

Динамика расщепления протеазой полиэдров полиэдрина вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) и идентификация расщепляемых связей

М. Т. Бобровская, В. А. Ковалев, Т. В. Ширина, А. В. Руденко, Э. А. Козлов

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

В процессе растворения полиэдров вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) B. mori при pH 11,0 и комнатной температуре за 2 ч протеаза полиэдров расщепляет в полипептидной цепи полиэдрина (244 остатка аминокислот) пептидные связи Tyr-Ile (208—209), Tyr-Thr (186—187), Ala-Asn (121—122) и Trp-Ser (88—89). Ни одна связь не расщепляется окончательно (100 %), по данным электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с добавлением додецилсульфата натрия, что приводит к появлению набора перекрывающихся полипептидных цепей с м. м. 28000 (целая полипептидная цепь), 25000, 22000, 14500, 10500 и 8000 (ее фрагменты). Этим фрагментам полипептидной цепи отвечают (по данным первичной структуры) такие фрагменты: 1—208 (м. м. по первичной структуре 24715), 1—186 (21980), 1—121 (14362), 1—88 (10443) и 122—186 (7633). Первой при 15-мин растворении расщепляется связь 208—209, за ней (45 мин) — связь 186—187 и две последние расщепляются за 2 ч. При увеличении времени растворения результаты не изменяются. Но при 2-ч растворении при 37 °С дополнительно расщепляются связи Tyr-Leu (118—119), Phe-Val (193—194) и Tyr-Lys (203—204), причем связи 203—204, 208—209, 88—89 и 118—119 расщепляются полностью, а остальные — частично. Это приводит к появлению целого набора фрагментов: 118—186, 122—186, 118—193, 122—193, 118—203, 122—203, 1—88 с м. м., вычисленными на основе первичной структуры, 7633, 7916, 8445, 8728, 9765, 10048, 10443 соответственно, что коррелирует с диффузной полосой с м. м. 7000—10000 в ПААГ. Дискутируется влияние протеазы полиэдров на такие процессы, как диссоциация—ассоциация полиэдрина в растворах и ассоциация фрагментов полиэдрина с мембранами вирионов.

Введение. В результате заражения насекомых вирусом ядерного полиэдроза (ВЯП) в ядрах клеток развиваются кристаллические белковые образования, имеющие форму полиэдров и включающие в себя вирионы ДНК-типа. Полиэдры строятся из одного белка (полиэдрина) с молекулярной массой 28000 [1].

Известно, что полиэдры содержат химотрипсиноподобную протеазу с оптимумом действия pH *in vitro* 10,5 [1]. Нами было показано, что при растворении в этих условиях полиэдрин расщепляется протеазой полиэдров на крупные перекрывающиеся фрагменты с м. м. 22000, 19000, 14000, 10000, 8000

[1, 2]. Предполагалось, что полиэдрин является природным субстратом протеазы полиэдров, способствующей не только растворимости полиэдров в кишечном соке (pH кишечного сока несколько ниже величины pH оптимума действия *in vitro*), но и выщепляющей функционально важные фрагменты полипептидной цепи полиэдрина. Дело в том, что, как показано нами [3], полиэдрин прочно ассоциирован с мембраной вирионов и, вероятно, заполняет пространство между нуклеокапсидом и мембраной. После расщепления полиэдрина протеазой, максимальная активность которой обнаружена в мембранах вириона [4], фрагменты полиэдрина также остаются ассоциированными с вирионами [3]. Не исключено, что после слияния мембраны вирионов с клеточной мембраной (именно так про-

никает нуклеокапсид в клетку [5]) фрагменты могут проникать в клетку. Отсюда можно предположить особую роль фрагментов полиэдрина на первых стадиях инфекции.

Из изложенного выше понятно, почему важно выяснить центры расщепления и какие участки полипептидной цепи могут попадать в клетку при инфекции. Ранее нами предложена гипотетическая модель структурно-функциональной организации полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *V. mori*, где каждому участку предписывается определенная функция [2].

В настоящем сообщении приведены не только доказательства расположения центров расщепления, но и динамика расщепления *in vitro* протеазой полиэдров полиэдрина ВЯП *V. mori*. Обсуждается влияние расщепления в некоторых центрах на процессы ассоциации—диссоциации полиэдрина в растворах и возможное образование функционально важных фрагментов полиэдрина.

Материалы и методы. Для исследования использовали полиэдры ВЯП *V. mori*, выделенные нами из гусениц, погибших в естественных условиях от ВЯП [6]. Полиэдрин получали двумя методами. По методу 1 полиэдры растворяли в 67 %-й уксусной кислоте в течение 2 ч, как описано [1]. Однако белок получали не после лиофилизации, а осаждением в результате диализа против дистиллированной воды в холодильнике (свежевыделенный препарат П1). По методу 2 полиэдры растворяли в 0,05 М Na_2CO_3 + 0,1 М NaCl (рН 11,0) в течение 15, 45 и 120 мин при комнатной температуре и 120 мин — при 37 °С. Далее, как описано в работе [1]. Белок выделяли осаждением, подкисляя щелочной раствор 0,2 н уксусной кислотой до рН 5—6 (свежевыделенный препарат П2). Оба препарата не подвергали лиофилизации, а после осаждения использовали для дальнейших исследований.

