

## СТРУКТУРА И СВОЙСТВА НАНОКОМПЛЕКСА

## «ДНК – БЕЛОК ОБОЛОЧКИ ФИТОВИРУСА»

**С**войства белков оболочки (БО) и капсидов фитовирусов позволяют использовать их в качестве матриц для создания новых материалов, вакцин и для адресной доставки биологически активных композиций в клетки животных и растений. Характерная особенность БО, из которых состоят капсиды, – их способность к самоорганизации в пространственно упорядоченные структуры и к селективной упаковке материала.

Капсиды представляют собой регулярные симметричные трехмерные структуры, имеющие достаточно малые размеры (от десятков до нескольких сотен нанометров), которые можно получать в большом количестве. Следует особо отметить, что капсиды вирионов можно подвергать как генетическим, так и химическим модификациям. Капсиды фитовирусов – абсолютно биобезопасный материал, так как растительные вирусы не патогенны для человека и животных. Это делает БО вирусов растений перспективным материалом для использования в бионанотехнологиях.

Известно, что БО спирального фитовируса, типичного представителя потексвирусов – Х-вируса картофеля (ХВК) (рис.1), взаимодействует с вирионной рибонуклеиновой кислотой (РНК) с образованием наночастиц с вирионной структурой [1]. В статье изложены результаты изучения возможности образования дезоксирибонуклеопротеидных комплексов

(ДНП) при инкубации белка оболочки ХВК с ДНК, приводятся результаты исследования структуры и свойств ДНП-частиц. Следует отметить, что ранее уже предпринимались попытки упаковки двухцепочечной ДНК в БО родственного потексвируса – вируса мозаики папайи, однако структура и свойства таких частиц не были исследованы [2].

Чтобы исследовать возможность упаковки ДНК в БО ХВК, БО инкубировались с молекулами ДНК со случайной последовательностью и различной длины (от 500 до 5000 п.н.). Полученные комплексы анализировались методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) (рис.2).

На микрофотографии видно, что ДНП представляют собой извитые частицы с ярко выраженной структурой, неоднородные по ширине и высоте. Морфология таких частиц заметно отличается от морфологии вирионов ХВК (см. рис.1). По данным АСМ было составлено распределение частиц ДНП по длинам. Оказалось, что максимум этого распределения соответствует средней длине свободной В-формы использованной ДНК. Из этого можно сделать вывод, что организация комплекса БО и ДНК в составе ДНП не соответствует нуклеосомной, иначе длина ДНП была бы меньше, чем у свободной ДНК. В то же время средние высоты ДНК и ДНП значительно различаются: средняя высота ДНП – 4 нм (см. рис.2), а высота свободной ДНК – 1 нм (рис.3).

Чтобы выяснить, образует ли БО ХВК при взаимодействии с ДНК регулярную спиральную структуру, аналогичную вирионной, полученные ДНП обрабатывались трипсином. Такая обработка позволяет выявить различия между БО в свободном состоянии и находящимся в составе белковой спирали

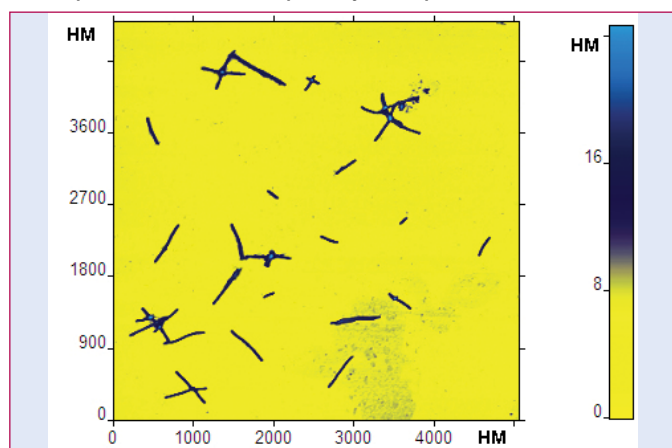
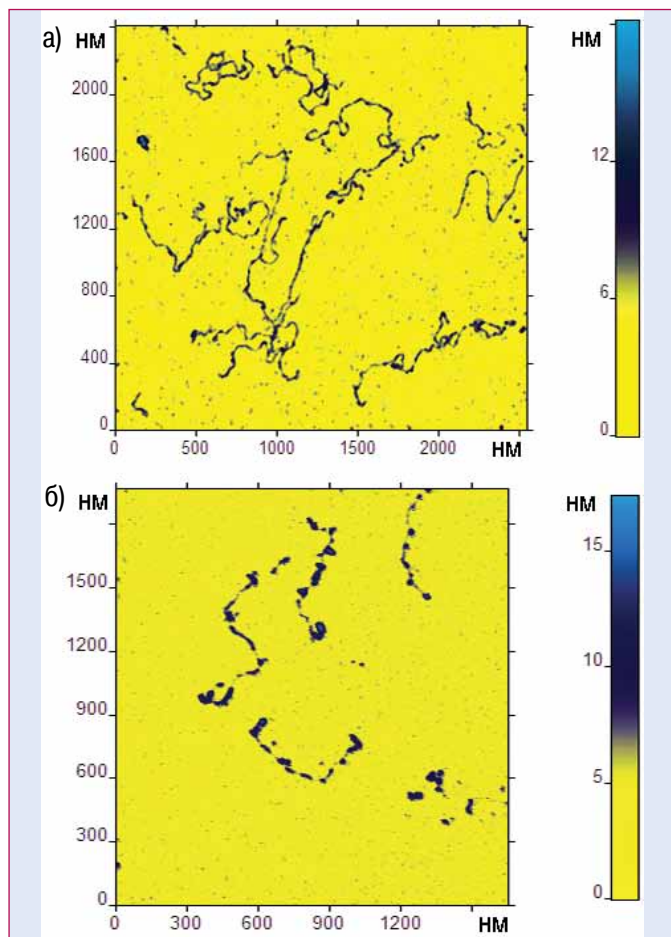


