

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ

На правах рукопису

ПАЛЬЧИКІВСЬКА Лариса Гнатівна

ПЕРВИННА СТРУКТУРА ПОЛІЕДРИНУ БАКУЛОВІРУСІВ
РЯДУ *LEPIDOPTERA*

02.00.10 - біоорганічна хімія, хімія природних та
фізіологічно активних речовин

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Київ - 1994



00801434 (K)

лабораторія хімії білка Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Науковий керівник:

Доктор біологічних наук,
Козлов Е. А.
кандидат біологічних наук,
Левітіна Т. Л.

Офіційні опоненти:

доктор хімічних наук,
професор
Серебряний С. Б.
кандидат хімічних наук,
Гудкова Л. В.

Провідна установа:

Київський університет
ім. Тараса Шевченка

Захист відбудеться "28" вересня 1994 г.
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.016.65.01 в Інституті
біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (253094, м. Київ
вул. Мурманська, 1).

З дисертацій можна ознайомитись в бібліотеці Інституту
біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Автореферат розісланий "28" вересня 1994 г.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Д.М. ФЕДОРЯК

7B-30.976

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Протягом останніх років інтерес до бакуловірусів, а зокрема до вірусів ядерного поліедрозу (ВЯП), зумовлений використанням їх як високоефективних екологічно чистих інсектицидів. На базі ВЯП сконструйовано вектор, який застосовують у біотехнології для синтезу важливих у народному господарстві та медицині білків і пептидів.

Характерна особливість ВЯП полягає в тому, що внаслідок інфекції в ядрах клітини виникають кристалоподібні білкові утворення - тіла включення (ТВ). Білок ТВ (поліедрин) при кристалізації включає в себе ДНК-вишукучі віріони та ядерну РНК. Від особливостей будови, фізикохімічних властивостей і біосинтезу поліедрину залежать утилітарні властивості інсектицидів (ТВ) і вектора (бакуловіруси). Виходячи з цього, знання первинної структури поліедринів дозволить дослідити взаємозв'язок її з функціями білка. Основна функція поліедринів - захист віріонів від навколишнього середовища при передачі інфекції через утворення поліедрів. Оскільки молекули поліедрину в процесі утворення поліедрів взаємодіють між собою, а також з РНК поліедрів та з мембранами віріонів, поліедрин може бути використаний як модельний білок для вивчення білок-білкових, білок-нуклеїнових та білок-мембранних взаємодій, що є центральною проблемою молекулярної біології та біоорганічної хімії. Модифікація ділянок поліедрину, відповідальних за перелічені взаємодії, дозволить змінювати цілеспрямовано властивості інсектицидів і вектора.

Знання первинної структури поліедринів ВЯП ряду представників різних загонів комах, географічних ізолятів і шта-

мів дозволить в'яснити філогенетичні і еволюційні взаємовідносини цих білків.

Ступінь дослідженості тематики. Пріоритет дослідження первинної структури поліедринів методами білкової хімії належить лабораторії хімії білка ІМБІГ НАН України, якою керує док.б.н. Е.А.Козлов. Дана робота завершує цикл досліджень по встановленню первинної структури поліедринів та зв'язку її з функціональними особливостями цього білка.

Мета та задачі дослідження. Метою даної роботи було виведення загальної формули поліедринів ВЯП *Lepidoptera* і виявлення їх філогенетичних взаємовідносин. Порівнюючи загальну формулу з відомими білковими мотивами знайти на ній функціонально важливі сайти, відповідальні за білок-білкові, білок-нуклеїнові, білок-мембранні взаємодії та інші біологічні властивості.

В задачі даного дослідження входило: 1. Визначення повної амінокислотної послідовності поліедринів ВЯП *Mamestra brassicae* (Mb) і *Malacosoma neustria* (Mn) і уточнення первинних структур поліедринів *Bombyx mori* (Bm), *Parthetria dispar* (Pd), *Agrotis segetum* (As) і *Galleria mellonella* (Gm). 2. Проведення структурно-функціонального аналізу досліджених нами та іншими авторами амінокислотних послідовностей поліедринів, порівнюючи їх з відомими білковими мотивами і виявлення, таким чином, функціонально важливих сайтів і філогенетичних взаємовідносин поліедринів ВЯП.