Для структурных исследований препараты П1 и П2 восстанавливали и карбоксиметилировали по методу [7] (SBKM-препараты).

Расщепление SBKM П1 и П2 трипсином («Worthington», США) осуществляли в 0,2 н NH_4HCO_3 при 37 °С и рН 7,8. Фермент-субстратное соотношение 1:100. SBKM П1 суспендировали в бикарбонатном растворе и расщепление трипсином продолжали до полного прояснения суспензии (6 ч). Суспензия SBKM П2 исчезала через несколько минут после начала расщепления и гидролиз продолжался в течение 4 ч. Реакцию останавливали лиофилизацией.

Аналитическую пептидную карту получали, как описано [8]. Для структурных исследований триптический гидролизат разделяли методом пре-

паративного картирования, разработанного нами и подробно описанного в работе [9]. Пептидную карту П1 получали после растворения в течение 2 ч, а П2 — в течение 15, 45 и 120 мин.

Электрофорез в 10 %-м полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу [10].

N-концевые аминокислотные остатки определяли дансил-методом [11]; аминокислотную последовательность пептидов с препаративных пептидных карт — комбинированным методом дансил-Эдман [11].

Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе ВС-200 («Biocal», Германия). Триптофан в пептидах выявляли, окрашивая пептидные карты реактивом Эрлиха [12].

Результаты и обсуждение. Известно, что полиэдры ВЯП *V. mori* содержат химотрипсиноподобную протеазу с оптимумом действия рН *in vitro* 10,5 [13], способную выщеплять из полипептидной цепи полиэдрина предположительно [2] функционально важные фрагменты. На этом построена гипотетическая модель структурно-функциональной организации полипептидной цепи полиэдрина [2], согласно которой участки 89—118 и C-концевой 187—244 могут обуславливать белково-белковые взаимодействия, ответственные за ассоциацию полиэдрина.

Для прямого доказательства действия протеазы полиэдров в специфических для нее центрах мы применили метод пептидного картирования [9] триптического гидролизата различных препаратов полиэдрина, полученных в условиях, отсутствия действия протеазы (67 %-я уксусная кислота) и в условиях ее действия (рН 10,5) [1] в разные промежутки времени. Исследование структуры меняющих локализацию пептидов на пептидных картах таких препаратов сопровождалось N-концевым анализом этих препаратов в ПААГе. Результаты последнего представлены на рис. 1. Анализ N-концевых остатков показал, что препарат полиэдрина П1 содержит один остаток Pro (N-конец полиэдрина [2]). После растворения полиэдров в течение 15 мин при рН 11,0 у препарата П2 дополнительно появляется остаток Ile, что коррелирует с появлением полипептида с м. м. 25000 (рис. 1, дорожка 2). После 45 мин — еще один N-концевой остаток — Thr, что коррелирует с появлением полипептида с м. м. 22000 (рис. 1, дорожка 3). Через 2 ч отмечают дополнительно еще два N-концевых остатка — Asp и Ser и следовые количества Leu. Появление за это время полипептидов с м. м. 25000, 22000, 14500, 10000, 8000, следовых количеств 14000 (рис. 1, дорожка 4), а также наличие

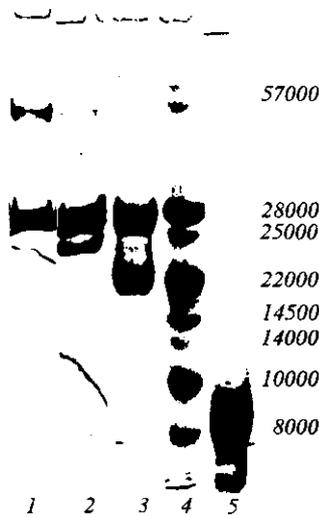


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ различных препаратов полиэдрина ВЯП *V. mori*: 1 — препарат П1; 2, 3 и 4 — препараты П2 после 15, 45 и 120-мин растворения полиэдров соответственно; 5 — П2 после 120-мин растворения при температуре 37 °С

целой полипептидной цепи (28000) свидетельствует о неполноте расщепления в четырех центрах при растворении полиэдров при pH 11,0 в течение 2 ч. Полное расщепление полипептидной цепи за время 2 ч происходит только при повышенной температуре (37 °С), что ведет к появлению набора, очевидно, близких по м. м. фрагментов полипептидной цепи в диапазоне 7000—10000 (диффузная полоса на рис. 1, дорожка 5). Такой препарат полиэдрина содержит восемь N-концевых остатков аминокислот: Pro, Ile, Thr, Asp, Ser, Leu, Val, Lys. При повышенной температуре дополнительно расщепляются связи X-Leu, X-Val, X-Lys. Дальнейшая интерпретация полученных результатов возможна при анализе структуры уникальных для препаратов П1 и П2 пептидов с пептидных карт триптического гидролизата различных препаратов.