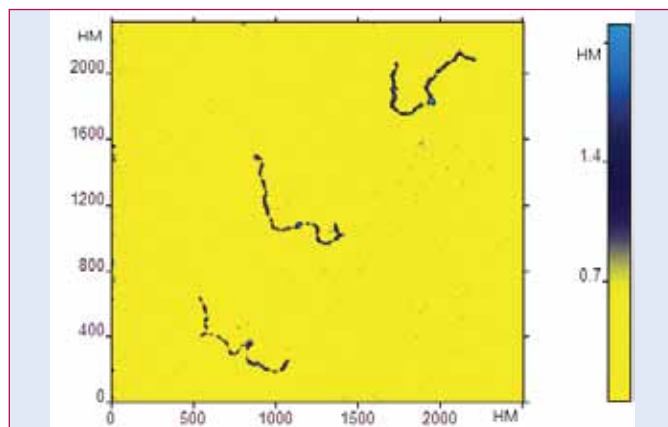
Рис.1 Атомно-силовое изображение Х-вируса картофеля



**Рис.2** Комплексы ДНП, полученные при инкубации ДНК с БО ХВК (весовое соотношение 1:10): а) рН 6.0; б) рН 8.0

вирусом А [3]. БО в составе вирусной частицы относительно устойчив к действию трипсина, при этом отщепляется лишь N-концевой пептид [4]. Обработка не собранных в вирусную спираль отдельных молекул БО приводит к образованию нескольких коротких пептидов. Этот подход был использован для изучения состояния БО в составе ДНП. После обработки ДНП трипсином обнаружить БО при электрофорезе в полиакриламидном геле в стандартных условиях не удалось, т.е. БО в составе ДНП расщепился на несколько коротких пептидов. Таким образом, можно сделать вывод о том, что структура БО в ДНП не соответствует структуре БО в нативном вирионе.

Для исследования структуры комплексов, образованных ДНК и БО ХВК, ДНП обрабатывались различными нуклеазами. Были использованы неспецифические нуклеазы, расщепляющие ДНК. После обработки ДНП нуклеазами обнаружить фрагменты ДНП или ДНК не удалось. Это свидетельствует о том, что ДНК в составе ДНП доступна действию нуклеаз и подверглась полному гидролизу, что в свою очередь указывает на неупорядоченность структуры БО в составе ДНП. При обработке ДНП специфическими нуклеазами (рестриктазами) ДНК в составе ДНП также расщеплялась. Известно, что использованные в работе рестриктазы проявляют фермента-



**Рис.3** Атомно-силовое изображение ДНК

тивную активность, связываясь с большой бороздкой ДНК [5]. Таким образом, можно предположить, что БО в составе ДНП не образует оболочку вокруг нуклеиновой кислоты, а связывается с малой бороздкой ДНК.

На основании полученных данных можно утверждать, что БО ХВК при инкубации с ДНК создает комплексы, принципиально отличающиеся по морфологии от вирионов ХВК и наночастиц, образованных РНК и вирусным белком.

Изучение структуры и свойств подобных наночастиц является необходимым этапом в создании сложных многофункциональных бионаноматериалов и в развитии молекулярной медицины.

Авторы выражают благодарность за поддержку Роснауке и Рособразованию (госконтракты: 02.512.11.2279, 02.513.11.3448, П255, П717, П973), программе УМНИК (проект № 10111, темы 14, 24), НАТО (Наука для мира) – СВН. NR.NRSFP 983204, Корейскому институту науки и технологий (проект KIST-MSU).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Karpova O.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Sheval E.V., Kiselyova O.I., Poljakov V.Y., Yaminsky I.V., Rodionova N.P., Atabekov J.G (2006) Potato virus X RNA-mediated assembly of single-tailed ternary 'coat protein-RNA-movement protein' complexes. *J Gen Virol.* 87(9):2731–2740.
2. Erickson J.W., Bancroft J.B. (1980) The assembly of papaya mosaic virus coat protein with DNA. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 40, p. 293–300.
3. Rodionova N., Karpova O., Kozlovsky S., Zayakina O., Arkhipenko M., Atabekov J. (2003) Linear remodeling of helical virus by movement protein binding. – *J. Mol. Biol.*, 333, № 3, p. 565–572.
4. Koenig R., Tremaine J.H., Shepard J.F. (1978) In situ degradation of the protein chain of potato virus X at the N and C-termini. – *J. Gen. Virol.* 38, p. 2 329–337.
5. Branden C, Tooze J. (1999) *Introduction to Protein Structure*, 2nd, New York: Garland Publishing.