

На правах рукописи

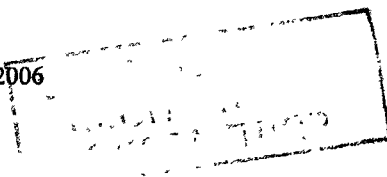
Чумаченко Анастасия Геннадьевна

**Денсовирус рыжего таракана *Blattella germanica*:
генетический аспект взаимодействия вирус / хозяин**

Специальность 03.00.15 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2006



Работа выполнена в группе генетической инженерии животных Института
Общей Генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Муха Дмитрий Владимирович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор

Засухина Галина Дмитриевна

Доктор биологических наук, профессор

Ким Александр Иннокентьевич

Ведущая организация: Институт Биологии Гена РАН

Защита состоится « ____ » _____ 2006 года в « ____ » часов на
заседании Диссертационного совета Д 002.214.01 при Институте общей
генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991 ГСП-1, Москва,
ул. Губкина, д.3.

Факс: (495) 132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2006 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
Кандидат биологических наук

Полухина Г.Н.

2006A
5492

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

К настоящему времени описано около 25 денсовирусов различных видов беспозвоночных. Денсовирусы содержат линейную однонитевую молекулу ДНК. Размер вирионов денсовирусов составляет 18-25 нм. Длины геномов варьируются от 4000 до 6100 п.о. На флангах денсовирусов находятся концевые инвертированные повторы (КИПы), образующие вторичные структуры. КИПы играют важную роль в автономной репликации вирусной ДНК.

Денсовирусы входят в семейство Parvoviridae, которое состоит из двух подсемейств - Parvovirinae и Densovirinae. Парвовирусы инфицируют клетки млекопитающих животных, денсовирусы – клетки членистоногих, главным образом насекомых. Свое название они получили из-за содержания в ядрах зараженных клеток плотных, темных, Фульген-позитивных масс вирионов. Большинство денсовирусов вызывают летальные заболевания организма-хозяина.

Клонированная в плазмидном векторе ДНК денсовирусов после трансформации клеток соответствующего насекомого рекомбинантной ДНК способна «вырезаться» из плазмиды – при этом вирус начинает «самостоятельную» жизнь, то есть реплицируется, экспрессирует вирусные белки и формирует вирусные частицы [Afanasiev et al., 1999]. Это является одной из особенностей денсовирусов и позволяет рассматривать данный тип вирусов в качестве уникального инструмента для генетических манипуляций с насекомыми. Известно, что денсовирусы – эффективные переносчики генетической информации и могут быть использованы в качестве вектора в генетической инженерии, в частности, для экспрессии чужеродного генетического материала в клетках насекомых. В настоящее время несколько видов денсовирусов были успешно использованы для этих целей [Afanasiev et al., 1999].

Кроме того, описанная «особенность» позволяет на стадии клонированного в плазмидном векторе вируса осуществлять с его ДНК любые генно-инженерные манипуляции, а затем изучать, как внесенные изменения скажутся на фенотипе (свойствах) вируса.

В 2000 году Д. В. Муха и К. Шал обнаружили новый денсовирус – денсовирус рыжего таракана (*BgDNV*) [Муха Д.В., Шал К., 2003] и приступили к его изучению. Данный вирус на сегодняшний момент является единственным описанным денсовирусом рыжего таракана.



Можно надеяться, что создание векторных конструкций на основе *BgDNV* позволит на новом уровне изучать молекулярно-генетическую организацию данного вида насекомых и разработать новые экологически чистые методы регуляции численности этого синантропного паразита.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы было изучение взаимодействия между денсовирусом (*BgDNV*) и его хозяином (*B. germanica*).

Были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучить распространенность денсовируса в популяциях рыжего таракана;
- 2) Исследовать динамику роста вируса *BgDNV* в культуре клеток;
- 3) Описать цитопатологические эффекты, вызываемые вирусной инфекцией;
- 4) Исследовать тканеспецифичность денсовирусной инфекции рыжего таракана;
- 5) Разработать метод поддержания вируса в лабораторных условиях;
- 6) Исследовать степень видоспецифичности *BgDNV*;
- 7) Исследовать изменения в геноме рыжего таракана, вызываемые вирусной инфекцией.

Научная новизна и практическая ценность работы

Данная работа пролила свет на отношения между недавно открытым денсовирусом *BgDNV* и его хозяином – рыжим тараканом.

Впервые проведено исследование распространенности денсовируса *BgDNV* в природе. Определена динамика развития денсовируса *BgDNV* в лабораторной линии Р6, хронически инфицированной изучаемым вирусом. Показано, что вирус может находиться в двух формах «активной» и «неактивной».

Методами электронной микроскопии описаны цитопатологические эффекты, обусловленные вирусной инфекцией. Показано, что у инфицированных вирусом тараканов развитие вируса происходит не во всех тканях: активное формирование вирусных частиц происходит в клетках пищеварительного тракта и жировом теле, при этом вирусных частиц не было выявлено в мышечной ткани и в мозге.

Впервые исследована динамика роста денсовируса *BgDNV* в пересеваемой культуре клеток рыжего таракана.

Разработан новый метод поддержания изучаемого денсовируса в лабораторных условиях. Метод основан на микроинъекции раствора, содержащего вирусные частицы, под кутикулу рыжего таракана.

Исследована видоспецифичность денсовируса *BgDNV*. Показано, что близкородственные *B. germanica* виды тараканов невосприимчивы к исследованному вирусу.

Показано, что инфицирование рыжего таракана *BgDNV* приводит к активизации (увеличению числа копий) ряда ретроэлементов (ретротранспозонов и/или ретровирусов) клеток хозяина. Клонированы и секвенированы протяженные фрагменты ДНК двух ретроэлементов, активизируемых инфекцией денсовируса *BgDNV*.

Можно заключить, что исследуемый денсовирус представляет собой многообещающий инструмент для исследования рыжего таракана методами генетической инженерии и разработки новаторских экологически чистых способов регуляции численности данного вида насекомых.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на конкурсе молодых ученых, Москва, 2003; конференции молодых ученых по молекулярной биологии и генетике, Киев, 2003, 8-й конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2004; 9-й конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2005.

