

Р. А. ВОЛКОВА, В. В. МЕСЯНИНОВ, Б. Ф. ПОГЛАЗОВ
**БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ БАЗАЛЬНЫХ ПЛАСТИНОК
БАКТЕРИОФАГА Т4Д**

(Представлено академиком А. С. Спириным 1 VII 1975)

Базальная пластинка *T*-четных бактериофагов является центральным элементом при сборке стержней и чехла и функционально важным элементом при адсорбции фага на бактериальной клетке. В результате интенсивных работ выяснилась сложность белкового состава базальных пластинок *T*-четных фагов (¹⁻³), идентифицированы продукты восьми генов, кодирующих структурные белки базальной пластинки (³) и выявлена их роль в формировании ее структуры (⁴⁻⁷). Таким образом, успехи в этой области привели к решению вопроса о тонкой структуре этого сложного элемента *T*-четных фагов.

Определение субъединичного состава базальной пластинки бактериофага Т4Д было целью настоящей работы.

Базальные пластинки получали из лизатов мутантов amE1437 и tsB34 по гену 19 бактериофага Т4Д (⁸). Ген 19 кодирует структурный белок хвостового стержня.

Меченые базальные пластинки получали, выращивая ts-мутант при 42° в 400 мл минимальной среды М9а по обычной схеме. Сразу после суперирифекции вносили ¹⁴C-гидролизат хлореллы (Срота, Чехословакия) из расчета 2 мкС/мл. По окончании выращивания добавляли 15 мл 3% раствора казеинового гидролизата. Нелизированные бактерии осаждали центрифугированием в течение 5 мин. при 15 000 *g*. Осадок суспендировали в 5 мл 0,01 *M* трис-HCl буфера (pH 7,4), содержащего 0,001 *M* ЭДТА. После добавления хлороформа и обработки ДНКазой (40 мкг/мл) и РНКазой (100 мкг/мл) в течение 1 часа при 37° удаляли бактериальные обломки при 3000 *g*. Концентрировали компоненты фагов центрифугированием в течение 3 час. при 274 000 *g* в роторе SW50.

Полученный таким образом концентрированный лизат смешивали с мечеными базальными пластинками, полученными обычным способом из 4 л лизата ts-мутанта и очищали центрифугированием в градиенте 10—45% сахарозы 35 мин., 274 000 *g*, 2°, в роторе SW50. Слой базальных пластинок, располагающийся в верхней части градиента, осаждали на SW50 3,5 часа при 274 000 *g* и суспендировали в 0,01 *M* трис-HCl буфере с 0,001 *M* ЭДТА pH 7,4. Контролировали чистоту препаратов при помощи электронного микроскопа «Hitachi-12» (Япония) и аналитической ультрацентрифуги «Spinco E».

Препарат, полученный из лизата ts-мутанта, содержал базальные пластинки со стержнем (базальные пластинки — стержень), которые не удалось разделить в сахарозном градиенте. Базальные пластинки, полученные из am-мутанта, были всегда гомогенными по составу и не содержали примеси стержней.

Препараты исследовали в 6; 8 и 10% полиакриламидном геле с додецилсульфатом Na (SDS) по методу Лэммли (⁹) с последующей радиоавтографией. Для радиоавтографии продольные срезы геля толщиной 1 мм высушивали под вакуумом и экспонировали на рентгеновскую пленку РТ6 (СССР) 1—3 недели.

При помощи электрофореза в полиакриламидном геле с SDS в составе базальных пластинок обнаружили помимо 7 основных белков (³) 3 минор-

мых компонента с молекулярными весами 22 000, 44 000, 48 000 (рис. 1).

В препарате базальные пластинки — стержень помимо перечисленных минорных компонентов обнаружили еще один с молекулярным весом 56 000. В этом же препарате присутствовал и стержневой белок с молекулярным весом 20 000. Что касается первого компонента, то, возможно, он закрепляется в структуре базальной пластинки при полимеризации стержня и легко диссоциирует в процессе выделения, если стержень не образуется. Пока трудно сказать, является ли он исходным кольцом стержня, служащим для контакта с базальной пластинкой, или является составной частью самой базальной пластинки. Установлено, что структурный белок стержня кодируется одним геном 19 (¹⁰), и в то же время известны мутанты по двум генам базальной пластинки, которые образуют базальные пластинки, неотличимые от нормальных, но не способные вызывать полимеризации стержневого белка (^{11, 12}). Поэтому мы полагаем, что белок с молекулярным весом 56 000 входит в состав базальной пластинки. При электрофорезе меченых базальных пластинок со стержнем мы выявили еще один белок с молекулярным весом 68 000. В процессе работы были уточнены молекулярные веса двух компонентов базальной пластинки, определенных ранее ориентировочно. Это белки с молекулярными весами 95 000 (II) и 140 000 (I).

Таким образом, в составе базальной пластинки бактериофага Т4Д было обнаружено 12 белков с молекулярными весами 22 000, 27 000, 34 000, 44 000, 46 000, 48 000, 56 000, 60 000, 68 000, 86 000, 95 000, 140 000.

