

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НЕФТЕХИМИИ

На правах рукописи

ВИТЕР Сергей Ольвестрович

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ ОБОЛОЧЕК
М- И Х-ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ

02.00.10 - Биоорганическая химия, химия природных и
физиологически активных веществ

А в т о р е ф е р а т
диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев - 1994

AB 29.778

Диссертацией является рукопись
Работа выполнена в лаборатории структуры и функции белка
Института биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Трассини Л.А.
кандидат биологических наук,
доцент
Тайкова Н.В.

Ведущее учреждение:

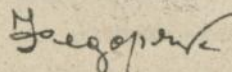
Институт биохимии им. А.В. Палледиана
НАН Украины

Защита диссертации состоится 27 мая 1994 г.
в 10 часов на заседании специализированного ученого совета
Д.016.65.01 в Институте биоорганической химии и нефтехимии НАН
Украины (253094, г. Киев-94, ул. Мурманская, 1).

О диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины.

Автореферат разослан 27 апреля 1994 г.

Ученый секретарь
специализированного совета



ФЕДОРЯК Д.М.

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00801731 (K)

Актуальность проблемы. Фитопатогенные вирусы представляют собой большую группу вирусов, поражающих широкий круг растений из различных семейств в том числе и сельскохозяйственные культуры. Вирусные болезни приводят к существенным потерям урожая и снижению качества продукции, а иногда к полной потере урожая и гибели большинства растений. Поэтому получение здорового посадочного материала важных сельскохозяйственных культур является одной из основных экономических и научных задач. Эти вопросы могут быть решены не только путем изучения морфологических, серологических и симптоматических характеристик отдельного фитовируса, но и изучением тонкой структуры, организации и функциональных характеристик как целого вириона, так и его составляющих компонентов - белков и нуклеиновых кислот. Наличие у вирусов растений белковой оболочки определяет их способность индуцировать образование антител в организме иммунизируемых животных. Однако рецепторы иммунокомпетентных клеток, как было установлено ранее, узнают не всю молекулу белка, а только определенные участки - антигенные детерминанты. Локализация антигенных детерминант, их моделирование синтетическими пептидами, получение антител, специфичных к одному антигенному участку белковой молекулы (моноклональные антитела, МКА) - дает возможность ближе подойти к пониманию молекулярных основ антигенности.

Гибридная техника получения моноклональных антител, направленных против одной антигенной детерминанты, положила начало новому этапу в изучении тонкой химической и антигенной структуры белков. Вирусы растений, в свою очередь, характеризуются разнообразной структурно-функциональной организацией белков и нуклеиновых кислот. Эти особенности дают возможность исследователям использовать вирусы растений в качестве безопасных в работе моделей при изучении основ структурной организации белков, белок-белкового и белок-нуклеинового взаимодействия, понимания процесса самосборки вириона, механизмов трансляции и транскрипции вирусной нуклеиновой кислоты в пораженном растении, определения роли геном-кодируемых неструктурных белков в развитии инфекционного процесса. Моноклональные антитела для этих исследований являются одним из лучших инструментов.

Объектом наших исследований были М-(РУМ) и Х-(РУХ) вирусы картофеля и их капсидные белки. РУМ является представителем карлагруппы вирусов растений и единственным вирусом из этой группы, у которого определена полная нуклеотидная последовательность геномной РНК (1991 г.). РУХ - представитель группы потексвирусов растений, нуклеотидная последовательность структурного гена белка оболочки которого была установлена в 1983 г.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в изучении антигенной структуры белков оболочек М- и Х-вирусов картофеля, сравнения установленных на данный момент первичных структур белков оболочек вирусов карлагруппы и их характеристика с применением компьютерных методов расчета. Для достижения этой цели было необходимо решить следующие задачи:

- наработать и выделить чистые препараты РУМ, его белка оболочки и получить поликлональные антитела (ПКА) иммунизацией животных целым вирионом РУМ;
- локализовать поверхностные антигенные детерминанты белка оболочки РУМ с помощью поли- и моноклональных антител к РУМ;
- провести анализ синтетических пептидов, имитирующих антигенную детерминанту белка оболочки РУХ, с использованием поли- и моноклональных антител к РУХ;
- провести иммунохимический анализ ряда карла- и потексвирусов и их структурных белков с помощью поли- и моноклональных антител;
- дать характеристику высших структур белков оболочек карлавирусов несколькими расчетными методами;
- рассчитать потенциальные антигенные детерминанты белков оболочек карлавирусов с установленной первичной структурой;
- провести сравнение первичной структуры белков оболочек карлавирусов и потексвирусов.

Научная новизна работы. Впервые проведено эпитопное картирование белка оболочки РУМ с помощью поли- и моноклональных антител. Методами фракционирования белков и пептидов выделен триптический пептид белка оболочки РУМ, который взаимодействует с одним МКА М6D5 и ПКА, полученными к целому вириону РУМ. Установлена аминокислотная последовательность этого участка: E A R P L P T A A D F E G K. Данный пептид расположен в N-концевой области белка оболочки РУМ в позиции 21-34 и экспонирован

на поверхности белковой субъединицы и вириона.

Второе МКА М4С1 не реагировало ни с одним из пептидов, полученных после гидролиза белка оболочки Рvм трипсином и протеиназой V.8, но реагировало с одним пептидом после гидролиза бромцианом.

Анализ вирусных частиц Рvм и его белка оболочки с МКА М4С1 показал, что это МКА взаимодействует как с белком оболочки Рvм, так и с белком оболочки Рvх, но не взаимодействует со структурным белком потексвируса зукуба мозаики картофеля (РАМv). Эти результаты говорят о гетероспецифичности МКА М4С1 и его способности при определенных условиях эксперимента к перекрестному взаимодействию с ДСН-препаратом белка оболочки Рvх.

Впервые проведен расчет потенциальных антигенных детерминант для белков оболочки вирусов карлагруппы и показано, что большинство антигенных детерминант локализуется в N- и C-концевых областях структурных белков и характеризуется высокой степенью гидрофильности и сегментной подвижности.

