

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА
Российской академии наук**

На правах рукописи

Козлов Евгений Николаевич

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КАПСИДНЫХ БЕЛКОВ
ДЕНСОВИРУСА РЫЖЕГО ТАРАКАНА (BgDV1) В
ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ СИСТЕМАХ – КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК
МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЯХ ДРОЗОФИЛЫ**

03.02.07 – генетика

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
д.б.н., профессор Муха Д.В.**

Москва 2016.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Общая характеристика парвовирусов.	10
1.2. Систематика подсемейства <i>Densovirinae</i> .	15
1.3. Денсовирус рыжего таракана (BgDV1).	20
1.4. Роль сплайсинга в реализации генетической информации парвовирусов.	26
1.5. Внутриклеточный трафик парвовирусов.	31
1.5.1. Взаимодействие вириона с рецептором клетки и его проникновение внутри клетки.	31
1.5.2. Транспорт парвовирусов через систему эндосом.	33
1.5.3. Структурные изменения капсида и выход из эндосомы.	34
1.5.4. Передвижение вируса в цитоплазме и проникновение в ядро.	36
1.5.5. Вход в ядро и «раздевание» вируса.	37
1.6. Транспорт вирусных белков через ядерный поровый комплекс.	39
1.6.1 Общая характеристика ядерного порового комплекса.	39
1.6.2 Роль фосфорилирования в регуляции транспорта вирусных белков через ядерный поровый комплекс.	43
1.7. Дрозофила как модель для генетических исследований.	44
1.8. Врожденный иммунитет <i>Drosophila melanogaster</i> .	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
2.1. Общая характеристика методов амплификации и клонирования фрагментов ДНК.	51
2.2. Амплификация фрагментов ДНК, соответствующих открытым рамкам считывания капсидных белков BgDV1.	51
2.3. Электрофорез фрагментов ДНК.	52
2.4. Очистка фрагментов ДНК.	52
2.5. Клонирование фрагментов ДНК.	53
2.6. Трансформация бактерий.	54
2.7. ПЦР с использованием клеток единичной колонии <i>E. coli</i> .	54
2.8. Выделение плазмидной ДНК.	55
2.9. Поддержание культур клеток млекопитающих, трансфекция.	56
2.10. Иммуногистохимическое окрашивание клеток антителами.	57
2.11. Сайт-направленный мутагенез.	57

2.12. Получение трансгенных линий <i>D. melanogaster</i> . Индукция экспрессии чужеродного генетического материала.	58
2.13. Выделение РНК, синтез кДНК.	59
2.14. Определение последовательности нуклеотидов ДНК.	60
2.15. Электрофорез белков в денатурирующем геле. Вестерн-блот гибридизация.	60
2.16. ПЦР в реальном времени.	60
2.17. Секвенирование нового поколения (NGS).	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1. Исследование внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса BgDV1 в культурах клеток млекопитающих.	62
3.2. Экспрессия генов капсидных белков VP2 и VP3 в трансгенных линиях <i>D. melanogaster</i> .	69
3.3. Транскриптомный анализ дифференциально-экспрессирующихся генов в трансгенных дрозофилах с интегрированным в геном нормальным и мутантным (изменение сигнала ядерной локализации - NLS) чужеродным геном VP2.	75
ВЫВОДЫ	84
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	85
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.	96
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.	103

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. За долгое время совместной эволюции с организмом-хозяином вирусы смогли развить самые разнообразные стратегии проникновения в хозяйский организм и развития инфекции. Параллельно с этим организмы, подверженные вирусной инфекции, создавали все новые способы защиты. Вирусы, как внутриклеточные паразиты, в большинстве случаев используют для своего развития молекулярные процессы, в норме протекающие в здоровой клетке организма-хозяина. С другой стороны, реакции «домашнего хозяйства» также способны выполнять противовирусные функции (Samuel, 2011; Klymenko *et al.*, 2012). В последнее время появляется все больше новых данных, указывающих на возможность использования организмом реакций, обеспечивающих его нормальную жизнедеятельность, для борьбы с инфекцией (Lynch *et al.* 2004; Bronkhorst *et al.*, 2012), например, сплайсинг вирусной РНК и РНК-редактирование. Таким образом, изучение данного защитного ресурса высших организмов может позволить выявить не только новые способы борьбы с вирусными инфекциями, но и решать широкий круг фундаментальных научных задач.

Геном вирусов кодирует структурные белки, формирующие капсид, и неструктурные белки, которые выполняют самые разнообразные функции, напрямую не связанные с формированием белковой оболочки. Помимо формирования капсида, выполняющего функцию защиты генетического материала вирусов, структурные белки также участвуют во взаимодействии с рецепторами клетки и в процессах транспорта вирионов через цитоплазму с последующим проникновением в ядро. Кроме того, имеются указания на то, что белки капсида также способны взаимодействовать с внутриклеточными медиаторами, активируя разнообразные каскады внутриклеточных реакций (Iwanaga *et al.*, 2014). Есть основания предполагать, что данный мало изученный аспект взаимодействия «вирус-хозяин» может играть важную роль в противовирусных реакциях многоклеточных организмов.

Одним из подходов, позволяющих более глубоко изучать внутриклеточные взаимодействия капсидных белков, является их гетерологичная экспрессия. При этом используются разнообразные модели, от культур клеток до целых организмов. Данный подход позволяет изучать не только стандартные про- и противовирусные реакции, но также наблюдать за реакцией организма на экспрессию вирусного белка, который в естественных условиях не мог бы попасть в клетку, так как используемых в качестве модели организм в норме не является организмом-хозяином для исследуемого вируса. Плодовые мушки *Drosophila melanogaster* находят широкое применение в качестве модельного объекта для

подобного рода исследований (Hughes *et al.*, 2012). Это обусловлено большим объемом накопленных данных о генетике дрозофилы, относительной простотой содержания и манипуляций, возможностью получать трансгенные линии рутинными методами. Кроме того, известно, что многие рецепторы и каскады активации противовирусных реакций дрозофилы имеют сходство с таковыми у высших позвоночных и человека. Таким образом, гетерологичная экспрессия вирусных белков в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster* является адекватным подходом для изучения неинкапсидирующей активности вирусных структурных белков.

Парвовирусы обладают одним из самых малых по размеру капсидов среди известных вирусов и являются возбудителями заболеваний человека и животных (Fediere, 2000). В семействе выделяют два подсемейства: *Parvovirinae* и *Densovirinae*. Представители первого подсемейства поражают высших позвоночных и человека, второго - беспозвоночных, среди которых представители хозяйственно ценных видов, такие как тутовый шелкопряд и креветки рода *Penaeus*. Вирусы подсемейства *Parvovirinae* изучены в гораздо большей степени, нежели денсовирусы, для которых многие вопросы, касающиеся их жизнедеятельности, остаются открытыми. Денсовирусы обладают простым по строению регулярным икозаэдрическим капсидом, что делает их привлекательным объектом для создания модифицированных вирусоподобных частиц, способных выступать в качестве неинфекционных агентов доставки различных субстанций в клетку и высокоэффективных векторов. Кроме того, более глубокое понимание биологии денсовирусов позволит эффективнее бороться с заболеваниями хозяйственно ценных видов, а также использовать их в качестве средства борьбы с различными вредными насекомыми (Afanasiev *et al.*, 1994). Денсовирус рыжего таракана (BgDV1) является удобным объектом для решения задач данного исследования.

Степень разработанности темы исследования. Представители подсемейства *Parvovirinae* являются объектом пристального внимания исследователей. К настоящему времени получено много данных о биологии отдельных представителей, патогенезе вызываемых заболеваний, ключевых этапах жизненного цикла (Bergoin, 2000; Cotmore, 2007; Parrish, 2010). В тоже время, к настоящему времени опубликовано довольно мало работ, посвященных ключевым этапам развития инфекции денсовирусов, организации капсидов, рецепторов распознавания, а так же об активируемых представителями данного подсемейства вирусов противовирусных реакциях. Денсовирусы являются причиной заболеваний с высокой степенью летальности, и в данной работе рассматривается одна из возможных причин данного явления. Кроме того, исследования в области денсовирусов до

некоторой степени ограничены отсутствием адекватной модельной системы. Предложенный в данной работе подход может облегчить возможность изучения ядерно-цитоплазматического транспорта денсовирусов. Выше мы упоминали о процессах, протекающих в клетке в норме, которые могут иметь провирусную и антивирусную функции. Гетерологичная экспрессия вирусных белков используется для решения достаточно широкого спектра задач (Kushnir, 2012), однако использование трансгенных линий дрозофилы для изучения новых функций капсидных белков, не связанных со структурной функций, является малоизученным направлением исследований, что позволяет надеяться на получение новых данных о, в частности, активации реакций «двойного назначения» в клетке.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы было изучить внутриклеточный трафик и генетический контроль экспрессии генов капсидных белков денсовируса BgDV1 в гетерологичных системах: культурах клеток млекопитающих и трансгенных линиях *D. melanogaster*. В соответствии с целью работы был сформулирован ряд задач:

1. Исследовать внутриклеточную локализацию капсидных белков BgDV1 (VP1, VP2 и VP3) в процессе транзиторной экспрессии векторных конструкций в пересеваемых культурах клеток млекопитающих (HeLa и Cos1).
2. Методом сайт-направленного мутагенеза изменить предсказанные методами *in silico* сигналы ядерной локализации (NLS) и ядерного экспорта (NES) капсидных белков BgDV1. Показать функциональную значимость этих доменов в регуляции внутриклеточного трафика капсидных белков.
3. Получить трансгенные линии дрозофил, содержащие в своем геноме как нативные последовательности кДНК капсидных белков VP2 и VP3 денсовируса, так и последовательности кДНК VP2 с нарушенным сигналом ядерной локализации и нарушенным донорным сайтом альтернативного сплайсинга.
4. Описать особенности экспрессии нативных и мутантных вариантов кДНК вирусных капсидных белков в трансгенных линиях дрозофилы.
5. Методами параллельного секвенирования (NGS) и амплификации в реальном времени описать различия паттернов генных активностей (транскриптомов) трансгенных дрозофил, обусловленные особенностями внутриклеточной локализации капсидного белка VP2.

Научная новизна работы. Впервые показана возможность использования пересеваемых клеточных культур клеток млекопитающих для изучения внутриклеточного транспорта капсидных белков денсовируса насекомых. Впервые экспериментально показана функциональная значимость, предсказанных методами *in silico*, сигналов ядерного транспорта (NLS и NES) капсидных белков BgDV1.

Впервые получены трансгенные линии дрозофил, содержащие в геноме как нативные последовательности кДНК капсидных белков денсовируса, так и последовательности с нарушенным сигналом ядерной локализации и донорным сайтом сплайсинга. Уникальность полученных линий заключается в том, что интегрированный в геном чужеродный генетический материал сравниваемых линий различается на один нуклеотид.

Показано, что при экспрессии кДНК одного из капсидных белков (VP2) денсовируса рыжего таракана в тканях трансгенных дрозофил происходит сплайсинг транскрипта, препятствующий образованию нативного белкового продукта. Предполагается, что выявленный тип сплайсинга может являться ранее неописанным защитным механизмом, препятствующим развитию вирусной инфекции.

Впервые установлено, что изменение внутриклеточной локализации капсидного белка денсовируса рыжего таракана, экспрессируемого в трансгенных линиях *D. melanogaster*, значительно влияет на паттерн генных активностей организма-хозяина. В частности, происходит изменение активности генов, ответственных за врожденный иммунный ответ организма.

Теоретическая и практическая значимость работы. Объектом исследования диссертационной работы являлся денсовирус рыжего таракана (BgDV1), относящийся к семейству *Parvoviridae*. Вирусы этого семейства разделяют на два подсемейства - *Parvovirinae* и *Densovirinae*. Большая часть вирусов подсемейства *Parvovirinae* является возбудителями опасных заболеваний человека, сельскохозяйственных и домашних животных. Представители подсемейства *Densovirinae* инфицируют беспозвоночных животных. Вирусы обоих подсемейств являются родственными и характеризуются схожестью структурно-функциональной организации генома и жизненного цикла. Очевидно, что беспозвоночные животные, инфицированные денсовирусами, либо культуры клеток и трансгенные животные, экспрессирующие на определенной стадии развития конкретные вирусные белки, могут рассматриваться в качестве удобной модели для изучения особенностей патогенеза, характерных для всех (либо большинства) представителей семейства *Parvoviridae*. Отметим, что исследование денсовирусов представляет самостоятельный практический интерес, поскольку некоторые из них инфицируют

насекомых и ракообразных, представляющих экономический интерес (тутовый шелкопряд, креветки), кроме того, определенные виды денсовирусов могут рассматриваться в качестве эффективных биологических агентов для борьбы с вредными для человека насекомыми, например, объект исследования данной работы - денсовирус рыжего таракана.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Основные результаты диссертации были представлены на российских и международных конференциях в том числе: V международной школе «Непостоянство генома» (Звенигород, 2012), международной конференции «Биоресурсы и вирусы» (Киев, 2013), 5-ой международной конференции EMBO meeting (Amsterdam, 2013), 15-ой международной конференции Biennial International Parvovirus Workshop (Bordeaux, 2014).

Положения, выносимые на защиту.

1. Культуры клеток млекопитающих могут быть использованы в качестве модельного объекта для изучения внутриклеточного транспорта капсидных белков денсовирусов.
2. Белки капсида BgDV1 обладают функциональными сигналами ядерной локализации и ядерного экспорта.
3. Гетерологичная экспрессия белка капсида BgDV1 приводит к активации предположительно антивирусного защитного механизма, выражающегося в сплайсинге гетерологично экспрессируемого гена белка капсида VP2.
4. Удаление сигнала ядерной локализации в последовательности белка VP2 при гетерологичной экспрессии гена VP2 в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster* приводит к значительному изменению паттерна транскрипции генома дрозофилы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Козлов Е.Н, Мартынова Е.У., Рощина Н.В., Каракозова М.В. и Муха Д.В. (2016) Экспрессия кДНК гена капсидного белка VP2 денсовируса рыжего таракана в трансгенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика, том 52, № 4, с. 504–509.
2. Козлов Е.Н. и Муха Д.В. (2015). Культура клеток млекопитающих как модель для изучения внутриклеточного транспорта белков денсовирусов // Генетика, том 51, № 2, с. 271–276.
3. Kozlov E.N., Martynova E.U., Kapelinskaya T.V., Mukha D.V. (2014) Genetic control of the expression of *Blattella germanica* densovirus capsid proteins in transgenic *Drosophila melanogaster*: the role of the mechanisms of alternative slicing and RNA editing in the host antiviral defense. Abstract book of the 15th Biennial International Parvovirus Workshop, 22 – 26 June, Bordeaux, France, P. 37.

4. Kozlov E.N. (2013) Splicing and RNA-editing: mechanisms of antiviral defense in *Drosophila melanogaster*. Abstract book of the 5-th EMBO Meeting, Amsterdam, 21-24 September, P. 201.
5. Kozlov E.N., Martynova E.U., Kapelinskaya T.V., Mukha D.V. (2013) Post-transcriptional control of densoviral gene expression in transgenic flies *Drosophila melanogaster*: RNA editing and alternative splicing. Abstract book of the international conference «Bioresources and viruses», Kiev, 10-13 August, pp. 111–112.
6. Мартынова Е.У., Козлов Е.Н., Муха Д.В. (2012) Наночастицы: перспективы использования в медицине и ветеринарии // Успехи современной биологии, 132, № 5, с. 435 – 477.
7. Martynova E.U., Kozlov E.N., Kapelinskaya T.V., Mukha D.V. (2012) The intracellular localization of regulatory and capsid proteins of the densovirus of German cockroach, *Blattella germanica* // The FEBS Journal, V. 279, Suppl. 1, P. 445.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика парвовирусов.

Парвовирусы являются одними из самых мелких вирусов животных. Согласно современной систематике все парвовирусы объединены в одно семейство - *Parvoviridae*. В данном семействе выделяют два подсемейства: *Parvovirinae*, представители данного подсемейства поражают позвоночных, и *Densovirinae*, которые могут инфицировать только беспозвоночные организмы.

Денсовирусы характеризуются наличием икосаэдрического капсида и отсутствием липопротеиновой оболочки. Малые размеры вирусных частиц накладывают известные ограничения на размер генома денсовирусов. Геном денсовирусов представлен линейной одноцепочечной молекулой ДНК (4.0–6.0 т. н.). На концах генома расположены инвертированные концевые повторы (ITR), которые служат в качестве затравок для репликации вирусного генома. Данные концевые повторы могут образовывать шпильчатые структуры различной морфологии, что служит одним из критериев классификации (Bergoin M. and Tijssen P., 2000).

Геном парвовирусов может быть униполярным и амбиполярным. При амбиполярности генома открытые рамки считывания (ORFs) белков денсовирусов располагается как на (-), так и на (+) цепи ДНК. В данном случае для некоторых вирусов наблюдается перекрывание открытых рамок считывания регуляторных и структурных белков (Abd-Alla *et al.*, 2004). В капсиды упаковывается как (+), так и (-) цепи. При выделении вирусной ДНК в растворах с высокой ионной силой образуется двухцепочечная ДНК. При униполярной организации генома ORFs вирусных белков располагаются на одной цепи ДНК.

Подсемейство *Densovirinae* включает в себя представителей, которые инфицируют беспозвоночные организмы, в том числе и такие хозяйственно ценные виды, как тутовый шелкопряд (*Bombyx mori*) (Li *et al.*, 2001) и креветки рода *Penaeus* (Shike *et al.*, 2000). Так же вирусы данного подсемейства могут инфицировать насекомых, которые представляют опасность для человека, в частности, являются синантропными переносчиками различных заболеваний (комары рода *Aedes*, рыжий таракан *Blattella germanica*) (Afanasiev *et al.*, 1994; Mukha *et al.*, 2006). Денсовирусы являются значительно менее изученной группой, чем парвовирусы, что, отчасти, обусловлено спецификой поражаемых ими организмов. Данные вирусы обладают высокой видоспецифичностью и тканеспецифичностью, что обуславливает трудности в их изучении (Fediere, 2000). В связи с малыми размерами генома денсовирусов и

малой кодирующей емкостью денсовирусы используют различные подходы к экспрессии вирусных белков. Это достигается за счет сплайсинга транскриптов вирусных РНК, наличия альтернативных сайтов терминации транскрипции, а также реализации механизма «leaky-scanning», при котором трансляция белка начинается не с первого метионина соответствующей ORF (Fediere *et al.*, 2004; Tijssen *et al.*, 2003). Для структурных и неструктурных белков имеются отдельные промоторы, части последовательности промоторов находятся в инвертированных концевых повторах (Fediere, 2000).

Вирионы парвовирусов состоят только из белкового капсида и одноцепочечной молекулы ДНК. Капсид парвовирусов обладает икосаэдрической симметрией. Икосаэдр - многоугольник, имеющий 20 граней, каждая из которой представляет собой правильный треугольник. Также у икосаэдра имеется 12 вершин и оси симметрии 5, 3 и 2 порядка. Данный тип симметрии обозначается как «симметрия 5-3-2» (Almendral, 2013). Оси пятого порядка проходят через вершины, третьего - через середины граней, второго - через середины ребер граней. Было показано, что каждая грань должна состоять из определенного числа так называемых ассиметричных единиц, которые представляют собой участок поверхности, через который не проходит ни одна ось симметрии икосаэдра. Поскольку таких осей 60, то минимальное количество ассиметричных единиц не должно быть меньше данного значения (Parrish, 2010). В простейшем случае каждая ассиметричная ячейка представлена одной субъединицей капсидного белка. Однако, капсиды со строгой икосаэдрической симметрией не позволяют включать во внутреннюю сферу оболочки геномы размером более 4 т.п.н. Увеличение размера субъединицы не дает ощутимого выигрыша по внутреннему объему, поскольку происходит пропорциональный рост толщины белковой оболочки (Afanasiev *et al.*, 1994). Реальное увеличение внутреннего объема икосаэдра достигается при условии использования большего количества субъединиц капсидных белков в одной ассиметричной ячейке (Bergoin and Tijssen, 2000). Для характеристики ячейки, составляющей грань икосаэдра, было введено понятие числа триангуляции (Т). Данный показатель характеризует количество ячеек, которые в совокупности образуют одну грань икосаэдра. Например, для капсида с Т=3 количество субъединиц, каждая из которых составляет ячейку, будет равно 180. Таким образом, общее количество субъединиц с квазиикосаэдрической симметрией всегда будет кратно 60 (Cotmore, 2007). На рисунке 1А представлены капсиды парвовирусов, для которых была определена структура. Строение капсида денсовирусов обладает рядом отличий от парвовирусов позвоночных. Вирусные частицы являются более гладкими по сравнению с парвовирусами, в районе прохождения оси симметрии третьего порядка отсутствуют

значимые выступы поверхности, в район прохождения оси симметрии пятого порядка находится пора, через которую может происходить выход генома вируса при попадании в клетку. В отличие от парвовирусов позвоночных, у которых в канале локализуется глицин-богатый домен белка VP3, у денсовирусов он, судя по всему, является пустым, то есть не содержит каких-либо структурных элементов капсидных белков. Также для денсовирусов характерно наличие «каньона» в районе прохождения оси симметрии пятого порядка. Под «каньоном» понимают достаточно протяженное и узкое углубление в поверхности капсида.

К настоящему моменту с помощью методов рентгеноструктурного анализа и электронной криомикроскопии получена структура капсидов многих парвовирусов, показано, что для всех изученных вирусов этого семейства характерна икосаэдрическая симметрия. Капсид парвовирусов может включать различное количество капсомеров – от 12 до 30, которые представляют собой пентамеры и гексамеры, и является одним из наиболее мелких капсидов вирусов с диаметром 18 - 25 нм. Каждый капсомер может состоять из 1 - 3 субъединиц, которые представляют собой вирусные структурные (капсидные) белки. Парвовирусы обладают различным составом структурных белков, капсид может состоять из одного, двух, трех и четырех белков в различных пропорциях. Структурные белки

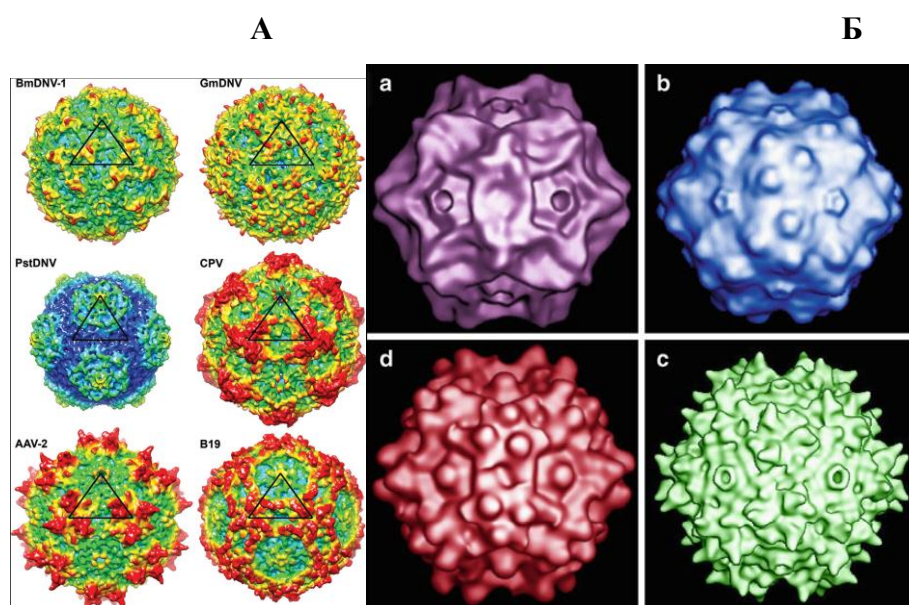


Рисунок 1. Строение капсидов парвовирусов. А – сравнение строения капсидов денсовирусов (BmDENV-1, GmDENV, PstDENV) и парвовирусов (CPV, AAV-2, B19). Поверхность капсида построена на основании трехмерных карт электронной плотности, созданных на основе атомных координат при разрешении 8 ангстрем. Одна ассиметричная икосаэдрическая единица обозначена черным треугольником. Цвета отображают расстояние от центра капсида (синий – 100 Å, голубой – 107.5 Å, зеленый – 115 Å, желтый – 122.5 Å, красный – 130 Å) (Kaufmann *et al.*, 2011). Б – изображение выровненных поверхностей капсидов вирусов CPV (a), AAV5 (b), ADV (c) и AAV2 (d), вид со стороны оси симметрии второго порядка, разрешение – 21 Å (Parrish, 2010).

парвовирусов обозначаются как VP1, VP2, VP3 и VP4, где цифра указывает на размер белка (VP1 является наибольшим по молекулярной массе белком). Капсид денсовирусов обладает икосаэдрической симметрией ($T=1$), состоит из 12 капсомеров и включает в себя 60 белков. В капсиде преобладают белки с наименьшей молекулярной массой. Минорную часть капсида составляют более крупные белки, которые содержат в себе общие С-концевые части, идентичные основному структурному белку, и уникальные N-концевые участки, выполняющие функции, необходимые для развития продуктивной инфекции (Corsi *et al.*, 1996). Белки капсида обладают общей С-концевой частью и уникальными N-концевыми участками. Общий для всех структурных белков фрагмент участвует в формировании корового элемента субъединицы, который состоит из восьми антипараллельных β -слоев, образующих цилиндр (Simpson *et al.*, 1998; Kaufmann, 2011). Участки аминокислот между слоями формируют петли, которые могут участвовать как в образовании взаимодействий между субъединицами, так и в процессах взаимодействия с рецепторами клеток хозяина, в транспорте вирусных частиц в цитоплазме клеток. В участках белковой цепи, которая не обладает строго упорядоченным строением, были обнаружены, так называемые, молекулярные переключатели, которые представляют собой короткие участки аминокислот, структурированные в составе одной субъединицы и не имеющие таковой в соседней. Данные переключатели способствуют формированию как гексамеров, так и пентамеров капсида (Bergoin and Tijssen, 2000).

Аминокислотные последовательности структурных белков (VP) содержат в себе консервативные мотивы, которые встречаются у всех изученных парвовирусов. В N-терминальном участке VP обнаружен серин-треонин-глициновый мотив. Данный участок располагается в углублении с внешней стороны капсида в области симметрии 5-го порядка. Его характерной особенностью является подвижность, что обеспечивает возможность изменения положения расположенных далее уникальных участков более крупных белков, а также возможно участие данного мотива в качестве молекулярных переключателей, обеспечивающих взаимодействие асимметричных ячеек (Tijssen and Bergoin, 1995; Bergoin and Tijssen, 2000). У всех белков парвовирусов с наибольшей молекулярной массой присутствует мотив, сходный по строению с доменом фосфолипазы A_2 . Функцией фосфолипаз является отщепление жирной кислоты от фосфолипидов во втором положении, что приводит к образованию лизофосфолипидов. Показано, что для протекания этой ферментативной реакции необходимо присутствие ионов кальция. Замены аминокислот в фосфолипазном домене приводят к нарушению внутриклеточного трафика вирусных частиц (Zadori *et al.*, 2001). Участие данного домена в развитии продуктивной инфекции далее будет

рассмотрено более подробно. VP некоторых денсовирусов имеют кластеры незаряженных аминокислот с высоким содержанием глицина. Можно предположить, что данные участки служат субстратом для протеолитической активности протеаз, что может приводить к образованию более коротких форм VP.

VP денсовирусов содержат аминокислотные последовательности, сходные по структуре с сигналами ядерной локализации, обнаруженном, в частности, в большом Т-антигене вируса SV40 (Afanasiev *et al.*, 1991). Поскольку развитие парвовирусов очень тесно связано с ядерным компартментом клетки, логично предполагать, что вирусные белки должны попадать в ядро, где в дальнейшем происходит сборка капсида и упаковка в него ДНК. Действительно, для всех многих изученных парвовирусов была показана ядерная локализация капсидных белков (Afanasiev *et al.*, 1994).

В составе общей С-концевой части VP парвовирусов присутствует консервативный домен Denso_VP4. Данная последовательность отвечает за формирование корового структурного элемента капсида (Kaufmann, 2010).

Капсид парвовирусов чрезвычайно устойчив к факторам внешнего воздействия, таким как нагрев до 65⁰С в течение длительного времени, воздействие высоких и низких значений рН, а также обработка ионными детергентами (Mani *et al.* 2007). К данному моменту пока не установлено, как взаимодействует ДНК вируса с капсидом. Предположительно, генетический материал заключен внутри полости капсида без образования химических связей с белками капсида.

Кроме структурных белков геном парвовирусов кодирует неструктурные белки, которые не участвуют в образовании капсида, но играют важную роль в жизненном цикле вируса. Данные белки обозначаются NS1, NS2, и NS3. Главный неструктурный белок NS1 встречается у всех парвовирусов и на данный момент его строение и функции изучены наиболее полно. Показано, что белок NS1 денсовирусов может участвовать в репликации вирусного генома, а также регулировать экспрессию структурных и неструктурных белков (Afanasiev *et al.*, 1991; Shike *et al.*, 2000). Белок NS1 обладает цитотоксическими свойствами и может индуцировать апоптоз (Tal and Attathom, 1993). Для NS1 также характерно ковалентное присоединение к 5'-концу ДНК, тем самым этот белок участвует во встраивании вирусного генома в капсид.

В аминокислотной последовательности NS1 денсовирусов обнаружены участки, которые характерны для инициаторных белков, участвующих в процессах инициации и терминации репликации по типу «катящейся шпильки». Мотив uHuHuuu (где u-гидрофобные аминокислоты) необходим для связывания ионов металлов с белками,

ответственными за связывание с ДНК. Мотив $uxxYuxxxK$ (где x - любая аминокислота), где тирозин участвует в нуклеазной активности (Ding *et al.*, 2002). Оба мотива находятся в N-концевом участке NS1. Трехчастный мотив, который характерен для хеликаз суперсемейства 3. Walker A-сайт $GxxxxGK(T/S)$ содержит лизин взаимодействующий с нуклеотид трифосфатами. Walker B-сайт $uuu(D/E)(D/E)$ необходим для связывания с кофакторами (ионами металлов), мотив расположен в C-концевой части белка. Установлено, что NS1 денсовирусов связывается с вирусной последовательностью $(GAC)_4$ в двухцепочечном участке в пределах ствола шпильки и делает односторонний разрыв в специфическом сайте в пределах ITR, используя в качестве субстрата одностороннюю ДНК. Считается, что этот участок может служить сайтом инициации репликации. Показано, что белок NS1 выполняет свою функцию в виде димера (Bergoin and Tijssen, 2000).

Функции белков NS2 и NS3 изучены сравнительно слабо. Для NS3 денсовируса бабочки *Junonia coenia* (JcDV) было показано, что аминокислотная последовательность белка содержит несколько консервативных доменов: два домена, характерных для цинковых пальцев, два возможных сайта гликозилирования и возможный сайт фосфорилирования (Abd-Alla *et al.*, 2004). Белок NS3 рано образуется в ходе репликативного цикла, и его количество увеличивается параллельно с увеличением количества репликативных форм вирусной ДНК. Было обнаружено, что полноразмерный белок необходим для продуктивной инфекции, причем действует он на стадии репликации вирусной ДНК. Показано, что белок NS2 может трансаktivировать промотор структурных белков денсовирусов (Bergoin and Tijssen, 2000).

1.2. Систематика подсемейства *Densovirinae*.

В настоящее время описано около 40 представителей подсемейства *Densovirinae*, которые, согласно решению Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) объединены в 5 родов: *Ambidensovirus*, *Brevidensovirus*, *Hepandensovirus*, *Iteradensovirus*, *Penstyldensovirus* (Cotmore et al, 2014). Для каждого вируса предложено сокращенное обозначение, например, денсовирус дымчатого коричневого таракана *Periplaneta fuliginosa* обозначается как PfDV. Далее мы более подробно рассмотрим особенности строения, организации генома и стратегии экспрессии каждого рода.

В род *Ambidensovirus* объединены денсовирусы, которые обладают амбиполярным геномом. К представителям относятся вирусы, поражающие представителей различных отрядов насекомых: Таракановых (*Periplaneta fuliginosa* денсовирус - PfDV, *Blattella germanica*

densovirus 1 - BgDV1), Двукрылых (*Culex pipens* densovirus - CpDV), Полужесткокрылых (*Planococcus citri* densovirus - PcDV) и Чешуекрылых (*Diatraea saccharalis* densovirus - DsDV, *Galleria mellonella* densovirus - GmDV, *Helicoverpa armigera* densovirus - HaDV1, *Junonia coenia* densovirus - JcDV, *Mythimna loreyi* densovirus - MIDV, *Pseudoplusia includens* densovirus - PiDV). На примере вирусов *Periplaneta fuliginosa* densovirus, *Galleria mellonella* densovirus и *Junonia coenia* densovirus мы рассмотрим особенности организации генома и жизненного цикла данного рода.

