

## Summary

Some properties of discrete DNA-fragments appearing during the fractionation of *Crepis capillaris* lysed nuclei by FIGE are investigated. It is shown that large DNA-fragments have a capacity to selective disintegration into small ones under physical and chemical influences and are able to anomalous mobility in the presence of intercalator ethidium bromide.

It is supposed that discrete DNA-fragments are flanked by sticking ends permitting them to form multimeric and topologically integrated structures.

УДК 577.112.5+578.841

Н. В. Роднин, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, Э. А. Козлов

### РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ГРАНУЛИНА ВИРУСА ГРАНУЛЕЗА ОЗИМОЙ СОВКИ, *AGROTIS SEGETUM* ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

Полипептидная цепь гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum*, реконструирована на основании данных по строению и составу триптических и хмотриптических пептидов немодифицированного белка, триптических фрагментов малеил-белка и хмотриптических пептидов одного из малеил-фрагментов. Полипептидная цепь построена из 247 остатков аминокислот и имеет молекулярную массу 29135. Обсуждаются особенности реконструкции полипептидной цепи данного белка, связанные с его расщеплением протеазой гранул.

**Введение.** Бакуловirusы подразделяются на две серологически родственные группы, различающиеся по форме тел включения (ТВ): А — вирусы ядерного полиэдрома (ВЯП, форма ТВ — многогранники) и В — вирусы гранулеза (ВГ, ТВ овальной формы). Распространение бакуловirusов в природных популяциях насекомых в значительной степени зависит от белка ТВ, защитный супервириокапсид из которого предохраняет вирус от воздействий среды при передаче его от насекомого к насекомому. Инфекционность вируса в значительной мере определяется способностью ТВ растворяться в кишечнике личинок насекомых. Этот процесс идет при участии протеазы ТВ [1]. В течение ряда лет нами была определена первичная структура нескольких полиэдринов (белок полиэдров) ряда ВЯП [1], а также изучены взаимоотношения протеазы полиэдров с белком ТВ [1—3]. То обстоятельство, что протеаза ТВ и ее естественный субстрат (белки ТВ) находятся в комплексе, значительно затрудняет выделение нерасщепленного белка и исследование его первичной структуры.

Если в группе А бакуловirusов известны первичные структуры десяти белков ТВ [1, 4, 5], выясненные как путем определения аминокислотной последовательности белка, так и секвенированием соответствующих генов, то в группе В бакуловirusов к настоящему моменту просеквенированы лишь гены гранулинов *Trichoplusia ni* и *Pieris brassicae* [7]. В данном сообщении подробно описан принцип реконструкции полипептидной цепи гранулина ВГ *A. segetum* на основании опубликованных нами ранее данных по составам и строению триптических и хмотриптических пептидов восстановленного и карбоксиметилированного гранулина [8] и триптических фрагментов малеил-гранулина

© Н. В. РОДНИН, Т. Л. ЛЕВИТИНА, Н. М. ГУСАК, Э. А. КОЗЛОВ, 1991

[9]. Применяя для обработки трипсином гранулин, предварительно расщепленный протеазой гранул [1], мы попытались установить пептидные связи, расщепляемые данной протеазой.

**Материалы и методы.** Гранулин получали растворением гранул в 68 %-ной уксусной кислоте [10]. Белок модифицировали восстановлением и карбоксиметилированием [11], окислением [12] и обработкой малеиновым ангидридом [13]. Пептиды и фрагменты гранулина получали разделением триптического [14], химотриптического гидролизата [8, 15] S-ВКМ-гранулина, а также триптического гидролизата окисленного и малеинированного белка [9]. N-концевую последовательность гранулина определяли методом Эдмана в сочетании с дансильрованием, применяя для растворения белка DS-Na [16]. Методы установления аминокислотной последовательности пептидов приведены в работе [14]. Аминокислотный состав белка и его пептидов определяли на анализаторе аминокислот ААА-331 (ЧССР), как описано ранее [14].

