

Афінна хроматографія глікобіополімерів чутливих і надчутливих рослин тютюну, уражених вірусом тютюнової мозаїки

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

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

Методом афінної хроматографії в рослинах надчутливого сорту тютюну Імунний 580, уражених вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ), через 1 добу після інокуляції виявлено позаклітинні вуглеводемісний біополімери, відсутні у здорових рослинах. Подібні біополімери не виявляються в тканинах інфікованого ВТМ чутливого мутанта цього сорту. Оскільки ці біополімери в процесі афінної хроматографії здатні специфічно зв'язуватися з конканаваліном А, але не з аглютиніном зародків пшениці, в їхньому складі вуглеводними компонентами можуть слугувати маноза та/або глюкоза. Обговорюється можлива функціональна роль виявлених біополімерів в ініціації у рослин вірусіндукованої надчутливої реакції.

Ключові слова: вірус тютюнової мозаїки, надчутлива реакція, глікобіополімери, лектини, афінна хроматографія.

Вступ. Ураження надчутливих рослин тютюну вірусною інфекцією призводить до значних змін їхнього клітинного метаболізму, зокрема обміну білків і вуглеводів. Такі зміни можуть бути як наслідком інфекції, так і чинником вірусостійкості. В літературі вже є немало робіт, присвячених вивченню білків, які утворюються в надчутливих рослинах у процесі розвитку вірусної інфекції. Деякими авторами в рослинних тканинах виявлено вірусіндуковані клітинні компоненти білкової і глікопротеїнової природи, які можуть спричинювати вірусостійкість. Це — вірусні інгібітори [1, 2], індуктори вірусостійкості [3] та патогенезасоційовані білки [4].

Проте все ще залишається нез'ясованим, чи можуть вони впливати на надчутливу реакцію рослин. Дотепер невідомо також, яка роль в ініціації надчутливої реакції належить білку 131 кДа —

продукту гена *N*, виявленому у надчутливих рослин тютюну, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ) [5].

У зв'язку з вищевикладеним нами висловлено думку про те, що в ініціації надчутливої реакції і пов'язаних з нею механізмів локалізації вірусної інфекції та індукованої вірусостійкості важлива роль належить білково-вуглеводній взаємодії за участі лектиноподібних білків (ЛПБ), з одного боку, та відповідних глікобіополімерів (ГБП), — з іншого [6]. На основі цієї ідеї розроблено гіпотетичну модель ініціації у рослин вірусіндукованої надчутливої реакції. Для підтвердження висунутих гіпотетичних положень вперше експериментально змодельовано стан індукції та супресії надчутливої реакції за допомогою відповідних моно- і полісахаридів [7], знайдено вірусіндуковані ЛПБ [8] та інтенсивне накопичення білків і вуглеводів у надчутливих рослинах, особливо на ранніх стадіях вірусної інфекції [9].

Таблиця 1

Вміст білків і вуглеводів у ліофільно висушених препаратах міжклітинної рідини з листя тютюну сорту Імунний 580, здорового і ураженого ВТМ, через 1 добу після інокуляції

Інокулюм	Білки, + Вуглеводи, +			
	мкг/мл	% від сухої маси	мкг/мл	% від сухої маси
ВТМ	400	4,0	12	6,0
Вода	340	3,4	10	5,0

Таблиця 2

Вміст білків і вуглеводів в осадах, отриманих з міжклітинної рідини здорових рослин тютюну сорту Імунний 580 різними способами

Осад	Білки, + Вуглеводи, +			
	мкг/мл	% від сухої маси	мкг/мл	% від сухої маси
Після висолювання $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2^*$	800	40,0	8	20,0
Після осадження етанолом (осад 1)	600	30,0	22	55,0
Після переосадження етанолом (осад 2)	600	30,0	4	10,0

*70 %-ве насичення.

Мета цієї роботи полягала у виявленні ГБП, специфічних до певних лектинів, у рослинах чутливого і надчутливого тютюну, ураженого ВТМ, методом афінної хроматографії.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень слугували: ВТМ (штам U_1), надчутливі до нього рослини тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Імунний 580 та його сприйнятливо-дефіцитного за *N* геном мутанта. Зразки з дослідних (інокульованих ВТМ) та контрольних (оброблених у такий самий спосіб водою) рослин відбирали у динаміці вірусної інфекції через 1, 4, і 7 діб після інокуляції.