19

Показано, что синтетический нанопептид Т Б Т Т Т К Т А С, имитирующий ранее установленный нами антигенный участок белка оболочки Рvх, перекрестно взаимодействует с одним МКА 23ХА5 и ПКА, полученных к целому вириону Рvх. Этот результат подтвердил данные об участии остатка лизина в позиции 19 аминокислотной последовательности белка оболочки Рvх в формировании антигенной детерминанты, взаимодействующей с МКА и его поверхностную ориентацию на вирусной частице Рvх.

Практическое значение работы. Разработан способ выделения N-концевого фрагмента белка оболочки Рvх, представляющий поверхностный эпитоп и включающий иммунодоминантную область.

Получение синтетического пептида, имитирующего антигенную детерминанту Рvх, дает возможность усовершенствования диагностических тест-систем идентификации Рvх в растениях.

Получены поликлональные антитела к Рvм, которые являются важным инструментом при идентификации вирусов в посадочном материале для получения безвирусных культур картофеля, а также могут быть использованы для дальнейшего изучения антигенной структуры карла- и потексвирусов. Методы иммуоферментного анализа, апробированные в данной диссертации, могут быть

внедрены в семеноводческие хозяйства Украины.

Апробация работы. Результаты диссертации 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 и III Международных симпозиумах "Плюс-цепочечные РНК вирусы" (Вена, Австрия, 1989; Клифутер, США, 1992); VII СССР-ФРГ симпозиуме "Химия белков и пептидов" (Дилижан, 1989); Международном симпозиуме "Вирусология, иммунология и общество" (Киев, 1991); IX Международном конгрессе по вирусологии (Глазго, Шотландия, 1993).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и состоит из введения, двух глав обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результаты и обсуждение собственных исследований, выводов и списка цитированной литературы (173 источника). Диссертация содержит 9 таблиц, 14 рисунков и 3 приложений.

Публикация. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. В работе использовали отечественные реактивы марок "ОСЧ" и "ХЧ" и зарубежного производства фирм "Sigma", "Serva", "Millipore", "Aldrich", "Fluka" и "Merk". Объектами исследований были средневирulentный штамм PVX и русский штамм PVM. PVX и очищенный белок оболочки любезно предоставил Грама Д.П. (Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, г.Киев.). PVM накапливали на растениях томатов *Lycopersicon esculentum*, и выделяли из свежих листьев томатов на 4-й - 5-й неделе после заражения [Николаева и др., 1985]. Белок PVM выделяли гуанидинхлоридным методом в присутствии B101 [Wa и Bruening, 1971]. Результаты очистки вируса и гомогенность белке оболочки контролировала электрофорезом в ПААГе с додецилсульфатом натрия (ДСН) [Laemmli, 1970, 1973], электрофорезом в агарозном геле [Hoening, 1967], спектральным анализом на спектрофотометрах "Spectord" (ГДР) и SF-16, и анализом аминокислотного состава.

Аминокислотный состав белка оболочки РУМ определяли стандартным методом в 5,7*n* соляной кислоте в вакууме. Пробки анализировали на аминокислотном анализаторе BIOTRONIK-7000 (ФРГ).

Аминокислотную последовательность пептида Т-15 определяли на автоматическом аминокислотном секвенаторе "Клауег" (ФРГ).

Антитела к вириону РУМ (ПКА_{РУМ}) получали иммунизацией кроликов по одной схеме препаратами РУМ, смешанных с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. Препараты вводили подкожно и внутримышечно в область спины выше задней лапы кролика. Реиммунизацию проводили через месяц после иммунизации введением препарата РУМ внутрикожно без полного адьюванта Фрейнда. Антитела из сыворотки выделяли риванол-сульфатным методом [Norejsi, 1956]. Титр антител определяли иммуноферментным анализом (ИФА). МКА М5Д5 и М4С1 были любезно предоставлены М. Саврма (Институт химической и биологической физики АН Эстонии, г.Таллинн).

Пептиды П5, П7, П9 были синтезированы в Институте биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины А. Дыбенко и В. Шилиным.

Белок оболочки РУМ расщепляли бромцианом [Серебряный, 1972], трипсином и протеиназой v.8 [Мишунин и Шевченко, 1985].

Разделение пептидов проводили на хроматографической системе "ЛКВ-Pharmacia" на колонке "LiChrosorb RP-18", 25 x 0,46 см в обращенной фазе в градиенте ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислоты.

Иммуноэлектрофорез проводили по Towbin et al., 1979.

ИФА проводили на планках для микротитрации Dynatech (Швейцария) и Flow Laboratories (Великобритания), и анализировали на 8-канальном автоматическом спектрофотометре Titertek Multiscan MC (Flow Laboratories, Великобритания) [Clark, 1977].

Флуороиммуноанализ временного разрешения (ФИАВР) проводили на полистирольных планках (12 лунок на полосу, Eflab, Helsinki, Финляндия) [Jarvekulg et al., 1989] с МКА меченым хелатом европия. Флуоресценцию измеряли на приборе ArgusTM 1230 Fluorometer (Wallac OY, Финляндия). Результаты представлялись в импульсах в секунду.

Расчет профилей гидрофильности [Норр и Woods, 1981], гидропатии [Куте и Doolittle, 1982], сегментной подвижности [Karplus и Schulz, 1985] и вторичной структуры [Garnier, 1978] про-

юдили на базе расчетных методов программы PCGene (версия 6.0).

Выравнивание аминокислотных последовательностей белков оболочек проводили с использованием программы Genebee [Brodsky, 1992] и PC Gene.

Результаты и их обсуждение

1. Выделение, анализ чистоты РУМ и гомогенности его белка оболочки

РУМ выделяли из свежесобранных листьев томатов, охлажденных до $+4^{\circ}\text{C}$ [Николаева и др., 1985]. Белок оболочки выделяли инкубацией раствора РУМ в 6М гуанидинхлориде с 2М LiCl с охлаждением до -40°C в течение ночи. Вирусную РНК отделяли центрифугированием. Раствор белка диализовали против дистиллированной H_2O , лиофилизировали и хранили при $+4^{\circ}\text{C}$.

Чистоту препарата РУМ проверяли УФ-спектром в диапазоне 200-320нм, электрофорезом в ПААГе с ДСН и агарозном геле. На рисунке 1 видно, что УФ-спектр РУМ имеет максимум поглощения при 260нм и минимум - при 247нм и характеризуется величинами соотношения $E_{260}/E_{280}=1,25$ и $E_{\text{макс.}}/E_{\text{мин.}}=1,12$, которые являются типичными для РУМ [Tavantzis, 1984].

