

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**

Специальность 03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена в Лаборатории генетических основ биоразнообразия Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель:

МУХА Дмитрий Владимирович

доктор биологических наук, профессор

Заведующий лабораторией генетических основ биоразнообразия

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

НЕФЕДОВА Лидия Николаевна

доктор биологических наук, доцент кафедры генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

СКОБЛОВ Михаил Юрьевич

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетической эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Медико-генетический научный центр»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН

Защита состоится «_____» мая 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института (ИОГен РАН) www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «_____» _____ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
Кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Взаимодействие вируса с организмом-хозяином является сложным многоступенчатым процессом. Изучение механизмов инфицирования, реализации генетической информации вирусного генома, участие белков вируса во взаимодействии с клеткой хозяина, антивирусные реакции дают возможность решать не только вопросы общей и частной вирусологии, но также изучать широкий круг фундаментальных биологических проблем. Одним из эффективных подходов для решения этого круга задач является анализ экспрессии генов вирусных белков в гетерологичных системах, то есть с использованием модельных организмов и пересеваемых культур клеток, в норме не инфицируемых данным типом вируса.

Большинство вирусов, самосборка вирусных частиц которых происходит в ядре клеток хозяина (к их числу относится и вирус денсонуклеоза рыжего таракана BgDV1), используют генетический аппарат клетки для репликации и дальнейшей экспансии инфекции, при этом процесс транспорта вирусных частиц в ядро играет ключевую роль в жизненном цикле. Детальное изучение роли кариофильных капсидных белков BgDV1 в данном процессе может позволить не только углубить знания о биологии данного вируса, но и выявить молекулярно-генетические реакции организма-хозяина, индуцируемые внутриклеточной локализацией капсидных белков.

Одним из методических подходов, использованных для решения задач данного исследования, являлось получение трансгенных линий *Drosophila melanogaster*, способных экспрессировать конкретные гены исследуемого денсовируса на определенной стадии развития плодовой мушки, что может приводить к индукции защитных механизмов клеток организма-хозяина. Изучение индукции механизмов антивирусной защиты в клетках насекомых представляет большой интерес, поскольку открывает возможность 1) выявить новые аспекты функционирования антивирусных систем, 2) детально изучить реагирование каскадов реакций «домашнего хозяйства» на вирусную инфекцию. Известно, что многие рецепторы и каскады активации антивирусных реакций насекомых (в частности, плодовой мушки *D. melanogaster*) имеют сходство с таковыми у высших позвоночных и человека. Это обстоятельство может позволить более детально изучить эволюционное становление клеточной защиты эукариотических организмов и, возможно, выяснить новые аспекты ее функционирования.

Известно, что капсиды парвовирусов формируются за счет самосборки капсидных белков. Процесс самосборки капсидных белков во многом остается непонятым, в частности, из-за отсутствия адекватной модели для изучения этого процесса. Использование трансгенных линий *D. melanogaster*, экспрессирующих капсидные белки изучаемого вируса, с нашей точки зрения, может позволить ближе подойти к пониманию процесса самосборки и формирования капсид парвовирусов. Кроме того, отметим, что трансгенные линии дрозофил, в клетках которых происходит формирование вирусоподобных частиц за счет самосборки капсидных белков денсовируса, могут быть использованы в качестве биофабрик для наработки наночастиц с заданными свойствами, например, экспонирующими на поверхности заданные антигенные детерминанты, что может представлять интерес для разработки новых вакцинных препаратов.

Цель работы

Изучить внутриклеточный трафик и генетический контроль экспрессии генов капсидных белков денсовируса BgDV1 в гетерологичных системах: культурах клеток млекопитающих и трансгенных линиях *D. melanogaster*.

Задачи исследования

1. Исследовать внутриклеточную локализацию капсидных белков BgDV1 (VP1, VP2 и VP3) в процессе транзитной экспрессии векторных конструкций в пересеваемых культурах клеток млекопитающих (HeLa и Cos1).
2. Методом сайт-направленного мутагенеза изменить предсказанные методами *in silico* сигналы ядерной локализации и ядерного экспорта 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 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.

Практическая значимость

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

денсовирус 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.

Личный вклад автора

Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы: в планировании и осуществлении экспериментов, оценке и интерпретации их результатов. Секвенирование нового поколения (NGS) и биоинформатический анализ данных NGS осуществлялись совместно с компанией «Евроген». Автор лично оформлял результаты для представления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также являлся основным участником при написании статей по результатам работы.

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).

