

М. Э. ТАЛЫАНСКИЙ, Т. И. АТАБЕКОВА, И. Г. АТАБЕКОВ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РНК С БЕЛКОМ ПРИ СОВМЕСТНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ ДВУХ ШТАММОВ ВТМ

(Представлено академиком А. С. Спириным 3 XII 1974)

Известно, что при смешанном заражении растений двумя штаммами вируса табачной мозаики (ВТМ), один из которых температурочувствителен (*ts*) по гену структурного белка, а другой резистентен к температуре (*tr*), в неразрешающих для *ts*-мутанта условиях между вирусами может произойти комплементарное взаимодействие (^{2, 3, 5, 9, 10, 11}). Результатом такого взаимодействия является формирование частиц с маскированным геномом, содержащих РНК *ts*-мутанта и белковую капсиду, построенную из субъединиц структурного белка температуроустойчивого штамма-помощника. Следует отметить, что в данной ситуации РНК *ts*-мутанта не имеет возможности выбора гомологичного структурного белка, так как в смешанно зараженной клетке одновременно присутствуют РНК двух штаммов и белок лишь одного из них — полноценного.

С другой стороны, в условиях, когда существует возможность выбора гомологичного структурного белка (смешанное заражение при разрешающей для обоих штаммов ВТМ температуре), явление маскирования генома обнаружено не было (^{1, 2}). В этих условиях не удалось также выявить и явление фенотипического смешивания (образование вирусных частиц, содержащих капсиду, построенную из белковых субъединиц обоих штаммов). Отсутствие эффектов маскирования генома и фенотипического смешивания может являться следствием высокой специфичности взаимодействия РНК с белком и белковых субъединиц друг с другом при сборке вируса *in vivo*. Такой вывод представляется наиболее логичным, однако, не может быть сделан однозначно, так как нельзя исключить, что в условиях зараженной клетки места сборки частиц разных штаммов разобщены, т. е. что взаимодействие гетерологичных белков и РНК в принципе исключено.

Возможность моделирования процесса сборки ВТМ *in vitro* позволяет произвести оценку степени специфичности взаимодействия РНК с белком, освободившись, таким образом, от влияния обстоятельств, ограничивающих интерпретацию результатов опытов *in vivo*, и сопоставить эти результаты. В связи с этим нами было проведено исследование свойств вирусных частиц, реконструированных в смеси, содержащей два типа РНК и, соответственно, два типа белков двух штаммов. В работе использованы две пары штаммов ВТМ, ранее применявшиеся нами при смешанном заражении растений для изучения специфичности взаимодействия РНК с белком при сборке ВТМ *in vivo* (^{1, 2}): 1) комбинация природного штамма ВТМ U2 с обычным штаммом ВТМ *vulgare* и 2) комбинация штамма U₂ с *ts*-мутантом ВТМ по гену структурного белка Ni118. Перечисленные штаммы-партнеры являются серологически родственными, но антигенно не идентичными. Кроме того, эти пары вирусов легко могут дифференцироваться на соответствующих растениях-индикаторах. Так растения фасоли сорта «Pinto» образуют некрозы при заражении штаммом ВТМ *vulgare* и мутантом Ni118, растения табака сорта «Samsun EN» — при заражении штаммом U2 и мутантом Ni118. Растения *Nicotiana glutinosa* L. реагируют некрозообразованием на любой из использованных в работе вирусов.

Препараты вирусов получали методом дифференциального центрифугирования. Вирусный белок выделяли ацетатным методом (⁶), вирусную

Анализ матерпала, полученного при совместной реконструкции штаммов U2 и BTM vulgare

Инокулюм *	Инфекционность (средние цифры для 8—10 половин листьев)								
	Nicotiana glutinosa L.			Nicotiana tabacum «Samsun EN»			Phaseolus vulgaris «Pinto»		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
U2	83	48	85	66	120	382	0	0	0
U2 + AT _{U2}	5	1	4	0	2	11	0	0	0
U2	54	49	137	33	37	106	0	0	0
U2 + AT _{BTM}	58	45	130	34	38	99	0	0	0
BTM	103	52	48	0	0	0	—	99	48
BTM + AT _{U2}	93	56	47	0	0	0	—	94	42
BTM	73	41	96	0	0	0	—	90	43
BTM + AT _{BTM}	5	1	6	0	0	0	—	2	3
(U2 + BTM)	53	49	151	229	38	157	31	27	26
(U2 + BTM) + AT _{U2}	29	20	67	35	7	4	22	19	18
U2 + BTM)	56	40	102	90	39	149	21	25	40
U2 + BTM) + AT _{BTM}	16	17	67	53	28	45	2	3	3

* В качестве инокулюма использовали препараты реконструированных при 24° нуклеопротеидов в концентрации 50 мкг/мл. Препараты антител применяли в концентрации 600 мкг/мл. Римскими цифрами обозначены номера опытов.

