

Исследование структурно-функциональных взаимодействий полиэдрина вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) с протеазой и РНК полиэдров. Влияние протеазы на диссоциацию полиэдрина в процессе гель-фильтрации через сефарозу 6В

Э. А. Козлов, Н. Ниязова, М. Т. Бобровская, Т. В. Ширина

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

kozlov@imbg.org.ua

*Известно, что полиэдры ВЯП *B. mori* содержат щелочную протеазу, расщепляющую в условиях растворения полиэдров in vitro (рН 10,5) полипептидную цепь полиэдрина (молекулярная масса (м. м.) 28500) до перекрывающихся фрагментов с м. м. 25000, 22000, 19000, 10000 и 8000. При этом полиэдрин в растворе с рН 10,5 существует в виде высокомолекулярных 13S- (70 %) и > 13S- (30 %) ассоциатов. Показано, что в процессе гель-фильтрации при рН 10,5 через сефарозу 6В раствора полиэдрина с рН 10,5 происходит частичная диссоциация высокомолекулярных ассоциатов до ранее неизвестного 8,5S-ассоциата, полипептида с м. м. 25000 и его димера с коэффициентом седиментации 3,4S. Причем недиссоциированные высокомолекулярные ассоциаты и 8,5S-ассоциат содержат только целую полипептидную цепь (м. м. 28500). В процессе гель-фильтрации при рН 11,0 растворов полиэдрина с тем же значением рН происходит полная диссоциация высокомолекулярных ассоциатов до 8,5S-ассоциата, полипептида с м. м. 22000 и его димера с коэффициентом седиментации 3,2S. 8,5S-ассоциат также содержит только целую полипептидную цепь. РНК в процессе гель-фильтрации в обоих случаях обнаруживается в высокомолекулярной (13S и более) и низкомолекулярной (м. м. < 25000) зонах. 8,5S-ассоциат не содержит РНК. После предварительного подогрева полиэдров при температуре 80–90 °С протеаза не расщепляет полиэдрин в растворе с рН 10,5. В процессе гель-фильтрации при рН 10,5 таких растворов диссоциация высокомолекулярных ассоциатов до 8,5S-ассоциата с целой полипептидной цепью происходит в значительно меньшей степени, но при этом отделяется малый РНП-комплекс с м. м. 20000–25000 и коэффициентом седиментации 2,9S, включающий полипептид с м. м. 10000–12000. Обсуждается влияние протеазы и РНК на диссоциацию полиэдрина и высвобождение вирионов из полиэдров при растворении их in vivo.*

Ключевые слова: вирус ядерного полиэдроза, полиэдрин, ассоциация—диссоциация, протеаза полиэдров, РНК полиэдров, РНП-комплекс.

Введение. Полиэдрин — белок тел включений (ТВ) вируса ядерного полиэдроза (ВЯП), представляю-

щих серологическую группу семейства ДНК-содержащих бакуловирусов, поражающих только насекомых. ТВ ВЯП имеют форму полиэдров. Вторая серологическая группа — вирусы гранулеза (ВГ),

© Э. А. КОЗЛОВ, Н. НИЯЗОВА, М. Т. БОБРОВСКАЯ,
Т. В. ШИРИНА, 2006

образующие ТВ формы гранул (белок ТВ — гранулин). Полиэдрин, равно как и гранулин, является ключевым элементом в процессе распространения вирусной инфекции в популяции насекомых. Синтезируясь на позднейшей стадии инфекционного процесса, когда заканчивается (или параллельно идет) формирование вирионов, полиэдрин в ядре клеток ассоциирует и, взаимодействуя с мембранами вирионов, включает множество вирусных частиц в образующиеся кристаллы (полиэдры). После гибели и разложения насекомых полиэдры, попавшие в окружающую среду, проявляют чрезвычайную устойчивость, сохраняя инфекционность вирионов в течение нескольких лет [1]. С другой стороны, попадая вместе с пищей в организм здоровых насекомых, полиэдры легко растворяются в кишечном соке (рН около 9). Полиэдрин, диссоциируя, высвобождает вирионы, которые проникают в клетки кишечника и инициируют тотальный процесс заражения организма.

Совершенно очевидно, что от уникальных особенностей механизма ассоциации—диссоциации полиэдрина, действующего в разных условиях (ассоциации в ядре клетки, диссоциация в кишечном соке), зависит успех распространения инфекции от хозяина к хозяину.

Анализируя результаты исследований химических и физико-химических свойств белков ТВ бакуловирусов, опубликованные в наших многочисленных предыдущих публикациях, мы можем сформулировать цель настоящих и последующих исследований: выяснение механизмов ассоциации—диссоциации полиэдрина и участие в этих механизмах протеазы и РНК, включенных в полиэдр. Существует мнение, что на первом этапе передачи инфекции (ассоциация полиэдрина и образование полиэдров в ядре) РНК формирует с полиэдрином РНП-комплекс, способствуя таким образом появлению полиэдров. Предположение о возможном влиянии РНК полиэдров на процессы ассоциации—диссоциации полиэдрина в растворах *in vitro* высказано нами в единственном сообщении еще в 1969 г. [2]. С тех пор исследований по этому вопросу не проводили. Роль протеазы в инфекционном процессе обсуждалась нами и в 1980 г. [3]. Недавно мы опубликовали [4] результаты исследований кинетики расщепления полипептидной цепи полиэдрина в семи центрах, которые предполагают, что полиэдрин является природным субстратом протеазы, включающейся в полиэдр. Именно это

сообщение можно считать первым в серии дальнейших публикаций под общим заголовком, посвященным выяснению механизмов ассоциации—диссоциации полиэдрина ВЯП *V. mori* с участием протеазы и РНК полиэдров.