Публикации

Автором опубликованы 7 печатных работ, в том числе 3 статьи по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 105 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, и приложение. Диссертация содержит 17 рисунков и 1 таблицу. Библиографический указатель содержит 148 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Амплификация и клонирование 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 последовательности кДНК этого вируса (Kapelinskaya *et al.*, 2013). Подбор праймеров осуществляли с помощью программы PrimerBlast (Ye *et al.*, 2012). Для получения векторных плазмид, необходимых для трансфекции культуры клеток млекопитающих, амплифицированные фрагменты ДНК клонировали в вектор pcDNA3.1/NT-GFP-ТОРО (Invitrogen, США) согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Для получения плазмид, необходимых для трансформации эмбрионов дрозофилы, соответствующие фрагменты ДНК клонировали в вектор pBID-UASC (Wang *et al.*, 2012; <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)

Сайт-направленный мутагенез. Для проведения сайт-направленного мутагенеза использовали ранее описанный метод (Ho *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.

Культивирование клеток млекопитающих. Трансфекция. Клеточные линии HeLa и COS1 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки при 37⁰ С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Перед трансфекцией клетки высевали в чашки Петри, в которые предварительно были положены покровные стекла. Плазмидную ДНК очищали с помощью набора реактивов Qiagen tip 100 Plasmid Midi Kit (Qiagen, USA). Трансфекцию проводили с использованием реактива Metafectene Pro (Biontech, USA) согласно рекомендациям производителя.

Иммуногистохимическое окрашивание. Клетки, прикрепленные к предметным стеклам, фиксировали в 4% PFA. Для блокировки неспецифического связывания антител использовали 3% BSA. В качестве первичных антител использовали ранее описанные антитела, специфичные к эпитопу, локализованному в С-концевой части капсидных белков денсовируса BgDV1 (Kapelinskaya *et al.*, 2013), либо антитела кролика, специфичные к GFP (Abcam, USA). В качестве вторичных антител использовали антитела, специфичные к иммуноглобулинам кролика, меченные FITC (Abcam, USA). Препараты заключали в ProLong Antifade Reagents (Invitrogen, USA), содержащий DAPI. Внутриклеточную локализацию флуоресцентного сигнала анализировали с помощью конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 510 meta.

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: y1 w* P{CaryIP}su(Hw)attP8) (для интеграции чужеродного генетического материала в X-хромосому), либо самок линии #9752 (генотип: P{vas{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 F₁ 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. Дехорионизированные эмбрионы помещали на специальную подложку из парафилма M (Sigma-Aldrich, USA). 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).

Выделение РНК из трансгенных дрозофил. Синтез кДНК. РНК выделяли из мух первого поколения (10 самок + 10 самцов), полученных от скрещивания самок трансгенных дрозофил, содержащих интегрированную в геном копию кДНК капсидных белков денсовируса BgDV1, с самцами драйверной линии. Для выделения РНК использовали набор реактивов SV Total RNA Isolation kit (Promega, USA) согласно рекомендациям изготовителя. Полученную РНК использовали в качестве матрицы для получения кДНК. Для синтеза кДНК использовали праймер oligo(dT) и набор реактивов Mint (Евроген, Россия) согласно рекомендациям изготовителя.

Электрофорез белков. 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.

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 1А). Посредством программы cNLS Mapper (Kosugi *et al.*, 2009) в последовательностях аминокислот всех трех капсидных белков BgDV1 предсказаны сигналы ядерной локализации: один из выявленных NLS (IVTGKRGAEEDSASTPTKKNKPS) 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 1А).

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

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-TOPO (Invitrogen, USA) (Рисунок 1Б). 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 и красителя DAPI полностью совпадает (Рисунок 2, 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 2, 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 1А). 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.

А

>VP1

MSTSGLESVPLLPVNSATVEYGGIEPKVHSGCYGASRLPVKPTSAAGGACAQYDK
 IFQSQILGRAASSGNPLNVFKSRDEYYNSVWPWELRRLPFAERDRLIKPYGVKWDK
 VSKAQYAQHWKLVNPRAGQKRIQQGIVLPPFSNNIGPNTIQDAKTGSDFIAQGH
 DIHYSEAKSDIDIQRADTEAIGQFIQEATHSHNPISTQQVIGAVGLAGKQLVE
 KLTKGVQYGSPPQSSQGGTSNSDQPVAGPSSRPDPVPAQLPVQPSSTIQEPAQIMS
 APEAIVTGKRGAEEDSASTPTKKNKPEHSGSALPGTSGNTDGSMSSTMLDL
 DASRGIMPISRGIHVEKFEWTFTKKWKFLSFGVADVILPDDIGTTTAPAKRNAI
 TTSLVNI PWEYAFMYMSFAEFNRLREMTGVFATDCDIKIYQYNPRVAFQTADTN
 STQATLNQNKFTRIAKGLRNNPHLFGSDRDYTFSSDEPMKPLGFETNADQYTGQ
 KFRDRLSKEMYGTTRTNTPTVPAISTGKEMGLLRYTYVYASQTIIDSGFPQYN
 KYCSEFNMSMDLIGKQVLSAHHDFKYAPLTTTRARHYQDSIYLPGDIPEKKESQPA
 NVVIPAGSKIIDLQSVRMPSTGFSAVEGANSRKEDAMTLGHLQVGGVDLKTGEA
 LSNSTFDFTLYTKFPMEQGGLYNEAGYQGATCGDQESLHVGVRAVPLKGTAV
 NNTINASSWLDCCQMYWTVCECLRCVSTPEFTYPRGNVSDIPLRSQFTAATKTA
 PMLQTFDRPYPFYGKPKQVRVLSVEL

