

СТЕХИОМЕТРИЯ РНП-КОМПЛЕКСА ПОЛИЭДРОВ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *Bombyx mori*

© Т. В. ШИРИНА, М. Т. БОБРОВСКАЯ, Э. А. КОЗЛОВ

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: e.a.kozlov@imbg.org.ua

Методом гель-фильтрации на колонке Sephacryl S-300 показано, что входящий в полиэдры вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* комплекс РНП А имеет молекулярную массу (Мм) около 700 кДа. Показано, что РНП А с Мм 788 кДа формируется из двух 13S-ассоциатов полиэдрина с Мм 342 кДа, двух полипептидов р14 с Мм 14 кДа, двух малых некодирующих РНК с Мм 21 кДа и двух малых некодирующих РНК с Мм 17 кДа. Предлагается модель образования комплекса РНП А из составляющих его компонентов. Обсуждается роль комплекса в формировании полиэдра и его роль в инфекционном процессе.

Ключевые слова: вирус ядерного полиэдроза, *Bombyx mori*, полиэдрин, малая РНК, РНП-комплекс, гель-фильтрация.

Ранее [1] было показано, что две малые РНК в составе полиэдров вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) *Bombyx mori* образуют РНП-комплексы с Мм 50 кДа (РНП50) и Мм 31 кДа (РНП31). Оба РНП входят в состав более крупного комплекса РНП А, который при электрофорезе в агарозе в нативных условиях имеет подвижность, совместимую с подвижностью условной 10S РНК. Интересно было определить Мм комплекса РНП А, его архитектуру и роль в формировании кристаллической решетки полиэдров, опираясь на известные результаты электронно-микроскопических исследований структуры полиэдров ВЯП *Porthetria dispar* и *Aglais utricae* [2]. Результаты этих исследований представлены в настоящем сообщении.

Материалы и методы

Полиэдры. В работе использовали полиэдры, выделенные из коконов кара-почах: инфицированные ВЯП гусеницы *B. mori*, успевшие свить кокон до своей гибели. Полиэдры выделяли из гомогената «гнилых» коконов.

Раствор полиэдрина. 100 мг полиэдров растворяли в течение одного часа при комнатной температуре в 4 мл буфера 0,05 М ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3 + 0,1 \text{ M NaCl}$), рН 10,5 (буфер I). Для удаления вирусных частиц раствор центрифугировали последовательно при 6000 об./мин 10 мин, а затем при 30 тыс. об./мин – 1 час при 4 °С.

Получение РНП А. Метод 1. Раствор полиэдрина диализировали в течение 3,5 час про-

тив подкисленной дистиллированной воды (рН 2–3), а затем 20 мин против 0,2 М бикарбоната аммония (рН 7,8). Выпавший осадок полиэдрина отделяли центрифугированием (6–7 тыс. об./мин, 10 мин) и надосадочную жидкость диализировали в течение ночи против 0,07 М фосфатного буфера, рН 7,5 (буфер II). Далее, как описано в работе [1]. Метод 2. Раствор полиэдрина диализировали сутки против буфера II, затем 30 мин против 0,2 М бикарбоната аммония, рН 7,8. Выпавший осадок полиэдрина удаляли низкоскоростным центрифугированием (6–7 тыс. об./мин, 10 мин). Далее, как в работе [1].

Гель-фильтрация. Использовали коммерческие колонки Sephacryl S-300 (маркеры: Thy (Мм 669 кДа), IgG (Мм 160 кДа), Ova (Мм 43 кДа), Myogl (Мм 17,5 кДа) и Superose 6 10/300 GL (маркеры: Thy (Мм 669 кДа), Fer (Мм 440 кДа), BSA (Мм 67 кДа), Ribon (Мм 13,7 кДа). (Amersham, Pharmacia, Biothech, Швеция). Гель-фильтрацию проводили в буферах I и II (см. выше). Собирали фракции по 2 мл.

Определение РНК в пиках осуществляли с помощью орциновой реакции и измерением отношения A_{260}/A_{280} в УФ-спектрах.

