

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НЕФТЕХИМИИ

На правах рукописи

ТУРОВА Ирина Петровна

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА
ОБОЛОЧКИ X-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

02.00.10 — биорганическая химия, химия природных
и физиологически активных веществ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

АВАНТИ
Работа выполнена в лаборатории структуры и функции белка Института биоорганической химии и нефтехимии АН Украины.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Радавский Ю. Л.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Козлов Э. А.
кандидат биологических наук,
доцент **Тайкова Н. В.**

Ведущее учреждение:

Институт биохимии им. А. В. Палладина
АН Украины.

Защита диссертации состоится «*24*» *09* 1993 г. в 10 часов на заседании специализированного ученого совета Д.016.65.01 в Институте биоорганической химии и нефтехимии АН Украины (253094, г. Киев-94, ул. Мурманская, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии и нефтехимии АН Украины.

Автореферат разослан « » _____ 1993 г.

Ученый секретарь
специализированного совета

ФЕДОРЯК Д. М.

ЛННБ України ім. В. Стефанюка



00815733 (R)

Подписано в печать 25.05.93. 1,24 печ. л. Зак. 447

Типография Киевского института ВВС

Актуальность проблемы. В настоящее время ведутся многочисленные исследования вирусов высших растений и их компонентов. 90% вирусов высших растений имеют одноцепочечный РНК - геном и интерес к ним вызван, с одной стороны, значительным влиянием на экономику народного хозяйства, а с другой - разнообразием структурно - функциональной организации белков и геномных РНК.

Последние годы ознаменовались значительными успехами в изучении антигенных свойств белков, в частности вирусных. Установлено, что антитела и рецепторы иммунокомпетентных клеток узнают не всю молекулу белка, а определенный ее участок - антигенную детерминанту или эпитоп. Изучение тонкого химического строения антигенных детерминант - одна из ключевых проблем биоорганической химии и иммунологии. Знание антигенной структуры капсидных белков дает информацию об их топографии в капсиде, что важно для установления молекулярной организации их вирионов, изучения белок - белкового и белок - нуклеинового взаимодействия и понимания таких процессов, как самосборка вирусов и освобождение РНК от белка.

Объектом наших исследований явился капсидный белок X-вируса картофеля. ХВК относится к группе потексвирусов, которая включает около 30 представителей. Нуклеотидная последовательность структурного гена белка оболочки ХВК была установлена в 1983 году.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение антигенной структуры белка оболочки ХВК и сравнение этого белка с капсидными белками других потексвирусов, первичная структура которых установлена. Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

- определить антигенные детерминанты, локализованные на поверхности вириона;
- охарактеризовать тонкое химическое строение участка полипептидной цепи капсидного белка ХВК, включающего антигенные детерминанты;
- рассчитать потенциальные антигенные детерминанты капсидного белка ХВК и семи капсидных белков потексвирусов с известной первичной структурой;

- провести сравнение первичной и высших структур капсидных белков вирусов потексгруппы.

Научная новизна.

- Впервые, с помощью моноклональных антител проведено эпитопное картирование капсидного белка ХВК. С помощью методов химии белка выделен фрагмент капсидного белка, который взаимодействует с двумя моноклональными антителами, полученными на цельные вирусные частицы.

- Установлено, что в антигенные детерминанты, взаимодействующие с двумя МКА, входит остаток лизина в позиции 19 полипептидной цепи белка. При модификации этого остатка лизина цитраконовым ангидридом, узнавания МКА не происходит.

- Показано, что N - концевой участок капсидного белка ХВК экспонирован на поверхности вириона.

- Впервые проведено сравнение первичной, вторичной и антигенной структур всех капсидных белков вирусов потексгруппы с известной первичной структурой и высказано предположение об общности молекулярной организации их вирионов.

- С помощью расчетных методов доказана принадлежность РМВ к потексгруппе, что ранее дискутировалось.

Практическое значение работы. Разработан способ выделения N-концевого фрагмента капсидного белка ХВК, включающего иммунодоминантную область. Получение синтетических пептидов, входящих в эту область позволит усовершенствовать диагностические тест-системы идентификации ХВК в растениях.

Получены ПКА к ХВК, которые являются важным инструментом для иммунодиагностики вируса в посадочном материале. Метод ИФА с использованием этих ПКА, который апробирован в данной диссертации может быть внедрен в НИИ и хозяйствах Украины, которые заинтересованы в диагностике ХВК.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на V Украинском биохимическом съезде (Ивано-Франковск, 1987); VII Всесоюзном симпозиуме по химии белков и пептидов (Таллинн, 1987); VII съезде Украинского микробиологического общества (Черновцы, 1989); I Всесоюзном симпозиуме по химии белков (Тбилиси, 1990); II Международном симпозиуме "Плюс-цепочечные РНК вирусы" (Австрия, Вена, 1989); VII СССР - ФРГ симпозиум "Химия пептидов и белков" (Дилижан, 1989); Междуна-

родный симпозиум "Вирусология, иммунология и общество" (Киев, 1991).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, двух глав обзора литературы, описания материалов и методов исследования, раздела результатов и обсуждения собственных исследований, выводов и списка цитированной литературы (179 источников). Диссертация содержит 13 таблиц и 20 рисунков.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. В работе использовали средневирулентный штамм ХБК (РУХ). Вирус размножали на растениях дурмана и для выделения использовали листья на 12 сутки после заражения. Белок оболочки выделяли из очищенного вируса солевым методом [Franki, 1968]. Критерием оценки чистоты и целостности белковых препаратов служили результаты электрофореза в ПААГ с ДСН [Laemmli, 1970], N-концевой аминокислотный анализ [Gray, 1972] и аминокислотный состав.

Кроличью антисыворотку к ХБК получали методом чередования внутривенных и внутримышечных инъекций, причем последние проводили смешивая вирус с полным адьювантом Фрейнда. Титр сыворотки определяли капельным методом. МКА к ХБК - 21KD2, 23KA5 и 21KB4 были любезно предоставлены М.Саарма (Институт химической и биологической физики АН Эстонии).

Капсидный белок ХБК расщепляли бромцианом [Серебряный, 1972], трипсином [Descalexi-Canoedda, 1984] и протеазой V8 из *St. aureus* [Aitken, 1984]. Для разделения полученных фрагментов применяли гель-фильтрацию на сефадексе G-50 (Pharmacia, Швеция), ионообменную хроматографию на колонке DEAE-Toyopearl-650 (Toyo Soda, Япония) и ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке "Ultrasphere octyl" с использованием хроматографической системы фирмы "Beckman" (США).