Вирус GmDV был первым обнаруженным парвовирусом беспозвоночных и обладает амбиполярным геномом размером 6039 п.н., на концах которого присутствуют инвертированные повторы длиной 550 п.н. Данные последовательности образуют Y-подобную шпильчатую структуру, которая служит матрицей для начала репликации (Tijssen *et al.*, 2003). Концевые повторы могут существовать во «флип» и «флоп» ориентациях. При транскрипции вирусного генома образуются две РНК (2,5 тн и 1,8 тн), соответствующие белкам NS, и одна РНК (~2,6 тн), соответствующая белкам VP. Большинство регуляторных элементов промотора располагаются в концевых повторах. 5'-нетранслируемая область для структурного транскрипта довольно коротка и составляет 5 нуклеотидов, в то время как для неструктурных транскриптов она составляет 82 и 84 нуклеотида (Tijssen *et al.*, 2003). Транскрипты для VP и NS перекрываются 3'-концами на участке длиной в 60 нуклеотидов. Возможно, формируемая в результате транскрипции перекрываемого района «+» и «-» цепей ДНК, двунитевая РНК имеет регуляторную функцию. Вирус GmDV экспрессирует 3 неструктурных белка (NS1, NS2, NS3), NS1 и NS2 транслируется со сплайсированного транскрипта длиной 1,8 тн посредством «leaky-skinning» механизма, в то время как белок NS3 транслируется с несплайсированного транскрипта, начало трансляции происходит со старт-кодона, который расположен непосредственно за ITR.

Сплайсинга транскрипта структурных белков не наблюдается, однако, все четыре структурных белка, которые транслируются с последовательных AUG кодонов, образуются либо за счет «leaky-skinning» механизма, либо протеолитического расщепления белков, или в результате рибосомного сдвига. Вопрос о конкретном механизме пока остается открытым.

JcDV также обладает амбиполярным геномом размером 5908 нуклеотидов, на концах которого расположены инвертированные повторы по 96 нуклеотидов, которые формируют Y-подобную шпильку и могут существовать во «флип»- и «флоп»-ориентациях (Hanh *et al.*, 2013). При изучении регуляции транскрипции данного вируса было установлено, что в его геноме имеется два промотора: P9 и P93, соответственно для структурных и неструктурных белков. Был обнаружен один транскрипт для структурных белков, и два для неструктурных,

размером 2,5 тн (данный транскрипт не сплайсируется, с него происходит трансляция NS3) и 1,7 тн (с данного сплайсированного транскрипта транслируются NS1 и NS2). Транскрипт для структурных белков обладает очень короткой 5'-нетранслируемой областью (всего 3 нуклеотида), в то время как у двух мРНК неструктурных белков - 83 и 86 пн, соответственно (Wang *et al.*, 2013). Транскрипты для VP и NS имеют перекрытие в 3'-области размером 61 пн. Стоит отметить, что капсид также состоит из 4 структурных белков, которые считываются с одного транскрипта с помощью «leaky- skinning» механизма (Bruemmer *et al.*, 2005; Shirk *et al.*, 2007).

Вирус PfdV имеет геном размером 5455 п.н., на концах ДНК содержатся инвертированные концевые повторы (ITRs) длиной 202 п.н. В составе ITRs присутствуют палиндромные последовательности длиной 120 п.н., которые формируют простую шпильчатую структуру. В геноме содержатся 6 ORFs. Три ORFs - α , β , γ - кодируют транскрипты для неструктурных белков, другие три рамки- 1, 2, 3- структурные белки (Guo *et al.*, 2000). Для неструктурных белков было обнаружено два промотора (p3 и p18), у структурных белков имеется один промотор - p97. Кроме того, у неструктурных белков имеется один функциональный сайт полиаденилирования, в то время как для структурных белков их было обнаружено четыре. Разнообразие регуляторных белков формируется за счет сплайсинга первичных транскриптов, в то время как различные структурные белки образуются за счет альтернативных сайтов терминации транскрипции и начала трансляции (Yamagishi *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2008). Капсид состоит из 5 белков, что является уникальным случаем среди денсовирусов.

К роду *Ambidensovirus* также относится вирус денсонуклеоза рыжего таракана *Blattella germanica* densovirus 1 (BgDV1). Строение его генома, особенности жизненного цикла и стратегия экспрессии более подробно будут рассмотрены ниже.

Род *Brevidensovirus* включает в себя вирусы, которые поражают насекомых из отряда двукрылых. К этим насекомым относятся комары *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* и *Anopheles gambiae*. Данные насекомые могут являться переносчиками таких заболеваний, как лихорадка Денге, малярия, лихорадка западного Нила, которые характеризуются тяжелым течением и высокой смертностью заболевших (Carlson *et al.*, 2006). В связи с этим, представляет большой интерес возможность использования денсовирусов как средства борьбы с данными вредоносными насекомыми. Рассмотрим особенности организации генома и стратегии экспрессии, представленные в данном роде, на примере двух вирусов: *Aedes aegypti* densovirus (AaeDV1) и *Culex pipiens pallens* densovirus (CpDV). Помимо названных представителей к данному роду относятся следующие вирусы:

AalDV1 (AY095351), AgDV (EU233812), AaeDV2 (FJ360744) AalDV2 (X74945), (AalDV3), (AY31087), HeDV (AY605055). В скобках обозначены выходные данные нуклеотидных последовательностей из GenBank.

Вирус AaeDV1 вызывает заболевания личинок и взрослых насекомых с характерной паталогической картиной и высоким уровнем смертности. Данный вирус обладает сравнительно небольшим (4009 пн) униполярным геномом, на концах которого расположены инвертированные повторы. Отличительной особенностью данного вируса является то, что TIRs 5'- и 3'-частей содержат уникальные последовательности и отличаются по размерам: 164 нуклеотида для 5'- и 146 нуклеотида для 3'-области. Данные повторы формируют T-образную шпильку. Вторичная структура на 5'-конце генома обладает более высокой стабильностью за счет большего содержания GC- пар. Как и у других известных парвовирусов, в левой части генома располагается ORF для структурных белков, которых у AaeDV1 обнаружено два, также для них описан отдельный промотор p6 (Ward *et al.*, 2001). Капсид состоит из двух белков – VP1 и VP2, которые транслируются с ORF, расположенной в правой части генома. Данные белки транслируются с одного транскрипта, затем белок VP2 образуется посредством протеолитического расщепления белка VP1. Для структурных белков так же был обнаружен отдельный промотор - p67. Таким образом, AaeDV1 обладает уникальными особенностями организации генома, которые выделяют его среди других парвовирусов (Cheng, 2007).

Другим представителем данного рода является вирус *Culex pipiens pallens* densovirus, который поражает комаров и значительно отличается своей организацией от описанного ранее вируса москитов. Геном CppDV составляет 5769 п.н и является амбиполярным на концах которого расположены инвертированные повторы размером 285 пн. Данные последовательности формируют J- подобную шпильку, функция которой также, как и у других парвовирусов, заключается в формировании точки начала репликации вирусного генома (Zhai *et al.*, 2008). Схема экспрессии неструктурных белков отличается от таковой других представителей данного рода. Левая часть генома, кодирующая NS, содержит шесть открытых рамок считывания и два промотора p7 и p17. мРНК, с которой транслируется NS3, транскрибируется с промотора p7, размер транскрипта - 2,4 т.н. Транскрипт размером 1,8 т.н, промотором для которого является p17, образуется в результате спласинга мРНК, при котором ORF2 и ORF2', ORF3 и ORF3' объединяются (Baquerizo-Audiot *et al.*, 2009). При этом стоит отметить, что считывание NS2 начинается со старт кодона, расположенного через 52 нуклеотида от старт-кодона NS1, в то время как для большинства описанных денсовирусов данное расстояние составляет всего несколько нуклеотидов.

Капсид CppDV состоит из четырех белков, которые транслируются с единственной мРНК размером 2,2 тн. Размеры данных белков – 90, 64, 57 и 12 кДа, при этом белок VP4 довольно мал, чтобы быть включенным в капсид из 60 белковых субъединиц с сохранением структуры, по этой причине выдвигается предположение, что данный белок является продуктом протеолитического распада (Baquerizo-Audiot *et al.*, 2009).

Род *Hepandensovirus* включает вирусы, поражающие виды *Penaeus monodon*, *Penaeus chinensis* и *Penaeus merguensis*. Депонированные в GenBank нуклеотидные последовательности данных вирусов имеют следующие обозначения: PmoHDV1 (DQ002873), PchDV (AY008257), PmoHDV2 (EU247528), PmoHDV3 (EU588991), PmeDV (DQ458781), PmoHDV4 (FJ410797), FchDV (JN082231). Ранее данный род носил название гематопанкреатического парвовируса креветок, отражая название вызываемого заболевания гематопанкреатического синдрома (HPV). *Penaeus monodon hepandensovirus* имеет униполярный геном размером 6,3 тпн, в капсид упаковываются цепи противоположной полярности равновероятно. В терминальных участках расположены ITRs, различающиеся по размерам в 5'- и 3'- области: 224 и 44 пн, соответственно (Sukhumsirichart *et al.*, 2006). В геноме присутствуют три ORF - левая, правая и средняя. Левая и средняя кодируют белки NS1 и NS2 (функция данного белка до конца не выяснена). Правая ORF кодирует единственный структурный белок капсида - VP, молекулярная масса которого около 57 кДа (Safeena *et al.*, 2012). Как правило, капсиды денсовирусов состоят более чем из одного белка, таким образом, данная особенность выделяет представителей рода *Hepandensovirus* среди других денсовирусов. Для каждой ORF были обнаружены активные промоторы, кроме того, перед левой ORF была детектирована дополнительная рамка считывания, которая не транскрибируется. Функциональное значение данной ORF не установлено.

Второй род денсовирусов, вызывающих заболевания креветок - *Penstyldensovirus*. Ранее данный род имел название по наиболее распространенному заболеванию, которое вызывает данный вирус - инфекционный гиподермальный и гематопанкреатический вирус некроза креветок (IHNV). Депонированные в GenBank нуклеотидные последовательности представителей данного рода имеют следующие обозначения: PstDV1 (AF273215), PmoPDV1 (GQ411199), PmoPDV2 (AY124937), PstDV2 (GQ475529). Представители данного рода по своей организации близки к вышеописанному роду, но имеют и характерные особенности. ITRs также имеют различный размер, формируя T- подобную шпильку. Описаны три ORFs, которые расположены в геноме этого вируса аналогично вышеописанному способу у рода *Hepandensovirus*. Однако, например, у вируса *Penaeus stylirostris penstyldensovirus 1* (PstDV1), имеющего геном размером 3,9 тпн, с ORF, кодирующей структурный белок, образуется

четыре капсидных белка (Shike *et al.*, 2000). Вопрос о конкретном механизме синтеза капсидных белков различной длины остается дискуссионным. Представители двух данных родов подвергаются активному изучению, так как вызываемые ими заболевания наносят большой ущерб промысловому разведению креветок во всех регионах мира с их активной культивацией (Safeena *et al.*, 2012).

Представители последнего рода – *Iteradensovirus* – поражают чешуекрылых, таких как *Casphalia extranea*, *Sibine fusca* и имеющего большое экономическое значение тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Первый изолят данного вируса был выделен в Японии в префектуре Нагано, затем были обнаружены еще два изолята, которые отличались по структуре терминальных участков, и ранее данные изоляты относили к отдельному роду итераденовирусов. Характерной особенностью *Bombyx mori densovirus* (BmDV) является наличие на концах генома длинных ITRs (250 пн) и значительных по протяженности образующихся концевых шпилечных структур, имеющих форму «стебель- петля». Геном является разделенным, имеются ORFs для белков NS1 и NS2, а также ORF для VP. В капсиде присутствуют 4 белка, которые считываются с четырех последовательно расположенных AUG-кодонов в ORF с помощью механизма «leaky- skinning» (Li *et al.*, 2001). ORF для NS и VP перекрываются в своих 3'-участках. Для касет NS и VP были обнаружены отдельные промоторы и показана их функциональная активность. Часть регуляторных элементов промоторов входит в состав инвертированных повторов (Yu and Tijssen, 2014).

1.3. Денсовирус рыжего таракана (BgDV1).

Денсовирус рыжего таракана (BgDV1) был впервые обнаружен в 2000 году Муха Д.В. и Шалом К. при изучении тотальной ДНК тараканов линии Р6. Линия была получена из насекомых, отловленных на территории США и поддерживаемых в лаборатории в течении 5 лет (Муха и Шал, 2003). Размер генома BgDV1 составляет 5335 нуклеотидов. Структурно-функциональная организация генома BgDV1 имеет много общих черт с другими представителями подсемейства *Densovirinae*. BgDV1 имеет амбиполярный геном, на концах которого расположены ITRs размером 217 и 216 пн, расположенные на 5' и 3' концах, соответственно. Внутри концевых последовательностей выявлены палиндромные последовательности размером 192 пн (Mukha *et al.*, 2006). Палиндромные структуры формирует Т-подобную шпильку, которая служит точкой начала репликации вирусного генома. В левой части генома располагаются три открытые рамки считывания (ORF3 - ORF5) для неструктурных белков под контролем промотора P2, а в правой - две открытые

рамки считывания для структурных белков (ORF1, ORF2) под контролем промотора P1 (Капелинская и др., 2008).

Транскрипция структурных и неструктурных генов имеет четкую временную динамику. При изучении развития инфекции BgDV1 в культуре клеток таракана BGE-2 транскрипты неструктурных белков детектировали уже через три часа после инфекции, в то время как транскрипты структурных белков можно было обнаружить только через 5 дней после инфекции (Kapelinskaya *et al.*, 2011). Таким образом, на начальных стадиях инфекции экспрессируются белки, имеющие значение для регуляции репликации и транскрипции вирусного генома, на поздней стадии доминирует экспрессия капсидных белков.

Было описано три мРНК длиной 2302, 1644, и 872 нуклеотидов, соответствующих NS белкам. С большего по размерам транскрипта (2302 нуклеотидов) происходит считывание белка NS3. В транскрипте длиной 1644 нуклеотидов в результате сплайсинга удаляется 658 нуклеотидов: между 274 нуклеотидом (донорный сайт сплайсинга), который расположен на 7 нуклеотидов выше AUG-старт кодона ORF5, и 933 нуклеотидом (акцепторный сайт сплайсинга), расположенного сразу за стоп-кодоном ORF5. Таким образом, происходит полное удаление ORF5 и объединение ORF3 и ORF4. В результате сплайсинга между донорным сайтом в положении 274 и акцепторным сайтом в положении 1705 удаляется интрон размером 1430 нуклеотидов, что приводит к образованию транскрипта длиной 872 нуклеотида. Образующая при этом рамка считывания соответствует 3'-проксимальному участку ORF3. Старт транскрипции для всех мРНК, соответствующих NS белкам, располагается на расстоянии 24 нуклеотида от 5'-ITR, 5'-нетранслируемая область составляет 42 и 35 нуклеотида для несплайсированных и сплайсированных транскриптов. Общий для всех NS 3'-конец расположен на 2541 нк (Kapelinskaya *et al.*, 2011).

Для структурных белков также описано три мРНК длиной 2603, 2374 и 2,364 н. При этом два транскрипта образуются в результате сплайсинга с использованием одного общего акцепторного сайта и двух донорных. мРНК 2603 н. является несплайсированным транскриптом, содержащим ORF2, а в транскрипте длиной 2374 нуклеотидов в результате сплайсинга происходит объединение ORF1 и ORF2. 5'-нетранслируемая область VP транскриптов составляет всего 5 нуклеотидов (Kapelinskaya *et al.*, 2011). Стоит также отметить что 3'-концы транскриптов NS и VP перекрываются на протяжении 48 н, что можно наблюдать и у других представителей денсовирусов с амбиполярным геномом. Общая картина стратегии экспрессии денсовируса рыжего таракана представлена на Рисунке 2.

Капсид BgDV1 состоит из трех белков: VP1 - VP3 с молекулярной массой 100, 85/80 и 56 кДа. При исследовании белков капсида для белка VP2 наблюдалось превышение реального молекулярного веса, выявленного с помощью Вестерн блот гибридизации, над теоретически рассчитанным, а также присутствие двух белковых продуктов с массой 80 и 85 кДа, имевших, согласно данным масс-спектрометрии, одинаковые аминокислотные последовательности. Последующая гибридизация с моноклональными антителами к убиквитину показала наличие убиквитинирования белка VP2, чем объясняется наличие двух белковых продуктов. Белки VP1 и VP3 транслируются с одного сплайсированного транскрипта, причем VP3 транслируется со следующего в ORF старт кодона с помощью так называемого «leaky scanning» механизма. В VP1 присутствует последовательность домена

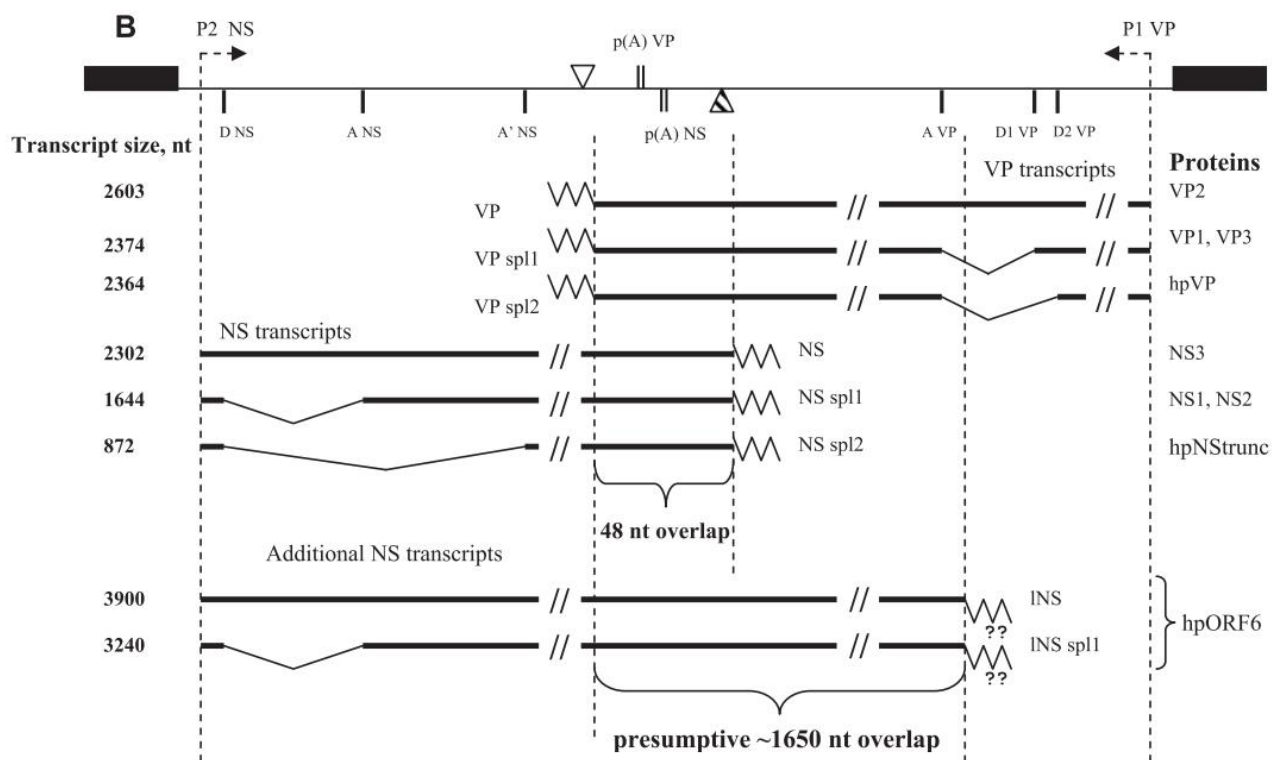
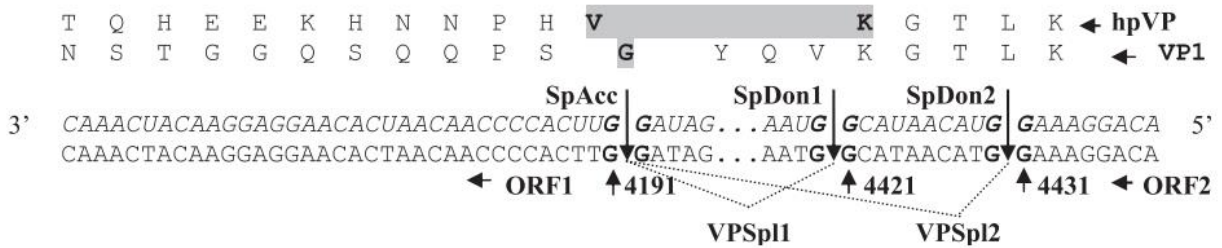
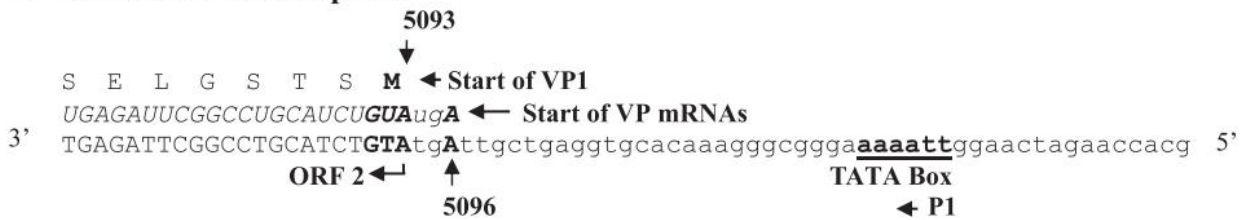


Рисунок 2. (часть 1).

G Details of splicing in VPsp1/VPsp2 transcripts

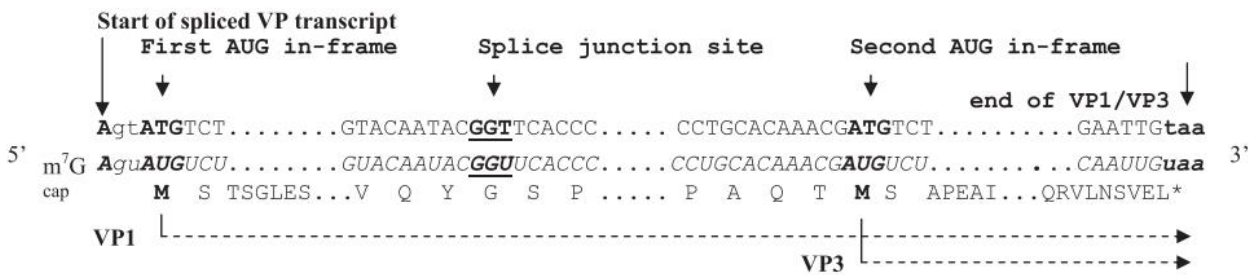


H Start of VP transcription



I VP proteins translation

(VP1 and VP3)



(VP2)

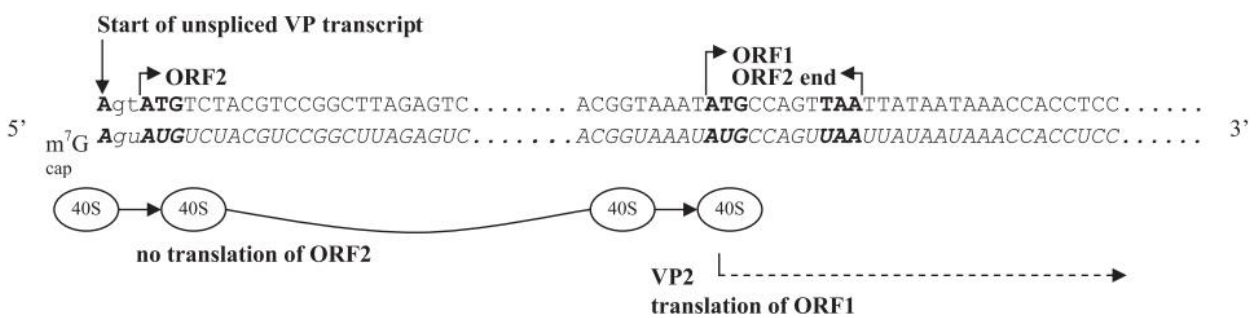


Рисунок 2. Схема транскрипции генома BgDV1 (фрагмент рисунка из Kapelinskaya *et al.*, 2011).

На шкале генома показаны промоторы P1 и P2, сигнал полиаденилирования [p(A)] (двойная вертикальная линия), места окончания транскрипции (перевернутые треугольники, пустой для VP и закрашенный для NS) и донорные (D) и акцепторные (A) сайты сплайсинга. ITRs показаны как черные прямоугольники. мРНК для VP и NS транскрибируется в противоположных направлениях, направление транскрипции указано стрелкой в соответствующем промоторе. Размеры для РНК транскриптов указаны слева, названия – возле окончания каждого транскрипта. Наклонные линии указывают участки, которые удаляются в процессе сплайсинга. Белки для каждого транскрипта

Рисунок 2 (продолжение). показаны справа. Поли (А) участки показаны зигзагообразной линией. Для дополнительных NS транскриптов, сигнал полиаденилирования которых не был подтвержден, в качестве обозначения использованы два знака вопроса. **С - Н:** схематическое изображение старта транскрипции NS и VP, сайтов терминации транскрипции и сайтов сплайсинга для соответствующих транскриптов. Числа на схеме соответствуют сайтам начала и конца транскрипции, донорным и акцепторным сайтам сплайсинга, а также начало и конец ORF. SpDon обозначает донорный сайт, SpAcc – акцепторный сайт сплайсинга, сайты обозначены вертикальными линиями, вырезаемые участки – наклонной пунктирной линией. На панели **С** одинаковые последовательности в концах первого экзона и интрона подчеркнуты. На панели **Ф** показан участок перекрывания NS и VP транскриптов размером в 48 нуклеотидов. В разделе **Г** представлены возможные механизмы, участвующие в синтезе капсидных белков BgDV1. Механизм «leaky-scanning» участвует в синтезе белков VP1 и VP3 с транскрипта VP1spl1, который содержит ORFspl. механизм «leaky-scanning» также может участвовать в синтезе VP2 с несплайсированного транскрипта VP, кодирующего ORF2 и ORF1.

фосфолипазы A₂, что характерно для многих представителей денсовирусов. Белок VP2 транслируется с несплайсированной мРНК, при этом первый в транскрипте AUG кодон из-за короткой UTR может пропускаться рибосомой, после чего трансляция начинается со следующего старт-кодона. Еще одной особенностью VP2 является наличие моноубиквитинирования, функция которого не ясна, но, по аналогии с другими вирусам, можно предположить, что данная модификация играет роль при интернализации вируса и формировании капсида (Kapelinskaya *et al.*, 2011).

BgDV1 также кодирует три неструктурных белка: NS1, NS2 и NS3 с молекулярной массой 60, 29 и 31 кДа, соответственно. Белок NS1 имеет высокую степень сходства с главным неструктурным белком парвовирусов, роль других неструктурных белков пока не установлена (Kapelinskaya *et al.*, 2011).

Белки капсида и неструктурные белки имеют в своих последовательностях сигналы ядерной локализации: РТККНКР и ККWK для капсидных белков и RRRKRR (243-248 аа для NS1). Показано, что данные сигналы обуславливают распределение вирусных белков в внутри клетки, при этом белок NS1 при его детекции в ядре имеет галлоподобное распределение, находясь у периферии ядра (Kapelinskaya *et al.*, 2011, Мартынова и др., 2014).

Стоит также отметить еще одну интересную особенность экспрессии генома BgDV1. Кроме описанных выше транскриптов NS белков также образуются два длинных NS транскрипта, размером 3900 и 3240 нуклеотидов. При этом транскрипция не оканчивается в области общего сигнала полиаденилирования и продолжается в область структурных белков. В данных транскриптах располагается ORF6, однако белок, кодируемый этой ORF, пока не обнаружен (Kapelinskaya *et al.*, 2011). Подобная ситуация уникальна для денсовирусов и функции длинных NS транскриптов пока не ясны. Наконец, убиквитинирование белка VP2

также является не описанным ранее явлением среди денсовирусов. Ни одна из гипотез, объясняющих значение данной модификации, к настоящему времени не подтверждена экспериментально.

1.4. Роль сплайсинга в реализации генетической информации парвовирусов.

По причине малых размеров ДНК парвовирусов вся необходимая для реализации жизненного цикла информация должна быть закодирована в весьма ограниченном объеме. Поэтому парвовирусы используют широкий спектр регуляции экспрессии своего генома для создания всего многообразия белков, взаимодействия с хозяином и временной регуляции своего жизненного цикла. Одним из этапов такой регуляции является регуляция на уровне транскрипции.

Транскрипция является важнейшим этапом реализации информации, закодированной в ДНК. Одним из значимых этапов процессинга РНК является сплайсинг первичного транскрипта. Данный процесс происходит в ядрах эукариотических клеток и обуславливает прерывистую структуру генов эукариот, которые содержат экзоны и интроны (кодирующие и некодирующие участки ДНК). При этом сплайсинг происходит сразу после транскрипции.

В целом механизм сплайсинга изучен достаточно хорошо. На Рисунке 3 представлена его общая схема сплайсинга.

Кратко, процесс сплайсинга состоит из ряда стадий и катализируется комплексами белков с РНК, которые называются малыми ядерными рибонуклеопротеиновыми частицами – мяРНП (Lerner *et al.*, 1980). Интроны имеют на своих концах специфичные последовательности. На первом этапе ОН-группа аденозинового остатка, расположенного в интроне, атакует и разрушает фосфодиэфирную связь на 5'-конце интрона. Одновременно с этим в интроне образуется новая связь, которая придает интрону лассо-подобную форму. Затем терминальная ОН-группа на 5'-конце интрона атакует связь на 3'-конце интрона, в результате чего два экзона соединяются. При этом удаляемый интрон быстро деградирует в ядре. Важную роль в процессе сплайсинга играют малые ядерные РНК (U1, U2, U4, U5 и U6), которые в совокупности с белками образуют комплекс сплайсосомы (Stamm *et al.*, 2005).

Сплайсинг имеет большое биологическое и эволюционное значение для эукариот и, в частности, многоклеточных организмов, позволяя увеличить информационную емкость ДНК и образовывать на одной цепи РНК несколько вариантов белков, что имеет место при альтернативном сплайсинге. Данный процесс может регулироваться на разных уровнях, при этом в последовательности РНК имеются участки, которые напрямую не связаны с интроном, но способны оказывать регулируемую роль (*cis* элементы). Основой для *trans*

регуляции служит многообразие белков, участвующих в формировании и регуляции работы сплайсосома (Hoskins, 2012).

Среди *cis* регуляторных элементов выделяют последовательности в РНК, которые либо усиливают сплайсинг по определенным сайтам («энхансеры сплайсинга» - ESE), либо приводят к подавлению сплайсинга по данным сайтам («гасители сплайсинга» - ESS). С последовательностями ESE могут взаимодействовать белки семейства SR, которые также принимают участие в сборке сплайсосома (Matlin *et al.*, 2005). В составе SR белков имеются мотивы связывания с РНК, а также серин-аргинин богатые последовательности - RS домены, которые также присутствуют у таких коровых элементов сплайсосома, как U2AF65 и U2AF35, а также у фактора регуляции сплайсинга *D. melanogaster* - *Tra* (Lopez, 1998).

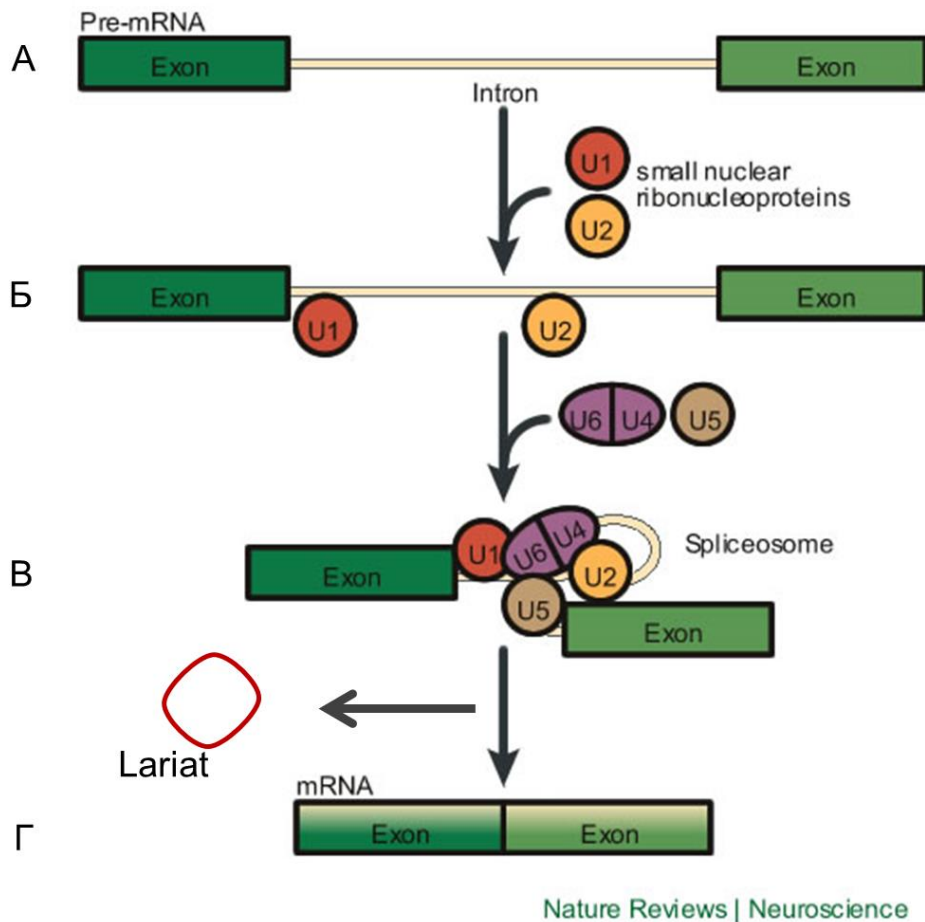


Рисунок 3. Общая схема сплайсинга (López, 2003, с изменениями). **А** - пре-мРНК. **Б** - связывание мРНК U1 и U2 с 5'-донорным сайтом и полипиримидиновым трактом интрона. Привлечение мРНК U4, U5 и U6, сближение интронов и формирование сплайсосома. **В** - удаление интрона с образованием кольцевой молекулы РНК – лариата. **Г**- зрелая мРНК.