РНК — фенольным методом (7). Реконструкцию проводили в 0,1 M фосфатном буфере pH 7,2—7,3 в течение 14—16 час. при 24° для пары BTM и U2 и при 24° и 33° для пары Ni118 и U2. Белок и РНК применяли в опытах по реконструкции в концентрациях 1,1 мкг/мл и 50 мкг/мл, соответственно. Седиментационный анализ белков проводили с использованием аналитической ультрацентрифуги Spinco E. Методы получения антисывороток, выделения из них γ G-глобулиновых фракций, содержащих необходимые антитела, их истощение гетерологичными штаммами вирусов, а также метод селективной нейтрализации описаны ранее (4, 5). Инфекционность препаратов реконструированных вирусов выражали как среднее число местных некрозов, образуемых на половине листа соответствующего растения-индикатора при заражении вирусом в концентрации 50 мкг/мл.

Было показано, что эффективность смешанной реконструкции с участием РНК и белков штаммов U2 и BTM vulgare, а также штаммов U2 и Ni118, судя по валовому выходу и инфекционности реконструированного нуклеопротеида, не отличается значительно от эффективности реконструкции каждого из этих вирусов в отдельности. Реконструированный материал обрабатывали препаратами γ G-глобулинов, выделенных из соответствующих антисывороток, и определяли его инфекционность на соответствующих растениях-индикаторах.

Из табл. 1 следует, что препарат γ G-глобулина из антисыворотки к BTM vulgare, истощенный очищенным препаратом U2 (AT_{BTM}), способен избирательно нейтрализовать инфекционность BTM, не влияя на инфекционность U2. Аналогичным образом препарат антител, выделенных из антисыворотки к U2 и истощенный BTM vulgare (AT_{U2}), избирательно нейтрализует U2, не действуя на обычный BTM. Инфекционность материала, смешанно реконструированного из U2 и BTM, для растений табака сорта «Samsun EN» (селективно выявляющих геном U2) почти полностью подавляется AT_{U2}, что свидетельствует об отсутствии или незначительном содержании частиц с маскированным геномом типа РНК_{U2} × белок_{BTM}. С другой стороны, некоторое уменьшение инфекционности на растениях табака «Samsun EN» в присутствии AT_{BTM} свидетельствует о наличии в

Таблица 2

Анализ материала, полученного при совместной реконструкции штаммов U2 и Ni118

Инокулом *	t, °C	Инфекционность (средние цифры для 8—10 половин листьев)					
		Nicotiana glutinosa L.†			Phaseolus vulgaris Pinto		
		I	II	III	I	II	III
U2	24	123	81	49	0	0	0
U2 + AT _{U2}		3	5	4	0	0	0
U2	24	81	25	38	0	0	0
U2 + AT _{Ni118}		81	22	35	0	0	0
Ni118	24	52	54	57	—	45	62
Ni118 + AT _{U2}		49	52	66	—	46	69
Ni118	24	106	34	60	—	37	57
Ni118 + AT _{Ni118} **		3	3	5	—	3	7
(Ni118 + U2)	24	101	57	78	58	32	34
(Ni118 + U2) + AT _{U2}		51	21	29	26	14	20
(Ni118 + U2)	24	70	47	52	38	60	42
(Ni118 + U2) + AT _{Ni118}		29	20	31	4	2	6
(Ni118 + U2)	33	127(78) ***	59(51)	67(45)	(28)	7(60)	11(39)
(Ni118 + U2) + AT _{U2}		2(1)	2(1)	4(2)	(0)	2(2)	0(3)
(Ni118 + U2)	33	100(128)	41(59)	35(38)	(35)	10(39)	8(29)
(Ni118 + U2) + AT _{Ni118}		89(120)	39(55)	33(44)	(32)	11(42)	5(34)

* То же, что в табл. 1, но использовали так же температуру 33°.

** В качестве AT_{Ni118} использовали антитела, полученные к антигенно идентичному штамму BTM vulgare.

*** В скобках указаны величины инфекционности препаратов, реконструированных с применением удвоенного количества белка U2.

смешанно реконструированном материале некоторого количества фенотипически смешанных частиц, белковая оболочка которых построена из белков обоих типов (BTM и U2). Препарат AT_{BTM} почти полностью ингибировал образование некрозов смесью U2 и BTM на растениях фасоли «Pinto» (селективно вывляющих в обычных условиях геном BTM vulgare). Это позволило предположить, что реконструированный материал не содержит также частиц с маскированным геномом BTM (типа РНК_{BTM}×белок_{U2}). Наряду с этим некоторое подавление инфекционности смеси на растениях фасоли в присутствии AT_{U2}, очевидно, свидетельствует о наличии в реконструированном материале фенотипически смешанных частиц, содержащих РНК обычного BTM и белки обоих использованных в реконструкции штаммов (BTM и U2).

Данные, полученные при анализе материала, реконструированного из смеси РНК и белков второй пары вирусов (U2 и Ni118), представлены в табл. 2. Эти результаты аналогичны результатам, полученным для пары U2 и BTM и свидетельствуют об отсутствии частиц с маскированным геномом типа РНК_{Ni118}×белок_{U2} и наличии некоторого количества фенотипически смешанных частиц, содержащих РНК мутанта Ni118 и белки обоих штаммов. Полученные данные не дают возможности судить о наличии или отсутствии частиц с маскированным геномом U2 в комбинации с Ni118, а также фенотипически смешанных частиц, содержащих геном U2, из-за отсутствия растений-индикаторов, реагирующих некрозообразованием на штамм U2, но не образующих некрозов при заражении мутантом Ni118.