**Результаты и обсуждение.** Ранее [3] мы показали, что гранулы ВГ *A. segetum* содержат протеазу, которая при их растворении в щелочных условиях расщепляет гранулин в такой степени, что фрагменты белка не обнаруживаются электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ). Попытка растворить гранулы после их предварительной обработки ингибиторами протеаз не увенчалась успехом. Поэтому гранулин получали, растворяя гранулы в уксусной кислоте без предварительного ингибирования протеазы ТВ, после чего белок восстанавливали и карбоксиметилировали (S-ВКМ-гранулин) либо окисляли и малеилировали. Как показал электрофорез в ПААГ, полученные таким методом препараты гранулина расщеплены в меньшей степени, чем при растворении гранул в щелочных условиях. Можно полагать, что

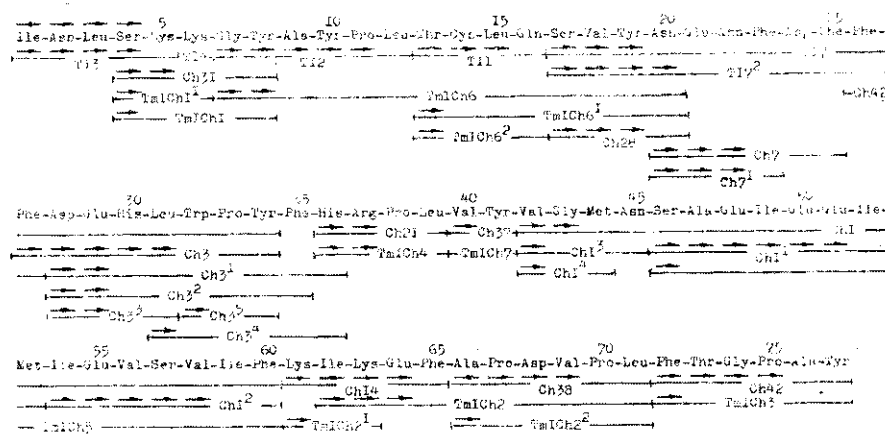


Рис. 1. Схема реконструкции фрагмента Тм1  
Fig. 1. Reconstruction pattern of *Tm1* fragment

обработка уксусной кислотой, а также восстановление и карбоксиметилирование не ингибируют полностью протеазу ТВ, активность которой восстанавливается при переводе белка в щелочную среду. Можно также допустить, что некоторый протеолиз происходит и при хранении гранул.

С помощью электрофореза в ПААГ (данные не приведены) также показано, что расщепление S-ВКМ-гранулина трипсином в стандартных условиях происходит с образованием не только большого числа мелких пептидов, но и крупных фрагментов с молекулярными массами от 12 000 до 20 000. При этом значительная часть белка не расщепляется вообще. В этих же условиях химотрипсин практически не расщепляет S-ВКМ-гранулин, в то время как протеаза ТВ, обладающая химотриптической активностью [17], расщепляет гранулин до мелких пептидов.

Мы полагаем, что протеаза гранул способна расщеплять трипсин и химотрипсин, а те, в свою очередь, — протеазу гранул, чем и может объясняться присутствие нерасщепленной полипептидной цепи белка после протеолиза. Поэтому обработку гранулина химотрипсином вели в достаточно жестких условиях: 22 ч в 2 М мочеvine при трехкратном добавлении фермента [15]. Даже в таких условиях расщепления мы получили большое число не только мелких пептидов, но и крупных перекрывающихся фрагментов, склонных к сильной ассоциации, что значительно затрудняло разделение смеси и получение индивидуальных

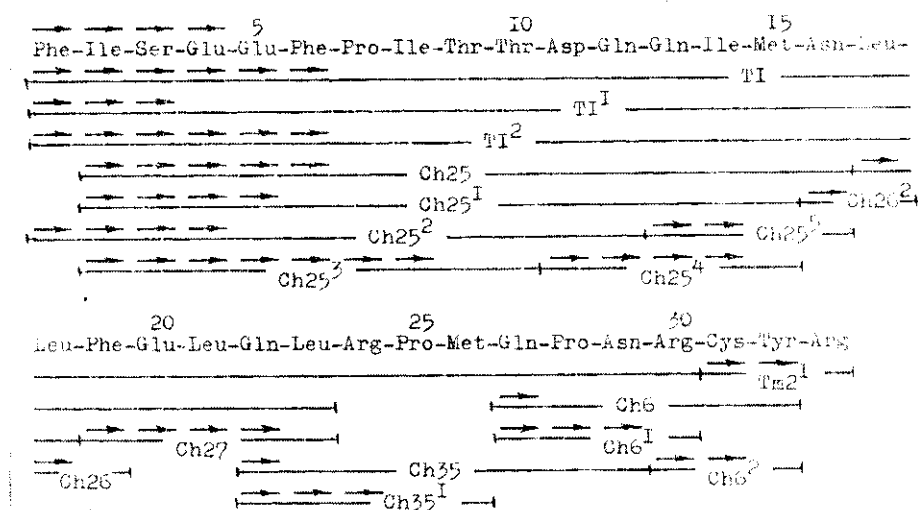


Рис. 2. Схема реконструкции фрагмента *Tm2*  
 Fig. 2. Reconstruction pattern of *Tm2* fragment