ESS элементы имеют весьма вариабельные последовательности. Среди субстратов, способных связываться с ними стоит отметить комплексы гетерогенных ядерных РНК с

белками. Ярким супрессором сплайсинга является hnRNP A1, белок, связывающийся с полипиримидиновым трактом (PTB), а также фактор сплайсинга дрозофилы SXL (Wang and Bell, 1994). Как правило, ESS и ESE элементы участвуют в регуляции сплайсинга на ранних стадиях формирования сплайсосомы. К *cis* регуляторным элементам также относят пространственную структуру молекулы РНК, при формировании вторичной структуры которой может происходить сближение экзонов, которые будут иметь предпочтение для сплайсинга перед другими альтернативными вариантами. Все разновидности встречающихся экзонов можно условно на несколько групп (Matlin, 2005). К первой группе относятся так называемые кассетные экзоны, в этом случае части последовательности РНК могут независимо включаться и исключаться из последовательности мРНК. Ко второй группе относятся факультативные экзоны. В этом случае из всей совокупности экзонов в конечной последовательности остается только один экзон для одной изоформы белка. В третьей группе возможно изменение экзона путем использования различных донорных и акцепторных сайтов. При этом экзон может удлиняться или укорачиваться в 5'- и 3'-направлениях. Наконец, возможен такой вариант развития событий, при котором происходит удержание интрона в последовательности РНК (как правило, это обусловлено действием ESS элементов) (Ge and Porse, 2014).

Как известно, количество мРНК, попавшего в цитоплазму, значительно меньше исходного количества транскрибированной РНК. Значительная часть транскриптов отправляется на деградацию по так называемому антисмысловому механизму – NMD (nonsense mediated decay) (Pescarelli and Kebara, 2014). При этом в NMD путь отправляется и значительное количество транскриптов, которые подверглись неправильному сплайсингу. Таким образом, точная регуляция данного механизма является важным аспектом обеспечения нормальной жизнедеятельности клетки. Данное утверждение относится в полной мере и к вирусам. Причем из-за малого размера генома проблема информационной емкости вирусной НК выходит на первое место. Необходимость закодировать большое количество белков в относительно небольшом по размеру геноме решается вирусами по-разному, и альтернативный сплайсинг в данном случае является удобным способом решения этой проблемы. Впервые явление сплайсинга было описано для аденовирусов, после чего прерывистость генов была показана и для большинства эукариотических организмов.

Аденовирусы являются малыми вирусами без оболочки с двухцепочечным ДНК геномом, который кодирует около 30-40 генов, чьи продукты в инфицированной клетке могут участвовать во множестве путей регуляции и биосинтеза, в том числе взаимодействовать с факторами сплайсинга. Общие особенности сплайсинга аденовирусов

таковы: накопление сплайсированной РНК вируса происходит к поздней стадии литического цикла, интроны не нарушают последовательности ORF, незрелая мРНК вируса содержит большое количество интронов, причем их размеры меньше интронов высших организмов (Davison, *et al.*, 2003). Процессинг вирусной РНК регулируется на многих уровнях. Главная поздняя транскрипционная единица (MLTU) может быть полиаденилирована пятью разными способами, при этом в результате сплайсинга может образовываться около 20 различных типов РНК, которые делятся на L1- L5 группы (Akusjarvi, 2008). Главный поздний промотор (MLP) активен на всем протяжении инфекции, однако на ранних стадиях полиаденилирование приводит к образованию коротких L1 транскриптов, а на поздних стадиях преимущественно к образованию L5 транскриптов. При этом в момент окончания репликации и начала синтеза вирусных белков образуются L4 транскрипты, регуляция которых обусловлена отдельным L4 промотором (Shaw and Ziff, 1980).

Регуляцию сплайсинга транскриптов аденовируса рассмотрим на одном из примеров – сплайсинге РНК L1 гена (так называемой L1 модели). При этом типе сплайсинга используется общий 5'-сайт и два альтернативных 3'-сайта, в цитоплазму попадают два типа РНК- 52,55K и 3a (Hasson *et al.*, 1989). L1 является единственным геном у аденовируса, который транскрибируется и на ранних, и поздних стадиях инфекции. 52,55K образуется на ранних стадиях инфекции и участвует в ассоциации вирусного генома с пустыми капсидами, а 3a является важным структурным белком капсида и продуцируется на поздних стадиях инфекции (San Martín, 2012). Таким образом, переключение между двумя вариантами должно быть строго регулируемо для успешного развития инфекции. В регуляции сплайсинга данного типа участвуют два *cis* элемента: 3a-репрессорный элемент (3RE) и 3a-усилитель сплайсинга (3VDE). 3VDE расположен перед 3a 3'-сайтом сплайсинга. 3RE работает как отрицательный регулятор на ранних стадиях инфекции блокируя сборку сплайсосомы на 3a 3'-сайте путем связывания гиперфосфорилированной формы SR фактора (Mühlemann *et al.*, 2000). Ингибирование этого процесса происходит с помощью вирусного белка E4-ORF4, который индуцирует дефосфорилирование SR белков. E4-ORF4 - это многофункциональный вирусный регулятор, который связывается с фосфотазой PP2A и блокирует E1A-индуцированную активацию транскрипции, индуцирует гипофосфорилирование ряда клеточных и вирусных белков и, тем самым, регулирует сплайсинг аденовирусной РНК. E4-ORF4 индуцирует дефосфорилирование SR белков, тем самым обуславливая их отсоединение от точки ветвления интрона, что делает ее доступной для связывания с U2 snRNP. Кроме того, регуляция статуса фосфорилирования SR белков

может влиять и на активацию защитных механизмов клетки, что играет роль на поздних стадиях инфекции (Larsson *et al.*, 1992).

Другой пример использования механизмов сплайсинга вирусами может быть рассмотрен на примере вирусов папилломы. Данные вирусы имеют малый размер и кольцевую молекулу ДНК. У вируса BPV-1 в центральной части генома имеется ряд сайтов сплайсинга, причем регуляция между двумя конкурирующими 3'-сайтами происходит при участии двух энхансерных последовательностей - SE1 и SE2 (Jia, 2009). С данными последовательностями взаимодействуют SR белки, причем предпочтительный вариант сплайсинга зависит от стадии инфекции.

У другого представителя - вируса HPV-16 - напротив, имеется только два донорных сайта сплайсинга, и образование двух форм РНК (E1 и E2) также происходит при участии SR белков, центральная роль среди которых принадлежит SRF1 (Schwartz, 2008). В РНК E1 и E2 генов присутствуют последовательности, которые способны взаимодействовать с белками, облегчающими прохождение сплайсинга. Кроме того, в последовательности РНК имеется участок, с которым может связываться hnRNP A1, что предотвращает формирование сплайсосомы и ингибирует сплайсинг (Schwartz, 2008).

Наконец, один из наиболее распространенных патогенных вирусов человека - вирус гриппа, также активно использует механизмы альтернативного сплайсинга. Рассмотрим, как вирус гриппа может использовать механизмы сплайсинга инфицированной клетки. После попадания в ядро рибонуклеопротеины способны взаимодействовать с белком SC35 (SR белок) и р80-коилином. SC35 и р80-коилин способны перемещаться между ядром и цитоплазмой, а также играют важную роль в регуляции сплайсинга. Связывание рибонуклеопротеинов с данными белками приводит к их перераспределению, что оказывает влияние на сплайсинг клеточной мРНК (Fortes *et al.*, 1995). Кроме того, белок вируса NS1 способен взаимодействовать с U2 и U6 snRNA за счет своего РНК-связывающего домена (Schneider and Wolff, 2009). Данное взаимодействие также подавляет сплайсинг клеточных мРНК, однако процессинг вирусной РНК остается на прежнем уровне. Известно, что, у вирусов гриппа может образовываться до трех NS белков с одной пре-мРНК в результате сплайсинга, а также четыре варианта главного структурного М-белка с одного вирусного сегмента РНК. Процессы сплайсинга строго регулируются, обеспечивая временное разделение на ранние и поздние транскрипты (в зависимости от стадии инфекции). Полная картина регуляции сплайсинга NS белков до конца не выявлена. С другой стороны, имеется адекватная модель, объясняющая регуляцию выбора сайта вирусного сегмента, отвечающего за продукцию М-белка (Gomez-Puertas *et al.*, 2000). При накоплении в ходе транскрипции

необходимого количества белков PB1, PB2 и PA (компонентов вирусной РНК-полимеразы) и при участии белка NS1 происходит блокирование дистального конца М-сегмента, в результате чего привлекаемые к ESE последовательности SF2/ASF обуславливают сборку сплайсосомы на проксимальном 5'-сайте сплайсинга. В результате такого переключения происходит образование РНК, которая служит матрицей для синтеза М2 белка, одного из основных структурных белков, а сплайсинг с образованием транскрипта мРНК₃, функция которого до конца не ясна, прекращается. Стоит отметить также важность вторичной структуры в области ESE. Переход из стабильной формы шпилечной структуры в нестабильную делает доступным точку ветвления в интроне а также привлечение SF2/ASF к элементу ESE. Условия, регулирующие данный конформационный переход, до конца не установлены.

Таким образом, альтернативный сплайсинг встречается у вирусов очень широко, при этом вирусные продукты способны подстраивать под себя работу сплайсосомы, обеспечивая преимущественный сплайсинг своих РНК и угнетая нормальный сплайсинг клеточных транскриптов.

1.5. Внутриклеточный трафик парвовирусов.

Для развития продуктивной инфекции парвовирусы должны преодолеть ряд клеточных барьеров, чтобы достигнуть ядерного компартмента, где происходит репликация вирусного генома и самосборка капсидов. Традиционно выделяют следующие стадии, которые проходит вирусная частица на пути к ядру клетки: взаимодействие капсида с клеточной мембраной, поглощение вирусной частицы с помощью эндоцитоза, транспорт по везикулярной системе клетки через ряд эндосомных компартментов к поздней эндосоме, выход из эндосомы, транспорт к ядру клетки, преодоление ядерной мембраны. Каждый из этих этапов имеет большое значение для конечной судьбы вируса. Было отмечено, что для некоторых парвовирусов соотношение проникших в клетку вирионов и вновь реплицированных вирусных частиц колеблется от 100 к 1 до 1000 к 1 (Meng et al., 2013; Parrish, 2010). Таким образом, для развития инфекции требуется довольно высокие значения титра вируса.

К сожалению, вопрос внутриклеточного транспорта денсовирусов изучен в гораздо меньшей степени, чем парвовирусов позвоночных. Однако есть основания утверждать, что в целом данные процессы у представителей обоих подсемейств довольно сходны. Рассмотрим более подробно каждый из этапов.

1.5.1. Взаимодействие вириона с рецептором клетки и его проникновение внутрь клетки.

Все парвовирусы используют рецептор-опосредованный способ проникновения в клетку, при этом для разных вирусов могут использоваться различные гликопротеины, гликаны и гликолипиды в качестве рецепторов. Многие вирусы могут использовать несколько рецепторов, однако до конца не выяснено, как это сказывается на оптимальном развитии инфекции. Например, парвовирус собак (CPV) и вирус панлейкопении кошек (FPV) используют рецепторы трансферрина (TfR) в качестве первичных, но некоторые штаммы данных вирусов могут связываться с сиаловой кислотой на поверхности клетки хозяина. Вирион, связанный с TfR-рецептором, поступает в клетку с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза. Данный путь, судя по всему, является главным способом поглощения вирусных частиц. Однако показано, что изменение сигнала интернализации в цитоплазматической части рецептора TfR приводит к остановке поглощения вируса, но не предотвращает развитие инфекции (Palermo, 2008). Более того, экспрессия в клетках доминантно-негативного динамина-2 приводит лишь к частичному уменьшению поглощения вирусов CPV и AAV и развитию инфекции, обусловленной этими вирусами, что говорит о том, что другие механизмы поглощения также могут существовать (Hueffer, 2004; Duan, 1999). Минутный вирус мышей (MVM) и аденоассоциированный вирус второго типа (AAV2) поглощаются с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза, несмотря на то, что ими также используются сиаловые кислоты и/или гепарин сульфат протеогликан (HSPG) в качестве первичных рецепторов, которые специфически не связаны с клатриновым путем (Bartlett, 2000). Другие возможные пути поглощения этих вирусов включают неспецифический пиноцитоз капсидов с клеточной поверхности или другие менее изученные клатрин-независимые механизмы.

Для многих парвовирусов остается невыясненным вопрос о роли связывания с рецептором в инициируемых клеточных путях, которые влияют на поглощение или экспрессию генов. Например, AAV2 связывает и кластеризует $\alpha V\beta 5$ интегрины, что через Notch1 и Ras сигнальные пути приводит к увеличению интернализации через клатрин-зависимый эндоцитоз (Sanlioglu, 2000). Кроме того, показано, что кластеризация TfR с олигомерным трансферрином изменяет паттерн внутриклеточного трафика по сравнению с мономерным трансферрином (Marsh, 1995). Данное явление также может влиять на пути проникновения мультивалентных капсидов в клетку.

Стоит заметить, что в некоторых случаях вирус связывается с клеткой и проникает внутрь, но инфекция не развивается. Причиной этому может служить невозможность

вирусного капсида покинуть эндосому, или по причине того, что вирус попал в компартмент клетки, выход из которого и невозможен. Например, трансдукция рекомбинантных AAV2 капсидов более эффективна через базолатеральную поверхность поляризованных клеток дыхательного эпителия человека по сравнению с апикальной поверхностью, несмотря на то, что примерно равное количество частиц входит через обе поверхности (Duan, 1998). Похожим образом химерный TfR, у которого цитоплазматические и трансмембранные последовательности заменены на нейраминидазы гриппа, или внеклеточный домен заменен на фрагмент антивирусного антитела, способен связывать и поглощать CPV, что, однако, не приводит к развитию инфекции (Hueffer, 2003).

Таким образом, для многих парвовирусов установлен необходимый рецептор связывания, а также возможные дополнительные рецепторы, кроме того, выявлены главные способы интернализации.

1.5.2. Транспорт парвовирусов через систему эндосом.

Передвижения вирусных капсидов между и внутри эндосомных компартментов отличается высокой динамичностью и сложностью. Для CPV было показано, что клетки, фиксированные после поглощения вируса и окрашенные антителами, аккумулировали вирусные капсиды в перинуклеарных везикулах через 30 минут (Parker and Parrish, 2000). Этот паттерн распределения может быть нарушен с помощью деполимеризации сети микротрубочек, при обработке нокодазолом, низкой температурой или в том случае, если в клетке экспрессируется мутантный белок динамин-2 K44A (Vihinen-Ranta, 1998; Suikkanen, 2003). Данные воздействия ослабляют инфекцию, хотя довольно сложно отделить воздействие лекарственных средств на жизнеспособность клеток и их репликацию от непосредственного воздействия на инфекцию.

После поглощения вирусные частицы обнаруживаются в различных компартментах клетки, но определение конкретного эндосомного компартмента, через который должен пройти вирус, остается непростой задачей. В случае вируса CPV проникшие вирионы движутся медленно и могут оставаться ассоциированными с TfR рецептором в эндосомальной системе. После фиксации зараженных клеток в разное время после поглощения капсиды вирусов CPV и AAV могут быть колокализированы с маркерами ранних эндосом, поздних эндосом, деградирующих эндосом и лизосом в течение первых часов после инфекции (Ding, 2005; Ding, 2006). Анализ живых клеток с помощью флуоресцентно меченых частиц, который является более точным при изучении динамических процессов, чем анализ фиксированных клеток, показывает, что существует несколько одновременно

протекающих и перекрывающихся процессов движения частиц внутри везикулярной системы, некоторые из которых соответствуют трафику при помощи цитоскелета, нежели случайному передвижению через цитоплазму (Seisenberger, 2001).

Серотипы аденоассоциированных вирусов имеют четкие различия, и аминокислотные последовательности их капсидных белков имеют гомологию от 55 до 90 процентов, и они также могут иметь отличающийся паттерн внутриклеточного трафика. Например, капсиды аденоассоциированного вируса AAV5, но не других серотипов, аккумулируются в комплексе Гольджи (Bantel-Schaal, 2002). Клеточный тип и концентрация капсидов влияет и на распределение частиц в эндосомах и эффективность переноса.

Изменение pH эндосом в кислый диапазон важно для развития инфекции всех парвовирусов, исследованных к настоящему времени, хотя значение данного явления до конца не выяснено. Бафиломицин A₁ ингибирует АТФ-азу, ответственную за изменение кислотности эндосом, NH₄Cl нейтрализует pH эндосом, и оба этих воздействия блокируют развитие инфекции в течение 30 минут в случае заражения вирусом AAV и 90 минут в случае заражения вирусом CPV (Bartlett, 2000). Предварительная инкубация капсидов при низких значениях pH не приводит к остановке инфекции в клетках. Эффект нейтрализации pH может говорить о том, что низкие значения кислотности запускают необходимые конформационные изменения капсида. Некоторые обратимые изменения капсида могут иметь место при инкубации в кислой среде, и внешние части капсида, такие как уникальный конец VP1 может становиться более доступным при данных условиях. Другая причина важности значений pH может заключаться в том, что вирусам может быть необходимо действие кислотно-зависимых факторов клетки, которые представлены в особых эндосомных компартментах (например, некоторые протеазы), или эндосомное перемещение и слияние везикул может напрямую зависеть от уровня pH, поскольку данный показатель имеет значение для некоторых из этих процессов. В последнем случае, выбор способа транспортировки и этапа, на котором вирусные частицы покидают эндосому, влияет на весь комплекс изменений капсида после проникновения в клетку (Akache, 2007).

1.5.3. Структурные изменения капсида и выход из эндосомы.

Вопрос о главных конформационных изменениях в структуре капсида на ранних стадиях проникновения в клетку остается дискуссионным. Особенности ответа на воздействия низкими значениями pH и протеаз различается у разных парвовирусов, что говорит и вирус-специфических требованиях данных воздействий для разных вирусов. Парвовирус B19 чувствителен к понижению pH, что приводит к экспонированию

уникального N-концевого участка VP1 и освобождению вирусной ДНК (Simpson *et al.*, 2000), в то время как капсиды вирусов CPV и MVM остаются в основном интактными и инфекционными. Вирус CPV инфицирует клетки кишечника, дальнейшее распространение этого вируса происходит в пищеварительном тракте и, возможно, это требует более стабильного капсида, чем у B19, который, в основном, распространяется респираторным путем. Капсиды AAV вируса, хотя и близки по своей структуре к B19, показывают стабильность, сходную с капсидами CPV и MVM. Капсиды автономных парвовирусов, таких как CPV и MVM, экспонируют часть N-концевых участков VP2 за пределы капсида, и 15-22 аминокислотных остатка этой последовательности, в зависимости от использующей протеазы и, собственно, аминокислотной последовательности фрагмента, могут быть отщеплены с образованием VP3 (Weichert, 1998). В случае MVM данная последовательность может быть также отщеплена после эндоцитоза, усиливая подвижность уникального участка VP1. Имеют ли место схожие процессы в случае CPV пока не выяснено, исследования с помощью ингибиторов не выявили протеаз, ответственных за расщепление VP2 этого вируса с образованием меньшего по размеру капсидного белка - VP3.

Уникальный участок VP1 содержит последовательность домена фосфолипазы A₂ и сигнал ядерной локализации, активность данных участков требуется для развития инфекции. Судя по всему, N-концевой участок вынесен на поверхность капсида через пору, находящуюся на оси симметрии пятого порядка у капсидов CPV и MVM, без реассоциации белковой оболочки, что также формирует участок капсида, через который будет осуществляться выход вирусной ДНК (Farr, 2004). Активность домена фосфолипазы A₂ (PLA₂) необходима для выхода капсида из эндосомы. Показано, что капсиды MVM, имеющие точечные мутации, удаляющие активность PLA₂ и в норме приводящие к потере инфекционности, по-прежнему могут инфицировать клетки в том случае, если эндосомный лизис стимулируется добавлением полиэтиленаминов или капсидов аденовируса (Farr, 2005).

Воздействие кислых pH на AAV2 также проявляется в конформационных изменениях, которые активируют или делают доступным домен PLA₂. Мутации в активном центре домена PLA₂ не влияют на сборку капсида, упаковку вирусного генома, связывание и вход в клетки HeLa, но ранняя экспрессия генов ингибируется, что, вероятно, указывает на важность последовательности PLA₂ для проникновения вируса в ядро (Girod *et al.*, 2002).

Кроме того, показано, что мутации, которые блокируют выход домена PLA₂ на поверхность капсида критично уменьшают инфекционность, а мутации, приводящие к изменению аминокислотных остатков, окружающих пору в районе оси симметрии 5-го

порядка, могут восстановить инфекционность мутантных в области уникального участка VP1 вирусных частиц (Grieger, 2007).

1.5.4. Передвижение вируса в цитоплазме и проникновение в ядро.

Как было сказано выше, на стадии транспорта через эндосомную сеть капсиды парвовирусов претерпевают определенные конформационные изменения. Однако есть свидетельства того, что дальнейшие изменения в структуре капсида происходят и в цитоплазме. Обработка клеток ингибиторами протеаз уменьшают инфекционность MVM при добавлении через 3 часа после инфекции, что теоретически достаточно для влияния на процессы, происходящие с вирусом в цитоплазме. Протеазы могут расщеплять VP2 капсида в специфических местах, инициируя разборку капсида, но, судя по всему, протеасомные процессы не вовлечены в специфическое расщепление VP2 с образованием VP3 или выдвиганием наружу N-конца VP1 (Tullis, 1992). Вирусы, инфицирующие клетки в присутствии ингибиторов протеаз скапливаются у цитоплазматической стороны ядерной мембраны, но не проникают в ядро. Однако ингибиторы протеаз могут влиять также на ферменты, находящиеся в эндосомах и, как правило, данные ингибиторы высокотоксичны для клеток, что может обуславливать неспецифическую редукцию вирусной репликации.

Напротив, различные протеазы могут играть положительную и отрицательную роль в развитии аденоассоциированной инфекции. С одной стороны, обработка протеазами ингибирует проникновение капсида AAV, а обработка ингибиторами протеаз усиливает трансдукцию AAV, возможно, посредством изменения процессов эндосомного транспорта или через ослабление убиквитин-зависимой деградациии вирусных капсидов (Yan, 2002).

В экспериментах с использованием дигибридной системы было показано взаимодействие катепсинов В и L с белками капсидов AAV2 и AAV8. Ингибирование активности внутриклеточных протеаз, к которым относятся катепсины В и L, уменьшало трансдукцию вируса *in vivo* (Akache, 2007). Сайты расщепления трипсина также были обнаружены на поверхности капсида AAV2, которые могут быть вовлечены в начальные структурные перестройки, повышая гибкость белковой оболочки вируса и подготавливая его к процессу освобождения вирусного генома. Хотя *in vitro* вирусные частицы остаются интактными, различия при негативном окрашивании показывает структурные перестройки и повышение пластичности капсида благодаря процессам протеолитического расщепления (Van Vliet, 2006). Продолжительная инкубация с протеазами уменьшает инфекционность по причине потери гепарин-связывающей активности, но может способствовать «раздеванию» и выходу вирусного генома внутри клетки. Микроинъекции частиц, обработанных

разнообразными протеазами, могут показать, достаточны ли данные модификации для активации вирусных частиц. Действительно, некоторые этапы в реорганизации очень важны, поскольку введенные в цитоплазму капсиды AAV2 не приводили к развитию продуктивной инфекции даже в присутствии аденовируса Ad5 (Sonntag et al., 2006).

От сайта освобождения из эндосомного компартмента капсиды должны быть доставлены к ядру. Если транспорт в перинуклеарное пространство происходит в составе эндосом, дальнейший активный механизм транспорта при помощи микротрубочек клетки свободных капсидов может быть необязателен. Тем не менее, есть указание на то, что поступающие капсиды CPV используют микротрубочки клетки для достижения приядерного положения (Vihinen-Ranta, 2000). Обработка клеток нокодазолом, которая останавливает полимеризацию микротрубочек, приводит к тому, что инъецированные капсиды рассеиваются по цитоплазме. Освобождение генома автономных парвовирусов из капсидов происходит довольно медленно, поскольку введенные в цитоплазму антитела против капсидов блокируют развитие инфекции CPV даже в том случае, если обработка антителами имела место через несколько часов после воздействия инфекционного агента. Показано, что AAV2, AAV5 и AAV10 взаимодействуют с белками, ассоциированными с микротрубочками. Различные исследования показывают разнообразные эффекты воздействия нокодазола и других веществ, оказывающих влияние на аппарат микротрубочек клетки, на вирусную инфекцию или трансдукцию капсидов (Sanlioglu, 2000; Hirosue, 2007). В некоторых случаях данное воздействие предотвращает направленное движение вирусных частиц в цитоплазме, в других случаях выраженных эффектов не наблюдается. Обработка таксолем, который стабилизирует микротрубочки, приводит к незначительному увеличению трансдукции AAV2 (Hirosue, 2007).

1.5.5. Вход в ядро и «раздевание» вируса.

Автономные парвовирусы проникают в ядро, где им требуется прохождение клетки через S- фазу для репликации ДНК. Теоретически, капсид парвовируса диаметром 26 нм способен пройти через канал ядерного порового комплекса без перестройки. Данное явление наблюдается для вновь синтезированных капсидов в ходе развития инфекции. Однако, имеется ряд свидетельств о том, что капсиды парвовирусов могут проникать в ядро не через ядерный поровый комплекс, несмотря на наличие сигнала ядерной локализации в N-конце белка VP1, который экспонируется над поверхностью капсида в ходе проникновения вируса в клетку. Разрыв внешней оболочки ядра наблюдался при инъекции в цитоплазму ооцитов *Xenopus* капсидов MVM, блокировка ядерных пор с помощью агглютинина пшеницы не

приводило к ингибированию транспорта капсидов в ядро, что указывает на наличие пути, независимого от ядерного порового комплекса (Cohen, 2005). Добавление капсидов MVM к клеткам млекопитающих приводило к разрыву ядерной оболочки и к изменению распределения ядерного ламина A/C (Cohen, 2006). Таким образом, роль сигнала ядерной локализации для этих вирусов может заключаться в направлении вирусной частицы к ядру и прикреплению к ядерной мембране или поре, а не в прямом транспорте.

Многие вопросы разборки капсида до конца не выяснены, однако частицы парвовирусов имеют довольно жесткую структуру, и полная разборка капсида для освобождения вирусной ДНК может не требоваться. Напротив, вирусная ДНК может выноситься или извлекаться из интактных капсидов. С использованием флуоресцентно меченых зондов к 5'-концу вирусной ДНК MVM был показан частичный выход цепи ДНК в цитоплазму (Mani *et al.*, 2006). Мечение зондом 3'-конца генома также показало присутствие участка ДНК за пределами капсида. Форма капсида, входящего в ядро, до конца не изучена, и может варьировать у разных вирусов. Хотя капсиды MVM не были обнаружены в ядре, это может говорить лишь о слабой эффективности переноса через ядерную мембрану, или о том, что капсиды соединяются с порой и освобождают геном через ядерную пору (Mani *et al.*, 2006). Для AAV есть противоречивые данные о том, происходит ли разборка частицы до или после проникновения в ядро. Флуоресцентно меченые капсиды AAV2 обнаруживали внутри ядра через два часа после поглощения клеткой, некоторые частицы находились в участках инвагинации ядерной мембраны уже через 15 минут (Seisenberger, 2001). Хотя исследования показывают, что капсиды аденовирусов поддерживают инфекцию AAV и конверсию одноцепочечной ДНК в двухцепочечную форму (Xiao, 2002), специфическая роль аденовирусов в разборке капсида и ядерно-цитоплазматическом транспорте AAV остается до конца не понятой. Некоторые исследования с использованием меченых частиц и субклеточным фракционированием с последующей гибридизацией с ДНК показало, что аденовирусы могут облегчать транслокацию AAV в ядро (Xiao, 2002). Более того, инъекции антител против капсида вируса в ядро останавливает инфекцию, что указывает на связь капсида с геномом вируса после входа в ядро. С другой стороны, есть данные о том, что, хотя капсид аденовирусов и увеличивает количество частиц AAV в ядре, подавляющее большинство капсидов остается в цитоплазме (Lux, 2005). Более того, вирусная ДНК была обнаружена с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации внутри ядер клеток через два часа после трансдукции, независимо от коинфекции аденовирусом Ad5 (Lux, 2005). В то время как колокализация вирусных капсидов и ДНК не обнаруживалось в пределах ядра, данная колокализация обнаружена в перинуклеарном пространстве и в цитоплазме.

Описанные факты не позволяют сделать окончательный вывод о том, происходит ли разборка капсида до входа в ядро или в процессе входа в ядро.

1.6. Транспорт вирусных белков через ядерный поровый комплекс.

1.6.1. Общая характеристика ядерного порового комплекса.

Эукариотические клетки разделены на два главных компартмента: ядро и цитоплазму. Транспорт РНК, мембранных и растворимых белков между ядром и цитоплазмой осуществляется через ядерный поровый комплекс (NPC). Данный комплекс является транспортером, пронизывающим ядерную мембрану. В центре NPC имеется туннель диаметром 8-10 нанометров и длиной 45 нанометров, через который за счет простой диффузии могут проникать ионы и белки с малой молекулярной массой. Белки, формирующие NPC, носят название нуклеопоринов. Центральный канал поры выстлан несвернутыми гидрофобными цепями нуклеопоринов, которые образуют селективный фильтр для малых молекул. Однако, большинство белков, даже сравнительно маленьких, могут проникать в ядро через пору только с помощью посредников. Общая схема строения ядерного порового комплекса представлена на Рисунке 4.

Основным посредником является белок Ran, с помощью которого происходит наиболее изученный вид транспорта - Ran-зависимый транспорт. Его характерной особенностью является гидролиз GTP, катализируемый Ran. В данном механизме транспорта участвуют и другие белки, среди которых центральную роль играют переносчики консервативного семейства кариоферинов β . Большинство данных белков осуществляют перенос субстратов, за редким исключением, только в одном направлении. Было обнаружено около 20 типов кариоферинов β , однако переносимых субстратов значительно больше, в связи с чем встает вопрос о специфичности взаимодействия переносчиков с сигналами ядерного транспорта (Pemberton and Paschal, 2005).

Первыми белками, для которых был показан транспорт в ядро, являются нуклеоплазмин и большой Т-антиген вируса SV40 (Afanasiev et al., 1991). Сигналы NLS данных белков довольно сходны и представляют собой группы положительно заряженных аминокислотных остатков. Аналогичные им сигналы носят название классических NLS и могут быть узнаваемы кариоферинами α .

Тем не менее, большинство субстратов переносится без участия кариоферина α . Сигналы коровых гистонов могут содержать всего несколько положительных аминокислот, в некоторых случаях встречаются аргинин-глицин богатые сигналы. Данные последовательности могут быть довольно протяженные, что может указывать на

критичность укладки всей молекулы для узнавания сигнала импортинами β (Rosenblum *et al.*, 1998). Было показано, что кариоферины β могут менять свою конформацию, подстраиваясь под различные NLS, тем самым обеспечивая разнообразие переносимых субстратов.

