

На правах рукописи

Мартынова Елена Уразовна

**ИЗУЧЕНИЕ СТРАТЕГИИ ЭКСПРЕССИИ
ДЕНСОВИРУСА РЫЖЕГО ТАРАКАНА *BLATTELLA*
*GERMANICA***

Специальность 03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2011

Работа выполнена в лаборатории генетических основ биоразнообразия
Учреждения Российской академии наук Института общей генетики им.
Н.И. Вавилова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Муха Дмитрий Владимирович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Засухина Галина Дмитриевна
Институт общей генетики
им. Н.И.Вавилова РАН

кандидат биологических наук
Генинг Леонид Владимирович
Институт молекулярной генетики РАН

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биологии гена РАН

Защита состоится 20 октября 2011 года в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 при Учреждении Российской академии наук Институте общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, ул. Губкина, д. 3.
Тел.: (499) 135-62-13, Факс: (499) 132-89-62
E-mail: iogen@vigg.ru, aspirantura@vigg.ru;
Адрес в Интернете: www.vigg.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан 6 сентября 2011 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Денсовирусы, или вирусы денсонуклеоза, относятся к подсемейству *Densovirinae* семейства *Parvoviridae*. Представители данного семейства характеризуются одноцепочечным линейным ДНК-геномом, заключенным в икосаэдрический капсид размером 18 – 26 нм, не имеющий липопротеиновой оболочки. Отличительной особенностью генома является наличие на его концах палиндромных последовательностей, способных образовывать стабильные вторичные структуры. Вирусы, относящиеся к подсемейству *Densovirinae*, инфицируют клетки беспозвоночных, в основном насекомых и ракообразных, и в большинстве случаев вызывают летальные заболевания организма-хозяина.

Несмотря на то, что впервые симптомы заболевания, вызываемого денсовирусом, и сам патоген были описаны еще в 60-х гг. прошлого века (Meynadier et al., 1964; Amargier et al., 1965; Vago et al., 1966), эта группа вирусов до настоящего времени остается сравнительно малоизученной. К настоящему времени известно уже около 30 различных денсовирусов (Yang et al., 2008), однако их исследования носят в основном описательный (описание симптомов вызываемого заболевания, определение нуклеотидной последовательности и биоинформатический анализ генома) или узкоспециализированный характер. При этом практически не изученными до последнего времени оставались такие важные аспекты жизненного цикла вирусов как механизмы проникновения и выхода из клетки-хозяина, механизмы реализации генетической информации вируса (стратегии экспрессии генома) и ее регуляция, роль вирусных белков и систем клетки-хозяина в жизненном цикле вируса, в конечном итоге определяющие характер патогенеза. Необходимо отметить также, что отсутствие достаточного уровня знаний о биологии денсовирусов, а также значительное разнообразие и разнородность данной группы вирусов затрудняют создание системы классификации подсемейства *Densovirinae* и приводят к постоянному пересмотру уже существующих.

Углубление знаний об особенностях жизненного цикла данной группы вирусов имеет не только чисто научное значение, но и высокую практическую значимость. С одной стороны денсовирусы являются природными патогенами таких хозяйственно ценных видов беспозвоночных как тутовый шелкопряд (*Bombyx mori*) и различные виды креветок рода *Penaeus*. Периодически возникающие эпизоотии приносят значительный ущерб сельскому хозяйству многих азиатских стран. С другой стороны, значительное количество насекомых-хозяев денсовирусов являются вредителями сельского хозяйства (личинки *S. fusca*, *G. mellonella*) либо синантропными паразитами (*P. fuliginosa*, *B. germanica*). Следует особо подчеркнуть, что денсовирусы поражают также различные виды комаров, в том числе из родов

Aedes и *Anopheles* (Afanasiev et al., 1991; Boublik et al., 1994; Ren et al., 2008), имеющих важное медицинское значение как переносчики различных тяжелых заболеваний человека, таких как малярия, желтая лихорадка, лихорадка Денге. В природных популяциях денсовирусы играют значительную роль в поддержании и регуляции численности этих насекомых. Это обстоятельство, а также ряд особенностей самих денсовирусов дает возможность широко использовать эту группу вирусов в качестве новаторских биопестицидов направленного действия (Carlson et al., 2006; Fediere, 2000).

Необходимо отметить и другие направления практического использования денсовирусов, а именно, создание на их основе векторов для эффективной трансформации и генетических манипуляций с насекомыми, а также экспрессионных систем, подобных бакуловирусным, для продукции чужеродных белков в клетках насекомых (Afanasiev & Carlson, 2000). Помимо этого простота и регулярность организации капсидов денсовирусов, их небольшие размеры и неспособность инфицировать клетки млекопитающих делает данную группу вирусов перспективной для разработки на их основе биологических носителей для направленной доставки лекарственных средств или генетического материала в целевые клетки.

Денсовирус рыжего таракана *Blattella germanica* (BgDNV) является одним из представителей подсемейства *Densovirinae*. BgDNV был впервые обнаружен в 2000 г. Д. В. Муха и К. Шалом. В ходе последующей работы была определена нуклеотидная последовательность его генома, проведен ее биоинформатический анализ и предсказаны предполагаемые открытые рамки считывания и регуляторные элементы. Кроме того, методом электронной микроскопии были описаны цитопатологические эффекты и тканеспецифичность вирусной инфекции (Муха, Шал, 2003; Mukha et al., 2006). Особенности же стратегии экспрессии генома денсовируса рыжего таракана, являющейся одним из ключевых этапов в жизненном цикле вируса, до настоящего исследования оставались неизвестными.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение стратегии экспрессии генома денсовируса рыжего таракана *Blattella germanica* (BgDNV).

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Изучение динамики развития вирусной инфекции BgDNV в культуре клеток рыжего таракана BGE-2.
2. Изучение характера экспрессии генома BgDNV на уровне транскрипции: определение количества транскриптов, характеристика альтернативных форм сплайсинга, определение сайтов начала и окончания транскрипции.
3. Изучение характера экспрессии генома BgDNV на уровне белковых продуктов.

4. Определение внутриклеточной локализации белковых продуктов денсовируса рыжего таракана *Blattella germanica*.

Научная новизна результатов исследования

В настоящей работе впервые для денсовирусов продемонстрирован характер временной динамики транскрипции и репликации вирусного генома и показано стабильное поддержание VgDNV в культуре клеток рыжего таракана BGE-2.

Впервые описана стратегия экспрессии генома VgDNV на уровне транскрипции. Получены данные о точках начала и окончания транскрипции, выявлены и охарактеризованы мРНК как для капсидных, так и для регуляторных белков и показано участие альтернативного сплайсинга в образовании транскриптов для обеих групп белков.

Впервые для денсовирусов охарактеризована дополнительная группа транскриптов для неструктурных белков, транскрибирующихся с того же промотора, что и основная группа, но заканчивающихся в области расположения открытых рамок считывания для капсидных белков. Описано несколько вариантов транскриптов, имеющих большую (около 1600 нт.) область перекрывания с транскриптами для капсидных белков. Обнаружение данной группы вирусных мРНК позволяет предполагать возможность участия механизмов РНК-интерференции в антивирусной защите клетки насекомого-хозяина.

Получен высокоочищенный препарат вирусных частиц VgDNV и определен белковый состав капсида данного вируса. Показано, что экспрессия белков капсида имеет ряд уникальных особенностей, не описанных до сих пор ни для одного из денсовирусов.

Впервые для денсовирусов показано наличие посттрансляционной модификации капсидных белков убиквитином.

Методом белкового иммуноблоттинга выявлены три неструктурных белка денсовируса рыжего таракана. Показано соответствие описанных белков открытым рамкам считывания, выявляемым методами *in silico*.

В данной работе была впервые определена внутриклеточная локализация как структурных, так и регуляторных белков денсовируса рыжего таракана в инфицированной пересеваемой культуре клеток.

Полученные в процессе работы результаты демонстрируют наличие уникальных особенностей, характеризующих денсовирус рыжего таракана, и позволяют предположить, что VgDNV может принадлежать к отдельному роду внутри своего подсемейства.

Научно-практическая значимость работы

Данные, полученные в рамках настоящей работы, расширяют представления о стратегиях реализации генетической информации вирусов подсемейства *Densovirinae* и о биологии денсовирусов в целом. Полученные результаты могут быть использованы при чтении

лекций по вирусологии и молекулярной биологии в высших учебных заведениях биологического, медицинского и сельскохозяйственного профиля. Кроме того, полученные результаты могут являться основой для последующей разработки биологических способов борьбы с рыжим тараканом на основе VgDNV, а также создания на его базе инструментов для изучения методами генетической инженерии молекулярно-генетических процессов в клетках рыжего таракана. Экспериментальные данные, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, о белковом составе капсида и природе структурных белков VgDNV являются важными для создания системы *in vitro* сборки вирусных частиц, что, в свою очередь, служит важным шагом для разработки на основе денсовируса рыжего таракана молекулярных носителей, пригодных для использования в биомедицинской практике.

Апробация работы

Основные положения и результаты работы были представлены на следующих российских и международных конференциях: на 4 съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008г); на XX Международном генетическом конгрессе (Берлин, 2008г); на I Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Донецк, 2009 г); на I Всероссийской Научной Конференции, посвященной 125-летию биологических исследований в Томском Государственном Университете «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии» (Томск, 2010г); на IV Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология клетки» (Москва-Звенигород, 2010г).

Декларация личного участия автора

В диссертационной работе использованы экспериментальные и аналитические материалы, полученные лично автором, суммарный вклад составляет 85 %. Исследование стратегии экспрессии вирусного генома на уровне РНК было выполнено совместно с Т.В. Капелинской, изучение внутриклеточной локализации белков совместно с Д.В.Муха. Определение нуклеотидных последовательностей плазмид осуществлялось А.Л.Королевым. Масс-спектрометрический анализ белков проведен в НИИФХМ РАМН (фирма «Пинни»).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, включенных в перечень научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на _____ страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: общая характеристика работы, обзор литературы, материалы

и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Диссертация содержит _____ рисунков. Список литературы содержит _____ ссылок.

Содержание работы

Материалы и методы

Результаты, представленные в работе, получены с использованием линии эмбриональных клеток рыжего таракана BGE-2 (любезно предоставлена доктором Т. Курти, Университет штата Миннесота, США). Клетки заражали денсовирусом путем добавления суспензии, содержащей вирусные частицы, в культуральную среду. Пересевы клеток проводились с интервалами от 10 дней до двух недель в зависимости от времени достижения необходимой концентрации (сплошного газона).

Для получения препаратов вирусных частиц были использованы лабораторные линии тараканов, исходно не зараженные денсовирусом: Normal и White. Тараканов заражали либо перорально, добавлением вирусосодержащей суспензии в воду для питья, либо инъецируя ее под кутикулу.

Тотальную ДНК из зараженных клеток и тараканов выделяли фенольным методом (Маниатис и др., 1984), наличие вирусной инфекции детектировали по присутствию в препарате дополнительной полосы вирусной геномной ДНК размером около 5 т.п.о., формирующейся в результате отжига инкапсидированных «+» и «-» цепей вирусного генома в условиях повышенной концентрации солей.