УФ-спектры поглощения снимали на спектрофотометре «Specord» (ГДР).

Результаты и обсуждение

Выбор коконов кара-почах обусловлен тем, что выделенные из них полиэдры не имеют протеолитической активности. Полиэдры

из других источников (гемолимфа инфицированных гусениц, погибшие в естественных условиях гусеницы) содержат щелочную протеазу, которая при выделении полиэдрина в щелочных условиях расщепляет полипептидную цепь в нескольких местах с образованием крупных перекрывающихся фрагментов [3]. Использование таких полиэдров значительно осложнило бы интерпретацию полученных данных.

Для определения Мм РНП А раствор полиэдрина подвергали гель-фильтрации на колонке Sephacryl S-300. В результате получили шесть пиков (рис. 1). Основная масса протеина выходила в первых трех пиках. Очевидно, что первый пик содержит компоненты с Мм 700 кДа, второй – около 350 кДа и третий – 170 кДа. РНК обнаруживается в первых трех фракциях пика 1 и во фракциях пиков 5 и 6. УФ-спектры объединенных фракций 1–3 (а) и фракции 4 (б) пика 1 представлены на рис. 1. Отношение A_{260}/A_{280} равно 1,07 (а) и 0,78 (б). Фракции 5–18 (пики 2, 3, 4 и частично 5) имеют типичные протеиновые спектры с отношением A_{260}/A_{280} равным 0,6–0,7. Из этих данных следует, что РНП А присутствует во фракции 1–3. Вероятно фракция 4 (б) представляет собой димер 13S-субъединицы полиэдрина с Мм 342 кДа [3]. Такое четкое разделение в пределах пика 1 свидетельствует, что РНП А име-

ет Мм в пределах 700–800 кДа. Точную Мм РНП А можно рассчитать, исходя из Мм входящих в него компонентов [1]. Было показано, что в растворе при pH 10,5 70% полиэдрина находится в виде ассоциата с коэффициентом седиментации 13S (13S-субъединица) [3]. По определению Харрап [2] 13S-субъединица представляет собой шестиплечевую узловую единицу (six-armed nodal unit). Известно, что узловая единица представляет собой додекамер полипептидной цепи полиэдрина [4] с Мм 342 кДа (Мм полипептидной цепи 28,5 кДа [3]). Очевидно, что РНП А содержит две единицы. В состав РНП А входит РНП В, который состоит из двух РНП31, каждый из которых включает полипептид с Мм 14 кДа и малую РНК с Мм 17 кДа [1]. Таким образом РНП В имеет Мм 62 кДа. В сумме получаем 746 кДа. В полиэдр включается еще малая РНК с Мм 21 кДа, которая образует комплекс РНП50 с полипептидной цепью полиэдрина [1]. Наиболее вероятно, что в РНП А входят две РНК (по одной в каждой узловой единице). В итоге суммарная Мм РНП А будет составлять 788 кДа. Очевидно, что 19S-компонент, обнаруженный нами ранее [5] при ультрацентрифугировании раствора полиэдрина, по-видимому, представляет собой РНП А. Исходя из такого расчета Мм РНП А и из УФ-спектров (рис. 1), отобранных фракций а и б, мы делаем вывод, что