На рис. 2 представлено наложение пептидных карт этих препаратов. Совершенно очевидно, что ввиду ограниченности количества центров расщепления протеазой полиэдров (семь центров) пептидная карта препарата П1 (протеаза неактивна при получении белка) будет отличаться от пептидных карт П2 (протеаза активна) только несколькими пептидами. И действительно, пептидная карта П1 содержит четыре уникальных пептида (заштрихованные пятна). Пептидные же карты П2 содержат 15 уникальных пептидов (светлые пятна), 26 пептидов (темные пятна) принадлежат обоим препаратам. Совершенно очевидно, что уникальные пептиды П2 возникли в результате расщепления четырех уникальных пептидов П1 протеазой полиэдров. Поэтому нас интересовало только их строение.

Пептиды выделяли методом препаративного пептидного картирования и определяли их аминокислотный состав, N-концевую последовательность (не более шести стадий).

Пептид 28. Состав: Asp₂, Thr, Ser₂, Glu₆, Pro, Gly, Ala, Val₃, Ile₄, Leu₂, Tyr₂, Phe₂, Lys₂, Trp(+). На пептиде проведены две стадии деградации — Val-Ile...

Пептид 29. Состав: Asp₃, Thr, Ser₃, Glu₂, Pro, Gly₃, CM-Cys, Val, Met, Ile₂, Tyr, Phe₂, His, Lys_{0,4}, Arg. На N-конце был определен Gly и примесь Lys.

Пептид 30. Состав: Asp₆, Thr, Ser, Glu₃, Pro₃, Ala, Val₅, Met, Ile, Leu₂, Tyr, Phe₂, Lys, Arg. На пептиде проведено три стадии деградации — Phe-Val-Glu...

Пептидные карты препаратов П2, полученных в течение разного времени растворения полиэдров, отличаются между собой. Так, у П2, полученного через 15 мин растворения полиэдров, почти совсем исчезает пептид 28 и появляются пептиды 35 и так называемый промежуточный 33* (при более длительном растворении полиэдров этот пептид исчезает).

Пептид 35. Состав: Asp, Thr, Ser₂, Glu₅, Gly, Ala, Val₂, Ile₃, Leu₂, Phe, Lys. На пептиде проведены четыре стадии деградации — Ile-Gly-Thr-Asp...

Пептид 33*. Состав: Asp, Glu, Pro, Val, Tyr₂, Phe, Lys, Trp(+). На пептиде проведены шесть стадий деградации. На третьей стадии остаток не был идентифицирован. Пептид содержит остаток Trp, можно предположить, что он занимает третье положение. Поскольку пептиды 35 и 33* получены

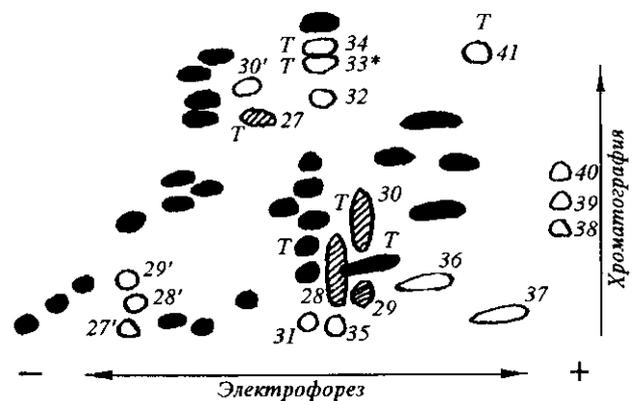


Рис. 2. Пептидные карты триптического гидролизата препаратов П1 и П2 полиэдрина ВЯП *V. mori*. Темные пятна — общие для двух препаратов; заштрихованные — уникальные для препарата П1; светлые — уникальные для препаратов П2; Т — триптофан-содержащие пептиды; звездочкой обозначен промежуточный пептид (см. текст)

в результате расщепления полиэдрина химотрипсиноподобной протеазой, то на С-конце пептида 33* может быть только остаток Туг. Отсюда строение 33* можно записать следующим образом — Val-Ile-Trp-Glu-Asp-Phe-(Pro, Val, Ile, Tyr, Lys)-Tyr. Сумма аминокислотных составов 35 и 33* равна аминокислотному составу пептида 28. Сопоставляя N-концевые последовательности пептидов 28, 35 и 33*, можно сделать вывод, что пептид 33* занимает N-концевое, а 35 — С-концевое положение в пептиде 28.

В связи с дальнейшим обсуждением мы считаем целесообразным привести здесь аминокислотную последовательность полиэдрина ВЯП *B. mori*, выясненную нами ранее [14]. На этой последовательности, по результатам исследования строения, легко локализовать пептиды 28, 35 и 33* (рис. 3) и установить центр расщепления — пептидная связь Tyr-Ile (208—209). Этот вывод подтверждается N-концевым анализом препарата П2, полученного через 15 мин растворения полиэдров (см. выше).

У препарата П2, полученного после растворения полиэдров в течение 45 мин, в значительной степени исчезает, кроме пептида 28, еще и пептид 29, но появляются дополнительно к 33* и 35 пептиды 31 и 36.

Пептид 31. Состав: Asp₂, Thr, Ser₂, Glu, Val, Phe₂, Arg. На пептиде проведены пять стадий деградации — Thr-Asn-Ser-Phe-Glu-(Asp, Ser, Val, Phe)-Arg.