Клітинні екстракти одержували гомогенізацією листя в 0,1 М ГСМ-буфері (0,1 М гліцин, 0,01 М $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_3 , рН 8,0) та наступним центрифугуванням (35000 g, 20 хв). Міжклітинну рідину одержували після інфільтрації листя 0,1 М ГСМ-буфером, що містив 1 М NaCl , та центрифугування (10000 g, 10 хв) без попередньої гомогенізації. Із препаратів клітинних екстрактів та міжклітинної рідини ГБП осаджували трьома об'ємами етанолу. В осадах визначали вміст білків за

методом Бредфорд [10], вуглеводів — 0,2 %-м антроном у концентрованій H_2SO_4 [11] і аналізували за допомогою афінної хроматографії.

Як носії в колонках (1 × 4 см) використовували конканавалін А (КонА) або аглютинін із зародків пшениці (wheat germ agglutinin, WGA), іммобілізовані на сефарозі («Лектинотест», Україна). Вміст колонок зрівнювали 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,4), що містив 0,15 М NaCl (ФБС). Речовини з колонок послідовно елюювали ФБС і 50 мМ розчинами відповідно α -метил-D-манозиду і N-ацетил-D-глюкозаміну. Носії регенерували послідовним промиванням 0,05 М боратним буфером, рН 8,8, та 1 %-м розчином оцтової кислоти. Як стандарти для перевірки ємності афінних сорбентів КонА і WGA використовували відповідно дріжджовий розгалужений манан і хітозан, препаративани відповідно з дріжджів [12] і хітину [13].

Процес елюції речовин з афінних колонок реєстрували за допомогою проточного спектрофотометра Uvicord S-II («LKB», Швеція), сполученого з самописцем КСП-4. Фракції об'ємом 1—2 мл збирали за допомогою колектора Yargo («BioMark, Inc.», Швеція) і аналізували на наявність білків та вуглеводів, як зазначено вище.

Результати і обговорення. У попередніх дослідженнях [8] виявлено значні зміни у білково-вуглеводному комплексі та антивірусній активності клітинних і міжклітинних речовин ВТМ-інфікованих надчутливих рослин тютюну. Знайдені закономірності дають підставу припустити утворення під дією вірусної інфекції в надчутливих рослинах речовин, скоріш за все, глікопротеїнової природи (ГБП), які можуть специфічно і зворотно взаємодіяти з лектиноподібними білками і в такий спосіб брати певну участь в ініціації надчутливої реакції. Відтак нам належало з'ясувати, чи здатна ВТМ-інфекція індукувати у надчутливих рослин утворення ГБП, які б вибірково і зворотно зв'язувалися з лектином певної вуглеводної специфічності.

Для одержання препаратів ГПБ, необхідних для афінної хроматографії, а також для оптимізації умов їхнього вилучення випробовували два варіанти осадження біополімерів, а саме: осадження етанолом і висолювання сульфатом амонію.

Результати визначення вмісту білків і вуглеводів у нативних препаратах міжклітинної рідини та після виділення з неї ГБП наведено в табл. 1 і 2. Як видно з представлених даних, вміст білків і