В настоящей работе приведены данные по изучению влияния расщепления протеазой полиэдров в определенных сайтах полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *V. mori* на его диссоциацию в процессе гель-фильтрации через сефарозу 6В («Pharmacia», Швеция) в условиях растворения полиэдров *in vitro*.

Материалы и методы. *Полиэдры.* Использовали полиэдры, свежесыведенные из гемолимфы гусениц 4—5-го возраста, инфицированных ВЯП в лабораторных условиях.

Растворители — раствор А с рН 10,5 (0,05 М Na_2CO_3 + 0,05 М NaHCO_3 + 0,1 М NaCl); раствор Б с рН 11,0 (0,04 М Na_2CO_3 + 0,014 М NaHCO_3 + 0,1 М NaCl).

Растворы полиэдрина. 250 мг полиэдров растворяли в 4 мл растворов А или Б в течение 1 ч при комнатной температуре. Нерастворившийся материал удаляли центрифугированием в течение 5 мин при 6000 об/мин. Дальнейшим ультрацентрифугированием (4 °С, 30000 об/мин) в течение 1 ч из растворов удаляли также вирионы и продукты их деградации.

Ингибирование протеолитической активности. Полиэдры суспендировали в 4 мл дистиллированной воды и оставляли на ночь в холодильнике. Затем суспензию при интенсивном перемешивании инкубировали при температуре 80—90 °С в течение 5—10 мин.

Гель-фильтрацию осуществляли через сефарозу 6В («Pharmacia») с диапазоном разделения молекул 10^4 — $4 \cdot 10^6$. Условия гель-фильтрации описаны под соответствующим рисунком.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии DS-Na проводили на приборе «Helicon» (Россия) в 10 %-м геле по [5].

Седиментационный анализ осуществляли с помощью ультрацентрифуги MOM-31706 (Венгрия) с регистрацией Шлирен-оптикой. Снимки производили после достижения максимальной скорости 50000 об/мин. Коэффициент седиментации (S) рассчитывали по методу [6].

РНК в растворах определяли с помощью орциновой реакции [7] и УФ-спектров (отношение E_{260}/E_{280}).

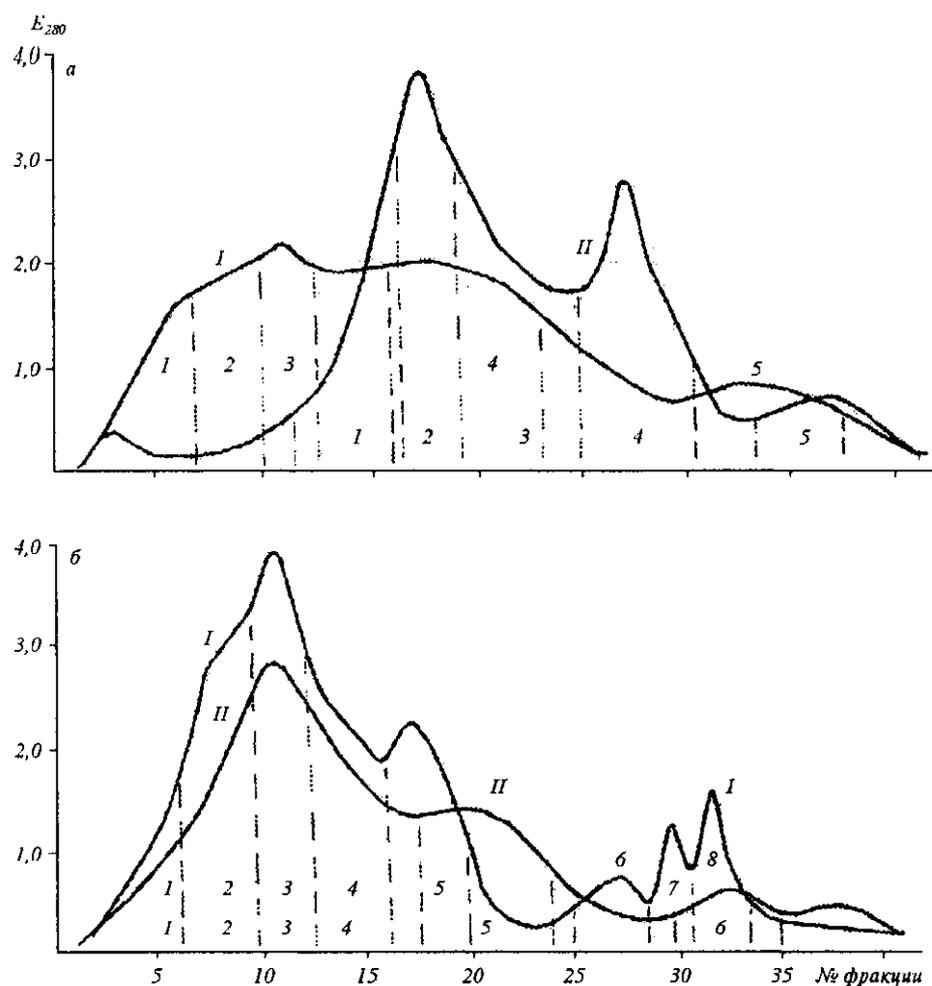


Рис. 1. Гель-фильтрация через сефарозу 6В препаратов полиэдрина ВЯП *V. mori*, полученных растворением нативных (а) и денатурированных (б) полиэдров в растворах с рН 10,5 и 11,0. Колонка 2,0 × 55 см уравновешена растворами с рН 10,5 (кривая I) или 11,0 (кривая II). Скорость элюции — 20 мл/ч; объем фракции — 3 мл. Пунктирными линиями и цифрами отмечены зоны, отобранные для дальнейших исследований после гель-фильтрации при рН 10,5 (верхний ряд цифр на каждом рисунке) и рН 11,0 (нижний ряд)

УФ-спектры поглощения в области 230—320 нм записывали на спектрофотометре «Specord» (ГДР).

