

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ КАПСИДА ВИРУСА BGDNV В ГЕТЕРОГЕННОЙ СИСТЕМЕ

**Е. Н. Козлов, Т. В. Капелинская,
Е. У. Мартынова, Д. В. Муха**

Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва

ugin.sfu@gmail.com

Денсовирус рыжего таракана относится к семейству парвовирусов. Вирусы рода *densovirus* поражают беспозвоночные организмы, среди которых есть хозяйственно ценные виды, такие, как тутовый шелкопряд *Bombyx mori* и креветки рода *Penaeus*, а также выступают как паразиты многих синантропных организмов и вредителей сельского хозяйства.

Геном денсовируса рыжего таракана (далее BgDNV) имеет размер 5335 п.н. и представлен одноцепочечной линейной ДНК, которая при выделении в растворах с большой ионной силой формирует двухцепочечную линейную молекулу ДНК [4], содержащую в себе шесть открытых рамок считывания (ORF). Экспрессия белков вирусного капсида происходит с двух транскриптов размером 2374 пн (белки VP1 и VP3) и 2603 пн (белок VP2). Первый транскрипт представляет собой результат сплайсинга, при котором вырезаются нуклеотиды с 4191 по 4421 и объединяются две открытые рамки считывания ORF1 и ORF2. Таким образом, белки капсида VP1 и VP3 имеют общий С-концевой участок и уникальные N-концевые участки. Белок VP2 транслируется с несплайсированной РНК размером 2603 пн, которая полностью кодируется ORF1. Размеры белков VP1, VP2 и VP3-97, 85/80 и 57 кДа, при этом в наибольшем количестве в капсидах представлен белок VP3 [2]. Для белков VP1 и VP3 было предсказано наличие в их аминокислотной последовательности сигналов ядерной локализации (NLS) в общей С-концевой части, для белка VP2-сигнала ядерного экспорта (NES), кодируемого участком РНК, который удаляется при сплайсинге. Предположительно, данные сигналы имеют большое значение для инфекционности BgDNV [1].

Для развития инфекции вирусу необходимо проникнуть в ядро клетки хозяина, где вирусный геном реплицируется и транскрибируется. Различные группы вирусов имеют несколько стратегий проникновения в ядро [3]. Род денсовирусов для проникновения в ядро использует

каталитическую активность участков своего капсида, которые могут лизировать ядерную мембрану[5]. Нами было сделано предположение, что после трансляции вирусных белков в цитоплазме они могут за счет имеющихся у них сигналов ядерной локализации проникать в ядро, где формируют инфекционный капсид, который покидает ядерный компармент с помощью сигнала NES, не разрушая ядро.

Для проверки функциональности NLS и NES белки капсида экспрессировались в гетерогенной системе, в культуре клеток линии COS-1. Последовательности ДНК VP1, VP2 и VP3 были клонированы в экспрессионный вектор pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO. В данном векторе имеется последовательность *cycle 3 GFP*, которая образует слитый белок с N-концевой частью целевого белка. Культура клеток COS-1 трансфицировалась плазмидами *topVP1*, *topVP2* и *topVP3*. Затем клетки фиксировались в 4 % PFA по стандартной методике. Фиксированные клетки гибридизовались с антителами к GFP. Ядра окрашивались DAPI. Изучение локализации белков проводили с помощью лазерной микроскопии на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LM510 meta. Контролем служила плаزمид, экспрессирующая чистый *cycle 3 GFP*.

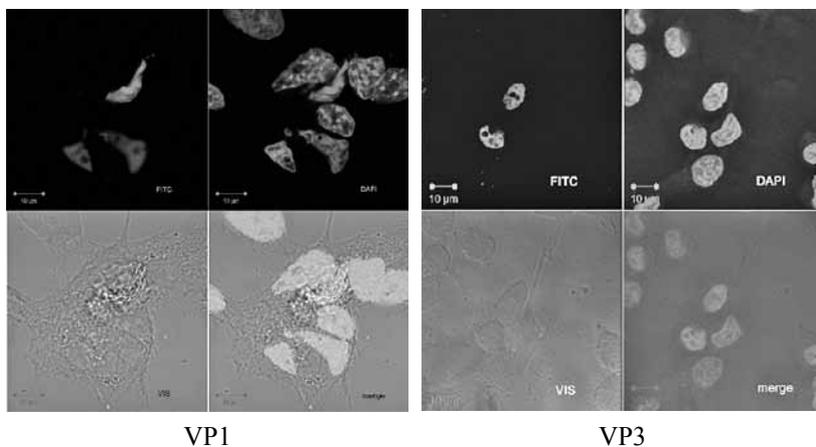
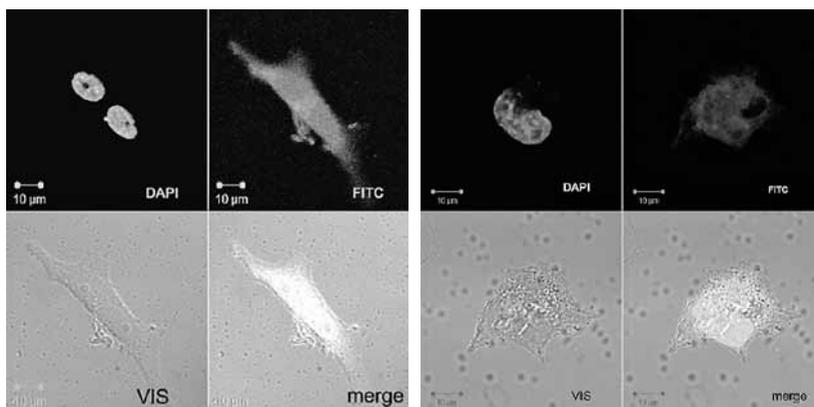