При 33° белок ts-мутанта Ni118 подвержен денатурации с потерей растворимости, что исключает возможность его участия в реконструкции. В связи с этим реконструкционная смесь U2 и Ni118 при этой температуре является трехкомпонентной и содержит РНК двух штаммов и белок лишь одного из них — U2, причем в количестве, недостаточном для полного взаи-

модействия с РНК обоих штаммов. Можно было предположить, что в этих условиях белок U2 будет предпочтительнее взаимодействовать с гомологичной РНК, и только при увеличении его количества число вирионов, содержащих гетерологичные РНК и белок, значительно возрастает. Возможность образования таких вирионов (РНК_{Ni118}×белок_{U2}) была продемонстрирована нами ранее (2) при смешанном заражении растений штаммами U2 и Ni118 в неразрешающих для ts-мутанта условиях, т. е. в отсутствие активного белка Ni118.

Для проверки этого предположения была проведена смешанная реконструкция штаммов U2 и Ni118 при 33° с обычным (1:22) и удвоенным (1:44) соотношением РНК:белок в реконструкционной смеси. Инфекционность обоих реконструированных препаратов не отличалась значительно на растениях *N. glutinosa* L, однако на фасоли сорта «Pinto» (избирательно выявляющей геном Ni118) она была значительно выше в случае препарата, полученного с использованием удвоенного количества белка U2 (табл. 2). При обработке обоих препаратов АТ_{U2} происходило почти полное ингибирование инфекционности. Препараты АТ_{Ni118} на инфекционность не влияли (табл. 2). Эти результаты свидетельствуют о том, что: 1) инфекционность на растениях фасоли обусловлена присутствием в обоих препаратах частиц с геномом Ni118, маскированным белком U2 и 2) отношение числа таких частиц к общему количеству вирионов значительно выше в препарате, полученном с использованием удвоенного количества белка U2. Иными словами, при 33° в реконструкционной смеси U2 и Ni118 в условиях недостатка белка U2 происходит предпочтительное взаимодействие белка U2 с гомологичной РНК.

Таким образом, с использованием двух комбинаций штаммов ВТМ (U2 и ВТМ vulgare; U2 и Ni118) было показано, что при реконструкции в четырехкомпонентной системе, содержащей РНК и белки двух типов, не происходит образования частиц с маскированным геномом (или их количество крайне невелико). С другой стороны, имеет место образование значительного количества гомологично реконструированных (построенных из РНК и белка одного типа) и фенотипически смешанных частиц, которые присутствуют в смеси приблизительно в равных соотношениях. Следует заметить, что количественная оценка содержания разных типов частиц в смеси по инфекционности не является достаточно точной.

Наличие значительного количества гомологично реконструированных частиц, а также отсутствие частиц с маскированным геномом в смешанно реконструированном материале свидетельствует, по-видимому, о высокой степени специфичности взаимодействия РНК с белком при реконструкции ВТМ. Предпочтительное образование гомологичных вирионов U2 в трехкомпонентной реконструкционной смеси U2 и Ni118 при 33° в условиях недостатка белка U2 также свидетельствует об избирательности взаимодействия РНК с белком. Взаимодействие между белковыми компонентами, очевидно, также высоко специфично, так как в противном случае формирование значительного количества вирионов, содержащих гомологичные белковые субъединицы, было бы крайне маловероятно, учитывая, что белковая оболочка ВТМ содержит 2130 идентичных субъединиц и, следовательно, возможность ошибок в процессе сборки очень велика.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
2 XI 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. И. Атабекова, П. Д. Шаскольская, И. Г. Атабеков, Биол. науки, № 8, 116 (1972). ² М. Э. Тальянский, Т. И. Атабекова, И. Г. Атабеков, Докл. ВАСХНИЛ, № 6, 4 (1974). ³ П. Д. Шаскольская, И. Г. Атабеков и др., Биол. науки, № 8, 101 (1968). ⁴ J. G. Atabekov, V. K. Novikov et al., Virology, v. 41, 519 (1970). ⁵ J. G. Atabekov, N. D. Schaskolskaya et al., Virology, v. 41, 397 (1970). ⁶ H. Fraenkel-Conrat, Virology, v. 4, 1 (1957). ⁷ H. Fraenkel-Conrat, B. Singer, Virology, v. 23, 354 (1964). ⁸ H. Jouskusch, Naturwiss., B. 34C, 514 (1968). ⁹ B. Kassanis, C. Bastow, J. Gen. Virol., v. 10, 95 (1971). ¹⁰ Y. Okada, T. Ohno, Mol. Gen. Genetics, v. 114, 205 (1972). ¹¹ Sarkar, Mol. Gen. Genetics, v. 105, 87 (1969).