Результаты и обсуждение. Известно, что полиэдры растворяются *in vitro* при рН не ниже 10,5 [8]. Полиэдрин в растворах с рН 10,5 существует в виде ассоциатов с коэффициентами седиментации 13S (70 %), 19S (20 %) и 23S (10 %) [9]. При этом около половины ассоциатов содержат полипептидные цепи с частично расщепленными в семи центрах пептидными связями, установленными нами ранее [4]. Несмотря на это, диссоциации 13S-ассоциатов не происходит при рН 10,5 [2]. Однако повышение рН до 11,0 уже приводит к частичной диссоциации 13S-ассоциата до компонента со средним коэффициентом седиментации 2,7S [2].

Можно полагать, что это димер полиэдрина, если учитывать, что мономер имеет коэффициент

седиментации 1,6S [9]. Причина диссоциации, по-видимому, кроется не только в большей открытости при рН 11,0 центров расщепления протеазой полиэдров, но и в наличии РНК, способной ассоциировать с полиэдрином [9].

Чтобы разобраться с этим вопросом, мы применили по сравнению с ранним исследованием крупнопористый гель сефарозу 6В (ранее мы использовали сефадекс G-25 [3]). Гель-фильтрации подвергали растворы полиэдрина с рН 10,5 и 11,0, полученные из полиэдров с ингибированной (денатурированные полиэдры) и активной (нативные полиэдры) протеазой. Из рис. 1 видно, что изменение рН на 0,5 единицы приводит в результате гель-фильтрации к резкой диссоциации полиэдрина в случае нативных (рис. 1, а) и менее заметной — в случае денатурированных прогревом (рис. 1, б) полиэдров. Картина более проясняется при анализе

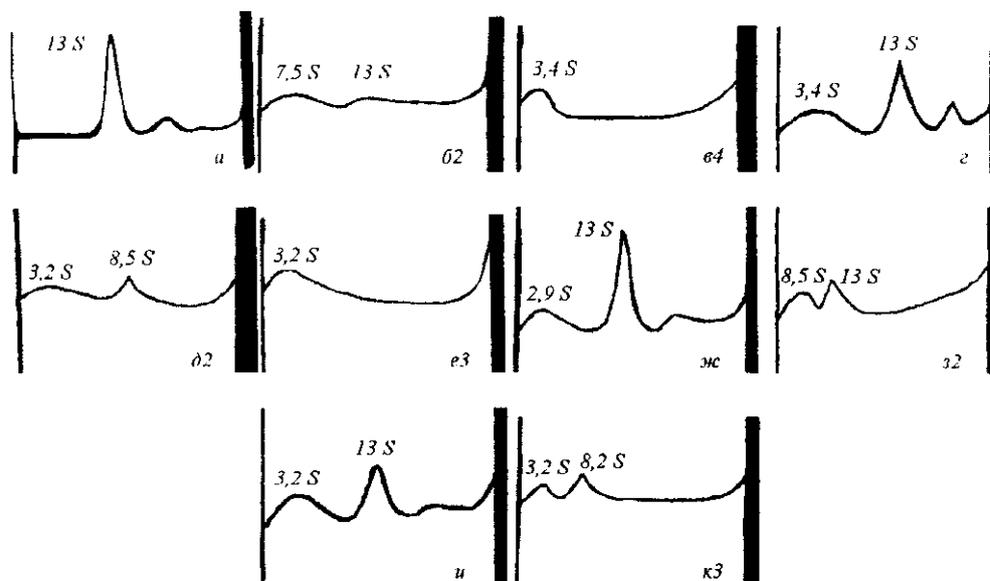


Рис. 2. Седиментограммы исходных растворов полиэдрина из нативных (а, г) и денатурированных (ж, и) полиэдров с рН 10,5 (а, ж) и 11,0 (г, и), а также зон, полученных после гель-фильтрации исходных растворов из нативных (б, в, д, е) и денатурированных (з, к) полиэдров при 10,5 (б, в, з) и 11,0 (д, е, к). Цифрами при некоторых буквах обозначены зоны, отобранные для исследования после гель-фильтрации (рис. 1). S — коэффициент седиментации

седиментограмм зон, отобранных после гель-фильтрации (рис. 2). При использовании нативных полиэдров в результате гель-фильтрации при рН 10,5 происходит частичная диссоциация 13S-ассоциата (рис. 2, а) до 7,5S- и 3,4S-ассоциатов (рис. 2, б, в). При повышении рН при гель-фильтрации 13S-ассоциат (рис. 2, г) полностью диссоциирует до 8,5S- и 3,2S-ассоциатов (рис. 2, д, е). В случае же денатурированных полиэдров частичная диссоциация 13S-ассоциата (рис. 2, ж) при рН 10,5 происходит только до 8,5S-ассоциата (рис. 2, з). 3,2S-ассоциат появляется лишь при повышении рН до 11,0 (рис. 2, к). Эти факты подтверждаются данными гель-фильтрации (рис. 1). При рН 10,5 выходной объем зоны 5 (рис. 1, б) равен таковому зоны 2 при рН 11,0 из нативных полиэдров (рис. 1, а), имеющей коэффициент седиментации 8,5S (рис. 2, д). Зона же, соответствующая коэффициенту седиментации 3,2S, при рН 10,5 отсутствует (рис. 1, б). Однако, как следует из данных этого же рисунка, при рН 11,0 появляется зона 5, выходной объем которой равен объему зоны 4 при рН 10,5 из нативных полиэдров (рис. 1, а), имеющей коэффициент седиментации 3,4S.