Гомогенность выделенных пептидов определяли с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН [Laemmli, 1970], N-концевого анализа и аминокислотного состава. Аминокислотную последовательность пептидов определяли вручную [Edman, 1956, Gray, 1963] и на микросек-

вензоре 890 М (Beckman, США).

Иммунохимическое изучение ХБК, его капсидного белка и выделенных фрагментов проводили методом "непрямого" иммуноферментного анализа (ИФА) [Clark, 1977], иммуноэлектроблоттинга [Towbin, 1979] и радиоиммуноанализа [Purcell, 1973] с помощью поли- и моноклональных антител к Х-вирусу. Для проведения "непрямого" ИФА использовали платы из полистирола (Dunatex, Швейцария). Оптическое поглощение измеряли при длине волны 414 нм на фотометре Titertek Multiscan (Великобритания).

В радиоиммунологическом анализе использовали платы из поливинилхлорида (Titertek Flow Laboratories, Голландия). Реакции взаимодействия антиген-антитело определяли количественно при помощи связывания белка А меченого изотопом ^{125}I . Результат радиоиммуноанализа измеряли на счетчике "Рагамма" (ЛКВ, Швеция).

Модификацию остатков лизина, содержащихся в N-концевом фрагменте капсидного белка ХБК проводили с помощью цитраконового ангидрида [Новраттаккар, 1984].

Расчет вторичной структуры белков оболочки ХБК и вируса аукуба мозаики картофеля (ВАМК, РМВ) проводили вручную по методу Shou и Fasman, 1978 г, а расчеты вторичных структур этих и еще шести капсидных белков потаксовирусов с помощью компьютерной программы PСGene по методу Garnier, 1978.

Для теоретических расчетов по локализации антигенных детерминант в белках применяли шкалу акрофильности [Норр, 1985], гидрофильности [Норр и Woods, 1981] и гидропатии [Kyte и Doolittle, 1982].

Результаты исследований и их обсуждение

1. Электрофорез и N-концевой анализ белка оболочки PVX

Анализ капсидного белка PVX электрофорезом в ПААГ в присутствии ДСН показал наличие одной полосы, соответствующей белку с М. м. 27 кДа (рис. 1). Молекулярная масса белка PVX, исходя из первичной структуры гена, составляет 27 кДа, что белок PVX при проведении электрофореза в денатурирующих условиях ведет себя аномально. Такое поведение белка связано с большим содержанием остатков серина и треонина в N-концевом участке, что

природит к меньшему связыванию с ДСН и определению завышенного значения М.м. белка. N-концевой анализ показал отсутствие свободной α - аминогруппы в исследуемом белке.

2. Расщепление белка оболочки РvX бромцианом, фракционирование полученных фрагментов и N - концевой анализ

С целью локализации антигенных детерминант в капсидном белке РvX последний расщепляли бромцианом.

Аминокислотная последовательность белка оболочки РvX представлена на рисунке 1. Как видно из рисунка, белок РvX содержит всего семь остатков метионина и, таким образом, в результате расщепления его бромцианом можно получить ограниченное число крупных фрагментов, что крайне важно для локализации в них антигенных детерминант.

После расщепления бромцианом в смеси полученных фрагментов дансилхлоридным методом были идентифицированы следующие N - концевые аминокислотные остатки: Leu, Ile, Ala, Asp, Lys и Pro, что соответствовало последовательностям Met - X первичной структуры гена белка оболочки РvX.

Смесь бромциановых фрагментов фракционировали на сефадексе G-50 в 20% уксусной кислоте (рис. 2). В результате гель-фльтрации были получены четыре фракции пептидной природы, в которых были определены следующие N-концевые аминокислотные остатки:

- I фракция - Asp, Leu, Ile;
- II фракция - Ala, Leu, Ile;
- III фракция - Pro;
- IV фракция - Lys.

"Непрямой" иммуноферментный анализ показал, что только фракция I дает специфическую реакцию с ПКА и МКА, и, следовательно, содержит антигенные детерминанты нативного белка. Так как основная цель настоящей работы - изучение антигенной структуры белка оболочки РvX, в дальнейшем мы исследовали именно эту фракцию.

Для дальнейшей очистки фракцию I хроматографировали на ионообменнике DEAE-Toyorearl-650 (рис. 3). В результате хроматографического разделения были получены три фракции содержащие пептидный материал в гомогенном состоянии. Во фракции

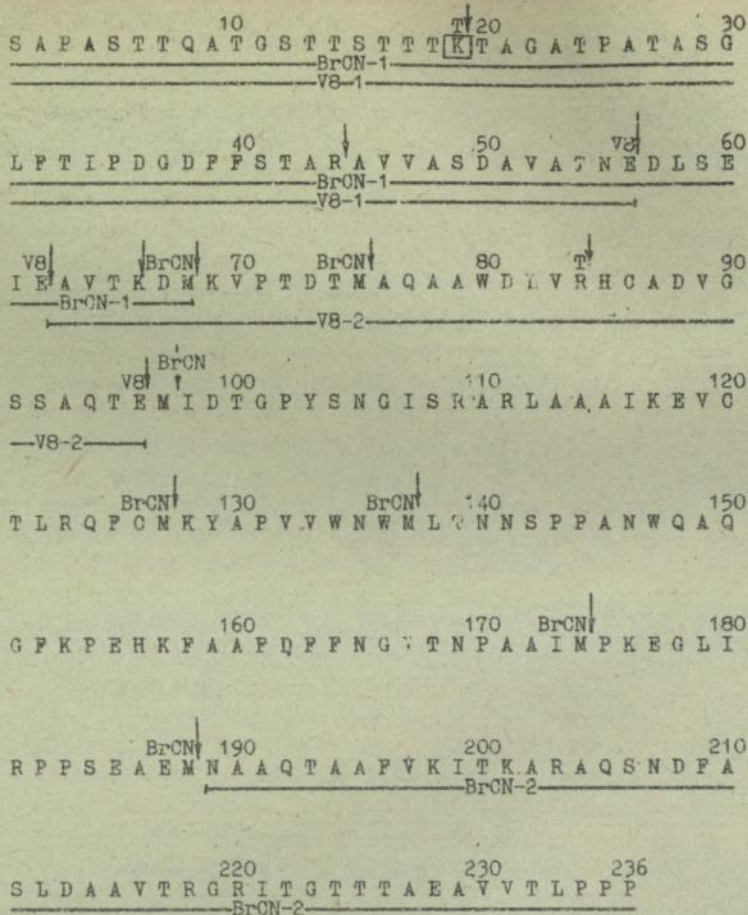


Рис. 1 Аминокислотная последовательность капсидного белка ХБК
 [Морозов, 1983]

Стрелками показаны атакуемые бромцианом, трипсином (T) и протеазой из *St. aureus* (VB) пептидные связи. Прямые линии отмечены выделенные пептиды. В рамке остаток лизина, входящий в антигенную детерминанту.