Наукова новизна роботи. Вперше встановлено повну амі-

нокислотну послідовність полієдринів ВЯП Мп і Мб. Уточнена первинна структура полієдринів ВЯП As, Gm, Pd, Bm і виведено загальну формулу полієдрину. Виявлено функціонально важливі сайти поліпептидного ланцюга полієдрину і запропоновано гіпотетичну модель структурно-функціональної організації поліпептидного ланцюга полієдрину. З'ясовано еволюційні та філогенетичні взаємовідносини полієдрину.

Практична цінність роботи. Розроблений нами метод пептидного картування може бути використаний в практичній білковій хімії для дослідження білків середнього розміру. Подані рекомендації по модифікуванню функціонально важливих сайтів, які можуть бути використовані у науково-дослідних інститутах для подальших фундаментальних і прикладних досліджень по перевірці гіпотези структурно-функціональної організації поліпептидного ланцюга полієдрину та удосконаленню інсектицидів і вектора, який застосовується у біотехнології на базі ВЯП. Отримані результати можуть викладатися в учбових закладах.

Апробація матеріалів дисертації. Результати роботи доповідалися на VII і VIII Всесоюзних симпозиумах по хімії білків і пептидів (Таллін, 1987; Тбілісі, 1990) та на конференції "Новейшие методы в биотехнологии." РАН (Москва; 1994).

По матеріалах дисертації опубліковано 5 статей, список яких наведено в кінці автореферату.

Структура та обсяг роботи. Дисертація викладена на

сторінках машинописного тексту і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів та їх обговорення, заключення, висновків і списку цитованої літератури. Огляд літератури містить дані щодо біологічних, фізико-хімічних та структурних особливостей амінокислотних послідовностей поліедрину. Список літератури налічує джерел. Дисертація включає 5 таблиць та 14 рисунків.

Конкретний особистий внесок дисертанта. Експериментальна частина роботи виконана дисертантом особисто.

Методологія, методи дослідження.

Препарат поліедрину ВЯП Мп одержували розчиненням поліедрів у 0,1н. NaOH (Berggold, 1947), інші поліедрини були люб'язно надані співробітниками лабораторії хімії білка ІМБіГ НАН України. У роботі використовували відновлення -S-S- зв'язку дітіотрейтолом та алкілування іодоцтовою кислотою (Себряний, Кавсан, 1968), модифікування білка за залишками лізину малеїновим ангідридом (Butler, Hartley, 1972), ферментативне розщеплення білків трипсином, хімотрипсином, термолізином і ровбавленою солянню кислотою.

Суміші пептидів розділяли з використанням методів гель-фільтрування, високовольтного електрофорезу (в/в) і хроматографії на папері. Нами було розроблено прискорений метод ("Препаративне пептидне картування") визначення первинної структури високогомологічних білків з молекулярною масою 20 000 - 30 000. Для дослідження амінокислотної послідовності білків та пептидів застосовувались метод Едмана в сполученні з дансильованням (Гусак та ін., 1979) і карбокси-

пептидаза А і В (Пугачова, 1971). Амінокислотний склад визначали за допомогою аналізатора амінокислот ААА 331, ЧССР.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для з'ясування первинної структури полієдринів ВЯП ми застосували традиційний підхід, розроблений в нашій лабораторії для білків ТВ бакуловірусів, - дослідження тільки триптичних пептидів з причини високого ступеня гомології білків ТВ.

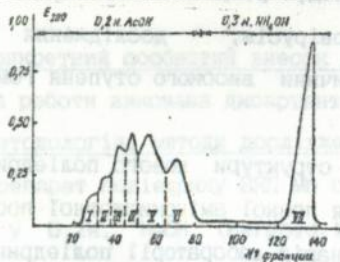
Дослідження первинної структури нового полієдрину ВЯП Мп та з'ясування і уточнення повної амінокислотної послідовності раніше вивчених в нашій лабораторії полієдринів ВЯП Аs, Gп, Pd і Bп вимагало розробки різної методології для розділення триптичного гідролізату полієдринів, через те що у випадку нового білка необхідно було одержувати всі пептиди, а для білка, у якого в тій чи іншій мірі з'ясовано амінокислотну послідовність, - тільки деяких визначених пептидів. Для цього ми розробили дві стратегії з'ясування первинної структури полієдринів.

По першій традиційній стратегії триптичний гідролізат попередньо розділяли гелі-фільтруванням, а далі матеріал усіх фракцій розділяли різними комбінаціями в/в електрофорезу і хроматографії на папері у двох електролітах і двох системах розчинників. У всіх одержаних фракціях визначали амінокислотний склад та N-кінцеві залишки. По другій стратегії, якій ми дали назву "метод препаративного пептидного картування", триптичний гідролізат розділяли препаративним в/в

електрофорезом тільки в одному електrolіті і хроматогували в одній системі розчинників. Необхідні пептиди досліджували після проявлення хроматограм нінгідрином.