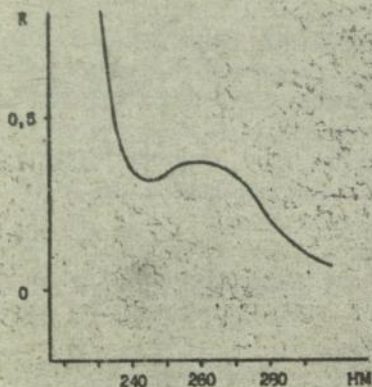


Рис.1. УФ-спектр раствора очищенного препарата РУМ.
Концентрация вируса 0,134 мг/мл.

Электрофорез РУМ и его белка оболочки в ПААГе с ДСН показал наличие одной полосы в районе молекулярной массы 36 кДа (рис. 2А), а электрофорез в агарозном геле -- наличие одной полосы РНК (рис. 2Б). Незначительное увеличение молекулярной массы белка оболочки по сравнению с его молекулярной массой, выведенной из первичной структуры гена (34 кДа) [Израев, 1989], по-видимому, объясняется гликозилированием белка оболочки в процессе его синтеза и формирования пространственной структуры капсидных субъединиц.

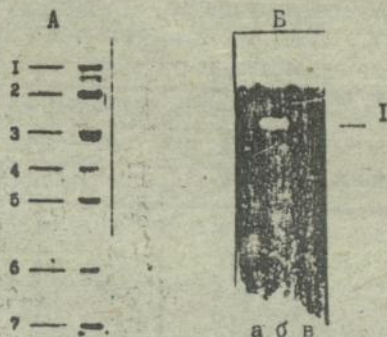


Рис.2. А. Электрофорез в 12,5% ПААГе с ДСН белка оболочки РУМ с белковыми маркерами (IMW Calibration Kit, Pharmacia).

Цифрами обозначены:

- 1 - фосфоорилаза б, М.м. 94 кДа; 2 - БСА, М.м. 67 кДа;
- 3 - овалбумин, М.м. 43 кДа; 4 - белок оболочки РУМ;
- 5 - карбонгидраза, М.м. 30 кДа; 6 - ингибитор трипсина, М.м. 20,1 кДа; 7 - α -лактальбумин, М.м. 14,4 кДа.

Б. Электрофорез РНК РУМ в 4% агарозном геле.

Обозначения:

- 1 - полоса РНК РУМ; а - неразрушенный препарат РУМ; б - препарат РУМ, обработанный 10М мочевиной;
- в - препарат РУМ, обработанный 2М LiCl.

Результатами электрофореза в ПААГе и агарозном геле было показано, что нами получен гомогенный и не деградированный в процессе выделения препарат РУМ и его белок оболочки.

2. Определение аминокислотного состава белка оболочки РУМ

Аминокислотный состав белка оболочки РУМ определяли стандартным методом в 5,7н соляной кислоте в вакууме. Пробы инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов при 110°C и анализировали на аминокислотном анализаторе BIOTRONIK-7000 (ФРГ).

Таблица 1.

Аминокислотный состав белка оболочки РУМ и его сравнение с аминокислотными составами белков оболочек РУМ [Ruparov et al., 1999] и German штамма РУМ [Gramstat, 1990], выведенных из нуклеотидных последовательностей их генов

Аминокислота	Время гидролиза (час)			Аминокислотный состав по:	
	24	48	72	Ruparov et al. (1989)	Gramstat (1990)
	Количество аминокислот				
Gly	19	19	19	18	18
Ala	36	33	34	33	32
Pro	15	26	25	19	20
Ser	16	15	14	16	15
Val	15	17	17	18	19
Thr	23	22	21	20	20
Cys	2	3	3	3	3
Met	6	7	8	8	8
Leu	22	22	22	23	23
Ile	11	12	12	10	10
Tyr	6	6	6	6	6
Phe	12	12	11	10	10
His	5	5	5	5	5
Lys	12	12	12	12	13
Arg	26	26	28	30	29
Asp + Asn	35	34	34	20 + 17	20 + 16
Glu + Gln	34	34	34	24 + 8	24 + 8
Trp	не определяли			3	3
Сумма	295	303	305	303	303

Из таблицы 1 видно, что аминокислотный состав изучаемого

нами вируса незначительно отличается от аминокислотных составов РММ по Rupasov et al. (1989) и Gramstat (1990). Значительное увеличение пролина в пробах с инкубацией 48 и 72 часа, по-видимому, можно объяснить частичным наложением пика выхода аммиака. Данные по аминокислотному анализу капсидного белка РММ свидетельствуют о его значительном сходстве с аминокислотными составами, выведенными из структурных генов двух штаммов РММ, а также о гомогенности изучаемого белка.

3. Гидролиз белка оболочки РММ бромцианом, трипсином и протеиназой V.8

Для локализации вирусных эпитопов белок оболочки РММ расщепляли бромцианом [Серебряный, 1972], трипсином и протеиназой V.8 [Мишунин и Шевченко, 1985]. Участки пептидных связей, атакуемые этими реагентами показаны на рисунке 3. Пептидные связи между лизином и пролином, и аргинином и пролином плохо гидролизуются трипсином, что было отмечено и другими авторами [Needleman, 1975].

4. Разделение пептидных фракций ВЭЖХ в обращенной фазе и иммунохимический анализ с помощью МКА и ПКА против РММ

Для проведения ВЭЖХ использовали хроматографическую систему "LKB-RHARMASIA" (Швеция). На рисунке 4 показан профиль элиции триптического гидролизата белка оболочки РММ. В аналогичных или незначительно измененных условиях проводили разделение пептидного материала после расщепления бромцианом и протеиназой V.8.

Для иммунохимического анализа пептидов из трех гидролизатов методами ИФА и ФИАВР использовали два МКА: М6D5 и М4С1, и одну поликлональную сыворотку, обогащенную Ig G. Все антитела были получены при иммунизации животных целыми вирусными частицами РММ. МКА М4С1 слабо взаимодействовало с одним из пептидов бромцианового расщепления белка оболочки РММ и не реагировало ни с одной из анализируемых фракций после гидролиза белка оболочки РММ трипсином и протеиназой V.8. По-видимому, при расщеплении бромцианом происходит частичное разрушение антигенной детерминанты белка оболочки РММ, а во время гидро-

лизе сериновыми протеиназами - полная деградация эпитопа, в котором основной вклад во взаимодействие с паратопом антитела вносят положительно и отрицательно заряженные остатки аминокислот.