Интересен тот факт, что во всех четырех исходных растворах полиэдрина 7,5S—8,5S-ассоциаты отсутствуют (рис. 2, а, г, ж, и). А в исходных растворах с рН 10,5 нет ассоциатов 3,2S—3,4S (рис. 2, а, ж). О наличии и природе 2,9S-компонен-

та в исходном растворе с рН 10,5 из денатурированных полиэдров (рис. 2, ж — сравнить с рис. 2, а) и его отсутствии после гель-фильтрации (рис. 1, б) речь пойдет ниже в связи с анализом РНК в зонах после гель-фильтрации. Если все четыре исходных раствора полиэдрина оставить не только на время, равное времени гель-фильтрации, но и на сутки, седиментограммы их не изменяются. Не изменяются они и при разбавлении растворов в 5—10 раз (аналогичном при гель-фильтрации). Совершенно очевидно, что ассоциаты с коэффициентом седиментации < 13S появляются в процессе гель-фильтрации. Такое поведение полиэдрина при гель-фильтрации отчасти проясняется при рассмотрении электрофореграмм DS-Na-ПААГ (рис. 3) зон, отобранных после гель-фильтрации (рис. 1).

Как видно из рис. 3, а, б, полипептидная цепь полиэдрина, полученного вследствие растворения нативных полиэдров при рН 10,5 и 11,0, значительно расщепляется протеазой полиэдров до фрагментов с м. м. 22000 и 25000. Из предыдущего сообщения [4] следует, что фрагменты полипептидной цепи с м. м. 25000 и 22000 — это фрагменты без 36 и 58 остатков с С-конца (1—209 и 1—186 соответственно), т. е. без одного (С-концевого) из двух участков, ответственных за белково-белковые взаимодействия согласно нашей гипотезе о структурно-функциональной организации полипептидной цепи полиэдрина [9]. После гель-фильтрации

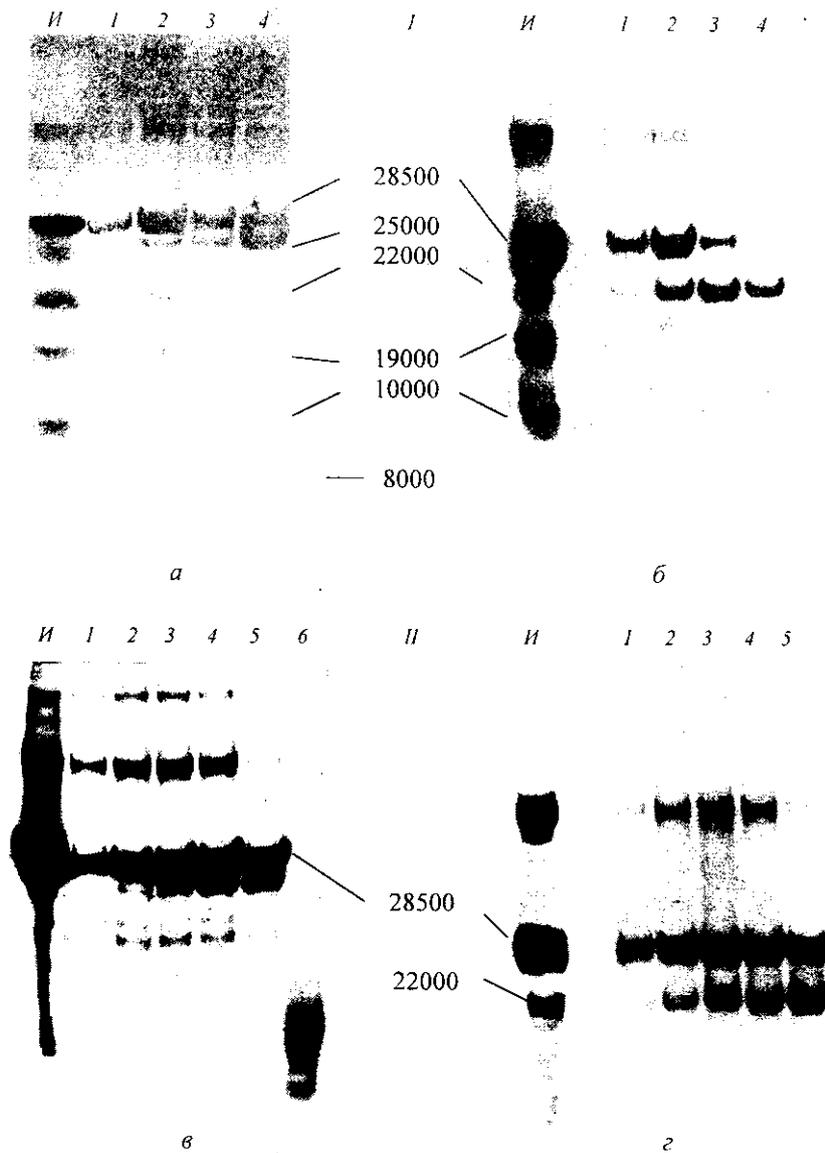


Рис. 3. Электрофорез в DS-Na-ПААГ исходных препаратов полиэдрина (И), полученных растворением нативных (I) и денатурированных (II) полиэдров в растворах с pH 10,5 (а, в) и 11,0 (б, г). Номера дорожек соответствуют обозначению зон, отобранных для анализа после гель-фильтрации (рис. 1)