При обох стратегіях повна амінокислотна послідовність встановлювалась шляхом порівняння будови вивчених пептидів досліджуваного білка з відомою первинною структурою еталонного полієдрину ВЯП Мп (Козлов та ін., 1978).

Первинна структура полієдрину ВЯП Мп раніше не дослід-



жувалась. Ми встановили її по першій стратегії. На Рис.1 представлено результати розділення гельфільтруванням розчинного триптичного гідролізату відновленого та карбоксиметиль-

Рис. 1 Розділення розчинних триптичних пептидів полієдрину ВЯП Мп на колонці з сефадексом Г-25 (2,5 x 100см). Швидкість елюції 30мл/г, об'єм фракції - 5 мл. Далі із матеріалу семи пі-

ків було відібрано 48 гомогенних пептидів (Т) і вивчено їх будову. Пептид Т28 додатково субфрагментувався хімотрипсином (Ch). N-кінцевий залишок Met був визначений після обробки білка 0,1N NaOH. Схема реконструкції поліпептидного ланцюга і введена на рис.2. Стрілками --> на рис.2 і далі позначено число проведених стадій деградації за Едманом. Стрілками <-- позначена послідовність залишків, встановлена дією карбоксипептидази А і В.

Первинна структура полієдрину ВЯП Мв. Цей полієдрин був вибраний нами для відпрацювання метода препаративного картування по другій методиці визначення первинної структури, через те, що деякі фрагменти цього білка частково досліджува-

лись в нашій лабораторії (Kozlov et al., 1986), а повна амінокислотна послідовність була виведена з нуклеотидної для іншого штаму ВЯП Mb (Cameron, 1989). Методом пептидного картування було відібрано 31 пептид. Схема реконструкції поліпептидного ланцюга наведена на рис.3. Пептиди T18 і T11 субфрагментувались термолізином (Th) і Ch відповідно.

Метод препаративного пептидного картування може бути успішно застосований для з'ясування первинної структури високогомологічних білків середнього розміру (м.м. - 30 000).

Первинна структура поліедрину ВЯП As. Часткова амінокислотна послідовність великих фрагментів поліпептидного ланцюга була встановлена в нашій лабораторії раніше (Гусак, 1985). Для одержання недостатніх пептидів і розкриття дужок ВКМ-поліедрин розщеплювали T і гідролізат розділяли методом препаративного картування. Таким чином виділено 25 необхідних гомологічних пептидів. Пептиди T8 і T16 субфрагментували Ch і Th відповідно і субфрагменти розділяли в/в електрофорезом. На рис.4 наведена повна амінокислотна послідовність, на якій позначено нові одержані нами пептиди.

Первинна структура поліедрину ВЯП Gm. Часткова амінокислотна послідовність була встановлена в нашій лабораторії раніше (Гусак, 1981). Для розкриття дужок з триптичного гідролізату немодифікованого білка методом препаративного пептидного картування було виділено 10 необхідних пептидів. Пептид T9 субфрагментували Ch, а пептид T18 і T23 - Th. З хімотриптичного гідролізату білка методом картування був виділений один пептид, що містить в собі триптофан (Ch22).

Всі досліджені нами пептиди позначені на рис.5.

Первинна структура поліедрину ВЯП Pd. Повна амінокислот-

на послідовність цього полієдрину була встановлена в нашій лабораторії (Левітіна, 1981), а також виведена з нуклеотидної послідовності гена полієдрину іншого ізоляту ВЯП. Між даними двох лабораторій були розходження. Для встановлення істини ми вдруге методом пептидного картування з триптичного гідролізату немодифікованого білка виділили необхідні пептиди. Пептиди T18 субфрагментували Th, а нерозчинну фракцію триптичного гідролізату розщеплювали Ch і Th. З хімотриптичного гідролізату білка пептидним картуванням виділяли необхідний пептид, що містить триптофан (Ch22). На білку, обробленому 0,1n. NaOH, було проведено 5 стадій деградації за Едманом. Одержані результати представлені на рис.6.