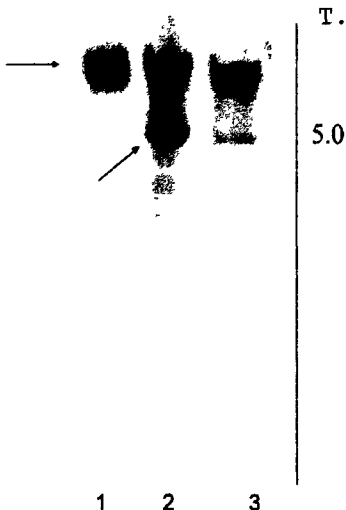
Структура и объем диссертации. Публикации. Диссертация изложена 122 страницах и включает стандартные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы. Работа иллюстрирована 26 рисунками, содержит 5 таблиц. Библиография – 115 источников зарубежных и отечественных авторов. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Распространенность денсовируса BgDNV в популяциях рыжего таракана

Денсовирус BgDNV впервые был обнаружен при исследовании тараканов линии Р6, полученной из популяции этих насекомых, обитающих в одном из свинарников коммерческой компании "Prestige" (США). Линия тараканов Р6 поддерживается в лабораторных условиях около 10 лет

При анализе тотальной ДНК тараканов линии Р6 посредством фракционирования в 1% агарозном геле было показано, что после окраски геля бромистым этидием у части препаратов выявляется дополнительная фракция, часто сопоставимая по количеству с геномной ДНК (рисунок 1, дорожка 2) Было показано, что выявленная фракция соответствует ДНК денсовируса рыжего таракана [Муха Д В Шал К., 2003]. Отметим, что все тараканы, содержащие большое количество вируса, проявляли яркие признаки заболевания: вялость и нескоординированность движения.



Т. П. О. Рисунок 1. Результат геле-электрофореза нескольких образцов тотальной ДНК рыжего таракана, выделенной из индивидуальных особей линии Р6. Наклонной стрелочкой указана дополнительная фракция вирусной ДНК. Горизонтальной стрелочкой указана фракция геномной ДНК.

Детальный анализ тараканов данной линии показал, что количество ДНК вируса относительно геномной ДНК значительно отличается у препаратов тотальной ДНК, экстрагированных из разных особей. У ряда особей вирусная ДНК

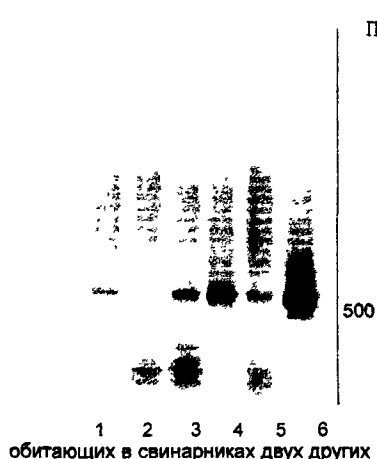
представлена слабой фракцией (рисунок 1, дорожка 3), а у большинства особей (~80%) данным методом не выявлялась вовсе (рисунок 1, дорожка 1)

Образцы ДНК, у которых методом окраски бромистым этидием дополнительная фракция выявлена не была, исследовали более чувствительным методом, а именно, блот-гибридизацией по Саузерну с зондом, комплементарным ДНК вируса. Данный подход позволил более четко дифференцировать тараканов данной линии по количеству вирусной ДНК. Отметим, что у ряда образцов тотальной ДНК (~20%) даже при использовании столь чувствительного метода вирусная ДНК обнаружена не была.

В то же время, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, комплементарными ДНК денсовируса (Vir1 - caggattgccataagaag, Vir2 - catcatcttggttagactgtc), во всех образцах ДНК тараканов данной линии был выявлен продукт амплификации (рисунок 2)

Таким образом показано, что вирус в инфицированных тараканах может находиться в двух формах – активной и неактивной

Можно предположить, что в неактивной форме ДНК вируса находится не в виде эписомной ДНК и/или в вирусных частицах, так как в этих случаях методом блот-гибридизации должна была бы выявляться фракция вирусной ДНК, а интегрирована в геном хозяина.



П.О. **Рисунок 2.** Результат амплификации ДНК тараканов линии Р6 с праймерами, комплементарными ДНК денсовируса (Vir1/Vir2). Во всех образцах (дорожки 1-6) присутствует продукт амплификации.

Показано, что ареал обитания исследуемого денсовируса не ограничен охарактеризованной выше популяцией тараканов. При исследовании выборок тараканов из популяций этих насекомых,

обитающих в свинарниках двух других коммерческих компаний – "Britt" и "Riverside"

(обе расположены на территории США) - было показано, что часть особей данных популяций инфицированы денсовирусом.

Методом ПЦР тотальной ДНК тараканов (по 30 особей из каждой популяции) с праймерами Vir1/Vir2 BgDNV был обнаружен у 50% особей популяции "Britt" и у 20% особей популяции "Riverside" (рисунок 3).

При исследовании методом ПЦР тотальной ДНК тараканов, отловленных в квартирах жилых домов из разных районов городов Москва (Россия) и Киев (Украина) – пять и две выборки по 30 особей, соответственно, - и ряда лабораторных линий ("Orange", "Black" и "Normal") BgDNV обнаружен не был.

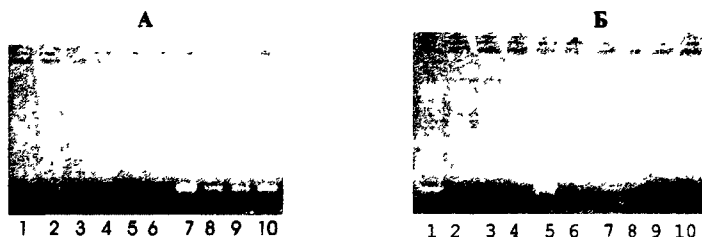


Рисунок 3. Результат амплификации ДНК тараканов с праймерами, комплементарными ДНК денсовируса (Vir1/Vir2), из популяций А- "Britt": 5 тараканов из 10 инфицированы (дорожки 2, 7, 8, 9, 10). Б- "Riverside": 2 таракана (дорожки 1 и 5) инфицированы из 10.

2. Пересеваемая культура клеток рыжего таракана **как модель для изучения денсовируса**

В работе использовали два типа пересеваемых культур клеток рыжего таракана: BGE-1 и BGE-2 [Kurtti T.J., Brooks M. A., 1976]. Клетки поддерживали на клеточной среде ранее описанного состава [Kurtti T.J., Brooks M. A., 1976] при температуре 25° С. Культуру клеток пересевали каждые 10 дней путем разведения суспензии клеток 1:10. Заражение культуры клеток денсовирусом проводили следующим образом. Несколько зараженных денсовирусом тараканов на стадии поздней инфекции гомогенизировали тefлоновым пестиком в культуральной клеточной среде. Полученный гомогенат пропускали через фильтр 0,22 мкм, и

очищенный раствор добавляли в культуральную среду на стадии пересева клеток из расчета 1 часть гомогената на 50 частей культуральной клеточной среды

Для анализа инфекционности вируса после 3-4^{ой} пересева зараженных денсовирусом клеток из них выделяли тотальную ДНК, которую анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле. Показано, что активная репликация вирусной ДНК происходит только в клетках BGE-2 (см. рисунок 4). На рисунке 4 (дорожка 2) вирусная ДНК представлена в виде дополнительной фракции размером около 5 т.п.н. В пересеваемой культуре BGE-1 репликация вирусной ДНК используемым методом не выявляется (см. рисунок 4, дорожка 1).