количество этих фрагментов возрастает от высокомолекулярной зоны (13S и более, рис. 2, а; рис. 3, а, дорожки 1, 2) к низкомолекулярной (3,2S, рис. 2, в; рис. 3, а, дорожка 4). Особенно это характерно для фрагмента с м. м. 22000, появляющегося в растворах полиэдрина с pH 11,0 (рис. 3, б, дорожки 1, 4), где в зоне 4 присутствует практически только этот фрагмент. Наличие целой полипептидной цепи (м. м. 28500) в зоне 3, содержащей 3,2S-ассоциат (рис. 2, е), объясняется, скорее всего, присутствием в ней небольших количеств 8,5S-ассоциата (рис. 1, а), который не выявляется ультрацентрифугированием, но фиксируется в соседней зоне 2, перекрывающейся с зоной 3 (рис. 1, а, кривая II;

рис. 2, д). Присутствие небольших количеств фрагментов с м. м. 25000 и 22000 в высокомолекулярных зонах 1 и 2 (рис. 3, а, б, дорожки 1, 2) объясняется диссоциацией полиэдрина в процессе гель-фильтрации (см. выше). Возможно, по этой же причине низкомолекулярные ассоциаты обнаруживаются при гель-фильтрации в зонах с высокомолекулярными ассоциатами (рис. 2, б, д, з, к).

Совершенно очевидно, что даже при частичном (фрагмент 1—209), не говоря уже о полном (фрагмент 1—186), отщеплении С-концевого участка, ответственного за белково-белковые взаимодействия, происходит ослабление взаимодействия полипептидных цепей в 13S-ассоциате, что ведет к

диссоциации его при взаимодействии с матрицей геля в процессе гель-фильтрации. Тем не менее, способность полиэдрина образовывать димер после отщепления С-концевого участка 187—244 сохраняется (рис. 1, а, кривая I, зона 4; рис. 1, б, кривая II, зона 3; рис. 2, в, е, соответственно). По-видимому, взаимодействие укороченных полипептидных цепей происходит за счет второго участка 90—120, также ответственного за белково-белковые взаимодействия [9].

Интересно также, что только около половины полиэдрина диссоциирует до димера и мономера, оставшаяся же половина (даже при pH 11,0) диссоциирует до 8,5S-ассоциата, содержащего, скорее всего, целую полипептидную цепь (рис. 1, а, кривая II, зоны 1, 2). Это коррелирует с тем, что лишь половина полиэдрина в растворах с pH 10,5 содержит расщепленные полипептидные цепи. Очевидно, не все 12 полипептидных цепей (мономеров полиэдрина) в 13S-ассоциате контактируют с растворителем. В последующем сообщении мы попытаемся связать полученные нами данные с существующими моделями укладки мономеров в 13S-ассоциате [10, 11].

Тот факт, что для диссоциации полиэдрина до димеров и далее необходимо отщепление С-концевого фрагмента, подтверждается данными электрофореза в DS-Na-ПААГ полиэдрина из прогретых полиэдров. Результаты представлены на рис. 3, в, г. Действительно, в случае практически отсутствующей протеолитической активности при pH 10,5 (рис. 3, в) димеры при гель-фильтрации не обнаруживаются (см. рис. 1, б, кривая I; рис. 2, з). Однако при ультрацентрифугировании исходного раствора выявляется 2,9S-компонент (рис. 2, ж). Природа этого компонента будет обсуждаться ниже в связи с РНК. В процессе гель-фильтрации при pH 11,0 наблюдаются димеры (рис. 1, б, кривая II, зона 5; рис. 2, к), протеолитическая активность в растворе с pH 11,0 также проявляется (рис. 3, г). По-видимому, индукция протеолитической активности в прогретых полиэдрах является причиной появления 3,2S-димера при ультрацентрифугировании исходного раствора полиэдрина, pH 11,0 (рис. 2, и). Возникновение протеолитической активности при pH 11,0 в прогретых полиэдрах можно объяснить тем, что активность протеазы, максимально проявляющаяся, как известно, в мембранах вирионов [12], не инактивируется полностью при прогреве полиэдров. Известно [13], что повышение

значения pH до 11,0 приводит к большему разрушению вирионов и переходу активной протеазы с мембран в раствор и, как следствие, к расщеплению полиэдрина.

Как указывалось выше, протеаза, возможно, не единственный фактор, влияющий на процесс ассоциации—диссоциации полиэдрина в щелочных растворах. Мы проверили наличие РНК во всех зонах, полученных после гель-фильтрации (рис. 1, а, б). Наличие РНК проверяли орциновой реакцией и отношением E_{260}/E_{280} . Как известно, РНК из полиэдров имеет отношение $E_{260}/E_{280} = 1,85$, а полиэдрин — 0,75 [2]. Орциновой реакцией РНК обнаружена во всех зонах, содержащих 13S-ассоциаты и выше. Отрицательную реакцию давали зоны, содержащие 7,5S—8,5S- и 3,2S-ассоциаты. У этих зон обнаружен белковый спектр с максимумом при 280 нм (рис. 4, кривая I). Однако отношение E_{260}/E_{280} зон, содержащих 13S-ассоциаты и выше, было 0,8—0,9, а зон с 7,5S—8,5S- и 3,2—3,4S-ассоциатами — 0,60. Четко наличие РНК в зонах, содержащих высокомолекулярные ассоциаты, показано при гель-фильтрации только при pH 10,5 растворов из нативных полиэдров (рис. 1, а): УФ-спектр зоны I с отношением $E_{260}/E_{280} = 1,15$ приведен на рис. 4 (кривая 2). Низкомолекулярная зона 5 (рис. 1, а, кривая I) также содержит РНК, судя по орциновой реакции и УФ-спектру (рис. 4, кривая 3) с отношением $E_{260}/E_{280} = 1,10$. При гель-фильтрации при pH 11,0 растворов из нативных полиэдров отсутствуют зоны, содержащие 13S-ассоциаты и выше (рис. 1, а, кривая II), а РНК обнаруживается только в зоне 5, содержащей, по-видимому, так же, как и зона 5 с pH 10,5, смесь олигонуклеотидов (продуктов деградации РНК) и мелких пептидов (продуктов деградации полиэдрина протеазой полиэдров) с отношением $E_{260}/E_{280} = 1,40$ (УФ-спектр приведен на рис. 4, кривая 4).