Надо отметить, что морфогенез базальной пластинки контролируется продуктами 17 генов и, хотя часть из них, видимо, играет регуляторную роль и не включается в состав базальной пластинки, все же не исключена возможность того, что некоторые минорные структурные компоненты нам не удалось определить при помощи использованного метода.

Процентное соотношение полипептидных цепей, входящих в базальную пластинку, мы определяли, измеряя радиоактивность полос электрофореграммы меченых базальных пластинок на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Для этого вырезали окрашенные после электрофореза полосы или разрезали гель на диски толщиной 1 мм, помещали их во флаконы для счета с 0,5 мл 30% перекиси водорода и оставляли в закрытом состоянии при 37° при периодическом встряхивании. Через 20 час. добавляли по 10 мл диоксанового сцинтиллятора (60 г нафталина, 4 г 2,5-дифенилоксазола, 0,2 г дифенилоксазола, 200 г C₂H₅ОН довести до 1 л диоксаном).

Результаты определения процентного содержания различных субъединиц в базальной пластинке представлены в табл. 1. Исходя из наших данных по равновесному центрифугированию, молекулярный вес базальных пластинок равен $6,7 \cdot 10^7$ дальтон (⁸).

После определения процентного соотношения белков базальной пластинки, зная их молекулярный вес, мы смогли определить и субъединичный состав базальной пластинки (табл. 1).

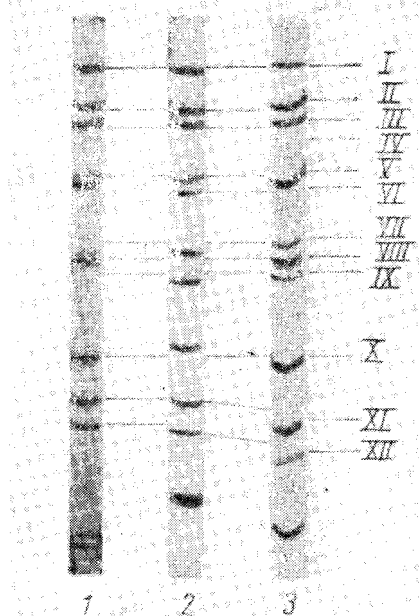


Рис. 1. Электрофореграммы белков базальной пластинки бактериофага Т4Д (10% полиакриламидный гель). 1 — базальные пластинки, полученные из ам-мутанта ам-E1137 фага Т4Д; 2 — базальные пластинки — стержень, полученные из ts-мутанта tsB31 фага Т4Д; 3 — радиоавтограмма электрофореграммы 2

Как видно из табл. 1, число субъединиц различного типа варьирует в пределах от 3 до 24. Больше всего субъединиц (24) приходится на белок с молекулярным весом 60 000. Из работы Хазелькорна ⁽⁶⁾ также следует, что белок с таким молекулярным весом должен быть представлен в базальной пластинке не менее чем 18 субъединицами и входит в состав коротких фибрилл ⁽⁷⁾.

Некоторые белки представлены 12 и более субъединицами. Из сопоставления данных Кинга ⁽³⁾ и настоящей работы следует, что продукты 9; 10; 11 и 12 генов соответствуют белкам II, V, X и XI (рис. 1), которые представлены 12 и более субъединицами, т. е., если учесть шестилучевую структуру

Таблица 1
Белковый состав базальных пластинок
бактериофага Т4Д

№ белка	Предполагаемый ген	Мол. вес	Содержание белка, %	Число субъединиц	
				расчетное	ближайшее целое число, кратное 3 или 6
I	7	140000	7,4	3,60	3
II	10	95000	17,4	12,30	12
III	6	86000	12,5	9,75	9
IV		68000	3,2	3,16	3
V	12	60000	21,2	23,95	24
VI		56000	2,7	3,23	3
VII		48000	4,3	6,00	6
VIII	8	46000	8,4	12,20	12
IX		44000	3,9	5,94	6
X	9	34000	8,7	17,50	18
XI	11	27000	8,2	20,40	21
XII		22000	2,1	6,40	6

базальной пластинки, эти белки в ее структуре могут быть ди-, три- и тетрамерами. Действительно, для перечисленных генов показана внутригенная комплементация ^(4, 13); поэтому продукты этих генов могут быть мультимерами.

По данным ряда авторов, гены 9; 10; 11 фага Т4 сцеплены, т. е. синтез их продуктов должен давать равное количество копий. Однако из настоящей работы следует, что в целой базальной пластинке их количество разное. Таким образом, по-видимому, включение этих полипептидов в базальную пластинку регулируется на уровне сборки.

Для дальнейшей работы необходимо было найти способ избирательного разрушения базальной пластинки. Исследовали влияние таких факторов, как понижение рН среды и обработка мочевиной. Обработку проводили путем постепенного добавления эквимольного количества реагентов ⁽¹⁴⁾. Контролировали опыт при помощи электронной микроскопии.