Пептид 36. Состав: Asp, Ser, Glu, Pro, Gly₃, CM-Cys, Met, Ile₂, Tyr, His. На пептиде проведены шесть стадий деградации — Gly-Gly-Gly-CM-Cys-Pro-Ile-(Asp, Ser, Glu, Met, Ile, His)-Tyr. На С-конце находится остаток Туг по той же причине, что и у пептида 33* (см. выше). Сумма аминокислотных составов пептидов 31 и 36 равна аминокислотному составу пептида 29. Все три пептида легко локализируются на полипептидной цепи полиэдрина (рис. 3) и таким образом определяются еще один центр расщепления — Tyr-Thr (186—187). Этот результат подтверждается N-концевым анализом препарата П2, полученного через 45 мин растворения полиэдров (см. выше).

У препарата П2, полученного через 2 ч растворения полиэдров, дополнительно к пептидам 28 и 29 в значительной степени исчезают пептиды 27, 30 и появляются пептиды 27¹, 28¹, 34, 38, 39, 40.

Пептид 27¹. Состав: Asp₂, Thr, Pro₂, Leu, Lys, Arg₂. На пептиде проведены шесть стадий деградации. Из подвижности пептида на пептидной карте очевидно, что он содержит два остатка Asn, а не Asp. Исходя из этого строение 27¹ можно записать так — Asn-Leu-Lys-Pro-Thr-Arg-Pro-Asn-Arg.

Пептид 28¹. Состав: Ser, Gly, Lys. На пептиде определен N-концевой остаток. Строение 28¹ — Ser-Gly-Lys.

Пептид 34. Состав: Asp, Val, Ile, Leu, Trp(+). На пептиде проведены четыре стадии деградации. Его строение — Leu-Ile-Val-Asn-Trp.

Пептиды 38, 39, 40 — отличаются только содержанием разных форм метионина — метионинсульфон, метионинсульфоксид и метионин. Их аминокислотный состав выписывается одной формулой: Asp₄, Ser, Glu₃, Pro, Ala, Val₅, Met, Ile, Tyr, Phe₂. На пептиде проведены четыре стадии деградации — Phe-Val-Glu-Asp. Сумма аминокислотных составов пептидов 28¹ и 34 равна аминокислотному составу пептида 27 (см. выше), а сумма аминокислотных составов пептидов 27¹ и 38—40 равна аминокислотному составу пептида 30 (см. выше). Локализуя эти пептиды на полипептидной цепи полиэдрина, можно установить еще два центра расщепления полиэдрина протеазой полиэдров — Trp-Ser (88—89) и Ala-Asn (121—122). Этот вывод соответствует результатам N-концевого анализа препарата П2, полученного после 2 ч растворения полиэдров (см. выше).

И, наконец, у препарата П2, полученного после растворения полиэдров в течение 2 ч при 37 °С, с пептидных карт в значительной степени исчезает пептид 31 и полностью — пептид 33* и появляются пептиды 29¹, 30¹, 32, 37 и 41.

Пептид 29¹. Состав: Asp, Val, Arg. На пептиде проведены две стадии деградации. Его строение — Val-Asn-Arg.

Пептид 30¹. Состав: Pro, Val, Ile, Tyr, Lys. На пептиде проведены три стадии деградации. Строение — Lys-Pro-Ile-Val-Tyr.

Пептид 32. Состав: Ala, Val, Leu. На пептиде проведены три стадии деградации. Его строение — Leu-Val-Ala.

Пептид 37. Состав: Asp, Thr, Ser₂, Glu, Phe₂. На пептиде проведены пять стадий деградации. Строение — Thr-Asn-Ser-Phe-Glu-Ser-Phe.

Пептид 41. Состав: Asp, Glu, Val, Tyr, Phe, Trp (+). На пептиде проведены шесть стадий деградации. На третьей стадии остаток не был идентифицирован. Можно полагать, что третье положение в пептиде занимает остаток Trp. Строение пептида: Val-Ile-Trp-Glu-Asn-Phe-Tyr. Проверка аминокислотных составов пептидов 38, 39, 40 показала, что у них отсутствуют остатки Ala и Leu и на один остаток уменьшено содержание Val. Вероятно, что пептид 32 отщепился от С-конца пептидов 38—40. Локализуя пептиды 29¹, 30¹, 32, 37 и 41 на аминокислотной последовательности полиэдрина (рис. 3), можно установить еще три центра расщепления