Экспортины в своей аминокислотной последовательности также имеют сигнал, обеспечивающий транспорт из ядра. Это сигнал ядерного экспорта - NES. Чаще всего встречается гидрофобный лейцин-богатый сигнал NES. Последовательность ядерного экспорта присутствует у многих факторов транскрипции и регуляторов клеточного цикла. Данные сигналы распознаются экспортином Crm1. Также возможен транспорт белков из ядра, не содержащих NES. В этом случае перенос осуществляется с помощью специфичных

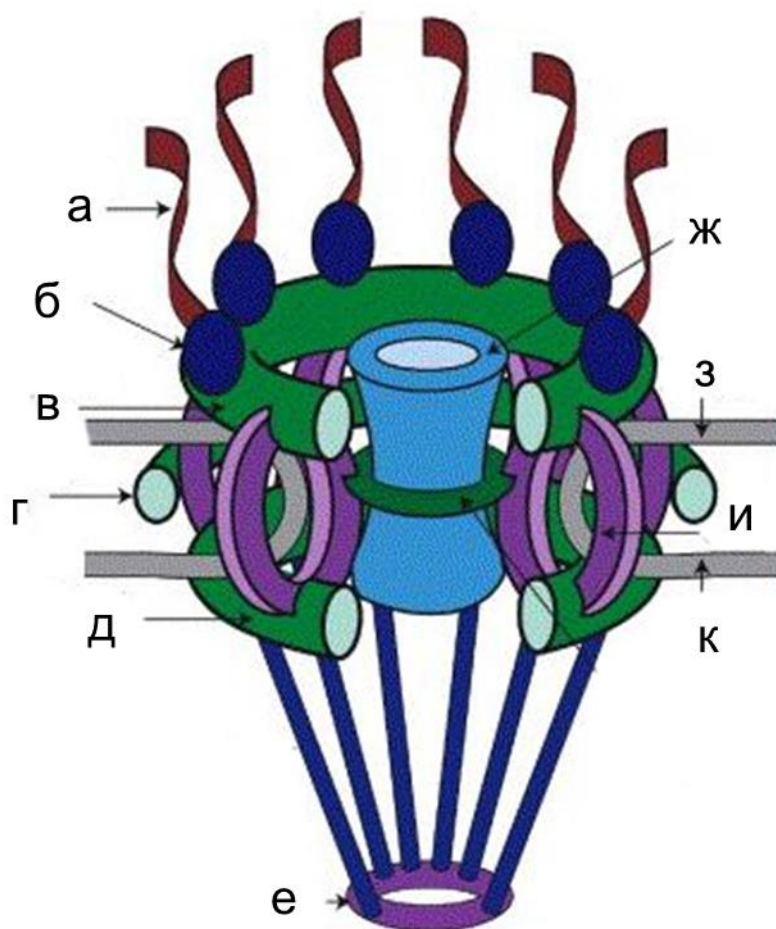


Рисунок 4. Строение ядерного порового комплекса: а – цитоплазматические филаменты, б – цитоплазматическая часть, в – цитоплазматическое кольцо, г – кольцо просвета, д – ядерное кольцо, е – терминальное кольцо, ж – центральный канал, з – наружная ядерная мембрана, и – спица, к – внутренняя ядерная мембрана. (иллюстрация из Sorokin *et al.*, 2007, с изменениями)

экспортинов, таких как Msn5p (Hood and Silver, 1999; Komeili and O'Shea, 1999), при этом перенос сопряжен с фосфорилированием, что указывает на важность данного процесса для узнавания экспортином сигнала NES.

Также из ядра экспортируются РНК, за транспорт которых ответственны по крайней мере два кариеферина: экспортин-*t* и экспортин-5. Первый участвует в транспорте транспортных РНК, экспортин-5 также участвует в транспорте тРНК и микроРНК. Транспорт большинства мРНК осуществляется без участия экспортинов, данную функцию выполняют белки семейства TAP/NFX (Lei and Silver, 2002).

Изучение строения ядерного порового комплекса проводили на многих модельных объектах. Эти исследования показали высокую консервативность строения NPC, обладающего восьмилучевой симметрией, перпендикулярной к мембране. Ядерная пора включает в себя три подструктуры: цитоплазматические фибриллы, центральную часть и ядерную сетку. Центральная часть содержит восемь стержней, соединяющих ядерное и цитоплазматическое кольцо и окружающих центральный канал. От цитоплазматической части отходят фибриллы длиной около 50 нм, от ядерной - порядка 100 нм, которые формируют структуру в форме корзины. Предполагается, что данные фибриллы являются первыми участниками в акте переноса субстрата. Поровый комплекс состоит примерно из 30 видов белков, которые представлены в разной степени копияности. Условно все нуклеопорины делят на трансмембранные, FG-нуклеопорины (содержат в своих последовательностях FG- повторы), FN-нуклеопорины (Nup35 и Nup 53), нуклеопорины, содержащие WD повторы и гидрофобные линкеры (Rout and Aitchison, 2000; Cronshaw *et al.*, 2002).

В последовательностях аминокислот FG-нуклеопоринов есть сайты связывания сигналов ядерного транспорта, и ассиметричное расположение данных белков играет важную роль в переносе веществ. Импортины, например, имеют более высокое сродство к нуклеопоринам ядерной стороны NPC, в то время как экспортины обладают большей афинностью к цитоплазматической стороне поры (Suntharalingam and Wente, 2003).

Наиболее изученным механизмом транспорта является Ran-зависимый транспорт субстратов. Центральная роль в этом механизме принадлежит ГТФазе Ran, маленькому белку с предпочтительно ядерной локализацией. Данный фермент гидролизует GTP довольно медленно, и большую роль в связывании нуклеотида играют другие эффекторные белки: RanGAP1, RanBP1, RanGEF и RanBP3.

Как и большинство ГТФаз, данный фермент осуществляет гидролиз GTP с низкой скоростью, и перечисленные выше вспомогательные белки увеличивают скорость гидролиза в тысячи и десятки тысяч раз. Данные ферменты могут перемещаться между ядром и цитоплазмой, а также иметь преимущественную локализацию в том или другом компартменте: RanGAP1 локализуется исключительно в цитоплазме, RanGEF1- в ядре.

Данное распределение приводит к тому, что Ran в комплексе с GTP содержится по большей части в ядре, а Ran в комплексе с GDP - в цитоплазме, из-за чего возникает градиент концентраций RanGTP, что обуславливает направленность транспорта.

Процесс транспорта белков, содержащих классические NLS, по Ran-зависимому механизму характеризуется наличием нескольких этапов (Stochaj and Rother, 1999). На первом этапе образуется комплекс, состоящий из импортина- β 1, кариоферина- α и белка с ядерным сигналом локализации. Данный комплекс связывается с белком RanBP2, который входит в состав цитоплазматических фибрилл. Данный процесс является RanGTP-зависимым, поскольку образуемый комплекс весьма нестабилен при высоких концентрациях GTP, кроме того, RanGTP может напрямую участвовать в образовании связи комплекса с нуклеопорином.

После образования связи с цитоплазматической фибриллой за счет ее изгибания транспортный комплекс перемещается к центральному каналу поры, где после гидролиза GTP происходит его высвобождение и связывание с нуклеопорином p62 и транспортным фактором NTF2. NTF2 обеспечивает однонаправленный перенос транспортного комплекса, связанного с RanGDF. После прохождения центрального канала транспортный комплекс связывается с Nup62 и перемещается к нуклеопорину Nup153, после чего начинается процесс освобождения субстрата (Shah *et al.*, 1998).

Процесс освобождения субстрата можно разделить на три стадии. На первом этапе происходит фиксация комплекса на Nup153, после чего при взаимодействии с Ran связь Nup153 и импортина- β 1 нарушается. На втором этапе происходит связывание RanGTP с комплексом, что приводит к диссоциации из него импортина- β 1. И, наконец, потеря импортина- β 1 приводит к понижению аффинности кариоферина- α к переносимому белку, в результате чего данный белок высвобождается в нуклеоплазму (Floer and Blobel, 1996).

Для поддержания постоянства транспорта переносчики должны постоянно возвращаться в цитоплазму. Импортин- β 1 связывается с RanGTP и в таком виде переносится в цитоплазму. Кариоферин- α образует комплекс с RanGTP и CAS (cellular apoptosis susceptibility gene) и также транспортируется в цитоплазму. Для ядерного экспорта также требуется кариоферин и RanGTP. Наиболее распространенным экспортином является Crm1. Для транспорта из ядра необходимо образование четвертичного комплекса в составе переносимого белка, Crm1, RanBP3 (повышает аффинность Crm1 к RanGTP и белкам с гидрофобными сигналами ядерного экспорта) и RanGTP (Lindsay *et al.*, 2001). Затем сформированный комплекс переходит в цитоплазму. Поскольку связь RanGTP и

переносимого субстрата очень прочная, то для освобождения белка необходимо увеличить ферментативную активность RanGTF. При связывании с RanGAP1 и RanBP1 способность RanGTF к гидролизу GTP усиливается в тысячи раз, и в результате связь между субстратом и комплексом ослабляется. После гидролиза комплекс распадается, и RanGDP с помощью NTF2 возвращается в ядро.

Важным звеном в транспорте субстрата является взаимодействие его сигналов ядерной локализации с импортинами и экспортинами. Как правило, в подавляющем большинстве случаев изменение конформационных особенностей участка, формирующего сайты связывания, отмечены в переносимых субстратах. При этом возможны самые разнообразные механизмы: внутримолекулярное маскирование и межмолекулярное маскирование сигналов, взаимодействие белков с ДНК (что приводит к ядерному удержанию субстрата), а также специфичное взаимодействие с белками, которые обеспечивают преимущественно ядерное или цитоплазматическое расположение субстрата. Кроме того, регуляция ядерно-цитоплазматического транспорта возможна на уровне изменения экспрессии белков-переносчиков и нуклеопоринов.

1.6.2. Роль фосфорилирования в регуляции транспорта вирусных белков через ядерный поровый комплекс.

Фосфорилирование белковых субстратов является одним из ключевых механизмов изменения их функциональной активности. На основе изучения большого Т-антигена вируса SV40 было впервые показано, что фосфорилирование области сигнала и близлежащих последовательностей может обуславливать изменение степени афинности данного субстрата к импортинам, тем самым меняя внутриклеточную локализацию. К настоящему моменту накоплено много примеров, когда фосфорилирование вирусных белков может изменять активность NLS.

Репликация генома цитомегаловируса человека (семейство герпесвирусов) происходит в ядре. Для репликации этого вируса помимо ядерных факторов клетки, необходимо участие шести вспомогательных вирусных белков, среди которых особый интерес представляет ppUL44 (Alvisi *et al.*, 2006). Данный белок является вспомогательным, образуя комплекс с холоэнзимом (вирусной ДНК-полимеразой) и другими вспомогательными ферментами, а также способен к связыванию двухцепочечной ДНК без использования АТФ и образовывать димеры. ppUL44 обладает сигналом NLS, выше которого расположен сайт фосфорилирования для киназы СК2 и других вирусных киназ. Показано, что фосфорилирование по данному сайту вызывает значительное накопление ppUL44 в ядре,

однако транспорт данного белка может происходить и в отсутствие фосфорилирования (Alvisi *et al.*, 2006). Таким образом, предполагается, что при высоких уровнях фосфорилирования ppUL44 образует комплекс с другими вспомогательными белками репликации и обеспечивает их транспорт в ядро.

Помимо транспорта в ядро фосфорилирование может также регулировать и ядерный экспорт. Примером может служить вирусный белок CAV (VP3, или апоптин) который способен накапливаться в ядрах только опухолевых клеток, взаимодействуя с p53 и активируя апоптоз (Heilman *et al.*, 2006). Данный белок обладает сигналом ядерной локализации и, взаимодействуя с импортином- β 1, проникает в ядро. Также в последовательности апоптина присутствует NES, фосфорилирование которого по остатку T¹⁰⁸ происходит только в опухолевых клетках (Tavassoli *et al.*, 2005). В результате апоптин накапливается в ядре, что, при достижении определенной концентрации, приводит к активации p53 каскада и индукции апоптоза.

1.7. Дрозофила как модель для генетических исследований.

Дрозофила в течение многих лет эффективно используется в качестве модели для изучения различных заболеваний человека, начиная от болезни Паркинсона (Feany and Bender, 2000), наследуемых онкологических заболеваний вплоть до различных метаболических расстройств, таких как ожирение и диабет (Musselman *et al.*, 2011). Кроме того, модельные системы на основе дрозофилы находят все более широкое применение для изучения молекулярных и генетических свойств различных вирусов, в том числе представляющих опасность для человека.

Генетические манипуляции с дрозофилой достаточно просты, геном этого организма хорошо изучен, что упрощает анализ влияния тех или иных вирусных генов на биологические процессы в клетке. Преимуществом использования модельных систем на основе дрозофилы является, не в последнюю очередь, разработанный в течение многих лет широчайший арсенал молекулярных и генетических методов, в том числе, для изучения белок-белковых, ДНК-белковых взаимодействий, экспрессии генов, функционирования метаболических путей, а так же генетических ресурсов, позволяющие изучать функции генов. Другим преимуществом данной системы является меньший размер генома дрозофилы по сравнению с геномом человека и млекопитающих, что также способствует упрощению анализа. Многие гены дрозофилы являются сходными с таковыми млекопитающих и человека, многие биохимические пути и пути генетической регуляции также консервативны. Было показано, что около 70% генов дрозофилы имеют гомологов у человека, и 75% генов

человека, нарушение которых приводит к генетическим болезням, имеют гомологов у дрозофилы. Кроме того, дрозофила обладает коротким циклом развития и, таким образом, очень быстрой сменой поколений. При этом период развития от оплодотворенного яйца до взрослой особи составляет около двух недель, половая зрелость у самок наступает уже в течение первого дня жизни взрослой особи. Одна самка может давать несколько сотен потомков. Содержание дрозофил в лабораторных условиях является простым и незатратным.

Одним из важнейших преимуществ применения модельных систем на основе дрозофил является возможность исследовать функции вирусных генов в различных органах, тканях, и даже клетках на строго определенной стадии развития в контексте целого организма *in vivo*. Это достигается посредством использования относительно недавно разработанной бинарной экспрессионной системы GAL4-UAS (Duffy, 2002). К настоящему времени с использованием дрозофилы как модельной системы были исследованы следующие вирусы, представляющие угрозу для человека: вирус Эпштейна-Барр, вирус Денге, вирус иммунодефицита человека, вирус гепатита В, цитомегаловирус, вирус гриппа группы А, коронавирус SARS, вирус SV40, ряд аденовирусов. Основная часть этих исследований обобщена в недавнем обзоре (Hughes *et al.*, 2012). В целом обобщая опубликованные данные, можно выделить два направления исследований. Одним из направлений работ с использованием модельной системы на основе дрозофилы является проведение масштабных скринингов, направленных на выявление белковых продуктов организма-хозяина, необходимых для реализации тех или иных этапов жизненного цикла вируса. Например, при исследовании вируса гриппа с использованием методов РНК интерференции был проведен скрининг библиотеки генов, содержащей 13071 ген дрозофилы (около 90% всего генома дрозофилы). На первом этапе было идентифицировано 100 генов, нарушение экспрессии которых в трансгенных дрозофилах приводит к изменению экспрессии маркерного гена, находящегося под контролем промотора вируса гриппа. В ходе последующего исследования, было показано, что три белковых продукта генов ATR6V0D1, COX6A1 и NXF1 (гомологи соответствующих генов дрозофилы у человека) являются ключевыми для репликации вирусов гриппа (Hao *et al.*, 2008).

Другим перспективным направлением исследований взаимодействия вирус-хозяин с использованием дрозофилы в качестве модели, проводимых в настоящее время, является изучение молекулярных механизмов воздействия белковых продуктов вирусов на организм хозяина. В рамках этого направления реализовано несколько подходов. Один из них – это исследование вирусных генов с неизвестными функциями. Экспрессия данных генов в организме трансгенных мух на первом этапе позволяет выявить общие патологические

эффекты в конкретных клетках, органах и тканях. На следующем этапе проводится исследование метаболических путей клеток хозяина, которые были нарушены в результате экспрессии анализируемого вирусного белка, и определение конкретных функций этого белка. Другой подход – это изучение белковых продуктов вирусов, функция которых в той или иной степени уже предсказана, например, исследование вирусных протеаз, протеинкиназ, белков ионных каналов и других. В данном случае использование трансгенных дрозофил как модели позволяет выявить влияние единичных вирусных белков на организм хозяина. Кроме того, подобные исследования, как правило, помогают выявить новые не известные ранее функции изучаемых вирусных белков. В качестве одного из ярких примеров исследования роли вирусных белков можно привести работы по изучению белков Nef и Tat вируса иммунодефицита человека, функции которых были недостаточно изучены и позднее значительно прояснены с использованием трансгенных дрозофил в качестве модели (Lee et al., 2005).

Вирус SARS-CoV является патогенным РНК вирусом, который может вызывать тяжелые заболевания, в том числе пневмонию. С помощью экспрессии белков в трансгенных линиях дрозофилы было установлено, что белки вируса могут вызывать апоптоз в пораженных клетках. Кроме того, М белок капсида может ингибировать JAK/STAT каскад. Таким образом, с помощью данной модели удалось установить новые мишени для терапии заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV (Chan et al., 2007).

1.8. Врожденный иммунитет *Drosophila melanogaster*.

В своей борьбе с патогенными организмами насекомые могут использовать только на врожденный иммунитет. Гуморальные факторы, такие как антимикробные пептиды, быстро синтезируются в жировом теле после инфицирования, противодействуя широкому спектру патогенов. Кроме того, циркулирующие в гемолимфе гемоциты с помощью фагоцитоза могут эффективно поглощать большинство микроорганизмов, более крупные патогены, такие как паразитические черви, инкапсулируются клетками гемолимфы и меланином (Evans et al., 2003; Meister, 2004)

При характеристике врожденного иммунного ответа насекомых выделяют два главных пути активации экспрессии антимикробных пептидов. Toll-путь отвечает на инфицирование грамм-положительными бактериями и грибами, при этом происходит активация Nf-kB факторов транскрипции Dif и dorsal (Meng et al., 1999; Manfrulli et al., 1999) что приводит к индукции ряда генов, в том числе, генов антимикробных пептидов (AmP). Второй путь (Imd), участвует в распознавании грамм-отрицательных бактерий. При

этом активируется другой Nf-kB фактор (Relish), что приводит к активации группы генов, в числе которых также присутствуют AmP (Hedengren *et al.*, 1999).

Стоит отметить, что многие иммунные каскады насекомых имеют гомологов у млекопитающих, что дает возможность изучать реакции иммунитета высших позвоночных на таком удобном объекте, как *Drosophila melanogaster*. Ключевую роль в распознавании патогенов как Toll, так и в Imd пути, играют пептидогликан распознающие белки (PGRP). Toll путь активируется пептидогликаном лизинового типа (LYS-PGN) через водорастворимые рецепторы PGRP-SA и PGRP-SD, которые в свою очередь стимулируют протеолитическое расщепление лиганда Toll-spz. Напротив, Imd путь активируется другим пептидогликаном - DAP-PGN при взаимодействии с рецептором PGRP-LC. Затем транскрипционные активаторы попадают в ядро, где активируют транскрипцию антимикробных пептидов. Кроме того, активация данных путей приводит к повышению экспрессии ряда других генов, также обуславливающих защитные функции организма. На Рисунке 5 даны обобщенные данные по функционированию Toll и Imd пути активации синтеза антимикробных пептидов.

Помимо продукции антимикробных пептидов у насекомых имеется еще один защитный механизм – фагоцитоз. В фагоцитозе участвуют гемоциты, процесс во многом сходен с наблюдаемым у млекопитающих. На поверхности клеток имеется ряд рецепторов, которые участвуют в распознавании патогенов. Рецептор *peste*, гомолог семейства белков CD36, участвует в распознавании внутриклеточных паразитов. У дрозофилы обнаружено около 30 гомологов CD36, которые объединяются в семейство SR-B белков. Ген *croquet mort* кодирует рецептор, который участвует в фагоцитозе собственных клеток организма. Еще одним важным рецептором является *eater*, который представляет собой трансмембранный белок, содержащий также большое количество повторов, подобных эпителиальным факторам роста, в своей внеклеточной части. Известно также, что данный рецептор способен опосредовать поглощение двухцепочечной РНК (Evans *et al.*, 2003).

Еще один рецептор, связанный с фагоцитозом, носит название Dscam. Последовательность гена имеет 4 альтернативных экзона, каждый из которых также имеет от 2-х до 33-х альтернативных вариантов сплайсинга, что в совокупности дает возможность получить более 38000 отдельных белковых продуктов. Примерно 18000 из них продуцируется в гемоцитах, при этом наибольшее разнообразие изоформ белка наблюдается во внеклеточном домене, который включает 10 иммуноглобулин-подобных доменов и шесть доменов фибронектина третьего типа. По сути, разнообразие заключается в трех иммуноглобулин-подобных доменах, напоминая формирование разнообразия антигенных рецепторов у человека. Таким образом, примерно 18000 изоформ Dscam, которые

экспрессируются в гемоцитах, представляют собой группу разнообразных рецепторов, ответственных за распознавание широкого спектра микробных агентов (Meister, 2004).

Другим семейством белков насекомых, которые действуют как опсоины, являются *Терс* белки (тиоэстер-содержащие белки). В геноме дрозофилы закодировано 6 потенциальных *Терс* белков, в состав которых входит несколько доменов, подобных макроглобулин- α и семейству белков комплемента (C3). Данные белки формируют ковалентные аддукты со своими мишенями, подобно белкам комплемента, используя свой тиоэстеразный мотив. Стоит отметить, что белки семейства *Терс* не имеют данного функционального мотива, однако способны связываться с патогенными бактериями, такими как *Candida albicans*.

Особый интерес, с нашей точки зрения, представляет ген *picky*. Локус, в котором он расположен, кодирует три пептидогликан-распознающих белка (PGRP): PGRP-SC1a, PGRP-SC1b и PGRP-SC2. В отличие от других PGRP, которые выступают в качестве рецепторов в Toll и Imd путях регуляции, участвуя в распознавании патогенов, данные белки обладают протеолитической активностью и способны образовывать фрагменты пептидогликанов бактерий, которые затем могут выступать в качестве активаторов фагоцитоза.

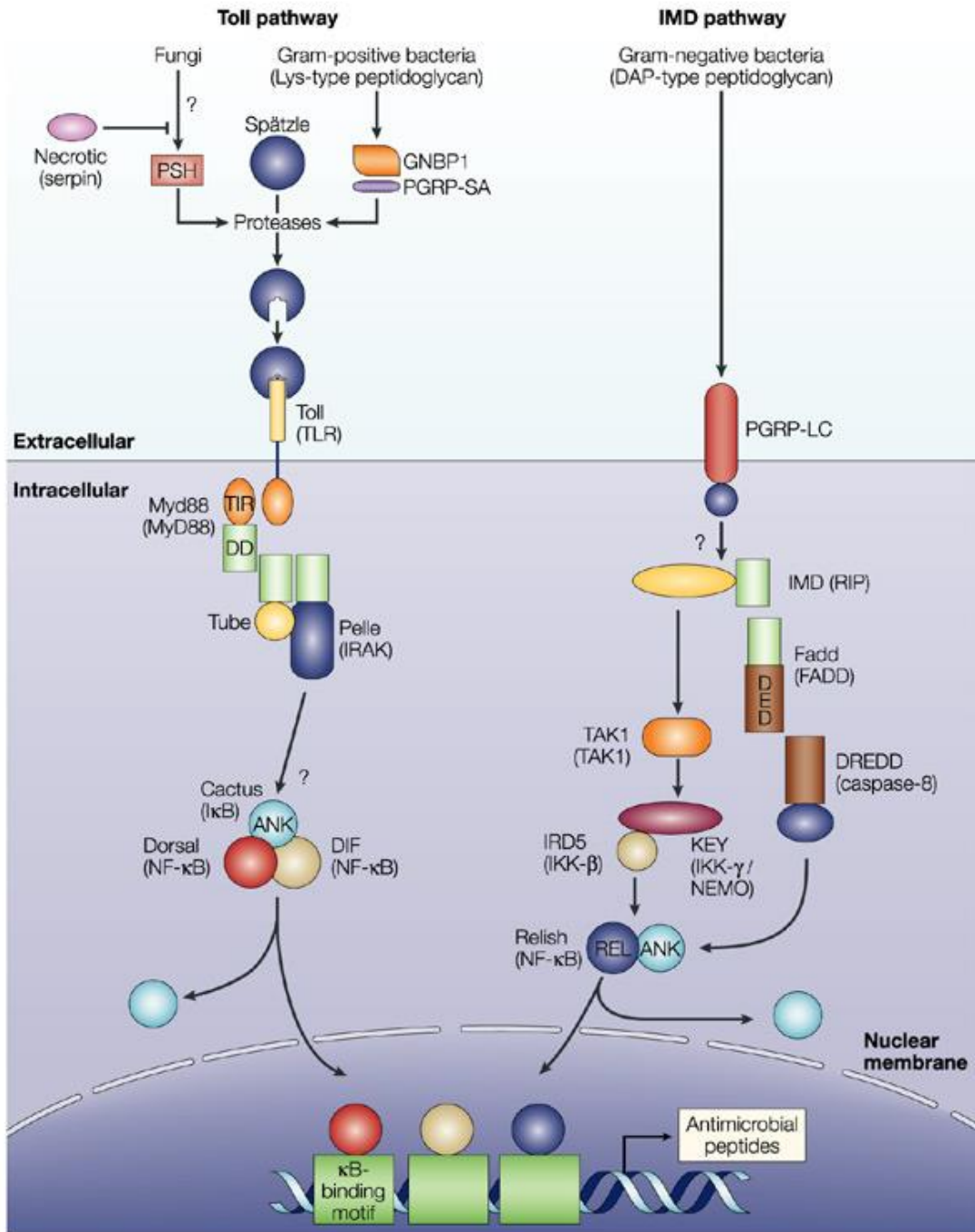


Рисунок 5. Схема каскадов межмолекулярных взаимодействий, обуславливающих реализацию Toll и Imd путей врожденного иммунитета. Продукция белков, которые кодируют антимикробные пептиды, находится под контролем двух сигнальных путей: Toll путь, который активируется в основном грибами и грамположительными бактериями, и Imd путь, который активируется в основном грамотрицательными бактериями. В зависимости от вида κB-связывающего мотива, представленного в промоторе, гены, кодирующие антимикробные пептиды, более чувствительны к каскаду Toll-DIF (например, *Drosomycin*), IMD-Relish каскаду (например, *Diptericin*) или подвергаются совместной регуляции обоими каскадами. Toll активируется посредством связывания с активированной формой Spätzle, образующейся в результате действия протеолитических каскадов, активированных секретированными распознающими молекулами

(Рисунок 5, продолжение). (например, такими как пептидогликан распознающий белок PGRP-SA и грамтрицательный бактерия-связывающий белок 1, GNBP1) PGRP-SA может связываться с пептидогликанами, которые присутствуют у грамположительных бактерий. Последующая внутриклеточная передача сигнала вызывает транслокацию ядерных факторов – κB (NF- κB) подобных белков DIF и Dorsal. IMD путь запускается в результате взаимодействия между трансмембранным рецептором PGRP-LC и пептидогликанами грамтрицательных бактерий. В результате активации PGRP-LC вспомогательный белок, содержащий «death-domain», связывается с IMD. В такой активированной форме IMD может связываться с фактором Fadd, который, в свою очередь, взаимодействует с каспазой DREDD. Данная каспаза способна проводить протеолитическое расщепление Relish при условии, что Relish был фосфорилирован с помощью *Drosophila* IKK комплекса (IKK). *Drosophila* IKK комплекс (ингибитор NF- κB (IkB)-киназ) состоит из факторов IRD5 и Kenny (KEY). IKK активируется в результате действия TAK1 через IMD-зависимый путь. После расщепления REL домен, бывший в составе Relish, перемещается в ядро, где регулирует транскрипцию генов, имеющих иммунную функцию.

Условные обозначения: ANK – анкирин-содержащий домен; DED – «death-effector» домен; DIF – дорсал-связанный иммунный фактор; FADD – FAS связанный «death» домен; IRAK – интерлейкин 1 рецептор-связанная киназа; MyD88 – первичный миелоид дифференцирующий белок 88; NEMO – основной NF- κB модулятор; PSH – Persephone; RIP – рецептор-связывающий белок; serpin – ингибитор сериновых протеаз; TIR domain – Toll/интерлейкин1 домен рецептора; TLR – Toll-подобный рецептор. Название гомологов описанных белков позвоночных представлены на рисунке в круглых скобках (Lynch, 2004).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Общая характеристика методов амплификации и клонирования фрагментов ДНК.

Для амплификации и последующего клонирования в соответствующие векторные плазмиды кДНК генов капсидных белков денсовируса рыжего таракана в качестве матрицы использовали ранее клонированные в вектор pGEM-T vector (Promega, USA) последовательности кДНК этого вируса (Kapelinskaya *et al.*, 2011). Подбор праймеров и определение температуры отжига осуществляли с помощью программы PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Для получения экспрессионных плазмид, необходимых для трансфекции культуры клеток млекопитающих, амплифицированные фрагменты ДНК клонировали в вектор pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (Invitrogen, USA) согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Для получения плазмид, необходимых для трансформации эмбрионов дрозофилы, соответствующие фрагменты ДНК клонировали в вектор pBID-UASC (<https://www.addgene.org/35200/>). В последнем случае, праймеры, использованные для амплификации ДНК, содержали дополнительные последовательности нуклеотидов, соответствующие сайтам рестрикции *Not* I и *Xho* I, по которым проводили клонирование. Очистку фрагментов ДНК, лигирование, трансформацию клеток *E. coli*, очистку плазмидной ДНК проводили с использованием стандартных методов (Маниатис и др., 1984)

2.2. Амплификация фрагментов ДНК, соответствующих открытым рамкам считывания капсидных белков VgDV1.

ПЦР проводили с использованием автоматического амплификатора Primus (MWG-Biotech) с использованием следующей программы:

начальная денатурация- 95⁰ С 5 минут. Затем 30 циклов, состоящих из трех этапов:

денатурация- 1 минута 94⁰ С;

отжиг- 58, 60, 65⁰ С, 1 минута (в зависимости от температуры плавления использованных пар праймеров);

элонгация- 72⁰ С 3 минуты;

финальная элонгация- 72⁰ С 5 минут.

Для амплификации использовали Taq ДНК полимеразу (Fermentas) в соответствии с рекомендациями производителей. Поскольку открытые рамки считывания генов всех трех капсидных белков имеют идентичный С-концевой участок, для амплификации использовали общий обратный праймер VPend_Xho1, содержащий в своей последовательности сайт

рестрикции XhoI – ctcgagttacaattcaactgaatt. Для амплификации кДНК гена VP2 использовали праймер VP2_F содержащий в своем составе последовательность Козака (СААА) – сассаааатгсссagttaattataаааасс. Для амплификации VP3 использовали прямой праймер следующего состава: сассаааатgtctgcaccagaggctatag. Последовательности Козака выделены подчеркиванием.

2.3. Электрофорез фрагментов ДНК.

Электрофорез проводили в 1 % горизонтальном агарозном геле (Fisher Biotech, USA). Для приготовления геля и проведения электрофореза использовали 1x TAE буфер (0.04M Трис-ацетат, 0.02M уксусная кислота, 2мМ ЭДТА, pH 8.0). Перед нанесением пробы смешивали с утяжеляющим раствором, содержащим 0.25 % бромфенолового синего, 35 % глицерина, 50мМ ЭДТА. Полосы нуклеиновых кислот в геле визуализировали освещением УФ (длина волны 254 нм) и фотографировали с помощью цифровой камеры Kodak Digital Camera на приборе Kodak EDAS 290.

2.4. Очистка фрагментов ДНК.

Для выделения и очистки необходимого фрагмента ДНК препарат ДНК разделяли в 1 % легкоплавкой агарозе (Fisher Biotech, USA) и нужный фрагмент вырезали скальпелем в небольшом объеме агарозы (около 100 мкл). Очистку от геля проводили на колонках с использованием набора QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA). Фрагмент геля, содержащий ДНК, инкубировали в лизирующем буфере при 50⁰ С 10 минут до полного растворения геля, объем буфера брали из расчета 1 мг геля на 3 мкл буфера. К полученному раствору добавляли изопропанол в соотношении 1 мг геля на 1 мкл изопропанола, инкубировали 2 минуты. Полученную смесь наносили на колонку и центрифугированием при 14000 об/мин, после чего данную колонку промывали 500 мкл лизирующего буфера (центрифугирование 14000 об/мин, 1 минута). После этого в колонку добавляли 750 мкл PE буфера, инкубировали 5 минут при комнатной температуре, затем снова центрифугировали 14000 об/мин 1 минуту. Переносили колонку в чистые пробирки и центрифугировали 2 минуты 14000 об/мин для удаления остатков буфера. Добавляли в колонку 50 - 100 дистиллированной воды и смывали ДНК с колонки центрифугированием при 14000 об/мин 2 минуты. Полученную ДНК хранили при -20⁰С.

2.5. Клонирование фрагментов ДНК.

Фрагменты ДНК, кодирующие целевые последовательности, лигировали с необходимым вектором.