>VP2

MPVNYNKP PPYERPNWERMNEGQRRYAMBQYNLALVRRGQYFEPPIAARPPSPA
 PNNAIQDLDELDRLLDNFPFISGPQSSQGGTSNSDQPVAGPSSRPDPVPAQLPVQ
 PSTIQEPAQIMS APEAIVTGKRGAEEDSASTPTKKNKPEHSGSALPGTSGNT
 DGSMGSSSTMLDLDASRGIMPISRGIHVEKFEWTFTKKWKFLSFGVADVILPDDI
 GTTTAPAKRNAITTSLVNI PWEYAFMYMSFAEFNRLREMTGVFATDCDIKIYQY
 NPRVAFQTADTNSTQATLNQNKFTRIAKGLRNNPHLFGSDRDYTFSSDEPMKPL
 GFETNADQYTGQKFRDRLSKEMYGTTRTNTPTVPAISTGKEMGLLRYTYVYASQ
 TIIDSGFPQYNKYCSEFNMSMDLIGKQVLSAHHDFKYAPLTTTRARHYQDSIYLP
 GDIPPEKKESQPA NVVIPAGSKIIDLQSVRMPSTGFSAVEGANSRKEDAMTLGHL
 QVGGVDLKTGEALSNSSTFDFTLYTKFPMEQGGLYNEAGYQGATCGDQESLHV
 GVRAPVPLKGTAVNTINASSWLDCCQMYWTVCECLRCVSTPEFTYPRGNVSDIPLR
 SQFTAATKTA PMLQTFDRPYPFYGKPKQVRVLSVEL

>VP3

MSAPEAIVTGKRGAEEDSASTPTKKNKPEHSGSALPGTSGNTDGSMSSTML
 DL DASRGIMPISRGIHVEKFEWTFTKKWKFLSFGVADVILPDDIGTTTAPAKRW
 A LTTSLVNI PWEYAFMYMSFAEFNRLREMTGVFATDCDIKIYQYNPRVAFQTAD
 TNSTQATLNQNKFTRIAKGLRNNPHLFGSDRDYTFSSDEPMKPLGFETNADQY
 TGQKFRDRLSKEMYGTTRTNTPTVPAISTGKEMGLLRYTYVYASQTIIDSGFPQ
 YNKYCSEFNMSMDLIGKQVLSAHHDFKYAPLTTTRARHYQDSIYLPGDIPEKKESQ
 PANVVI PAGSKIIDLQSVRMPSTGFSAVEGANSRKEDAMTLGHLQVGGVDLKTG
 EALSNSSTFDFTLYTKFPMEQGGLYNEAGYQGATCGDQESLHVGVRAVPLKGT
 AVNTI NASSWLDCCQMYWTVCECLRCVSTPEFTYPRGNVSDIPLRSQFTAATKTA
 PMLQTFDRPYPFYGKPKQVRVLSVEL

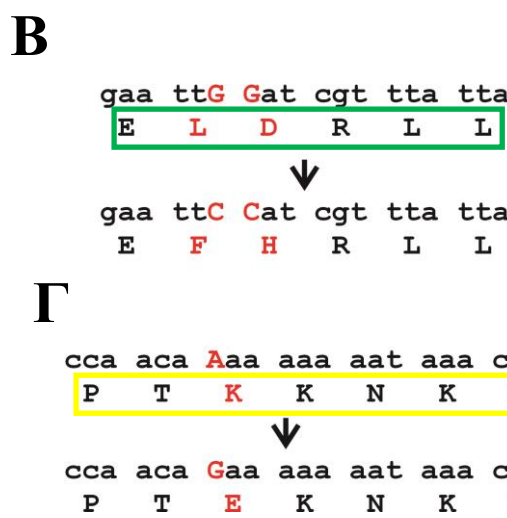
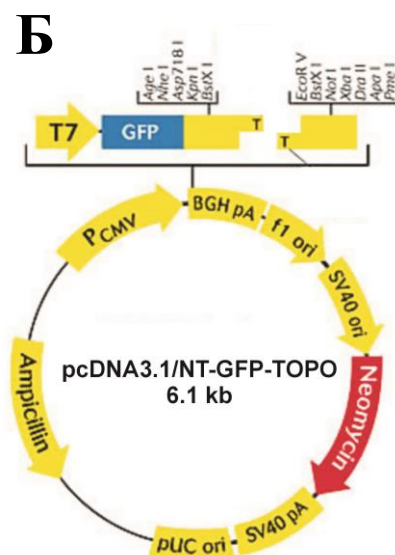