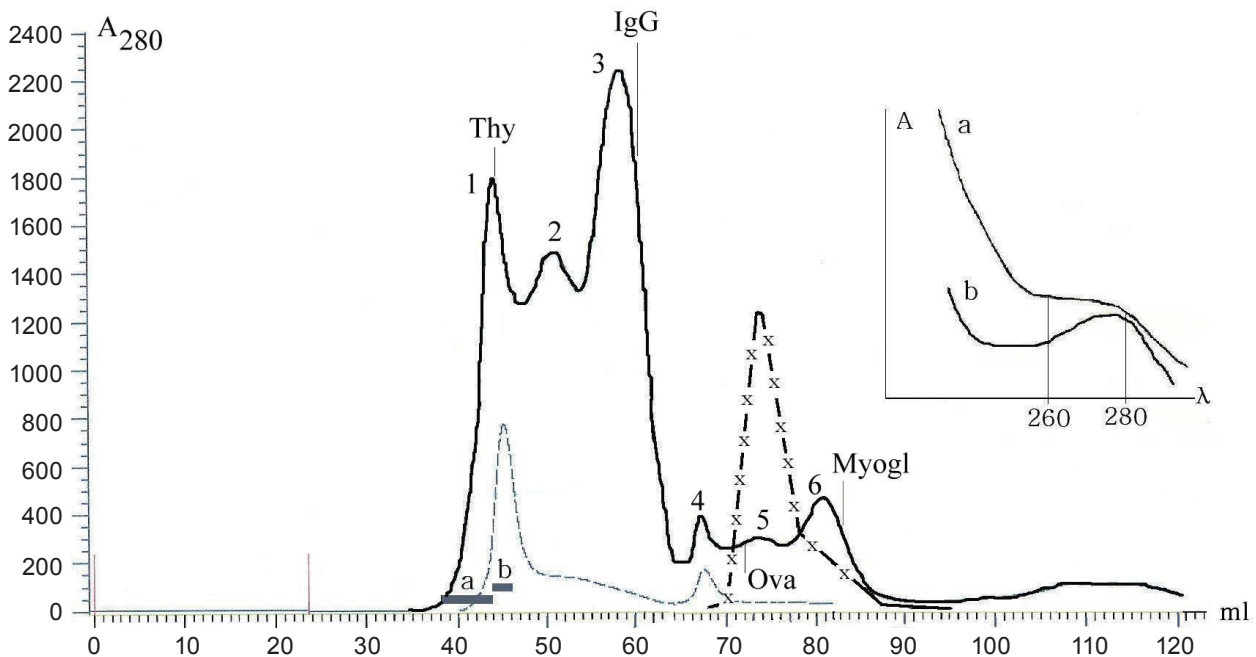


Рис. 1. Гель-фильтрация на Sephacryl S-300 раствора полиэдрина (—) и РНП А (-x-x-x-) в буфере I. Гель-фильтрация материала пика 3 в буфере II (- - -). А – УФ-спектры фракций а и б пика 1

фракція 4 піка 1 (рис. 1) містить димер узлової одиниці з Мм 684 кДа. Різниця в Мм РНП А і димера узлової одиниці, рівна 100 кДа, передбачає їх частинне розділення в межах піка 1.

Аналізуючи далі Мм компонентів поліедрина в піках рис. 1, ми передположили, що пік 2 містить узлові одиниці, а пік 3 – їх половини (триплечевої компонент узлової одиниці з Мм 171 кДа). Очевидно цей компонент з коефіцієнтом седиментації 8,2S виявлений нами раніше при ультрацентрифугуванні [5]. Пік 4 ймовірно містить димер поліпептидної ланки поліедрина (плече узлової одиниці з Мм 57 кДа). Такий компонент з коефіцієнтом седиментації 3,2S також виявлений при ультрацентрифугуванні [5]. Інтересно відзначити, що поліедрин із піка 3 після діалізу проти фосфатного буфера і наступної гел'фільтрації, виявляється в формі димера узлової одиниці (рис. 1), т.е. (після зниження рН з 10,5 до 7,5) відбувається ступінчаста асоціація триплечевого компонента поліедрина з утворенням спочатку узлової одиниці, а потім її димера. І нарешті, пік 5 містить поліпептидну ланку поліедрина (Мм 28,5), а пік 6 – суміш малих РНК і поліпептида р14. Передположення про те, що пік 5 містить поліпептидну ланку поліедрина, а піки 1–4 її асоціати, підтверджується даними електрофорезу в ПААГ в присутності DS-Na: всі піки дають одну і ту ж картину (поліпептид з Мм 29 кДа, рис. не приводиться).