В тоже время, при использовании более чувствительного метода, а именно, полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, комплементарными к ДНК денсовируса, было показано, что вирусная ДНК присутствует в образцах тотальной ДНК обеих инфицированных линий как на стадии 3-4^{ой} пересева после заражения (см. рисунок 5), так и при более долгом культивировании.

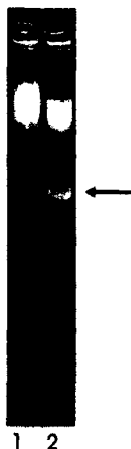
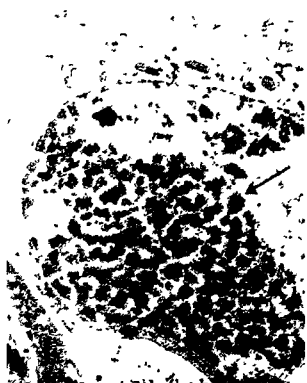


Рисунок 4. Результат электрофоретического разделения тотальной ДНК культивируемых клеток после заражения денсовирусом: 1 – линия BGE-1; 2 – линия BGE-2. Стрелочкой показана фракция вирусной ДНК.



Рисунок 5. Результат ПЦР с праймерами Vir1 и Vir 2 тотальной ДНК инфицированных клеток линий BGE-1 (дорожка 1) и BGE-2 (дорожка 2) М - маркерная ДНК.

А



Б

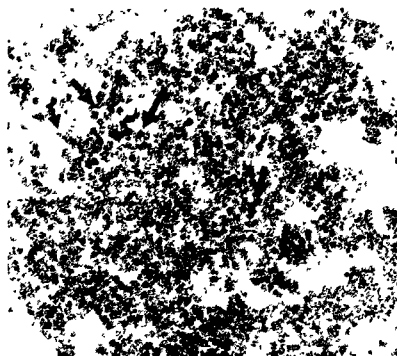


Рисунок 6. Электронно-микроскопическая фотография инфицированных вирусом клеток линии BGE-2. А - общий вид виrogenной стромы. Б - При большем увеличении видны вирусные частицы, окруженные электронно-плотной стенкой, часть из которых содержат электрон-прозрачный центр, (показаны тонкими стрелками), другие - электрон-плотный (показаны жирными стрелками).

Методами электронной микроскопии на стадии 3-4 пассажей после заражения клеток описаны цитопатологические эффекты, обусловленные вирусной инфекцией. Показано, что основные цитопатологические проявления в инфицированных клетках линии BGE-2 заключаются в необычной структуризации хроматина, при этом большая часть нуклеоплазмы занята вирусными частицами, формирующими виrogenную строму (на рисунке 6а обозначено стрелкой). Выявлены два типа ультраструктуры вирусных частиц: первый характеризуется электронно-прозрачным центром, окруженным электрон-плотной стенкой (вирусные частицы без ДНК); второй тип представлен электрон-плотными сферами (вирусные частицы с ДНК) (рис. 6б). Кроме того, показано, что вирусные частицы могут находиться не только в ядре, но и в цитоплазме.

Показано, что репликация вируса в пересеваемой культуре клеток BGE-2 не является стабильной. После 5-6^{го} пассажа концентрация вирусной ДНК относительно клеточной ДНК уменьшается, и примерно к 20-25^{му} пассажу не выявляется методом окраски бромистым этидием (рисунок 11, сравните дорожки 3-7).

Динамика развития вируса *BgDNV* в культуре клеток BGE-2 представлена в Таблице 1.

Таблица 1. Сравнение количества вирусной ДНК относительно totalной ДНК в пересеваемой культуре BGE-2, инфицированной денсовирусом

Количество пассажей	Количество вируса в пересчете на единицу totalной ДНК
1	22,6
2	20,21
5	1,57
10	0,52
25	0,0

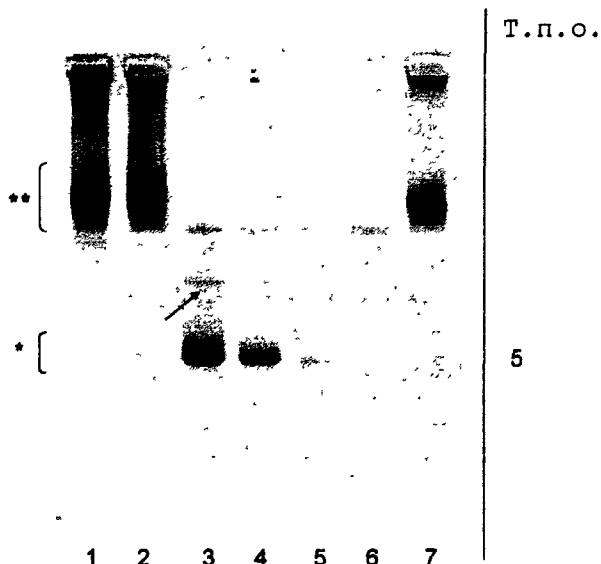


Рисунок 7. Динамика развития вируса *BgDNV* в культуре клеток BGE-2 (сравнение количества вируса относительно totalной ДНК). 1- культура клеток без вируса, 2- через 10 дней инкубации с денсовирусом, 3 – 1-й пассаж, 4- 2-й пассаж, 5 – 5-й пассаж, 6- 10-й пассаж, 7- 25-й пассаж. Двумя звездочками указана зона локализации геномной ДНК. Звездочкой указан участок локализации вирусной ДНК. Стрелочкой указана репликативная мультимерная форма вируса.

С нашей точки зрения, возможны два варианта интерпретации полученных результатов. Первое объяснение заключается в том, что культура клеток BGE-2 неоднородна, то есть состоит из клеток двух типов – восприимчивых и не восприимчивых к вирусу. Вторые в ходе развития вирусной инфекции постепенно вытесняют первых. Другое объяснение заключается в том, что при увеличении числа копий денсовируса в инфицированной клетке включается регуляторный механизм, ограничивающий репликацию вируса.

