

Виявлення лектиноподібних білків у рослинах тютюну та дурману, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки

О. Г. Коваленко, Т. А. Телегєєва, А. М. Кириченко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

Методами гель-фільтрації та афінної хроматографії досліджували білки рослин тютюну та дурману, здатні взаємодіяти з дріжджовими мананами, іммобілізованими на сфероні H-1000. Встановлено, що в надчутливих рослинах, інфікованих ВТМ, утворюються лектиноподібні білки, здатні до лігандної взаємодії з дріжджовим α -(1,2)- α (1,3)- α (1,6)-зв'язаним мананом. Раніше показано, що цей біополімер може втручатися у дію надчутливої вірус-індукованої реакції, модулюючи, можливо, активність клітинного(них) глікополімеру-індуктора(ів). Припускається, що в процесі локалізації вірусної інфекції лектиноподібні білки можуть переходити у розчинну форму і виконувати регуляторні функції завдяки специфічній білково-вуглеводній взаємодії з цим(и) індуктором(ами).

Вступ. В останні роки в літературі активно дискутується питання про участь лектинів у процесах упізнавання і взаємодії біополімерів та клітин [1]. Завдяки тому, що лектини (подібно антитілам) багатовалентні і мають два або чотири активних центри, вони можуть одночасно зв'язувати різні макромолекули, які містять відповідні даному лектинові вуглеводневі групи. Ця властивість лектинів дозволяє рослині впізнавати в складі глікопротеїнів, гліколіпідів, протеогліканів та інших глікокон'югатів, що знаходяться на поверхні клітин фітопатогенних мікроорганізмів, певні моно- чи олігосахариди і реагувати на вторгнення чужорідної інформації неспецифічними змінами метаболізму рослини-хазяїна. Концепція білково-вуглеводної взаємодії при вивченні механізму стійкості вищих рослин до фітопатогенних бактерій і грибів вже досить добре розроблена [2, 3]. Проте стосовно ролі лектинів у стійкості рослин до вірусів ця проблема в літературі в повній мірі не висвітлена, хоча й робилися припущення щодо здатності лектинів захищати рослини від вірусів [4]. Подібні функції приписували і ендегеним олігосахаридам

[5], глікопротеїнам апопласту [6] та компонентам клітинних стінок рослин [7].

Вивчаючи механізми дії дріжджових полісахаридів, ми звернули увагу на те, що нейтральні манани, хоча й не можуть на відміну від манансульфатів індукувати у рослин розвиток вірусостійкості *de novo*, але здатні втручатися в реалізацію вірус-індукованих захисних реакцій, позаяк у помірних концентраціях вони пригнічують інфекційність вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) у надчутливих і не пригнічують у чутливих до цього вірусу рослинах [8]. Грунтуючись на таких спостереженнях, ми припустили існування у надчутливих рослин стадій локалізації вірусної інфекції, які можуть підсилюватися екзо- і ендегеними глікокон'югатами [8] завдяки специфічній білково-вуглеводній взаємодії [9]. В результаті розроблено гіпотетичну модель ініціації вірус-індукованої надчутливої реакції за участі ендегених глікополімерів (ГП)-індукторів, глікономерів-супресорів та лектиноподібних білків (ЛПБ) [10].

Метою цієї роботи було виявлення в інфікованих ВТМ рослинах тютюну та дурману ЛПБ, які можуть специфічно зв'язуватися з дріжджовими мананами — молекулярними моделями ендегених (клітинних) ГП-індукторів.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень слугували: штам U₁ ВТМ, надчутливі до нього рослини тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Імунний 580 та сприйнятливо дефіцитного за N-геном мутанту цього сорту, а також надчутливі рослини дурману (*Datura stramonium* L.).

Рослини вирощували в теплиці у весняно-літній період за звичайних умов. Дослідні рослини інфікували очищеним препаратом ВТМ, контрольні — обробляли в такий же спосіб водою чи відповідним буфером. Інфіковані та контрольні листки для аналізів відбирали в динаміці інфекції через 1, 4 та 7 діб після інокуляції.