Выделение тотальной РНК, РНК-электрофорез, Northern-блоттинг, получение радиоактивно-меченных зондов, RT-PCR, RACE проводили по стандартным методикам или с использованием коммерческих наборов, согласно рекомендациям фирм-изготовителей. Для Northern-блоттинга было использовано 7 ДНК-зондов к различным участкам генома VgDENV, а также РНК-зонд, расположение которых относительно открытых рамок считывания VgDENV приведено на рис. 1. Используемые в работе праймеры для RT-PCR и RACE также представлены на рис. 1. После ПЦР-амплификаций необходимые полосы вырезали из геля, клонировали в вектор pGEM-T/T-Easy (Promega), вставки секвенировали и сравнивали полученные последовательности с базами данных с использованием программы BLAST.

Очистку вирусных частиц из зараженных тараканов проводили методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы или CsCl. Наличие вирусных частиц в отобранных фракциях проверяли путем выделения вирусной ДНК и SDS-ПААГ электрофореза. SDS-ПААГ электрофорез проводили согласно методу Лэммли (Laemmli, 1970), гели окрашивали Coomassie R250. Western-блоттинг для детекции капсидных и регуляторных белков и убиквитинирования белка VP2 проводили по стандартной методике, белки предварительно переносили на PVDF-мембраны методом полусухого электроблоттинга. В

работе были использованы поликлональные кроличьи антитела (заказаны в фирме Genemed Synthesis, San Antonio, USA) к эпитомам, соответствующим ORF3 (0.22 мг/мл, 1:500), ORF4 (0.33 мг/мл, 1:1000) и ORF5 (0.5 мг/мл, 1:1500) (регуляторные белки), а также ORF2 (VP K1, 0.34 мг/мл, 1:500) и С-концевому участку ORF1, являющемуся общим для всех капсидных белков (VP K2, 0.5 мг/мл, 1:10000) и мышинные антитела к убиквитину (P4G7, фирма Covance, New Jersey, USA, 1:850). Эпитопы были подобраны методом *in silico* с использованием программного обеспечения на сайте (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input).

Масс-спектрометрический анализ проводили в НИИФХМ РАМН (фирма «Пинни»). Идентификацию белков BgDNV проводили по методу пептидного фингерпринтинга при помощи программы Mascot Search (www.matrixscience.com) в белковых базах данных NCBI. Значимыми считали совпадения, со значением $p < 0,05$ (score > 83).

Внутриклеточную локализацию белков VP1 и NS1 проводили методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием указанных выше антител (VP K1, 1:1000 и к ORF3, 1:500) и вторичных антител, конъюгированных с FITC (1:200) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, USA) по стандартной методике. Ядра окрашивали DAPI. Визуализацию проводили с использованием конфокального микроскопа LSM 510Meta (Carl Zeiss).

Номер последовательности нуклеотидов BgDNV в GenBank [AY189948](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclom/AY189948).

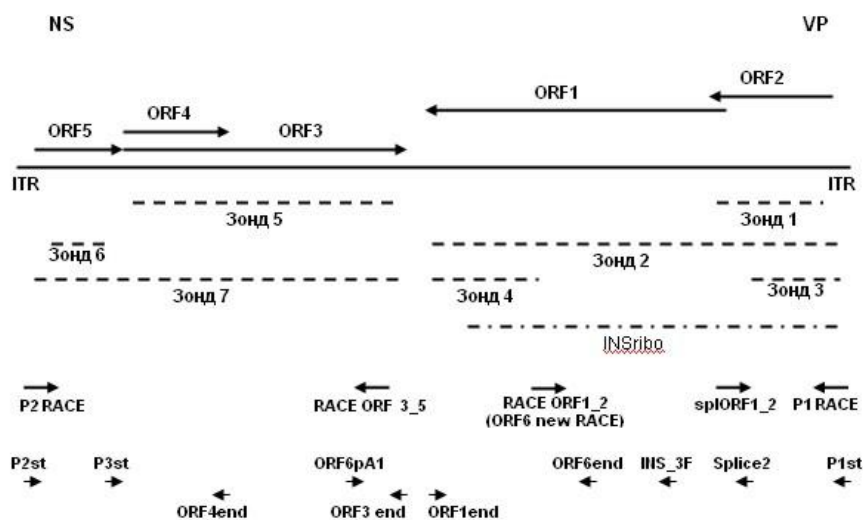


Рисунок 1. Схема расположения зондов для Northern-блот гибридизации и праймеров для RT-PCR и RACE, использованных в работе. VP – капсидные белки, NS – регуляторные белки. ORF 1-5 – соответствующие открытые рамки считывания. ITR – концевые инвертированные повторы. Зонды для Northern-блот гибридизации обозначены пунктиром, одноцепочечный РНК-зонд обозначен пунктиром с точками. Праймеры, использовавшиеся только для RACE, обозначены длинными стрелками, праймеры для RT-PCR – короткими стрелками (праймеры splice2, ORF6 end, ORF6pA1 также использовались для RACE).

Результаты и обсуждение

Динамика развития вирусной инфекции BgDNV в культуре клеток BGE-2

Для исследования динамики развития вирусной инфекции часть суспензии с растущими клетками BGE-2 отбирали через 3 ч, 1 сутки, 5 суток и 7 суток (нулевой пассаж, V0) после заражения и далее при каждом пересеве и из зараженных клеток выделяли тотальную ДНК. Всего с момента заражения было осуществлено 25 пересевов (пассажи V0 – V24). Данные для пассажей V1-V13, V16, V22 и V24 представлены на рис. 2.

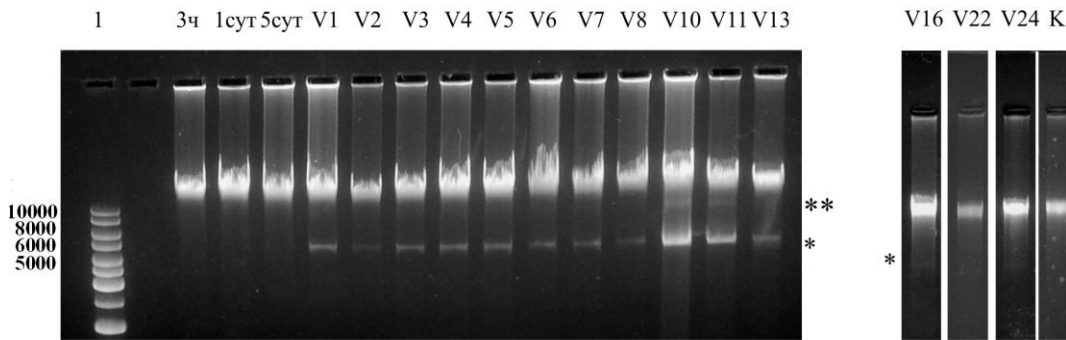


Рисунок 2. Электрофореграмма тотальной ДНК из культуры клеток BGE-2, инфицированной BgDNV. Дорожка 1 – молекулярный маркер, здесь и далее размеры даны в п.о. Над дорожками сверху указано время после заражения денсовирусом (V1-V24 – соответствующие пассажи). К – клетки BGE-2, не инфицированные денсовирусом. Звездочкой обозначена полоса размером около 5 т.п.н., соответствующая геномной ДНК BgDNV. Двумя звездочками – репликативная димерная форма вируса.

На рис. 2 можно видеть, что вирусная ДНК в виде дополнительной полосы размером приблизительно 5 т.п.н. четко выявляется на уровне первого пассажа (V1, 25 суток после заражения). В течение последующих 13 пассажей наблюдается стабильная репликация вирусного генома без значительного изменения количества вирусной ДНК относительно геномной. Вирусная ДНК в препаратах геномной ДНК клеток сохранялась вплоть до 24 пассажа после заражения (V24, 535 дней).

Полученные результаты говорят о том, что пересеваемая культура клеток BGE-2 может быть использована для поддержания денсовируса BgDNV в лабораторных условиях.

Для изучения временного характера транскрипции генома BgDNV тотальную РНК выделяли из клеток BGE-2 отобранных на уровне 3 ч, 1 суток, 5 суток, 7 суток, 25 суток и далее до десятого пассажа (V10) включительно после инфицирования. Для выявления транскриптов, относящихся к структурным белкам, использовали зонд ко всей правой части генома (зонд 2); для выявления транскриптов, относящихся к неструктурным белкам, использовали зонд ко всей левой части генома (зонд 7) (рис. 1).

На основе результатов Northern-блот гибридизации нами была определена временная динамика транскрипции вирусных мРНК. На рис. 3а можно видеть, что экспрессия генов неструктурных белков начинается уже через 3 часа после заражения с постепенным небольшим увеличением количества мРНК к 25 суткам и остается стабильной вплоть до конца наблюдений

(V10). Гены вирусных капсидных белков (рис. 3б), начинают экспрессироваться с запозданием: соответствующая мРНК появляется, начиная с 5 суток после заражения. Их экспрессия заметно возрастает к 25 суткам и остается стабильной вплоть до 10 пассажа. Отметим, что экспрессия генов белков капсида начинается несколько раньше, чем интенсивное образование и накопление ДНК вируса (рис. 2), и в дальнейшем образование транскриптов вирусных капсидных белков идет параллельно с накоплением вирусной ДНК до 10 пассажа.

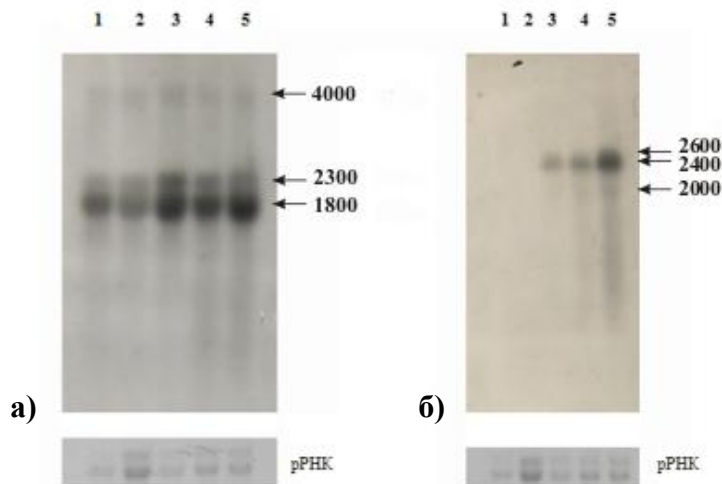


Рисунок 3. Northern-блот гибридизация РНК, выделенной из клеток BGE-2 через 3 ч (дорожка 1), 1 сут (дорожка 2), 5 сут (дорожка 3), 7 сут (дорожка 4) и 25 сут, первый пассаж (дорожка 5) после заражения. а) гибридизация с зондом к ORF неструктурных белков и б) гибридизация с зондом к ORF белков капсида. Для каждой дорожки на а) и б) внизу приведены сравнительные количества рРНК. Размеры детектированных фрагментов даны в нуклеотидах.