Первинна структура полієдрину ВЯП Вт. Повна амінокислотна послідовність його була встановлена в нашій лабораторії (Коалов, 1978), а пізніше виведена з нуклеотидної послідовності гена полієдрину іншого ізоляту ВЯП (Iatrou, 1985). Між цими даними мали місце розходження. Для перевірки із триптичного і хімотриптичного гідролізатів немодифікованого білка, методом пептидного картування виділяли відповідно пептиди T6 і T26 і 2 пептида, які містять триптофан - Ch12 і Ch 23. Пептид Ch12 і T26 субфрагментували відповідно T і Th. З нерозчинного матеріалу триптичного гідролізату полієдрину, модифікованого maleїновим ангідридом виділяли пептид Tm11, який субфрагментували послідовно Ch і частковим кислотним гідролізом (A). Одержані результати приведені на рис.7.

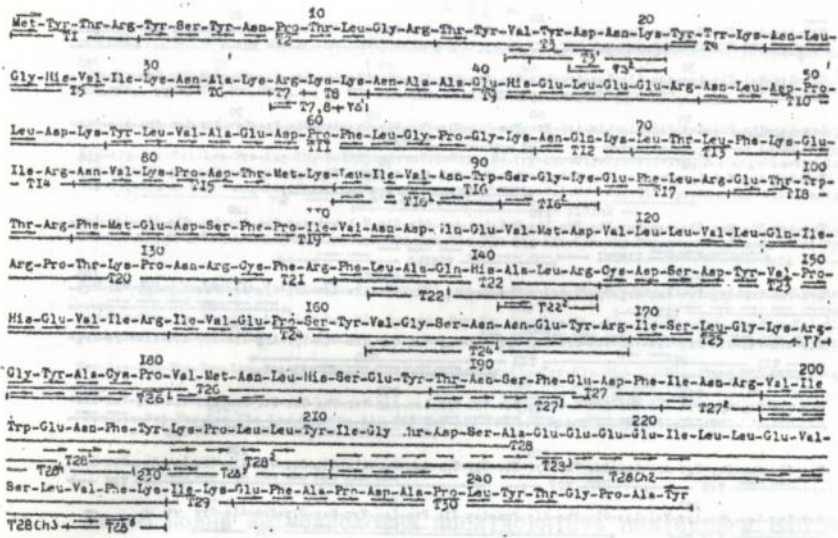


Рис.2 Реконструкція поліпептидного ланцюга поліедрину ВЯП Мп

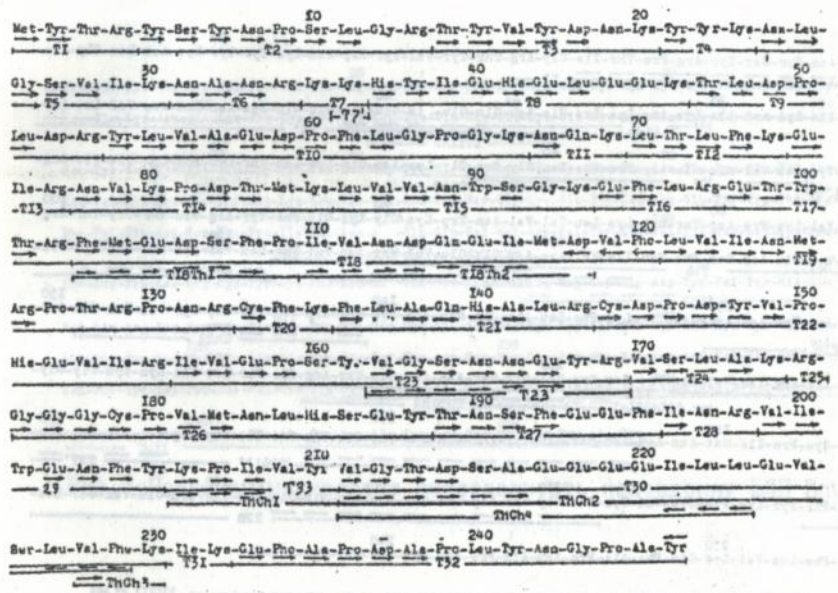


Рис.3 Реконструкція поліпептидного ланцюга поліедрину ВЯП Мь



Рис.4 Повна амінокислотна послідовність поліпептиду ВЯП Аз

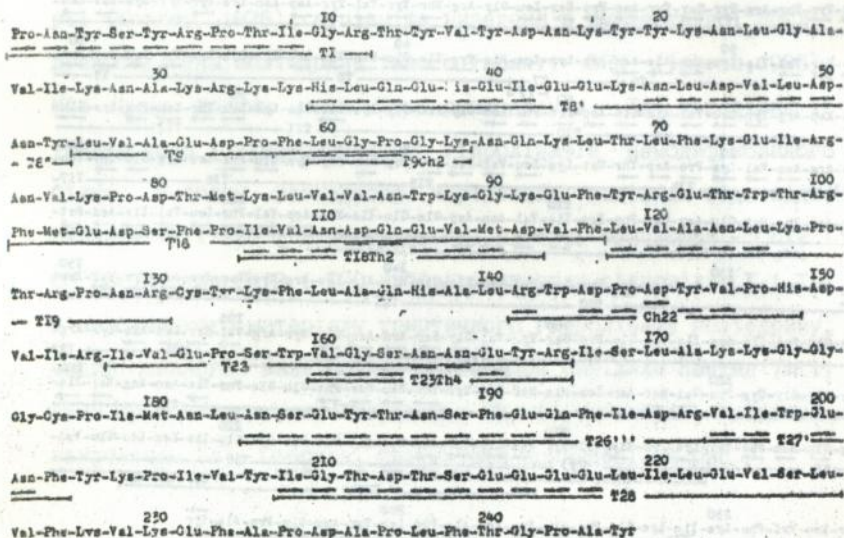


Рис.5 Повна амінокислотна послідовність поліпептиду ВЯП Сп



Вис.6 Повна амінокислотна послідовність поліпептиду ВЯП Р₁



Вис.7 Повна амінокислотна послідовність поліпептиду ВЯП В_m

90

100

110

V V N W S G K E F L R E T W T R F M E D S F P I V N D Q E V M D

I V N W S G K E F L R E T W T R F M E D S F P I V N D Q E V M D

V V N W K G K E F Y R E T W T R F M E D S F P I V N D Q E V M D

I V N W S G K E F L R E T W T R F V E D S F P I V N D Q E V M D

V V N W S G K E F L R E T W T R F M E D S F P I V N D Q E V M D

V V N W S G K E F L R E T W T R F M E D S F P I V N D Q E V M D

* * *
V V W G K E F R E T W T R F M E D S F P I V N D Q E V M D

120

130

140

150