Досліджували вільні і зв'язані структурно речовини з листків здорових та інфікованих ВТМ рослин. Для солюбілізації структурно зв'язаних речовин з клітин застосовували послідовну обробку рослинних гомогенатів 1,5 М розчином NaCl, 1 %-ми розчинами тритону X-100, дезоксихолевої кислоти та гвіну-60.

Клітинні екстракти з листя тютюну отримували гомогенізацією листя в 0,1 М фосфатному буфері, що містив 0,15 М NaCl (ФБС) із наступним центрифугуванням (105000 g, 90 хв). Міжклітинну рідину видаляли після інфільтрації ізольованого листя ФБС-буфером, що містив 1 М NaCl, та наступного центрифугування (8000 g, 20 хв) і ліофілізації.

Для вивчення клітинної локалізації речовин, що мають антивірусну і гемаглютинуючу активності, ФБС-екстракти з ураженого (7 діб після інокуляції ВТМ) та здорового листя розділяли на розчинну (105000 g — супернатант), мікросомно-рибосомну (105000 g — осад) та ядерно-хлоропластно-мітохондріальну фракції (17000 g — осад) за допомогою диференційного центрифугування, як описано в роботі [11]. Солюбілізацію структурно зв'язаних компонентів з органел здійснювали 1 %-м розчином тритону X-100 в 0,1 М ФБС, рН 7,4.

Модельними ГП-індукторами служили розгалужений $\alpha(1,2)$ - $\alpha(1,3)$ - $\alpha(1,6)$ -зв'язаний манан (РМ) *Candida tropicalis* і лінійний $\beta(1,3)$ - $\beta(1,4)$ -зв'язаний манан (ЛМ) *Rhodotorula rubra*, іммобілізовані на сфероні Н-1000 [12]. Ці носії використовували як афінні сорбенти, заповнюючи ними колонки (1 × 13 см) та зрівноважуючи 0,1 М ФБС.

Одержані екстракти спочатку фракціонували за допомогою розділювальної хроматографії на колонці (1 × 13 см) з біогелем Р-100 («Bio-Rad», США). Речовини з колонки елюювали 0,1 М ФБС-буфером, рН 7,4, процес елюції реєстрували за допомогою проточного спектрофотометра Uvicord S-II («ЛКВ», Швеція). Фракції об'ємом 1,2 мл збирали за допомогою колектора Yargo («BioMark,