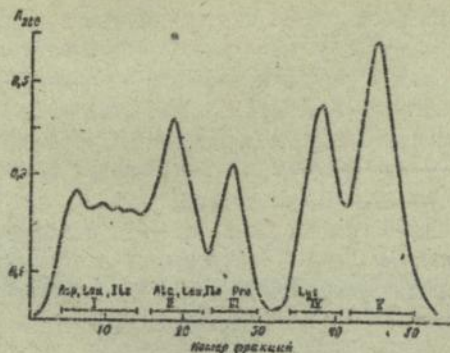


Рис. 2 Фракционирование смеси фрагментов бромированного расщепления капсидного белка PVX на сефадексе G-50 в 20% CH_3COOH . Колонка 2,8x45 см, скорость элюции 30 мл/ч, объем фракции - 3 мл

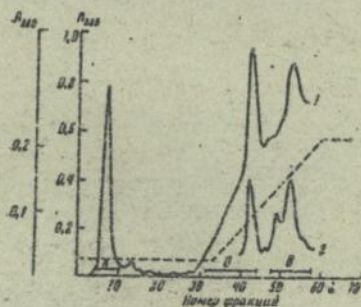


Рис. 3 Хроматограмма фракции I (рис. 2) на колонке с DEAE-Toyorearl-650

Колонка 1,6x12 см. Линейный градиент (---) 0,01-0,5 моль NH_4HCO_3 рН 9,0. Объем фракции 3 мл. 1 - оптическая плотность при 220 нм, 2 - оптическая плотность при 290 нм

А в качестве N-концевой была идентифицирована аспарагиновая кислота, а во фракции Б не было обнаружено свободной α -NH₂-группы. Исходя из данных о нуклеотидной последовательности гена белка оболочки RVX, С-концевой бромциановый фрагмент должен иметь N-концевую аспарагиновую кислоту. Таким образом, фракция А, по-видимому, содержит С-концевой бромциановый фрагмент белка оболочки RVX, а фракция Б, с учетом данных об отсутствии свободной α -NH₂-группы в белке, соответствует N-концевому фрагменту, обозначаемому нами BrCN-1. Последующий анализ показал правильность этого предположения. Фракция В - неомогенна и в дальнейшем не исследовалась.

3. Характеристика ряда бромциановых фрагментов

3.1. Электрофорез в ПААГ с ДСН

Смесь бромциановых фрагментов и отдельных фракций и пептидов, полученных после разделения анализировали электрофорезом в ПААГ с ДСН (рис. 4).

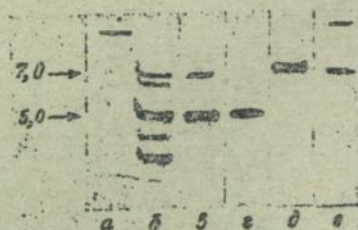


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ с ДСН и иммуноблоттинг капсидного белка RVX и его бромциановых фрагментов
а - капсидный белок RVX; б - смесь бромциановых фрагментов;
в - фракция I (рис. 2); г - фракция А (рис. 3);
д - фракция Б (рис. 3); е - иммуноблоттинг смеси бромциановых фрагментов и капсидного белка RVX.

Как видно из рисунка фракция I содержит, в основном, два крупных фрагмента М.м. около 7 и 5 кДа, соответственно. Это также свидетельствует о том, что указанная фракция содержит N- и C-концевые крупные фрагменты. Данные, представленные на рисунке 4 (г и д), свидетельствуют также о том, что в результате ионообменной хроматографии были получены два гомогенных бромциановых пептида.

3.2. Аминокислотный состав и первичная структура

Аминокислотный состав полученных пептидов был близок к аминокислотному составу этих участков полипептидной цепи белка. В пептиде (фракция А) не обнаружен C- концевой гомосерин, что говорит о C - концевом расположении данного фрагмента в белке.

Фракция III (рис 2) по данным дансильирования имеет N-концевой пролин и представляет собой гомогенный пептид. Однако, сравнение его аминокислотного состава с этим же участком структурного гена белка оболочки PVX (рис. 1), свидетельствует о некотором различии. Это обстоятельство побудило нас определить аминокислотную последовательность данного пептида. Ниже приведена первичная структура, установленная нами методом Эдмана в дансильной модификации и предсказанная по нуклеотидной последовательности этого участка структурного гена:

P - K - E - G - L - I - R - P - A - S - E - (A, E) - Gsr

P - K - E - G - L - I - R - P - P - S - E - A - E - M

Вместо остатка пролина (позиция 9) был идентифицирован аланин.

C- концевой бромциановый фрагмент (BrCN-2) содержит 48 аминокислотных остатков. Ниже приведена его N - концевая последовательность, определенная нами на автоматическом секвенаторе аминокислот:

N - A - A - G - T - A - A - F - V - K -

N - A - A - G - T - A - A - P - V - K

Эта первичная структура гомологична последовательности, выведенной из структурного гена капсидного белка PVX (рис. 1).

4. Иммунохимический анализ белка оболочки RVX и его бромциановых фрагментов

Результаты иммунохимического анализа RVX, его белка оболочки, N- и C-концевых фрагментов методом "непрямого" ИФА с ПКА и с МКА 21XB4, 21XD2 и 23XA5 представлены в таблице 1. Как видно из приведенных данных, N-концевой бромциановый фрагмент содержит антигенную детерминанту (детерминанты). Все три МКА взаимодействуют с RVX и его капсидным белком. Более того, МКА 21XD2 и 23XA5 специфически взаимодействуют также с N-концевым бромциановым фрагментом и со смесью N- и C-концевых фрагментов. МКА 21XB4 узнает белок оболочки RVX, но не дает специфической реакции со смесью бромциановых фрагментов. Возможно, что антигенная детерминанта узнаваемая МКА 21XB4 локализована на расщепленном участке белка оболочки.

Результаты "непрямого" радиоиммуноанализа подтверждают тот факт, что N - концевой бромциановый фрагмент белка оболочки RVX узнается МКА 21XD2 (Табл. 2). Таким образом, можно утверждать, что один или два эпитопа, узнаваемые этими МКА, локализованы в N-концевом участке белка оболочки RVX. Необходимо отметить, что C- концевой бромциановый фрагмент также взаимодействует с ПКА, но слабее чем N-концевой фрагмент.