V F L V I N M R P T R P N R C F K F L A Q H A L R C D P D Y V P

V L L V L Q I R P T K P N R C F R F L A Q H A L R C D S D Y V P

V F L V A N L K P T R P N R C Y K F L A Q H A L R W D P D Y V P

V Y L V A N L K P T R P N R C Y K F L A Q H A L R W D E D Y V P

I F L E A N L K P T R P N R C Y R F L A Q H A L R C D P D Y V P

I Y L T I N V R P T R P N R C Y K F V A Q H A L R W D E G Y V P

* * * * *
V L N M R P T R P N R C Y K F L A Q H A L R D Y V P

160

170

180

H E V I R I V E P S Y V G S N N E Y R V S L A K R G G G C P V M

H E V I R I V E P S Y V G S N N E Y R I S L G K R G Y A C P V M

H D V I R I V E P S W V G S N N E Y R I S L A K R G G G C P I M

H E V I R I M E P S Y V G M N N E Y R I S L A K K G G G C P I M

H E V I R I V E P D Y V G V G N E Y R I S L A K R G G G C P I M

H E V I R I V E T S Y V N Q P N E Y R I S L A K R G G G C P I R

* * * * *
H E V I R I V E V N E Y R I S L K R G C P I

190

200

210

N L H S E Y T N S F E E F I N R V I W E N F Y K P I V Y V G T D
 N L H S E Y T N S F E D F I N R V I W E N F Y K P L L Y I G T D
 N L N S E Y T N S F E Q F I D R V I W E N F Y K P I V Y I G T D
 N I H S E Y T N S F E S F V N R V I W E N F Y K P I V Y I G T D
 N L N S E Y N N S F E S F I E R V I W E N F Y R N N V Y I G T D
 N L H S A Y T T S F E H F L N S V I W N N F Y K P I V Y V G T T

*

*

*

*

*

N L [] Y [] S F E [] F I [] V W [] N F Y K [] V Y I G T []

220

230

240

S A E E E E I L L E V S L V F K I K E F A P D A P L Y N G P A Y
 S A E E E E I L L E V S L V F K I K E F A P D A P L Y T G P A Y
 T S E E E E L I L E V S L V F K V K E F A P D A P L F T G P A Y
 A S E E E E I L I E V S L V F K I K E F A P D A P L F T G P A Y
 S A E E E E I L L E L S L L F K V K E F A P D I P L Y S G P A Y
 A S E E E E I L L E V S L V F K I K E F A P D A P L F Q G P A Y