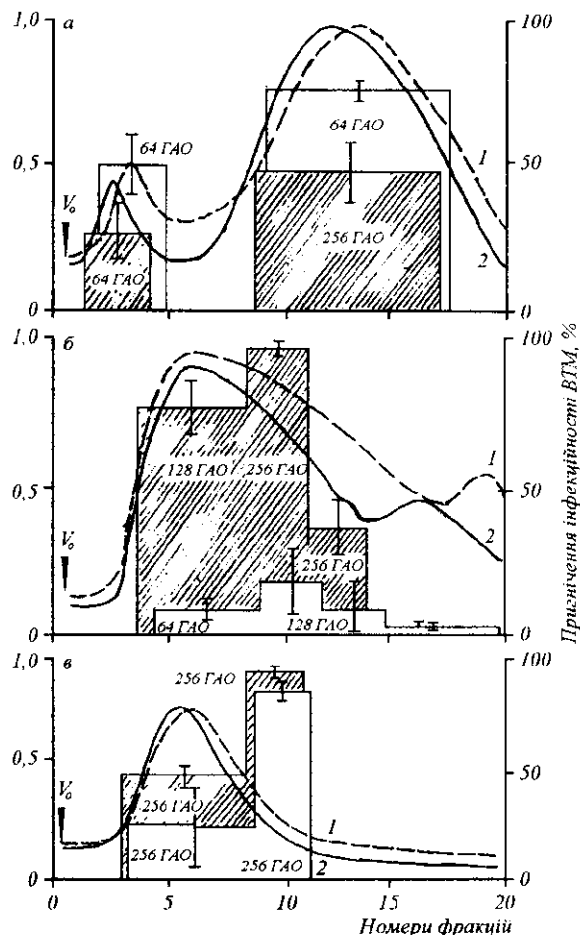


Рис. 1. Фракціонування розчинних (а) і структурно зв'язаних (б, в) компонентів здорових (1) та уражених ВТМ (2) рослин дурману на біогелі Р-100, визначення їхньої антивірусної і гемаглютинуючої активностей. Речовини з колонки (1 × 13 см) елюювали 0,1 М ФБС, рН 7,4. Активність дослідних (заштриховані колонки) і контрольних (світлі колонки) екстрактів по відношенню до ВТМ визначали на листі дурману. Гемаглютинуюча активність (на рисунку вказана в гемаглютинуючих одиницях — ГАО) в реакції з еритроцитами кроля

Інс.», Швеція) та аналізували на наявність ГА- і антивірусної активностей, як описано в роботі [13], а також методами афінної хроматографії.

Реакцію гемаглютинації проводили в одноразових полістирольних планшетах з трипсинізованими кролячими еритроцитами, фіксованими 2 %-м розчином глутарового альдегіду [13].

Вміст білка в препаратах визначали за методом Бредфорда [14].

Результати дослідів обробляли статистично та подавали у вигляді середніх похибок середніх величин або їхніх довірчих інтервалів.

Результати і обговорення. З огляду на те, що

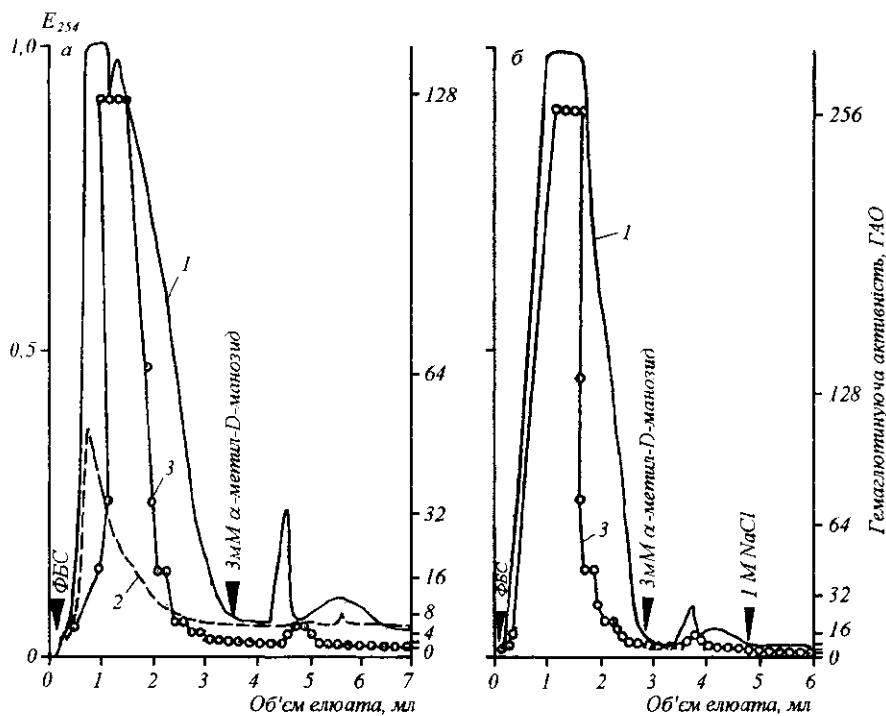


Рис. 2. Лектинова специфічність афінних колонок, виготовлених на основі розгалуженого (а) та лінійного (б) дріжджових мананів, іммобілізованих на сфероні Н-1000. На рисунках наведено профілі елюції конканаваліну А (КонА, 1) та фітогемаглютиніну А (2), реєстровані за допомогою проточного денситометра (при довжині хвилі 254 нм); кривою 3 позначено гемаглютинуючу активність фракцій КонА (в ГАО). Сорбцію лектинів на афінних колонках (1 × 13 см) проводили у ФБС-буфері при кімнатній температурі, десорбцію — послідовно 0,1 М ФБС, 3 мМ α-метил-Д-манозидом та 1 М NaCl за тих же умов