Для локализации антигенных детерминант мы применяли также иммуноэлектроблоттинг, в котором были использованы только МКА 21XD2. Согласно данным по иммуноблоттингу (рис. 4) три полосы с электрофоретической подвижностью 27, 7, и 6,5 кДа дали реакцию с антителами. Известно, что помимо интактного белка только N-концевой бромциановый фрагмент (68 аминокислотных остатков) может находиться в этой зоне. Второй по величине, C-концевой бромциановый фрагмент (48 аминокислотных остатков) обладает большей подвижностью (рис. 4.5, г).

Данные, полученные "непрямым" ИФА и иммуноблоттингом с применением ПКА и МКА, свидетельствуют о наличии в N-концевом участке белка оболочки RVX по крайней мере одного эпитопа. Этот участок содержит большое число гидрофильных аминокислотных остатков. Известно, что антигенные детерминанты белков очень часто содержат именно гидрофильные остатки [Lerner, 1981].

Таблица 1

Сравнение антигенной активности РVХ, белка оболочки РVХ, N- и С-концевых бромциановых фрагментов белка оболочки методом МКА

Антитело	А н т и г е н				
	РVХ	Белок оболочки	Смесь N- и С-концевых фрагментов	N-концевой фрагмент	С-концевой фрагмент
21XB4	0,63	0,38	+	+	+
21XD2	0,54	0,46	0,35	0,42	0,19
23XA5	0,75	0,45	0,36	0,42	0,21
ПКА	0,97	0,79	0,69	0,75	0,41

Результаты представлены в единицах поглощения при длине волны 414 нм. [†]Взаимодействие МКА 21XB4 с N- и С-концевыми фрагментами белка оболочки РVХ не являлось специфическим (наблюдалась лишь высокая фоновая реакция, 0,2 ед. оптической плотности, при разных концентрациях антигена), поэтому цифровые значения этих данных в таблице не приведены.

Таблица 2

Сравнение антигенной активности РVХ, белка оболочки РVХ, N- и С-концевых бромциановых фрагментов белка оболочки методом радиоиммуноанализа

Антитело	А н т и г е н				
	РVХ	Белок оболочки	Смесь N- и С-концевых фрагментов	N-концевой фрагмент	С-концевой фрагмент
21XD2	3199	699	433	647	252
23XA5	3356	1106	304	863	139
ПКА	4820	1897	454	1254	392

Реакцию взаимодействия антиген - антитело определяли количественно при помощи ¹²⁵I белка А. В лунки плат вносили по 3,75 нкюри (8000 имп/мин) меченого йодом белка А. Результаты радиоиммуноанализа представлены в имп/мин с вычитанием фонового значения (550 имп/мин), полученного при взаимодействии исследуемых АТ к РVХ с серологически не родственным вирусом - ВТМ.

5. Триптический гидролиз и модификация N-концевого бромцианового фрагмента

N-концевой бромциановый фрагмент (BrCN-1) содержит два остатка лизина в позициях 19 и 66 и остаток аргинина в позиции 44 (рис. 1). С целью получения пептидов, возможно включающих антигенные детерминанты, фрагмент расщепляли трипсином. Однако, при анализе смеси триптических пептидов дог - блоттингом и ИФА (Табл. 3) с помощью МКА не было отмечено положительной реакции. Это свидетельствовало о том, что остатки лизина или аргинина входят в антигенную детерминанту или детерминанты, для которых специфичны используемые антитела. Для доказательства важности участия остатков лизина во фрагменте BrCN-1 при взаимодействии с МКА проводили его модификацию цитраконовым ангидридом. Известно, что цитраконовый ангидрид модифицирует α -NH₂-группы лизина и остаток приобретает отрицательный заряд. Цитраконалированный пептид не давал специфической реакции с МКА (Табл. 3), однако, при снятии цитраконовой защиты сила отмечена положительная реакция. Полученные результаты свидетельствовали о том, что в антигенную детерминанту или детерминанты, взаимодействующие с обоими МКА входит остаток лизина.

Таблица 3

Сравнение антигенной активности белка оболочки RVX и его фрагментов методом "непрямого" ИФА

АНТИГЕН							
Анти- тело	Белок	Триптичес-	Фрагмент	Модифи-	Пептид	Пептид	ВТМ
МКА	Болоч-	кий гидро-	BrCN-1	цирован-	v8-1	v8-2	
	ки	лизат		ный			
		BrCN-1		BrCN-1			
21XD2	0,47	0,04	0,43	0,06	0,52	0,04	0,02
23XA5	0,46	0,04	0,44	0,06	0,50	0,03	0,03

Результаты представлены в единицах поглощения при длине волны 414 нм. В качестве контроля использовался белок оболочки ВТМ.

5. Иммунохимический анализ пептидов, полученных в результате расщепления белка РvX протеазой V8 из *St. aureus*

Так как фрагмент ВгСН-1 содержит два остатка лизина, необходимо было установить, какой из этих остатков специфичен для МКА 21ХД2, а какой для 23ХА5, или оба МКА специфичны для одного и того же остатка лизина. С этой целью капсидный белок РvX расщепляли протеазой V8 из *St. aureus*. Известно, что данный фермент расщепляет пептидную связь, образованную карбоксильной группой глутаминовой кислоты. В результате расщепления протеазой V8 можно было ожидать получения двух крупных фрагментов, включающих остатки 1 - 56 и 64-96 (рис. 1). Первый из этих фрагментов включает остаток лизина в позиции 19, а второй - в позиции 66 последовательности белка оболочки РvX.

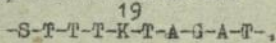
Продукт расщепления белка протеазой V8, фракционировали ВЭЖХ в обращенной фазе (рис. 4) и полученные фракции анализировали "непрямым" методом ИФА. Из всех пептидных фракций, представленных на рисунке, только материал фракции 15 взаимодействовал с обоими МКА.

N-концевым анализом не было обнаружено свободной α-аминогруппы в материале данной фракции. Анализируя вышеизложенное, а также данные по аминокислотному составу получаемого фрагмента, можно утверждать, что фракция 15 представляет собой гомогенный N-концевой пептид (V8 - 1) белка оболочки РvX, включающий 56 аминокислотных остатков. Результаты иммуноанализа этого пептида представлены в таблице 3. Пептид V8-2 не взаимодействует ни с одним из используемых МКА (табл. 3), следовательно, не входит в состав соответствующих детерминант.