Рисунок 1. Характеристика структурной организации капсидных белков денсовируса рыжего таракана и сайт-направленного мутагенеза, приводящего к замене аминокислот. **А** – последовательности аминокислот нативных белков VP1, VP2 и VP3. Цветом морской волны выделена последовательность VP3 (общая для всех 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, подчекиванием – 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.

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 1В). Кроме того, в нуклеотидной последовательности, соответствующей NLS с максимальным уровнем значимости

(IVTGKRGAEEDSASTPTKKNKPS) белка VP3 был заменен один нуклеотид (A → G), в результате этой замены в соответствующей аминокислотной последовательности происходит замена аминокислоты (K → E) (Рисунок 1Г).

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 трансфицированных клеток (Рисунок 2, 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 трансфицированных клеток (Рисунок 2, 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, 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 3 приведен результат исследования внутриклеточной локализации капсидного белка VP1 денсовируса BgDV1, детектируемой после транзитной экспрессии соответствующей векторной конструкции в пересеваемой культуре клеток Cos1.

Отметим, что при исследовании внутриклеточной локализации капсидных белков в каждой серии экспериментов были использованы первичные антитела как к N-концевой

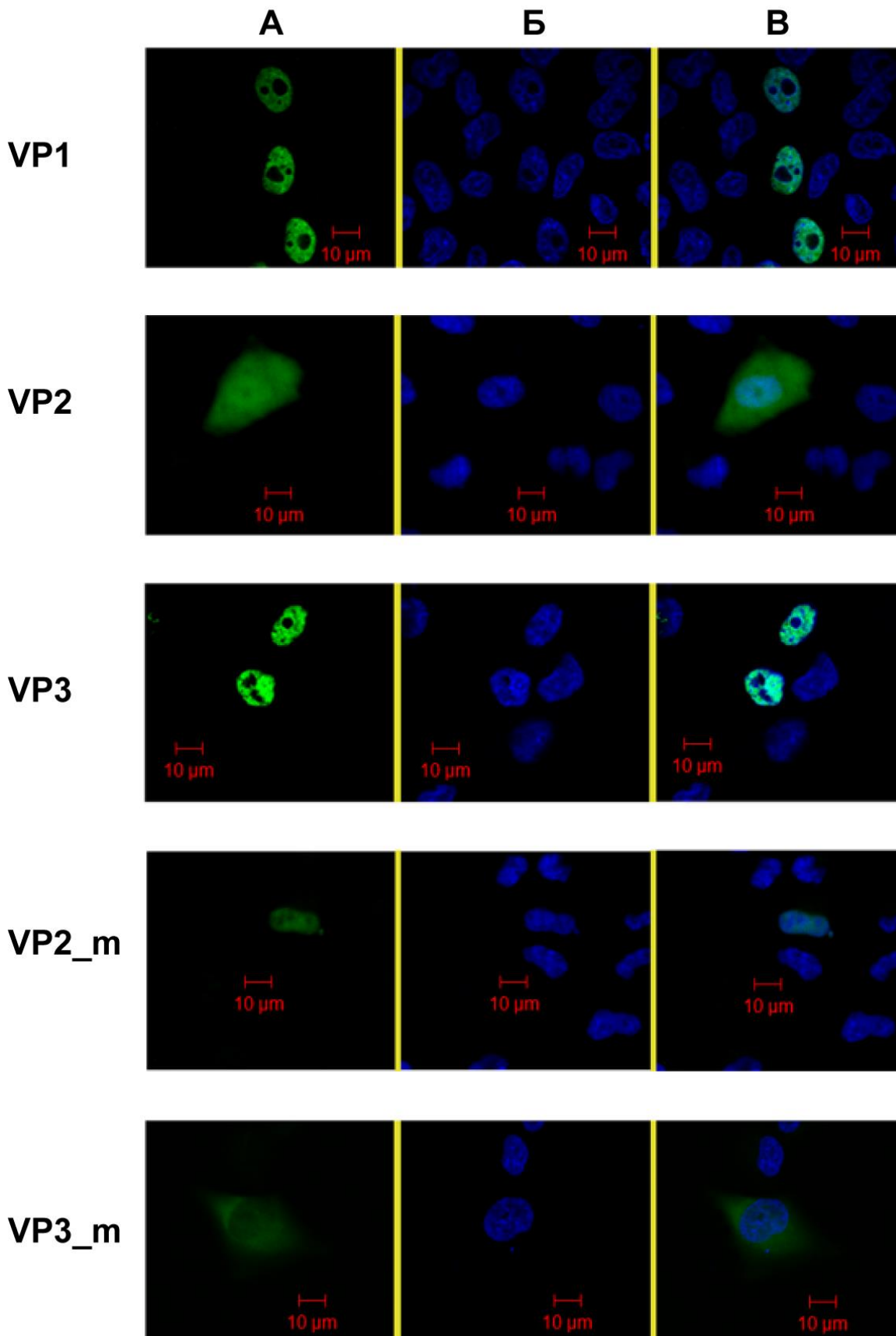