Таким чином, викладені вище результати підтверджують виявлений факт [5], що високомолекулярні агрегати по-

ліедрина дисоціюють в процесі гел'фільтрації. Інтересно відзначити, що РНП А на відміну від поліедрина не дисоціює до 13S-суб'єдиниць при гел'фільтрації розчину поліедрина. Однак виділений в чистому вигляді, він дисоціює при гел'фільтрації в залежності від способу отримання і матриці геля. Так, РНП А, виділений по методу 1, дисоціює при гел'фільтрації до своїх компонентів – поліпептидної ланки (Мм 28,5 кДа), р14 (Мм 14 кДа) і двох малих РНК (Мм 17 і 21 кДа). Як видно (рис. 1), значительна частина поліедрина виходить в формі поліпептидної ланки одним піком в діапазоні 70–78 мл. Ниспадаюче плече в діапазоні 79–86 мл очевидно представляє собою поліпептид р14. РНК виявляється в фракціях 18–23. На рис. 2 видно, що цей препарат РНП А виходить одним піком в діапазоні від 16 до 22 мл. Ми передпологаємо, що при гел'фільтрації РНП А дисоціює до двох молекул РНП з Мм 78 кДа, складеного з димера поліпептидної ланки (одно плече узлової одиниці) і РНК з Мм 21 кДа, плюс однієї молекули РНП В (Мм 62 кДа) і 10-ти молекул димера поліпептидної ланки (Мм 57 кДа). Можливо зробити висновок, що при гел'фільтрації препарату 1 РНП А відбувається руйнування фізичних зв'язків протеїн-протеїнових взаємодій, відповідальних за формування узлової одиниці і асоціацію двох узлових одиниць з РНП В. Іншими словами, руйнуються зв'язки, утворені амінокислотними залишками, розташованими в С-кінцевій частині поліпептидної ланки [3]. Цілі димери, утворені за рахунок протеїн-протеїнових взаємодій середніх

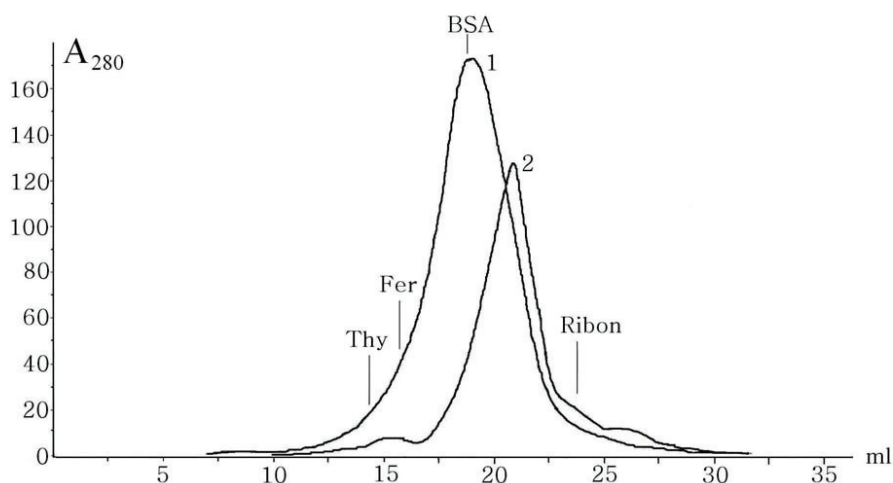


Рис. 2. Гел'фільтрація на Superose 6 10/300 GL препарату 1 і препарату 2 РНП А в буфері І