Интересные результаты получены при гель-фильтрации растворов полиэдрина из денатурированных прогревом полиэдров. Как видно из рис. 2, ж, в исходном растворе при растворении полиэдров при pH 10,5 появляется компонент с коэффициентом седиментации 2,9S, отсутствующий в таком же растворе, полученном из нативных полиэдров (рис. 2, а). Очевидно, этот компонент имеет м. м. 30000, поскольку коэффициент седиментации мономера полиэдрина с м. м. 28500 = 1,6S [9]. Однако при гель-фильтрации при pH 10,5 исходного раствора из денатурированных полиэдров этот компонент не

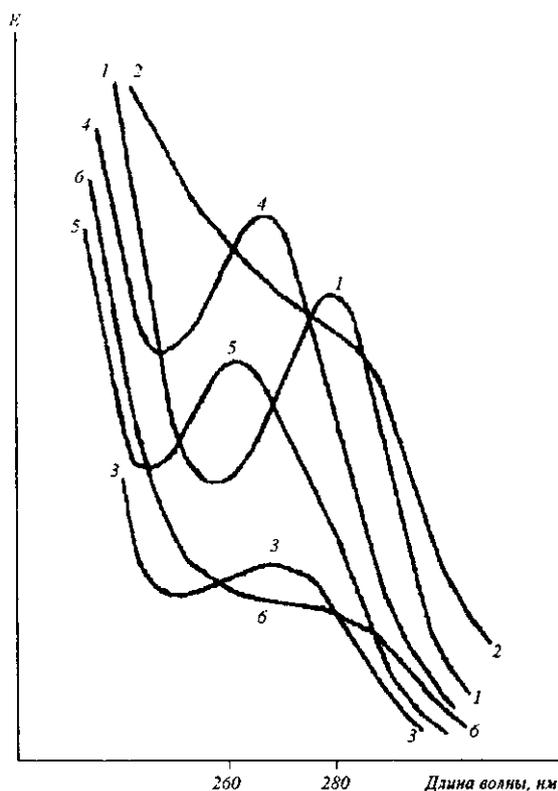


Рис. 4. УФ-спектры зон, отобранных после гель-фильтрации (рис. 1): Обозначения кривых см. в тексте

обнаруживается, но вместо него в низкомолекулярной зоне появляются три компонента (рис. 1, б, кривая I, пики 6, 7, 8). Молекулярная масса компонента пика 6 составляет 20000—25000, так как этот компонент выходит с объемом, при котором элюируется фрагмент полипептидной цепи полиэдрина с м. м. 22000 (рис. 1, а, кривая II, зона 4; рис. 3, б, дорожка 4). Сравните с объемом выхода димера этого фрагмента с коэффициентом седиментации 3,2S (рис. 1, а, кривая II, зона 3; рис. 2, е; рис. 3, б, дорожка 3). В DS-Na-ПААГ в компоненте пика 6 обнаруживается полипептид с м. м. 10000—12000 (рис. 3, в, дорожка б). УФ-спектр этого компонента (рис. 4, кривая 5) имеет типичный для РНК спектр с максимумом при 260 нм и отношением $E_{260}/E_{280} = 1,7$. По-видимому, материал пика 6 представляет собой малый РНП-комплекс. Это подтверждается тем фактом, что этот компонент исчезает при гель-фильтрации при рН 11,0 (сравните профили кривых I и II на рис. 1, б), но появляется пик 6 (рис. 1, б, кривая II), материал которого имеет УФ-спектр с максимумом при 260 нм и с отношением $E_{260}/E_{280} = 1,6$ (спектр

такой же, как и у РНП-комплекса, рис. 4, кривая 5), очевидно, представляющий собой смесь полипептида с малой РНК. Скорее всего, 2,9S-компонент, присутствующий в исходном растворе (рис. 2, ж), являет собой димер малого РНП-комплекса. Можно предположить, что при растворении полиэдров этот димер частично диссоциирует из высокомолекулярных (13S и более) ассоциатов, что, возможно, обусловлено ослаблением гидрофобных взаимодействий при прогреве полиэдров. При гель-фильтрации при рН 10,5 не только появляется димер 2,9S РНП-комплекса, но и происходит его дальнейшая частичная диссоциация до составляющих компонентов — полипептида и РНК (рис. 1, б, кривая I, пики 7 и 8), сопоставимых по м. м. Об этом свидетельствуют УФ-спектры пиков 7 и 8: первый имеет типичный для белка спектр с отношением $E_{260}/E_{280} = 0,8$ (данные не приведены), второй, по-видимому, представляет собой смесь полипептида с олигонуклеотидом (спектр его с отношением $E_{260}/E_{280} = 1,15$ показан на рис. 4, кривая 6). Факт диссоциации малого РНП-комплекса до полипептида и олигонуклеотида подтверждается при гель-фильтрации при рН 11,0 (см. выше). Малый РНП-комплекс, возможно, реализуется и в случае растворения нативных полиэдров при рН 10,5. Однако при гель-фильтрации исходного раствора он может маскироваться появлением больших количеств фрагментов полиэдрина, возникающих в результате действия протеазы полиэдров (см. рис. 1, а, кривая I). РНП-комплекс должен элюироваться в промежутке между зонами 4 и 5. Об этом свидетельствуют данные, полученные нами еще в 1969 г. [2]. В цитированной работе малый РНП-комплекс обнаруживается при гель-фильтрации при рН 10,0 через сефадекс G-25 (рис. 1 из работы [2]; колонка 3,5 × 38 см, фракции 30—38, объем фракции — 5 мл). При возрастании величины рН до 11,0 вместо РНП-комплекса появляются олигонуклеотиды (рис. 3 из работы [2], фракции 39—49). Снижение рН с 11,0 до 7,2 приводит к реассоциации олигонуклеотидов и полипептидов и появлению РНП-комплекса (рис. 5 из работы [2], фракции 29—38). Полиэдрин выходит из колонки во фракциях 20—28, соли — 75—80 [2].