Рисунок 2. Исследование внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса BgDV1, в процессе транзиторной экспрессии соответствующих векторных конструкций в пересеваемой культуре клеток HeLa. *Условные обозначения:* ряды VP1, VP2 и VP3 демонстрируют локализацию нативных форм капсидных белков; VP2_m и VP3_m – мутантных вариантов соответствующих белков. Столбцы А, Б, В – окраска антителами, DAPI и наложение этих изображений, соответственно. Шкала – 10 мкм.

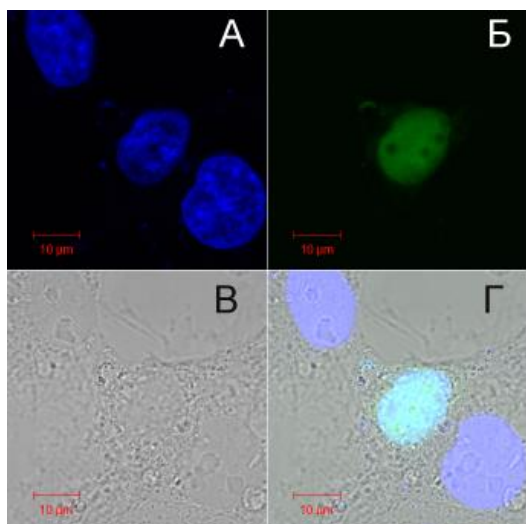


Рисунок 3. Внутриклеточная локализация капсидного белка VP1 денсовируса BgDV1, детектируемая после транзитной экспрессии соответствующей векторной конструкции в пересеваемой культуре клеток Cos1. **А** - окраска DAPI, **Б** - окраска антителами к капсидному белку, **В** – без окраски, **Г** - наложение изображений.

части гибридных белков, так и к С-концевой. Результаты, полученные с использованием этих двух типов антител, полностью совпадали.

Таким образом, можно заключить, что исследованные сигналы внутриклеточной локализации белков капсида BgDV1 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.

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 4 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 5 приведена последовательность нуклеотидов фрагмента транскрипта интегрированной в геном копии гена VP2 и указаны праймеры, использованные для амплификации методом ПЦР фрагментов ДНК, соответствующих исследуемым транскриптам (последовательности праймеров на рисунке выделены надстрочным шрифтом черного цвета).

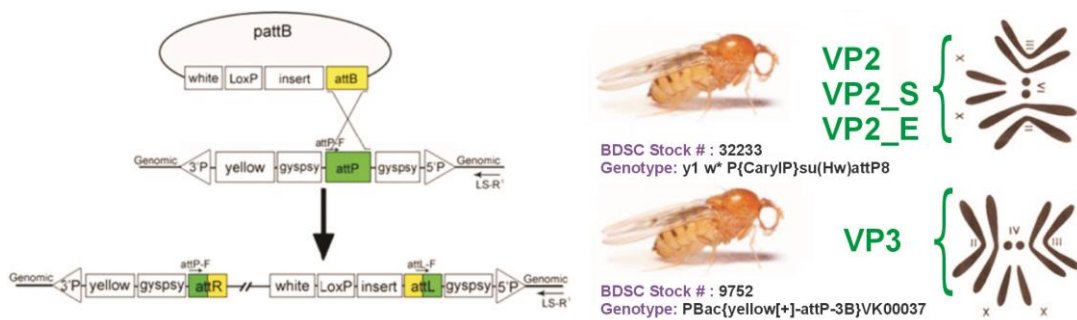


Рисунок 4. Схема получения трансгенных линий дрозофил, использованных в работе. Приведены генотипы мух, в эмбрионы которых инъецировали векторные конструкции; названия рекомбинантных ДНК; хромосомы, в которые был интегрирован чужеродный генетический материал. Также приведена условная схема сайт-специфической интеграции.