*

*

*

*

*

*

*

[] E E E E I L L E V S L V F K I K E F A P D [] P L F [] G P A Y

Для максимального ступеня гомології у деяких амінокислотних послідовностях припущені делеції (-). Варіабельні валишки амінокислот взяті в рамки. Положення, в яких відбуваються гомологічні заміни в групах позначені вірочкою. Для визначення філогенетичних взаємовідносин поліедринів у групі ВЯП ми залучили, крім наших даних, амінокислотні послідовності ще 8-ми поліедринів, виведених з нуклеотидних послідовностей відповідних генів 4-х ВЯП загону Lepidoptera і одного ВЯП - Hymenoptera. Серед ВЯП, які порівнюються, є представники двох загонів комах, двох штамів однієї комахи і по два ізоляти ВЯП

трьох комах. Для кожної пари поліедринів ми підраховували число відповідностей (ідентичні та гомологічні залишки) і "ступінь спорідненості" (Hood, 1973) (% числа відповідностей від загального числа амінокислотних залишків поліедринів, які порівнювались). З одержаних результатів можна зробити чотири основних висновки: 1. Поліедрини ВЯП вагону Lepidoptera належать до групи високогомологічних білків зі "ступенем спорідненості" в діапазоні 85-100%. 2. Дивергенція первинних структур поліедринів ВЯП серед вагону Lepidoptera значно нижча дивергенції первинних структур вагонів Lepidoptera і Hymenoptera ("ступінь спорідненості" 53-57% (вагін Lepidoptera - самий молодий вагін комах)). 3. Дивергенція поліедрини проходить двома паралельними шляхами, залежними від хааяіна і віруса. 4. ВЯП по різному реагують на природний відбір у процесі дивергенції в залежності від ділянок поліпептидного ланцюга поліедрини. У поліпептидному ланцюгу чітко виділяється найбільш варіабельна ділянка 1-53 ("ступінь спорідненості" 70-98%) і константна 53-123 ("ступінь спорідненості" 92-100%).

Високий ступінь консервативності поліедрини ВЯП Lepidoptera дозволив виписати так звану "загальну формулу" цієї групи білків (Джидж). Загальна формула окладається з "смыслові послідовності", яка містить в собі ідентичні і гомологічні залишки і "не суттєві" ділянки, які містять в собі варіабельні залишки. "Не суттєві" ділянки ваяті в порожні рамки на загальній формулі. "Суттєва послідовність" вміщує 78% залишків амінокислот, а "не суттєві" ділянки - 22%. На загальній формулі очевидний різний ступінь реакції поліедрина на природний відбір в варіабельній і константній

ділянках: варіабельна ділянка містить в собі 60% "суттєвої послідовності", а константна ділянка - 90%.

Структурно-функціональний аспект первинної структури полієдрину (гіпотеза). По величині "суттєвої послідовності" загальної формули можна судити про важливість майже всього поліпептидного ланцюга для функціонування полієдрину.

Очевидна і загально відома одна функція полієдрину - через білок-білкову взаємодію молекул полієдрину утворення супервірокапсида (захисна, структурна функція). Раніше в нашій лабораторії були експериментально визначені ділянки поліпептидного ланцюга, відповідальні за білок-білкові взаємодії (Кібірев, 1976; Kozlov, 1986). Ми спробували вивести мотив однієї з цих ділянок. Цей мотив приведений на рис.8. Він на 72% складається з залишків - носіїв сигнатури білок-білкових взаємодій.

Крім білок-білкових взаємодій відомі інші - білок-нуклеїнові і білок-мембранні взаємодії. Це відображено у раніше висунутій гіпотезі структурно-функціональної організації поліпептидного ланцюга полієдрину, згідно з якою полієдрин має мультифункціональні власивості (Kozov et al., 1986). Поглиблюючи цю гіпотезу, ми спробували локалізувати на поліпептидному ланцюгу полієдрину мотиви, які відповідають за перелічені вище взаємодії і властивості. Результати цих досліджень приведені на рис.9-11. Таким чином, нами були визначені крім мотива I гіпотетичні мотиви, відповідальні за взаємодію полієдрину з РНК полієдрів (мотив II), ядерну локалізацію (мотив III), зв'язування нуклеотида (мотив IV), взаємодію з мембраною віріонів (мотив V) і клітинною мембраною (мотив VII), фосфорилювання (мотив VII).