При Т/А-клонировании с использованием вектора pGEM-T-Easy, в х2 лигазный буфер добавляли ПЦР-продукт и плазмиду pGEM-T-Easy (Promega) в молярном соотношении 1/3, и 3 единицы Т4 ДНК-лигазы. Объем реакционной смеси – 10 мкл. Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре, затем 1 час при 4⁰С. Половину лигазной смеси использовали для трансформации.

ТА-клонирование с использованием вектора pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (Invitrogen), опосредованное топоизомеразой, проводили в соответствии с рекомендацией производителя.

При клонировании в экспрессионный вектор pBID-UASC лигирование происходило по «липким концам», образовавшимся после рестрикции плазмиды pGEM-T-Easy, содержащей целевую вставку, и плазмиды pBID-UASC по сайтам *NotI* и *XhoI*. Данные сайты рестрикции находятся в полилинкере вектора pBID-UASC, и также содержались в составе праймеров, использованных для амплификации фрагментов кДНК. Сначала плазмиды обрабатывали рестриктазой *NotI*, согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Затем ДНК в реакционной смеси осаждали этиловым спиртом. Для этого к реакционной смеси добавляли 2,5 объема 96 % этилового спирта, 1/50 конечного объема 5 М хлористого натрия и 0,5 мкл гликогена и инкубировали при -20⁰ С 30 минут. Затем ДНК осаждали центрифугированием при 14000 об/мин 10 минут. Образовавшийся осадок промывали 70 % спиртом и высушивали при комнатной температуре 10 - 15 минут. Осадок растворяли в воде. Далее отбирали аликвоту и с помощью гель-электрофореза определяли качество прохождения рестрикции. Затем по аналогичной схеме повторяли рестрикцию с использованием рестриктазы *XhoI*.

Лигирование фрагментов ДНК по «липким концам» проводили с помощью Т4-ДНК лигазы в смеси следующего состава: 5 мкл х2 Rapid Ligation Buffer (60 мМ Трис-НСl, рН 7.8; 20 мМ MgCl₂; 20 мМ DTT; 2 мМ АТФ; 10 мМ ПЭГ), 1мкл вектора (50-100 нг), 1 мкл (3 ед) Т4-ДНК лигазы, клонируемый ПЦР продукт (150-300 нг), вода до 10 мкл. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и далее при +4⁰С в течение ночи и использовали для трансформации компетентных клеток бактерий.

2.6. Трансформация бактерий.

Трансформацию бактерий *E. coli* проводили химическим методом. В работе использовали штаммы *E. coli* Jm109 и TOP 10 (Promega, USA; Invitrogene, USA). Сначала единичную колонию помещали в жидкую среду x2YT и культивировали при 37⁰С в течение ночи при постоянном покачивании. Состав среды x2YT на 100 мл дистиллированной воды:

- 1,6 г пептона;
- 1 г дрожжевого экстракта;
- 0,5 г хлористого натрия.

Затем из ночной культуры брали аликвоту клеток и добавляли в свежую жидкую среду x2YT в соотношении 1:100, после чего подращивали культуру в течение 1,5- 2 часов до достижения оптической плотности OD= 0,4-0,5. Полученную культуру охлаждали на льду 10 минут, после чего центрифугировали при 4000 об/мин 5 минут при 4⁰С, осадок промывали 0,01 М хлористым магнием 5 минут. После центрифугирования осадок клеток обрабатывали 0,1 М раствором хлористого кальция 30 минут при 4⁰С, затем снова центрифугировали и добавляли 0,1 М раствор хлористого кальция, ресуспендировали осадок клеток и разливали по пробиркам по 200 мкл. Данные компетентные клетки до трансформации хранили на льду при 4⁰С.

Для трансформации к полученным заранее компетентным клеткам добавляли 2-10 мкл лигазной смеси или плазмиды и инкубировали на льду 30 минут. Затем пробирки помещали в водяную баню на 42⁰С на 2 минут и затем снова на лед на 7 минут, после чего в пробирки с трансформированными клетками добавляли 1 мл x2YT и культивировали при покачивании в течении часа. Затем из суспензии клеток отбирали 100 мкл, оставшиеся клетки центрифугировали при 13400 об/мин 30 секунд и осадок ресуспендировали в 100 мкл ростовой среды. Далее клетки (отобранные 100 мкл суспензии и осадок клеток) сеяли на агаризованную среду x2YT, содержащую селективный антибиотик, и инкубировали в термостате при 37⁰С в течение ночи.

2.7. ПЦР с использованием клеток единичной колонии *E. coli*.

Для быстрой оценки размера клонированного ДНК-фрагмента применяли метод ПЦР. Для этого использовали наборы для ПЦР GenPak PCR Core («Лаборатория Изоген»), содержащие готовые реакционные смеси и все процедуры проводили согласно методике, предоставленной фирмой изготовителем с использованием пары праймеров M13 F/R («Синтол») в конечной концентрации 0.5 мкМ. Вместо препарата ДНК в смесь вносили

небольшой кусочек интересующей колонии и тщательно перемешивали. Для проведения реакции использовалась следующая программа:

Предварительная денатурация: 5 минут. Затем 35 циклов, состоящих из трех этапов:

Денатурация – 2 мин при 95⁰С;

Отжиг – 1 минута при 55⁰С;

Синтез – при 72⁰С, время синтеза определялось из расчета 1 мин на 1000 пн. После этого проводили завершающий синтез в течение 7 минут.

2.8. Выделение плазмидной ДНК.

Для выделения плазмидной ДНК из бактерий мы использовали два подхода: для выделения в препаративных количествах, секвенирования, хранения, рестрикции и ПЦР использовался лизис кипячением. Для постановки трансфекций и инъекций в эмбрионы мух *D. melanogaster* применяли очистку на колонке Qiagen tip-100 (Qiagen).

При лизисе кипячением массу клеток собирали с поверхности агаризованной питательной среды петлей и ресуспендировали в 400 мкл раствора #1 (50мМ трис HCl, 50мМ ЭДТА, лизоцим 0,5 мг/мл, РНКаза 0,1 мг/мл) после чего интенсивной струей вливали 400 мкл раствора #2 (50мМ трис HCl, 50мМ ЭДТА, 1 % тритон X-100). Полученную смесь инкубировали при 95⁰ С 1 минуту, охлаждали и помещали на 2 минуты в лед. Центрифугировали при 14000 об/ мин 10 минут и супернатант переносили в чистую пробирку. Затем к супернатанту добавляли 40 мкл 20 % SDS и инкубировали при 65⁰ С 45 минут. По завершению инкубации добавляли 120 мкл ацетата калия, перемешивали и помещали в лед на 30 минут. После центрифугирования при 14000 об/мин 10 минут верхнюю фазу переносили в новую пробирку и добавляли к ней 500 мкл хлороформа. Смесь качественно перемешивали и центрифугировали при 14000 об/ мин 5 минут. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку и добавляли 540 мкл изопропанола, инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Центрифугировали 14000 об/мин 10 минут, образовавшийся осадок промывали 70% этиловым спиртом, подсушивали и растворяли в необходимом объеме дистиллированной воды (50- 100мкл). Плазмиды хранили при -20⁰ С.

Очистку бактериальных плазмид на колонке Qiagen-tip100 (Qiagen, USA) проводили следующим образом. 100 мл ночной культуры бактериальных клеток, содержащих плазмиду, центрифугировали при 4000 об/мин 15 минут, 4⁰ С. Удаляли водную фазу и промывали осадок из клеток 20 мл ледяного буфера STE (100 мМ NaCl, 10 мМ Tris, 1 мМ EDTA, pH 8.0) центрифугировали при 4000 об/мин 15 минут, 4⁰ С. Полностью удаляли буфер STE,

ресуспендировали осадок в буфере P1 (50 мМ Tris, 10 мМ EDTA, 100 мкг/мл РНК-азы А, рН 8.0), добавляли 4 мл буфера P2 (200 мМ NaOH, 1 % SDS), перемешивали и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 2 мл охлажденного буфера P3 (3М ацетат калия, рН 5.5), перемешивали и выдерживали на льду 15 минут. Центрифугировали клеточный лизат 30 минут при 16000 об/мин при 4⁰ С. Для подготовки колонки Qiagen-tip100 к связыванию плазмидной ДНК через колонку пропускали 4 мл буфера QBT (750 мМ NaCl, 50 мМ MOPS, 15 % EtOH, 0,15 % Triton X- 100, рН 7.0). Клеточный лизат, отобранный после центрифугирования, переносили на подготовленную колонку. Затем дважды промывали колонку 10 мл буфера QC (1 М NaCl. 50 мМ MOPS, 15 % EtOH, рН 7.0) Смывали ДНК с колонки 5 мл буфера QF (1,25 М NaCl, 50 мМ Tris, 15 % EtOH, рН 8.5). К раствору ДНК добавляли 3,5 мл изопропилового спирта. Осаждали ДНК при 12000 об/мин и 4⁰ С 30 минут. Промывали осадок 5 мл холодного 70 % этилового спирта, подсушивали на столе 5 минут. ДНК растворяли в необходимом объеме воды (примерно 500-1000 мкл).

2.9. Поддержание культур клеток млекопитающих, трансфекция.

В данной работе нами были использованы две культуры клеток млекопитающих: культура клеток HeLa и культура клеток африканской зеленой мартышки COS1. Клетки культивировали при 37⁰ С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. В качестве культуральной среды использовали среду DMEM с добавлением 10% бычьей сыворотки крови (Gibco, USA). Клетки содержали в культуральных флаконах и пересевали с периодичностью 1 раз в 5 дней (для клеток COS1 интервал составлял 3 дня). Для снятия клеток с ростовой поверхности использовали раствор трипсин/ЭДТА (Панэко, Россия). Перед постановкой трансфекции с помощью камеры Горяева определяли плотность культуры, затем из расчета 100000 кл/мл вносили необходимый объем культуральной среды в чашку Петри, содержащую покровные стекла и необходимый объем среды DMEM и 10 % сыворотки (Gibco, USA). Клетки культивировали до достижения 80-90% покрытия ростовой поверхности, после чего переходили к собственно постановке трансфекции. Трансфекцию проводили с помощью липосомного реагента Metafectene Pro (Biontex, USA) согласно рекомендациям производителя. Для этого необходимое количество плазмидной ДНК растворяли в PBS, а также в отдельной пробирке смешивали 5 мкл Metafectene Pro и 50 мкл PBS. Затем две смеси объединяли и инкубировали при комнатной температуре 15 минут. Полученную смесь добавляли в чашки Петри и оставляли на 24 ч при стандартных условиях культивирования, удаляли трансфецирующую смесь. Временной интервал последующего

культивирования составлял 24, 48 и 72 часов. Затем покровные стекла с прикрепленными клетками извлекали из чашек Петри, дважды отмывали от культуральной среды в PBS, после чего клетки фиксировали в 4 % растворе параформальдегида 10 часов при 4⁰С.

2.10. Иммуногистохимическое окрашивание клеток антителами.

После фиксации клеток переходили к их иммуногистохимическому окрашиванию. Покровные стекла с монослоем трансфецированных клеток инкубировали в течении 7 минут в растворе 0,1% Triton X-100, приготовленном на солевом растворе PBS, для улучшения проникновения антител. Для исключения неспецифического взаимодействия антител на следующей стадии клетки инкубировали в течение суток при 4⁰С в блокирующем растворе PBS с 4% BSA (Хеликон, Россия). Затем 2 часа инкубировали препараты с раствором, содержащим первичные антитела к С-концу белков VP (Kapelinskaya et al., 2011), либо антитела к GFP (Abcam, USA). Разведение 1 к 1000. Далее отмывали препараты в PBS, после чего инкубировали клетки со вторичными антителами, конъюгированными с FITC (Abcam, USA), также в течении 2 часов (разведение 1 к 5000). После обработки клеток первичными и вторичными антителами, препараты заключали в раствор ProLong Antifade Reagents (Invitrogen, USA), содержащий DAPI. Окрашивание ядерной ДНК раствором DAPI проводили в течение нескольких часов в темноте при комнатной температуре. Полученные препараты анализировали с помощью лазерного конфокального микроскопа Carl Zeiss LM510 META. Для длительного хранения препараты помещали в морозильную камеру (-20 С).

2.11. Сайт-направленный мутагенез.

Для проведения сайт-направленного мутагенеза использовали ранее описанный метод (Но *et al.*, 1989), с некоторыми модификациями. Амплификацию фрагмента ДНК, в последовательности которой должен быть заменен нуклеотид, проводили в два этапа. На первом этапе проводили амплификацию двух перекрывающихся на 25 нуклеотидов фрагментов ДНК, причем перекрывающийся район соответствовал участку, в котором должен быть заменен нуклеотид. Прямой и обратный праймеры, соответствующие перекрывающемуся району, содержали нужную нуклеотидную замену. На втором этапе проводили амплификацию протяженной последовательности ДНК, используя в качестве матрицы амплифицированные на первом этапе перекрывающиеся фрагменты ДНК и праймеры, фланкирующие заданный протяженный фрагмент. Для амплификации

использовали набор реактивов Tersus Plus PCR kit (Евроген, Россия), содержащих смесь высокоточных полимераз.

2.12. Получение трансгенных линий *D. melanogaster*. Индукция экспрессии чужеродного генетического материала.

Эмбриональную трансформацию *D. melanogaster* проводили посредством микроинъекций векторной ДНК в полярную плазму эмбрионов согласно ранее опубликованного метода (Spradling, 1986). Микроинъекции проводили в эмбрионы первого поколения, полученных от скрещивания самок линии # 32233 (генотип: $y^1 w^+ P\{CaryIP\}su(Hw)attP8$) (для интеграции чужеродного генетического материала в X-хромосому), либо самок линии # 9752 (генотип: $PVas\{yellow[+]-attP-3B\}VK00037$) (для интеграции чужеродного генетического материала во 2-ю хромосому) с самцами лабораторной линии J24, экспрессирующих интегразу фага PhiC31 под контролем промотора гена *vasa* (генотип: $2A-PhiC31(3xP3-RFP-3xP3-GFP-vas-PhiC31)$).

100 самок и 100 самцов поколения F_1 помещали в прозрачный цилиндр с чашкой Петри, покрытой влажной черной бумагой. Через три часа с помощью кисточки собирали эмбрионы и удаляли хорион с помощью липкой ленты. Дехориенизированные эмбрионы помещали на специальную подложку из парафилма. Затем с помощью микроманипулятора STEREO LumarV12, микроскопа Axiovert-200M («Zeiss», ФРГ) и системы для микроинъекций FemtoJet («Eppendorf», ФРГ) в эмбрионы вводили плазмидную ДНК в объеме 0.05 мкл. После инъекций эмбрионы помещали во влажную камеру на сутки. По истечении данного срока отбирали выживших эмбрионов и переносили их в пробирки со стандартным кормом для культивирования линий дрозофил. После вылета мух скрещивали с исходной линией (#32233 или #9752), и в получавшемся потомстве отбирали мух, которые содержали маркерный признак трансформации (красные глаза). На следующем этапе получали стабильные линии трансгенных мух, содержащих интегрированный чужеродный материал в гомозиготном состоянии.

Сайт-специфическая интеграция векторных конструкций в геном дрозофилы обеспечивалась активностью интегразы фага PhiC31, обуславливающей рекомбинацию между сайтом attB (локализован в векторе pBID-UASC) и сайтом attP, локализованным в определенном локусе генома дрозофилы (место локализации зависит от типа выбранной линии). Линии дрозофил были предоставлены Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University, USA). Индукцию экспрессии чужеродного генетического материала осуществляли посредством скрещивания виргильных самок трансгенных дрозофил с

самцами драйверной линии. В работе была использована драйверная линия # 3954 (генотип: P{Act5C-GAL4}17bFO1). Принцип активации экспрессии трансгена (GAL-UAS система) описан ранее (Duffy, 2002).

2.13. Выделение РНК, синтез кДНК.

РНК выделяли из мух на стадии имаго с помощью набора SV Total RNA Isolation kit (Promega, USA). На первом этапе отобранных мух нужного генотипа (15 самцов и 15 самок) гомогенизировали в фарфоровой ступке с добавлением жидкого азота. Полученный гомогенат помещали в 175 мкл лизис буфера и тщательно перемешивали. Затем добавляли 350 мкл RNA Dilution buffer и перемешивали. Лизат прогревали 3 минуты при 70⁰С, после чего центрифугировали 10 минут при 14000 об/ мин. Жидкую фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 200 мкл 95% этанола, после чего раствор переносили в специальную адгезивную колонку и центрифугировали 1 минуту, 14000 об/ мин. Колонку промывали 600 мкл RNA Wash buffer, после чего наносили на колонку смесь из 40 мкл Yellow Core buffer , 5 мкл 0,09 М MnCl₂ и 5 мкл DNase I. Инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 200 мкл DNase Stop solution и центрифугировали 1 минуту. Затем промывали колонку дважды RNA Wash buffer по 600 и 250 мкл. Смывали РНК с колонки 100 мкл воды.

Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора реактивов Mint (Евроген). Для этого к 50-100 нг полученной РНК добавляли 2 мкл праймера Oligod(T) (500мкг/мл) (Promega, USA) и прогревали смесь при 70⁰С 2 минуты, после чего помещали реакционную пробирку в лед. Добавляли 4 мкл 5x буфера, 2 мкл dNTP и 2мкл DTT, после чего добавляли 2 мкл Mint ревертазы и инкубировали 2 часа при 42⁰ С. Реакцию останавливали нагреванием при 70⁰С 15 минут. Для каждого образца РНК помимо экспериментальной реакции для амплификации использовали также отрицательный контроль «- ОТ-смесь», то есть реакционную смесь, не содержащую обратной транскриптазы. Полученную кДНК использовали для амплификации методом ПЦР. Для амплификации фрагментов ДНК, соответствующих экспрессируемым генам капсидных белков, использовали следующую пару праймеров: 5'UTR-VP2 gacgcataccaacgaattcg и 3'UTR- VP2 gggtccttcacaagaatcctc. Условия амплификации:

начальная денатурация- 95⁰ С 5 минут. Затем 30 циклов, состоящих из трех этапов:
денатурация- 1 минута 94⁰ С;
отжиг- 1 минута 58⁰С;

элонгация- 72⁰ С 3 минуты. Финальная элонгация составляла 5 минут при 72⁰ С.

2.14. . Определение последовательности нуклеотидов ДНК.

Секвенирование клонированных фрагментов ДНК осуществляли по методу Сенгера (терминирующих дидезоксинуклеотидов) (Sanger *et al.*, 1977), с использованием автоматического ДНК-секвенатора ABI PRIZM 310 и набора реактивов BigDye Termination Kit V. 3.1 (PE Applied Biosystems), согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Для анализа полученных последовательностей использовали программу Chromas Pro 1.33 (Technelysium, Australia).

2.15. Электрофорез белков в денатурирующем геле. Вестерн-Блот гибридизация.

Электрофорез белков проводили в 10% полиакриламидном геле по методу Лэммли (SDS-ПААГ электрофорез) (Laemmli, 1970). Лизат для нанесения на гель готовили из 10 самок и 10 самцов первого поколения, полученных от скрещивания трансгенных мух с драйверной линией. После проведения электрофореза белки переносили на PDFV-мембрану методом полусухого электроблоттинга. Вестерн-блот гибридизацию проводили согласно стандартного метода с использованием набора реактивов Protoblot 2 kit (Promega, USA), содержащего вторичные меченые антитела, против иммуноглобулинов кролика. В качестве первичных антител использовали ранее описанные антитела кролика, специфичные к эпитопу, локализованному в С-концевой части капсидных белков денсовируса BgDV1.

2.16. ПЦР в реальном времени.

Для количественного анализа экспрессии генов в трансгенных линиях дрозофил нами были отобраны следующие гены-кандидаты: дрозомидин (Drs), диптерицин (DptB), секропин С (SecC). Для ПЦР в реальном времени были использованы следующие пары праймеров: Drs- AAGTACTTGTTTCGCCCTCTTCG и TTAGCATCCTTCGCACCAGCA; DptB- TGCATTTACCGCTAGTCTTCTA и CTCAGATCGAATCCTTGCTTTGG; SecC- TACAAGATCTTCGTTTTTCGTCGC и CTGTTGCGCAATTCACAGTCC. Для амплификации использовали полимеразу производства СибЭнзим (Россия) согласно рекомендаций производителя. В качестве референсного гена использовали алкогольдегидрогеназу (FlyBase ID: FBgn0000055). Для амплификации референсного гена использовали следующую пару праймеров: ATGATGTGACCGTGCCCATТ и AGGGCTCCGTTAGTTGTTGG. ПЦР

проводили с помощью прибора MiniOpticon real-time PCR detection system (BioRad). Режим амплификации:

Начальная денатурация - 5 мин при 95⁰ С, затем 40 циклов, состоящих из следующих этапов:

Денатурация – 1 минута при 94⁰ С;

Отжиг – 30 сек при 62, 65 и 68⁰ С (в зависимости от использованных праймеров);

Элонгация – 45 сек при 72⁰ С.

Для анализа полученных результатов использовали программу CFX manager (BioRad).

(Т отжига для каждого гена был разный, все реакции ставили одновременно, градиентный ПЦР)

2.17. Секвенирование нового поколения (NGS).

Приготовление библиотеки для секвенирования проводили с помощью набора реактивов NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs, UK) согласно протокола фирмы производителя. Полученная библиотека была очищена методом экстракции из геля (вырезаны фрагменты длиной 250-400 п.о.) Выделение образца из геля проводили с использованием набора реактивов Qiagen Gel Extraction (Qiagen, USA). Определение последовательности нуклеотидов в полученной библиотеке генов проводили с использованием набора реактивов TruSeq SBS sequencing Kit version 3 (Illumina, Inc.), согласно рекомендациям фирмы изготовителя, с последующим анализом на приборе Illumina HiSeq 2000.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса BgDV1.

Известно, что репликация вирусной ДНК и формирование вирусных частиц денсовирусов происходит в ядре (Bergoin *et al.*, 2000; Vendeville *et al.*, 2009). Однако механизм выхода вирусных частиц из ядра остается непознанным. Денсовирусы являются одними из наиболее мелких из описанных к настоящему времени вирусов – размер вирусных частиц равен 18-20 нм. Столь малый размер сопоставим с размером ядерных пор, что позволяет предположить трафик вирусных частиц денсовируса через ядерные поры без разрушения ядра клетки.

Очевидно, что, как в проникновении синтезированных в цитоплазме капсидных белков денсовируса в ядро клетки, так и в выходе сформированных вирусных частиц через ядерные поры в цитоплазму, ключевую роль должны играть сигналы ядерной локализации (NLS) и ядерного экспорта (NES), являющиеся составной частью аминокислотных последовательностей капсидных белков большинства денсовирусов (Zhou *et al.*, 2009; Owens, 2013).

Ранее было показано, что белки капсида денсовируса рыжего таракана VP1 (97 кДа) и VP2 (80 кДа) имеют общий С-концевой участок, полностью соответствующий белку VP3 (57 кДа), и уникальные N-концевые участки (Kapelinskaya *et al.*, 2013) (Рисунок 6А). Посредством программы cNLS Mapper (Kosugi *et al.*, 2009) в последовательностях аминокислот всех трех капсидных белков BgDV1 предсказаны сигналы ядерной локализации: один из выявленных NLS (IVTGKRGAEERPDSASTPTKKNKPS) обладает высоким уровнем значимости (8.6), в то время как два других (KKWKFLSFGVADVILPDDIGTTTAPAKRWA и DEPMKPLGFETNADQYTGQKFRDRLSKEMYGT) - низкими уровнями значимости (3.0). В уникальном N-концевом участке белка VP2 посредством программы NetNES 1.1 (Cour *et al.*, 2009) был предсказан сигнал экспорта из ядра NES (ELDRLL) (Рисунок 6А).

Основной проблемой в изучении внутриклеточного трафика как капсидных белков, так и сформированных вирусных частиц денсовирусов, является отсутствие удобной модельной системы. Понятно, что наиболее адекватной моделью может являться пересеваемая клеточная культура, полученная из организма-хозяина соответствующего вируса. Однако не из каждого организма можно получить стабильную пересеваемую клеточную культуру, более того, далеко не каждая клеточная культура удобна для

проведения молекулярно-генетических манипуляций, например, трансфекции клеток. Одним из выходов из описанной ситуации, с нашей точки зрения, может являться использование

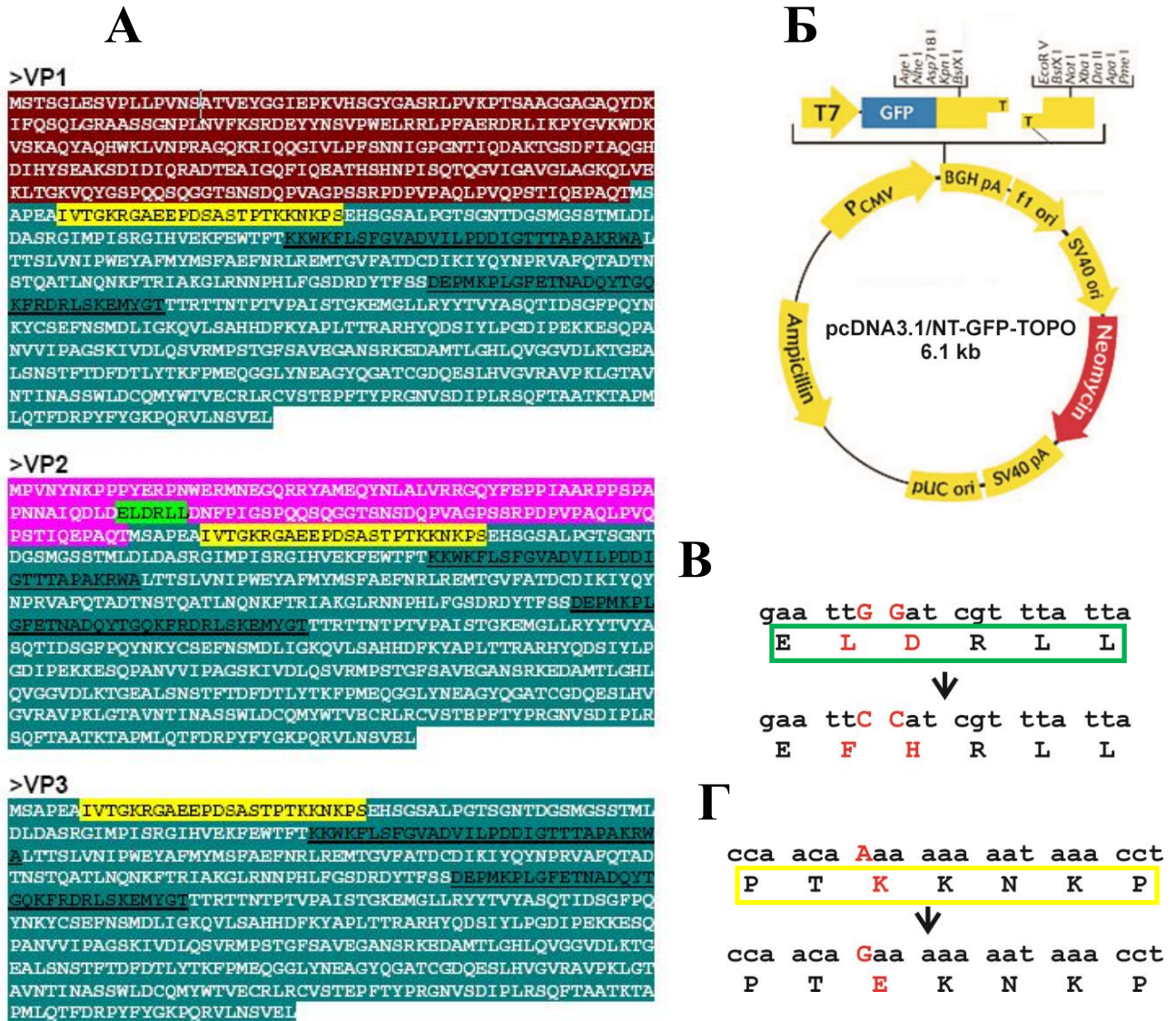


Рисунок 6. Характеристика структурной организации капсидных белков денсовируса рыжего таракана и сайт-направленного мутагенеза, приводящего к замене аминокислот. **А** – последовательности аминокислот нативных белков VP1, VP2 и VP3. Цветом морской волны выделена последовательность VP3 (общая для всех капсидных белков), бордовым и розовым цветом выделены уникальные последовательности VP1 и VP2, соответственно. Салатовым фоном выделена последовательность NES, желтым фоном – NLS с высоким уровнем значимости, подчёркиванием – NLS с низким уровнем значимости. **Б** – схематическое изображение структуры вектора pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (приведено по данным фирмы Invitrogen), использованного для клонирования кДНК капсидных белков денсовируса и последующей трансфекции клеток HeLa и Cos1. **В** – схема сайт-направленного мутагенеза NES. **Г** – схема сайт-направленного мутагенеза NLS.

гетерологичных клеточных систем, которые легко поддерживаются в лабораторных условиях и с успехом используются для молекулярно-генетических исследований, например,

культуры клеток млекопитающих. Однако данное предположение требует экспериментальной проверки, поскольку с одной стороны млекопитающие значительно эволюционно удалены от организмов-хозяев денсовирусов, с другой стороны, известно, что сигналы ядерной локализации и ядерного экспорта являются эволюционно консервативными структурами.

Целью этой части работы являлась проверка возможности использовать пересеваемые культуры клеток млекопитающих для изучения внутриклеточного трафика капсидных белков денсовируса рыжего таракана и характеристика функциональной значимости выявленных методами *in silico* в последовательностях капсидных белков сигналов ядерной локализации и ядерного экспорта.

Для получения векторных конструкций, необходимых для трансфекции культур клеток млекопитающих, ранее клонированные фрагменты амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, фланкирующих заданный участок ДНК. Амплифицированные фрагменты ДНК клонировали в вектор pсDNA3.1/NT-GFP-ТОРО (Invitrogen, USA) (Рисунок 6Б). В результате были получены векторные конструкции, позволяющие экспрессировать под контролем промотора цитомегаловируса в пересеваемых культурах клеток млекопитающих (в работе были использованы два типа клеточных культур: HeLa и Cos1) слитые гибридные белки, состоящие из двух частей: зеленого флуоресцентного белка (GFP) (N-концевая часть) и одного из капсидных белков BgDV1 (С-концевая часть). Условия постановки трансфекции и типы использованных антител описаны в разделе «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ».

В результате проведенного анализа показано, что гибридные белки GFP-VP1 и GFP-VP3 накапливаются в ядрах трансфицированных клеток HeLa. Локализация свечения флуоресцентных антител, специфичных к С-концевой части гибридного белка) и красителя DAPI полностью совпадает (Рисунок 7, ряды VP1 и VP3, столбцы А, Б, В), что указывает на внутриядерную локализацию анализируемых белков. Напротив, гибридный белок GFP-VP2 локализуется как в ядре, так и в цитоплазме (Рисунок 7, ряд VP2, столбцы А, Б, В).

При использовании антител, специфичных к N-концевой части гибридного белка (антитела к GFP) был получен аналогичный результат. Локализация свечения флуоресцентных антител, специфичных к N-концевой части гибридного белка) и красителя DAPI полностью совпадает (Рисунок 8, ряды VP1 и VP3, столбцы А, Б, В), что указывает на внутриядерную локализацию анализируемых белков. Напротив, гибридный белок GFP-VP2 локализуется как в ядре, так и в цитоплазме (Рисунок 8, ряд VP2, столбцы А, Б, В).

Как было описано выше, все три капсидных белка BgDV1 имеют несколько сигналов ядерной локализации (NLS), а белок VP2 – кроме того, и сигнал выхода из ядра (NES) (Рисунок 6А). Можно предполагать, что NLS обеспечивают внутриядерную локализацию изучаемых белков, где происходит самосборка капсид денсовируса, а NES обеспечивает выход зрелых частиц из ядер инфицированных вирусом клеток.

Для проверки функциональной значимости NLS и NES был использован следующий подход. Методом сайт-направленного мутагенеза в нуклеотидной последовательности, соответствующей NES VP2 было заменено два нуклеотида (GG → CC), в результате этой замены в соответствующей аминокислотной последовательности происходит замена двух аминокислот (LD → FH) (Рисунок 6В). Кроме того, в нуклеотидной последовательности, соответствующей NLS с максимальным уровнем значимости (IVTGKRGAEERPDSASTPTKKNKPS) белка VP3 был заменен один нуклеотид (A → G), в результате этой замены в соответствующей аминокислотной последовательности происходит замена аминокислоты (K → E) (Рисунок 6Г).

Отметим, что в аминокислотных последовательностях капсидных белков, с внесенными заменами, описанными методами *in silico* сигнал NES не был выявлен; кроме того, из трех описанных выше сигналов NLS – были выявлены только два сигнала ядерной локализации с низким уровнем значимости.

При исследовании внутриклеточной локализации мутантной формы белка VP2, то есть белка, который содержал только сигналы NLS, было показано, что измененный белок преимущественно локализуется в ядрах трансфецированных клеток (Рисунок 7, ряд VP2-м, столбцы А, Б, В).