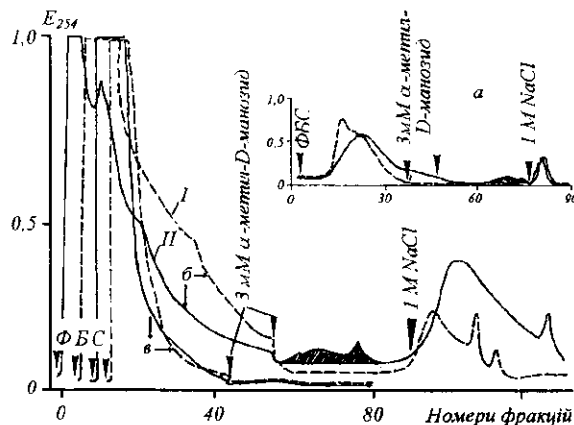


Рис. 3. Афірна хроматографія розчинних і структурно зв'язаних речовин, екстрагованих із листя здорових (I) та інфікованих ВТМ (II) рослин дурману, на РМ-сфероні. Розчинні речовини із листя екстрагували 0,1 М ФБС, рН 7,4 (а); зв'язані — 1 %-м тритоном X-100 (б) або 1,5 М NaCl у ФБС (в). Умови афінної хроматографії подано на рис. 2

рослини дурману мають надзвичайно ефективний механізм локалізації вірусної інфекції, що супроводжується утворенням так званих «самолімітуючих некрозів», важливо було спочатку дослідити зміни вмісту і локалізації речовин, які мають антивірусну та гемаглютинуючу активності, в рослинах цього виду, уражених ВТМ. За допомогою розділювальної хроматографії нами досліджено

вільні і зв'язані речовини, що локалізовані в пострібосомній (рис. 1, а), рибосомно-мікросомній (рис. 1, б) та ядерно-хлоропластно-мітохондріальній (рис. 1, в) фракціях клітин дурману.

У результаті встановлено, що як у здорових, так і інфікованих ВТМ рослинах присутні речовини, здатні пригнічувати інфекційність ВТМ та аглютинувати кролячі еритроцити. Між тим, суттєве підвищення антивірусної активності (при незначній різниці в гемаглютинуючій активності) речовин під впливом вірусної інфекції відмічено нами лише у фракції б (рис. 1), що може свідчити про зв'язок цих речовин з мікросомно-рибосомною фракцією клітин. У розчинній фракції а (рис. 1) вірус-індуковане підвищення гемаглютинуючої активності спостерігалось лише серед «низькомолекулярних» речовин при незначній різниці в їхній антивірусній активності. Якихось відмінностей в активностях структурно зв'язаних речовин, вилучених з клітинних органел (фракція в, рис. 1) у наших дослідів не знайдено.

Таким чином, ВТМ-інфекція може індукувати синтез у рослин цитоплазматичних антивірусних чинників, імовірно, асоційованих з мембранним апаратом клітин. Все ж антивірусна активність екстрактів строго не корелює з вмістом у них «нових» компонентів. Тому можна припустити, що виявлені вірус-індуковані речовини можуть виконувати не лише власне антивірусні, але й інші, можливо, регуляторні функції. Важливу власти-