Для проверки данных гипотез был проведен следующий эксперимент. Пересеваемая культура клеток BGE-2 на стадии 10^{12} пересева после инфицирования вирусом, то есть когда количество вирусной ДНК значительно снизилось по сравнению с таковым на первых стадиях инфекции, подвергалась облучению γ -лучами в дозах (40 Гр и 80 Гр), блокирующих пролиферацию клеток, но не влияющих на репликацию относительно короткой вирусной ДНК. Облучение проводили на установке ГУПОС-1 (4,5 Гр/мин, ^{137}Cs), расположенной в ИОГен РАН.

Очевидно, что в случае, когда лишь часть клеточной культуры содержит ДНК вируса, а другая часть представляет собой клетки, устойчивые к вирусной инфекции, репликация вируса после облучения не сможет привести к резкой смене соотношения между вирусной и геномной ДНК даже при достаточно длительном культивировании облученных клеток. Напротив, в случае, когда все клетки (или подавляющая часть) содержат ДНК вируса, и ослабление вирусной инфекции произошло согласно второму из обсужденных выше сценариев, длительное культивирование облученных клеток может привести к резкой смене соотношения между вирусной и геномной ДНК.



Рисунок 8. Электрофорез тотальной ДНК инфицированных клеток рыжего таракана 10^{12} пассажа после облучения. 1, 2 - одна неделя инкубации после облучения (40 Гр и 80 Гр соответственно); 3, 4 - 25 дней (40 Гр и 80 Гр соответственно); М - маркерная ДНК.

Соотношение между клеточной геномной и вирусной ДНК определяли после фракционирования тотальной ДНК клеток в 1% агарозном геле. Для

анализа использовали инфицированные клетки 10^{го} пассажа, культивируемые в течение 7 и 25 дней после облучения

Результат электрофореза представлен на рисунке 8. Как видно на рисунке, через неделю после облучения вирусная ДНК представлена в тотальной ДНК слабой дополнительной фракцией (рис. 8, дорожки 1 и 2); через 25 дней в обоих экспериментах (40 Гр и 80 Гр рад) наблюдалась сильная фракция вирусной ДНК, сопоставимая по яркости с геномной (рис. 8, дорожки 3 и 4).

Таким образом, можно заключить, что результаты эксперимента подтверждают гипотезу, согласно которой при увеличении числа копий денсовируса в инфицированной клетке включается регуляторный механизм, ограничивающий репликацию вируса. Возможно, это является следствием саморегуляции, обусловленной генами денсовируса

3. Анализ тканеспецифичности развития вирусной инфекции

Эксперименты *in vitro* с пересеваемыми культурами клеток рыжего таракана убедительно продемонстрировали зависимость хода инфекционного процесса от типа клеточной культуры (смотрите главу 2) Самостоятельной задачей нашего исследования являлся анализ тканеспецифичности развития вирусной инфекции *in vivo*, то есть в организме инфицированного насекомого.

В экспериментах использовали насекомых линии Р6, проявляющих признаки заболевания. Продольным разрезом насекомых разделяли на две части, одну из которых использовали для выделения тотальной ДНК, которую анализировали методом гель-электрофореза В случае обнаружения фракции вирусной ДНК в количестве, сходном с геномной ДНК (то есть при подтверждении, что вирус активно реплицируется в клетках данной особи), вторую часть насекомого исследовали методом электронной микроскопии.

Этим методом было показано, что у инфицированных вирусом тараканов развитие вируса происходит не во всех тканях: активное формирование вирусных частиц происходит в клетках пищеварительного тракта и жировом теле, при этом вирусных частиц не было выявлено в мышечной ткани и в мозге (рисунок 9)

Известно, что оотека представляет собой специализированный орган самки таракана, в котором происходит эмбриональное развитие насекомых следующего поколения. У самок рыжего таракана оотеки представляют собой в значительной степени обособленный орган (особенно на поздних стадиях развития эмбрионов),

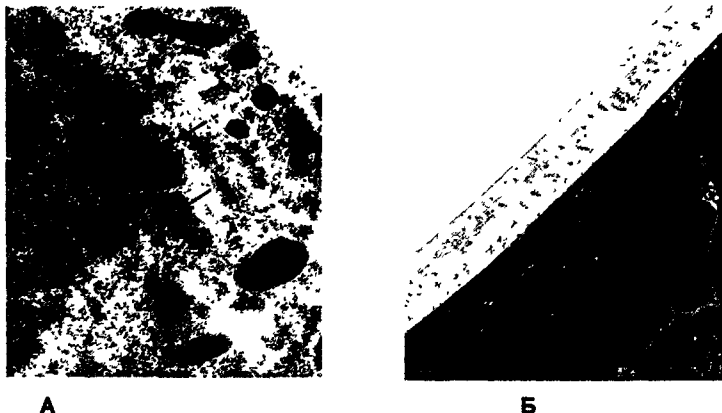


Рисунок 9. Электронная микроскопия клеток А - жирового тела, Б – мышечной ткани таракана, инфицированного денсовирусом. Стрелочками указаны скопления вируса.

однако долгое время сохраняющий клеточные контакты с тканями материнского организма.

В ходе эксперимента оотеки на поздних стадиях развития механически отделяли от самок линии Р6, и тотальную ДНК, экстрагированную отдельно из тел самок и из принадлежащих им оотек анализировали методом гель-электрофореза. Показано, что активная репликация вируса происходит только в теле насекомого – в препаратах тотальной ДНК, экстрагированных из оотек инфицированных насекомых, дополнительной фракции, соответствующей вирусной ДНК, обнаружено не было.

4. Заражение рыжего таракана денсовирусом *BgDNV* методом микроинъекций. Поддержание вируса в лабораторных условиях

Несколько зараженных денсовирусом тараканов на стадии поздней инфекции гомогенизировали тefлоновым пестиком в культуральной клеточной

среде. Полученный гомогенат пропускали через фильтр 0,22 мкм, и очищенный раствор (~5 мкл) инъецировали под кутикулу тараканам с помощью шприца для микроинъекций (Hamilton Company). Микроинъекции проводили в тараканов линии Normal, не содержащих, как было показано ранее, BgDNV.

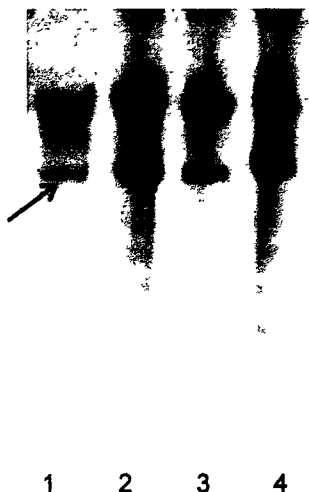
Через несколько дней после микроинъекций начинается массовая гибель тараканов (смотрите Табл. 2). Показано, что тотальная ДНК тараканов, умерших в результате вирусной инфекции, содержит дополнительную фракцию, соответствующую вирусной ДНК.