Выяснилось, что при обработке как одним, так и другим реагентом очень быстро происходит превращение базальных пластинок в звездообразную форму: при обработке уксусной кислотой при рН 4,5 и при обработке 1 М мочевиной 2 часа при 45°. Дальнейшее увеличение концентрации реагентов приводило к постепенному неупорядоченному разрушению базальных пластинок, при этом первыми начинали разрушаться лучи звезд. Надо отметить, что при обработке низкими концентрациями мочевины (до 3 М) при 37° можно было наблюдать разрушение базальных пластинок и без превращения в звезды. При этом замечен интересный факт. Обработка 3М мочевиной при 37° в течение 1 часа приводила к образованию базальных пластинок с отверстием вместо центральной пробки, но с размерами, соответствующими размерам интактной базальной пластинки (рис. 2). Таким образом, образование отверстия не нарушает стабильности базальной

пластинки фага и не вызывает перестройки в звезду. На основании этого наблюдения можно также предположить, что центральное отверстие при переходе базальной пластинки из гексагональной формы в звездчатую образуется за счет выталкивания центральной пробки, а не за счет ее перестраивания (рис. 2, см вкл. к стр 435).

Приносим искреннюю благодарность Е. П. Сенченкову за консультации при работе с изотопами.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
21 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. J. Cummings, A. R. Kusy et al., J. Virol., v. 6, 4, 545 (1970). ² Б. Ф. Поглазов, Л. П. Родикова, Р. А. Султанова, Молекулярная биол., т. 7, 4, 573 (1973).
³ J. King, N. Mykolajewycz, J. Mol. Biol., v. 75, 2, 339 (1973). ⁴ J. E. Flatgaard, Ph. D. Thesis, California Institute of Technology, 1969. ⁵ E. Terzaghi, B. E. Terzaghi, J. Biol. Chem., v. 249, 16, 5119 (1974). ⁶ W. S. Mason, R. Haselcorn, J. Mol. Biol., v. 66, 3, 445 (1972). ⁷ S. S. Kells, R. Haselcorn, J. Mol. Biol., v. 83, 4, 473 (1974). ⁸ R. A. Sultanova, V. Ya. Chernayk, B. F. Poglazov, Biochim. et biophys. acta, v. 386, 369 (1975).
⁹ U. K. Laemmli, Nature, v. 227, 5259, 680 (1970). ¹⁰ J. King, U. K. Laemmli, J. Mol. Biol., v. 75, 2, 315 (1973). ¹¹ J. King, J. Mol. Biol., v. 58, 3, 693 (1971). ¹² E. Meezan, W. B. Wood, J. Mol. Biol., v. 58, 3, 685 (1971). ¹³ H. Bernstein, R. S. Edgar, L. H. Denhardt, Genetics, v. 51, 6, 987 (1965). ¹⁴ C. M. To, E. Kellenberger, A. Eisenstark, J. Mol. Biol., v. 46, 3, 493 (1969).

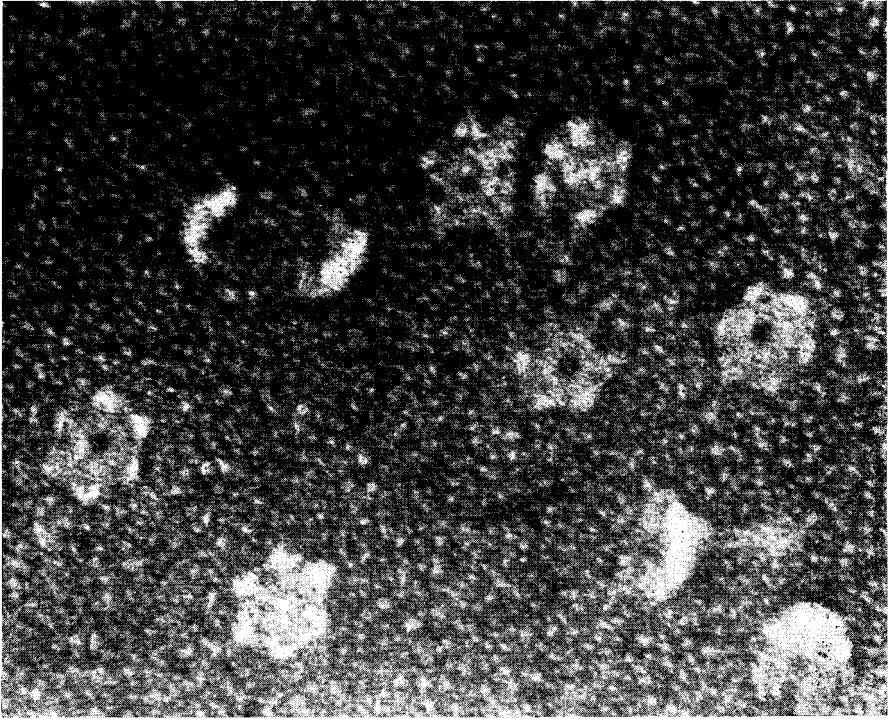


Рис. 2. Электронная микрофотография базальных пластинок бактериофага Т4Д, обработанных 3 М мочевиной. Контрастирование при помощи 2% нейтрализованной до pH 7,4 фосфорновольфрамовой кислоты (300 000×)