При гель-фильтрации растворов с рН 10,5 из прогретых полиэдров параллельно с диссоциацией димера малого РНП-комплекса отмечается частичная диссоциация 13S-ассоциата до 8,5S-ассоциата (рис. 1, б, кривая I, зона 5). При этом высокомо-

(рис. 1, б, кривая I, зона 5). При этом высокомолекулярная зона I, по-видимому, содержит РНК (положительная орциновая реакция, $E_{260}/E_{280} = 0,9$). При гель-фильтрации растворов при pH 11,0 из прогретых полиэдров наблюдается полная диссоциация 13S- до 8,5S-ассоциата (рис. 1, б, кривая II; рис. 2, κ). Зона I при этом также, возможно, содержит РНК (положительная орциновая реакция, $E_{260}/E_{280} = 0,8$). Полная диссоциация объясняется, вероятно, не только повышением pH, но и проявлением при pH 11,0 активности протеазы (объяснение см. выше).

Выводы. Из описанного анализа проведенных исследований можно сделать некоторые выводы, представляющие интерес для понимания механизма распада полиэдров и выхода из них вирионов *in vivo* на первых стадиях инфекции организма. Полиэдры содержат в себе как минимум один малый РНП-комплекс с м. м. 20000—25000, включающий полипептид с м. м. 10000—12000. Распад полиэдров и диссоциация полиэдрина происходят через промежуточные ассоциаты, минимальный из которых имеет коэффициент седиментации 13S. Далее распад этих ассоциатов идет с участием протеазы, которая, отщепляя в 13S-ассоциате от полипептидной цепи С-концевой фрагмент, содержащий 58 остатков аминокислот, способствует диссоциации 13S-ассоциата через 3,2S-димер до полипептидных фрагментов и 8,5S-ассоциата с параллельным высвобождением вирионов и малого РНП-комплекса с м. м. 20000—25000. Судьба и назначение 8,5S-ассоциата и малого РНП-комплекса непонятны.

Из проведенных исследований следует ряд вопросов. Какова природа и происхождение малого РНП-комплекса и его компонентов — малой РНК и полипептида с м. м. 10000—12000? Эти компоненты присутствуют в виде комплекса в исходных полиэдрах или они и их комплекс являются побочными продуктами деградации в щелочных условиях кишечного сока, протекающей с участием протеазы полиэдров, высокомолекулярных ассоциатов полиэдрина с высокомолекулярной РНК? Из-за совместного влияния протеазы и РНК на результаты проведенных экспериментов не ясен пока вклад РНК (РНП-комплекса) в процесс ассоциации—диссоциации полиэдрина. Этот вопрос может проясниться при аналогичных исследованиях на полиэдрах, в которых отсутствует или, по крайней мере, значительно снижена протеолитическая активность протеазы, так как инактивация протеазы

подогревом полиэдров ведет к их денатурации и высвобождению РНП-комплекса. Выяснению этих вопросов будут посвящены наши дальнейшие исследования.

E. A. Kozlov, N. Nijazova, M. T. Bobrovskaja, T. V. Shirina

Investigation of structure-function interaction of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin with polyhedra protease and RNA. Effect of protease on polyhedrin dissociation during Sepharose 6B gel-filtration

Summary

It is known that B. mori NPV polyhedra contains protease which cleaves polyhedrin polypeptide chain (m. w. 28500) during dissolution of polyhedra in vitro under alkaline conditions (pH 10.5) to overlapping fragments with mol. weights 25000, 22000, 19000, 10000 and 8000. Besides polyhedrin, present in solution at pH 10.5 as high mol. weight 13S- (70 %) and > 13S- (30 %) associates. Current paper shows that during Sepharose 6B gel-filtration at pH 10.5 of polyhedrin pH 10,5 solution there occurs partial dissociation of high mol. weight associates to unknown earlier 8.5S-associates, 25000 polypeptide and its dimer with sedimentation coefficient 3.4S. Undissociated high mol. weight associates and 8.5S-associates contain the whole polypeptide chain (m. w. 28500) only. During gel-filtration at pH 11.0 of polyhedrin solution with the same pH there occurs complete dissociation of high mol. weight associates to 8.5S-associates, 22000 polypeptide and its dimer with sedimentation coefficient 3.2S. The 8.5S-associate contains the whole 28500 polypeptide chain only. RNA was found in the low mol. weight (and high mol. weight (13S and higher) zones. 8.5S-associate does not contain RNA. After preliminary polyhedra heating at 80—90 °C the polyhedra protease does not cleave polyhedrin in pH 10.5 solution and dissociation of high mol. weight associates to 8.5S-associates containing whole polypeptide chain occurs with much lower degree during gel-filtration at pH 10.5. Yet as a result of gel-filtration RNP-complex is released with mol. weight of 20000—25000 and sedimentation coefficient 2.9S, containing polypeptide chain with mol. weight of 10000—12000. The effect of the polyhedra protease and RNA on in vivo polyhedrin dissociation and virus realization from polyhedra are discussed.