Таким образом, МКА 21ХД2 и 23ХА5 взаимодействуют с участком полипептидной цепи капсидного белка РvX, включающим остаток лизина в позиции 19. Можно предположить, что:

- а) этим МКА соответствует одна общая детерминанта;
- б) имеются две перекрывающиеся антигенные детерминанты, в которые входит один и тот же остаток лизина.

По-видимому, для взаимодействия с МКА помимо положительного заряда на остатке лизина существенно также наличие большого числа гидроксаминнокислотных остатков в последовательности



которые могут образовывать водородные связи в активном центре антител.

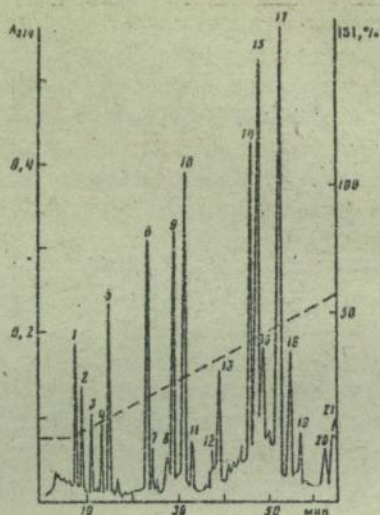


Рис. 4 Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза белка оболочки РНК протеазой V8 из *St. aureus* с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе. Состав подвижной фазы: А - 3% изопропиловый спирт, 0,1% ТЭВ, 0,1% N-этилморфолин; В - 60% изопропиловый спирт, 0,1% ТЭВ, 0,1% N-этилморфолин. (----) - изменение концентрации буфера В.

7. Сравнение первичных и высших структур капсидных белков восьми представителей потексвирусов

В настоящее время установлена полная нуклеотидная последовательность структурных генов семи представителей потексвирусов: РНК, РМV [Бундия, 1986], WС1MV - вируса мозаики белого клевера [Forster, 1986], О1УMV - вируса желтой мозаики клевера [Abou Haidar, 1989], РMV - вируса мозаики папайи [Abou Haidar, 1988], NMV - вируса мозаики нарцисса [Zuidema, 1989], LVX - X- вирус лилии [Memelink, 1990] и SMYEV-вируса ассоциированного со слабым пожелтением краев листьев земляники [Jelkman, 1991] рассматри-

веного ранее, как лютеовирус, но, по-видимому, также относящегося к потексвирусам. Кроме значительного сходства в организации генома у данных потексвирусов обнаруживается также существенная гомология в аминокислотных последовательностях их капсидных белков (рис. 5).

Используя компьютерную программу GENEVIEW, мы сравнили аминокислотные последовательности белков оболочек восьми представителей потексвирусов и обнаружили, что N-концевые области белков оболочек вариабельны по длине (по отношению к высококонсервативной последовательности KFAAFDFFDGV) и характеризуются отсутствием гомологичных участков аминокислот. Основная часть гомологичных последовательностей аминокислот расположена в центральной части белковых молекул. Сохранение высококонсервативных последовательностей аминокислот в белках оболочек указывает на их важную роль в определении вторичной и третичной структуры и обеспечении белок - белковых и РНК - белковых взаимодействий в процессе самосборки вирусных частиц.

С помощью компьютерной программы PCGene, мы предсказали (по методу Garnier) и сравнили вторичные структуры восьми капсидных белков потексвирусов (рис. 6). Предсказанное число α -спиралей, β -поворотов, вытянутых участков и клубков для белков оболочек составило следующие значения:

Белок оболочки	α -спираль	неупорядоченный вытянутый участок	β -поворот	неупорядоченный клубок
PVX	48,3%	31,67%	5,0%	14,8%
WC1MV	49,4%	28,9%	11,5%	10,0%
CL1MV	31,1%	41,5%	8,4%	18,8%
PMV	41,0%	32,5%	9,2%	16,9%
PAMV	57,2%	22,9%	6,4%	13,3%
LVX	47,7%	25,8%	12,9%	13,4%
NMV	32,4%	44,7%	9,2%	13,5%
SMYEV	27,2%	45,4%	14,4	12,8%

Расчеты, проведенные нами, свидетельствуют о том, что доминирующим элементом вторичной структуры капсидных белков

WTFFVPLATWADVATFAGSEEVATIEELQEIATLW.HCIGIPAAE
 EYDSEKYLPRAPFSGQLDVLVLT.I.SELVPLIIELEIAAEV.HIKELGLAD
 FSHYETDEKHTYPPQVYVAFETKAREGRTBQAGRIQFLSATIQPSEEDYRSGPLASLDKIAETVTRTGLASFAEILATVGLVHTKHTIPAEK
 FHY NQKESSESTPRTAFPAITQKQKSTIEVDFTELPAQKGLERVSTL.VAAIYFAAS
 HCLHY NATTATFFPDLTE[34]LETTSPPVAVASFAHIAITETTAHTVCIYSDY
 FTE KEAFATTTQATERTTDTTTEK[6]ATP[1]ATACGLFTIPGCGFFVYKAAIYANNATATSEELKXIELTV.KEMIVFTDY
 HNY NATPCTTDTTDFLPAASLDSDPRAPELHDLKXIIITSTTAVYFAIGLGLDLY.K[1]GLDANS
 HAKHY KGDGPFVTVVPAFGESEFLPHOSTPYYLFRRTFVREANVAQVGDFFRSLTPEELIATICAAAGLTAAS.SQILCIVASGLMALTFVSDY