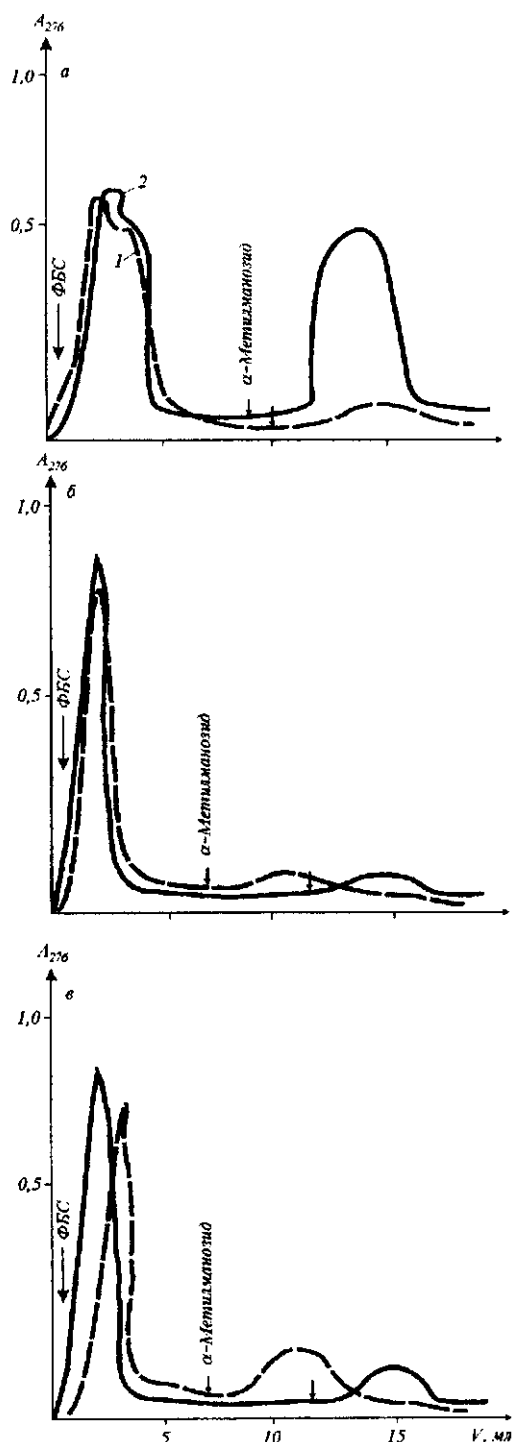


Рис. 1 Афінна хроматографія на КонА-сефарозі глікобіополімерів з міжклітинного простору тютюну сорту Імунний 580, здорового (1) та ураженого ВТМ (2), через 1 (а), 4 (б) та 7 (в) діб після інюкуляції

вуглеводів у міжклітинній рідині з листя тютюну сорту Імунний 580, інфікованого ВТМ, не переви-

щував 4,0 і 6,0 %, здорового — 3,4 і 5,0 % від сухої маси препарату відповідно. Решту речовин в препаратах становлять, очевидно, мінеральні речовини, у тому числі робочий буфер, вихідна концентрація якого була досить високою (1,25 М). Після осадження контрольного зразка сульфатом амонію вміст білків дорівнював 40 %, вуглеводів — 20 %, після осадження біополімерів етанолом відповідно — 30 і 10—55 % від сухої маси препарату. Співвідношення вмісту білків до вмісту вуглеводів в осаді було 2, після осадження етанолом — 1,8 («нерозчинні ГБП», осад 1) та 3 («розчинні ГБП», осад 2).

Отже, найбільший вихід ГБП отримано після осадження етанолом. Тому для афінної хроматографії ми використовували саме осад 1, одержаний при обробці міжклітинної рідини етанолом.

Як згадувалося вище, за вуглеводоспецифічні ліганди в наших дослідках правили лектини: манозо- і глюкозоспецифічний КонА і N-ацетил-D-глюкозаміноспецифічний WGA. Вибір цих лектинів обґрунтований результатами наших попередніх досліджень, які свідчать про блокувальну активність КонА [14] і лектину з картоплі (*Solanum tuberosum* agglutinin — STA, наші неопубліковані дані) щодо захисної дії дріжджового манану, який використано в наших дослідках як модель ендogenous індуктора надчутливої реакції [7]. Причому перший виявився більш як у 100 разів активнішим інгібітором індуктора, очевидно, завдяки тому, що він, на відміну від N-ацетил-D-глюкозаміноспецифічних STA [15] і WGA [16], має специфічність щодо манози [16].

Згідно з теорією афінної хроматографії [17], ГБП, специфічні до певних лектинів, взаємодіють на колонці з відповідним носієм. Відтак КонА повинен мати максимальну спорідненість до манозо- і глюкозовмісних, а WGA — до N-ацетил-D-глюкозаміновмісних ГПБ. У відповідності до цього, препарати, нанесені на колонку з КонА, повинні з високою ефективністю елююватися α -метил-D-манозидом, а на колонку з WGA — N-ацетил-D-глюкозаміном [16].