участков полипептидной цепи полиэдрина. РНП А, выделенного по методу 2, диссоциирует при гель-фильтрации одним пиком в диапазоне (18–22 мл) и с ниспадающим плечом (22–26 мл). Мы предполагаем, что происходит диссоциация РНП А полностью до полипептидной цепи (24 молекулы) и двух молекул р14 (ниспадающее плечо). Отметим, что при гель-фильтрации препарата 1 РНП А это плечо отсутствует. Очевидно, что при гель-фильтрации у препарата, выделенного по методу 2, разрушаются все протеин-протеиновые, а также протеин-нуклеиновые взаимодействия. Можно сделать вывод, что в препарате 1 протеин-протеиновые взаимодействия, ответственные за образование димеров, и протеин-нуклеиновые взаимодействия более прочные, чем у препарата 2. Это можно объяснить тем, что препарат 1 проходит через стадию выделения при рН 2–3, в то время как при выделении препарата 2 значение рН не снижается ниже 7,5. Можно предположить, что при более низких значениях рН межмолекулярные взаимодействия в препарате 1 РНП А упрочняются настолько, что при взаимодействии с матрицей при гель-фильтрации они не нарушаются в отличие от препарата 2.

Из результатов гель-фильтрации и ультрацентрифугирования [5] очевидно, что самыми слабыми являются протеин-протеиновые взаимодействия, ответственные за ассоциацию узловых единиц. Образованные двумя С-концевыми участками 187–244 полипептидной цепи полиэдрина, высокомолекулярные ассоциаты разрушаются в первую очередь с образованием узловой единицы. Следующими разрушаются, не без участия щелочной протеазы полиэдров [3], протеин-протеиновые взаимодействия, образованные этими же участками между шестью плечами внутри узловой единицы. При этом образуются димеры полипептидной цепи (одно плечо). Димеры, образованные протеин-протеиновыми взаимодействиями среднего участка полипептидной цепи 92–121 [3], разрушаются в последнюю очередь. Очевидно, что хотя димеры и узловые единицы образованы протеин-протеиновыми взаимодействиями, природа их различна. Взаимодействия средних участков более прочные, чем С-концевых. Это предполагается из особенностей участков аминокислотных последовательностей. В димерах РНП-комплексов одновременно разрушаются протеин-протеиновые взаимодействия средних участков и протеин-нуклеиновые, образованные N-концевым участком полипептидной цепи

(1–91). В результате ступенчатого разрушения физических связей протеин-протеиновых и протеин-нуклеиновых ассоциатов реализуются малые РНК.

Из изложенных выше данных можно представить происходящие в клетке на поздней стадии инфекции процессы ассоциации полиэдрина и сборки полиэдра и предположить роль малых РНК (РНП) в этих процессах. На рис. 3 представлены стадии этого процесса. Полипептидная цепь на рис. 3 изображена в масштабе, где в каждом изгибе расположен аминокислотный остаток Pro: 15 остатков в положениях 1, 7, 58, 62, 79, 107, 125, 128, 148, 157, 178, 205, 234, 237, 242. После схождения полипептидной цепи полиэдрина с полисом в цитоплазме образуются димеры («плечи») за счет центрального участка полипептидной цепи (обозначен синим цветом), ответственного за образование димеров [3]. Полипептидные цепи димеров частично расщепляются по связи Asn121-Ala122 цитоплазматической протеазой с образованием димеров р14 [1]. Плечи собираются в трех-плечевые единицы за счет С-концевых участков полипептидной цепи (также отмечен синим цветом), ответственных за образование 13S-субъединицы. Укороченные димеры и трех-плечевые единицы мигрируют в ядро. Далее процесс формирования полиэдров предполагается на основании проведенных исследований [2] по диссоциации полиэдров при рН 10,5. В ядре трех-плечевые единицы собираются в шестиплечевые (этап 1), которые далее образуют монослойные агрегаты (этап 2). К свободным плечам монослойных агрегатов присоединяется малая РНК sncRNA-2 с Мм 21 кДа к «комплементарному» участку полипептидной цепи 75–95 [1] (отмечен красной точкой в узловых единицах). Беря за основу, что РНП-комплекс А (19S-компонент) составляет 20% от массы узловых единиц [3], можно рассчитать, что приблизительно на каждые десять узловых единиц приходится один комплекс РНП А. Параллельно в ядре к участку 26–45 (обозначен красным цветом) каждой полипептидной цепи димера р14 присоединяется малая РНК sncRNA-1 с Мм 17 кДа, образуя РНП В. Далее РНП В присоединяется к плечам узловых единиц монослойных агрегатов, меченых sncRNA-2, через протеин-протеиновые взаимодействия центрального участка полипептидной цепи р14 с С-концевым участком полипептидной цепи плеча полиэдрина. Монослойные агрегаты полиэдрина соединяются через взаимодействия С-концевых участков полипептидной цепи свободных плеч и допол-