Рисунок 1

Результаты микроскопии показали, что белки VP1 и VP3 локализуются практически только в ядре (рис. 1), а белок VP2 наблюдается в ядре и в цитоплазме клеток (рис. 2). Микроскопия клеток, трансфицированных контрольной плазмидой, показала, что данный белок равномерно

распределяется по всему объему клетки (рис. 3). Ранее была показана внутриядерная локализация белка VP1 в пересеваемой культуре клеток *Blattella Germanica* [2]. Предыдущие данные не противоречат картине, которая наблюдается при экспрессии белка VP1 в гетерогенной системе. Таким образом, можно говорить о том, что внутриклеточный трафик синтезированных в цитоплазме белков капсида обусловлен наличием сигналов ядерного экспорта и импорта в их аминокислотной последовательности.



VP2

Рисунок 2

контроль, GFP

Рисунок 3

Литература

1. Сорокин А. В., Ким Е. Р., Овчинников Л. П. Ядерно-цитоплазматический транспорт белков // Успехи биологической химии. 2007, Т. 47. С. 89–128.
2. Kapelinskaya T. V., Martynova E. U., Schal C. and Mukha D. V. Expression Strategy of Densonucleosis Virus from the German Cockroach, *Blattella germanica* // J. Virol. 2011. Vol. 85(22). P. 11855–11870.
3. Sarah Cohen, Shelly Au, Nelly Pante. How viruses access the nucleus // Biochimica et Biophysica Acta. 2010. P. 1634–1645.
4. Mukha D. V. et al. Characterization of a new densovirus infecting the German cockroach, *Blattella germanica* // Journal of General Virology. 2006. Vol. 87. P. 1567–1575.
5. Zadori Z. et al. A viral phospholipase A₂ is required for parvovirus infectivity // Developmental Cell. 2001. Vol. 1. P. 291–302.

EXPRESSION OF STRUCTURAL PROTEINS FROM VIRUS BGDNV AT HETEROGENOUS SYSTEM

E. N. Kozlov, T. V. Kapelinskaya, E. U. Martynova, D. V. Mukha
Vavilov Institute of general Genetics, Moscow

Summary. Structural proteins of BgDENV was expressed at heterogenous system. Cell preparations was examined with help of confocal microscopy. We found, that fusion proteins topVP1 and topVP3 localized to nucleus, topVP2 was observed both in cytoplasm and nucleus. This distribution is result of presence NLS in VP1 and VP3. VP2 also has NES in his sequence. Both NLS and NES may play an important role in infection of host cells.

АДАПТАЦИЯ МУТАНТОВ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* ПО ТИОЛОВЫМ РЕДОКС-СИСТЕМАМ К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Е. В. Лепехина, Н. Г. Музыка, Г. В. Смирнова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Екатеринбург

alenshick@mail.ru

Ранее было обнаружено, что температурные стрессы сопровождаются изменением экспрессии антиоксидантных генов *katG* и *sodA* и уровня глутатиона внутри и снаружи клеток, а мутанты по синтезу глутатиона обладают повышенной чувствительностью к экстремальным температурам. Все эти факты свидетельствуют о наличии окислительного стресса при резких изменениях температуры культивирования.

Целью настоящей работы являлось изучение устойчивости бактерий *E. coli* при действии температурных стрессов и роли тиоловых редокс-систем в этих условиях.

Резкое снижение температуры культивирования до 20 °С приводило к временной остановке роста у всех изученных штаммов. Быстрее всего рост возобновляли мутанты по тиоредоксинредуктазе (*trxB*), медленнее всего росли бактерии, дефицитные по тиоредоксину (*trxA*). В отличие от остальных изученных штаммов, мутанты по глутатиону (*gshA*) имели пониженную выживаемость после часа культивирования при 20 °С. Мутанты *gshA* не индуцировали экспрессию генов *katG* (каталаза НPI), *katE* (каталаза НPII) и *sodA* (Mn-супероксиддисмутаза), в то время