Как видно на Рисунке 5, 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 6, 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 6, 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 5 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 5 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 AG-3' динуклеотиды (Рисунок 5). 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 6, дорожка 1 обозначены звездочкой). Очевидно, что эти минорные фракции также могут

>VP2

AGUUGUGAAUGAAUGUUCGAGCCGAGCAGACGUGCCGCGGCCUUCGUUAAUAUCCUUGAAUAAGCCAACU
UUGAAUCACAA^{GACGCAUACCAAACGAAUUCG}CAGAUCUGCGGGCCGCGGGAAUUCGAUUAUGCCAGUUAAUUUAU
AUAAACCACCUCCUUAUGAACGGCCAAAUUGGGAGCGGAUGAACGAGGGACAGCGCAGAUUAUGCCAUGGAA
CAAUUAAUUUAGCAUUAGUACGACGAGGACAAUUAUUUGAACCCUAUUGCUGCAGUCCUCCUUCACC
UGCUCUAAUAAUGCCAUACAAGAUUUAGAUGAAUUGGAUCGUUUAUUAGACAAUUUCCGAUAGGUUCAC
CCCAACAAUCACAAGGAGGAACAUCAAACAGCGACCAACCAGUUGCUGGUCCUUCUUCACGACCAGAUGCA
GUGCCAGCUCACACUGCCAGUUCAGCCUUCACGAUUCAGAACCUGCACAACAGAUGUCUGCACCAGAGGC
UAUAGUUACAGGAAAAAGAGGAGCGGAAGAACCUGAUUCUGCUAGUACUCCAACA^aAAAAAAUAAACCUU
CUGAACAUAGUGGAAGUGCAUUAACCAGGCACUUCAGG^uAAUACAGAUGGUUCAUUGGGUUCUAGUACAAG
UUAGAUUUAGAUGCAGUAGGGGUUAUUUGCCUAUAUCUAGGGGAUACAUGUAGAGAAUUUGAAUGGAC
UUUCACAAAAAUGGAAUUUUUAUCUUUUGGUGUAGCAGAUGAAUACUACCUGACGACAUAGGUACAA
CUACAGCUCGGCUAAACGAUGGGCAUUGACAACAUCUUUAGUAAACAUCCUUGGGAAUAGCAUUUAUG
UACAUGUCUUUUGCUGAAUUUAAUAGAUUGAGAGAAUAGACAGGAGUAAUUGCAACAGACUGUGAUUUAA
AAUUAUCAAUAUAAUCCAAGAGUAGCUUUUCAAACAGCAGAUACGAUAGUACACAAGCAACAUUAAAUC
AAAAUAAUUUACUCGUUUUGCAAAGGUUUAAGAAACAAUCCCCACUUGUUUGGUAGUAAUAGAGAUUUA
ACAUUUUCAAGUGAUGAACCAUGAAACCGCUUGGGUUUGAAACUAAUGCAGAUCAAUAUACUGGACAAA
AUUUAGAGAUAGAUUAUCAAAGAAUUGUAUGGUACAACUACUCGUACAACAAUACUCCGACUGUACCUG
CAAUAUCAACAGGUAAGAGAUUGGGUUUACUAAGAUUUUAUCUGUAUAGCUUCACAAACUUAAGAUAGU
GGGUUCCUCAAUACAUAUAAUUAUGUUCUGAAUUUAUUCAUUGGAUUUAAUUGGUAACAAGUUUUAUC
UGCACAUCAUGAUUUUAAUUAUGCUCCUUUAACUACUAGAGCAAGACAUUACCAAGAUUCUAAUUUACUUGC
CAGGUGAUUUCCUGAAAAGAAAGAAAGUCAACCUGCUAAUGUUGUUAUCCUGCAGGUUAAUUUUGUA
GAUCUACAUCAGUUAGGAUGCCUAGUACAGGAAUUUAGUGCAGUUGAAGGAGCCAAUUCUAGAAAAGGAAGA
UGCUAUGACUCUAGGUCAUUUACAAGUAGGAGGUGUUGAUUUUAAAGACAGGAGAAGCACUUUCUAAUAGUA
CAUUCACUGACUUUGAUACAUUUAUUAUCAAUUUCCAAUGGAACAAGGUGGAUUGUACAUAUGAGGCAGGA
UAUCAAGGAGCAACAUGUGGCGAUCAAGAAAGUUUGCACGUUGGUGUUCGUGCAGUACCAAAACUUGGAAC
UGCUGUAAAUACAAUUAUUGCAUCAUCUUGGUUAGACUGUCAAAUGUAUUGGACAGUAGAAUGUAGACUUA
GAUGCGUUUCAACAGAACCAUUUACGUAUCCAAGAGGCAUUGUAUCAGAUUUCCAUAUCGUUCACAAUU
ACAGCUGCUACUAAAACUGCACCAAGUUGCAAACAUUUGAUCGCCCAUAAUUUCUAAUGGUAAAACCAAAAG
AGUUCUAAAUUCAGUUGAAUUGUAACUCGAGGGUACCUCUA^{GAGGAUCUUUGAAGGAACC}UUACUUCUGUGGU
GUGACAUAUUUGGACAAACUACCUACAGAG . . . 3'

Рисунок 5. Фрагмент последовательности РНК, транскрибируемой в трансгенных дрозофилах, содержащих последовательности VP2, VP2_S и VP2_E. *Условные обозначения:* Сайт инициации транскрипции (первый нуклеотид) выделен 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); Красным шрифтом и двойным подчеркиванием выделен сигнал терминации трансляции VP2 и VP3.