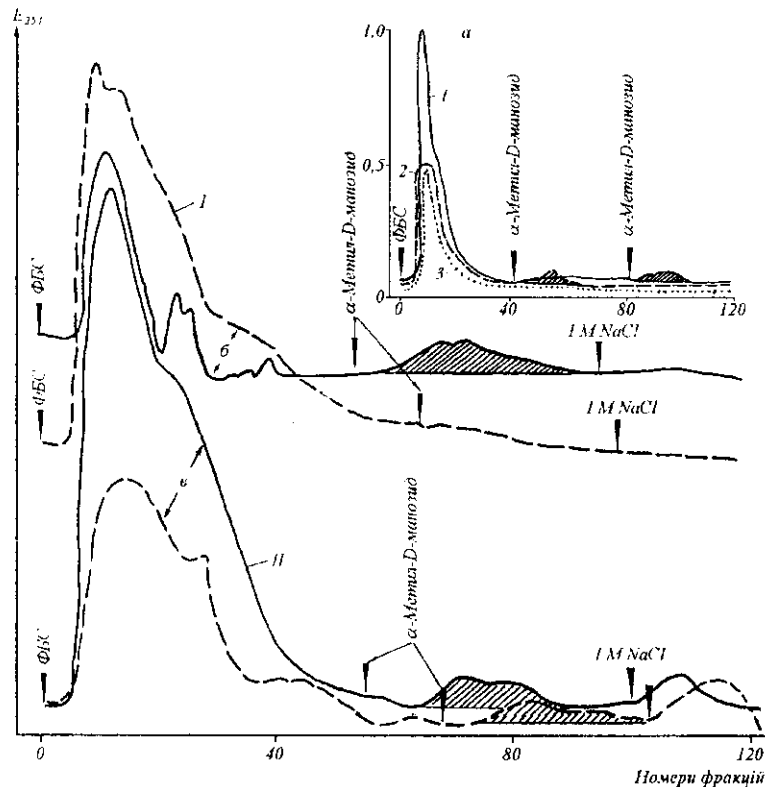


Рис. 4. Афинна хроматографія зв'язаних (а — екстракція: 1 — 1 %-м твіном-60; 2 — 1 %-м тритоном X-100; 3 — 1 M NaCl) і розчинних (б, в) речовин з листя здорових (I) і уражених ВТМ (II) рослин надчутливого сорту тютюну Імунний 580 (а, б) і його сприйнятливого ревертанта (в) на колонці з РМ-сфероном. Умови афинної хроматографії подано на рис. 2

вістю цих компонентів може бути їхня лектинова активність, вивчення якої ми мали на меті провести за допомогою модельних речовин — РМ і ЛМ, відомих як індукторів чи модуляторів вірусостійкості у надчутливих рослинах [8, 10].

Попередні дослідження РМ та ЛМ, іммобілізованих на сфероні, як афинних сорбентів виявили їхню спорідненість до D-манозеспецифічного лектину конканаваліну А (КонА); D-галактозеспецифічний фітогемаглютинін практично не взаємодіяв з ними (рис. 2). Причому РМ-сферон активніше зв'язувався з КонА, ніж ЛМ-сферон, можливо, за рахунок того, що цей лектин здатний розпізнавати α - і β -глікозидні зв'язки [15], а також завдяки великій кількості (> 40 %) $\alpha(1,2)$ -зв'язаних манозильних залишків у РМ з вільними ОН-групами переважно при С-4 вуглецевого ланцюга манопіранози [16]. Тому в наступних дослідках як афинний сорбент використовували переважно РМ-сферон.

Встановлено, що серед розчинних речовин, виділених з листків дурману, інфікованих ВТМ, присутні два білкових компоненти, що специфічно зв'язуються з РМ-сфероном і елююються з колонки 10 мМ розчином α -метил-D-манозиту. Три білкових компоненти виявлено і серед зв'язаних речовин, екстрагованих з органел ВТМ-інфікованих

листіків дурману тритоном X-100 (рис. 3). У здорових рослинах дурману таких речовин нами не знайдено.