¹⁰ G D S T K⁺K⁺A E, T A K⁺D E, G T S Q E, R⁺R⁺E, A R P L P T A A D³⁰
⁴⁰ F E, G K⁺D T S E, N T D G R A A D A D G E, M¹S L E, R⁺R⁺L D S L⁶⁰
⁷⁰ R⁺E, F L R⁺E, R⁺R⁺G A I R⁺V T N P G L E, T G R P R⁺L Q L A E, N⁹⁰
¹⁰⁰ M¹R P D P T N P Y M R P S I E, A L S R⁺I K P I A I S N N M¹A¹²⁰
¹³⁰ T S E, D M¹M¹R⁺I Y V N L E, G L G V P T E, H V Q Q V V I Q A V¹⁵⁰
¹⁶⁰ L F G K⁺D A S S S V F L D P R⁺G S P E, W P R⁺G A I T A D A V¹⁸⁰
¹⁹⁰ L A V L K⁺K⁺D A E, T L R⁺R⁺V O R⁺L Y A⁺F V T W N N M¹L T H N²¹⁰
²²⁰ A P P A D W A A M¹G P Q Y E, D R F A A F D O P D Y V E, N T A²⁴⁰
²⁵⁰ A V Q P L E, C L I R⁺R⁺P T P R⁺E, K⁺V A N N T H K⁺D I A L R⁺G²⁷⁰
²⁸⁰ A N R⁺N Q V F S S L N A E, V T G C M¹N G P E, L T R⁺D Y V K⁺S³⁰⁰
 N R⁺K

Рис. 3. Аминокислотная последовательность белка оболочки РУМ [Ruparov et al., 1989].

- | - место атаки пептидной связи бромцианом;
- ↓ - место атаки пептидной связи трипсином;
- † - место атаки пептидной связи протеиназой V.8.

Анализ в ИФА и ФИАВР пептидных фракций белка оболочки РУМ с использованием МКА М6D5 показал, что это МКА дает сильную перекрестную реакцию с одним триптическим пептидом Т-15

и значительно меньшую с триптической фракцией Т-13 (рис. 4). Ни с одной из фракций от гидролиза протеиназой V.8 МКА М6Д5 не реагировало (табл. 2). Определение аминокислотной последовательности фракции Т-15 проводили после рехроматографии в обращенной фазе и было установлено, что эта фракция содержит тетрадекапептид, отвечающий позиции 21-34 (см. рис. 3) в полипептидной цепи белка оболочки РММ: В А R P L R T A A D P R I Q K.

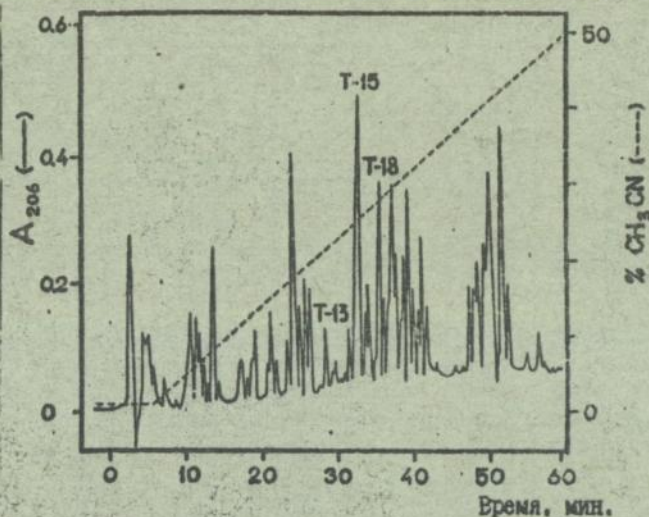


Рис. 4. Профиль разделения пептидов ВЭЖХ в обращенной фазе, полученных в результате гидролиза белка оболочки РММ трипсином.

Колонка "LiChrosorb RP-18" (5μm, 25 x 0,46 см); градиент ацетонитрила 2-50% с 0,1% ТЭУ. Время разделения - 60 мин.; скорость элюции - 1мл/мин. Детектирование - 206 нм.

ИФА триптических пептидов с ИКА к РММ (табл. 2) показал, что с антителами взаимодействует две фракции - Т-15 и Т-18 (рис.4), а реакция антител с пептидом Т-13 практически не наблюдается. Таким образом, в результате эпитопного картирования белка оболочки РММ с использованием ИКА и ИКА показано, что N-концевой участок белка оболочки РММ в позиции 21 - 34

(пептид Т-15) экспонирован на поверхности вириона и представляет собой иммунодоминантную область капсидного белок.

Таблица 2.

Иммунохимический анализ триптических ВЭЖХ-фракций белка оболочки РМВ с помощью МКА и ПКА в непрямом ИФА и в ФИАВР

		И Ф А (E ₄₅₀)		Ф И А В Р (имп./с)			
№ фракц.	Ат ПКА _{РМВ} 1:1000 +	Контроль		МКА М6ДБ		МКА М4С1	
		ПКА _{РМВ} -	ПКА ИНТАКТ, 1:1000	+	-	+	-
				1:2000		1:2000	
3	0,117	0,089		3008	2090	5009	1823
6	0,104	0,074		3302	2208	5349	1988
7	0,111	0,069		3219	2319	5636	1946
10	0,199	0,186		3247	2402	5401	1926
11	0,206	0,181		3152	2446	5155	2090
13	0,205	0,116		24626	2126	5746	1935
14	0,140	0,179		4352	2058	5899	2098
15	0,371	0,123		31688	2395	5308	1897
16	0,128	0,107		5745	2192	5614	1874
17	0,214	0,176		3752	2284	5261	1940
18	0,295	0,116		3523	2377	5466	1767
19	0,133	0,128		3217	2285	4560	1801
21	0,068	0,049	0,113	2982	2020	4609	1768
22	0,085	0,052		3040	2121	5103	1991
23	0,083	0,053		3720	2166	4719	1800
24	0,065	0,050		8804	3808	4711	1849
25	0,073	0,054		3040	2113	4388	1759
26	0,102	0,054		3116	2029	4809	1834
28	0,080	0,049		3194	2181	4790	1757
29	0,071	0,054		3749	1942	4300	1913
30	0,111	0,053		3753	2693	4874	2219
31	0,065	0,053		3261	2548	4951	1872
32	0,075	0,064		3664	2150	4444	1805
33	0,106	0,060		3122	2054	4339	1861
РМВ	1,757	0,057		109908	2453	27944	2508
Белок РМВ	1,544	0,083		77910	5686	21495	2087
ТВС	-	-	-	5219	2094	7550	2009
РАМВ	-	-	-	1819	1800	1544	1418