пептидов и фрагментов [8, 15]. Предположение о влиянии протеазы гранул на действие трипсина и химотрипсина подтверждается тем фактом, что у окисленного и малеинированного гранулина расщепление трипсином идет значительно полнее и специфичнее [9]. Появление с небольшим выходом фрагментов, образующихся при расщеплении неспецифических для трипсина связей (например, Asn-Glu, Thr-Glu), может быть объяснено действием протеазы гранул до их растворения.

Гидролиз пептидных связей по карбоксильным группам остатков лизина и аргинина при обработке S-ВКМ-гранулина химотрипсином можно объяснить проявлением триптической активности химотрипсина в жестких условиях.

Перечисленные особенности расщепления гранулина и сложности разделения смесей фрагментов значительно затруднили исследования первичной структуры и реконструкцию полипептидной цепи белка. Даже появление данных по аминокислотной последовательности гранулина родственного ВГ *T. ni* [6], выведенной из нуклеотидной последовательности соответствующего гена, не дало возможности однозначно реконструировать полипептидную цепь белка на основании имевшихся в тот момент данных по составам и структуре пептидов. Один из вариантов реконструкции с максимальной степенью гомологии с другими белками ТВ был опубликован нами ранее [1]. Для однозначной реконструкции необходимо было продолжить исследования триптических и химотриптических пептидов S-ВКМ-белка [8] и триптических фрагментов гранулина, модифицированного малеиновым ангидридом [9].

В результате анализа опубликованных нами данных по пептидам и фрагментам белка [8, 9] вполне осуществима реконструкция полипептидной цепи. Этапы ее можно представить в виде схем (рис. 1—5), на которых стрелками над пептидами отмечены стадии определения

N-концевой последовательности. В схемах представлено минимально необходимое для реконструкции число пептидов. Перекрывающимися пептидами мы считали те, у которых секвенированием установлены идентичные последовательности, или в том случае, когда состав большего пептида был равен сумме составов нескольких более мелких пептидов. При отсутствии таких данных мы расставляли фрагменты, прибегая к сравнению с известными аминокислотными последовательнос-

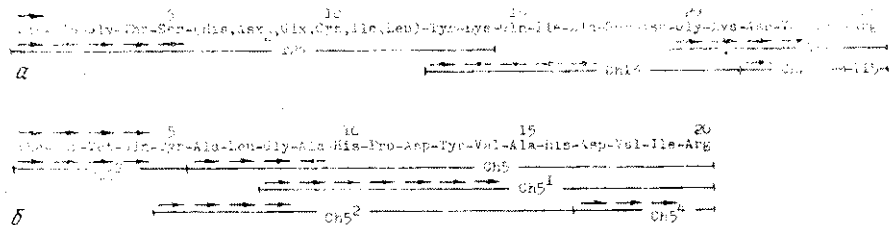


Рис. 3. Схема реконструкции фрагментов Тм4 (а) и Тм5 (б)  
Fig. 3. Reconstruction patterns of *Tm4* (а) and *Tm5* (б) fragments