Стосовно тютюну, то структурно зв'язані ЛПБ, які проявляють спорідненість до РМ, виявлено і в здорових рослинах (рис. 4, а). Враховуючи те, що кількість білка, який солюбілізується з клітин неіонними детергентами, відносно невелика, її питома активність у порівнянні з розчинною фракцією білка досить значна, особливо у фракціях, вилучених 1 %-м розчином твіну-60 (таблиця). Зараження надчутливого сорту тютюну Імунний 580 ВТМ призводить до появи принаймні двох ЛПБ у розчинній фракції (рис. 4, б). На противагу цьому, профілі елюції білкових компонентів здорових та інфікованих ВТМ рослин сприйнятливо до цього вірусу мутанту, вилучених з афинного сорбента специфічним елюентом (10 мМ розчином α -метил-D-манозиту), суттєво між собою не відрізняються (рис. 4, в).

Таким чином, у рослинах двох видів з родини пасльонових виявлено ЛПБ, здатні до лігандної взаємодії з дріжджовим α -мананом, використаним як модель ГП-індуктора. Очевидно, що в процесі локалізації вірусної інфекції у надчутливих рослин вони можуть активізуватися і переходити в розчинну форму, виконуючи певні регуляторні функції в

Вміст і гемаглютинуюча (ГА) активність зв'язаних білків в інтактних рослинах тютюну сорту Імунний 580

Фракції білка, екстраговані зі структурних елементів клітини	Вміст білка, мг/г сирої маси листя	ГА-активність	
		ГАО	ГАО/мкг білка
1,5 М NaCl	0,13	—	—
1 %-й тритон X-100	0,41	8	19,5
1 %-ва дезоксихолева кислота	0,24	4	16,6
1 %-й твін-60	0,10	16	160,0

Примітка. «—» — не досліджували; ГАО — гемаглютинуюча одиниця.

реалізації надчутливої реакції. Вивчення цих речовин дасть можливість досконаліше дослідити їхню будову, фізико-хімічні властивості та функціональну активність. Певний інтерес становить також аналіз клітинних компонентів іншої природи, зокрема, вуглеводмісних біополімерів, здатних активуватися у надчутливих рослин за вірусної інфекції і взаємодіяти як *in vitro*, так і *in situ* з відповідними ЛПБ. Вирішенню поставлених завдань і будуть присвячені наші подальші дослідження.

O. G. Kovalenko, T. A. Telegeeva, A. M. Kyrychenko

Discovery of lectin-like proteins in the tobacco and datura plants, infected by tobacco mosaic virus

Summary

The plant proteins of tobacco and datura able to interact with yeast mannans immobilized on spheron H-1000 have been studied by gel-filtration and affinity chromatography. The hypersensitive plants infected by TMV have been established to produce lectin-like proteins capable to interact as ligands with the yeast $\alpha(1,2)$ - $\alpha(1,3)$ - $\alpha(1,6)$ -connected mannan. Previous study showed this biopolymer can be involved in the hypersensitive virus-induced reaction, probably modulating the action of cellular glycopolymer-inductor(s). At the virus infection localisation the lectin-like proteins are suggested to convert into a soluble form and to function as a regulator owing to their specific interaction with the inducer(s).

A. G. Kovalenko, T. A. Telegeeva, A. H. Kyrychenko

Обнаружение лектиноподобных белков в растениях табака и дурмана, инфицированных вирусом табачной мозаики

Резюме

Методами гель-фільтрації та афінної хроматографії досліджували білки рослин табака і дурмана, способні взаємодіяти з дрожжевими маннанами, іммобілізованими на сфероне H-1000. Установлено, що в сверхчувствительных растениях, зараженных вирусом табачной мозаики, образуются лектиноподобные белки, способные к лигандному взаимодействию с дрожжевым $\alpha(1,2)$ - $\alpha(1,3)$ - $\alpha(1,6)$ -связанным маннаном. Ранее показано, что этот биополимер может вовлекаться в сверхчувствительную вирус-индуцированную реакцию, вероятно, модулируя действие клеточного(ых) гликополимера-индуктора(ов). Предполагается, что в процессе локализации

вирусной инфекции лектиноподобные белки могут переходить в растворимую форму и выполнять регуляторные функции благодаря специфическому взаимодействию с этим(и) индуктором(ами).