Обозначения: Ат - антител; ТВС - фосфатный буфер для проб; 1:1000, 1:2000 - разведение антител; РАМВ - вирус аюкуба мозаики картофеля; имп./сек - импульсы в секунду; "+" - антиген инкубировали с Ат; "-" - антиген не инкубировали с Ат.

5. Иммунохимический анализ карла- и потексвирусов картофеля

Иммунохимический анализ М- и В-(РVС) карлавирусов, Х- и аукуба мозаики (РАМУ) потексвирусов картофеля проводили методом непрямого ИФА с ПКА против РVМ. В результате анализа было отмечено, что ПКА_{РVМ} проявляет очень сильную перекрестную реакцию с Х- и В-вирусами картофеля, белком оболочки РVХ и не взаимодействует с РАМУ (Табл. 3).

Таблица 3.

Антигенное сращение вирусов картофеля карла- и потексгрупп вирусов растений

Антиген	Подклональные антители				Интактные кроличьи антители 1:1000
	ПКА _{РVМ} (Киев) 1:1000		ПКА _{РVХ} (Киев) 1:1000		
	+	-	+	-	
Карлавирусы:					
РVМ (Киев)	1,757	0,057	1,122	0,071	
РVС (Киев)	1,539	0,704	Н-А*	Н-А	0,085
РVВ (Эстония)	0,821	0,084	Н-А	Н-А	
Потексвирусы:					
РVХ (ГДР)	1,495	0,069	Н-А	Н-А	
Белок оболочки РVХ (Киев)	1,597	0,050	1,608	0,092	0,096
РАМУ (Эстония)	0,077	0,058	Н-А	Н-А	
TBS	0,113		0,140		0,075

* - анализ не проводили; TBS - буфер для нанесения проб в ИФА.

Интенсивная перекрестная реакция наблюдалась также между ПКА против РVХ и М-вирусом картофеля. Слабая перекрестная реак-

ция между РУМ, белком оболочки РУХ (Киев) и антисыворотками к этим вирусам наблюдалась и в иммуноэлектрофорезе. Реакция между РУВ (Киев) и ПКА_{РУМ} имела высокую интенсивность, но при инкубации без антител был отмечен значительный уровень фона. В то же время РУВ (Эстония) перекрестно реагировал с ПКА_{РУМ} без увеличения уровня фона при интенсивности реакции почти в два раза меньше наблюдаемой для РУХ и его белка оболочки. Таким образом, можно предположить, что вирусы РУМ и РУХ имеют близкое антигенное сходство, хотя представляют разные группы вирусов растений. Антигенное сравнение РУМ и РУВ показывает, что эти вирусы имеют сходство антигенной структуры белков оболочек, однако являются отдаленно родственными представителями одной группы [Вагшалл, 1959]. РАМУ не обнаружил никакого антигенного родства с РУМ ни при анализе методом непрямого ИФА, ни в иммуноэлектрофорезе, что говорит об отсутствии серологического родства между этими вирусами.

Анализ моноклональных антител М4С1, М6Д5 и 21хД2 (против РУХ) методом иммуноэлектрофореза после разделения белков оболочек РУХ, РУМ и РАМУ в ПААГе с ДОН и переноса на нитроцеллюлозу показал, что МКА 21хД2, М4С1 и М6Д5 не взаимодействуют с белком оболочки РАМУ (рис. 5., I-В, II-В, III-В).

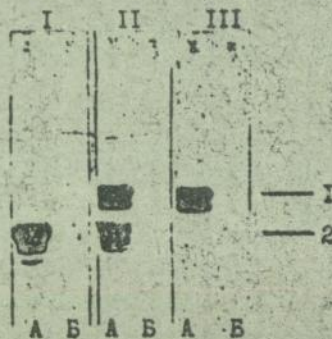


Рис.5. Иммуноэлектрофорез белков оболочек РУХ, РУМ и РАМУ с МКА против РУМ и РУХ.

I - инкубация с МКА 21хД2; II - инкубация с МКА М4С1; III - инкубация с М6Д5; А - белки оболочек РУМ (1) и РУХ (2). В - белок оболочки РАМУ.

Не было отмечено реакции между белком оболочки РУХ и МКА М6Д6 (рис.5, III-A). Неожиданный результат был получен при анализе МКА М4С1, которое перекрестно взаимодействовало с белком оболочки РУХ (рис.5, II-A). На основании результатов, полученных в иммуноферментном анализе и иммунодотблоттинге с ПКА, и иммуно-электроблоттинге с МКА, можно предположить, что МКА М4С1 и ПКА_{РУМ} перекрестно взаимодействуют со сходным эпитопом белка оболочки РУХ. Результаты иммуноэлектроблоттинга предполагают возможную гетероспецифичность МКА М4С1 и склонность к перекрестной реакции с ДСН-препаратом белка оболочки РУХ.

6. Анализ первичной структуры белков оболочек карловирусов

В настоящее время установлена полная нуклеотидная последовательность структурного гена только для РУМ [Zavriev, 1991], а для пяти представителей этой группы проведен неполный 3'-концевой сиквенс РНК, который включает ген белка оболочки: РУЗ - S-вирус картофеля [MacKenzie et al., 1989]; HeIVS - S-вирус геле-никума [Foster et al., 1990]; LSV - бессимптомный вирус лилии [Memelink et al., 1990]; OLV - латентный вирус гвоздики [Mee' in, 1991]; PоrMV - вирус мозаики тополя [Henderson et al., 1992]. Показано сходство геномной организации этих вирусов в 3'-концевой области [Foster, 1992] и отмечена значительная гомология нуклеотидных и аминокислотных последовательностей их капсидных белков и 3'-концевого участка РНК [Memelink et al., 1990; Haylor, 1990; Henderson et al., 1992;].