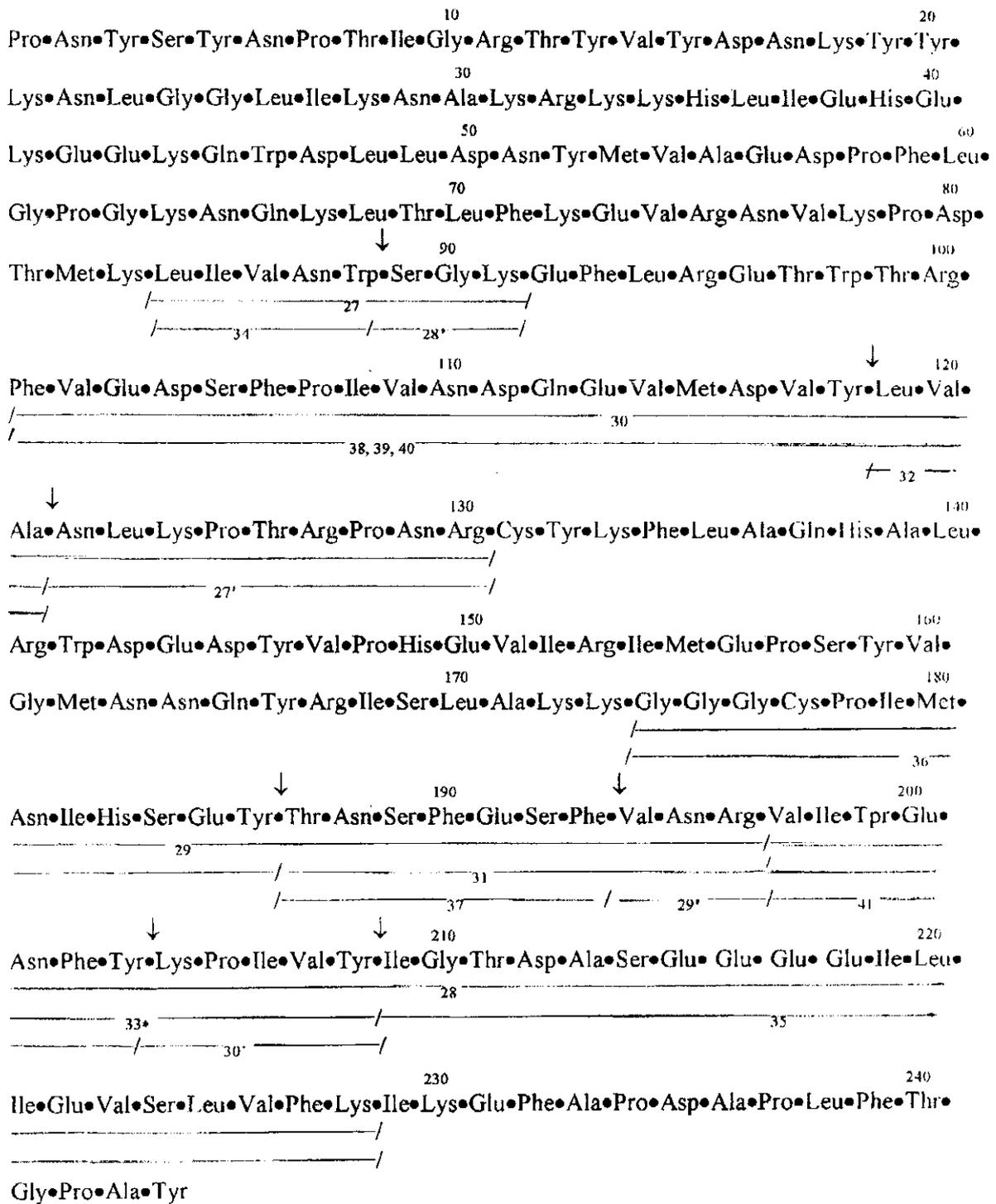


Рис. 3. Аминокислотная последовательность полиэдрина ВЯП *B. mori* по публикации [14] с обозначенными уникальными для препаратов П1 и П2 триптических пептидами (рис. 2) и центрами расщепления протеазой полиэдров (обозначены стрелками)

при повышенной температуре — Tyr-Leu (118—119), Phe-Val (193—194) и Tyr-Lys (203—204). Эти данные согласуются с результатами N-концевого анализа П2, полученного после растворения полиэдров через 2 ч при 37 °С (см. выше).

Таким образом, из семи расщепляемых связей шесть являются специфическими для химотрипсина — Tyr/Phe/Trp-X. Можно предположить, что связь Ala-Asn расщепляется другой протеазой. Чрезвычайно интересно, почему две протеазы, обладающие вместе столь широкой специфичностью, даже при повышенной температуре расщепляют ограниченное число (семь) пептидных связей (к тому же неполностью), а протеаза, расщепляющая связь Ala-Asn, действует только в единственном центре.

Как видно из рис. 1 (дорожки 2—4), в результате расщепления при комнатной температуре четырех пептидных связей (88—89, 121—122, 186—187 и 208—209) получаются пять мажорных фрагментов с м. м. 25000, 22000, 14500, 10000 и 8000. Из рис. 3 можно рассчитать м. м. всех возможных фрагментов, возникающих при расщеплении указанных связей: 1—208 (м. м. 24715), 1—186 (21980), 1—122 (14362), 1—88 (10443) и 122—186 (7633). Минорному фрагменту с м. м. 14000 соответствует фрагмент 1—118 (14079). Очевидно, при комнатной температуре происходит незначительное расщепление связи Tyr-Leu, что неудивительно, так как она расположена рядом со связью Ala-Asn (121—122).

Особенностью расщепления четырех указанных связей является то, что они не расщепляются на 100 %. Это и приводит к появлению перекрывающихся фрагментов полипептидной цепи. Мало того, значительная часть полиэдрина (30 %) остается нерасщепленной. Полностью полипептидная цепь расщепляется в указанных центрах только при 37 °С за 2 ч. Однако даже и в этих условиях полностью расщепляются только четыре из семи связей — Trp-Ser (88—89), Tyr-Leu (118—119), Tyr-Lys (203—204) и Tyr-Ile (208—209), что приводит к появлению набора фрагментов 118—186, 122—186, 118—193, 122—193, 118—203, 122—203, 1—88, близких по м. м. (7633, 7916, 8445, 8728, 9675, 10048 и 10443 соответственно) и образующих в ПААГе диффузную полосу с м. м. в диапазоне 7000—10000 (рис. 1, дорожка 5).