Полученные нами данные согласуются с теми функциями, которые

предложены для белков, кодируемых соответствующими мРНК, в жизненном цикле парвовирусов (Berns, 1990; Bergoin & Tijssen, 2000). Неструктурные белки необходимы на самых ранних стадиях инфекции до начала репликации вирусного генома (Abd-Alla et al., 2004). В частности, белок NS1 является инициаторным белком репликации (Cotmore & Tattersall, 1996) и способен трансаktivировать как свой собственный промотор, так и промотор для структурных белков (Afanasiev et al., 1994; Doerig et al., 1988, 1990; Giraud et al., 1992; Lorson et al., 1996; Rhode, 1985). Можно предположить, что синтез и накопление NS1 способствует репликации ДНК BgDENV, приводит к активизации транскрипции мРНК для белков капсида и синтезу соответствующих белковых продуктов и сборке капсидов, что в свою очередь ведет к формированию зрелых дочерних вирусных частиц и накоплению значительного количества вирусной ДНК (рис. 2).

Таким образом, как можно заключить из представленных выше данных, в случае BgDENV имеется разделение появления двух групп транскриптов во времени. Можно выделить ранние (неструктурные) и поздние (капсидные) мРНК, как и соответственно ранние и поздние промоторы, с которых они транскрибируются.

Определение профиля транскрипции генов капсидных и регуляторных белков BgDENV

Для детального изучения мРНК, образующихся в ходе инфекции BgDENV, были использованы пробы к участкам вирусного генома, кодирующим капсидные белки: зонд 1

(4244–4989 нт.), зонд к 5'-концевому участку ORF 2, (зонд 3, 4642–5096 нт.) и зонд к 3'-концевому участку вирусного генома (зонд 4, 2564–3466 нт.). В случае регуляторных белков использовались зонд к ORF3 (зонд 5, 958–2505 нт.) и зонд к ORF5 (зонд 6, 346–901 нт.) (рис. 1).

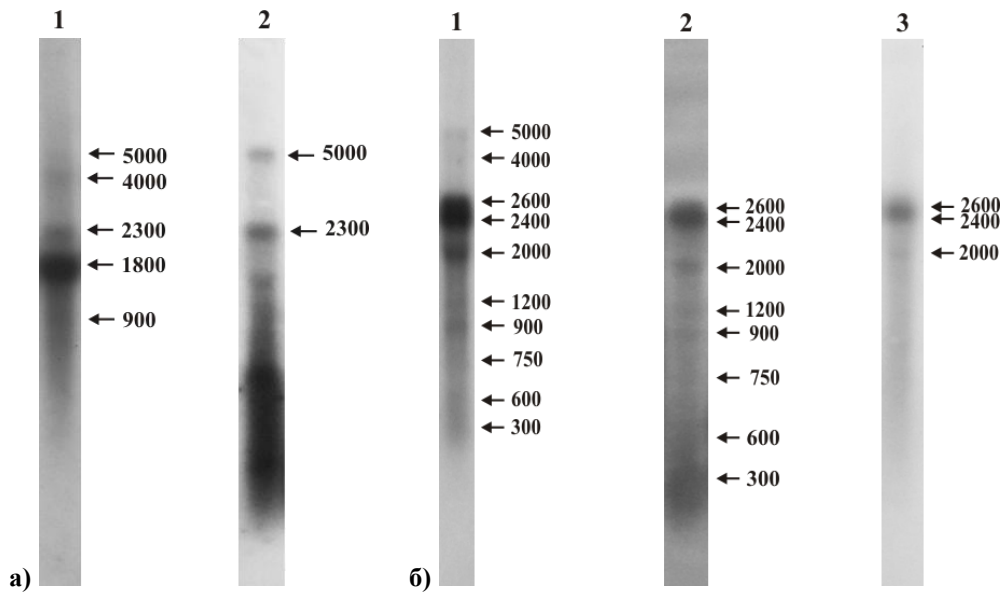


Рисунок 4. Northern-блот гибридизация тотальной РНК, выделенной из клеток BGE-2, инфицированных BgDNV. Гибридизация проводилась с зондами а) к ORF, кодирующим неструктурные белки: дорожка 1 – зонд 5; дорожка 2 – зонд 6; б) к ORF, кодирующим белки капсида: дорожка 1 – зонд 1; дорожка 2 – зонд 3; дорожка 3 – зонд 4. Стрелками обозначены идентифицированные транскрипты с указанием их приблизительных размеров в нуклеотидах.

Как можно видеть на рис. 4а, дорожка 1, РНК, соответствующая неструктурным белкам, транскрибируется в виде двух основных мРНК, размером около 2300 нт. и 1800 нт. и дополнительных минорных мРНК размером около 5000 нт., 4000 нт. и 900 нт., причем количественно наиболее представлен транскрипт размером 1800 нт. Гибридизация с зондом к ORF5 (рис. 4а, дорожка 2) выявила присутствие дополнительного транскрипта размером 5000 нт. и основного транскрипта размером 2300 нт. В случае мРНК, соответствующей капсидным вирусным белкам (рис. 4б, дорожка 1), гибридизуются два мажорных транскрипта размером приблизительно 2400 нт. и 2600 нт. Кроме того, дополнительно было выявлено семь минорных транскриптов размером около 5000 нт., 4000 нт. (аналогично ситуации в случае с NS транскриптами), 2000 нт., 1200 нт., 900 нт., 750 нт., 600 нт. и 300 нт., а также восьмой транскрипт размером около 1700 нт., выявляемый при более длительных сроках экспозиции. Гибридизация с зондом, соответствующим 5'-концевому участку ORF2 выявила присутствие всех описанных выше транскриптов, за исключением двух высокомолекулярных минорных транскриптов с размерами 5000 нт. и 4000 нт. (рис.4б, дорожка 2). В то же время гибридизация с зондом к 3'-концевому участку вирусного генома (рис. 4б, дорожка 3) кроме двух основных транскриптов (2400 нт и 2600 нт.) выявила только один дополнительный транскрипт размером 2000 нт. Необходимо отметить, что выявленный транскрипционный паттерн является уникальным для денсовирусов: наличие дополнительных высокомолекулярных минорных

транскриптов было описано в литературе только для *GmDNV* и *PstDNV*, но их природа не была изучена (Dhar et al., 2010; Gross et al., 1990; Gross and Tal., 2000); низкомолекулярные минорные транскрипты не были выявлены ни у одного из описанных к настоящему времени денсовирусов.

Построение транскрипционной карты VgDNV

Ранее методами биоинформатики для VgDNV было предсказано наличие одного промотора P1 (транскрипция начинается с 5096 нт.) и двух сигналов полиаденилирования для вирусных капсидных белков, и двух промоторов P2 (начало транскрипции – 240 нт.) и P3 (начало транскрипции – 823 нт.) и одного сигнала полиаденилирования для неструктурных белков (Mukha et al., 2006, в настоящей работе номера нуклеотидов даны для последовательности обратнo-комплементарной последовательности, представленной в указанной статье). Исходя из этих данных, можно было предполагать, что большое число транскриптов, выявляемых Northern-блот гибридизацией, связано с тем, что в экспрессии вирусного генома задействованы механизмы альтернативного сплайсинга. Для определения структуры транскриптов VgDNV был применен метод RT-PCR с использованием пар праймеров, соответствующих различным участкам вирусного генома (рис. 1).

При амплификации с парой праймеров P2st/ORF3 end (рис. 1), соответствующими началу и концу участка, кодирующего регуляторные белки, были получены три фрагмента, соответствующие кДНК VgDNV (обозначены стрелками на рис. 5, дорожки 1, 2), а также ряд неспецифических полос. Амплификация с парой праймеров P2st/ORF4 end (праймер ORF4end расположен в конце ORF4, рис. 1) привела к появлению двух специфических фрагментов (обозначены стрелками на рис. 5, дорожки 3, 4) и нескольких неспецифических полос. При этом согласно последовательности нуклеотидов генома VgDNV в каждом случае, в отсутствие сплайсинга, предполагалось образование только одного фрагмента размером 2259 п.о. и 1476 п.о. соответственно.

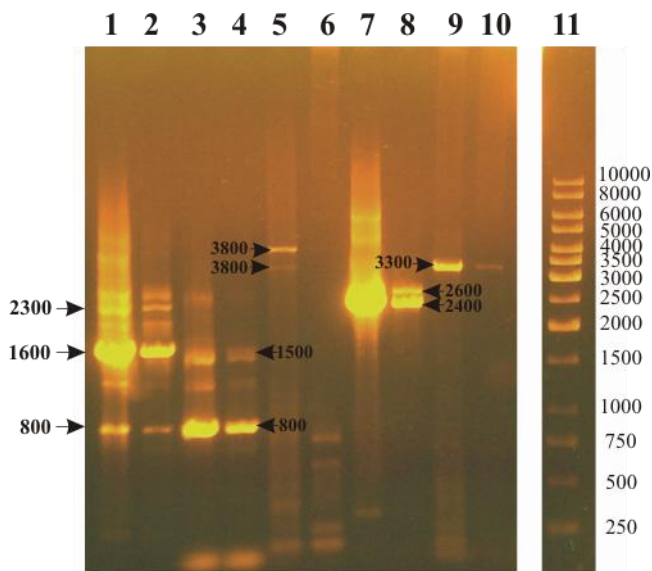


Рисунок 5. RT-PCR тотальной РНК из клеток **BGE-2**, зараженных **BgDNV**. Первая дорожка для каждой пары праймеров – РНК, выделенная из клеток на стадии **V4**, вторая дорожка – на стадии **V12**. Дорожки **1, 2** – амплификация с праймерами **P2st /ORF3 end**, дорожки **3, 4** – **P2st /ORF4 end**, дорожки **5, 6** – **P2st /ORF6 end**, дорожки **7, 8** – **P1st/ORF1 end**, дорожки **9, 10** – **P3st/ ORF6 end**. Дорожка **11**- молекулярный маркер. Размеры кДНК-фрагментов здесь и далее даны в парах оснований.

Клонирование и секвенирование кДНК-фрагментов показал, что при образовании мРНК для регуляторных белков имеет место явление сплайсинга (рис. 9). В одном случае (кДНК размером 1600/800 п.о., рис. 5, дорожки 1, 2/3,4) происходит вырезание 658 нт.: с 275 (за семь нуклеотидов перед AUG кодоном для ORF5) (**D1_NS**) по 932 (сразу после стоп-кодона для ORF5) (**A1_NS**) (рис. 6Б). При этом происходит полное удаление ORF5 с формированием мРНК, кодирующей практически полностью перекрывающиеся ORF3 и ORF4. Во втором случае (кДНК размером 800 п.о., рис. 5, дорожки 1, 2) происходит сплайсинг между 274 нт. (аналогично предыдущему) и 1705 нт. (**A1'_NS**), с вырезанием интрона размером 1430 нт. (рис. 6В). В результате сплайсинга образуется транскрипт, содержащий открытую рамку считывания размером 501 нт. (19,3 кДа), соответствующую 3'-концевой части ORF3 (**hpNStrunc**) (первый AUG-кодон находится на 2025 нт.). Интересно отметить, что **hpNStrunc** содержит один из доменов белка NS1 – домен SF3-хеликазы (рис. 13). кДНК размером 2300/1500 п.о. (рис. 5, дорожки 1,2/3,4) соответствует несплайсированному транскрипту, содержащему все три (ORFs 3-5) открытые рамки считывания для регуляторных белков.