Щоб виявлені зміни вмісту ГБП у рослині можна було віднести до власне надчутливої реакції рослини-хазяїна, а не до ВТМ-інфекції як такої, в дослідках поряд з інтактними рослинами надчутливого сорту Імунний 580 використовували також рослини його чутливого до ВТМ мутанта, дефіцитного за N геном.

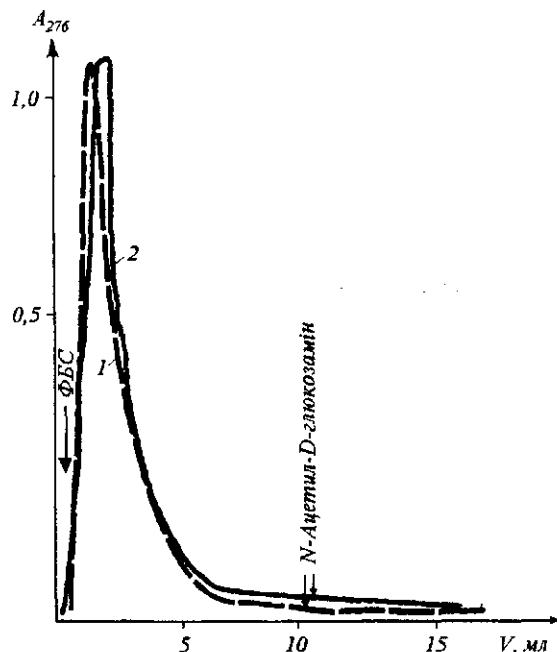


Рис. 2 Хроматографія на WGA-сефарозі глікобіополімерів з міжклітинного простору тютюну надчутливого сорту Імунний 580, здорового (1) і ураженого ВТМ (2), через 1 добу після інюкуляції

У результаті проведених досліджень встановлено, що в міжклітинній рідині рослин надчутливого сорту і його чутливого мутанта містяться речовини, які специфічно зв'язуються з КонА. Про це свідчать профілі елюції нанесених на колонку препаратів, де поряд з речовинами, які елюються 0,1 М ФБС, знаходяться речовини, що вимиваються з колонки специфічним до цього лектину гаптемом — α -метил-D-манозидом.

Різниця в хроматографічних профілях елюції міжклітинної рідини, отриманої з дослідних і контрольних рослин сорту Імунний 580 через 4 і 7 діб після інюкуляції, не виявлено (рис. 1, б, в). Проте через 1 добу після інюкуляції в дослідних зразках міжклітинної рідини надчутливих рослин нами відмічено значне зростання вмісту ГБП у фракціях, елюйованих α -метил-D-манозидом, порівняно з контролем (рис. 1, а).

В одержаних фракціях разом з вуглеводами виявлено значну кількість (до 80 %) білків. Той факт, що ці фракції на хроматограмах не утворюють чіткого піка, а елюються пологою кривою, може свідчити про те, що в даному разі мова йде не про один, а два й більше ГПБ з близькою афінністю до КонА.

При дослідженні клітинних екстрактів з до-

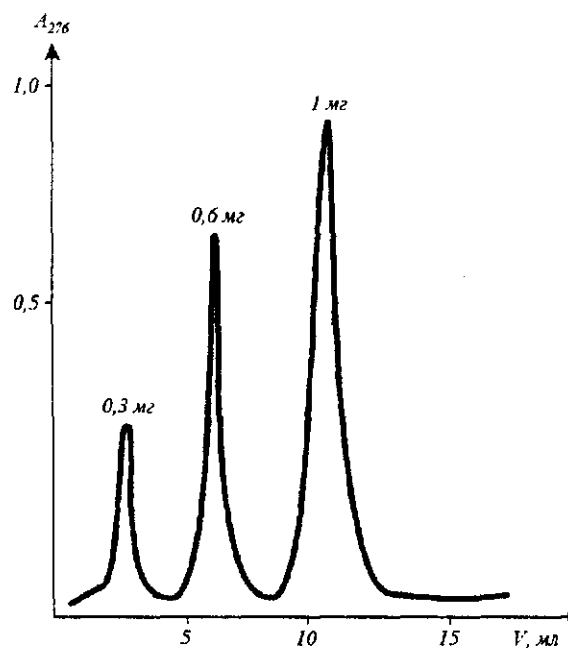


Рис. 3 Хроматографія хітозану на WGA-сефарозі. Хітозан в кількості 0,3 мг, 0,6 мг та 1 мг наносили на колонку і послідовно елюювали 0,05 М розчином N-ацетил-D-глюкозаміну