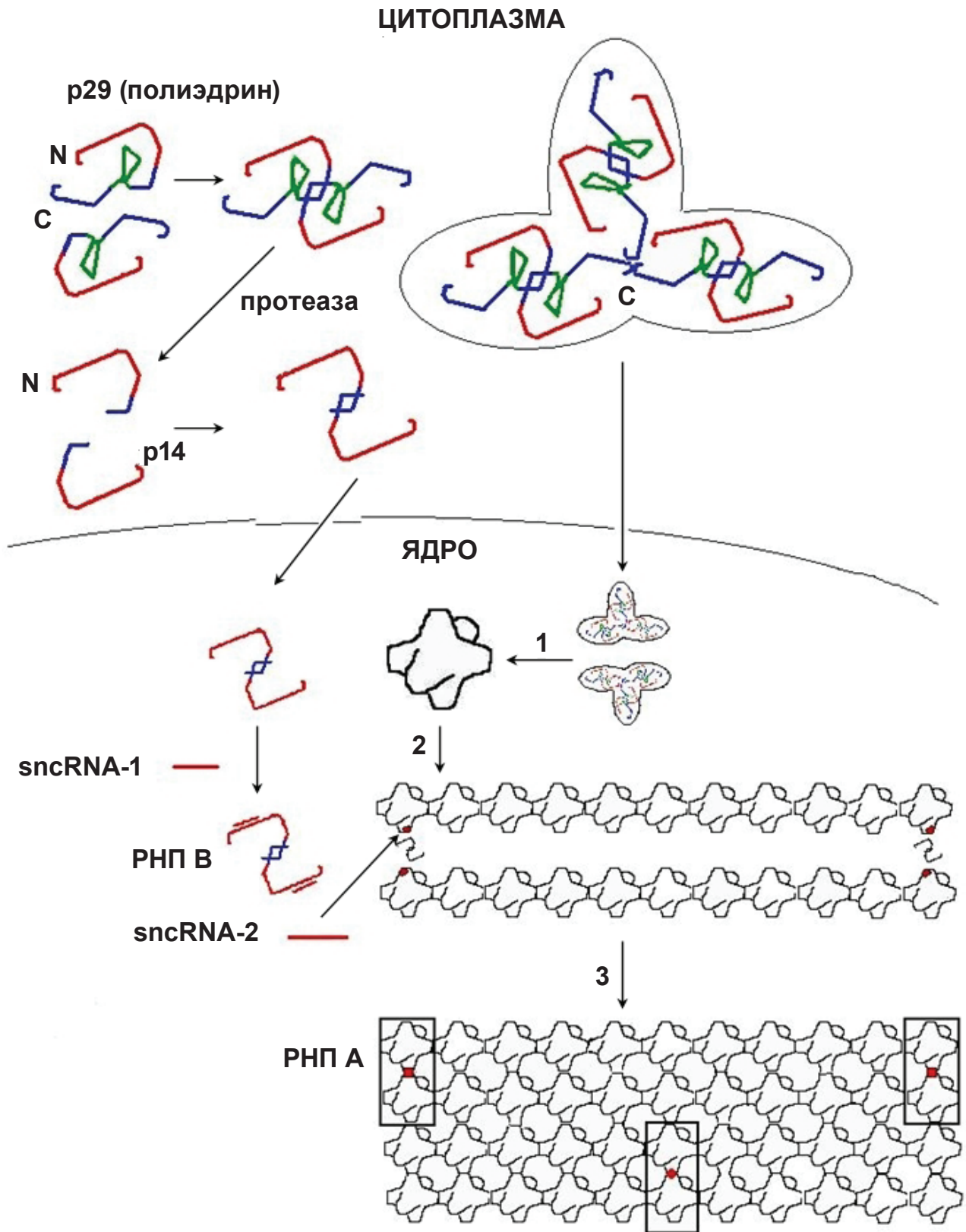


Рис. 3. Гипотетическая модель процессинга и ассоциации полиэдрина в цитоплазме и образования РНП В и РНП А при формировании полиэдра в ядре