Помимо этого, нами был описан дополнительный сплайс-вариант мРНК для неструктурных белков. В этом случае происходило вырезание 1123 нт. с 1031 нт. (**D2_NS**) по 2153 нт. (**A2_NS**), также в данном транскрипте имел место сплайсинг, описанный ранее с 275 нт. по 932 нт. Этот транскрипт кодирует маленькую 345 нт. (13,4 кДа) рамку считывания, соответствующую концу ORF3 (первый AUG-кодон находится на 2181 нт.), но, остается непонятным, имеет ли данная мРНК функциональное значение в жизненном цикле денсовируса или является артефактной. Таким образом, для неструктурных белков было определено наличие трех транскриптов, экспрессирующихся с промотора P2.

При амплификации с парой праймеров **P1st/ORF1 end**, соответствующих началу и концу участка генома, кодирующему структурные белки (рис. 1), были получены два кДНК-фрагмента размером около 2600 п.о. и около 2400 п.о. (рис. 5, дорожки 7, 8). Анализ

полученных фрагментов показал, что больший по размеру соответствует несплайсированной пре-мРНК, включающей в себя обе рамки считывания для структурных белков. Меньший фрагмент соответствует сплайсированному транскрипту, в котором происходит вырезание 229 нт., с 4420 нт. (D1_VP) по 4192 нт. (A_VP). Интрон включает в себя конец ORF1 и начало ORF2, таким образом, что при его вырезании образуется одна большая рамка считывания (ORFspl) размером 778 а.о. (83,5 кДа) (рис.6Г). Нами также были обнаружены кДНК, содержащие сплайсинг другого типа. В данном случае задействован альтернативный донорный сайт (D2_VP), расположенный на 10 нуклеотидов выше и описанный уже акцепторный сайт, и происходит вырезание 239 нт. между 4431 нт. и 4191 нт. Данный вариант сплайсинга не приводит к появлению новой рамки считывания, а лишь продлевает незначительно ORF2, увеличивая ее кодирующую емкость от 229 а.о. до 271 а.о. (размер белка около 30кДа) (рис. 6Г). Таким образом, для структурных белков было продемонстрировано наличие трех транскриптов, экспрессирующихся с промотора P1 (рис. 9).

Для определения точек начала и окончания транскрипции применяли метод 5' и 3'-RACE соответственно с набором заглубленных относительно друг друга специфических праймеров (отмечены на рис. 1).

5'-конец мРНК для неструктурных белков был определен на 240 нт., как и было предсказано ранее (Mukha et al., 2006), на 24 нт. ниже конца ITR в пределах Inr (TTA₊₁GTT) сайта (первый нуклеотид в транскрипте выделен жирным шрифтом) (рис. 6А). Последовательность сайта согласуется с консенсусной последовательностью A(A/C/T)CA₊₁(G/T)T(C/T), характерной для представителей типа Членистоногие (Purnell et al., 1994; Tijssen&Bergoin, 1995). На расстоянии 28 нт. от него расположен консервативный DPE элемент (G₊₂₄AGCAG₊₂₉ACGT), полностью согласующийся с соответствующей консенсусной последовательностью (G₊₂₄ NNN A/G/T₊₂₈ C/G A/T C/T A/C/G C/T) (Kutah, Kadonaga, 2000; Kadonaga, 2000; Butler, Kadonaga, 2002). 5'-конец транскриптов для структурных вирусных белков был определен на 5096 нт., на 23 нт ниже конца ITR, согласно предсказанному ранее (Mukha et al., 2006) в пределах менее консервативного Inr-элемента (TTA₊₁GTA) (рис. 6Д). Но при этом консервативного DPE элемента правильно расположенного относительно Inr обнаружено не было (GAG₊₂₄TCAG₊₂₈TGCCTTT). Можно предположить, что, так как вышележащие регуляторные элементы (включая TATA-box) для P1 и P2 являются одинаковыми, то именно нижележащие элементы (Inr, DPE и другие) могут оказывать влияние на силу и специфичность промотора. Большая консервативность соответствующих мотивов для промотора регуляторных белков может определять большую активность транскрипции, описанную для этого промотора денсовирусов (Dhar et al., 2007, 2010). 5'-некодирующая область для NS белков является достаточно протяженной и составляет 42 нт. для

сплайсированных транскриптов и 35 нт. для несплайсированного транскрипта. В то же время 5'-нетранслируемая область для VP белков составляет всего 3 нт. Нами не было найдено ни одного транскрипта, начинающегося с 823 нт., предсказанного для промотора P3 (Mukha et al., 2006).

3'-конец транскриптов для неструктурных белков был идентифицирован на 2541 нт., на расстоянии 14 нт. от предсказанного ранее (Mukha et al., 2006) сигнала полиаденилирования (AAASTT, 2521-2526 нт.). Транскрипты для структурных белков заканчиваются на 2494 нт., на расстоянии 19 нт. от предсказанного сигнала полиаденилирования (AATAAA, 2513-2518). Транскрипты перекрываются своими 3'-концами на протяжении 48 нт (рис. 6E).

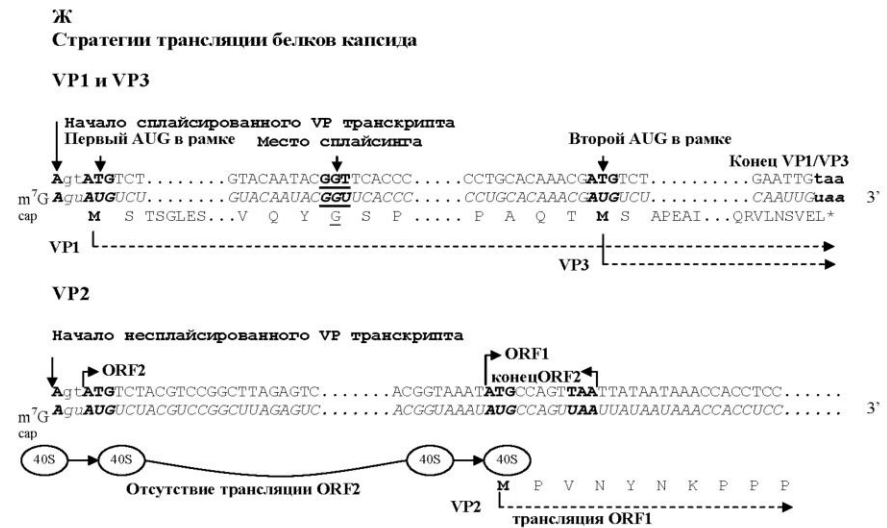
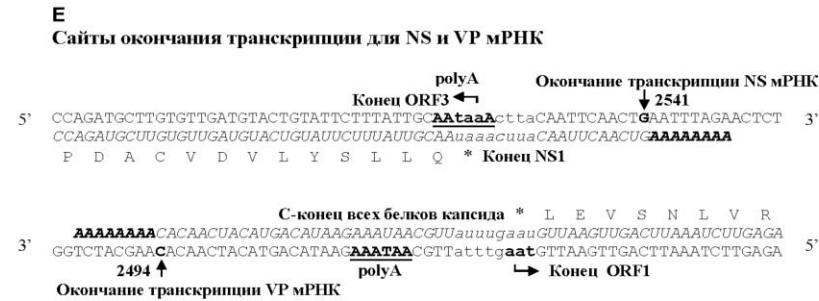
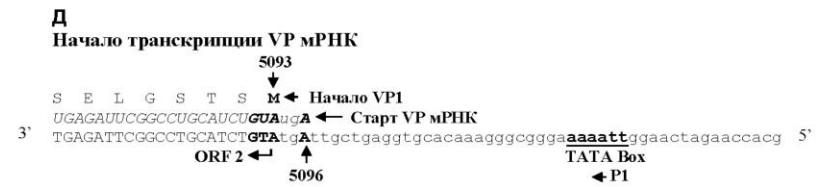
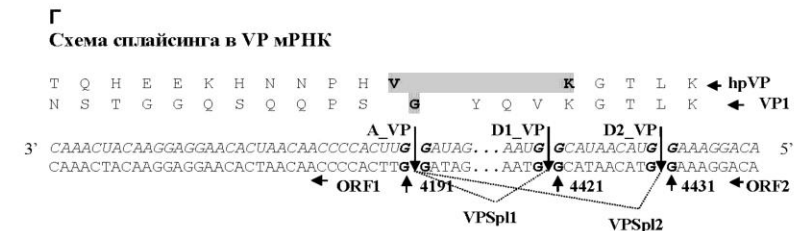
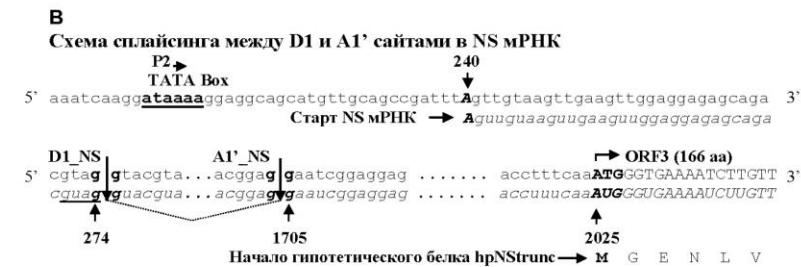
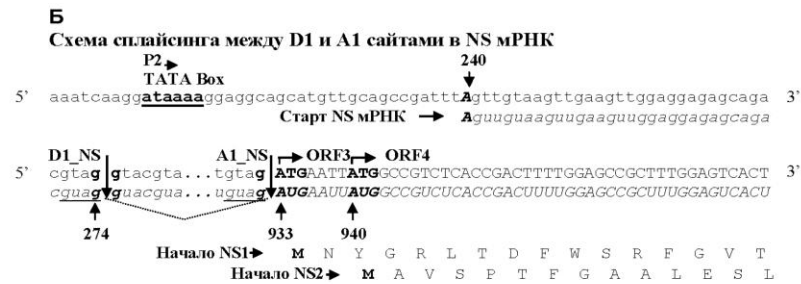
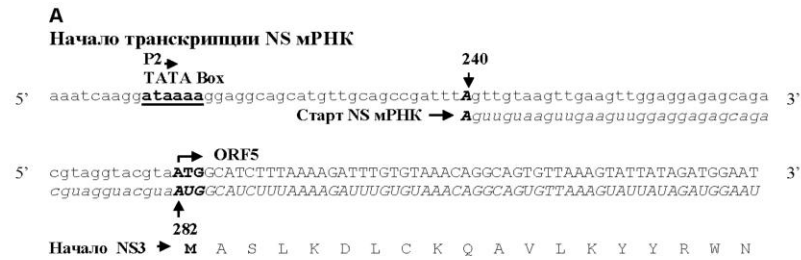


Рисунок 6. Сайты начала и окончания транскрипции и основные сайты сплайсинга мРНК VgDENV. Схема стратегии трансляции белков капсида VgDENV.