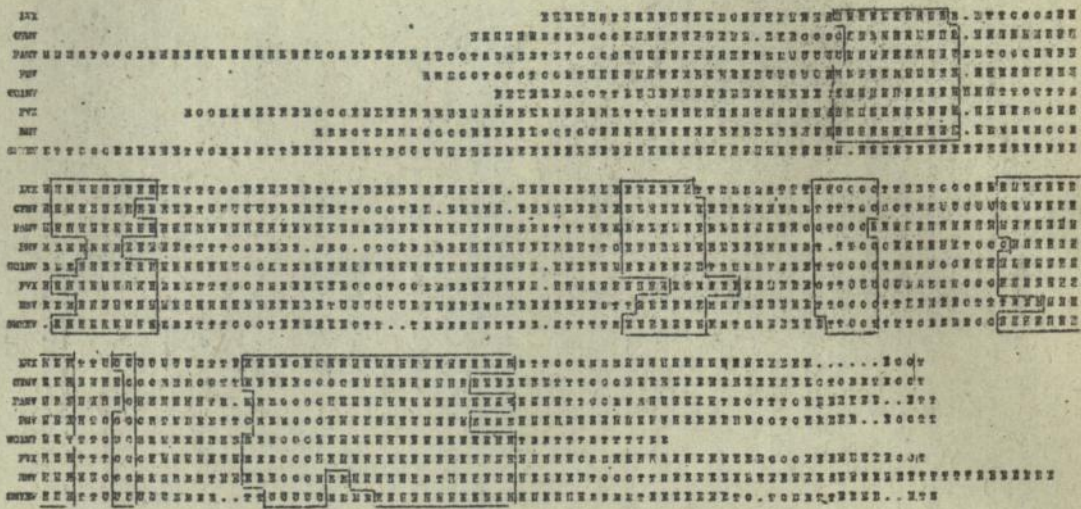
SHY	F	F	D	V	P	L	A	T	W	A	D	V	A	T	F	A	G	S	E	E	V	A	T	I	E	E	L	Q	E	I	A	T	L	W	.	H	C	I	G	I	P	A	A	E																																															
SHY	E	Y	D	S	E	K	Y	L	P	R	A	P	F	S	G	L	D	V	L	V	L	T	.	S	E	L	V	P	L	I	E	L	E	I	A	A	E	V	.	H	I	K	E	L	G	L	A	D																																											
F	S	H	Y	E	T	D	E	K	H	T	Y	P	P	Q	V	Y	V	A	F	E	T	K	A	R	E	G	R	T	B	Q	A	G	R	I	Q	F	L	S	A	T	I	Q	P	S	E	E	D	Y	R	S	G	P	L	A	S	L	D	K	I	A	E	T	V	T	R	T	G	L	A	S	F	A	E	I	L	A	T	V	G	L	V	H	T	K	H	T	I	P	A	E	K
F	H	Y	N	Q	K	E	S	S	E	S	T	P	R	T	A	F	F	A	I	T	Q	K	Q	K	S	T	I	E	V	D	F	T	E	L	P	A	Q	K	G	L	E	R	V	S	T	L	.	V	A	A	I	Y	F	A	A	S																																			
H	C	L	H	Y	N	A	T	T	A	T	F	F	P	D	L	T	E	[34]	L	E	T	T	S	P	P	V	A	V	A	S	F	A	H	I	A	I	T	E	T	T	A	H	T	V	C	I	Y	S	D	Y																																									
F	T	E	K	E	A	F	A	T	T	Q	A	T	E	R	T	T	D	T	T	T	T	T	[6]	A	T	P	[1]	A	T	A	C	G	L	F	T	I	P	G	C	G	F	F	V	Y	K	A	A	I	Y	A	N	N	A	T	A	T	S	E	E	L	K	X	I	E	L	T	V	.	K	E	M	I	V	F	T	D	Y														
H	N	Y	N	A	T	P	C	T	T	D	T	T	D	F	L	P	A	A	S	L	D	S	D	P	R	A	P	E	L	H	D	L	K	X	I	I	T	S	T	T	A	V	Y	F	A	I	G	L	G	L	D	L	Y	.	K	[1]	G	L	D	A	N	S																													
H	A	K	H	Y	K	G	D	G	P	F	V	T	V	V	P	A	F	G	E	S	E	F	L	P	H	O	S	T	P	Y	Y	L	F	R	T	F	V	R	E	A	N	V	A	Q	V	G	D	F	F	R	S	L	T	P	E	E	L	I	A	T	I	C	A	A	G	L	T	A	A	S	.	S	Q	I	L	C	I	V	A	S	G	L	M	A	L	T	F	V	S	D	Y

SHY	F	F	D	V	P	L	A	T	W	A	D	V	A	T	F	A	G	S	E	E	V	A	T	I	E	E	L	Q	E	I	A	T	L	W	.	H	C	I	G	I	P	A	A	E																																															
SHY	E	Y	D	S	E	K	Y	L	P	R	A	P	F	S	G	L	D	V	L	V	L	T	.	S	E	L	V	P	L	I	E	L	E	I	A	A	E	V	.	H	I	K	E	L	G	L	A	D																																											
F	S	H	Y	E	T	D	E	K	H	T	Y	P	P	Q	V	Y	V	A	F	E	T	K	A	R	E	G	R	T	B	Q	A	G	R	I	Q	F	L	S	A	T	I	Q	P	S	E	E	D	Y	R	S	G	P	L	A	S	L	D	K	I	A	E	T	V	T	R	T	G	L	A	S	F	A	E	I	L	A	T	V	G	L	V	H	T	K	H	T	I	P	A	E	K
F	H	Y	N	Q	K	E	S	S	E	S	T	P	R	T	A	F	F	A	I	T	Q	K	Q	K	S	T	I	E	V	D	F	T	E	L	P	A	Q	K	G	L	E	R	V	S	T	L	.	V	A	A	I	Y	F	A	A	S																																			
H	C	L	H	Y	N	A	T	T	A	T	F	F	P	D	L	T	E	[34]	L	E	T	T	S	P	P	V	A	V	A	S	F	A	H	I	A	I	T	E	T	T	A	H	T	V	C	I	Y	S	D	Y																																									
F	T	E	K	E	A	F	A	T	T	Q	A	T	E	R	T	T	D	T	T	T	T	[6]	A	T	P	[1]	A	T	A	C	G	L	F	T	I	P	G	C	G	F	F	V	Y	K	A	A	I	Y	A	N	N	A	T	A	T	S	E	E	L	K	X	I	E	L	T	V	.	K	E	M	I	V	F	T	D	Y															
H	N	Y	N	A	T	P	C	T	T	D	T	D	F	L	P	A	A	S	L	D	S	D	P	R	A	P	E	L	H	D	L	K	X	I	I	T	S	T	T	A	V	Y	F	A	I	G	L	G	L	D	L	Y	.	K	[1]	G	L	D	A	N	S																														
H	A	K	H	Y	K	G	D	G	P	F	V	T	V	V	P	A	F	G	E	S	E	F	L	P	H	O	S	T	P	Y	Y	L	F	R	T	F	V	R	E	A	N	V	A	Q	V	G	D	F	F	R	S	L	T	P	E	E	L	I	A	T	I	C	A	A	G	L	T	A	A	S	.	S	Q	I	L	C	I	V	A	S	G	L	M	A	L	T	F	V	S	D	Y