Key words: nuclear polyhedrosis virus, polyhedrin, association-dissociation, polyhedra protease, polyhedra RNA, RNP-complex, structure-function interaction.

E. A. Козлов, Н. Ниязова, М. Т. Бобровська, Т. В. Ширіна

Дослідження структурно-функціональних взаємодій поліедрину вірусу ядерного поліедрозу тутового шовкопряда (*Bombyx mori*) з протеазою та РНК поліедрів. Вплив протеази на дисоціацію поліедрину у процесі гель-фільтрації через сефарозу 6В

Резюме

Відомо, що поліедри ВЯП В. mori містять протеазу, яка при розчиненні поліедрів in vitro (pH 10,5) розщеплює поліпептидний ланцюг поліедрину (молекулярна маса (м. м.) 28500) до фрагментів з м. м. 25000, 22000, 19000, 10000 і 8000, що перекриваються. Крім цього, поліедрин у розчині з pH 10,5 існує у вигляді високомолекулярних 13S- (70 %) та > 13S- (30 %) асоціатів. Показано, що в процесі гель-фільтрації при pH 10,5 через сефарозу 6В розчину поліедрину з pH 10,5 високомолекулярні асоціати частково дисоціюють до невідомих раніше 8,5S-асоціатів, поліпептиду з м. м. 25000 та його димеру з

коефіцієнтом седиментації 3,4S. Причому недисоційовані високомолекулярні асоціати та 8,5S-асоціат мають лише повний поліпептидний ланцюг з м. м. 28500. При гель-фільтрації за рН 11,0 розчинів з тим же значенням рН високомолекулярні асоціати повністю дисоціюють до 8,5S-асоціатів, поліпептиду з м. м. 22000 та його димеру з коефіцієнтом седиментації 3,2S. 8,5S-асоціат також містить лише повний поліпептидний ланцюг. РНК при гель-фільтрації в обох випадках виявляється в у високомолекулярній (13S та більше) та низькомолекулярній (м. м. < 25000) зонах. 8,5S-асоціат РНК не має. Після попереднього прогрівання полієдрів при 80–90 °С протеаза не розщеплює полієдрину в розчині з рН 10,5. При гель-фільтрації за рН 10,5 дисоціація високомолекулярних асоціатів до 8,5S-асоціатів з повним поліпептидним ланцюгом значно менша, але при цьому відокремлюється малий РНП-комплекс з м. м. 20000–25000 і коефіцієнтом седиментації 2,9S, що містить поліпептид з м. м. 10000–12000. Обговорюється вплив протеази та РНК на дисоціацію полієдрину та вивільнення віріонів з полієдрів *in vivo*.

Ключові слова: вірус ядерного полієдрозу, полієдрин, асоціація—дисоціація, протеаза полієдрів, РНК полієдрів, РНП-комплекс, структурно-функціональні взаємодії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Жимерикин В. Н. Некоторые свойства вируса *Birdia diprionis* штамм «Томский» // Вирусы насекомых / Под ред. Н. Н. Воробьева, Л. М. Тарасевич.—М.: Наука, 1975.—197 с.
2. Козлов Э. А., Согуляева В. М., Левитина Т. Л., Верещак В., Серебряный С. Б. Очистка полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда и исследование процессов его ассоциации-диссоциации в растворах // Биохимия.—1969.—34, № 4.—С. 679—684.
3. Козлов Э. А., Унгурияну Н., Серебряный С. Б. Возможная роль протеазы в вирионах вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда // Вирусные болезни растений и насекомых: Тр. ЛСХА.—Елгава, 1980.—Вып. 121.—С. 45—48.
4. Бобровская М. Т., Ковалев В. А., Ширина Т. В., Руденко А. В., Козлов Э. А. Динамика расщепления протеазой полиэдров полиэдрина вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) и идентификация расщепляемых связей // Биополимеры и клетка.—2004.—20, № 3.—С. 207—209.
5. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis // J. Biol. Chem.—1969.—244.—Р. 4406—4412.
6. Боуэн Т. Введение в ультрацентрифугирование.—М.: Мир, 1973.—248 с.
7. Мейбаум В. В. Определение пентоз в нуклеотидах и нуклеозидах посредством реакции Биала // Биохимия.—1945.—10, № 5.—С. 353—359.
8. Bergold G. H. Die isolierung des poliedervirus und die natur der polieder // Z. Naturforsch.—1947.—2b.—Р. 122—143.
9. Kozlov E. A., Levitina T. L., Gusak N. M. The primary structure of baculovirus inclusion body proteins. Evolution and structure-function aspects // Curr. Top. Microbiol. and Immunol.—1986.—131.—Р. 135—164.
10. Harrap K. A. The structure of nuclear polyhedrosis virus. I. The inclusion body // Virology.—1972.—50.—Р. 114—123.
11. Лыло В. В., Серебряный С. Б. Гидродинамические характеристики 12S-олигомера белка тел включений вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* и модель его структуры в растворе // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 3.—С. 139—144.
12. Payne C. C., Kalmakoff J. Alkaline protease associated with virus particles of a nuclear polyhedrosis virus: assay, purification and properties // J. Virol.—1978.—26.—Р. 84—92.
13. Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Деградация вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда // Микробиол. журн.—1980.—42, № 3.—С. 365—371.

УДК 576.858.77

Надійшла до редакції 25.01.06