При исследовании внутриклеточной локализации мутантной формы белка VP3, то есть белка, который не содержит ни сигнала NLS с высокой степенью значимости, ни сигнала NES, было показано, что измененный белок локализуется как в цитоплазме, так и в ядрах трансфецированных клеток (Рисунок 7, ряд VP3-м, столбцы А, Б, В). С нашей точки зрения, можно предполагать, что незначительный импорт белка VP3 с внесенной аминокислотной заменой может быть обусловлен двумя описанными сигналами NLS с низкими значениями уровней значимости (Kosugi *et al.*, 2009).

Как было отмечено выше, помимо пересеваемой культуры клеток человека (HeLa), для исследования внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса нами была также использована пересеваемая культура клеток африканской зеленой мартышки (Cos1). Известно, что при трансфекции этой культуры клеток векторными конструкциями,

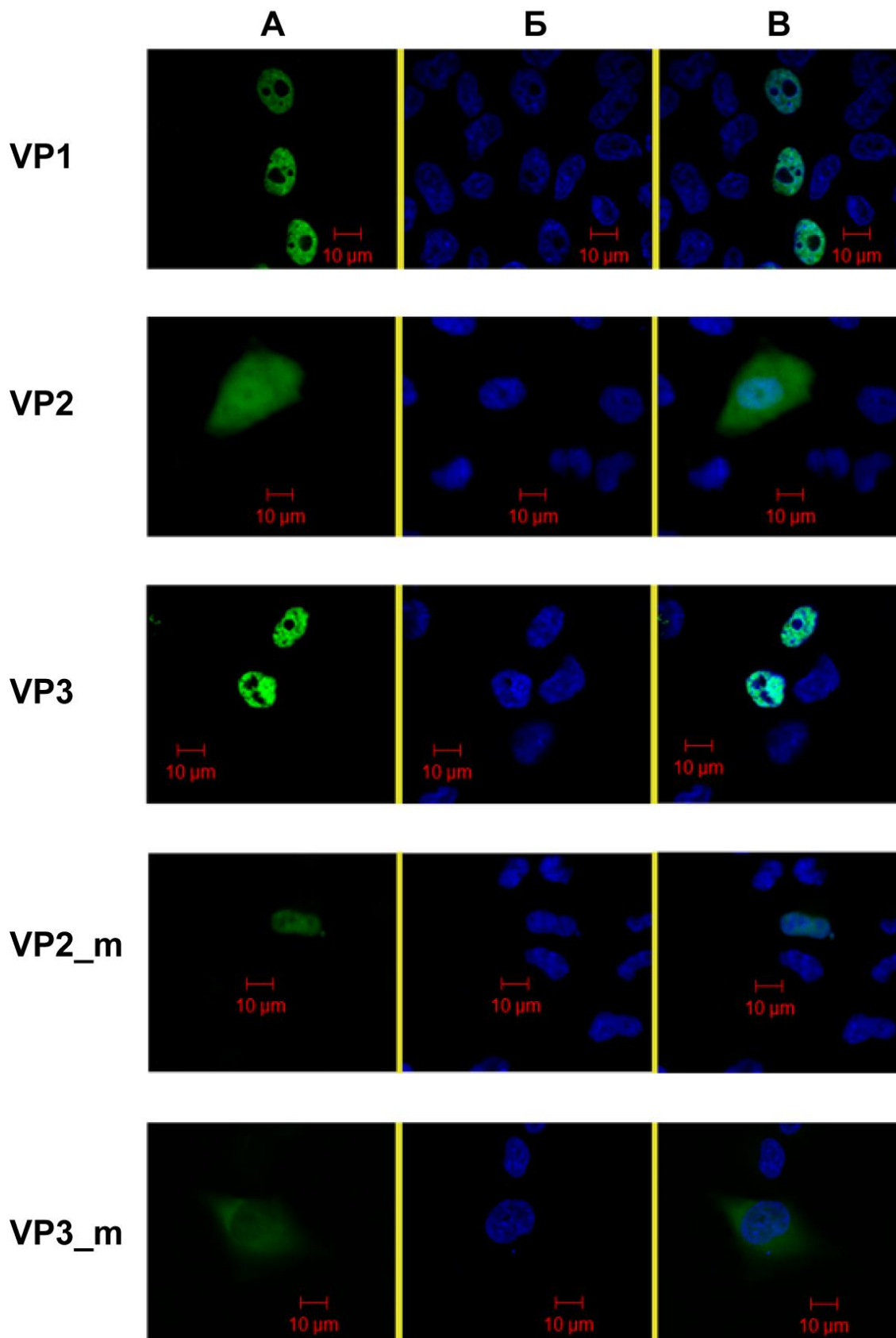


Рисунок 7. Исследование внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса BgDV1, в процессе транзитной экспрессии соответствующих векторных конструкций в пересеваемой культуре клеток HeLa (окраска антителами, специфичных к С-концевой части гибридного белка). *Условные обозначения:* ряды **VP1**, **VP2** и **VP3** демонстрируют локализацию нативных форм капсидных белков; **VP2_m** и **VP3_m** – мутантных вариантов соответствующих белков. Столбцы **А**, **Б**, **В** – окраска антителами, специфичных к С-концевой части гибридного белка, DAPI и наложение этих изображений, соответственно. Шкала – 10 мкм.

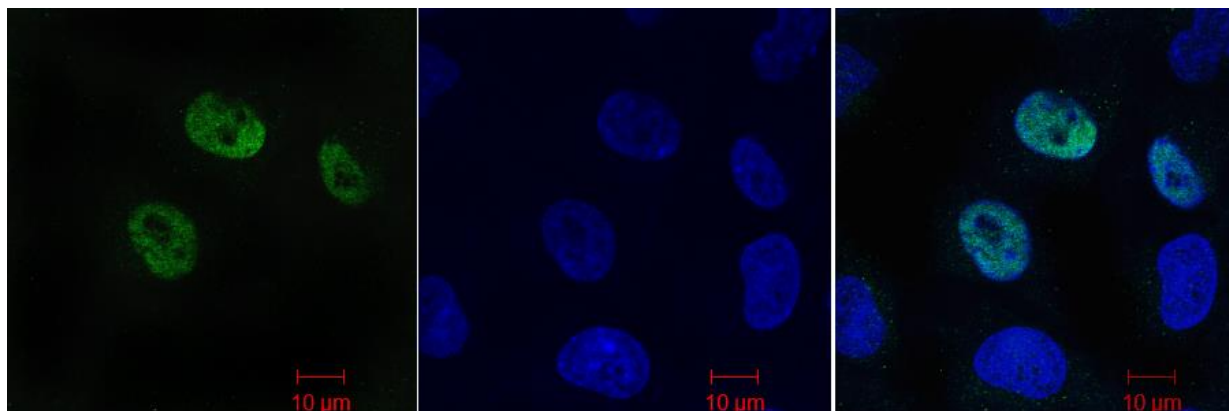
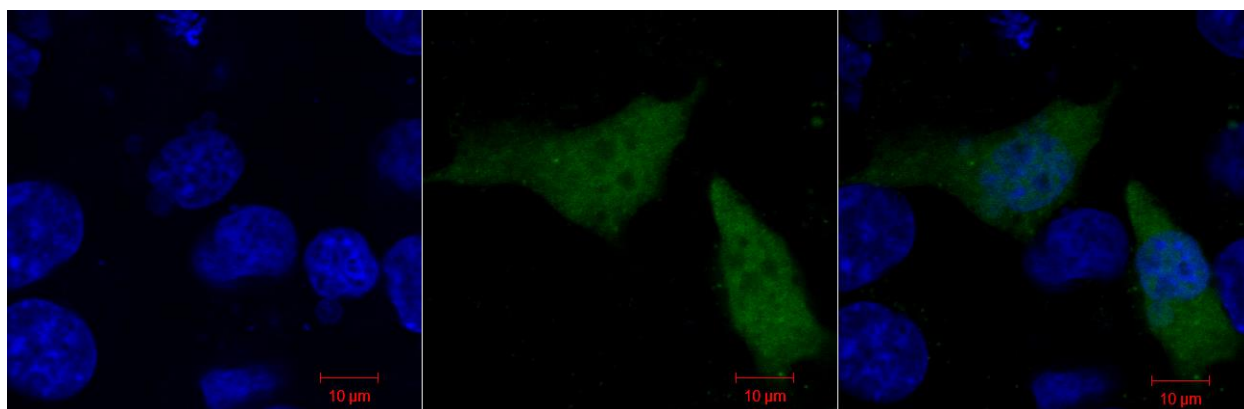
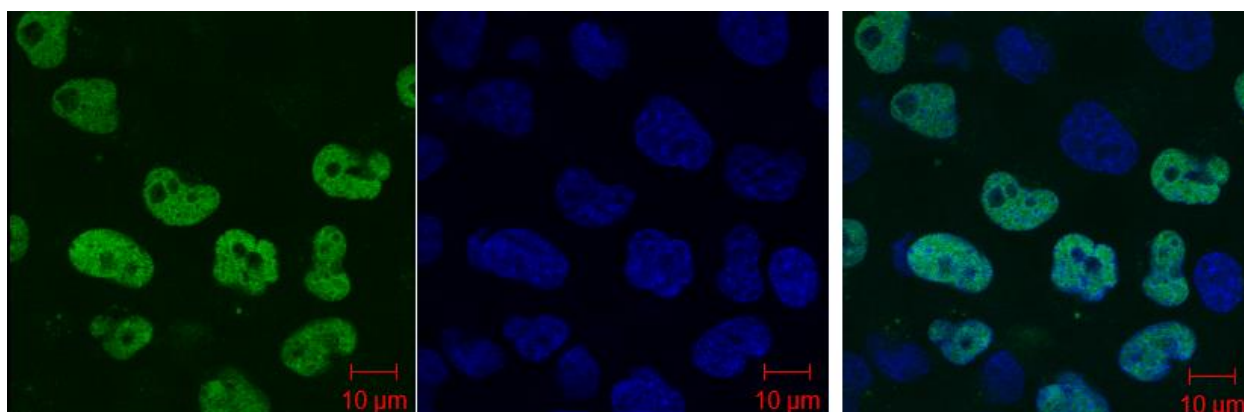
А**Б****В****VP1****VP2****VP3**

Рисунок 8. Исследование внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса BgDV1, в процессе транзитной экспрессии соответствующих векторных конструкций в пересеваемой культуре клеток HeLa (окраска антителами, специфичных к N-концевой части гибридного белка). *Условные обозначения:* ряды **VP1**, **VP2** и **VP3** демонстрируют локализацию нативных форм капсидных белков; Столбцы **А**, **Б**, **В** – окраска антителами, специфичных к N-концевой части гибридного белка, DAPI и наложение этих изображений, соответственно. Шкала – 10 мкм.

содержащими участок начала репликации SV40, происходит внутриклеточная амплификация рекомбинантной плазмидной ДНК, что может приводить к увеличению количества транслируемого белка и, как следствие, к усилению детектируемого сигнала в процессе иммуногистохимического окрашивания.

В результате проведенной работы было показано, что паттерн внутриклеточной локализации капсидных белков BgDV1 не зависит от типа использованных клеток млекопитающих. Для примера, на Рисунке 9 приведен результат исследования внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса BgDV1, детектируемой после

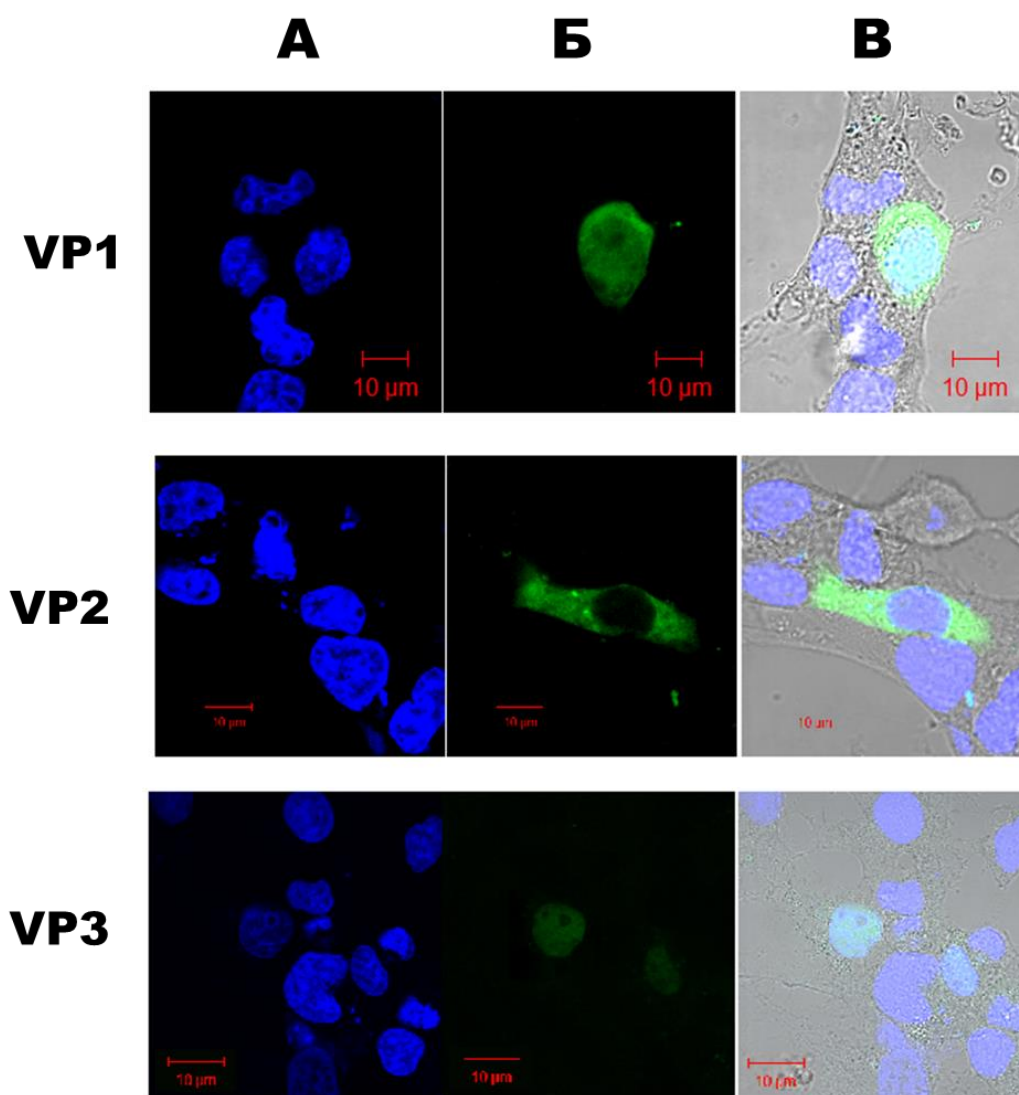


Рисунок 9. Исследование внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса BgDV1, в процессе транзитной экспрессии соответствующих векторных конструкций в пересеваемой культуре клеток COS1. *Условные обозначения:* ряды **VP1**, **VP2** и **VP3** демонстрируют локализацию капсидных белков **VP1**, **VP2** и **VP3**. Столбцы **А**, **Б**, **В** – окраска антителами, специфичными к С-концевой части гибридного белка, DAPI и наложение этих изображений, соответственно. Шкала – 10 мкм.

транзиторной экспрессии соответствующей векторной конструкции в пересеиваемой культуре клеток Cos1. Как видно на рисунке локализация свечения флуоресцентных антител и красителя DAPI полностью совпадает (Рисунок 9, ряды VP1 и VP3, столбцы А, Б, В), что указывает на внутриядерную локализацию анализируемых белков. Напротив, гибридный белок GFP-VP2 локализуется как в ядре (в меньшем количестве), так и в цитоплазме (в большем количестве) (Рисунок 9, ряд VP2, столбцы А, Б, В).

Таким образом, можно заключить, что исследованные сигналы внутриклеточной локализации белков капсида VgDV1 функционально активны, и могут регулировать как импорт капсидных белков в ядра клеток (для последующей самосборки капсид), так и, по всей вероятности, выход зрелых капсид из ядер инфицированных клеток. Кроме того, следует заключить, что культуры клеток млекопитающих является адекватной моделью для исследования сигналов внутриклеточной локализации капсидных белков денсовирусов.

3.2. Экспрессия генов капсидных белков VP2 и VP3 в трансгенных линиях *D. melanogaster*.

Для изучения экспрессии генов капсидных белков VP2 и VP3 денсовируса рыжего таракана в трансгенных линиях дрозофилы на первом этапе исследования были получены две линии трансгенных мух: первая линия содержала интегрированную в определенный сайт, локализованный в X-хромосоме, копию кДНК VP2, вторая линия - интегрированную в определенный сайт, локализованный во 2^й хромосоме, копию кДНК VP3. На Рисунке 10 представлена схема получения трансгенных линий дрозофил. Методы получения трансгенных мух и индукции экспрессии чужеродного генетического материала описаны в разделе «Материалы и Методы». РНК, используемую для синтеза копий кДНК с праймером олиго(dT), выделяли из мух первого поколения, полученных от скрещивания виргильных самок трансгенных линий с самцами драйверной линии. На Рисунке 11 приведена последовательность нуклеотидов фрагмента транскрипта интегрированной в геном копии

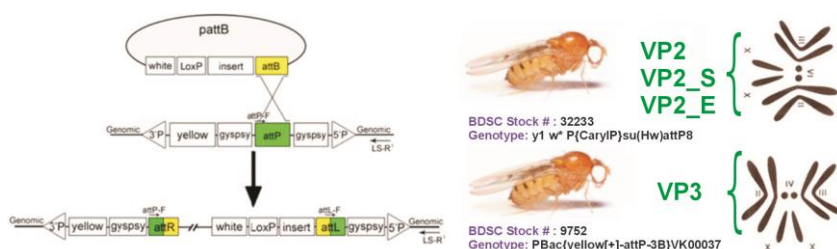


Рисунок 10. Схема получения трансгенных линий дрозофил, использованных в работе. Приведены генотипы мух, в эмбрионы которых инъецировали векторные конструкции; названия рекомбинантных ДНК; хромосомы, в которые был интегрирован чужеродный генетический материал. Также приведена условная схема сайт-специфической интеграции.

гена VP2 и указаны праймеры, использованные для амплификации методом ПЦР фрагментов ДНК, соответствующие исследуемым транскриптам (последовательности праймеров на рисунке выделены надстрочным шрифтом черного цвета).

Как видно на Рисунке 11, ожидаемый размер амплифицированного фрагмента ДНК, получаемый в результате ПЦР кДНК транскрипта VP2, равен 1972 п.о. (1887 п.о. - ORF VP2; 48 п.о. и 37 п.о. – фланкирующие ORF последовательности, 5' и 3' соответственно).

Результат электрофоретического разделения продуктов ПЦР кДНК транскрипта VP2 в 1% агарозном геле представлен на Рисунке 12А, дорожка 1. Как видно на рисунке, помимо фрагмента ожидаемой длины (1972 п.о.), выявляются продукты ПЦР, представленные фрагментами меньшей длины. Продукты ПЦР, представленные наибольшим количеством копий амплифицированной ДНК (на Рисунке 12А, дорожка 1) обозначены буквами **a**, **b**, **c**, **d**), были вырезаны из геля, очищены и клонированы в вектор pGEM-T-Easy (Promega). На следующем этапе была определена последовательность нуклеотидов, клонированных фрагментов. Показано, что фракция **a** соответствует несплайсированной форме РНК; фракция **b** – РНК, из которой удалена короткая последовательность (217 нуклеотидов), локализованная между 136 и 354 нуклеотидами транскрибируемой РНК (на Рисунке 11 этот интрон выделен желтым фоном); фракция **c** – РНК, из которой удалена относительно протяженная последовательность (1317 нуклеотидов), локализованная между 608 и 1926 нуклеотидами транскрибируемой РНК (на Рисунке 11 этот интрон выделен голубым фоном); фракция **d** – РНК, из которой удалены оба интрона. Все выявленные интроны имели канонические сайты сплайсинга: донорные 5'GU и акцепторные AG3' динуклеотиды (Рисунок 11). Выравнивание последовательностей нуклеотидов сплайсированных форм РНК относительно нативной последовательности РНК VP2 представлено в Приложении 1.

Отметим, что два из описанных сплайс-вариантов содержали достаточно протяженные ORFs, которым соответствовали определенные предсказанные белковые продукты, имеющие длину: вариант **b** – 510 аа, **c** – 189 аа. Белковый продукт несплайсированной РНК – 628 аа.

Помимо клонированных продуктов ПЦР кДНК транскрипта VP2, нами был выявлен ряд амплифицированных продуктов, представленных в минорных количествах (на Рисунке 12А, дорожка 1 обозначены звездочкой). Очевидно, что эти минорные фракции также могут соответствовать определенным сплайсированным формам РНК, однако клонирование минорных фракций не увенчалось успехом. Для описания всех вариантов сплайсинга РНК, транскрибируемой в трансгенных мухах, содержащих чужеродный генетический материал

>VP2

AGUUGUGAAUGAAUGUUCGAGCCGAGCAGACGUGCCGCGUGCCUUCGUUAAUAUCCUUGAAUAAGCCAACU
 UUGAAUCACAA^{GACGCAUACCAAACGAAUUCG}CAGAUCUGCGGCCGCGGGAAUUCGAUU^{AUG}CCA^{GUUAAUUUAU}
^{AUAAACCACCUCUUAUGAACGGCCAAAUUGGGAGCGGAUGAACGAGGGACAGCGCAGAUUAGCCAUGGAA}
^{CAAUUAAUUUAGCAUUAGUACGACGAGGACAAUAAUUUUGAACCCUAUUGCUGCAGUCCUCCUUCACC}
^{UGCUCUAAUAAUGCCAUAACAAGAUUUAGAUGAAUUGGAUCGUUUAAUUAGACAAUUUCCGAUAG}GUUCAC
 CCCAACAAUCACAAGGAGGAACAUCAAAACAGCGACCAACCAGUUGCUGGGUCCUUCUUCACGACCAGAUCCA
 GUGCCAGCUC AACUGCCAGUUCAGCCUUCAACGAUUCAAGAACCUGCACAACCG^{AUG}UCUGCACCAGAGGC
 UAUAGUUACAGGAAAAAGAGGAGCGGAAGAACCUGAUUCUGCUAGUACUCCAACA^aAAAAAAUA AACCUU
 CUGAACAUAGUGGAAGUGCAUUACCAGGCACUUCAGG^uAAUACAGAUGGUUCAUUGGGUUCUAGUACAAUG
 UUAGAUUUAGAUGCUAGUAGGGGUAAUUAUGCCUUAUAUCUAGGGGAAUACAUGUAGAGAAAUUUGAAUGGAC
 UUUCACAAAAAAUGGAAAUUUUUAUCUUUUGGUGUAGCAGAUGUAAUACUACCUGACGACAUAGGUACAA
 CUACAGCUCGCGCUAAACGAUGGGCAUUGACAACAUCUUAGUAAAACAUCCUUGGGAAUAUGCAUUUAUG
 UACAUGUCUUUUGCUGAAUUUAAUAGAUUGAGAGAAAUGACAGGAGUAUUUGCAACAGACUGUGAUUUA
 AAUUAUCAAUUAAUCCAAGAGUAGCUUUUCAACAGCAGAUACGAUAGUACACAAGCAACAUUAAAUC
 AAAUAAAUUUACUCGUUUGCAAAGGUUUAAGAAACAAUCCCCACUUGUUUGGUAGUAAUAGAGAUUAU
 ACAUUUCAAGUGAUGAACCAUGAACCCGCUUGGGUUUGAAACUAAUGCAGAUCAAUAUCUGGACAAAA
 AUUUAGAGAUAGAUUUAUCAAAGAAAUGUAUGGUACAACUACUCGUACAACAAUACUCCGACUGUACCUG
 CAUAUCAACAGGUAAGAGAUUGGUUUACUAAGAUUUUAUACUGUAUAUGCUUCACAAACUAUAGAUAGU
 GGGUUUCCUCAAUACAUAUAAUUAUUGUUCUGAAUUUAAUUCAAUGGAUUUAAUUGGUAACAAAGUUUUUAC
 UGCACAUCAUGAUUUUAAUUAUGCUCCUUAAUCUACUAGAGCAAGACAUUACCAAGAUUCUAAUUUACUUGC
 CAGGUGAUUUCUGAAAAGAAAAGAAAGUCAACCUGCUAAUUGUUGUUAUUCUGCAGGUAGUAAAAUUGUA
 GAUCUACAUCAGUUAGGAUGCCUAGUACAGGAUUUAGUGCAGUUGAAGGAGCCAAUUCUAGAAAAGGAAGA
 UGCUAUGACUCUAGGUCAUUUACAAGUAGGAGGUGUUGAUUUUAAAGACAGGAGAAGCACUUUCUAAUAGUA
 CAUUCACUGACUUUGAUACAUAUUAUACA AAAUUUCCAAUGGAACAAGGUGGAUUGUACAUAAGGACAGGA
 UAUCAAGGAGCAACAUGUGGCGAUCAAGAAAGUUUGCAGUUGGUGUUCGUGCAGUACCAAACUUGGAAC
 UGCUGUAAAUACAAUUAUUGCAUCAUCUUGGUUAGACUGUCAAUUGUAUUGGACAGUAGAAUGUAGAUUA
 GAUGCGUUUCAACAGAACCAUUUACGUAUCCAAGAGGCAAUGUAUCAGAUUUAUCCAUUACGUUCACAAUUU
 ACAG^{CUGCUACUAAAACUGCACCAUUGUUGCAAAACAUUUGAUCGCCCAUAAUUUCUUAUGGUAAAACACAAAG}
 AGUUCUAAAUCAGUUGAAUUG^{UAA}CUCGAGGGUACCUCUA^{GAGGAUCUUUGUGAAGGAACC}UUACUUCUGUGGU
 GUGACAUAUUUGGACAAACUACCUACAGAG . . . 3'

Рисунок 11. Фрагмент последовательности РНК, транскрибируемой в трансгенных дрозофилах, содержащих последовательности VP2, VP2_S и VP2_E. *Условные обозначения:* Сайт инициации транскрипции (первый нуклеотид) – голубым шрифтом; Сайт инициации трансляции VP2 – красным шрифтом и пунктирным подчеркиванием; Сайт терминации трансляции – красным шрифтом и двойным подчеркиванием; Сайт инициации трансляции VP3 – черным шрифтом и пунктирным подчеркиванием; Праймеры, использованные для исследования возможных вариантов сплайсинга – надстрочным шрифтом черного цвета; Желтым и голубым фоном обозначены интроны, выявленные в транскриптах VP2; Красным надстрочным шрифтом выделен нуклеотид, замена которого (U → G) приводит к потере 5'- донорного сайта сплайсинга одного из интронов, обозначенного голубым фоном, транскрипта VP2 (измененная последовательность ДНК использована для получения трансгенных мух VP2_S); Жирным подчеркиванием обозначены интроны, выявленные в транскриптах VP2_S; Красным подстрочным шрифтом выделен нуклеотид, замена которого (A → G) приводит к потере сигнала ядерной локализации белка VP2 (измененная последовательность ДНК использована для получения трансгенных мух VP2_E).

VP2, а также для выявления количественного соотношения между различными сплайс-вариантами, был использован метод секвенирования нового поколения (NGS).

Определение последовательности нуклеотидов в полученной библиотеке генов проводили с использованием прибора Illumina HiSeq2000 (1 дорожка, 101 цикл с одной

стороны). Полученные короткие последовательности нуклеотидов (22315772 ридов) были картированы на референсную последовательность (ORF гена VP2) с использованием пакета программ GMAP (Wu *et al.*, 2010). Результаты картирования были собраны в контиги с помощью программы Trinity (Grabherr *et al.*, 2011).

В результате проведенной работы было выявлено 4 контига, имеющих эффективную длину 1935, 1719, 618 и 402 п.о. Первый контиг (1935 п.о.) соответствовал несплайсированной РНК, второй контиг (1719 п.о.) соответствовал РНК-транскрипту, у которого вырезан меньший интрон, третий контиг (618 п.о.) соответствовал РНК-транскрипту, у которого вырезан больший интрон, и четвертый контиг (402 п.о.) соответствовал РНК-транскрипту, у которого вырезаны оба интрона. Размеры интронов и сайты сплайсинга полностью соответствовали таковым, которые были определены методом секвенирования ПЦР продуктов (см. Рисунок 12, дорожка 1). Таким образом, можно заключить, что продукты ПЦР, обозначенные на Рисунок 12А, дорожка 1 звездочкой, являются результатом неспецифической амплификации – в анализируемых трансенных мухах присутствует только три вышеописанных сплайс-варианта РНК.

Уровни экспрессии каждого из контигов, выявленных методом NGS, в исследованном образце были определены с помощью пакета программ RSEM (Li *et al.*, 2011). Показано, что в исследованном образце количество сплайс-варианта, у которого вырезан интрон меньшей длины, по отношению к несплайсированной форме РНК составляет 0,61; количество сплайс-варианта, у которого вырезан интрон большей длины, по отношению к несплайсированной форме РНК составляет 5,10; и, наконец, количество сплайс-варианта, у которого вырезаны оба интрона, по отношению к несплайсированной форме РНК составляет 0,48.

Таким образом, показано, что большая часть транскрибируемой в трансенных мухах РНК, содержащей ORF VP2, представлена сплайс-вариантами. Отношение несплайсированной формы к сплайсированным вариантам составляет примерно 1:6. Поскольку количественное соотношение между сплайс-вариантами и несплайсированной формой РНК было исследовано лишь в одном эксперименте NGS, то, строго говоря, не является статистически значимым, однако, отметим, что преобладание количества сплайс-вариантов над несплайсированной формой РНК полностью соответствует данным полуколичественного определения количества различных форм транскрипта методом ПЦР (Рисунок 12А, дорожка 1).

Анализ методом Вестерн-блота белков, экспрессируемых в дрозофилах первого поколения, полученных от скрещивания виргильных самок трансгенной линии VP2 с

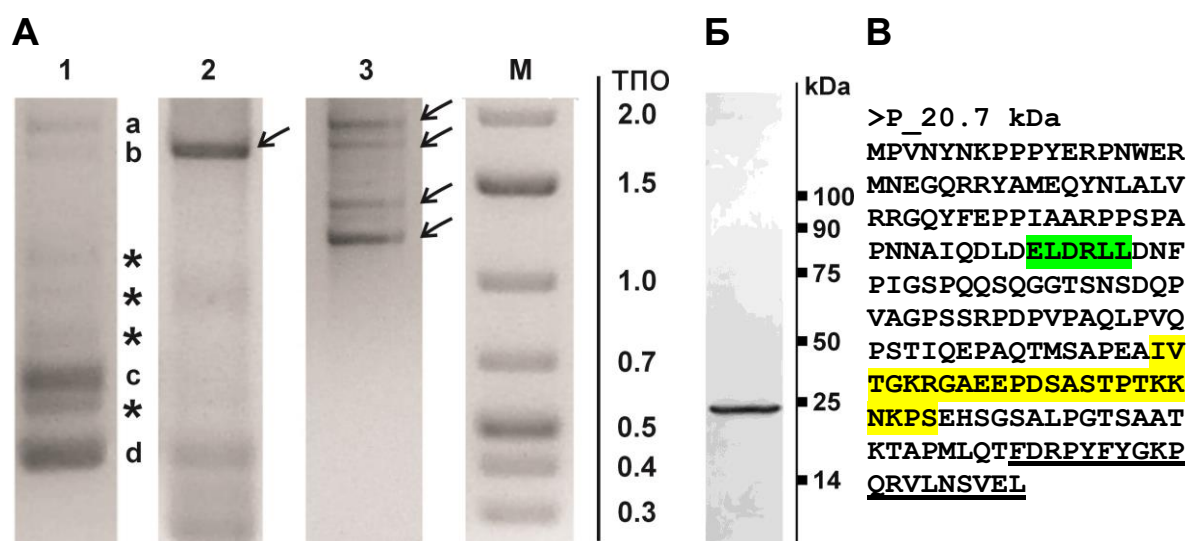


Рисунок 12. Анализ экспрессии чужеродного генетического материала у дрозофил первого поколения, полученных от скрещивания трансгенных самок с самцами драйверной линии. **А** – результат электрофоретического разделения продуктов ПЦР (описание праймеров приведено в тексте) кДНК, синтезированной с использованием в качестве матрицы тотальной РНК и праймера олиго(dT). РНК, использованная в качестве матрицы для синтеза кДНК была выделена из следующих потомков F₁: **дорожка 1** – VP2; **дорожка 2** – VP3; **дорожка 3** – VP2_S. **М** - маркерная ДНК (1 kb DNA Ladder, “Thermo Scientific”). Буквами **a, b, c, d** обозначены фракции ДНК, которые были вырезаны из геля, клонированы и секвенированы; звездочкой (*) обозначены минорные продукты ПЦР. Стрелками обозначены мажорные продукты ПЦР, обсуждаемые в тексте. **Б** – результат Вестерн-блота белков, экспрессирующихся в дрозофилах первого поколения, полученных от скрещивания самок трансгенной линии VP2 с самцами драйверной линии. **В** – предсказанная последовательность аминокислот белка, детектируемого методом Вестерн-блота. Зеленым фоном выделен сигнал выхода из ядра (NES), желтым – сигнал ядерной локализации (NLS). Подчеркиванием выделен эпитоп, специфичный для использованных антител (Kapelinskaya *et al.*, 2013).