SHY	F	F	D	V	P	L	A	T	W	A	D	V	A	T	F	A	G	S	E	E	V	A	T	I	E	E	L	Q	E	I	A	T	L	W	.	H	C	I	G	I	P	A	A	E																																															
SHY	E	Y	D	S	E	K	Y	L	P	R	A	P	F	S	G	L	D	V	L	V	L	T	.	S	E	L	V	P	L	I	E	L	E	I	A	A	E	V	.	H	I	K	E	L	G	L	A	D																																											
F	S	H	Y	E	T	D	E	K	H	T	Y	P	P	Q	V	Y	V	A	F	E	T	K	A	R	E	G	R	T	B	Q	A	G	R	I	Q	F	L	S	A	T	I	Q	P	S	E	E	D	Y	R	S	G	P	L	A	S	L	D	K	I	A	E	T	V	T	R	T	G	L	A	S	F	A	E	I	L	A	T	V	G	L	V	H	T	K	H	T	I	P	A	E	K
F	H	Y	N	Q	K	E	S	S	E	S	T	P	R	T	A	F	F	A	I	T	Q	K	Q	K	S	T	I	E	V	D	F	T	E	L	P	A	Q	K	G	L	E	R	V	S	T	L	.	V	A	A	I	Y	F	A	A	S																																			
H	C	L	H	Y	N	A	T	T	A	T	F	F	P	D	L	T	E	[34]	L	E	T	T	S	P	P	V	A	V	A	S	F	A	H	I	A	I	T	E	T	T	A	H	T	V	C	I	Y	S	D	Y																																									
F	T	E	K	E	A	F	A	T	T	Q	A	T	E	R	T	T	D	T	T	T	T	[6]	A	T	P	[1]	A	T	A	C	G	L	F	T	I	P	G	C	G	F	F	V	Y	K	A	A	I	Y	A	N	N	A	T	A	T	S	E	E	L	K	X	I	E	L	T	V	.	K	E	M	I	V	F	T	D	Y															
H	N	Y	N	A	T	P	C	T	T	D	T	D	F	L	P	A	A	S	L	D	S	D	P	R	A	P	E	L	H	D	L	K	X	I	I	T	S	T	T	A	V	Y	F	A	I	G	L	G	L	D	L	Y	.	K	[1]	G	L	D	A	N	S																														
H	A	K	H	Y	K	G	D	G	P	F	V	T	V	V	P	A	F	G	E	S	E	F	L	P	H	O	S	T	P	Y	Y	L	F	R	T	F	V	R	E	A	N	V	A	Q	V	G	D	F	F	R	S	L	T	P	E	E	L	I	A	T	I	C	A	A	G	L	T	A	A	S	.	S	Q	I	L	C	I	V	A	S	G	L	M	A	L	T	F	V	S	D	Y

-91-

Рис. 5 Сравнение аминокислотных последовательностей капсидных белков вирусов потексгруппы.



-17-

Рис. 6 Сравнение вторичных структур капсидных белков потексвирусов.
 Н - α -спираль; Т - β -поворот;
 Е - неупорядоченный вытянутый участок;
 С - неупорядоченный клубок.

ЛНБ ім. В. Стефаника
 АН України

потексвирусов является α -спираль.

Распределение предсказанных α -спиральных участков вдоль полипептидной цепи белков оболочек потексвирусов указывает на существование некоей двойной симметрии между N- и C-концевыми областями. Такое распределение свидетельствует о том, что α -спирали могут взаимодействовать друг с другом образуя третичную структуру. Аналогичная упаковка капсидного белка имеет место в ВТМ, где вторичная структура N- и C-концевых участков подобна и распределение элементов вторичной структуры вдоль полипептидной цепи довольно симметрично [McLachlan, 1980].

Tollin с соавт. в 1980 году высказали предположение, что положительно заряженные группы аминокислотных остатков белков оболочек PVX и PMV способны взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами РНК, а пять нуклеотидов ассоциированы с каждой белковой субъединицей. При сравнении аминокислотных последовательностей белков оболочек изучаемых вирусов, в основном, идентичны пять положительно заряженных аминокислотных остатков (рис. 5):

PVX	-	K(70), R(124), K(158), R(182), K(199)
LVX	-	R(94), R(126), R(152), K(166)
PANV	-	R(80), R(138), K(172), R(195), K(209)
OLYMV	-	K(42), R(98), R(132), R(156), K(170)
PMV	-	K(50), R(103), K(136), R(160), K(174)
WOLMV	-	K(45), R(99), K(133), R(157), K(171)
NMV	-	K(57), R(114), K(148), R(172), K(186)
SMYEV	-	R(133), K(167), R(199), K(213)

8. Расчет и сравнение профилей гидрофильности, акрофильности и гидропатии белков оболочек потексвирусов

Из литературных источников известно [Van Regenmortel, 1988], что весьма полезными для изучения антигенной структуры белков являются теоретические предсказательные методы. Для расчета степени гидрофильности изучаемых белков мы использовали алгоритм, предложенный Норр и Woods и соответствующую компьютерную программу PCGene, где используется этот алгоритм.

При сравнении профилей гидрофильности всех белков можно отметить следующие особенности. В подавляющем большинстве капсид-

ные белки имеют гидрофильную природу N- и C-концевых участков. Однако, наиболее высококонсервативная область всех восьми белков имеет гидрофобную природу.

Как отмечалось выше, в капсидных белках потексвирусов присутствуют пять аминокислотных остатков с положительным зарядом, которые, по-видимому, взаимодействуют с фосфатными группами РНК. Анализ профилей гидрофильности восьми белков показал, что участки полипептидной цепи, включающие эти пять остатков, имеют гидрофильную природу.

Так как объектом наших исследований является белок оболочки РVХ, а принадлежность РAМV к потексгруппе до настоящего времени дискутируется в литературе, то нам было интересно сравнить различные, наиболее широко используемые методы предсказания и расчета антигенных детерминант применительно к РVХ и, одновременно, более детально сравнить вторичные структуры и некоторые другие характеристики двух указанных вирусов.

Вторичную структуру определяли по методу Chou и Fasman, акрофильность и гидрофильность рассчитывали по Норр, гидронатию — по Kuts и Doolittle. Предсказанное число α -спиралей, β -складок и β -поворотов для белка оболочки РVХ составляет соответственно 37, 10 и 16%, а для белка оболочки РAМV — 34, 14 и 20%.

Расчеты гидро- и акрофильности двух белков показали, что гомологичный участок наибольшей длины, для двух белков, вмещающий 8 аминокислотных остатков (позиция 157 — 164 белка оболочки РVХ и позиция 173 — 180 белка оболочки РAМV), имеет отрицательное значение акро- и гидрофильности. В основном профили акро- и гидрофильности в каждом белке совпадают, хотя есть и некоторое несоответствие. Так, в позиции 1 — 28 белка оболочки РVХ отмечено положительное значение акрофильности, а значение гидрофильности отрицательное. N-концевой участок РVХ отличается заметно большим индексом акрофильности по сравнению с индексом гидрофильности, что говорит скорее о тенденции этой области располагаться на поверхности белковой молекулы, чем о скоплении в данном районе большого числа заряженных аминокислотных остатков. Что касается N-концевого участка РAМV, то для него характерен как высокий индекс акрофильности, так и гидрофильности.