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шарон Н., Лис Х. Углеводы в клеточном распознавании // В мире науки.—1993.—№ 2, 3.—С. 104—112.
2. Любимова А. В., Салькова Е. Г. Лектин-углеводное взаимодействие во взаимоотношениях растение—патоген // Прикл. биохимия и микробиология.—1988.—24, № 5.—С. 595—606.
3. Albersheim P., Darvil G. Oligosaccharine // Sci. Amer.—1985.—25, N 3.—P. 44—50.
4. Sundaresan R. V. S., Kimmins W. C. Effect of virus infection on the cell wall composition of lesions on lesion host *Phaseolus vulgaris* // Ann. Bot.—1981.—47, N 2.—P. 287—289.
5. Fritig B., Kauffman S., Dumas S., Geoffroy P., Kopp M., Legrand M. Mechanism of hypersensitivity reaction in plants // Plant Resistance to Viruses (Ciba Fund. Symp. 133).—Chichester; New York: Wiley J. & Sons, 1987.—P. 92—108.
6. Wieringa-Brants D. H., Dekker W. C. Induced resistance in hypersensitive tobacco against tobacco mosaic virus by injection of intercellular fluid from tobacco plants with systemic acquired resistans // Phytopathology.—1987.—118, N 2.—P. 165—170.
7. Modderman P. M., Schot C. P., Klis F. M., Wieringa-Brants D. H. Acquired resistance in hypersensitive tobacco against tobacco mosaic virus, induced by plant cell wall components // Phytopath. Z.—1985.—113, N 2.—P. 165—170.
8. Коваленко О. Г., Телегеева Т. А., Штакун А. М., Погоріла З. О. Вплив деяких моно- і полісахаридів на локалізацію вірусної інфекції та індуковану вірусостійкість у рослин // Биополимеры и клетка.—2000.—14, № 1.—С. 53—59.
9. Kovalenko A. G. Phytolectins: a possible base of antiviral activity of carbohydrate polymers in the hypersensitive host plant // Recent Results in Plant Virology: Symp. held in the Castle Reinhardbrunn (DDR, March 23rd—March 27th, 1986): Summaries.—Berlin, 1986.—P. 50—51.
10. Коваленко А. Г. Белок-углеводное взаимодействие в реализации устойчивости растений к вирусам // Микробиол. журн.—1993.—55, № 6.—С. 76—91.
11. Kovalenko A. G., Grabina T. D., Kolesnik L. V., Didenko L. F., Oleschenko L. T., Olevinskaya Z. M., Telegeeva T. A. Virus resistance induced with mannan sulphates in hypersensitive host plants // J. Phytopath.—1993.—137, N 2.—P. 133—147.
12. Kovalenko A. G., Yamskov I. A. Yeast mannans as affinity sorbents for lectins // Book of Abstrs. 15th Int. Lect. Conf.—Szeged, 1993.—P. 54.
13. Коваленко А. Г., Грабина Т. Д., Коваленко Э. А., Пилипенко В. Г. Индукция устойчивости к вирусу табачной мозаики и изменения в составе растворимых белков у табака // Микробиол. журн.—1987.—49, № 3.—С. 80—86.
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.—1976.—72, N 1.—P. 248—254.
15. Хьюз Р. Гликопротеины.—М.: Мир, 1985.—140 с.
16. Коваленко О. Г., Шашков О. С., Васильев В. М., Телегеева Т. А. Структурні особливості та біологічна активність мананів *Candida spes* H // Биополимеры и клетка.—1995.—11, № 3—4.—С. 88—95.

УДК 578.23.4:578.28.282:578.28.283
Надійшла до редакції 12.11.01