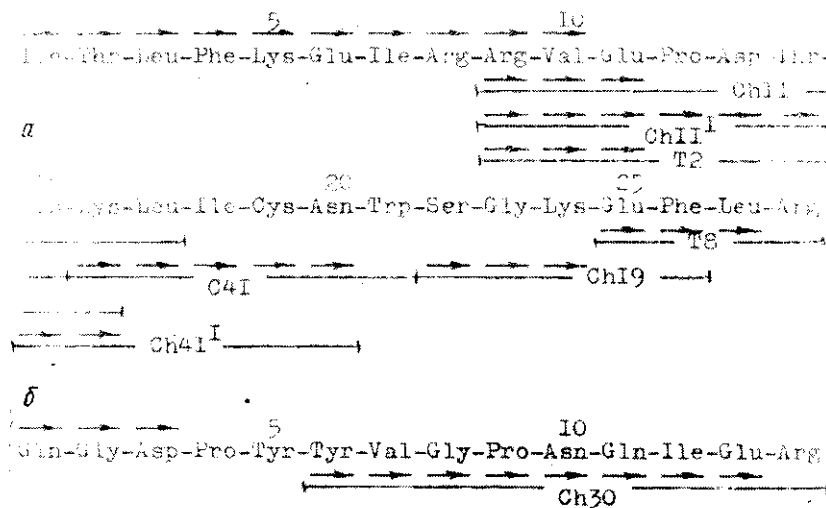


Рис. 4. Схема реконструкции фрагментов Тм8 (а) и Тм9 (б)  
Fig. 4. Reconstruction patterns of *Tm8* (а) and *Tm9* (б) fragments

тями гранулинов ВГ *T. ni* [6] и *P. brassicae* [7], которые выведены из нуклеотидных последовательностей соответствующих генов. Для оценки достоверности реконструкцию удобнее начать с триптических фрагментов малеил-гранулина.

Фрагмент Тм1. При расщеплении фрагмента химотрипсином были получены 12 пептидов [9], включающих 56 остатков аминокислот из 76, имеющихся во фрагменте. Поэтому для реконструкции были привлечены данные по триптическим и химотриптическим пептидам [14, 15]. На целом фрагменте установлена последовательность четырех аминокислот с N-конца. На рис. 1 приведена схема реконструкции. Перекрыванием удается реконструировать три участка: 1—39, 42—60, 61—71. Сумма аминокислотных составов этих участков и двух не вошедших в них химотриптических пептидов Тм1Сh3 и Тм1Сh7 равна аминокислотному составу фрагмента Тм1 без одного остатка триптофана. Последний во фрагменте не определяется, так как он выделен из окисленного белка. Ясно, что участок 1—39 в Тм1 занимает N-концевое положение, а остальные участки и два пептида расставлены по принципу максимальной гомологии с двумя другими гранулинами.

Фрагмент Тм2. Из рис. 2 очевидно, что структура фрагмента полностью установлена на основании перекрытия различных пептидов.

Фрагмент Тм4. Его аминокислотный состав [7] можно представить как сумму составов пептидов Ch13, T15, T20 и T24 [6] с той разницей, что сумма больше на остатки Lys и Tyr. Пептиды T15 и T20 входят в состав фрагмента Тм6, который, очевидно, занимает С-кон-

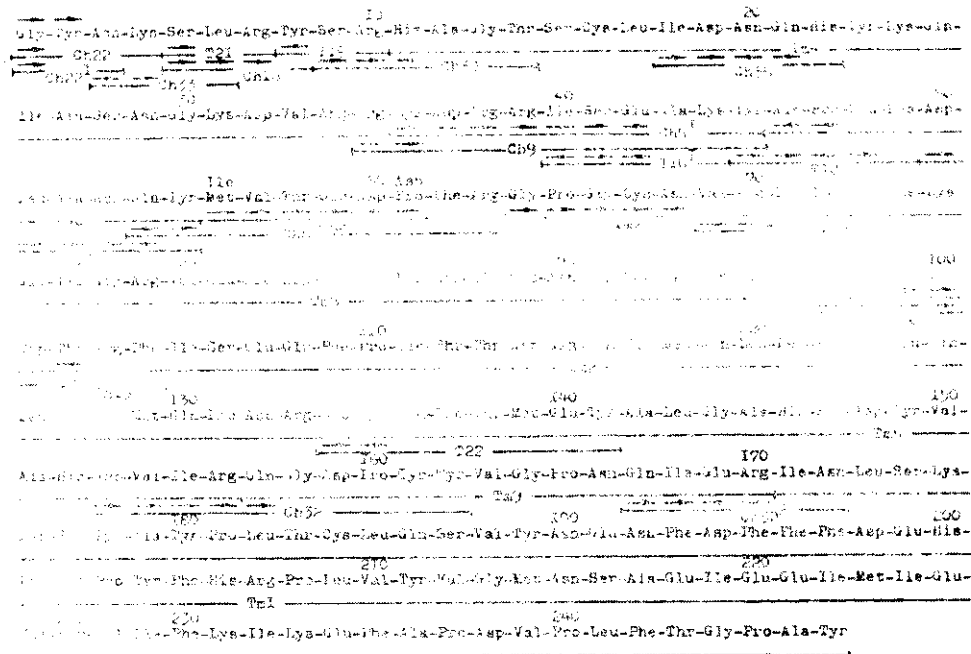


Рис. 5. Схема реконструкции полипептидной цепи гранулина ВГ *A. segetum*  
 Fig. 5. Reconstruction pattern of the polypeptide chain of *Agrotis segetum* granulosis virus granulin

цевое положение в Тм4. На основании этих предпосылок расписана структура Тм4 (рис. 3, а). Предполагается, что пептид Ch13 перекрывался остатками Lys и Tyr с пептидом T24.