Профили гидронатии двух исследуемых белков также характеризуют тенденцию N-концевых участков обоих белков

располагаться на поверхности белковой молекулы.

Эти и вышеприведенные результаты показывают, что белки оболочек РМV и РVX имеют общие структурные особенности и, как следствие, обладают общей организацией вирионов, что позволяет отнести РМV к группе потексвирусов.

Несмотря на то, что методы расчета антигенных детерминант оказались весьма полезными при сравнении структур капсидных белков восьми представителей вирусов потексгруппы, ни один из использованных алгоритмов не указал на иммунодоминантную область, экспериментально найденную в белке оболочки РVX.

ВЫВОДЫ

1. В результате расщепления белка оболочки РVX бромцианом в гидролизате определены следующие аминокислотные остатки: Ala, Leu, Ile, Pro, Iys и Asp, что соответствует последовательностям Met - X, установленным после секвенирования структурного гена данного белка.

2. Методами гель-фильтрации и ионного обмена выделены в гомогенном виде три пептида белка РVX: N - концевой (68 аминокислотных остатка), C - концевой (45 аминокислотных остатка) и внутренний (15 аминокислотных остатка).

3. Установлена аминокислотная последовательность внутреннего пептида белка оболочки РVX включающего 15 аминокислотных остатков. Показано различие в одном аминокислотном остатке по сравнению с данным участком структурного гена этого белка.

4. С помощью двух МКА и ПККА к РVX проведен иммунологический анализ капсидного белка и его бромциановых и триплических фрагментов, а также пептидов, полученных в результате гидролиза протеазой V8 из *St. aureus*. Впервые установлено, что иммунодоминантная область локализована в N - концевом участке белка.

5. При помощи ВЭЖХ в обращенной фазе выделен пептид из гидролизата белка оболочки РVX протеазой V8 из *St. aureus*, который взаимодействует с обоими МКА.

6. В результате модификации крупного N - концевого фрагмента цитраконовым ангидридом установлено, что для взаимодействия с МКА важен остаток лизина в позиции 19 полипептидной цепи белке оболочки РVX.

7. Проведен теоретический анализ эпитопных детерминант капсидных белков PVX и PAMV и расчет вторичной структуры 8 белков оболочек вирусов потексгруппы. Показано, что распределение гидрофильных и гидрофобных участков этих белков сходно. На основании этого можно утверждать принадлежность PAMV к потексгруппе.

8. Проведено сравнение аминокислотных последовательностей восьми белков оболочек вирусов потексгруппы и установлено их значительное структурное подобие, что свидетельствует о сходстве молекулярной организации их вирионов.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Турова И.П., Зайкин А.А., Грама Д.П. Вивчення антигенної структури білка оболонки X- та M-вірусів картоплі // Тез. доп. V Укр. біохім. з'їзду. - Івано-Франківськ. -1987. -ч.1, с.131-132

2. Турова И.П., Витер С.С., Радавский Ю.Л. Аналіз бромціанових фрагментів білка оболонки X-вірусу картоплі (ХБК) // Тез. доп. V Укр. біохім. з'їзду. - Івано-Франківськ. -1987. -ч.2, с.211

3. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Турова И.П., Гершкович А.А., Зайкин А.А., Ярецький Л., Сварма М.Ю. Изучение антигенной структуры белка оболочки X-вируса картофеля // Тез. докл. VII Весовз. симпоз. по химии белков и пептидов. -Таллинн. -1987. -с.90 - 91

4. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Турова И.П., Грама Д.П., Бобкова А.Ф., Гольдштейн М.И., Ярецький Л.В., Сварма М.Ю. Антигенная структура белка оболочки X-вируса картофеля. I. Иммунологический анализ бромциановых фрагментов // Биоорганическая химия. -1988. -Т.14, №1. -с.20-26

5. Турова И.П., Витер С.С., Радавский Ю.Л. Сравнение вторичной структуры, гидрофильности и гидрофобности белков оболочек X-вируса картофеля и вируса аукуба мозаики картофеля // Докл. АН УССР. -1988. -№9. -с.80-83

6. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Турова И.П., Зайцева Л.С., Ярецький Л.В., Сварма М.Ю., Гребенщиков Н.И., Бератова Л.А. Антигенная структура белка оболочки X-вируса картофеля. II. Локализация антигенной(ных) детерминант в N-концевом участке белка // Биоорганическая химия. -1989. -Т.15, №5. -с.615-619

7. Турова И.П., Витер С.С., Зайкин А.А., Зайцева Л.С., Грама Д.П., Радавский Ю.Л. Изучение антигенной структуры белков оболочек X-вируса картофеля и вируса аukuба мозаики картофеля // Тез. докл. VII Съезда Укр. микробиол. общества.-Черновцы.-1989.-ч.2, с.183-184

8. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Турова И.П., Зайцева Л.С., Дыбенко А.Г., Шилин В.В., Ярвекюльг Л.В., Саарме М.Д. Антигенная структура капсидных белков трех вирусов картофеля // Тез. докл. Всесоюз. симпозиум химия белков.-Тбилиси.-1990.-с.147

9. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Turova I.P., Dybenko A.G., Gershkovich A.A., Shilin V.V., Jarvekulg L.V., Saarma M.J. Antigenic structure of the coat proteins of potato virus X (PVX) and of potato aucuba mosaic virus (PAMV) // Abstr. 2-d Intern. Sympos on "Positive strand RNA viruses".-Vienna (Austria).-1989.-p.43

10. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Turova I.P., Dybenko A.G., Gershkovich A.A., Shilin V.V., Jarvekulg L.V., Saarma M.J. Immunochemical analysis of the coat proteins of potato virus X (PVX) and of potato aucuba mosaic virus (PAMV) // Abstr. 7-th USSR - FRG Sympos. on "Chemistry of peptides and proteins".-Dilizhan (USSR).-1989.-p.43

11. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Turova I.P., Baratova L., Greben-shohikov N., Shishkov A., Efimov A., Jarvekulg L., Saarma M. Immunochemical analysis, tritium planigraphy and structural features of the potato virus X and its coat protein // Intern. Sympos. "Virology, Immunology and Society" Techn. Reports N6.-1991.-p.254-272

Спискатель



Турова И.П.

AB 27.934