Вирус-содержащий раствор инъецировали в 40 нимф. Одна особь погибла от механических повреждений в ходе микроинъекции. После электрофореза тотальной ДНК, экстрагированной из тараканов, умерших через определенное время (см. Табл. 2), после инфицирования денсовирусом 36 особей содержали дополнительную фракцию вирусной ДНК, 3 особи – дополнительной фракции ДНК не содержали.

Таблица 2. Эксперимент по заражению денсовирусом в лабораторных условиях.

Количество суток, прошедших со дня инъекции	Количество погибших тараканов	Наличие дополнительной полосы
3	1	1+
7	2	2+
8	4	4+
14	10	10+
18	11	9+ 2-
20	4	4+
21	2	2+
22	1	1-
23	3	3+
24	1	1+

На рисунке 17 показан результат электрофореза с ДНК особей, зараженных вирусом путем инъекции.



Т.п.о. Рисунок 17. Электрофорез
тотальной ДНК тараканов,
зараженных путем микроинъекций
денсовирусом. Стрелочкой показана
фракция вирусной ДНК.

5.0 Как видно на рисунке 17, на
дорожках 1 и 3 вирусной ДНК
значительно меньше, чем на
дорожках 2 и 4, то есть гибель
тараканов может наступать при
различном количестве вируса.

Ранее (смотрите главу 2) нами
было показано, что репликация
вируса в пересеваемой культуре
клеток не является стабильной после
последовательных пассажей количество ДНК вируса относительно клеточной
ядерной ДНК резко сокращается. Очевидно, что пересеваемую культуру клеток
рыжего таракана нельзя рассматривать в качестве инструмента для длительного
поддержания денсовируса в лабораторных условиях. Напротив, разработанный
нами метод микроинъекций вирус-содержащего раствора под кутикулу тараканов
представляется оптимальным для этой цели.

5. Определение видоспецифичности вируса.

Разработанный метод микроинъекций вирус-содержащего раствора под
кутикулу тараканов (смотрите главу 4) нами был использован для анализа
видоспецифичности исследуемого денсовируса. Вирус-содержащий раствор
инъекцировали в гемолимфу трем близкородственным *B. germanica* видам
тараканов: *Supella longipalpa*, *Blattella vaga*, *Leocophaea maderae*. Показано, что
после инфицирования тараканов этих видов BgDNV гибели насекомых не
наблюдается, электрофоретический анализ тотальной ДНК инфицированных
тараканов не выявил дополнительной полосы, соответствующей репликативным
формам вируса. В тоже время, в контрольной группе происходила массовая

гибель *Blattella germanica* и электрофоретическим анализом тотальной ДНК инфицированных тараканов были выявлены дополнительные полосы, соответствующее репликативным формам вируса.

Таким образом показано, что исследуемый денсовирус является строго видоспецифичным, однако природа выявленной видоспецифичности требует дополнительного анализа.

§. Обнаружение ретроэлементов рыжего таракана и анализ их взаимодействия с денсовирусом *BdDNV*

Обнаружение ретровирусных элементов рыжего таракана

В рамках исследования структурно-функциональной организации денсовируса нами были амплифицированы и клонированы фрагменты ДНК, соответствующие открытым рамкам считывания генома вируса. Схема взаимного расположения ОРС вируса и локализация праймеров, использованных для амплификации заданных участков вирусного генома, представлена на рисунке 11. В качестве матрицы использовали тотальную ДНК, экстрагированную из тараканов, инфицированных вирусом.

Известно, что ПЦР является эффективным высокочувствительным методом, однако при работе данным методом необходимо использовать максимальное количество контролей, подтверждающих специфичность продукта реакции. На стадии отработки оптимальных условий амплификации, особенно в случаях, когда матрицей является ДНК, содержащая субповторы и способная формировать сложные вторичные структуры (примером такой матрицы является ДНК исследованного денсовируса) большое значение приобретает использование «отрицательных» контролей, в частности, праймеров и их различных сочетаний, которые в случае специфичной ПЦР не должны амплифицировать матричную ДНК. Так, при амплификации ОРС 4, кроме пары праймеров 3a/4a (5'-ctttggactcactatgggagatg-3') – 4b (5'-ttattcctgtagctcctccg-3'), обуславливающих в оптимальных условиях ПЦР амплификацию заданного участка вирусного генома, мы использовали пару праймеров 3a/4a' (5'-gaaacctcagtgataccctctac-3') и 4b' (5'-aataaggacatcgaggaggc-3'), где праймеры 3a/4a' и 4b' представляют собой,

последовательности ДНК, комплементарные праймерам 3а/4а и 4b, соответственно

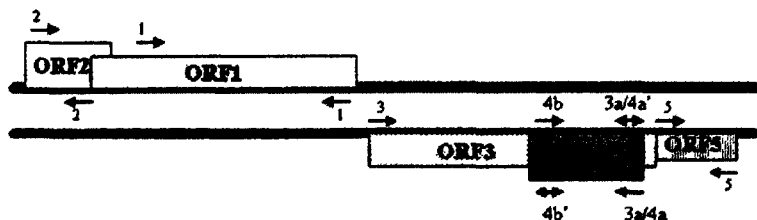
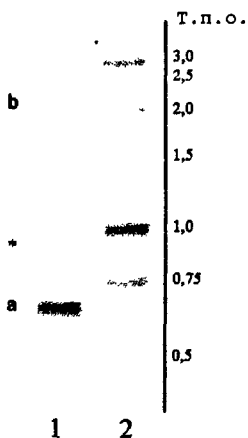


Рисунок 11. Схема структурной организации денсовируса *BgDNV*. ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 и ORF5 – соответствующие ОРС. 1а-1б, 2а-2б, 3а/4а-3б, 3а/4а-4б и 5а-5б – пары праймеров, фланкирующие соответствующие ОРС (направление стрелок указывают на ориентацию праймеров). 3а/4а' и 4б' – праймеры, комплементарные 3а/4а и 4b, соответственно.

Очевидно, что при проведении ПЦР с праймерами 3а/4а' и 4б', продукта амплификации вирусного генома наблюдаться не должно.



К нашему удивлению, при использовании пары праймеров 3а/4а' – 4б' в широких диапазонах температуры отжига и концентрации ионов магния в результате ПЦР тотальной ДНК инфицированных вирусом тараканов наблюдалась стабильная амплификация трех фрагментов ДНК размером 2,1; 0,9 и 0,73 т.п.о., соответственно (рис.12).

Рисунок 12. Результат ПЦР тотальной ДНК инфицированных денсовирусом рыжих тараканов с «контрольными» праймерами 3а/4а' и 4б'. Дорожка 1: а и б – мажорные амплифицированные фрагменты, звездочка – минорный фрагмент. Дорожка 2 – маркерная ДНК.