Ми також порівняли амінокислотну послідовність відповідального за білок-білкову взаємодію фрагмента 121-189 поліедрину з амінокислотною послідовністю N-кінцевої частини 1-85 фактора некрозу пухлини людини. Таким чином у поліедрині були знайдені 2 ділянки, гомологічні на 50% і 60% (рис.12.а і 12.б відповідно) з ділянками фактора некрозу пухлини людини. Цікаво підкреслити, що ділянка "а" поліедрину (рис.12.а) включає мотив VII і щільно примикає до мотиву VI (рис.13). На рис.13 приведено гіпотетичну модель структурно-функціональної організації поліпептидного ланцюга поліедрину БЯП, на якій локалізовані мотиви I-VII. Згідно з запропонованою гіпотезою можна рекомендувати модифікацію методом генної інженерії певних залишків в знайдених нами поліедринових мотивах. Здійснити це можна, застосовуючи вектор, сконструйований в нашому інституті на базі БЯП Мп. Ці дослідження є фундаментом для розробки і одержання новітніх біотехнологій.

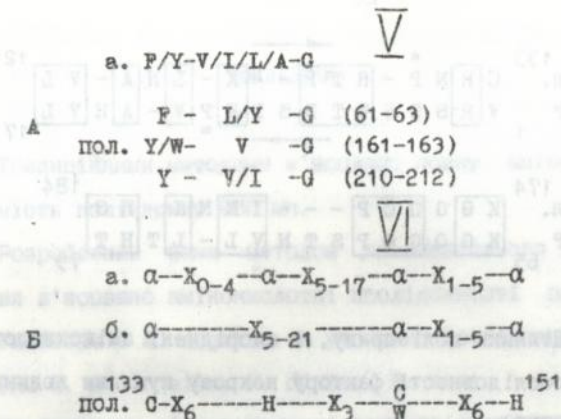


Рис. 10 . Білкові мотиви (а, б), відповідальні за білок-мембранну взаємодію, і споріднені послідовності полієдринау (пол.). А - фактор зберігання структурної цілісності, взаємодія з фосфоліпідними агрегатами. Б - транслокація через мембрану.
 α - С або Н.

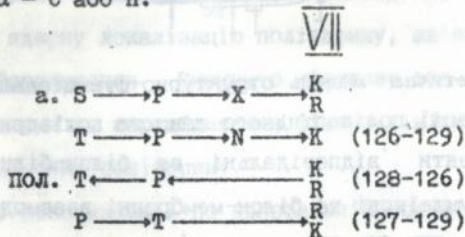


Рис. 11 . Гістоновий мотив (а), відповідальний за фосфорильвання, і споріднені послідовності полієдринау (пол.).

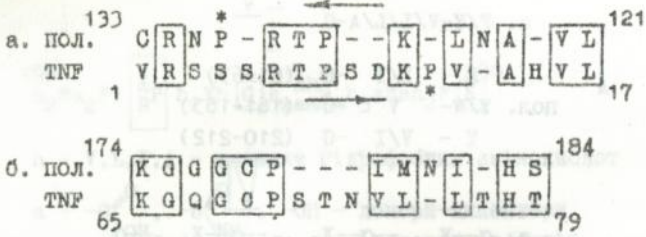


Рис. 12. Ділянки полієдрину, і споріднені амінокислотні послідовності фактору некрозу пухлини людини (TNF).

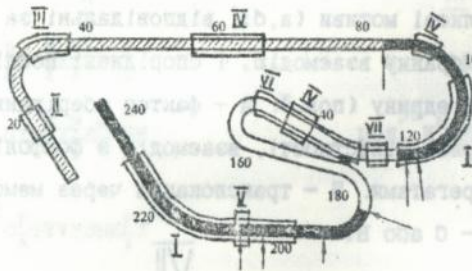


Рис. 13. Гіпотетична модель структурно-функціональної організації поліпептидного ланцюга полієдрину ВЯП. Фрагменти відповідальні за білок-білкові, білок-нуклеїнові та білок-мембранні взаємодії позначені **■**, **▨**, **□** - відповідно. Рамками позначені місця розташування мотивів I-VII. Стрілки показують центри розщеплення поліпептидного ланцюга протеазою полієдрів.