Нами был проведен сравнительный анализ первичных структур белков оболочек перечисленных карловирусов и потексвирусов путем попарного и множественного выравнивания их аминокислотных последовательностей. Попарное выравнивание проводили на базе программы Р0 Gene, а множественное - на базе программы GENEVIEW. Результаты попарного выравнивания представлены в таблице 4.

Исходя из полученных результатов можно отметить, что некоторые пары вирусов: РУМ-LSV, РУМ-OLV, РУМ-РУЗ, РУМ-HeIVS, LSV-HeIVS, OLV-РУЗ и РУЗ-HeIVS - имеют достаточно высокую степень гомологии капсидных белков - от 40 до 48 процентов, а для пары LSV-РУЗ отмечена наивысшая степень гомологии - 66%. Немного ниже 40% гомология между OLV с LSV и HeIVS, а можно

Таблица 4.

Анализ попарного выравнивания аминокислотных последовательностей белков оболочек карлавирусов и X-вируса картофеля

Белок оболочки		Белок оболочки											
		PVM		LSV		CLV		PVS		HelVS		PopMV	
		А.к	%	А.к	%	А.к	%	А.к	%	А.к	%	А.к	%
LSV	Идентич.	139	48										
	Сходные	37	13										
CLV	Идентич.	135	47	109	38								
	Сходные	37	13	40	14								
PVS	Идентич.	130	45	192	66	115	40						
	Сходные	40	14	27	9	40	14						
HelVS	Идентич.	142	48	124	43	110	37	133	46				
	Сходные	31	10	41	14	45	15	41	14				
PopMV	Идентич.	95	32	95	33	97	32	88	30	80	27		
	Сходные	38	13	41	14	44	14	32	11	42	14		
PVX	Идентич.	79	34	75	32	76	33	70	30	67	29	71	31
	Сходные	27	12	35	15	36	16	27	12	35	15	24	10

Обозначения: "Идентич." - одинаковые аминокислоты; "Сходные": Ala, Ser, Thr; Asp, Glu; Asn, Gln; Arg, Lys; Ile, Leu, Met, Val; Phe, Tyr, Trp.; А.к - количество аминокислот; % - процент от общего количества аминокислот

отметить очень низкую степень гомологии аминокислотной последовательности белка оболочки PopMV со всеми белками оболочек карлавирусов - 27-33%. Возможно, что PopMV является "крайним" представителем этой группы. Некоторые авторы отмечали слабое или полное отсутствие серологического родства PopMV с различными представителями карлагруппы [Adams, 1982; Foster, 1991], что, по-видимому, может также объясняться низкой степенью гомологии его белка оболочки с другими карлавирусами. Белок оболочки PVX

показал такую же гомологию с карлавирусами, как и РорMV - 29-34%. Являясь представителем потексвирусов, RVX, достаточно близок по степени родства с некоторыми представителями карлавирусов - PVM и CLV (34% и 33% гомологии, соответственно), что также подтверждается перекрестной реакцией с ПКА_{PVM} и с МКА М4С1.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белков оболочек карлавирусов и потексвирусов показало, что N- и C-концевые области характеризуются высокой степенью вариабельности и отсутствием гомологичных участков. "Коровые" (центральные) участки этих вирусов, наоборот, имели ряд высокогомологичных районов. Можно отметить следующие консервативные мотивы для белков оболочек карлавирусов и RVX:

1) $R/K \ F/Y \ A \ A \ F \ D - F \ D/N \ Y/G, F \ V - N \ A \ A$;

2) $I/V \ Q/M \ P - - \ G \ L/I, V \ I/L^* R - P \ T/S$;

3) $L/I^* R - - \ G \ R/M - Y/P \ A \ P \ V/I \ V/T \ W \ N - M \ L/H$ (кроме РорMV);

4) $P \ P - D/H \ W \ Q/A \ A/S - G \ F/Y$ (кроме РорMV).

Отмеченные высококонсервативные участки белков оболочек карлавирусов, вероятно, играют важную роль в формировании третичной структуры капсидной субъединицы, в обеспечении взаимодействия белковых субъединиц друг с другом при сборке вирусных частиц и с вирусной РНК. В 1980 г. Tollin et al. предположили, что пять положительно заряженных аминокислот белков оболочек RVX и PVM (вирус мозаики папая) способны взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами РНК. В виде приведенных консервативных мотивов звездочкой (*) отмечено три остатка аргинина, которые совпадают с аминокислотными остатками RVX, предположительно взаимодействующими с вирусной РНК. Возможно, что отмеченные аминокислотные остатки белков оболочек карлавирусов играют такую же роль.

7. Анализ вторичной структуры белков оболочек вирусов карлагруппы

Расчет вторичной структуры белков оболочек карлавирусов проводили на базе программы PC Gene по методу Garnier (1978). В таблице 5 показано количество предсказанных аминокислотных остат-

ков и их процентное отношение к общему количеству аминокислот для каждого карлавируса.

Таблица 5.

Предсказание вторичной структуры [Garnier, 1978] для белков оболочек шести карлавирусов

Белок обо- лочка	α-спираль		Неупорядочен- ный вытянутый участок		β-поворот		Неупорядочен- ный клубок	
	Кол-во амино- кислот	%	Кол-во амино- кислот	%	Кол-во амино- кислот	%	Кол-во амино- кислот	%
РУН	144	47,6%	83	27,3%	28	9,2%	48	15,7%
РVS	110	37,5%	100	34,4%	12	4,0%	70	23,8%
LSV	97	33,3%	98	34,0%	27	9,2%	68	23,3%
QLV	121	39,8%	104	33,9%	36	11,7%	44	14,3%
HelVS	77	25,7%	137	46,1%	43	14,3%	41	13,7%
PorMV	205	63,6%	61	18,9%	28	8,6%	27	8,6%

Проведенные расчеты показали, что преобладающими элементами вторичной структуры белков оболочек карлавирусов являются α-спираль и неупорядоченный вытянутый участок.