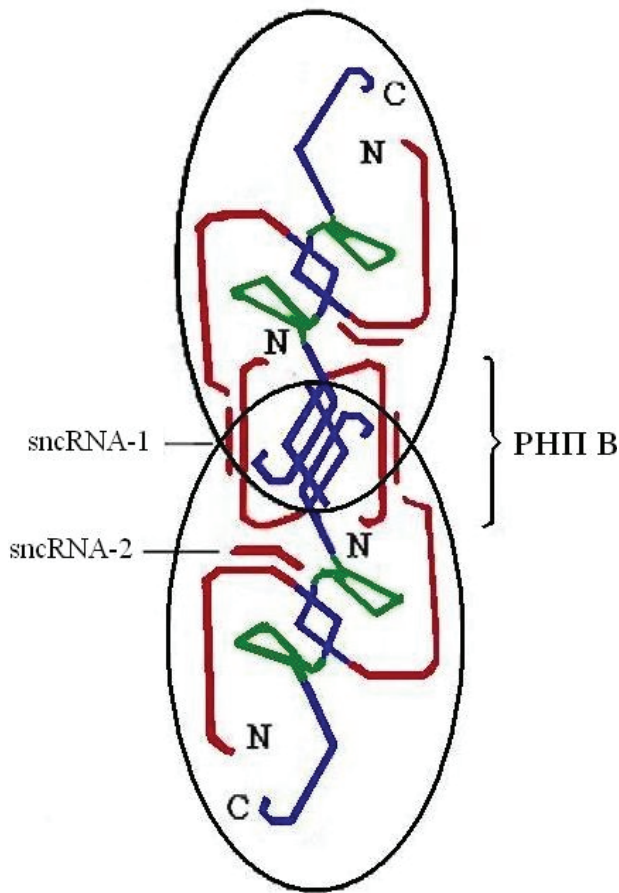


Рис. 4. Узел сшивки с помощью РНП В двух плеч узловых единиц РНП А, меченых sncRNA

нительно «сшиваются» РНП В, образуя кубическую кристаллическую решетку полиэдров (этап 3). Из представленной модели формирования полиэдра очевидно, что РНП А образуется в процессе формирования. На рис. 4 показан узел сшивки с помощью РНП В монослойных агрегатов.

Таким образом, мы предполагаем, что малые РНК (которые входят в состав РНП) выполняют структурную функцию при формировании полиэдров ВЯП *B. mori* на заключительной стадии инфекции. При формировании полиэдров в них включаются вирионы. В результате гибели гусениц при их разложении полиэдры выходят во внешнюю среду и поглощаются здоровыми гусеницами в процессе питания. Так происходит распространение инфекции. Возникает вопрос – а происходит ли передача только вирионов или передается также РНП А? Если да, то какова роль малых РНК в репликации вирусов в клетках первичной инфекции?

На основании вышеизложенного мы предлагаем гипотезу передачи РНП А или малых РНК в процессе распространения инфекции. При растворении полиэдров в условиях повышенного рН кишечника наряду с вирионами в результате разрушения наиболее слабых протеин-протеиновых взаимодействий между узловыми единицами высвобождается РНП А. В условиях раствора полиэдров в кишечнике РНП А не диссоциирует и вместе с нуклеокапсидом проникает в клетки первичной инфекции кишечника. При прохождении клеточной мембраны разрушаются протеин-протеиновые взаимодействия между шестью плечами узловой единицы РНП А и в клетку проникают димеры полиэдров, РНП В и РНП78 (комплекс димера полиэдров Мм 57 кДа с РНК Мм 21 кДа). При прохождении ядерной мембраны разрушаются протеин-нуклеиновые взаимодействия в РНП и протеин-протеиновые взаимодействия в димерах и в ядро наряду с ДНК проникают малые РНК. Какова же их функция? Это интригующий вопрос, для ответа на который необходимо проводить специальные исследования. Одно только можно предположить, что они выполняют функцию специфическую для ВЯП *B. mori*, поскольку в геноме ВЯП *A. californica* мы подобных РНК не обнаружили [6]. Из результатов исследования кристаллической структуры полиэдра ВЯП *A. californica* методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,2 Å можно видеть, что полиэдры также не содержат малых РНК [7].