Используемые условия ПЦР не позволяют строго судить о количественных соотношениях между амплифицируемыми фрагментами, однако следует отметить, что фрагмент 0,9 т.п.о., в отличие от двух других, во всех проведенных экспериментах (более десяти) был представлен минорными количествами ДНК.

Фрагменты ДНК размером 0,73 и 2,1 т.п.о. (на рисунке 12 обозначены как а и b, соответственно) были клонированы и секвенированы

Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов а и b с последовательностями нуклеотидов, представленными в базе данных GenBank посредством программы BLAST (blastn), не выявило значимой степени сходства.

Во фрагменте а было обнаружена одна открытая рамка считывания, во фрагменте b - две. При сравнении аминокислотных последовательностей OPC фрагмента а и одной из OPC фрагмента b (OPC1) с базой данных белков Swissprot посредством программы BLAST (blastx) были выявлены значимые сходства с последовательностями аминокислот, соответствующих высококонсервативному аминокислотному домену белка обратной транскриптазы, принадлежащей различным ретротранспозонам насекомых (рис 13).

Как видно на рисунке 13, транскрибированная *in silico* ДНК фрагмента а выявляет максимальную степень сходства с аминокислотной последовательностью обратной транскриптазы не содержащего длинные концевые повторы (non-LTR) ретротранспозона наездника *Nasonia vitripennis* - каталожный номер GenBank L00950, а OPC1 фрагмента b - с высококонсервативным доменом обратной транскриптазы ретротранспозона *Bombyx mori*.

Сравнение последовательности нуклеотидов OPC фрагмента а и OPC1 фрагмента b между собой показало, что они имеют значительное сходство (более 80%), но не идентичны (рисунок 14).

Не менее неожиданный результат был получен при сравнении гипотетической последовательности нуклеотидов второй OPC фрагмента b с электронной базой данных белковых последовательностей. Выявлено высокое сходство с доменом аминокислот белка капсиды денсовируса *Bombyx mori* (рис.15).

На данный момент не ясно, являются ли выявленные фрагменты ретрозлементов частями мобильных элементов или же ретровирусов. Очевидно, что описание полноразмерных копий данных элементов позволит лучше понять их природу и выявить филогенетическое родство. Нельзя исключить, что обнаруженные ретрозлементы представляют собой некий связующий (промежуточный) класс вирусов, филогенетически родственный как ретро-, так и денсовирусам.

A

Аминокислот: идентичных - 31% (44/140), позитивных - 53% (75/140)

```

a      375 KGGVAGSLLSPILFNIFIDSLPRTQRTKHSSFLGSHRINSLLYADDIVLVSSSTRSGLOQ 554
      +C  G  LSP+LFN +D++ R +  +++ FL+G+ +I +L++ADD+VL++ TR GLQ+
R2-Nv  511 RGVRRQGDPLSPLLFNCVMDAVLR-RLPENTGFLMGAEKIGALVFADDLVLLAETREGLQA 569

a      555 MLDTCERHSISHGYVFAPSKCEVIA--PQGKKTPC-----VTMYGEKVRK---TPSFK 698
      L  E      G  P KC +A P GK+      T+ +++ +      +K
R2-Nv  570 SLSRIEAGLQGGLEMMPRKCHTLALVPSGKEKKIKVETHKPPTVGNQEITQLGHADQWK 629

a      699 YLGVFPNDKGVDMAELCVEG 758
      YLGV +N G  ++ + G
R2-Nv  630 YLGVVYNSYGPIQVKINIAG 649
  
```

Б

Аминокислот: идентичных - 46% (32/69), позитивных - 63% (44/69)

```

b      224 VPSNWNTAVLHMIWKGKGRRDEIDKYRPIALTSIFRKVLEKTMIAQLQEY-EDR--LDVA 394
      VPS+W TA +H I K KG R +  YRPIA+TS+ KV+E+ +  QL +Y EDR  +
Rt-Bm  512 VPSSWKTARVHPIPK-KGDRSDPSSYRPIAITSLLSKVMERIINIQLLXYLEDRLQLISR 570

b      395 QGGFIRGKA 421
      Q GF  G++
Rt-Bm  571 QYGFRHGRS 579
  
```

Рисунок 13. Сравнение гипотетической последовательности нуклеотидов А – ОРС фрагмента а; Б – ОРС1 фрагмента б с базой данных Swissprot.

Условные обозначения:

а и б – фрагменты соответствующих аминокислотных последовательностей ОРС амплифицированных фрагментов ДНК а и б.

R2-Nv - высококонсервативный домен обратной транскриптазы ретротранспозона *Nasonia vitripennis*; Rt-Bm - высококонсервативный домен обратной транскриптазы ретротранспозона *Bombyx mori*.