слідних і контрольних рослин різниці в профілях елюції ГПБ з КонА-колонок, подібної до вищезгаданої, нами не відмічено. Очевидно, відносна кількість цих речовин у клітинних екстрактах значно менша, ніж у міжклітинній рідині, завдяки тому, що основна маса «афіннонеактивних» біополімерів є клітинними, але не позаклітинними компонентами. Не виявлено також різниці і в профілях елюції ГПБ з клітинних екстрактів і міжклітинної рідини здорових і інфікованих ВТМ рослин чутливого до цього вірусу мутанта тютюну. Тобто виявлені зміни стосуються вірусіндукованої надчутливої реакції рослин, але не самої вірусної інфекції.

Ці дані узгоджуються з результатами попередніх досліджень, що свідчать про значне підвищення вмісту білків і вуглеводів у міжклітинній рідині з листя надчутливих рослин тютюну вже через добу після інюкуляції їх ВТМ [9].

При аналізі зразків міжклітинної рідини з тютюну сорту Імунний 580 через 1, 4 і 7 діб після інюкуляції ВТМ на WGA-колонці речовин, специфічних до WGA, в жодному разі не виявлено (рис. 2), хоча WGA-сефароза в наших дослідках специфічно і з високою ємністю зв'язувала хітозан (рис. 3). Останнє свідчить про те, що N-ацетил-D-глюкозаміносPECIFIC лектин, характерний для рослин родини *Solanaceae* [15], а також ГБП —

гаптени даного лектину, очевидно, не мають вирішального значення для реалізації вірусіндукованої надчутливої реакції у тютюні.

Таким чином, у процесі розвитку вірусної інфекції і індукованої стійкості у надчутливих рослинах тютюну, інфікованих ВТМ, невдовзі після інокуляції утворюються позаклітинні вуглеводмісні біополімери, здатні до взаємодії з КонА і відсутні в здорових рослинах. Подібні компоненти не виявляються в тканинах інфікованого ВТМ чутливого мутанта тютюну. З огляду на те, що ці біополімери сполучаються в процесі афінної хроматографії з манозо- і глюкозоспецифічним КонА, але не з N-ацетил-D-глюкозаміноспецифічним WGA, у їхньому складі вуглеводними компонентами можуть виступати маноза та/або глюкоза.

Функція виявлених ГБП у рослині наразі невідома. Позаяк ці компоненти з'являються на ранніх стадіях інфекції (24 год після інокуляції), цілком імовірно, що вони виконують певну роль у вірусіндукованому «оксидативному вибуху», характерному лише для надчутливих рослин-хазяїв [18]. Згідно з нашою гіпотетичною моделлю ініціації вірусіндукованої надчутливої реакції у рослин [6], ГБП можуть реалізовувати свою функцію завдяки специфічній взаємодії з відповідним лектиноподібними рецепторами [8].

Вивчення структурно-функціональних особливостей виявлених нами речовин є метою наших подальших дослідження.

Автори висловлюють щире подяку М. Д. Луцику (Інститут біології клітини НАН України, Львів) за цінні консультації та допомогу, надані ним при виконанні даної роботи.

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

The affinity chromatography of glicobiopolymers from sensitive and hypersensitive tobacco plants infected by tobacco mosaic virus

Summary

The extracellular carbohydrate-containing biopolymers which are absent in healthy plants have been discovered in hypersensitive plants by the affinity chromatography method one day after inoculation. Such components have not been revealed in tissues of TMV-infected sensitive mutant of the same variety. Since these biopolymers may be specifically bound to concanavalin A, but not to germ wheat agglutinin, they probably contain the mannoside and/or glucoside as carbohydrate components. A possible functional role of these biopolymers in initiation of virus-induced hypersensitive reaction in plants is discussed.

Key words: tobacco mosaic virus, hypersensitive reaction, glicobiopolymers, lectins, affinity chromatography.