8. Предсказание антигенных детерминат белков оболочек карлавирусов на основе расчета их индексов гидрофильности и сегментной подвижности. Расчет профиля гидропатии

Достаточно эффективным средством для предсказания антигенной структуры белков являются расчетные методы. На основе алгоритмов программы PC Sele нами были предсказаны потенциальные антигенные детерминанты для шести белков оболочек карлавирусов. Для достижения этой цели были рассчитаны индексы гидрофильности [Norr и Woods, 1981] и сегментной подвижности [Karplus и Schulz, 1985]. На основании полученных результатов (рис. 6) можно сделать следующие предположения. Во-первых, можно отметить

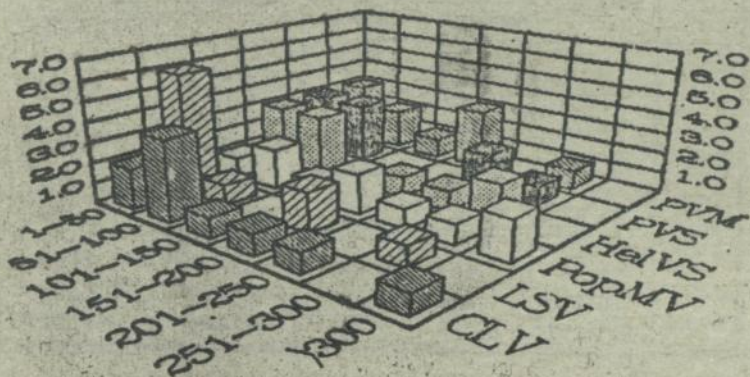
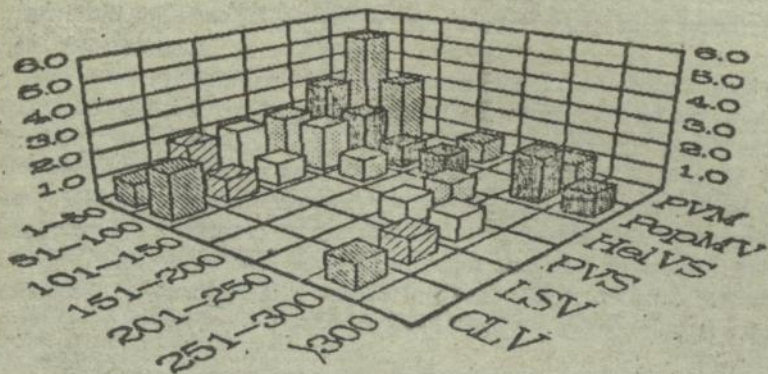


Рис. 6. Распределение потенциальных линейных антигенных детерминант по длине аминокислотных последовательностей белков оболочек карлавирусов.

А - расчет по индексу гидрофильности;

Б - расчет по индексу сегментной полярности;

характерную для нитевидных и палочковидных вирусов эпитопную плотность в N-концевых участках белков оболочек [Koenig, 1986]. Во-вторых, расчет по индексу гидрофильности показал, что для белков оболочек LSV, GLV и PVS характерна низкая степень гидрофильности и, как следствие, невозможность предсказания большого количества эпитопов. В-третьих, расчет антигенных детерминант по сегментной подвижности показал хорошую корреляцию с расчетами по индексу гидрофильности и расширил рамки предполагаемых антигенных детерминант у вышеупомянутых вирусов. В-четвертых, можно отметить, что часть локализованной нами антигенной детерминанты (пептид T-15, рис. 3) входит в предсказанный N-концевой участок белка оболочки PVM (табл. 6).

Таблица 6.

Расчет потенциальных линейных антигенных детерминант для белка оболочки M-вируса картофеля

	Гидрофильность			Сегментная подвижность	
	позиция	Индекс		позиция	Индекс сегментной подвижности
		абсолют.	средний		
PVM	4-12	12,209	1,357	2-8	1,087
	14-23	15,389	1,540	14-20	1,125
	33-39	8,983	1,283	35-41	1,103
	36-42	8,783	1,255	79-85	1,067
	44-50	7,397	1,057	94-100	1,066
	54-60	8,152	1,165	120-126	1,057
	65-70	8,311	1,385	155-161	1,069
	91-96	4,668	0,670	163-169	1,057
	186-192	7,839	1,120	185-191	1,063
	253-259	8,126	1,161	252-258	1,061

Этот участок в позиции 14-23 характеризуется наивысшим индексом гидрофильности как в абсолютном, так и в усредненном значении. В то же время позиция 21-34 пептида T-15 расположена между двумя участками с наивысшей сегментной подвижностью, что одновременно показывает на его относительно высокую мобильность и жесткость структуры, которые обеспечивают взаимодействие с паратопом антитела. В-пятых, расчет сегментной подвижности для

белка оболочки FormV показал высокую сегментную подвижность его "коровой" области, что значительно отличает его от белков оболочек карлавирусов.

Таким образом, комбинированный подход к предсказанию антигенных детерминант расчетными методами дает возможность более точно локализовать положение таких линейных участков в полипептидной цепи белков.

Расчет профиля гидропатии проводили на основе алгоритма по Kyte и Doolittle (1982). При сравнении профилей гидропатии белков оболочек карлавирусов показано, что высокая степень гидрофобности характерна для консервативных участков "коровых" областей аминокислотных последовательностей этих белков.

9. Анализ синтетических пептидов - аналогов антигенной детерминанты белка оболочки RVX

Для подтверждения результатов, полученных при анализе природных фрагментов капсидного белка RVX, были синтезированы три пептида, включающие остаток лизина в позиции 19:

Т К Т А С	(П5)
Т Т К Т А С	(П7)
Т С Т Т К Т А С	(П9)

Остаток глицина в позиции 22 был заменен на остаток цистеина для возможности присоединения синтезированных пептидов через SH-группу цистеина к белку-носителю, принимая во внимание факт, что боковые радикалы остатков глицина обычно вносят незначительный вклад в паратоп-эпитопное взаимодействие. Для присоединения пептидов к белку-носителю использовали малеинимидобензол-N-гидроксисукцинимидный эфир (МБО), а в качестве носителя использовали БСА. В результате был получен конъюгат БСА-П9. Анализ свободных пептидов П5, П7, П9 и конъюгата БСА-П9 методом флюориметрического анализа временного разрешения показал, что свободные пептиды и конъюгат БСА-П9 не взаимодействуют с МКА 21XD2, а МКА 23XA5 реагирует только со свободным пептидом П9 (Табл. 7, стр. 22).