Фрагмент Тм5. Его аминокислотный состав равен сумме составов пептида Ch5 и фрагмента Тм5<sup>2</sup> [6]. На рис. 3, б, представлена схема реконструкции фрагмента.

Фрагмент Тм8. N-концевая часть фрагмента (1—21) устанавливается на основании перекрытия последовательности нескольких триптических и химотриптических пептидов (рис. 4, а). С-концевая часть (22—28) реконструируется из пептидов Ch19 и T8 [6] при сравнении с двумя другими гранулинами.

Фрагмент Тм9. На рис. 4, б, его строение выписано на основании предположения о том, что пептид Ch30 [6] входит в состав данного фрагмента.

Из приведенных выше данных о строении триптических фрагментов маленл-белка и некоторых триптических и химотриптических пептидов может быть реконструирована вся полипептидная цепь гранулина (рис. 5). На целом белке проведены две стадии деградации по методу Эдмана. Скобка во фрагменте Тм4 на рис. 5 частично раскрыта по сравнению с рис. 3, а, на основании предположения о том, что пептид Ch39 перекрывает N-конец Тм4, а пептид Ch36 входит в состав Тм4 и локализуется на участке 18—21, исходя из гомологии с другими гранулинами. На основании гомологии расставлены и остатки Leu (положение 17) и Gln (положение 22). В положениях 56, 61 и 227 нами

установлена микрогетерогенность [8, 9]. На рис. 5 перекрывание отсутствует только в связке Arg-Gly (63—64). Реконструированная таким образом полипептидная цепь гранулина ВГ *A. segetum* включает 247 остатков аминокислот и имеет молекулярную массу 29 135. Аминокислотный состав, рассчитанный по представленной первичной структуре (Lys<sub>14</sub>, His<sub>7</sub>, Arg<sub>18</sub>, Asp<sub>13</sub>, Asn<sub>13</sub>, Thr<sub>11</sub>, Ser<sub>11</sub>, Glu<sub>17</sub>, Gln<sub>11</sub>, Pro<sub>16</sub>, Gly<sub>12</sub>, Ala<sub>12</sub>, 1/2Cys<sub>4</sub>, Val<sub>13</sub>, Met<sub>6</sub>, Ile<sub>17</sub>, Leu<sub>18</sub>, Tug<sub>16</sub>, Phe<sub>15</sub>, Trp<sub>3</sub>), хорошо согласуется с аминокислотным составом, определенным ранее [3]. Все полученные нами пептиды и фрагменты удается локализовать в реконструированной полипептидной цепи белка.

На рис. 5 вертикальными стрелками обозначены связи, расщепляемые трипсином при обработке в стандартных условиях (6 ч, 37 °С), которые не соответствуют специфичности трипсина. Можно полагать, что связи Tug-X и Phe-X (обозначены пунктирными стрелками) в какой-то степени расщепляются самим трипсином. Однако трудно представить себе, что трипсин может расщеплять и связи Thr-Glu, Gln-Ser, Asn-X, Leu-X (обозначены жирными стрелками). Мы полагаем, что расщепление этих связей является результатом действия протеазы гранул. Не исключено, что она же расщепляет и связи Tug-X, Phe-X.

Данное предположение (расщепление белка протеазой по двадцати сайтам) хорошо согласуется с результатами электрофореза в ПААГ гранулина, полученного растворением гранул в щелочной среде при 37 °С [3]. В случае расщепления белка по указанным сайтам полученные фрагменты действительно не могли бы быть обнаружены электрофорезом в ПААГ. Расщепление белка протеазой гранул существенно отличается от такового в случае полиэдрина и протеаз полиэдров [1, 2]. Вероятно, это имеет определенный биологический смысл, обсудить который можно только в контексте связи структуры и функции белков ТВ двух серологически родственных групп бакуловирусов — ВЯП и ВГ.