Поскольку все расщепляемые связи расположены в участках, ответственных, согласно гипотезе [2], за белково-белковые взаимодействия, то интересно интерпретировать полученные результаты в связи с процессами ассоциации—диссоциации полиэдрина в растворах. Последние подробно обсу-

даются в работах [2, 15]. После растворения полиэдров при pH 10,5 в течение 2 ч при комнатной температуре растворы препарата П2 содержат в основном 13S-субчастицы (70 %) и два минорных крупных ассоциата с коэффициентами седиментации 18S и 23S (в сумме 30 %) [2]. Это соотношение ассоциатов полиэдрина не изменяется при хранении растворов полиэдрина с pH 10,5 в течение 1 сут при комнатной температуре. Интересно, что, как отмечено выше, количество нерасщепленного полиэдрина у этого препарата (30 %) коррелирует с количеством 18S и 23S ассоциатов. Очевидно, в этих ассоциатах центры расщепления недоступны для протеазы полиэдров и открываются при их диссоциации до 13S-субчастиц, т. е. можно предположить, что участки вокруг пептидных связей 88—89, 121—122, 186—187 и 208—209 ответственны за ассоциацию 13S-субчастиц в более высокомолекулярные ассоциаты (23S, 34S [2]).

Однако при этом следует обратить внимание на тот факт, что картина седиментации при pH 10,5 целого и расщепленного протеазой полиэдров полиэдрина не меняется [2]. Это свидетельствует о том, что частичное расщепление четырех указанных выше пептидных связей не приводит к диссоциации 13S-субчастиц (додекамеры) до полипептидных цепей с коэффициентом седиментации 1,6S [2]. Вероятно, за преобразование 1,6S-мономера в 13S-додекамер ответственны участки полипептидных цепей, прилегающие к расщепляемым связям. Это, согласно гипотезе [2], могут быть нерасщепленные пролонгированные участки 95—115 и 190—205. Скорее всего, локальное и, главное, неполное расщепление указанных пептидных связей не ведет к значительным конформационным перестройкам полипептидных цепей мономеров в 13S-ассоциате. Характерно то, что при этом происходит только незначительное снижение содержания вторичной структуры с 53 до 46 % за счет β -структур [2]. Последнее не приводит к снижению содержания 13S-ассоциатов в растворах препарата П2 с целой и частично расщепленной полипептидной цепью [2], но превращает процесс диссоциации более высокомолекулярных ассоциатов в необратимый (действительно, при снижении pH раствора до 7,2 реассоциация 13S-субчастиц происходит только у препарата с нерасщепленной полипептидной цепью [2]). И только при повышенной температуре полиэдрин полностью расщепляется до устойчивых фрагментов с м. м. в диапазоне 7000—10000 (по данным ПААГ). При этом, как показано выше, дополнительно расщепляются еще три пептидные связи на участках 117—120 и 190—205. Как показано в нашей лаборатории, такой препарат полиэд-

рина при ультрацентрифугировании образует при рН 10,5 полидисперсную систему со средним коэффициентом седиментации 6S (данные не приведены). Отсюда можно предположить, что эти участки (особенно 190—205) ответственны за поддержание целостности 13S-додекамера.

Можно также предположить, что устойчивость к действию протеазы перечисленных фрагментов объясняется ассоциацией их с РНК полиэдров [2, 15] (N-концевой фрагмент, согласно гипотезе [2]) или с мембраной вирионов (остальные фрагменты).

Как предполагалось ранее [2], участок полипептидной цепи 122—186 является носителем сигнатур, отвечающих за взаимодействие белков с мембранами. Нами показано, что полиэдрин и его фрагменты после расщепления протеазой полиэдров прочно ассоциированы с вирионами (с мембраной или образуют промежуточный слой между нуклеокапсидом и мембраной) [3]. С вирионами, выделенными из раствора препарата полиэдрина П2 с нерасщепленной полипептидной цепью, прочно ассоциирован полиэдрин, а с вирионами, выделенными из препарата П2 с расщепленной полипептидной цепью, ассоциированы в подавляющем количестве фрагменты полиэдрина с м. м. $14000 \pm \pm 1000$ и 11500 ± 500 . Оба фрагмента образуют в ПААГ дискретные полосы [3]. В то же время, как следует из настоящего исследования (рис. 2, дорожка 4), фрагменты с м. м. 14500 и 14000 (1—118/122, см. выше) присутствуют в очень малом количестве по сравнению с фрагментом $14000 \pm \pm 1000$ в вирионах [3], а фрагмент с м. м. $11500 \pm \pm 500$ вообще отсутствует в препаратах П2 полиэдрина (рис. 2). Возможно, фрагменты с м. м. 14000 в вирионах и 13S-субчастицах отличаются. Из рис. 3 мы рассчитали м. м. возможных полипептидов, близкие к 14000 и 11500. Фрагменты с такими м. м. в вирионах более всего сопоставимы с фрагментами 89—208 (м. м. 14302) и 89—186 (м. м. 11552). Оба фрагмента включают в себя участок 122—186, ответственный, по гипотезе [2], за белково-мембранные взаимодействия.