Активизация выявленных ретроэлементов под действием денсовируса BgDNV

Для дальнейшего исследования выявленных ретроэлементов, на основе определенных последовательностей нуклеотидов фрагментов а и б нами были созданы пары праймеров, полностью комплементарных данным ретроэлементам (a1 – 5'-cagcacatcagacttgatc-3' / a2 – 5'-gtacatcgtgacgcacggag-3' – для фрагмента а; b1 – 5'-gaggggccgatggtatcacg-3' / b2 – 5'-ccttgcggaatatgctagtc-3' - для фрагмента б).

```

90      100      110      120      130      140      150      160
b  AATCCCGTTACGTCCACCCCGTGGTGGTGAATGGGATCCCAAAATATTAAACGATTAAGCTCTCTTGCCATT
   11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
a  AACTCGGCATATCACTCCCTTATCGTTGAATGGCACCCCTAAATACTTAAACGAGGAGTCTTTCTTACCTTT
   10      20      30      40      50      60      70

170      180      190      200      210      220      230
b  TCTCCATATAGCTGGCATATGGAGGTCTTTACCTTGGGGGCTTATTATTTCACACTTAGATGGCAAAACAGG
   11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
a  TCTCCGATACATCGTGACGCACGGAGTCTTTTACCTTGGGGGGCTATTACTTCGCACCTTAGATGGTGCAAAACACA
   80      90      100      110      120      130      140      150

240      250      260      270      280      290      300      310
b  TACCCATGGCTAATACTATGCTGTTTCGCAGGTGACTAGCATACTCTGTAGTTGTTCTTGTTCTTAGCCACCAAC
   11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
a  TACCCATGGCTGATACATATGCCGCTCGCACGTGCTTAGCATGCTTTGTAGCCCCGAATGTGTGTAGACACTAAC
   160      170      180      190      200      210      220

320      330      340      350      360      370      380
b  ACAGTCTCGTCGGCGTACAGCAAAGAGTTGATCCTGTGGCTACCTAGCAAGAAGCTTGAGTGCCTTCCTCGGGAGG
   11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
a  ACGATATCGTCGGCGTACAGCAAAGAATTGATCCTGTGGCTGCTAGCAAGAAGCTTGAATGCTTCGTGGCTGT
   230      240      250      260      270      280      290      300

390      400      410      420      430      440      450      460
b  GTCTGGGGAGAGTATCGATGAATATGTTGAAGAGCATCGGTGATAAATACGAGCCCTG-CAACAATCCTCTTCC
   11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
a  GTTCTGGGAGGGAGTCTATAAATATGTTGAAGAGAATCGGTGATAACAACGACCCCTGGCAACACCCCTTCC
   310      320      330      340      350      360      370

470      480      490      500      510      520      530
b  CATAGGGACTTTCTCTAGATGCTTGGCCCCCGATCCTTATTGTAGTTTCCGCATAATCGAACAAACACTTCAAAAG
   11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
a  CAAAGGTACCTTCTCTAGACCCCTGCCCCCGATCCTTATTGTAAATTTCCGCAATCGAACAAACACTTTCAGGAG
   380      390      400      410      420      430      440      450

540      550      560      570      580      590      600      610
b  -GACAAGAGGCCCTCTTTAATGCTATGCCATTGCACT-CTTCCACAATATGCTCGGTTGACTGTATCGTAGG
   11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
a  TGCCAAGAGGCCCT-CTTTAATGCCACTCTACTGCACTCTTCCACAATATGCTCGAATGACTGTGTCGTAGG
   460      470      480      490      500      510      520

620      630      640      650      660      670
b  CCCCCCTTATGTCCAGGAGGCCCTGCCAACAGTCCCT-TTCTTCTGCACTGCTCTTTGACAA
   11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
a  CGCCCTTTATGTCCAAAAGGCCAGCCAACATCTCTTCTCTGCTCCGCTCCTTGATAA
   530      540      550      560      570      580      590

```

Рисунок 14. Сравнение последовательности нуклеотидов ОРС фрагмента а и ОРС1 фрагмента б между собой. Выявлено 80,1 %-ное сходство фрагментов а и б на протяжении 588 нуклеотидов.

Первая пара праймеров позволяет амплифицировать методом ПЦР внутренний фрагмент "ретрозлемента а" величиной 542 п.о., вторая пара внутреннего фрагмент "ретрозлемента б" величиной 212 п.о.

Аминокислот: идентичных - 30% (17/56), позитивных - 50% (28/56)

```
b      167  SLSLFCSTHPCPFHNGWLSTASSVFSCAVAVPWVYSSVDVILVHPITWSLVANT 334
          S  +PC  CP  I+GW S S + + A+ + + + S V + PI + + NT
BmDNV  3137 SALIFCPATCPNSLISGWFSWFSRLAALALLILLILAQSFSDVDFLLPIPYKGLPNT 2970
```

Рисунок 15. Сравнение гипотетической аминокислотной последовательности OPC2 фрагмента **b** с базой данных Swissprot. Условные обозначения: **ь** – соответствующая аминокислотная последовательность OPC 2 фрагмента **b**.

BmDNV – последовательность аминокислот белка капсиды денсовируса *Bombyx mori* (*BmDNV*), каталожный номер [AB042597](#).

Методом ПЦР с использованием вышеописанных праймеров было показано, что количество ретроэлементов **a** и **b** в тотальной ДНК тараканов разных линий может колебаться в определенных пределах – наиболее значительные различия были выявлены при сравнении тараканов инфицированных и неинфицированных денсовирусом *BgDNV*. На рисунке 16 представлен результат ПЦР с праймерами **a1** – 5'-cagcacatcacgacttgatac-3' / **a2** – 5'-gtacatcgtgacgcacggag-3' тотальной ДНК, экстрагированной из тараканов линии **P6**, – как было описано выше, все особи данной линии инфицированы денсовирусом *BgDNV* – (дорожки 1 и 2) и линии **Normal**, не содержащей денсовируса (дорожка 6). Как видно на рисунке, количество продуктов амплификации в анализируемых линиях значительно различались: следовые количества в линии **Normal** и яркий фрагмент ДНК в линии **P6**. Однако отметим, что данный эффект мог быть обусловлен не влиянием денсовирусной инфекции, а некими межлинейными различиями.

Для демонстрации того, что инфицирование рыжего таракана *BgDNV* приводит к увеличению числа копий ряда ретроэлементов (ретротранспозонов и/или ретровирусов) клеток хозяина была поставлена серия дополнительных опытов.

В нашей дальнейшей работе мы использовали три типа тотальной ДНК тараканов линии **Normal**, не инфицированных денсовирусом, тараканов из линии **P6**, инфицированной *BgDNV*, и тараканов линии **Normal**, которые были заражены вирусом путем микроинъекции. Описание метода инфицирования тараканов *BgDNV* посредством микроинъекций смотрите в разделе 5. После амплификации тотальной ДНК тараканов линии **Normal** с праймерами, комплементарными фрагменту **a**, наблюдалась слабая полоса (рисунок 16, дорожка 6). В случаях амплификации тотальной ДНК тараканов линии **P6** и тараканов линии **Normal**,

которые были заражены вирусом путем инъекций, наблюдался продукт амплификации в большем количестве (рис 16, дорожки 1, 2 и 3, 4, 5 соответственно).

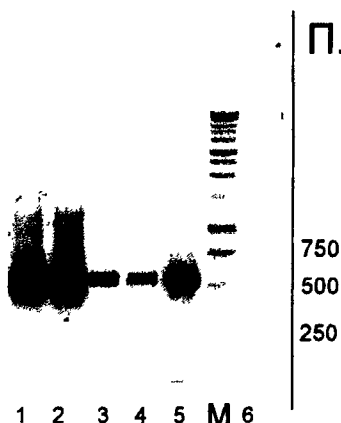


Рисунок 16. Результат ПЦР с праймерами, комплементарными фрагменту а. ДНК тараканов линий: 1, 2 - Р6, 3, 4, 5, - Normal, которые были заражены денсовирусом путем микроинъекций, 6 - Normal. М - маркерная ДНК.