самцами драйверной линии, представлен на Рисунке 12Б. В качестве первичных антител использовали антитела, специфичные к С-концевой части капсидных белков (Kapelinskaya *et al.*, 2013). Нами был выявлен лишь один белковый продукт, соответствующий по размеру (~20,7 kDa) сплайс-варианту РНК, из которой удален протяженный интрон, обозначенный на Рисунке 11 голубым фоном. Как было отмечено выше, нативная форма РНК, так и все описанные сплайс-варианты, содержали открытые рамки считывания и, следовательно, потенциально могли являться матрицами для синтеза соответствующих белковых продуктов. Возможно, белок, соответствующий сплайс-варианту РНК, из которой были удалены оба интрона, не был детектирован использованным методом из-за малого размера соответствующего белкового продукта (7.5 kDa); остальные предсказанные варианты белков (69.7 и 56.6 kDa) – из-за малого количества соответствующих белковых продуктов.

Результат электрофоретического разделения продуктов ПЦР кДНК транскрипта VP3 (последовательности праймеров обозначены на Рисунке 11 надстрочным шрифтом черного цвета) в 1% агарозном геле представлен на Рисунке 12А, дорожка 2. Как видно на рисунке, продукты ПЦР кДНК представлены одной основной мажорной фракцией, имеющей размер, соответствующий несплайсированной нативной РНК. Отметим, что описанный транскрипт VP3 содержит в своем составе последовательность нуклеотидов, которая в результате сплайсинга удаляется из большинства транскриптов VP2 (на Рисунке 11 обозначена голубым фоном), однако, в случае экспрессии VP3, такого сплайсинга не происходит.

С целью изучения функциональной значимости донорного сайта сплайсинга (5'GU) интрона, который присутствует как в последовательности гена VP2, так и в последовательности гена VP3, методом сайт-направленного мутагенеза в гене VP2 был заменен один нуклеотид, приводящий к изменению канонической последовательности донорного сайта сплайсинга: GU → GG (на Рисунке 11 измененный нуклеотид выделен надстрочным шрифтом красного цвета). С использованием рекомбинантной ДНК, содержащей описанную мутацию, была получена новая линия трансгенных дрозофил (VP2_S), содержащая интегрированный чужеродный генетический материал в том же сайте, что и линия VP2. Отметим, что теоретически две полученные линии трансгенных дрозофил («VP2» и «VP2_S») отличаются только на один нуклеотид (измененный донорный сайт сплайсинга).

В линии VP2_S, как и при работе с линиями VP2 и VP3, спектр транскрибируемых РНК определяли в мухах первого поколения, полученных от скрещивания виргильных трансгенных самок с самцами драйверной линии. Результат электрофоретического разделения продуктов ПЦР кДНК транскрипта VP2_S в 1% агарозном геле представлен на Рисунке 12А, дорожка 3. Выявленные мажорные фракции обозначены стрелками. Как видно на рисунке, наблюдаемый паттерн амплифицированных фрагментов в линии VP2_S значительно отличается от такового, наблюдаемого при амплификации кДНК, полученной при исследовании линии VP2.

Можно предполагать, что изменение донорного сайта сплайсинга приводит к активизации ранее не активных сайтов сплайсинга. Для проверки этого предположения, один из вариантов амплифицированных фрагментов кДНК VP2_S был клонирован, и определена его последовательность нуклеотидов. Действительно, в клонированном фрагменте ДНК было выявлено два интрона: один из них, локализованный между 136 и 354 нуклеотидами транскрибируемой РНК, полностью совпадает с интроном, описанным при исследовании транскриптов VP2 (на Рисунке 11 выделен желтым фоном и подчеркиванием), однако второй

интрон, локализованный между 1223 и 1926 нуклеотидами транскрибируемой РНК (на Рисунке 11 выделен голубым фоном и подчеркиванием) имеет с интроном, выявленным в линии VP2, общий акцепторный сайт, и ранее неописанный донорный сайт сплайсинга. Выравнивание последовательности нуклеотидов сплайсированной формы РНК исследованного транскрипта VP2_S относительно нативной последовательности РНК VP2 представлено в Приложении 2.

Известно, что одной из ярких особенностей белков капсида денсовирусов является их способность формировать вирусоподобные частицы не только из совокупности всех капсидных белков, но и из каждого белка в отдельности (Bergoin *et al.*, 2000). Показано, что при достижении некой предельной концентрации определенных капсидных белков может происходить смена их конформационного состояния и формирование агрегатов и кристаллических структур (Li *et al.*, 2008). С нашей точки зрения, логично предположить, что формирование агрегатов и кристаллических структур из определенных белков капсида BgDV1 может являться потенциальным триггерным механизмом, способным запускать механизмы клеточной защиты при экспрессии в трансгенных линиях дрозофилы, в частности, индуцировать механизмы, обуславливающие сплайсинг РНК, соответствующих потенциально опасным для клетки белкам. Возможно, белок VP2, в отличие от белка VP3, способен формировать опасные для клетки пространственные структуры, однако это предположение требует дополнительной проверки.

3.3. Транскриптомный анализ дифференциально-экспрессирующихся генов в трансгенных дрозофилах с интегрированным в геном нормальным и мутантным (изменение сигнала ядерной локализации - NLS) чужеродным геном VP2.

Известно, что капсидные белки вирусов могут выполнять не только структурную роль, являясь основными компонентами вирусных частиц, но и опосредовать регуляцию генной активности инфицированного вирусом организма-хозяина. Предполагается, что в цитоплазме клетки капсидные белки могут образовывать комплексы с регуляторными белками, которые лишены сигналов ядерной локализации (NLS), и, следовательно, которые не могут попасть в ядро клетки без участия посредников. В тоже время, комплексы капсидный белок/регуляторный белок попадают в ядро, используя NLS капсидного белка (Florin *et al.*, 2004; Ni *et al.*, 2013; Iwanaga *et al.*, 2014).

Для проверки возможной регуляторной роли капсидного белка VP2 денсовируса рыжего таракана нами была получена новая линия трансгенных мух.

В разделе «Исследование внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса BgDV1» нами было показано, что замена определенного нуклеотида приводит к утрате функциональной активности NLS капсидных белков денсовируса. Методом сайт-направленного мутагенеза в гене VP2 был заменен один нуклеотид, приводящий к потере NLS (см. Рисунки 6Г и 11; на Рисунке 11 измененный нуклеотид выделен подстрочным шрифтом красного цвета). С использованием рекомбинантной ДНК, содержащей описанную мутацию, была получена линия трансгенных дрозофил (VP2_E), содержащая интегрированный чужеродный генетический материал в том же сайте, что и линия VP2 (Рисунок 10). Отметим, что теоретически две сравниваемые линии трансгенных дрозофил («VP2» и «VP2_E») отличаются только на один нуклеотид.

Результат анализа экспрессии мутантного гена VP2 (VP2_E) представлен на Рисунке 13. РНК, используемую для синтеза копий кДНК с праймером олиго(dT), выделяли из мух первого поколения, полученных от скрещивания виргильных самок трансгенных линий с самцами драйверной линии. Можно видеть, что паттерн распределения ПЦР продуктов аналогичен тому, который наблюдался при экспрессии нативной последовательности, кодирующей VP2 (Рисунок 12А, дорожка 1).

Профили транскрибируемой РНК определяли только у самцов F₁, полученных от скрещивания самок соответствующей трансгенной линии с самцами драйверной линии. Подготовку образцов для определения пула транскрибируемых генов проводили, используя стандартный протокол, адаптированный для последующего определения последовательности

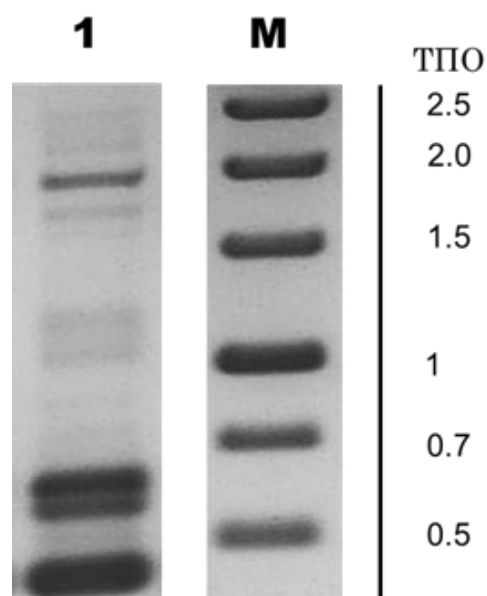


Рисунок 13. Результат электрофоретического разделения продуктов ПЦР кДНК, синтезированной с использованием в качестве матрицы тотальной РНК и праймера олиго(dT). РНК, использованная в качестве матрицы для синтеза кДНК была выделена из потомков F₁, полученных от скрещивания самок VP2_E с драйверной линией. Условные обозначения: **дорожка 1** – результат амплификации кДНК, **М** – маркерная ДНК (1 kb DNA Ladder, “Thermo Scientific”)

нуклеотидов с использованием прибора Illumina HiSeq2000. Для образца VP2 было определено 22315772 коротких последовательностей нуклеотидов (ридов), для образца VP2_E – 33075457.

Анализ дифференциальной экспрессии генов сравниваемых образцов проводили с использованием программы GSEA (Subramanian *et al.*, 2005). Было проведено сравнение уровней экспрессии 1271 гена. Показано, что примерно половина из них в сравниваемых образцах экспрессируется в разной степени. Сравнительный анализ уровней экспрессии групп генов, соответствующих функциональной роли продуктов экспрессии этих генов, (Gene Ontology - GO) показал, что 86 групп генов в образце VP2_E имеют БОЛЬШОЙ уровень экспрессии по сравнению с VP2, и 29 групп генов в образце VP2 имеют БОЛЬШОЙ уровень экспрессии по сравнению с VP2_E (в обоих случаях номинальное значение P-value < 1%).

Ниже приведено по 12 идентификаторов GO, обладающих наиболее низкими номинальными значениями P-value, и для которых выявлено обогащение уровней экспрессии соответствующих генов:

VP2_E versus VP2:

GO:0042742 - Защитный ответ на бактерии; GO:0050830 - защитный ответ против грам-положительных бактерий; GO:0050776 - Регуляция иммунного ответа; GO:0002682 - Регуляция процессов иммунной системы; GO:0002697 - Регуляция эффекторов иммунных процессов; GO:0031347 - Регуляция защитной реакции; GO:0043043 - Биосинтез пептидов; GO:0002252 - Модулирование иммунных процессов; GO:0002831 - Регуляция ответа на биотические стимулы; GO:0002759 - Регуляция антимикробного гуморального ответа; GO:0043604 – биосинтез амидов; GO:0006026 – катаболизм аминокликанов.

VP2 versus VP2_E:

GO:0050911 - Детекция химических стимулов, вовлеченных в сенсорное восприятие запаха; GO:0007140 - Мейоз у самцов; GO:0006334 - Сборка нуклеосом; GO:0007059 - Сегрегация хромосом; GO:0051303 - Установление локализации хромосом; GO:0052652 - Метаболизм циклических пуринов; GO:0007538 – детерминация пола; GO:0000070 - Митотическое разделение сестринских хроматид; GO:0000819 - Сегрегация сестринских хроматид; GO:0051310 - Сборка метафазной пластины; GO:0042773 - синтез АТФ, опосредованный транспортом электронов; GO:0007018 – движение, обусловленное микротрубочками.

Для примера на Рисунке 14 представлен график обогащения пула генов в четырех группах генов (группы генных онтологий - Gene Ontology - GO), ответственных за антибактериальный гуморальный ответ, защитный ответ на проникновение бактерий, биосинтез амидов, катаболизм аминокликанов, в линии «VP2_E» по сравнению с линией

«VP2». На рисунке вертикальными прямыми линиями обозначены отдельные гены, красной шкалой отмечена зона положительной корреляции, синей – отрицательной. На Рисунке 15 представлен график обогащения пула генов в четырех группах генов, ответственных за установление положения хромосом, расхождение сестринских хроматид, мейоз у самцов, сборка метафазной пластинки, в линии «VP2» по сравнению с линией «VP2_E». На рисунке вертикальными прямыми линиями обозначены отдельные гены, красной шкалой отмечена зона отрицательной корреляции, синей – положительной.

С нашей точки зрения, особый интерес представляет изменение уровня экспрессии генов иммунного ответа трансгенного организма, зависящее от внутриклеточной локализации капсидного белка VP2. В приведенном выше списке, цифровые идентификаторы GO, имеющие отношение к иммунным реакциям организма, выделены подчеркиванием. Кроме того, диаграммы, отражающие смещение пула генов, ответственных за регуляцию врожденного иммунного ответа дрозофилы, в область графика (эта область выделена красным и розовыми цветами), соответствующую генам, экспрессия которых усилена в линии VP2_E по сравнению с линией VP2 можно видеть на Рисунке 14 А, Б.

На Рисунке 16 приведен фрагмент диаграммы, отражающей известные и прогнозируемые белковые взаимодействия (включая как прямые (физические), так и косвенные (функциональные) ассоциации), построенной с помощью программы STRING v9.1 (Franceschini *et al.*, 2013). Красными метками выделены белки, экспрессия генов которых усилена в линии VP2_E по сравнению с линией VP2.

Результаты дифференциальной активности генов, полученные методом параллельного секвенирования (NGS), были подтверждены в независимом эксперименте, с использованием метода амплификации в реальном времени (Real-Time PCR). С этой целью, были отобраны три кандидатных гена, кодирующие соответствующие антимикробные пептиды: серкопин С, диптерицин и дрозомидин. Известно, что активизация экспрессии этих пептидов является составной частью Imd и Toll путей врожденного иммунитета насекомых (De Gregorio *et al.*, 2002; Buchon *et al.*, 2014).

Для амплификации в реальном времени в качестве матрицы использовали кДНК, полученную из РНК самцов F₁ от скрещивания трансгенных самок VP2, либо VP2_E, с самцами драйверной линии. Нормировка осуществлялась по гену алкогольдегидрогеназы.

В результате было показано, что гены всех трех исследованных антимикробных пептидов значительно сильнее экспрессируются в потомках F₁, полученных от скрещивания трансгенных самок VP2_E, по сравнению с потомками от самок VP2 (Рисунок 17). Показано, что количество транскриптов соответствующих генов, определенное использованным

методом, в потомках самок VP2_E больше соответствующего количества в потомках самок VP2 в 1.8 (серкопин C), 2.4 (диптерицин) и 1.2 раза (дрозомицин), что согласуется с данными NGS. Значения уровней экспрессии анализируемых генов, выявленные методом ПЦР в реальном времени представлены в Таблице.

Отметим, что, как было показано, большая часть транскрибируемой РНК гена VP2 и VP2_E подвергается сплайсингу (см. Рисунок 12А, дорожка 1 и Рисунок 13). Кроме того, методом Вестерн-блота был выявлен только один белок, соответствующий одному из вариантов сплайсированной РНК. Однако отметим, что выявленный «укороченный» белок в линии VP2 содержит сигналы NLS и NES, в то время как соответствующий белок в линии VP2_E содержит только сигнал NES (Рисунок 12В) и, следовательно, этот белок в линии VP2_E может быть локализован только в цитоплазме клеток. Кроме того, нельзя исключать, что белковый продукт, соответствующий несплайсированному варианту РНК, экспрессируется в малых количествах в клетках трансгенных мух, и выявленные отличия в паттернах генных активностей обусловлены функциональной активностью именно этой формы белка. И, наконец, отметим, что тип сплайсинга и профили транскрибируемых РНК мы определяли на стадии имаго. В тоже время, нельзя исключить, что индукция генетической программы, обуславливающей выявленные на стадии имаго изменения экспрессии генов врожденного иммунитета, происходит на эмбриональной стадии развития потомков F₁, полученных от скрещивания трансгенных мух с драйверной линией. В рамках данной работы, исследование сплайсинга РНК чужеродного генетического материала у трансгенных мух на эмбриональной стадии не проводилось.

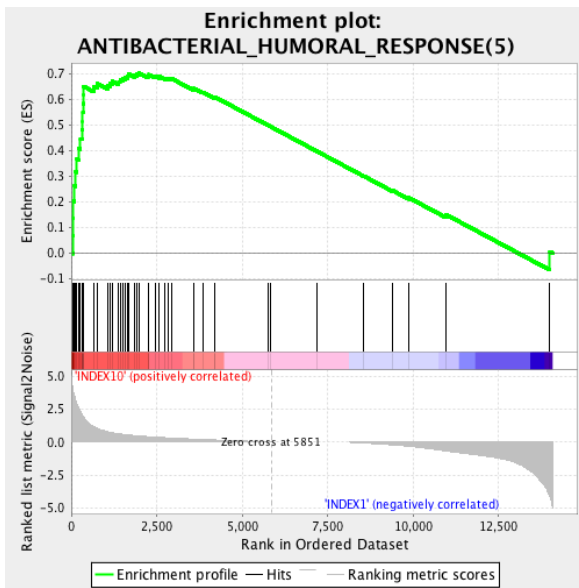
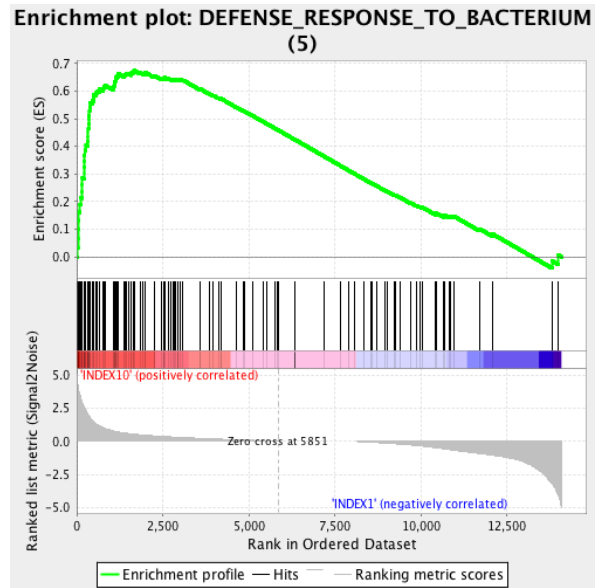
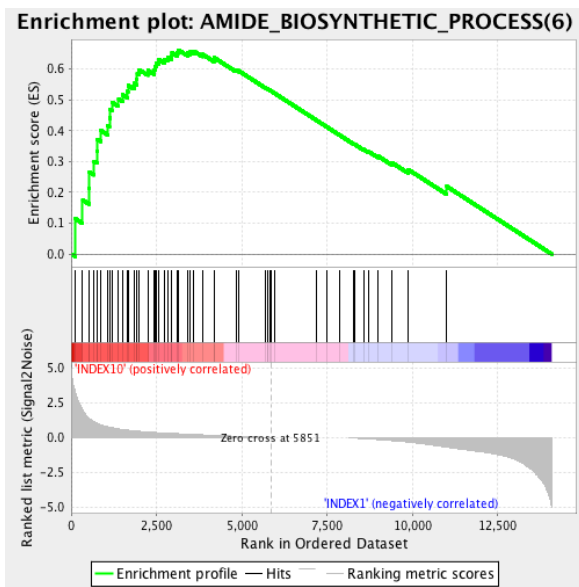
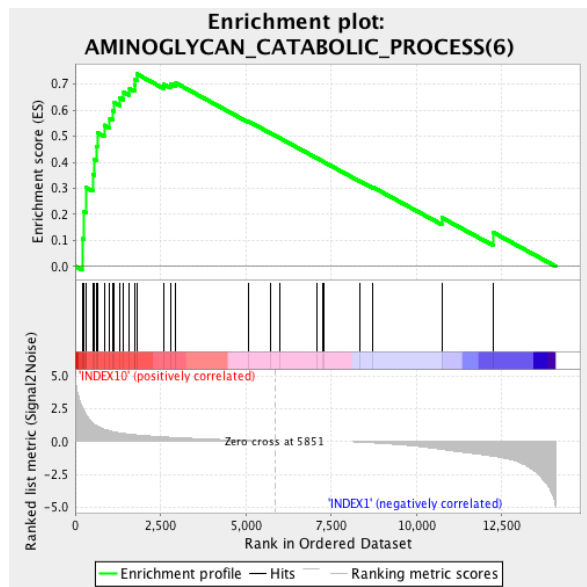
A**Б****В****Г**

Рисунок 14. График обогащения пула генов в группах генов (группы генных онтологий - Gene Ontology - GO) в линии «VP2_E» по сравнению с линией «VP2». Вертикальными прямыми линиями обозначены отдельные гены, красной шкалой отмечена зона положительной корреляции, синей – отрицательной. Показано обогащение пула генов, ответственных за **А** – антибактериальный гуморальный ответ, **Б** – защитный ответ на проникновение бактерий, **В** – биосинтез амидов, **Г** – катаболизм аминокликанов.

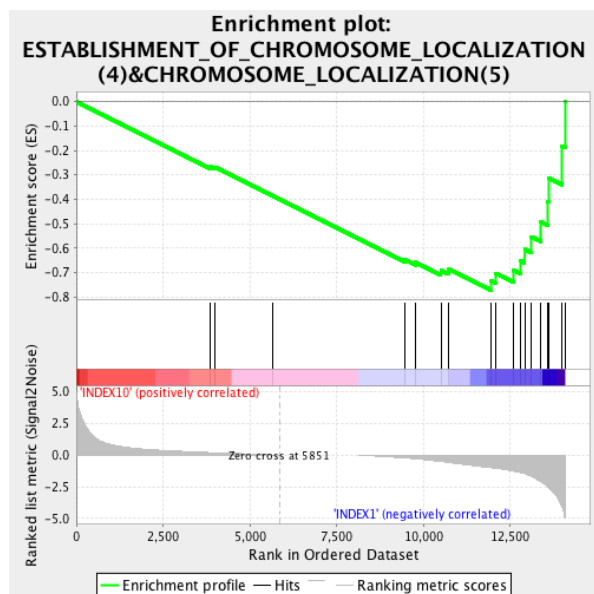
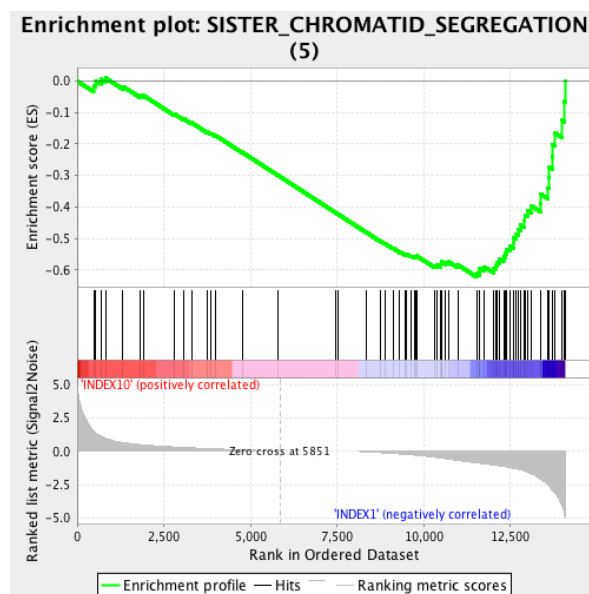
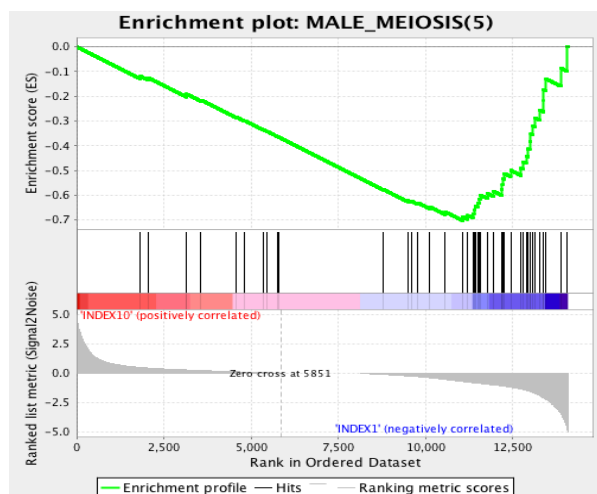
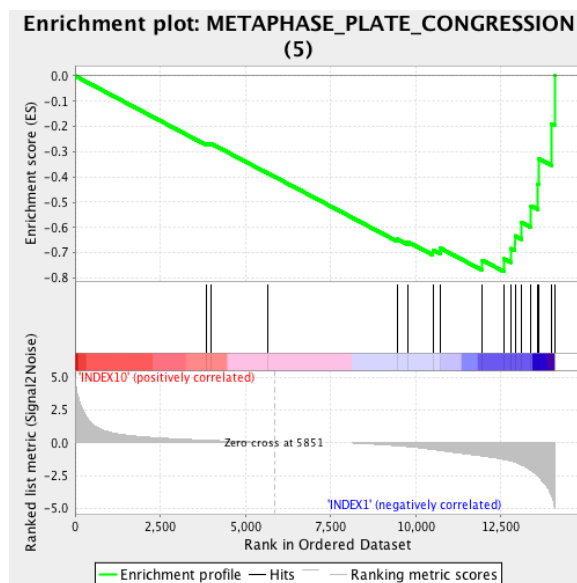
A**Б****В****Г**

Рисунок 15. График обогащения пула генов в группах генов (группы генных онтологий - Gene Ontology - GO) в линии «VP2» по сравнению с линией «VP2_E». Вертикальными прямыми линиями обозначены отдельные гены, красной шкалой отмечена зона отрицательной корреляции, синей – положительной. Показано обогащение пула генов, ответственных за **А** – установление положения хромосом, **Б** – расхождение сестринских хроматид, **В** – мейоз у самцов, **Г** – сборка метафазной пластинки.

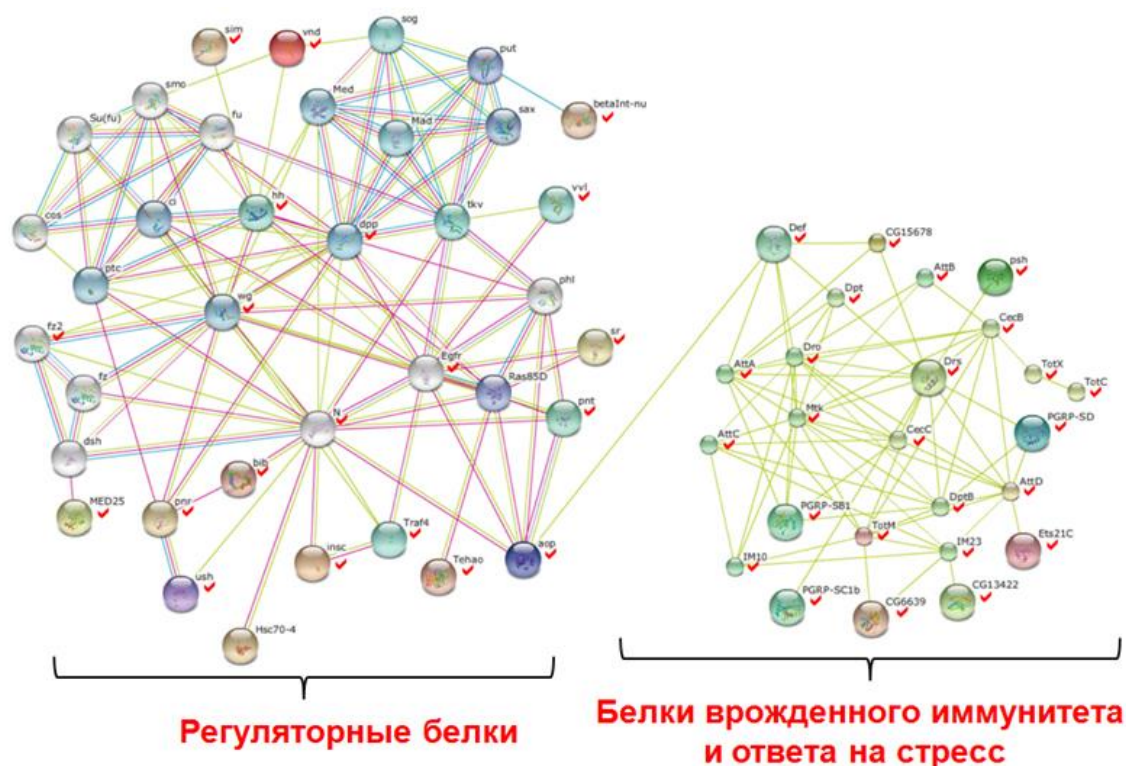


Рисунок 16. Иллюстрация изменения уровня экспрессии генов иммунного ответа трансгенных дрозофил, предположительно зависящего от внутриклеточной локализации капсидного белка VP2. Фрагмент диаграммы, отражающий описанные к настоящему времени взаимодействия между белками *D. melanogaster* (построена посредством программы STRING v9.1 с использованием соответствующей базы данных). Красными метками выделены белки, экспрессия генов которых усилена в линии VP2_E по сравнению с линией VP2.

Таблица. Значения уровней экспрессии генов антимикробных пептидов.

Target	Sample	Expression	Expression SD	Corrected Expression SD	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean Cq	Cq SD	Cq SEM
Adh	H1						20,32	0,286	0,165
Adh	H2						21,21	0,280	0,161
CecC	H1	0,752	0,073	0,074	0,042	0,042	28,84	0,181	0,105
CecC	H2	1,392	0,162	0,162	0,093	0,093	28,05	0,267	0,154
Dpt	H1	0,513	0,064	0,067	0,037	0,039	32,40	0,315	0,182
Dpt	H2	1,392	0,142	0,142	0,082	0,082	30,37	0,240	0,138
Drs	H1	1,000	0,091	0,091	0,064	0,064	26,19	0,115	0,082
Drs	H2	1,133	0,172	0,173	0,099	0,100	26,61	0,282	0,163

Условные обозначения: Adh – алкогольдегидрогеназа (референсный ген), CecC- серкопин C, Dpt – диптерицин, Drs – дрозоцин.

Expression SD - стандартное отклонение экспрессии;

Expression SEM - рассчитанная стандартная ошибка значения абсолютной экспрессии;

Mean Cq - значение определяющего цикла;

Cq SD - стандартная ошибка стандартного отклонения определяющего цикла;

Cq SEM - рассчитанная стандартная ошибка стандартного отклонения определяющего цикла.

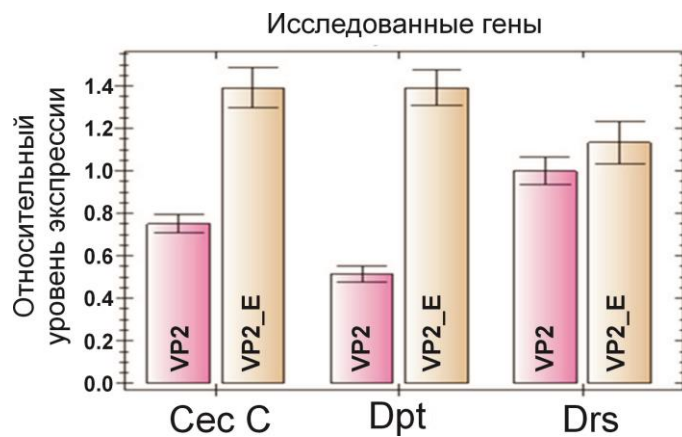


Рисунок 17. Результат ПЦР в реальном времени кДНК генов секропина (**CecC**), диптерицина (**Dpt**) и дрозомидина (**Drs**). В качестве матрицы использовали кДНК, полученную из РНК потомков F₁ от скрещивания трансгенных самок **VP2**, либо **VP2_E**, с самцами драйверной линии. Нормировка осуществлялась по гену алкогольдегидрогеназы.