Учитывая полученные нами данные о точках начала и окончания транскрипции, размеры охарактеризованных с помощью RT-PCR мРНК для регуляторных белков составляют 2302 п.о., 1644 п.о., 872 п.о. и согласуются с размерами трех полос 2300 нт., 1800 нт. и 900 нт., полученных при Northern-блот гибридизации с зондом к ORF3 (рис. 4а, дорожка 1). Полученные данные о наличии сплайсинга, приводящего к вырезанию ORF5, согласуются и с результатами Northern-блот гибридизации с зондом к ORF5 (рис. 4а, дорожка 2), который выявляет только полосу 2300 нт., соответствующую несплайсированной пре-мРНК. Размеры описанных мРНК для белков капсида составляют 2603 нт для несплайсированного и 2374 нт. и 2364 нт. для двух сплайсированных вариантов, что сопоставимо с размерами двух мажорных полос (2600 нт. и 2400 нт.), выявляемых при Northern-блот гибридизации (рис. 4б). Так как мРНК, содержащие сплайсинг, практически не отличаются между собой по размеру, то на Northern-блоте и электрофореграммах они идут как одна полоса и идентифицировать их отдельно не возможно.

Установление природы группы дополнительных VP транскриптов.

Полученные данные о транскрипции генома BgDENV не давали нам возможность объяснить природу ряда дополнительных транскриптов (2000 нт. – 300 нт., рис. 4б), выявленных для капсидных белков. Можно было предполагать, что их появление связано с наличием альтернативных сайтов полиаденилирования.

Для проверки данного предположения нами был поставлен 3'-RACE с использованием праймера P1 RACE (рис. 1), локализующегося в районе сайта начала транскрипции, и амплифицирующего полностью область генома BgDENV, кодирующую капсидные белки и позволяющего выявить все возможные мРНК.

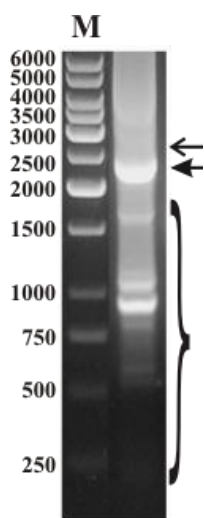


Рисунок 7. 3'-RACE для мРНК, соответствующей капсидным белкам. М - молекулярный маркер. Тонкой стрелкой обозначен фрагмент, соответствующий несплайсированной кДНК (2600 нт.), толстой – фрагмент, соответствующий сплайсированной кДНК (2400 нт.). Скобкой обозначены дополнительные мРНК для капсидных белков.

Результат амплификации представлен на рис. 7, где можно видеть, что помимо кДНК-фрагментов, соответствующих основным продуктам, размером около 2400 и 2600 п.о., был получен ряд дополнительных полос размером приблизительно 1600 п.о., 1200 п.о., 1100 п.о., 900 п.о., 800 п.о., 600 п.о., 550 п.о., представлявших собой стабильный паттерн, воспроизводившийся в нескольких повторных амплификациях (обозначен фигурной скобкой). Клонирование и секвенирование данных кДНК показало, что они действительно соответствуют мРНК, образующимся в результате альтернативной терминации транскрипции на следующих сайтах

внутри области, кодирующей капсидные белки: 4641 нт, 4447 нт, 4031 нт, 3989 нт, 3824 нт, 3551 нт, 3387 нт. При этом среди данных транскриптов встречались как сплайсированные, так и несплайсированные варианты (сайты сплайсинга соответствуют описанным выше). Размеры образующихся мРНК соотносятся с размерами дополнительных транскриптов, обнаруживаемых Northern-блот гибридизацией с VP зондами (рис. 4б и согласуются с результатами гибридизации с пробой к 3'-концевой области VP-кодирующей части (рис. 4б, дорожка 3). Функциональная роль данных транскриптов остается не понятной, так как они не содержат никаких новых рамок считывания, а кодируют только различающиеся по длине участки ранее описанных (ORF1 и ORF2) рамок считывания для капсидных белков. Интересно отметить, что анализ нуклеотидных последовательностей, окружающих сайты окончания транскрипции выявил в каждом случае наличие консервативных элементов, определяющих терминацию транскрипции (А-богатые участки, GT-богатые последовательности, САУТG-последовательности, полиА-подобные AU-последовательности) (Beaudoing et al., 2000).

Второй участок полиаденилирования (4394 – 4399 нт., Mukha et al., 2006) для неструктурных белков, скорее всего, не используется, т.к. нами не было обнаружено ни одного транскрипта, оканчивающегося в соответствующем месте.

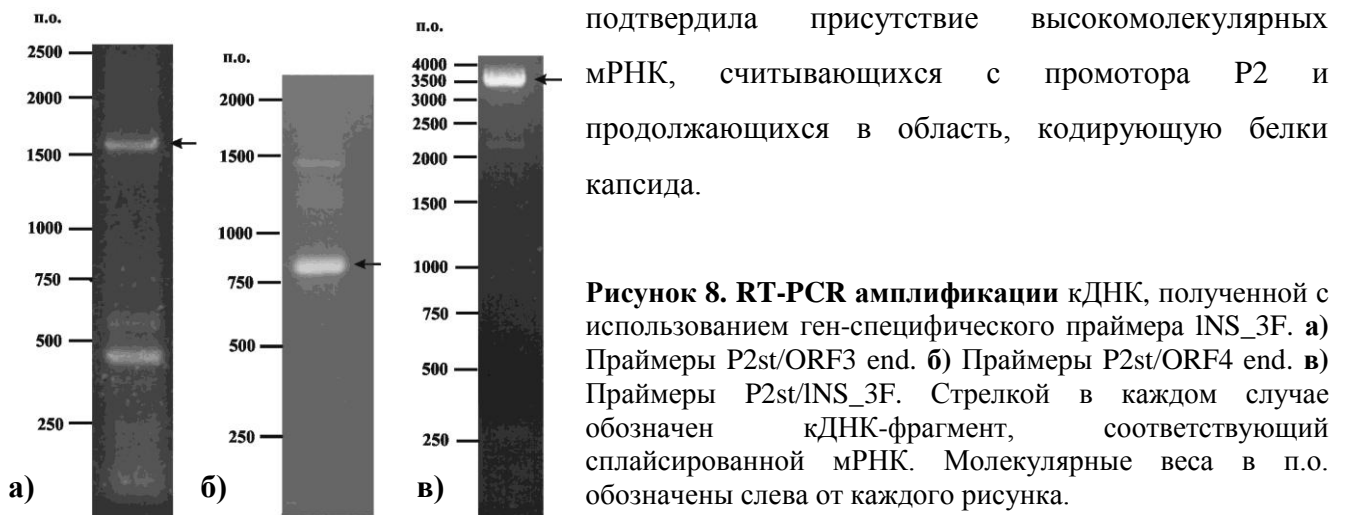
Обнаружение и характеристика дополнительной группы транскриптов для неструктурных белков

Размеры дополнительных высокомолекулярных NS транскриптов (4000 нт. и 5000 нт., рис. 4) позволяли предполагать, что их синтез может начинаться с промотора для регуляторных белков, но не заканчиваться на определенном ранее сайте терминации транскрипции, а продолжаться почти до конца генома BgDNV. Методом *in silico* в геноме BgDNV была обнаружена шестая открытая рамка считывания размером 396 п.о. (ORF6, рис. 9), расположенная в пределах 3684 – 4079 нт. в части генома, кодирующей белки капсида, но считываемая с комплементарной цепи и кодирующая белок размером 13.6кДа. Сравнение предсказанной аминокислотной последовательности ORF6 с имеющимися в базах данных NCBI, не выявило гомологии ни с белками эукариот, ни с известными белками денсовирусов.

Было выдвинуто предположение, что высокомолекулярные NS-транскрипты могут кодировать ORF6, хотя ее функциональная роль в жизненном цикле BgDNV оставалась не понятной. Для проверки данного предположения были поставлены RT-PCR амплификации с праймером ORF6end, расположенным в конце ORF6, и рядом праймеров, расположенных в области, кодирующей неструктурные белки (рис.1). Амплификация с праймерами P2st/ORF6end привела к появлению высокомолекулярного фрагмента с ожидаемым размером около 3800 п.о., а также дополнительного фрагмента с размером 3100 п.о. (рис. 5, дорожка 5). При использовании праймеров P3st/ORF6 end был получен один фрагмент с ожидаемым

размером около 3300 п.о. (рис. 5, дорожка 9, 10), при этом в обоих случаях присутствовал ряд дискретных низкомолекулярных фрагментов. Секвенирование полученных кДНК показало, что фрагмент размером 3100 нт. соответствует сплайсированной мРНК, содержащей описанный ранее сплайсинг, приводящий к вырезанию ORF5. Все остальные минорные низкомолекулярные фрагменты представляли собой продукты альтернативного сплайсинга транскрипта размером 3800 п.о. (6 различных сплайс-вариантов).

Для подтверждения наличия длинных NS-транскриптов были проведены RT-PCR с одноцепочечной кДНК, полученной с использованием ген-специфического праймера INS_3F, расположенного в области, кодирующей белки капсида (рис. 1). При последующей амплификации с праймерами P2st/ORF3 end, P2st/ORF4 end и P2st/INS_3F (рис. 1) были получены ПЦР-продукты предсказанного размера, в том числе со сплайсингом (рис. 8). Northern-блот гибридизация с использованием одноцепочечного РНК-зонда (INS, рис. 1) также



Для определения предполагаемого 3'-конца длинных NS транскриптов проводили 3'-RACE картирование. При этом нам пришлось столкнуться с наличием большого количества постоянно присутствовавших неспецифических ПЦР-продуктов, что затрудняло отбор искомым фрагментов. 3'-конец данных транскриптов был определен на 4139 нт. Принимая во внимание то, что данные мРНК имеют ту же точку начала транскрипции, что и основная группа NS мРНК, их размеры составляют 3900 нт. и 3240 нт., т.е. меньше, чем размеры соответствующих транскриптов, детектированных Northern-блоттингом. Основываясь на данном обстоятельстве, а также ряде других доводов, представленных в работе, можно предполагать, что большинство данных транскриптов может заканчиваться позднее определенной нами точки или иметь гетерогенный сайт окончания транскрипции. Кроме того, часть из них может не быть полиаденилирована.

Таким образом, в нашей работе было выявлено две группы транскриптов для неструктурных белков: первые транскрибируются с промотора P2 и заканчиваются после

ORF3, вторые тоже транскрибируются с промотора P2, но заканчиваются после ORF6. При этом данные транскрипты имеют протяженную область перекрытия с транскриптами для белков капсида, составляющую не менее 1600 нт (рис. 9).

На рисунке 9 представлена схема, иллюстрирующая стратегию транскрипции денсовируса рыжего таракана. Для дополнительных длинных NS транскриптов на схеме представлены только две основные мРНК, детектируемые с помощью Northern-блот гибридизации.