Отметим, что используемый метод ПЦР не является количественным и не позволяет строго судить о количестве амплифицированного продукта. Кроме того, известно, что неспецифические

примеси тотальной ДНК могут значительно снижать количество ПЦР-продукта. На рисунке 17 приведен результат гель-электрофореза продуктов ПЦР тотальной ДНК тараканов линии Normal, зараженных денсовирусом путем микроинъекций (дорожка 1), и свободных от вируса (дорожка 2) с двумя парами праймеров, первая из которых комплементарна ретроэлементу а, вторая – фрагменту рДНК рыжего таракана. Как видно на рисунке, после окраски бромистым этидием продукты амплификации, соответствующие рДНК, имеют сходную интенсивность свечения, а продукты амплификации, соответствующие ретроэлементу, количественно различаются. Данный эксперимент, с нашей точки зрения, убедительно демонстрирует, что выявленные различия в интенсивности свечения продуктов амплификации обусловлены различиями в количестве ДНК-матрицы, то есть различиями количества ретроэлементов в анализируемой тотальной ДНК, а не некими неспецифическими факторами, потенциально способными приводить к ослаблению ПЦР.

Методические подходы, используемые для демонстрации активизации ретроэлемента а под действием денсовирусной инфекции, были применены для анализа активизации ретроэлемента б. Показано, что в результате ПЦР с праймерами, комплементарными фрагменту б, и тотальной ДНК тараканов из незараженной денсовирусом популяции продукт амплификации представлен в следовых количествах. В тоже время, когда использовали тотальную ДНК

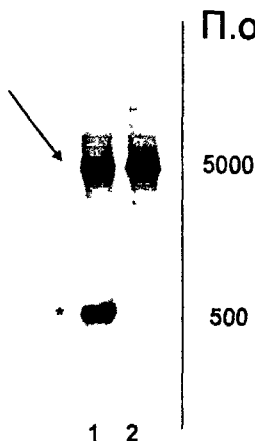


Рисунок 17. Результат ПЦР с двумя парами праймеров: первая из которых комплементарна ретроэлементу, вторая – фрагменту рДНК рыжего таракана – тотальной ДНК тараканов. 1 – линии Normal, зараженных денсовирусом путем микроинъекции; 2 – линии Normal. Стрелочкой показаны продукты амплификации с праймерами, комплементарными рибосомальным генам; звездочкой показаны продукты амплификации с праймерами, комплементарными фрагменту а.

5000
500 тараканов из линии Р6 или ДНК тараканов, зараженных *BgDNV* посредством микроинъекций, - продукт амплификации представлял собой мажорную фракцию.

Таким образом, показано, что выявленные нами ретроэлементы (а и б) присутствуют в различных линиях рыжего таракана и что заражение тараканов *BgDNV* индуцирует увеличение числа их копий.

Демонстрация индукции активизации ретроэлементов под действием вирусной инфекции представляет, с нашей точки зрения, общебиологический интерес. В частности, полученные результаты, с нашей точки зрения, предполагают разработку новых подходов для оценки последствий «безобидных» вирусных инфекций для генома клеток человека.

ВЫВОДЫ

1) Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследована распространенность денсовируса *BgDNV* в природе. Показано, что две из трех исследованных популяций тараканов на территории США инфицированы денсовирусом. При исследовании тараканов, отловленных в квартирах жилых домов из разных районов городов: Москва (Россия) и Киев (Украина) – пять и две выборки по 30 особей, соответственно; и ряда лабораторных линий *BgDNV* обнаружен не был.

2) Определена динамика развития денсовируса *BgDNV* в лабораторной линии Р6, хронически инфицированной изучаемым вирусом. Показано, что вирус может находиться в двух формах: «активной» и «неактивной». В первом случае методом окраски бромистым этидием и/или блот-гибридизацией выявляются мультимерные репликативные формы вируса и ДНК вирусных частиц; во втором – присутствие вируса можно выявить только методом ПЦР.

3) Методами электронной микроскопии описаны цитопатологические эффекты, обусловленные вирусной инфекцией. Показано, что у инфицированных вирусом тараканов развитие вируса происходит не во всех тканях: активное формирование вирусных частиц происходит в клетках пищеварительного тракта и жировом теле, при этом вирусных частиц не было выявлено в мышечной ткани и в мозге.

4) Исследована динамика роста денсовируса *BgDNV* в пересеваемой культуре клеток рыжего таракана. Показано, что репликация вируса в пересеваемой культуре клеток не является стабильной: после последовательных пассажей количество ДНК вируса относительно клеточной ядерной ДНК резко сокращается.

5) Разработан новый метод поддержания изучаемого денсовируса в лабораторных условиях. Метод основан на микроинъекции раствора, содержащего вирусные частицы, под кутикулу рыжего таракана.

6) Исследована видоспецифичность денсовируса *BgDNV*. Показано, что близкородственные *B. germanica* виды тараканов: *Suppella longipalpa*, *Blattella vaga*, *Leocophaea maderae* невосприимчивы к исследованному вирусу.

7) Показано, что инфицирование рыжего таракана *BgDNV* приводит к активизации (увеличению числа копий) ряда ретротранспозонов.

и/или ретровирусов) клеток хозяина. Клонированы и секвенированы протяженные фрагменты ДНК двух ретроэлементов, активируемых инфекцией денсовируса *BgDNV*. Показано, что оба фрагмента имеют открытую рамку считывания (ОРС), гомологичную обратной транскриптазе ретротранспозонов насекомых; кроме того, один из клонированных фрагментов содержит дополнительную ОРС, гомологичную белку оболочки денсовируса насекомых, не идентичную *BgDNV*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Чумаченко А.Г., Шал К., Муха Д.В. В.Обнаружение ретротранспозонов рыжего таракана *Blattella germanica*. Доклады Академии Наук, 2005, т. 401, № 1, с.112-116.
- 2) Chumachenko A , Mukha D. New cockroach-specific denonucleosis virus: virus and host Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics. Kyiv, Ukraine. September 25-27, 2003, p. 11.
- 3) Чумаченко А.Г., Шал К., Муха Д.В. Денсовирус рыжего таракана *Blattella germanica* (*BgDNV*): характеристика структурно- функциональной организации и анализ взаимоотношений с организмом хозяина III съезд ВОГис, Москва, 2004, 6-12 июня, т 1, с 29
- 4) Чумаченко А.Г., Шал К., Муха Д.В. Денсовирус рыжего таракана: генетический аспект взаимодействия вирус/ хозяин Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных Материалы международной научной конференции Саранск, 2005, с. 261-262.
- 5) Чумаченко А.Г. Новый денсовирус рыжего таракана: вирус и хозяин 8-я международная Пуцнинская школа-конференция молодых ученых. Пуцдино, 2004, 17-21 мая, с. 39.
- 6) Чумаченко А.Г. Мобильные элементы рыжего таракана 9-я международная Пуцнинская школа-конференция молодых ученых Пуцдино, 2005, 18-22 апреля, с. 61.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 06.02.2006 г.

Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л. 1,5 Тираж 90 экз. Заказ 064.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к

2006A
5492

№ - 5492