#### RECONSTRUCTION OF THE GRANULIN POLYPEPTIDE CHAIN OF THE AGROTIS SEGETUM GRANULOSIS VIRUS. COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE

*N. V. Rodnin, T. L. Levitina, N. M. Gusak, E. A. Kozlov*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

The complete amino acid sequence of the granulin of the *A. segetum* granulosis virus has been reconstructed using the data on tryptic and chymotryptic peptides of protein. In some cases the peptides obtained are compared with the amino acid sequences of the *Trichoplusia ni* and *Pieris brassicae* granulosis virus granulins. The polypeptide chain comprises 247 amino acids residues having the molecular weight 29135. The peculiarities of the reconstruction of polypeptide chain and cleavage of granulin by trypsin chymotrypsin and proteinase from granula are discussed.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozlov E. A., Levitina T. L., Gusak N. M. The primary structure of baculovirus inclusion body proteins. Evolution and structure-function aspects // *Curr. Topics Microbiol. and Immunol.*— 1986.— V. 131.— P. 135—164.
2. Сравнительные биохимические исследования полиэдринных белков бакуловирусов / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // *Биохимия.*— 1978.— 43, № 12.— С. 2189—2196.
3. Некогорые физико-химические свойства белка тел включения вируса ядерного полиэдроза и вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, С. Б. Серебряный // *Биополимеры и клетка.*— 1985.— 1, № 3.— С. 121—124.
4. Rohrman G. F. Polyhedrin structure // *J. Gen. Virol.*— 1986.— 67, N 8.— P. 1499—1513.

5. Cameron J. R., Possee R. D. Conservation of polyhedrin gene promoter function between *Autographa californica* and *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus // *Virus Res.*—1989.—2, N 3.—P. 183—200.
6. Cloning and sequencing of the granulin from the *Trichoplusia ni* granulosis virus / D. Akiyoshi, R. Chakerian, G. F. Rohrman et al. // *Virology.*—1985.—141, N 2.—P. 328—332.
7. The nucleotide sequence of the *Pieris brassicae* granulosis virus granulin gene / R. Chakerian, G. F. Rohrman, M. H. Nesson et al. // *J. Gen. Virol.*—1985.—66, N 6.—P. 1263—1269.
8. Дополнительное исследование триптических и химотриптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *A. segetum* / Т. Л. Левитина, Н. В. Роднин, Н. М. Гусак и др. // *Биополимеры и клетка.*—1989.—5, № 6.—С. 52—60.
9. Исследование триптических фрагментов малеил-гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Н. В. Роднин, Н. М. Гусак, Т. Л. Левитина и др. // Там же.—С. 61—67.
10. Comparative chemical studies of the nuclear polyhedrosis virus of *Bombyx mori* and *Galleria mellonella* / E. A. Kozlov, T. L. Levitina, N. M. Sidorova et al. // *J. Invert. Pathol.*—1975.—25, N 1.—P. 103—107.
11. Серусодержащие аминокислоты полиэдреного белка вируса желтухи тутового шелкопряда / С. Б. Серебряный, В. М. Кавсан, В. К. Кибирев, М. С. Кацман // *Хим. природ. соединений.*—1968.—№ 3.—С. 174—178.
12. Hirs C. H. W. Determination of cystein as cystic acid // *Meth. Enzymol.*—1967.—11.—P. 55—62.
13. Триптические пептиды малеилированного белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда. I. Разделение и аминокислотный состав / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. С. Кацман, С. Б. Серебряный // *Биоорг. химия.*—1978.—4, № 8.—С. 1029—1035.
14. Структура некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, С. Б. Серебряный, Н. В. Роднин, Э. А. Козлов // *Биополимеры и клетка.*—1986.—2, № 1.—С. 30—35.
15. Структура некоторых химотриптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, Н. В. Роднин, С. Б. Серебряный, Э. А. Козлов // Там же.—№ 2.—С. 73—81.
16. Weiner A. M., Plott T., Weber R. Amino terminal sequence analysis of proteins purified on a nanomol scale by gel electrophoresis // *J. Biol. Chem.*—1972.—247, N 10.—P. 3242—3251.
17. Eppstein D. A., Thoma J. A. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1975.—62, N 4.—P. 478—484.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 06.04.90