Интересно отметить, что в вирионах, возможно, отсутствуют фрагменты 89—193 и 89—203, так как в ПААГ нет фрагментов с м. м. между 14000 и 11500 [3] (центры расщепления 193—194 и 203—204, рис. 3). По-видимому, у полиэдрина, ассоциированного с мембранами вирионов, полипептидные связи 193—194 и 203—204 не расщепляются, а расщепляются только связи 88—89, 186—187 и 208—209 и то не полностью (целая полипептидная цепь в вирионах присутствует наряду с ее фрагментами: полипептиды 12, 16 и 17 [3]).

Таким образом, в результате проведенного вы-

ше анализа возникает ряд вопросов. Действительно ли образуется РНП-комплекс полиэдрина с РНК полиэдров через взаимодействие его N-концевого фрагмента 1—88 с РНК? Какова роль этого комплексообразования? Какую роль выполняют встроенные в мембрану вирионов (или находящиеся в промежуточном слое между мембраной полиэдров и нуклеокапсидом) полиэдрин и его фрагменты? Попадают ли в клетку вместе с нуклеокапсидом фрагменты полиэдрина после слияния мембраны вирионов с мембраной клеток? Судя по специфичности расщепления полиэдрина протеазой полиэдров, можно предположить, что полиэдрин является природным субстратом протеазы полиэдров и их взаимодействие приводит не только к более полному высвобождению вирионов в кишечнике гусениц, но и к появлению функционально важных полипептидов, играющих определенную роль в инициации инфекционного процесса.

M. T. Bobrovskaya, V. A. Kovalev, T. V. Shirina, A. V. Rudenko, E. A. Kozlov

Dynamics of cleavage of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin by polyhedral protease and identification of cleaved bonds

Summary

It is shown that polyhedral protease (PP) cleaves the polyhedrin polypeptide chain bonds Tyr-Ile (208—209), Tyr-Thr (186—187), Ala-Asn (121—122), Trp-Ser (88—89) upon polyhedron dissolution under alkaline (pH 11.0) conditions at room temperature during 2 hours. According to the data obtained by the sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), none of the bonds is cleaved completely, that results in the formation of overlapping polypeptides with molecular weights of 28000 (a whole polypeptide chain), 25000, 22000, 14500, 10500, 8000 (polypeptide chain fragments). We calculated the molecular weights of all possible fragments which could be derived from the polyhedrin polypeptide chain (28 kDa) by PP cleavage. The 25, 22, 14.5, 10.5, and 8.8 kDa polypeptides correspond to the polypeptide chain fragments 1—208 (m. w. 24715), 1—186 (m. w. 21980), 1—121 (14362), 1—88 (10443), 122—186 (7633). The bond 208—209 is the first to show the cleavage in 15 min of dissolution, the bond 186—187 is the second (in 45 min), and the bonds 121—122, 88—89 are cleaved in 120 min. These results do not depend on the prolongation of the dissolution time at room temperature, while the bonds Tyr-Leu (118—119), Phe-Val (193—194) and Tyr-Lys (203—204) are cleaved in addition after 120 min of dissolution at 37 °C. Under these conditions the bonds 88—89, 118—119, 203—204, 208—209 are cleaved completely contrary to the bonds 121—122, 186—187, 193—194 cleaved only partially. A series of fragments 1—88, 118/122—186/193/203 with the calculated molecular weights of 7633, 7916, 8445, 8728, 9765, 10048, 10443 respectively is released by the PP cleavage at 37 °C. These data are in accord with a diffused band in the range of molecular weights of 7000—10000, obtained by SDS-PAGE for the PP cleaved polyhedrin at 37 °C. The PP cleavage effect on the association/dissociation process of polyhedrin in solution as well as on the association of polyhedrin and its fragments with virion membranes is discussed considering the data obtained.

М. Т. Бобровська, В. О. Ковальов, Т. В. Ширина, А. В. Руденко, Е. А. Козлов

Динаміка розщеплення поліедрів протеазою поліедрину вірусу ядерного поліедрозу тутового шовкопряда (*Bombyx mori*) та ідентифікація розщеплених зв'язків