ВИСНОВКИ

1. Традиційними методами з'ясовано повну амінокислотну послідовність полієдрину ВЯП Мп.
2. Розробленим нами методом препаративного пептидного картування з'ясовано амінокислотні послідовності полієдринів ВЯП *M. brassicae* і *A. segetum* та уточнено послідовності полієдринів ВЯП *G. mellonella*, *P. dispar*, *B. mori*.
3. Встановлено філогенетичні взаємовідношення чотирнадцяти полієдринів ВЯП комах, вміщуючих 9 видів загону *Lepidoptera* (8 ВЯП чотирьох видів представлені шістьма ізолятами та двома штамми) і один вид загону *Hymenoptera*. Виведено смислову послідовність полієдрину ВЯП *Lepidoptera*.
4. У смисловій послідовності полієдрину ВЯП визначили білкові мотиви, які відіграють важливу роль у білок-білкових, білок-нуклеїнових, білок-мембранних взаємодіях, а також відповідальні за ядерну локалізацію полієдрину, зв'язування нуклеотида і фосфорилювання. Висунуто гіпотезу про зв'язок цих мотивів з відомими та передбаченими фізико-хімічними і біологічними властивостями полієдрину.
5. Подані рекомендації по направленій модифікації визначених амінокислотних залишків в мотивах полієдрину і запропоновано подальші напрямки фундаментальних і прикладних досліджень по удосконаленню вектора та біотехнологій на базі ВЯП бакуловірусів.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ковлов Э.А., Левитина Т.Л., Гусак Н.М., Роднин Н.В., Атепалихина С.А., Пальчиковская Л.И. Выяснение полной аминокислотной последовательности полиэдрина ВЯП озимой совки (*Agrotis segetum*) и уточнение первичной структуры полиэдринов ВЯП тутового (*Bombix mori*), непарного (*Porthetria dispar*) шелкопрядов и большой вошинной моли (*Galleria mellonella*) // Биополимеры и клетка. 1991. - т7, N1. - С. - 75-82.

2. Kozlov E.A., Rodnin N.V., Levitina T.L., Gusak N.M., Rodomsky N.F., Palchikovskaya L.I. The Amino Acid Sequence Determination of a Granulin and Polyhedrin from Two Baculoviruses Infecting *Agrotis segetum* // Virilogy 1992. t.189.- P.320-323.

3. Пальчиковская Л.И., Левитина Т.Л., Вобровская М.Т., Овандер М.Н., Кацман М.С., Ковлов Э.А. Ускоренный метод определения первичной структуры высокомолекулярных белков. Полная аминокислотная последовательность полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) капустной совки, *Mamestra brassicae* // Биополимеры и клетка. 1993. - т9, N4. - С.44-50.

4. Пальчиковская Л.И., Вобровская М.Т., Роднин Н.В., Левитина Т.Л., Ковлов Э.А. Триптические пептиды полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) кольчатого шелкопряда *Malacosoma neustria* // Биополимеры и клетка.-1993. т9, N4.-С.29-34.

5. Ковлов Э.А., Роднин Н.В., Пальчиковская Л.И., Левитина Т.Л., Вобровская М.Т., Радомский Н.Ф. Первичная структура полиэдрина вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда *Malacosoma neustria* // Биоорганическая химия.-1994.- т20, N5, - С.543-545.

Пальчиковская Л.И. Первичная структура полиэдрина бакуловирусов отряда *Lepidoptera*.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ, Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, 1994.

Защищаются 5 научных работ, в которых опубликованы полные аминокислотные последовательности полиэдринов 6-ти ВЯП и предложен ускоренный метод определения первичной структуры белков средней величины. В диссертации выяснены филогенетические взаимоотношения полиэдринов ВЯП отряда *Lepidoptera* и *Hymenoptera* и предложена гипотеза структурно-функциональных взаимоотношений полиэдринов.

Palchikovskaya L.I. The Primary structure of the polyhedrin baculoviruses *Lepidoptera*.

Dissertation has been presented for the receiving the degree of the Candidate of Science (Chemistry). Speciality is 02.00.10.- Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Substances, Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev 1994.

5 scientific works containing complete amino acid sequences of 6 NPV polyhedrins and a new accelerate determination method of middle size proteins primary structure are defended. Phylogenetic relations of *Lepidoptera* and *Hymenoptera* NPV polyhedrins as well as hypothesis of their structural-functions have been suggested too.

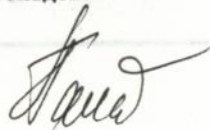
Ключові слова:

пептиди, білки, поліедрин, амінокислотна послідовність.

Підписано до друку 22.04.94р.

Тираж 100.

Надруковано в Інституті біоорганічної хімії та нафтехімії НАН України



Зам. 135 Формат 60x84/16. Обл.-вид.арк.І.0
Підписано до друку 22.09.94р. Тираж 100.

Поліграфічна дільниця ІТФ НАН України

AB 30.976

AB 30.976