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

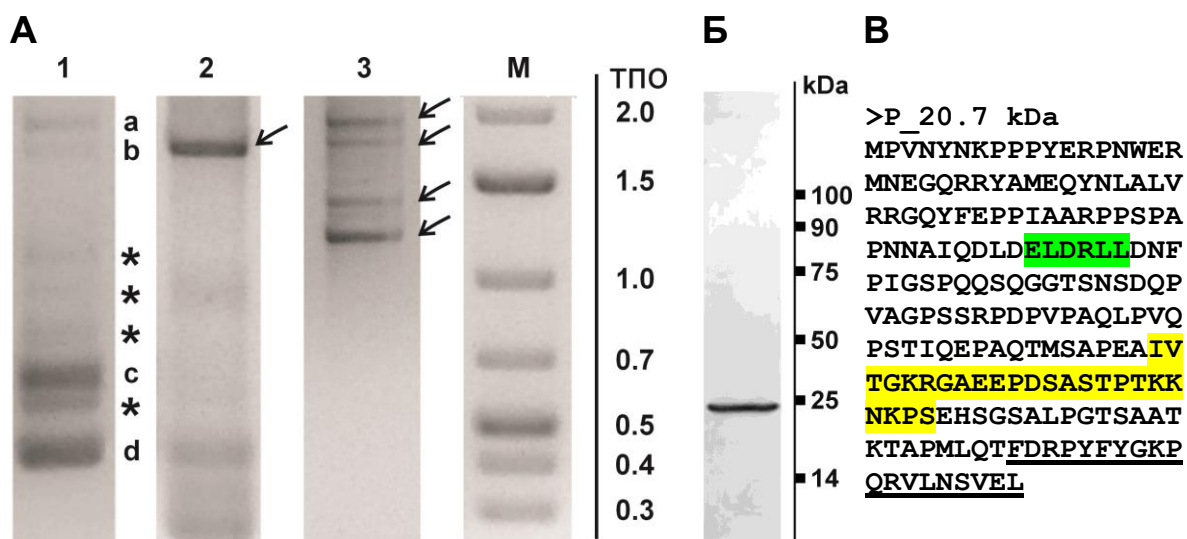


Рисунок 6. Анализ экспрессии чужеродного генетического материала у дрозофил первого поколения, полученных от скрещивания трансгенных самок с самцами драйверной линии. **А** – результат электрофоретического разделения продуктов ПЦР (описание праймеров приведено в тексте) кДНК, синтезированной с использованием 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).

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 6, дорожка 1). Таким образом, можно

заклучить, что продукты ПЦР, обозначенные на Рисунок 6, дорожка 1 звездочкой, являются результатом неспецифической амплификации – в анализируемых трансгенных 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 трансгенных 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 6, дорожка 1).

Анализ методом Вестерн-блота белков, экспрессируемых в дрозофилах первого поколения, полученных от скрещивания виргильных самок трансгенной линии VP2 с самцами драйверной линии, представлен на Рисунке 6Б. 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 5 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 5 надстрочным шрифтом черного цвета) в 1% агарозном геле представлен на Рисунке 6, 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 5 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 5 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.

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 6, 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 5 выделен желтым фоном и подчеркиванием), однако второй интрон, локализованный между 1223 и 1926 нуклеотидами транскрибируемой РНК (на Рисунке 5 выделен голубым фоном и подчеркиванием) имеет с интроном, выявленным в линии VP2, общий акцепторный сайт, и ранее не описанный донорный сайт сплайсинга.

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.

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 1Г и 5; на Рисунке 5 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 4).

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 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). 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%). Всего в данном исследовании было проведено сравнение уровней экспрессии 1271 группы генов.

Ниже приведено по 10 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 грамположительных 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. **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:0000070 – Митотическое разделение сестринских хроматид; GO:0000819 – Сегрегация сестринских хроматид; GO:0051310 – Сборка метафазной пластины; GO:0042773 – синтез АТФ, опосредованный транспортом электронов.

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. На Рисунке 7А приведена диаграмма, отражающая 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. На Рисунке 7Б 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.