A. G. Kovalenko, A. N. Kirichenko, T. A. Telegueva

Аффинная хроматография гликобиополимеров чувствительных и сверхчувствительных растений табака, пораженных вирусом табачной мозаики

Резюме

Методом аффинной хроматографии в растениях сверхчувствительного сорта табака Им.мунный 580, пораженных ВТМ, через 1 день после инокуляции обнаружено наличие внеклеточных углеводсодержащих биополимеров, отсутствующих в здоровых растениях. Подобные биополимеры не выявляются в тканях инфицированного ВТМ чувствительного мутанта этого сорта. Поскольку эти биополимеры в процессе хроматографии могут специфически связываться с конканавалином А, но не с агглютинином зародышевой пшеницы (WGA), в их составе в качестве углеводных компонентов могут быть манноза и/или глюкоза. Обсуждается возможная функциональная роль обнаруженных биополимеров в инициации у растений вирусиндуцированной сверхчувствительной реакции.

Ключевые слова: вирус табачной мозаики, сверхчувствительная реакция, гликобиополимеры, лектины, аффинная хроматография.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sela I. Plant-virus interactions related to resistance and localisation of viral infections // *Adv. Virus Res.*—1981.—26.—P. 201—237.
2. Loebenstein G., Gera A. The local lesion response to viruses: possibilities for engineering resistant plants // *Biotechnology in Plant Disease Control.*—Lissabon: Wiley, 1993.—P. 105—113.
3. 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 resistance // *Phytopathology.*—1987.—118, N 2.—P. 165—170.
4. Gianinazzi S. Antiviral agents and inducers of virus resistance: analogies with interferon // *Active Defence Mechanisms in Plants* / Ed. R. K. S. Wood.—New York; London: Plenum Press, 1982.—P. 275—298.
5. Whitham S., Dinesh-Kumars P., Choi Doil, Hehe K., Corr C., Baker B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor // *Cell.*—1994.—78, N 6.—P. 1101—1115.
6. Коваленко А. Г. Белок-углеводное взаимодействие в реализации устойчивости растений к вирусам // *Микробиол. журн.*—1993.—55, № 6.—С. 76—91.
7. Коваленко О. Г., Телегьева Т. А., Штакун А. В., Погоріла З. О. Вплив деяких моно- та полісахаридів на локалізацію вірусної інфекції та індуковану вірусостійкість у рослин // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 2.—С. 53—59.
8. Коваленко О. Г., Кириченко А. М., Телегьева Т. А. Виявлення лектиноподібних білків у надчутливих рослинах, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки // *Биополимеры и клетка.*—2003.—19, № 2.—С. 164—168.
9. Коваленко О. Г., Кириченко А. М., Телегьева Т. А. Вплив ВТМ-інфекції на вміст білків і вуглеводів у надчутливих рослинах тютюну та їхню антивірусну і гемаглютинувальну активність // *Укр. біохім. журн.*—2003.—75, № 2.—С. 103—108.

10. 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.
11. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов.—Киев: Наук. думка, 1982.—163 с.
12. Коваленко О. Г., Баркалова А. О. Одержання біологічно активних мананвмісних препаратів з дріжджів // *Мікробіол. журн.*—1995.—57, № 3.—С. 41—47.
13. Методы химии углеводов / Под ред. Н. К. Кочетков.—М.: Мир, 1967.—512 с.
14. Коваленко А. Г., Коваленко Э. А., Грабина Т. Д. Лектин-связывающая и антивирусная активность дрожжевых маннанов в сверхчувствительных растениях // *Микробиол. журн.*—1991.—53, № 2.—С. 83—99.
15. Casalongue C., Lezica R. Potato lectin: A cell-wall glucoprotein // *Plant Cell Physiol.*—1986.—26, N 8.—P. 1533—1539.
16. Хомутовский О. А., Луцки М. Д., Передерей О. Ф. Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран.—Киев: Наук. думка, 1986.—167 с.
17. Туркова Я. Аффинная хроматография.—М: Мир, 1980.—471 с.
18. Alan A. C., Lapidot M., Culver J. R., Flur R. An early tobacco mosaic virus-infected oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein 1 // *Plant Physiol.*—2001.—126.—P. 97—108.

УДК 578.23:578.85/865
Надійшла до редакції 23.12.03