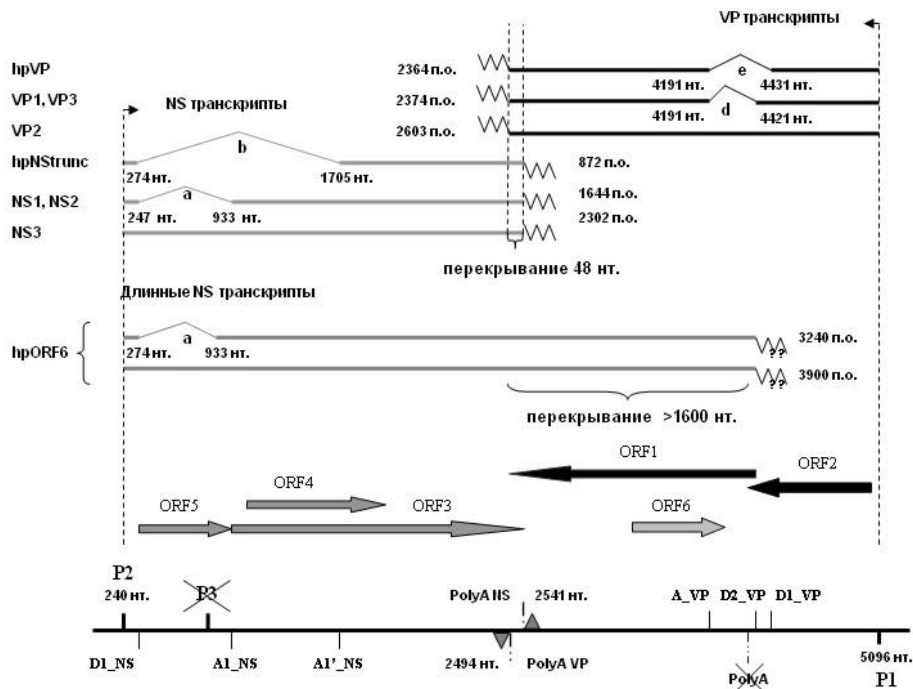


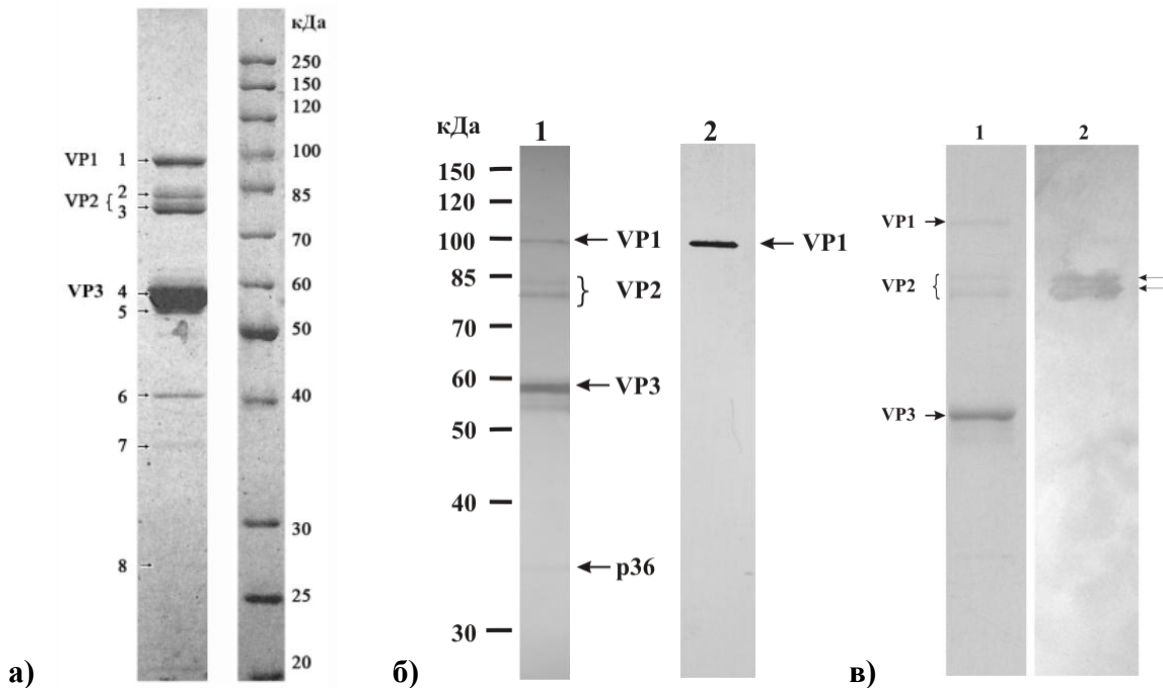
Рисунок 9. Общая схема экспрессии генома денсовируса рыжего таракана BgDNV. P1 – промотор P1, P2 – промотор P2 (цифрами обозначены точки начала транскрипции). Пунктирными линиями обозначены сайты полиаденилирования, серыми треугольниками с цифрами – точки окончания транскрипции. Для мРНК капсидных и регуляторных белков обозначены основные донорные и акцепторные сайты сплайсинга. Сбоку от транскриптов отмечены их размеры с учетом определенных нами сайтов начала и окончания транскрипции. Для длинных NS транскриптов в качестве конечной точки при подсчете размеров использовался 1197 нт. Для каждого сплайсинга цифры обозначают первый нуклеотид до и после вырезанного участка. Каждый тип сплайсинга обозначен латинской буквой. Предсказанный промотор P3 для неструктурных белков и дополнительный сайт полиаденилирования для белков капсида, оказавшиеся нефункциональными, перечеркнуты. Слева для каждого транскрипта указаны белки, предположительно кодируемые им.

Идентификация белков капсида BgDNV

Для очистки вирусных частиц применяли два подхода: центрифугирование в градиенте плотности сахарозы и центрифугирование в градиенте плотности CsCl. Как показало сравнение полученных препаратов, второй подход позволил получить более качественный высокоочищенный препарат частиц BgDNV. В обоих случаях присутствовала как фракция пустых частиц, так и фракция частиц, содержащих вирусную ДНК, причем центрифугирование

в градиенте плотности CsCl позволило получить две фракции ДНК-содержащих частиц, с различающейся плавучей плотностью.

Для определения белкового состава капсидов BgDNV препараты вирусных частиц разделяли в 7,9% SDS-ПААГ. Как можно видеть на электрофореграмме, приведенной на рис. 10а, нами было обнаружено присутствие 8 различных полос с ориентировочными размерами 97 кДа, 85 кДа, 80 кДа, 57 кДа, 56 кДа, 40кДа, 35,8 кДа, 27 кДа. При этом белки p97, p85, p80, p57 представляли собой мажорные полосы, в то время как оставшиеся четыре белка присутствовали в минорных количествах.



а) Электрофореграмма белков капсида BgDNV. Цифрами слева обозначены 8 полос, проанализированных методом масс-спектрометрии. VP1, VP2, VP3 обозначают идентифицированные нами белки денсовируса (нумерация согласно электрофоретической подвижности). Справа приведен маркер молекулярных весов.

б) Western-блот с антителами к капсидным белкам. Дорожка 1 – антитела VP K2 к общему C-концу ORF1, общему для всех белков капсиды. Стрелками и фигурной скобкой обозначены выявляемые данными антителами белки капсиды. Дорожка 2 – антитела VP K1 к ORF2. Молекулярные веса обозначены слева от рисунка.

в) Western-блот с антителами к убиквитину (Ub). Дорожка 1 – белки капсиды BgDNV. Дорожка 2 – гибридизация белков капсиды с MAb к убиквитину. Стрелками обозначены полосы, соответствующие VP2.

г) Наложение пептидов для VP1 на аминокислотную последовательность ORF1

MSAPEAIVTGKRGAEEDPDSASTPTTKNKPSEHSGSALPGTSGNTDGSMSSTMLDLASRGIMPISRGIHVEKFEWTFTKKWKFLSFGVADVILPDDIGTTTAPAKRWALTTSLVNI PWEYAFMYMSFAEFNRLREMTGVFATDCDIIKIYQYNPRVAFQTADTNSQTATLNQNKFTRIAGLRNPNHFLGSDRDYTFSSDEPKMLGFEFNADQYTGKFRDRLSKEMYGTTTRTNTPTVPAISTGKEMGLLRYTYVYASQTIIDSGFPQYNKYCSEFNMSMDLIGKQVLSAHHDFKYAPLTTARAHYQDSIYLPGDIPEKKEQSPANVVI PAGESKIYDLQSVRMPSTGFSAVEGANSRKEEDAMTLGHLQVGGVDLKTGEALNSSTFTDFDLYTKFPMEQGGLYNEAGYQATCGDQESLHVGVRAVFKLGTAVNTINASSWLDQMYWTVCECLRCVSTPEFTTYPRGNVSDIPLRSQFTAATKTAAPMLQTFDRPYFYGKPRVNLNSVEL

Наложение пептидов для VP2 на аминокислотную последовательность ORF1

MPVNYNKKPPYERPNWERMNEGQRRYAMEQYNLALVRRGQYFEPPIAARPPSPAPNNAIQDLDELDRLLDNFPIGSPQSQGGTNSNDQVAGPSSRPDPVPAQLPVQPSTIQEPAQMSAPEAIVTGKRGAEEDPDSASTPTTKNKPSEHSGSALPGTSGNTDGSMSSTMLDLASRGIMPISRGIHVEKFEWTFTKKWKFLSFGVADVILPDDIGTTTAPAKRWALTTSLVNI PWEYAFMYMSFAEFNRLREMTGVFATDCDIIKIYQYNPRVAFQTADTNSQTATLNQNKFTRIAGLRNPNHFLGSDRDYTFSSDEPKMLGFEFNADQYTGKFRDRLSKEMYGTTTRTNTPTVPAISTGKEMGLLRYTYVYASQTIIDSGFPQYNKYCSEFNMSMDLIGKQVLSAHHDFKYAPLTTARAHYQDSIYLPGDIPEKKEQSPANVVI PAGESKIYDLQSVRMPSTGFSAVEGANSRKEEDAMTLGHLQVGGVDLKTGEALNSSTFTDFDLYTKFPMEQGGLYNEAGYQATCGDQESLHVGVRAVFKLGTAVNTINASSWLDQMYWTVCECLRCVSTPEFTTYPRGNVSDIPLRSQFTAATKTAAPMLQTFDRPYFYGKPRVNLNSVEL

Наложение пептидов для VP3 на аминокислотную последовательность ORF1

MPVNYNKKPPYERPNWERMNEGQRRYAMEQYNLALVRRGQYFEPPIAARPPSPAPNNAIQDLDELDRLLDNFPIGSPQSQGGTNSNDQVAGPSSRPDPVPAQLPVQPSTIQEPAQMSAPEAIVTGKRGAEEDPDSASTPTTKNKPSEHSGSALPGTSGNTDGSMSSTMLDLASRGIMPISRGIHVEKFEWTFTKKWKFLSFGVADVILPDDIGTTTAPAKRWALTTSLVNI PWEYAFMYMSFAEFNRLREMTGVFATDCDIIKIYQYNPRVAFQTADTNSQTATLNQNKFTRIAGLRNPNHFLGSDRDYTFSSDEPKMLGFEFNADQYTGKFRDRLSKEMYGTTTRTNTPTVPAISTGKEMGLLRYTYVYASQTIIDSGFPQYNKYCSEFNMSMDLIGKQVLSAHHDFKYAPLTTARAHYQDSIYLPGDIPEKKEQSPANVVI PAGESKIYDLQSVRMPSTGFSAVEGANSRKEEDAMTLGHLQVGGVDLKTGEALNSSTFTDFDLYTKFPMEQGGLYNEAGYQATCGDQESLHVGVRAVFKLGTAVNTINASSWLDQMYWTVCECLRCVSTPEFTTYPRGNVSDIPLRSQFTAATKTAAPMLQTFDRPYFYGKPRVNLNSVEL

Рисунок 10. а) Электрофореграмма белков капсиды BgDNV. Цифрами слева обозначены 8 полос, проанализированных методом масс-спектрометрии. VP1, VP2, VP3 обозначают идентифицированные нами белки денсовируса (нумерация согласно электрофоретической подвижности). Справа приведен маркер молекулярных весов. б) Western-блот с антителами к капсидным белкам. Дорожка 1 – антитела VP K2 к общему C-концу ORF1, общему для всех белков капсиды. Стрелками и фигурной скобкой обозначены выявляемые данными антителами белки капсиды. Дорожка 2 – антитела VP K1 к ORF2. Молекулярные веса обозначены слева от рисунка. в) Western-блот с антителами к убиквитину (Ub). Дорожка 1 – белки капсиды BgDNV. Дорожка 2 – гибридизация белков капсиды с MAb к убиквитину. Стрелками обозначены полосы, соответствующие VP2. г) Наложение пептидов белков VP1 - VP3, выявляемых методом масс-спектрометрии, на аминокислотные последовательности открытых рамок считывания BgDNV.