Резюме

У процесі розчинення поліедрів вірусу ядерного поліедрозу (ВЯП) *B. mori* при рН 11,0 і кімнатній температурі за 2 год протеаза поліедрів розщеплює в поліпептидному ланцюгу поліедрину (244 залишки амінокислот) пептидні зв'язки Тур-Ile (208—209), Тур-Thr (186—187), Ala-Asn (121—122) та Trp-Ser (88—89). Жоден зв'язок не розщеплюється остаточно (100%), згідно з даними електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) з додаванням додецилсульфату натрію, що призводить до появи набору поліпептидних ланцюгів, які перекриваються, з м. м. 28000 (цілий поліпептидний ланцюг), 25000, 22000, 14500, 10500 та 8000 (його фрагменти). Цим фрагментам поліпептидного ланцюга відповідають (за даними первинної структури) такі фрагменти: 1—208 (м. м. за первинною структурою 24715), 1—186 (21980), 1—121 (14362), 1—88 (10443) і 122—186 (7633). Першим при 15-хв розчиненні розщеплюється зв'язок 208—209, за ним (45 хв) — зв'язок 186—187 і два останні розщеплюються за 2 год. Із збільшенням часу розчинення результати не змінюються. Але при 2-год розчиненні за температури 37 °С додатково розщеплюються зв'язки Тур-Leu (118—119), Phe-Val (193—194) та Тур-Lys (203—204), причому зв'язки 203—204, 208—209, 88—89 та 118—119 розщеплюються повністю, а решта — частково. Це спричинює появу цілого набору фрагментів: 118—186, 122—186, 118—193, 122—193, 118—203, 122—203, 1—88 з м. м. 7633, 7916, 8445, 8728, 9765, 10048, 10443 відповідно, виражуваними на основі первинної структури, що корелює з дифузною смугою з м. м. 7000—10000 в ПААГ. Дискутується вплив протеази поліедрів на такі процеси, як дисоціація—асоціація поліедрину в розчинах та асоціація фрагментів поліедрину з мембранами віріонів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kozlov E. A., Sidorova N. M., Serebryani S. B. Proteolytic cleavage of polyhedral protein during dissolution of inclusion bodies of the Nuclear Polyhedrosis viruses of *Bombyx mori* and *Galleria mellonella* under alkaline conditions // J. Invert. Pathol.—1975.—25, N 1. P. 97—101.
2. Kozlov E. A., Levitina T. L., Gusak N. M. The primary structure of Baculovirus inclusion body proteins. Evolution and structure aspects // Curr. Top. Microbiol and Immunol.—1986.—131.—P. 135—164.
3. Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Полипептиды вириона при ядерном полиедрозе тутового шелкопряда // Биохимия.—1980.—45, № 1.—С. 130—136.
4. Payne C. C., Kalmacoff J. Alkaline protease associated with virus particles of a nuclear polyhedrosis virus: assay purification and properties // J. Virol.—1978.—26, N 1.—P. 84—92.
5. Kawanishi C. Y., Summers M. D., Stoltz D. B., Arnott H. J. Entry of an insect virus *in vivo* by fusion of viral envelope and microvillus membrane // J. Invert. Pathol.—1972.—20, N 1.—P. 104—108.

6. Козлов Э. А., Согуляева В. М., Серебряный С. Б. Изучение первичной структуры белков вируса ядерного полиедроза тутового шелкопряда // Укр. хим. журн.—1966.—№ 8.—С. 875—878.
7. Clealand W. W. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH group // Biochemistry.—1964.—3, N 4.—P. 480—482.
8. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Радавский Ю. Л., Согуляева В. М., Сидорова Н. М., Серебряный С. Б. Определение молекулярного веса белка тел включений вируса ядерного полиедроза тутового шелкопряда *Bombyx mori* // Биохимия.—1973.—38, № 5.—С. 1015—1019.
9. Пальчиковская Л. И., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Овандер М. Н., Кацман М. С., Козлов Э. А. Ускоренный метод определения первичной структуры высокомолекулярных белков. Полная аминокислотная последовательность полиедрина вируса ядерного полиедроза (ВЯП) капустной совки *Mamestra brassicae* // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 4.—С. 44—49.
10. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // J. Biol. Chem.—1969.—244, N 6.—P. 4406—4412.
11. Гусак Н. М., Овандер М. Н., Дробот Л. Б., Серебряный С. Б. Определение структуры пептидов комбинированным методом Дансил-Эдман // Методы молекуляр. биологии.—Киев: Наук. думка, 1979.—С. 142—154.
12. Easley C. W. Combination of specific colour reactions useful in peptide mapping techniques // Biochim. et biophys. acta.—1965.—107, N 2.—P. 386—388.
13. Eppstein D. A., Thoma J. A. Alkaline protease associated with the matrix of a virus infecting the cabbage looper // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1975.—62, N 3.—P. 478—484.
14. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Роднин Н. В., Апеналихина С. А., Пальчиковская Л. И. Выяснение аминокислотной последовательности полиедрина вируса ядерного полиедроза (ВЯП) озимой совки (*Agrotis segetum*) и уточнение первичной структуры полиедринов ВЯП тутового (*Bombyx mori*), непарного (*Porthetria dispar*) шелкопрядов и большой вошинной моли (*Galleria mellonella*) // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 1.—С. 75—82.
15. Козлов Э. А., Согуляева В. М., Левитина Т. Л., Верещак В., Серебряный С. Б. Очистка полиедренного белка вируса ядерного полиедроза тутового шелкопряда и исследование процессов его ассоциации—диссоциации в растворах // Биохимия.—1969.—34, № 4.—С. 679—685.
16. Scharnhorst D. W., Weavez R. F. Structural analysis of the matrix protein from the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis zea* // Virology.—1980.—102, N 2.—P. 468—472.
17. Лыло В. В., Серебряный С. Б. Гидродинамические характеристики 12S-олигомера белка тел включений вируса ядерного полиедроза *Bombyx mori* и модель его структуры в растворе // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 3.—С. 139—144.

УДК 577.112.5
Надійшла до редакції 28.12.03