Отсутствие реакции с конъюгатом БСА-П9 объясняется возможными конформационными изменениями при конъюгации пептида к носителю, или влиянием поверхностных структур носителя на

Таблица 7.

Антигенная активность (имп./сек) пептидов П5, П7, П9 и конъюгата БСА-П9 в методе флюориммуноанализа временного разрешения с моноклональными антителами к РVX

Антиген	Моноклональные антитела			
	23XA5		21XD2	
	с МКА	без МКА	с МКА	без МКА
П5	2351	2144	1979	1849
П7	2095	2093	1909	1734
П9	35583	10740	5082	4675
БСА-П9	2161	2239	3075	2838
Белок РVX	20099	2498	22566	2238
Буфер	2131	2390	2276	1898

конформационное состояние пришитого пептида. Можно также предположить, что во время конъюгации была экранирована ϵ -NH₂-группа лизина, который вносит значительный вклад во взаимодействие с антителами. Возможно также, что оксигруппы N-концевых треонина и серина пептида П9, которые отсутствуют в пептиде П7, участвуют в образовании дополнительных водородных связей с паратопом антитела, и/или стабилизируют пространственную структуру пептида П9, обеспечивая узнавание этой структуры антителами.

Таким образом, иммунохимический анализ синтетического пептида П9 подтвердил результаты об участии остатка лизина в позиции 19 белка оболочки РVX в формировании антигенной детерминанты и показал, что данный N-концевой участок экспонирован на поверхности вириона.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено эпитопное картирование капсидного белка РVX с помощью МКА. Выделен пептид, представляющий иммунодоминантную область изучаемого белка, и установлена его первичная структура. Показано, что этот участок экспонирован на поверхности вирусной частицы.

2. Получены ПКА против РУМ, которые использовались для изучения антигенной структуры РУМ.
3. На базе компьютерных методов проеден расчет и сравнение высших структур и потенциальных линейных антигенных детерминант белков оболочек шести карлавирусов. Показано, что N-концевые области белков оболочек этих вирусов характеризуются высокой эпитопной плотностью.
4. Синтезирован пептид, имитирующий антигенную детерминанту белка оболочки РУХ и взаимодействующий с МКА против интактного X-вируса картофеля.
5. На основании множественного выравнивания первичных структур белков оболочек карла- и потекс вирусов сделано предположение о сходстве молекулярной организации и упаковки капсидных белков вирусов этих групп.
6. Методами ИФА, иммунодотблоттинга и иммуноэлектроблоттинга с использованием МКА и ПКА показано, что M- и X-вирусы картофеля имеют сходные антигенные детерминанты.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Радавський Ю. Л., Вітер С. С., Турова І. 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 І. П., Вітер С. С., Радавський Ю. Л. Аналіз броміанових фрагментів білка оболонки X-вірусу картоплі (ХВК) // Тез. доп. V Укр. біохім. з'їзду. - Івано-Франківськ. 1987. - ч. 2. - С. 211.
3. Радавский Ю. Л., Витер С. С., Турова И. П. и др. Изучение антигенной структуры белка оболочки X-вируса картофеля // Тез. докл. VII Всесоюз. симпози. по химии белков и пептидов. - Таллин. - 1987. - С. 90-91.
4. Радавский Ю. Л., Витер С. С., Саарма М. Д. и др. Антигенная структура белка оболочки X-вируса картофеля. I. Иммунологический анализ броміановых фрагментов // Биоорг. 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. и др. Антигенная структура белка оболочки X-вируса картофеля. II. Локализация антигенной (-ных) детерминант в N-концевом участке белка // Биоорг. химия. - 1989. - Т. 15. - № 6. - С. 615-619.
7. Изучение антигенной структуры белков оболочек X-вируса картофеля и вируса аукуба мозаики картофеля / в соавт. с Туровой И. П., Радавским Ю. Л., Заикиным А. А. и др. // Тез. докл. VII Съезда Укр. микробиол. общества. - Черновцы. - 1989. - ч. 2. - С. 183-184.
8. Радавский Ю. Л., Витер С. С., Саарма М. Д. и др. Антигенная

- структура капсидних белков трех вирусом картофеля // Тез. Всесоюз. симпоз. химия белков.-Тбилиси.-1990.-С.148.
9. Витер С.С., Раудсепп Р.А., Гавриш О.Г., Радавський Ю.Л. Імунохімічний аналіз білка оболонки М-вірусу картоплі // Тез. доп. VI Укр. біохім. з'їзду.-Київ.-1992.-С.98.
 10. Витер С.С., Радавський Ю.Л., Дибенко А.Г. та інші. Імунохімічний аналіз синтетичних пептидів, що входять до антигенної детермінанти білка оболонки X-вірусу картоплі // Укр. біохіміч. зб.-1992.-№4.-С.94-97.
 11. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Turova I.P. et al. Antigenic structure of the coat proteins of potato virus X (PVX) and of potato aucuba mosaic virus (PAMV) // Abstr. 2-nd Intern. Sympos. on "Positive strand RNA viruses".-Vienna, Austria.-1989.-P.43.
 12. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Turova I.P. et al. 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.
 13. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Turova I.P. et al. Immunochemical analysis, tritium planigraphy and features of the potato virus X and its coat protein // Intern. Sympos. "Virology, Immunology and Society". ROSTE/UNESCO.-Techn. Reports №6.-1991.-P.254-272.
 14. Viter S.S., Raudsepp R.A., Gavriash O.G., Radavsky Yu.L. Localization of epitope on potato virus M coat protein // Докл. АН України.-1992.-№9.-С.162-164.
 15. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Raudsepp R.A. et al. / Immunochemical analysis of the coat protein of potato virus M // Abstr. 3-th Intern. Sympos. on "Positive strand RNA viruses".-Florida, USA.-1992.-P.59.
 16. Immunochemical analysis and model building of the potato virus M and its coat protein / co-auth. Radavsky Yu., Gavriash O., Baratova L. et al. // Abstr. IX-th Intern. Congress Virology.-Glasgow, Scotland.-1993.-P.263.

Співквіталь



Витер О.О.

469180

АВ 29.778

1,5 печ. л. Тир. 100. Зак. 231

Типография Киевского института ВВС