Для дальнейшей идентификации все 8 полос были вырезаны из геля и подвергнуты масс-спектрометрическому анализу, что дало возможность установить природу каждой из белковых полос и предсказать стартовый кодон РНК, с которого происходило считывание соответствующего белка. Результат наложения пептидов, полученных для белков VP1-3 на ORFspl и ORF1, с использованием программы Mascot представлен на рис. 10г.

Анализ показал, что полосы 1 и 4 соответствуют двум белкам, считываемым с первых двух последовательных AUG-кодонов ORFspl, кодируемой сплайсированным VP-транскриптом (см. схему трансляции белков капсида на рис. 6). Данные белки были обозначены VP1 и VP3, соответственно (рис. 10а). Полосы 2 и 3 оказались идентичными, причем соответствующий белок, обозначенный нами VP2, полностью кодируется ORF1 (объединены фигурной скобкой на рис.10а). Увеличение размеров белков VP1 (97кДа) и VP2 (85/80кДа) относительно предсказанных (85,3кДа и 69,7кДа, соответственно) может объясняться наличием посттрансляционной модификации. Масс-спектрометрический анализ показал также, что оставшиеся полосы 5, 6, 7 и 8 (рис. 10а) представляют собой продукты протеолитического расщепления белка VP3.

Полученные нами данные о капсидных белках BgDNV были дополнительно подтверждены результатами Western-блот гибридизации с антителами, соответствующими открытым рамкам считывания, кодирующим белки капсида. Использование антител к концу ORF1 (VP K2) выявило все три белка, видимых на электрофореграмме (рис. 10б, дорожка 1), что подтверждает наличие у всех этих белков общего С-конца, соответствующего концу ORF1. Антитела к ORF2 (VP K1) гибридизуются только с одной полосой, которая соответствует белку VP1 (рис. 10б, дорожка 2), что свидетельствует о том, что только данный белок содержит уникальный N-концевой участок, соответствующий ORF2. При этом ни окрашиванием Кумасси, ни гибридизацией с антителами не было выявлено белка, кодируемого только ORF2 (24,8кДа), и белка hpVP (30кДа), кодируемого сплайсированным VP-транскриптом размером 2364 нт. (см. схему 9).

Таким образом, денсовирус рыжего таракана BgDNV содержит в составе капсида три различных белка VP1, VP2 и VP3, обладающих одинаковой С-концевой, но уникальными N-концевыми участками, причем белок VP2 присутствует в двух формах. Отметим, что белок VP3 представлен в капсиде в наибольшем количестве и составляет, следовательно, его основную структурную единицу.

Анализ последовательности белка VP1 показал присутствие в его уникальном N-концевом участке высококонсервативного мотива фосфолипазы A2 (PLA2) (134–192а.о.), необходимого для инфекционности парвовирусов, а в общем С-концевом участке – домена Denso_VP4 (300 – 760 а.о.). В уникальном N-концевом участке белка VP2 с использованием

программы NetNES 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) обнаружен сигнал ядерного экспорта (NES) **ELDRLL** (64-69 а.о.) (рис. 11).

>VP1 (ORF spl)

```
MSTSGLESVPLLPVNSATVEYGGIEPKVHSGYGASRLPVKPTSAAGGAGAQYDKIFQSQLGRAASSGNPLNVFKSRDEYYNSVPWELRRLPFAERDRLLIKPY
GVKWDKVSKAQYAQHVKLVNPRAGQKRIQQGIVLPLFSNNIIFGNTIQDAKTGSDFFIAQGIIHYSEAKSDIDIQRAIEAIGQFIQEATHSHNPISQTQGVI
GAVGLAGKQLVEKLTGKVQYGSFPQQSGGTSNSDQPVAGPSSRPDPVPAQLPVQPOSTIQEPAQTMMSAPEAIVTGKRGAEPEPDSASTPTKKNKPESEHSGSALP
CTSGNTDGSMSGSTMLDLASRGIMPISRGIHVEKFEWFTTKKWKFLSFGVADVILPDDIGTTAPAKRWALTTSLVNIPEWEYAFMYMSFAEFNRLREMTGV
FATDCDIKIYQYNPRVAFQTADTNSTQATLNQNKFTRIAKGLRNNPHLFGSDRDYTFSSDEPMKPLGFETNADQYTQKFRDRLSKEMYGTTTTRTTNTPTVP
AISTGKEMGLLRYTYVASQTIIDSGFPQYNKYCSEFNMSMDLIGKQVLSAHNDFKYAPLTTTRARHYQDSIYLPGDIPEKKE SQPANVVI PAGESKIVDLQSVRM
PSTGFSAVEGANSRKEDAMTLGHLQVGGVDLKTGEALSNSFTDFDTLYTKFPMEQGGLYNEAGYQGATCGDQESLHVGVRAVPKLGTA VNTINASSWLDCC
MYWTVBCRLRCVSTEFPTYPRGNVSDIPLRSQFTAATKTA PMLQTFDRPYFYGKPKQRVLNSVEL
```

Рисунок 11. Анализ доменной организации белка VP1. Желтым цветом обозначен участок PLA2, синим на нем – наиболее консервативные аминокислотные остатки. Розовым цветом – сигналы ядерной локализации (NLS). Красных – домен Denso_VP4. Крупным жирным шрифтом показаны первые два метиониновых кодона, с которых происходит считывание белков VP1 и VP3 соответственно.

Следует отметить, что белки VP1 и VP3 синтезируются, наиболее вероятно, с двух последовательных AUG-кодонов ORFspl, кодируемой сплайсированным VP-транскриптом, с использованием leaky scanning механизма. Третий белок VP2 транслируется с несплайсированного транскрипта, содержащего ORF1 и ORF2, расположенную перед ней (рис. 8). Первый AUG-кодон данного транскрипта (стартовый кодон ORF2), будучи расположенным очень близко к 5'-концу мРНК, может в данном случае быть «невидимым» для рибосомы, и, таким образом, ORF2 может не синтезироваться, в то время как рибосома будет перемещаться в область, близкую к AUG-кодону ORF1 и начинать трансляцию этого белка. Схема трансляции белков капсида BgDENV представлена на рис. 6Ж.

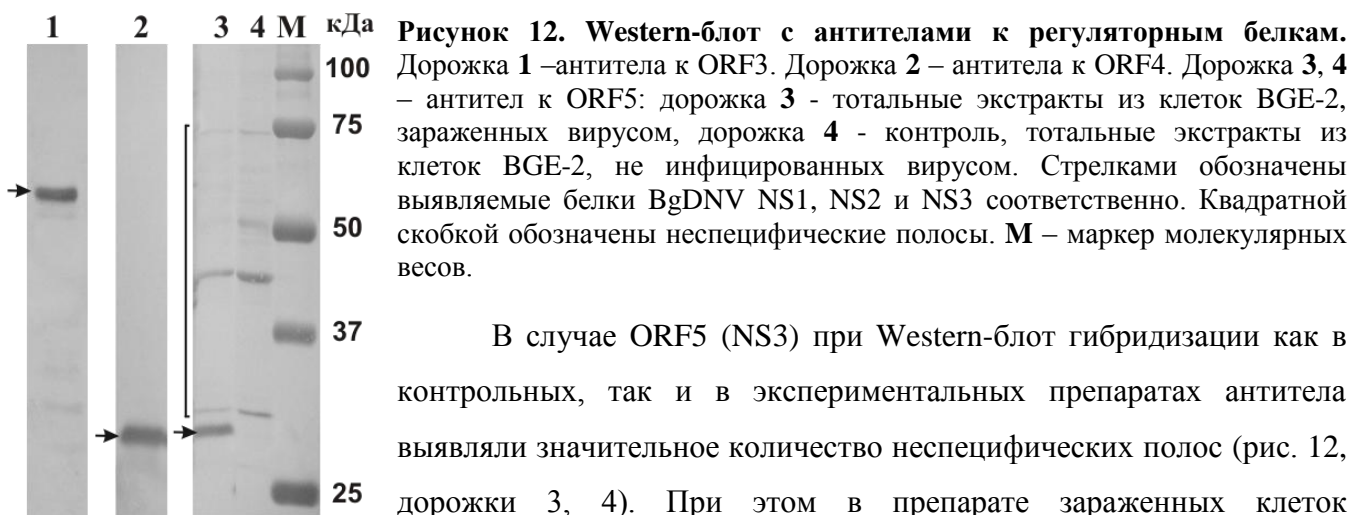
Обнаружение убиквитинирования белка VP2

Указанное выше существенное превышение молекулярного веса белков VP1 и VP2 относительно предсказанного теоретически позволило предположить, что в посттрансляционное модифицирование данных белков может быть вовлечен процесс убиквитинирования. Присоединение одной молекулы убиквитина (Ub) приводит к увеличению молекулярного веса модифицированного белка примерно на 8кДа, что в целом согласовалось с наблюдаемым в нашем случае увеличением молекулярного веса белка VP2 (80кДа) по сравнению с теоретически предсказанным для ORF1 (69,7кДа). Для проверки этой гипотезы мы использовали метод Western-блот гибридизации белков капсида с моноклональными антителами к убиквитину. На рисунке 10в представлен результат этого анализа. Показано, что белок VP2 действительно конъюгирован с Ub, в то время как VP1 и VP3 не содержат данной модификации. В более ранних работах было показано моноубиквитинирование капсидных белков ряда вирусов растений, отдельных вирусов позвоночных, а также одного вируса беспозвоночных – бакуловируса *Lymantria dispar* MNPV (Dunigan et al., 1988; Hazelwood and Zaitlin, 1990; Hingamp et al., 1995). Тем не менее, функциональное значение таких

модификаций не было выяснено ни в одном случае. Функциональное значение связывания Ub с белком VP2 VgDNV также остается непонятным. Наши данные свидетельствуют, что убиквитинирование происходит, скорее всего, после синтеза соответствующих белков в клетке или сразу после сборки вирусных капсидов, при этом из зараженной клетки частицы выходят уже модифицированными. Исходя из литературных данных, можно предположить, что убиквитинирование может выполнять положительную роль в инфекции, например, участвуя в траффике вирусных частиц в ядро и подготовке вирусной ДНК к последующей репликации и экспрессии. С другой стороны, убиквитинирование может быть частью системы антивирусной защиты клетки-хозяина.