СТЕХИОМЕТРИЯ РНП-КОМПЛЕКСУ ПОЛІЕДРІВ ВІРУСУ ЯДЕРНОГО ПОЛІЕДРОЗУ ТУТОВОГО ШОВКОПРЯДА *Bombyx mori*

Т. В. Ширіна, М. Т. Бобровська,
Э. А. Козлов

Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ;
e-mail: e.a.kozlov@imbg.org.ua

Методом гель-фільтрації на колонці Sephacryl S-300 показано, що присутній в поліедріх вірусу ядерного поліедрозу *Bombyx mori* комплекс РНП А має молекулярну масу (Мм) близько 700 кДа. Показано, що РНП А з Мм 788 кДа складається з двох 13S-асоціатів поліедрину з Мм 342 кДа, двох поліпептидів р14 з Мм 14 кДа, двох малих некодуєчих РНК з Мм 21 кДа та двох малих некодуєчих РНК з Мм 17 кДа. Запропоновано модель ут-

ворення комплексу РНП А зі складових його компонентів. Обговорюється роль комплексу в формуванні поліедра та його можлива роль у процесі інфекції.

Ключові слова: вірус ядерного поліедрозу, *Bombyx mori*, поліедрин, мала РНК, РНП-комплекс, гель-фільтрація.

**RNP-COMPLEX STOICHIOMETRY OF
Bombyx mori NUCLEAR POLYHEDROSIS
VIRUS POLYHEDRA**

*T. V. Shirina, M. T. Bobrovskaja,
E. A. Kozlov*

Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: e.a.kozlov@imbg.org.ua

S u m m a r y

By gel-filtration through Sephacryl S-300 it was shown that RNP A complex present in polyhedra of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus has molecular weight (M_w) about 700 kDa. It was shown that RNP A with M_w 788 kDa is composed of two polyhedrin 13S-associates with M_w 342 kDa, two p14 polypeptide with M_w 14 kDa, two 21 kDa small non-coded RNAs and two 17 kDa small non-coded RNAs. The model of RNP A formation from components making it is proposed. The

complex role in the course of polyhedron formation and its role in the course of infection are discussed.

Key words: nuclear polyhedrosis virus, *Bombyx mori*, polyhedrin, small RNA, RNP-complex, gel-filtration.

1. *Ширина Т. В., Бобровская М. Т., Козлов Э. А.* // Укр. біохім. журн. — 2010. — **82**, № 6. — С. 87–92.
2. *Harrap K. A.* // Virology. — 1972. — **50**, N 1. — P. 114–123.
3. *Kozlov E. A., Levitina T. L., Gusak N. M.* // Current Topics Microbiol. And Immunol. — 1986. — **131**. — P. 135–164.
4. *Scharnhorst D. V., Weaver R. P.* // Virology. — 1980. — **102**, N 3. — P. 468–472.
5. *Козлов Э. А., Ниязова Н., Бобровская М. Т., Ширина Т. В.* // Биополимеры и клетка. — 2006. — **22**, № 3. — С. 192–200.
6. *Ширина Т. В., Бобровская М. Т., Козлов Э. А.* // Укр. біохім. журн. — 2011. — **83**, № 4. — С. 41–49.
7. *Coulibaly F., Chiu E., Gutmann S. et al.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2009. — **106**, N 52. — P. 22205–22210.

Отримано 07.07.2011