ВЫВОДЫ

1. Исследована внутриклеточная локализация трех капсидных белков денсовируса рыжего таракана (BgDV1) VP1, VP2 и VP3 в процессе транзитной экспрессии векторных конструкций в пересеваемых культурах клеток млекопитающих (HeLa и Cos1). Показано, что белки VP1 и VP3 локализуются в ядрах клеток, белок VP2 – как в ядре, так и в цитоплазме.
2. С использованием метода сайт-направленного мутагенеза показано, что предсказанные *in silico* в анализируемых аминокислотных последовательностях сигналы ядерной локализации (NLS) и ядерного экспорта (NES) имеют функциональное значение для внутриклеточной компартиментализации белков капсида BgDV1.
3. Проведен анализ транскрипции чужеродного генетического материала у трансгенных особей *Drosophila*, экспрессирующих кДНК капсидных белков VP2 и VP3 денсовируса рыжего таракана. Показано, что большая часть РНК капсидного белка VP2 (в отличие от РНК капсидного белка VP3) подвергается сплайсингу, описано три сплайс-варианта. Методом секвенирования нового поколения (NGS) определены примерные количественные соотношения между выявленными сплайс-вариантами.
4. Показано, что экспрессия гена капсидного белка VP2 с измененным методом сайт-направленного мутагенеза донорным сайтом сплайсинга РНК (при сохранении последовательности аминокислот анализируемого белка) приводит к формированию новых сплайс-вариантов РНК.
5. Методами NGS и амплификации в реальном времени выявлены различия паттернов генных активностей (транскриптомов) между трансгенными особями *Drosophila*, экспрессирующими нативную последовательность кДНК капсидного белка VP2 и последовательность кДНК VP2 с нарушенным сигналом ядерной локализации (NLS). Показано, что экспрессия вирусных последовательностей, кодирующих белок с нативным сигналом NLS, связана с ослаблением транскрипционной активности генов, ответственных за врожденный иммунный ответ *Drosophila*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ./ Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. – М.: Мир, 1984 г.
2. Мартынова Е., Капелинская Т., Schal С., Муха Д. Внутриклеточная локализация регуляторных белков денсовируса рыжего таракана *Blattella germanica* // Молекулярная биология. 2014. Т. 48. №2. С. 349–352.
3. Капелинская Т., Мартынова Е., Королев А., Шал К., Муха Д. Транскрипция генома денсовируса рыжего таракана BgDNV: альтернативный процессинг вирусных РНК // Доклады Академии наук. 2008. Т. 421. №2. С. 256–261.
4. Муха Д. и Шал К. Денсовирус рыжего таракана *Blattella germanica*: обнаружение, нуклеотидная последовательность и организация генома // Молекулярная биология. 2003. Т. 37. №4. С. 607–618.
5. Abd-Alla A., Jousset F.X., Li Y., Fediere G., Cousserans F., Bergoin M. NS-3 protein of the *Junonia coenia* densovirus is essential for viral DNA replication in an Ld 652 cell line and *Spodoptera littoralis* larvae. // J. Virol. 2004. V. 78. P. 790–797.
6. Afanasiev B., Gaylov E., Buchatsky L., Kozlov Y. Nucleotide sequence and genomic organization of *Aedes densovirus* // Virology. 1991. V. 185. P. 323–336.
7. Afanasiev B., Kozlov Y., Carlson J., Beaty B. Densovirus of *Aedes aegypti* as an expression vector in mosquito cells // Exp Parasitol. 1994. V. 79. P. 322–339.
8. Akusjarvi G. Temporal regulation of adenovirus major late alternative RNA splicing // Front Biosci. 2008 V. 13. P. 5006–5015.
9. Akache B. A two-hybrid screen identifies cathepsins B and L as uncoating factors for adenovirus 2 and 8 // Mol. Ther. 2007. V. 15. C. 330–339.
10. Almendral J. Assembly of simple icosahedral viruses // Subcell Biochem. 2013. V. 68. P. 307–328.
11. Alvisi G., Ripalti A., Ngankeu A., Giannandrea M., Caraffi S., Dias M., Jans D. Human cytomegalovirus DNA polymerase catalytic subunit pUL54 possesses independently acting nuclear localization and ppUL44 binding motifs // Traffic. 2006. V. 10. P. 1322–1332.
12. Alvisi G., Jans D., Guo J., Pinna L., Ripalti A. A protein kinase CK2 site flanking the nuclear targeting signal enhances nuclear transport of human cytomegalovirus ppUL44 // Traffic. 2005. V. 11. P. 1002–1013.

13. Bantel-Schaal U. Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 2340–2349.
14. Bartlett J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 2777–2785.
15. Bergoin M. and Tijssen P. Molecular biology of Densovirinae // *Contrib Microbiol.* 2000. V.4. P. 12–32.
16. Baquerizo-Audiot E., Abd-Alla A., Jousset F., Cousserans F., Tijssen P., Bergoin M. Structure and Expression Strategy of the Genome of *Culex pipiens* Densovirus, a Mosquito Densovirus with an Ambisense Organization // *J Virol.* 2009. V. 83. P. 6863–6873.
17. Bronkhorst A., van Cleef K., Vodovar N., Ince I., Blanc H., Vlak J., Saleh M., van Rij R. The DNA virus Invertebrate iridescent virus 6 is a target of the *Drosophila* RNAi machinery // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 3604–3613.
18. Bruemmer A., Scholari F., Lopez-Ferber M., Conway J., Hewat E. Structure of an insect parvovirus (*Junonia coenia* Densovirus) determined by cryo-electron microscopy // *J Mol Biol.* 2005. V. 8. P. 791–801.
19. Carlson J., Suchman E., Buchatsky L. Densoviruses for control and genetic manipulation of mosquitoes // *Adv Virus Res.* 2006. V.68. P. 361–392.
20. Cheng L. Structure comparisons of *Aedes albopictus* densovirus with other parvoviruses // *Sci China C Life Sci.* 2007. V. 50. P. 70–74.
21. Cotmore S., Agbandje-McKenna M., Chiorini J., Mukha D., Pintel D., Qiu J., Soderlund-Venermo M., Tattersall P., Tijssen P., Gatherer D., Davison A. The family Parvoviridae // *Arch Virol.* 2014. V. 159. P. 1239–1247.
22. Cotmore S. and Tattersall P. Parvoviral host range and cell entry mechanisms // *Adv Virus Res.* 2007. V. 70. P. 183–232.
23. Corsini J., Afanasiev B., Maxwell I., Carlson J. Autonomous parvovirus and densovirus gene vectors // *Adv Virus Res.* 1996. V. 47. P. 303–351.
24. Chan C., Ma C., Chan W., Chan H. The SARS-coronavirus membrane protein induces apoptosis through modulating the Akt survival pathway // *Arch. Biochem. Biophys.* 2007. V. 459. P. 197–207.
25. Cohen S. and Pante N. Pushing the envelope: microinjection of Minute virus of mice into *Xenopus* oocytes causes damage to the nuclear envelope // *J. Gen. Virol.* 2005. V. 86. P. 3243–3252.
26. Cohen S. Parvoviral nuclear import: bypassing the host nuclear-transport machinery // *J. Gen. Virol.* 2006. V. 87. P. 3209–3213.

27. Cronshaw J., Krutchinsky A., Zhang W., Chait B., Matunis M. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex // *J. Cell Biol.* 2002. V. 158. P. 915–927.
28. Davison A., Benko M., Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses // *J Gen Virol.* 2003 V. 84. P. 2895–2908.
29. De Gregorio E., Spellman P., Tzou P., Rubin G., Lemaitre B. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila* // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 2568–2579.
30. Ding C. Urabe M. Bergoin M. Kotin R. Biochemical characterization of Junonia coenia densovirus nonstructural protein NS-1 // *J. Virol.* 2002. V.76. P. 338–345.
31. Ding W. rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion // *Mol. Ther.* 2006. V. 13. P. 671– 682.
32. Ding W. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors // *Gene Ther.* 2005. V. 12. P. 873–880.
33. Duan D. Dynamin is required for recombinant adenoassociated virus type 2 infection // *J. Virol.* 1999. V. 73. P. 10371–10376.
34. Duan D. Polarity influences the efficiency of recombinant adenoassociated virus infection in differentiated airway epithelia // *Hum. Gene Ther.* 1998. V.9. P. 2761–2776.
35. Duffy J. GAL4 system in drosophila: A fly geneticist's swiss army knife // *Genesis* 2002. V. 34. P. 1–15.
36. Evans C., Hartenstein V., Banerjee U. Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis // *Dev. Cell* 2003 V.5. P. 673–690.
37. Fediere G. Parvoviruses. From Molecular Biology to Pathology and Therapeutic Uses // Ed. by S. Faisst, J. Rommelaere. *Contrib Microbiol.* Basel, Karger. 2000. V. 4. P. 1–11.
38. Fédère G., El-Far M., Li Y., Bergoin M., Tijssen P. Expression strategy of densovirus from *Mythimna loreyi* // *Virology.* 2004. V. 320. P.181–189.
39. Fortes P., Lamond A., Ortín J. Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components // *J Gen Virol.* 1995. V. 76. P. 1001–1007.
40. Feany M. and Bender W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease // *Nature.* 2000. V. 404. P. 394–398.
41. Farr G. and Tattersall P. A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection // *Virology* 2004. V. 323. P. 243–256.
42. Farr G. Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. V. 102. P. 17148–17153.

43. Floer M. and Blobel G. The nuclear transport factor karyopherin beta binds stoichiometrically to Ran-GTP and inhibits the Ran GTPase activating protein // *Biol. Chem.* 1996. V. 271. C. 5313–5516.
44. Guo H., Zhang J., Hu Y. Complete sequence and organization of *Periplaneta fuliginosa* densovirus genome // *Acta Virol.* 2000. V.44. P. 315–322.
45. Ge Y. and Porse B. The functional consequences of intron retention: alternative splicing coupled to NMD as a regulator of gene expression // *Bioessays.* 2014. V. 36. P. 236–243.
46. Gómez-Puertas P., Albo C., Esperanza Pérez-Pastrana E., Amparo Vivo A., Portela A. Influenza Virus Matrix Protein Is the Major Driving Force in Virus Budding // *J Virol.* 2000. V. 74. P. 11538–11547.
47. Girod A. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. P. 973–978.
48. Grabherr M., Haas B., Yassour M. Fulllength transcriptome assembly from RNAseq data without a reference genome // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 644–652.
49. Grieger J. Surface exposed adeno-associated virus Vp1– NLS capsid fusion protein rescues infectivity of non-infectious wildtype Vp2/Vp3 and Vp3-only capsids, but not 5-fold pore mutant virions // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 7833–7843.
50. Hanh T., Pham C., Oanh T., Huynh H., Jousset F. *Junonia coenia* Densovirus (JcDENV) Genome Structure // *Genome Announc.* 2013 V. 1. P. 10591–10613.
51. Hoskins A. and Moore M. The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine // *Trends Biochem Sci.* 2012. V. 37. P. 179–188.
52. Hasson T., Soloway P., Ornelles D., Doerfler W., Shenk T. Adenovirus L1 52- and 55-kilodalton proteins are required for assembly of virions // *J Virol.* 1989. V.63. P. 3612–3621.
53. Hao L., Sakurai A., Watanabe T., Sorensen E., Nidom C., Newton M., Ahlquist P., Kawaoka Y. *Drosophila* RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication // *Nature.* 2008. V.454. P. 890–893.
54. Hueffer K. Parvovirus infection of cells by using variants of the feline transferrin receptor altering clathrin-mediated endocytosis, membrane domain localization, and capsid-binding domains // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 5601–5611.
55. Hueffer K. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor // *J. Virol.* 2003. V.77. P. 1718–1726.
56. Hirosue S. Effect of inhibition of dynein function and microtubule-altering drugs on AAV2 transduction // *Virology* 2007. V. 367. P. 10–18.

57. Hood J. and Silver P. In or out? Regulating nuclear transport // *Curr Opin Cell Biol.* 1999. V.11. P. 241–247.
58. Ho S., Hunt H., Horton R., Pullen J., Pease L. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction // *Gene.* 1989 V. 77. P. 51–59.
59. Heilman D., Teodoro J., Green M. Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies // *J Virol.*2006. V. 80. P. 7535–7545.
60. Hughes T., Allen A., Bardin J., Christian M., Daimon K., Dozier K., Hansen C., Holcomb L., Ahlander J. *Drosophila* as a genetic model for studying pathogenic human viruses // *Virology* 2012. V. 423. P. 1–5.
61. Hedengren M., Asling B., Dushay M., Ando I., Ekengren S. Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila* // *Mol. Cell* 1999. V. 4. P. 827–837.
62. Iwanaga M., Shibano Y., Ohsawa T., Fujita T., Katsuma S., Kawasaki H. Involvement of HSC70-4 and other inducible HSPs in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection // *Virus Res.* 2014. V.179. P. 113–118.
63. Jia R. and Zheng Z. Regulation of bovine papillomavirus type 1 gene expression by RNA processing // *Front Biosci.* 2009. V.1 P. 1270v1282.
64. Kapelinskaya T., Martynova E., Schal C., Mukha D. Expression strategy of densovirus from the German cockroach, *Blattella germanica* // *J Virol.* 2011. V.85. P. 11855–11870.
65. Komeili A. and O'Shea E. Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4 // *Science* 1999. V.284. P. 977–980.
66. Kaufmann B., El-Far M., Plevka P., Bowman V Yi Li, Peter Tijssen P and Michael G. Rossmann M. Structure of *Bombyx mori* densovirus 1, a silkworm pathogen // *J Virol.* 2011. V. 85. P. 4691–4697.
67. . Kaufmann B. Structure of *Penaeus stylirostris* densovirus, a shrimp pathogen // *J Virol.* 2010. V. 84. P. 11289–11296.
68. Klymenko T., Graham S. Human papillomavirus gene expression is controlled by host cell splicing factors // *Biochem. Soc. Trans.* 2012. V.40. P. 773–777.
69. Kosugi S., Hasebe M., Tomita M., Yanagawa H. Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009. V. 106. P. 10171–10176.
70. Lesli M., Zhang W., Timney L., Chait T., Rout P., Wozniak W., Aitchison J. Characterization of Karyopherin Cargoes Reveals Unique Mechanisms of Kap121p-Mediated Nuclear Import // *Mol. Cell Biol.* 2004. V.24. P. 8487–8503.

71. Li Y., Zádori Z., Bando H., Dubuc R., Fédière G., Szelei J., Tijssen P. Genome organization of the densovirus from *Bombyx mori* (BmDNV-1) and enzyme activity of its capsid // *J Gen Virol.* 2001. V.82. P. 2821–2825.
72. Li B. and Dewey C. RSEM: accurate transcript quantification from RNASeq data with or without a reference genome // *BMC Bioinformatics.* 2011. V. 12. P. 312–323.
73. Li Z., He J., Huang X. The truncated virus- like particles of C6/36 cell densovirus: implications for the assembly mechanism of brevidensovirus // *Virus Res.* 2008. V. 132. P. 248–252.
74. Lerner M., Boyle J., Mount S., Wolin S., Steitz J. Are snRNPs involved in splicing? // *Nature* 1980. V. 283. P. 220–224.
75. Lopez A. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation // *Annu. Rev. Genet.* 1998. V. 32. P. 279–305.
76. López J. Splicing up the synapse // *Nature Reviews Neuroscience.* 2003. V.4. P. 780–781.
77. Larsson S., Svensson C., Akusjärvi G. Control of adenovirus major late gene expression at multiple levels // *J Mol Biol.* 1992. V. 225. P. 287–298.
78. Lux K. Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 11776–11787.
79. Lei E. and Silver P. Protein and RNA export from the nucleus // *Dev. Cell.* 2002. V. 2. P. 261–272.
80. Lindsay M., Holaska J., Welch K., Paschal B., Macara I. Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export // *J. Cell Biol.* 2001. V. 153. P. 1391–1402.
81. Leulier F., Marchal C., Miletich I., Limbourg-Bouchon B., Benarous R., Lemaitre B. Directed expression of the HIV-1 accessory protein Vpu in *Drosophila* fat-body cells inhibits Toll-dependent immune responses // *EMBO Rep.* 2003. V. 4. P. 976–981.
82. Lynch K. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system // *Nat. Rev. Immunol.* 2004. V.4. P. 931–940.
83. Maroto B., Valle N., Saffrich R., Almendral J. Nuclear export of the nonenveloped parvovirus virion is directed by an unordered protein signal exposed on the capsid surface // *J Virol.* 2004. V. 78. P. 10685–10694.
84. Mukha D., Chumachenko A., Dykstra M., Kurtti T., Schal C. Characterization of a new densovirus infecting the German cockroach, *Blattella germanica* // *Gen Virol.* 2006 V. 87. P. 1567–1575.
85. Matlin A., Clark F., Smith C. Understanding alternative splicing: towards a cellular code // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005. V. 6. P. 386–398.

- 86.** Mühlemann O., Yue B., Petersen-Mahrt S., Akusjärvi G. A novel type of splicing enhancer regulating adenovirus pre-mRNA splicing // *Mol Cell Biol.* 2000. V. 20. P. 2317–2325.
- 87.** Marsh E. Oligomerized transferrin receptors are selectively retained by a luminal sorting signal in a long-lived endocytic recycling compartment // *J. Cell Biol.* 1995. V. 129. P. 1509–1522.
- 88.** Mani B. Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 1015–1024.
- 89.** McGuire S., Roman G., Davis R. Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. // *Trends Genet.* 2004. V. 20. P. 384–391.
- 90.** Meister M. Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defense // *Curr. Opin. Immunol.* 2004. V. 16. P. 10–15.
- 91.** Meng X., Khanuja B., Ip Y. Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF- κ B factor // *Genes Dev.* 1999. V. 13. P. 792–97.
- 92.** Manfrulli P., Reichhart J., Steward R., Hoffmann J., Lemaitre B. A mosaic analysis in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF // *EMBO J.* 1999. V.18. P. 3380–3391.
- 93.** Musselman L., Fink J., Narzinski K., Ramachandran P., Hathiramani S., Cagan R., Baranski T. // A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Dis Model Mech.* 2011. V. 4. P. 842–849.
- 94.** Ni P. and Cheng K. Non-encapsidation activities of the capsid proteins of positive-strand RNA viruses // *Virology* 2013. V. 446. P. 123–132.
- 95.** Owens L. Bioinformatical analysis of nuclear localisation sequences in penaeid densovirus // *Mar Genomics.* 2013. V. 12. P. 9–15.
- 96.** Parrish CR. Structures and functions of parvovirus capsids and the process of cell infection // *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010. V.343 P. 149–176.
- 97.** Peccarelli M., Kebaara B. Regulation of natural mRNAs by the nonsense-mediated mRNA decay pathway // *Eukaryot Cell.* 2014. V. 13. P. 1126–1135.
- 98.** Meng G., Zhang X., Plevka P., Yu Q., Tijssen P., Rossmann M. The structure and host entry of an invertebrate parvovirus // *J Virol.* 2013. V. 87. P. 12523–12530.
- 99.** Palermo L. Residues in the apical domain of the feline and canine transferrin receptors control host-specific binding and cell infection of canine and feline parvoviruses // *J. Virol.* 2003. V. 77. P. 8915–8923.

- 100.** Parker J. and Parrish C.R. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 1919–1930.
- 101.** Pemberton L. and Paschal B. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. // *Traffic* 2005. V. 6. P. 187–198.
- 102.** Pham H., Huynh O., Jousset F., Bergoin M., Tijssen P. Junonia coenia Densovirus (JcDENV) Genome Structure // *Genome Announc.* 2013 V. 1. P. 10591–10613.
- 103.** Ponti D., Troiano M., Bellenchi G., Battaglia P., Gigliani F. The HIV Tat protein affects processing of ribosomal RNA precursor // *BMC Cell Biol.* 2008. V. 9. P. 32–39.
- 104.** Rosenblum J., Pemberton L., Bonifaci N., Blobel G. Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein // *J. Cell Biol.* 1998. V.143. P. 887–899.
- 105.** Rout M. and Aitchison J. Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange // *Essays Biochem.* 2000. V. 36. P. 75–88.
- 106.** Samuel C. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral // *Virology* 2011. V. 411. P. 180–193.
- 107.** Sanger F., Niclen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Pros. Nat. Ac. Sci. USA.* 1977. V. 74. P. 5463–5467.
- 108.** Simpson A. Chipman P., Baker T., Tijssen P., Rossmann M. The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution // *Structure.* 1998. V. 6. P. 1355–1367.
- 109.** Shike H., Dhar A., Burns J., Shimizu C., Jousset F., Klimpel K., Bergoin M. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses // *Virology.* 2000. V. 277. P. 167–177.
- 110.** Shirk P., Bossin H., Furlong R., Gillett J. Regulation of *Junonia coenia* densovirus P9 promoter expression // *Insect Mol Biol.* 2007. V. 16. P. 623–633.
- 111.** Sukhumsirichart W., Attasart P., Boonsaeng V., Panyim S. Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon* // *Virology.* 2006. V.346. P. 266–277.
- 112.** Safeena M., Rai P., Karunasagar I. Molecular Biology and Epidemiology of Hepatopancreatic parvovirus of Penaeid Shrimp. // *Indian J Virol.* 2012. V.23. P. 191–202.
- 113.** Stamm S., Ben-Ari S., Rafalska I., Tang Y., Zhang Z., Toiber D., Thanaraj T., Soreq H. Function of alternative splicing // *Gene.* 2005. V. 344. P. 1–20.
- 114.** Shaw A. and Ziff E. Transcripts from the adenovirus-2 major late promoter yield a single early family of 3' coterminal mRNAs and five late families // *Cell.* 1980. V. 22. P. 905–916.

- 115.** San Martín C. Latest insights on adenovirus structure and assembly // *Viruses*. 2012. V. 4. P. 847–877.
- 116.** Schwartz S. HPV-16 RNA processing // *Front Biosci*. 2008. V.13. P. 5880–5891.
- 117.** Schneider J. and Wolff T. Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: do they play a role in viral mRNA export? // *Vaccine*. 2009. V. 27. P. 6312–6326.
- 118.** Sanlioglu S. Endocytosis and nuclear trafficking of adenoassociated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol- 3 kinase activation // *J. Virol*. 2000. V. 74. P. 9184–9196.
- 119.** Suikkanen S. Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus // *J. Virol*. 2003. V. 77. P. 10270–10279.
- 120.** . Seisenberger G. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus // *Science* 2000. V. 294. P. 1929–1932.
- 121.** Simpson A. Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses // *J. Mol. Biol*. 2000. V. 300. P. 597–610.
- 122.** Sonntag F. Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus // *J. Virol*. 2006. V. 80. P. 11040–11054.
- 123.** Suntharalingam M. and Wentz S. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function // *Dev. Cell*. 2003. V. 4. P. 775–789.
- 124.** Stochaj U. and Rother K. Nucleocytoplasmic trafficking of proteins: With or without Ran? // *Bioessays* 1999. V. 21. P. 579–589.
- 125.** Shah S., Tugendreich S., Forbes D. Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr // *J. Cell Biol*. 1998. V. 14. P. 31–49.
- 126.** Spradling, A. P element-mediated transformation In *Drosophila: A practical approach* // Oxford, IRL Press 1986 . Ed. by D. B. Roberts. pp. 175–197.
- 127.** . Tijssen P., Li Y., El-Far M., Szelei J., Letarte M., Zádori Z. Organization and expression strategy of the ambisense genome of densovirus of *Galleria mellonella* // *J Virol*. 2003. V. 77. P. 10357–10365.
- 128.** Tijssen P., Bergoin M. Densovirus viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses // *Semin. Virol*. 1995. V. 6. P. 347–356.
- 129.** Tijssen P., Li Y., El-Far M., Szelei J., Letarte M., Zádori. Z. Organization and Expression Strategy of the Ambisense Genome of Densovirus of *Galleria mellonella* // *J. Virol*. 2003. V. 77. P. 10357–10365.

- 130.** Tullis G. The trypsin-sensitive RVER domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but not for proteolytic processing in vivo // *Virology*. 1992. V. 191. P. 846–857.
- 131.** Tavassoli M., Guelen L., Luxon B., Gäken J. Apoptin: specific killer of tumor cells? // *Apoptosis* 2005. V. 10. P. 717–724.
- 132.** Tal J. and Attathom T. Insecticidal potential of the insect parvovirus GmDENV // *Arch. Insect Biochem Physiol*. 1993. V. 22. P. 345–356.
- 133.** Van Vliet K. Proteolytic mapping of the adeno-associated virus capsid // *Mol. Ther.* 2006. V. 14. P. 809–821.
- 134.** Vihinen-Ranta M. Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 4853–4859.
- 135.** Vihinen-Ranta M. Intracellular route of canine parvovirus entry // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 802–806.
- 136.** Weichert W. Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection // *Virology* 1998. V. 250. P. 106–117.
- 137.** Wang Y., Abd-Alla A., Bossin H., Li Y., Bergoin M. Analysis of the transcription strategy of the *Junonia coenia* densovirus (JcDENV) genome // *Virus Res.* 2013. V. 174. P. 101–107.
- 138.** Ward T., Kimmick M., Afanasiev B., Carlson J. Characterization of the structural gene promoter of *Aedes aegypti* densovirus // *J Virol.* 2001. V. 75. P. 1325–1331.
- 139.** Wang J. and Bell L. The Sex-lethal amino terminus mediates cooperative interactions in RNA binding and is essential for splicing regulation // *Genes Dev.* 1994. V. 8. P. 2072–2085.
- 140.** Wu T. and Nacu S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 873–881.
- 141.** Xiao W. Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2 // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 11505–11517.
- 142.** Yang B., Dong X., Cai D., Wang X., Liu Z., Hu Z., Wang H., Cao X., Zhang J., Hu Y. Characterization of the promoter elements and transcription profile of *Periplaneta fuliginosa* densovirus nonstructural genes // *Virus Res.* 2008. V. 133. P. 149–156.
- 143.** Yamagishi J., Hu Y., Zheng J., Bando H. Genome organization and mRNA structure of *Periplaneta fuliginosa* densovirus imply alternative splicing involvement in viral gene expression // *Arch Virol.* 1998. V. 144. P. 2111–2124.
- 144.** Yu Q. and Tijssen P. Gene expression of five different iteradenoviruses: *Bombyx mori* densovirus, *Casphalia extraneadensovirus*, *Papilio polyxenes* densovirus, *Sibine fusca* densovirus, and *Danaus plexippus* densovirus // *J Virol.* 2014. V. 88. P. 12152–12157.

- 145.** Yan Z. Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 2043–2053
- 146.** Zadori Z., Szelei J., Lacoste M.-C., Li Y., Gariépy S., Raymond P., Allaire M., Nabi I., Tijssen P. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. // *Dev. Cell.* 2001. V. 1. P. 291–302.
- 147.** Zhai Y., Lu X., Sun X., Fu S., Gong Z., Fen Y., Tong S., Wang Z., Tang Q., Attoui H., Liang G. Isolation and characterization of the full coding sequence of a novel densovirus from the mosquito *Culex pipiens pallens* // *J Gen Virol.* 2008. V. 89. P. 195–199.
- 148.** Zhou W., Zhang J., Yang B., Zhou L., Hu Y. The nuclear localization signal of the NS1 protein is essential for *Periplaneta fuliginosa* densovirus infection // *Virus Res.* 2009. V. 145. P. 134–140.

VP2 Sp11	uuguacaaugaggcaggauaucaaggagcaacauguggcgaucaagaaaguuugcacguu uuguacaaugaggcaggauaucaaggagcaacauguggcgaucaagaaaguuugcacguu *****
VP2 Sp11	gguguucgugcaguacaaaaacuuggaacugcuguaaaauacaauuaugcaucaucuugg gguguucgugcaguacaaaaacuuggaacugcuguaaaauacaauuaugcaucaucuugg *****
VP2 Sp11	uuagacugucaaauguauuggacaguagaauaguagacuuaugaugcguuucacagaacca uuagacugucaaauguauuggacaguagaauaguagacuuaugaugcguuucacagaacca *****
VP2 Sp11	uuuacguaucgaagaggcaauguaucaugauauuccauuacguucacaauuuacagcugcu uuuacguaucgaagaggcaauguaucaugauauuccauuacguucacaauuuacagcugcu *****
VP2 Sp11	acuaaaacugcaccaauguugcaaaacauuugaucgcccauauuuuauugguaaaccacaa acuaaaacugcaccaauguugcaaaacauuugaucgcccauauuuuauugguaaaccacaa *****
VP2 Sp11	agaguucuaaaauucaguugaauuguaacucgaggguaaccucuagaggauucuugugaagg agaguucuaaaauucaguugaauuguaacucgaggguaaccucuagaggauucuugugaagg *****
VP2 Sp11	aaccuuacuucuguggugugacauaauggacaaacuaccuacagag aaccuuacuucuguggugugacauaauggacaaacuaccuacagag *****

VP2 Sp12	augccaguuauuuauauuaaaaccaccuccuuauugaacggccaaaauugggagcggauaac augccaguuauuuauauuaaaaccaccuccuuauugaacggccaaaauugggagcggauaac *****
VP2 Sp12	gagggacagcgcagauaugccauggaacaauuaauuuagcauuaguacgacgaggacaa gagggacagcgcagauaugccauggaacaauuaauuuagcauuaguacgacgaggacaa *****
VP2 Sp12	uauuuugaaccaccuauugcugcaguccuccuucaccugcuccuaauaauugccauacaa uauuuugaaccaccuauugcugcaguccuccuucaccugcuccuaauaauugccauacaa *****
VP2 Sp12	gauuuagaugaauuggaucguuuauuagacaauuuuccgauagguuaccccaacaauca gauuuagaugaauuggaucguuuauuagacaauuuuccgauagguuaccccaacaauca *****
VP2 Sp12	caaggaggaacaucaaacagcgcaccaaccaguugcugguccuucucacgaccagaucca caaggaggaacaucaaacagcgcaccaaccaguugcugguccuucucacgaccagaucca *****
VP2 Sp12	gugccagcucaacugccaguucagccuucacgauucaagaaccugcacaacgaugucu gugccagcucaacugccaguucagccuucacgauucaagaaccugcacaacgaugucu *****
VP2 Sp12	gcaccagaggcuauaguuaacaggaaaaagaggagcggagaaccugauucugcuaguacu gcaccagaggcuauaguuaacaggaaaaagaggagcggagaaccugauucugcuaguacu *****

VP2 Sp12	agagcaagacauuaccaagauucuauuuacuugccaggugauauuccugaaaagaaagaa -----
VP2 Sp12	agucaaccugcuaauguuguuuauuccugcagguaguaaaauguagaucuacaucaguu -----
VP2 Sp12	aggaugccuaguacaggauuuagugcaguugaaggagccaauucuaagaaaggaagaugcu -----
VP2 Sp12	augacucuaggucuuuacaaguaggagguguugauuuuaagacaggagaagcacuuucu -----
VP2 Sp12	aauguacauucacugacuugauacauuauuacaaaauuuccaauggaacaaggugga -----
VP2 Sp12	uuguacaauagggcaggauaucaaggagcaacauguggcgaucaagaaaguugcaguu -----
VP2 Sp12	gguguucgugcaguacaaaaacuuggaacugcuguaaaucuuuuuugcaucaucuugg -----
VP2 Sp12	uuagacugucaaauguauuggacaguagaauugagacuuaugcguuucaacagaacca -----
VP2 Sp12	uuuacguauccaagaggcaauguaucaagauuuuccauuacguucacaauuuuacagcugcu -----cagcugcu *****
VP2 Sp12	acuaaaacugcaccaauguugcaaacauuugaucgcccauauuuucuaugguaaaccacaa acuaaaacugcaccaauguugcaaacauuugaucgcccauauuuucuaugguaaaccacaa *****
VP2 Sp12	agaguucuaaaauucaguugaauuguaacucgaggguaccucuaagaggauucuuugugaagg agaguucuaaaauucaguugaauuguaacucgaggguaccucuaagaggauucuuugugaagg *****
VP2 Sp12	aaccuuacuucuguggugugacauaauggacaaacuaccuacagag aaccuuacuucuguggugugacauaauggacaaacuaccuacagag *****

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.271)

VP2 augccaguuaauuuauaaauaaaccaccuccuuauugaacggccaaauugggagcggaugaac
 Sp112 augcca-----

VP2 **augacucuaggucuuuacaaguaggagguguugauuuuuaagacaggagaagcacuuucu**
VP2_S -----

VP2 **aauguacauucacugacuugauacauuaauacaaaauuuccaauuggaacaaggugga**
VP2_S -----

VP2 **uuguacaauagggcaggauaucaaggagcaacauguggcgaucaagaaaguuuugcacguu**
VP2_S -----

VP2 **gguguucgugcaguacaaaacuuggaacugcuguaaaaucaauuaaugcaucaucuugg**
VP2_S -----

VP2 **uuagacugucaaauguauuggacaguagaauuguagacuuagaugcguuucaacagaacca**
VP2_S -----

VP2 **uuuacguauccaagaggcaauguaucaagauauuccauuacguucacaauuuacag**cugcu
VP2_S -----cugcu

VP2 acuaaaacugcaccaauguugcaaacauuugaucgcccauauuuucuaugguaaaccacaa
VP2_S acuaaaacugcaccaauguugcaaacauuugaucgcccauauuuucuaugguaaaccacaa

VP2 agaguucuaaaauucaguugaauuguaacucgaggguaaccucuagaggauucuugugaagg
VP2_S agaguucuaaaauucaguugaauuguaacucgaggguaaccucuagaggauucuugugaagg

VP2 aaccuuacuucuguggugugacauaauggacaaacuaccuacagag
VP2_S aaccuuacuucuguggugugacauaauggacaaacuaccuacagag