Детекция экспрессии неструктурных белков VgDNV

Western-блот гибридизация с антителами к ORF3 (NS1) и ORF4 (NS2) в каждом случае выявили одну четкую полосу, размером приблизительно 60кДа и 29кДа соответственно, которые практически точно совпадали с предсказанными (60,2кДа и 30,3кДа) (рис. 12, дорожки 1 и 2).



В случае ORF5 (NS3) при Western-блот гибридизации как в контрольных, так и в экспериментальных препаратах антитела выявляли значительное количество неспецифических полос (рис. 12, дорожки 3, 4). При этом в препарате зараженных клеток дополнительно присутствовала полоса, соответствовавшая белку с молекулярным весом 31кДа. Ее размер согласовался с предсказанным для ORF5 (25,9кДа), хотя и несколько превышал его, что могло быть связано с наличием неких посттрансляционных модификаций (например, фосфорилирования).

Анализ последовательности наиболее консервативного белка NS1 показал, что данный белок состоит из двух доменов: эндонуклеазного Rep-домена и SF3-хеликазного домена (см. рис. 13). В белках NS2 и NS3 методами биоинформатики не было выявлено никаких консервативных доменов.

Таким образом, нами было показано, что все три регуляторных белка, кодируемых открытыми рамками считывания генома VgDNV, экспрессируются в ходе продуктивной инфекции вируса в культуре клеток рыжего таракана. При этом необходимо отметить, что белок NS1, наиболее вероятно, считывается с несплайсированного NS-транскрипта, в то время

как два остальных белка NS2 и NS3, транслируются с 1644 нт. сплайсированного транскрипта (см. схему 9), с использованием механизма leaky scanning.

Определение внутриклеточной локализации белков BgDNV

Анализ аминокислотной последовательности регуляторных белков BgDNV с использованием программы Wolf PSORT (<http://www.psорт.org/>) выявил присутствие в белке NS1 ряда мотивов, сходных с сигналами ядерной локализации (NLS) (рис. 13): RRRKRR (243-248 а.о.), KKPR (а.о. 514 – 516) и PRANRRR (а.о. 239 – 245), а также подобных мотивов KRKK (а.о. 142 – 145) и PALKKKI (а.о. 66 – 72) в белке NS2. В то же время, в белке NS3 аналогичных мотивов выявлено не было. Кроме того, два возможных NLS мотива были обнаружены в N-концевой части белка VP3, общей для всех капсидных белков (PTKKNKP, а.о. 23 – 29, KKWK, а.о. 80 – 83). Также в аминокислотной последовательности белка NS1 была обнаружена последовательность, сходная с сигналом ядерного экспорта – LPLEITAL (рис. 13).

```
>NS1
MNYGRLTDFWSRFGVMTGDDAGRDSVSSSDMVEAVGGEPSSGGPVGQQAQAEVTSSSSVDQKLQELVDRFVSRLEEKKNWKDSGYYISDVYACESSERANALARRLE
QRAESFGRGFIFIGIFIHNNHVTTHACPYTSRTRCQCQFKNFPEAKEDIRLLLRKPPAIETFTTRRDWENITKYFCTSGRRATFFKIFGHLQRLPLEITALSDST
ISGQDGGGPDGSGVENCNDPLEFHSQPEVGDIPARPRANRRRKRKRDQIVVGGDGGIGGATGIILDL/LSKCAVCPLTEIVFTKEYLQDPVACKRLDSKEVKD
AIDTRASVINTWEREDFVAFYNNPNTILISARSLSNAFDSYFNIEESFNVTPELLTFQMGENLVQFCRNLVDTLECNIPKRCFVVCSPPSACKNFFFDGV
KDYYLNSGQMNPNKYNQFAQDCHNRRITIWNEPNYEPREMENLKMLFAGDNLNANVKCKPQANVKRTPVIVLTNLSLPNFCQQTAFNDRVITVYHWTQATFL
KDYNNKKPRPDACVDVLYSLIQ
```

Рисунок 13. Анализ доменной организации белка NS1. Желтым обозначен Rep-домен, консервативные аминокислотные остатки, общие у всех денсовирусов, указаны синим. Серым обозначен SF3 хеликазный домен, темно-серым в его пределах участок гомологии с AAA+ATФазами, фиолетовым указан Walker A-мотив, голубым – Walker B-мотив, желтым – Walker B'-мотив, коричневым – Walker C-мотив и зеленым – «аргининовый палец». Красным цветом обозначен сигнал ядерного экспорта, бирюзовым – сигналы ядерной локализации (NLS).

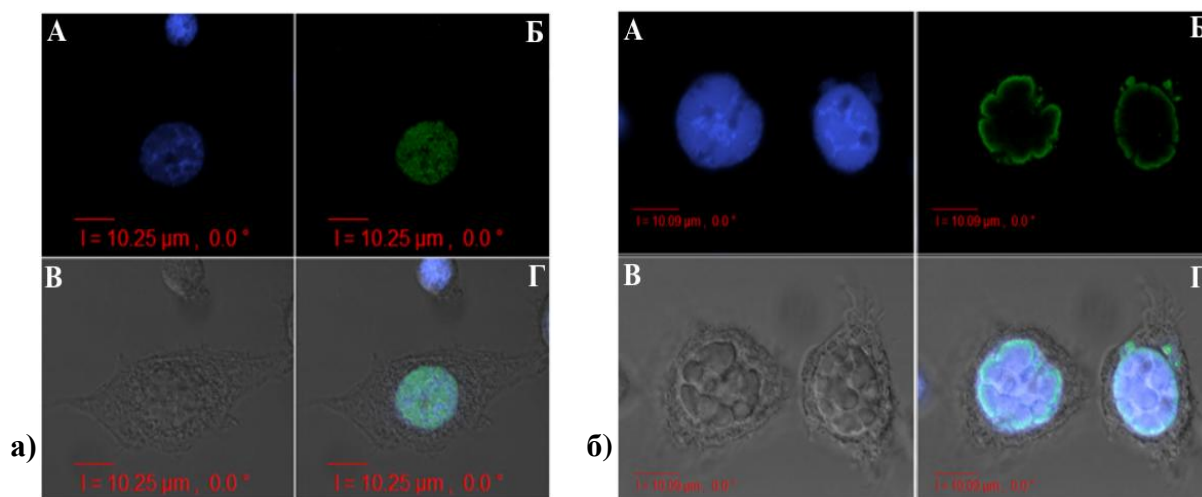


Рисунок 14. Внутриклеточная локализация белков BgDNV. а). Белок VP1. б). Белок NS1. В каждом случае: А – ядра клеток, окрашенные DAPI; В – гибридизация клеток BGE-2 с соответствующими антителами, конъюгированными с FITC; С – клетки культуры BGE-2, сфотографированные с применением метода фазового контраста; D – наложение флуоресцентных сигналов DAPI и FITC на клетки BGE-2. Внизу каждой фотографии приведен масштаб.

Иммуно-флуоресцентный анализ с антителами VP K1 к белку VP1 продемонстрировал ядерную локализацию соответствующего белка (рис. 14), причем белок VP1 характеризовался практически равномерным распределением по всему объему ядра. Гибридизация с антителами к белку NS1 также выявила четкую ядерную локализацию соответствующего белка, при этом белок NS1 характеризовался четко выраженной примембранной локализацией (рис. 14).

Выводы

1. Определена динамика транскрипции генов денсовируса рыжего таракана BgDNV. Показано наличие ранних, соответствующих неструктурным белкам, и поздних, соответствующих капсидным белкам, групп транскриптов. Выявлены ранние и поздние промоторы изучаемого вируса.
2. Определены сайты старта и терминации транскрипции генов капсидных и неструктурных белков BgDNV. Определена последовательность нуклеотидов сплайсированных вариантов РНК, соответствующих как генам капсидных белков (два варианта), так и неструктурных белков (два варианта). Впервые для денсовирусов описана дополнительная группа транскриптов для генов неструктурных белков, транскрипция которых начинается с основного промотора, но продолжается в область, кодирующую капсидные белки.
3. Исследован белковый состав капсида BgDNV. Показано, что капсиды денсовируса рыжего таракана состоят из трех белков (VP1 – 97 кДа, VP2 – 85/80 кДа, VP3 – 57 кДа). Для каждого капсидного белка определены сайты инициации трансляции. Показано моноубиквитинирование капсидного белка VP2.
4. Методом белкового иммуоблоттинга выявлено три неструктурных белка денсовируса рыжего таракана (NS1 – 60кДа, NS2 – 29кДа, NS3 – 31кДа). Показано соответствие описанных белков открытым рамкам считывания, выявляемым методами *in silico*.
5. Определена внутриклеточная локализация неструктурного белка NS1 и капсидного белка VP1 в инфицированной денсовирусом пересеваемой культуре клеток BGE-2. Показано, что оба исследованных белка накапливаются в ядрах инфицированных клеток, причем белок NS1 локализуется, преимущественно, вблизи ядерной мембраны.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. Мартынова Е.У., Капелинская Т.В., Муха Д.В. Денсовирусы насекомых: структура генома, особенности жизненного цикла и возможности практического использования. Успехи современной биологии, 2008 г., т. 128, № 4, с. 329 – 341.
2. Капелинская Т.В., Мартынова Е.У., Королев А.Л., Шал К., Муха Д.В. Транскрипция генома денсовируса рыжего таракана BgDNV: альтернативный процессинг вирусных РНК. Доклады Академии Наук, 2008 г., т. 421, № 2, с. 256 – 261.
3. Мартынова Е. У., Капелинская Т. В., Муха Д. В. Характеристика капсидных белков денсовируса рыжего таракана *Blattella germanica* (BgDNV). Труды Томского Государственного Университета, Серия биологическая, 2010, т. 275, с. 374 – 377.

Материалы всероссийских и международных конференций:

1. Капелинская Т.В., Мартынова Е.У., Королев А.Л., Муха Д.В. «Изучение стратегии транскрипции генома денсовируса рыжего таракана *Blattella germanica*». 4 съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 11 – 15 мая 2008 г., с. 114.
2. Kapelinskaya T., Martynova E., Korolev A., Mukha D. The transcription of the Red Cockroach Densovirus BgDNV genome: Alternative Processing of the Viral RNAs in the BGE-2 cells. XX Международный генетический конгресс, Берлин, 12 – 17 июня 2008 г., с. 169.
3. Мартынова Е. У., Капелинская Т. В., Королев А. Л., Муха Д. В. «Изучение стратегии экспрессии генома денсовируса рыжего таракана *Blattella germanica* на уровне транскрипции». I Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии», Донецк. 23 – 26 февраля 2009 г., с. 144 – 145.
4. Мартынова Е.У., Капелинская Т.В., Муха Д.В. «Характеристика капсидных белков денсовируса рыжего таракана *Blattella germanica* (BgDNV)». Первая всероссийская молодежная научная конференция, посвященная 125-летию биологических исследований в Томском Государственном Университете: «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии», Томск, 6 – 9 октября 2010, с. 131 – 132.
5. Мартынова Е.У., Капелинская Т. В., Муха Д. В. Идентификация белков, кодируемых геномом денсовируса рыжего таракана BgDNV. IV Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология клетки», 29 ноября – 3 декабря 2010, Москва – Звенигород, 145 – 146.