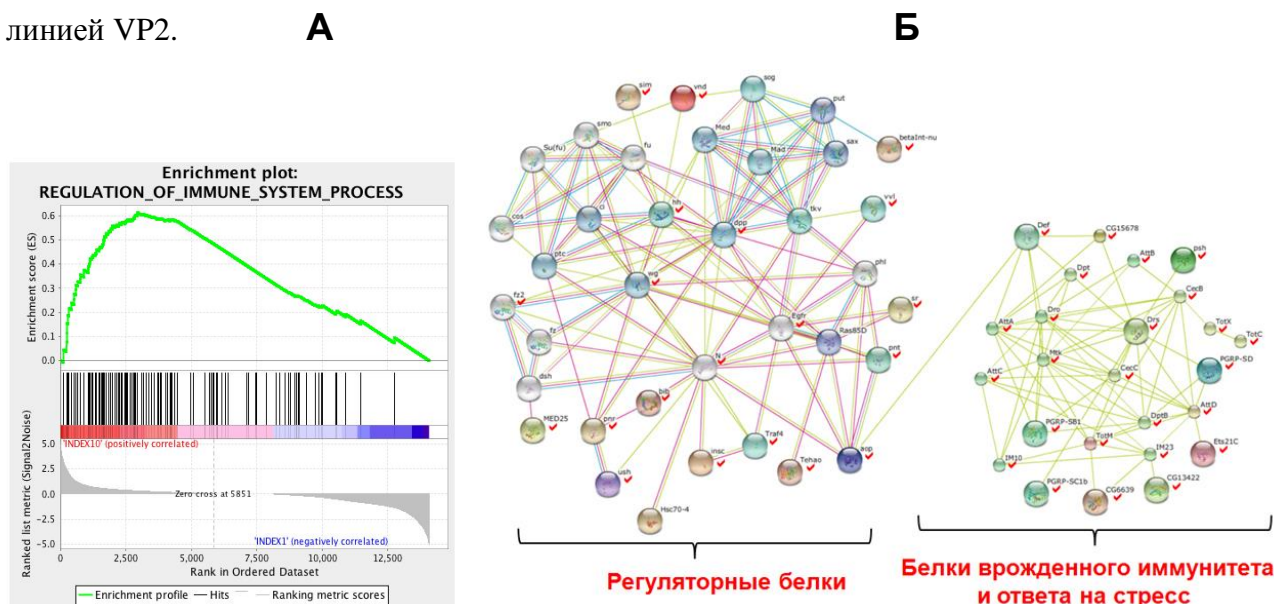


Рисунок 7. Иллюстрация изменения уровня экспрессии генов иммунного ответа трансгенных дрозофил, предположительно зависящего от внутриклеточной локализации капсидного белка VP2. **А** – график, демонстрирующий усиление экспрессии генов иммунного ответа в линии VP2_E по сравнению с линией VP2. **Б** – 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.

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 8). 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.

Отметим, что, как было показано в разделе «Экспрессия генов капсидных белков VP2 и VP3 в трансгенных линиях *D. melanogaster*», большая часть транскрибируемой РНК гена

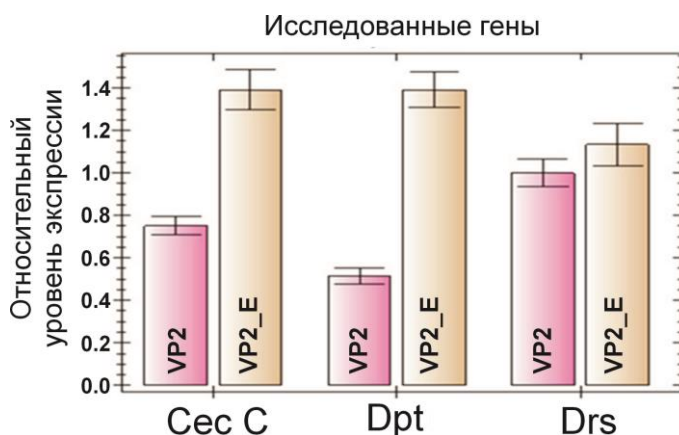


Рисунок 8. Результат ПЦР в реальном времени кДНК генов серкопина (Cec C), диптерицина (Dpt) и дрозомицина (Drs). В качестве матрицы использовали кДНК, полученную из РНК потомков F₁ от скрещивания трансгенных самок VP2, либо VP2_E, с самцами драйверной линии. Нормировка осуществлялась по гену алкогольдегидрогеназы.

VP2 подвергается сплайсингу. Идентичный тип сплайсинга был выявлен при исследовании транскриптов VP2_E (данные не приведены, поскольку выявленный профиль идентичен представленному на рисунке 6, дорожка 1). 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 6В) 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.

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 компарментализации 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 ПУБЛИКАЦИЙ 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., Козлов Е.Н.,** 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.