

Новый эндогенный ретровирус из генома курицы

Л. Г. Борисенко, А. В. Рындич

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

При проведении полимеразной цепной реакции с праймерами для консервативных участков ретровирусных генов протеазы и обратной транскриптазы в геноме курицы обнаружен новый эндогенный ретровирус. Он гомологичен MLV-родственным ретровирусам, встречающимся в геноме многих позвоночных, но не родственен экзогенным MLV-родственным ретровирусам, инфицирующим кур. Это первое сообщение о курином эндогенном ретровирусе, не принадлежащем к роду ALV (вирус лейкоза птиц). Показано, что новый ретровирус экспрессируется в эмбриональных фибробластах.

Введение. Эндогенные ретровирусы обнаружены в геноме восьми классов позвоночных животных [1]. Интерес к их изучению возрос после того, как стало известно о роли провирусов в возникновении новых высоковирулентных форм ретровирусов в результате рекомбинации [2—4]. В то же время присутствие в геноме эндогенных ретровирусов обуславливает устойчивость к инфицированию экзогенными ретровирусами, использующими для проникновения в клетку рецептор, аналогичный или родственный таковому эндогенного провируса [5—7].

К наиболее изучаемым относятся ретровирусы человека, курицы и мыши. К настоящему времени у кур описаны две группы эндогенных ретровирусов: провирусы, родственные вирусу лейкоза птиц (ALV-родственные ретровирусы), и семейство провирусов EAV (с подсемействами EAV-0, EAV-HP, E-33, E-51, ART-CN) [8]. Предполагается, что все эти многочисленные ретроэлементы принадлежат к роду ALV [9]. Недавно показано, что эндогенные ретровирусы, родственные вирусу лейкоза мышей (MLV), характерны для всех классов наземных позвоночных [10]. Несколько таких ретровирусов обнаружено и в геномах птиц [1, 10, 11]. При этом у синцитиального вируса кур (CSV), являющегося экзогенным и принадлежащего к MLV-родственной группе вирусов ретикулоэндотелиоза (REV), эндогенные аналоги не обнаружены.

В данной работе показано, что геном курицы содержит ретроэлементы, родственные человеческому эндогенному ретровирусу типа I (HERV-I),

который относится к группе MLV-родственных ретровирусов. Это первое сообщение о ретровирусе из генома курицы, который не родственен вирусу лейкоза птиц.

Материалы и методы. Геномная ДНК и тотальная РНК из образцов тканей трехнедельных эмбрионов кур линии СВ (B12/B12) любезно предоставлены д-ром Й. Хейнаром (Институт молекулярной генетики, Чехия).

Для амплификации HERV-I-родственной последовательности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали вырожденные праймеры для консервативных участков ретровирусной протеазы и обратной транскриптазы [12]:

PRO 5'-g t t/g t t i g a t/c a c i g g i g/t c

JO 5'-a t i a g i a g/t a/g t c a/g t c i a c a/g t a (i — инозин).

ПЦР проводили с 150 пмоль каждого праймера, 300 нг геномной ДНК в присутствии 50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,3, 1,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ dNTPs, 2 ед. Taq-полимеразы, используя набор реактивов фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ). Температурные циклы были такими: 1 цикл при 80 °С, 2 мин; 35 циклов при 45 °С, 30 с, 72 °С, 60 с, 94 °С, 20 с; 1 цикл при 45 °С, 3 мин и 72 °С, 7 мин. Продукт ПЦР длиной 850 п. н. был выделен из агарозного геля, клонирован в Т-векторе («Invitrogen», США) и секвенирован.

Для филогенетического анализа использована программа Phylip 3.5 [13].

Обратную транскрипцию с праймерами PRO и JO проводили при помощи набора и по протоколу фирмы «Roche» (Франция). Перенос по Саузерну и

```

L V D T G A A R S S L A H K V S G
ttg gtg gat acg ggg gca gct cga tca tca ctg gcc cac aag gtg tca gga
L K L T N E T L R I T G V E G T G
ctc aaa ttg aca aat gag acc tta agg ata aca ggg gta gag gga act ggg
M T V P L F E N T E L K L G D R A
atg aca gta cca ctt ttt gaa aat act gaa tta aaa ctg ggg gac agg gcc
I T G Q L L Y V P D A G T N L L G
ata aca gga caa tta ttg tat gta cct gat gca ggg act aac ctg ctg ggg
R D L M M K L G I Q I T T X T R M
agg gat ctt atg atg aaa ttg gga att caa ata aca acc t?? acc agg atg
E L L Y Q * I Y * L R Q M R E I D
gaa tta ctg tat caa tga ata tat taa ctg agg cag atg aga gag ata gac
P V V W V K E G N R G G L R I T P
cct gtg gtc tgg gtc aaa gaa ggg aat aga ggg ggg tta aga ata acc cct
L K I K L Q E K Y E ↓ I I R Q R Q Y
ttg aaa ata aaa tta caa gaa aaa tat gag atc ata aga cag aga caa tac
P I P F E G R M G L K P V I Q G L
cca att cca ttt gag gga cgt atg ggc ctt aaa cct gtg ata caa gga tta
L K D G L L E P C M S P F N T P I
cta aag gat ggg ttg ttg gaa cca tgt atg tcg ccc ttc aat acc ccc att
L P V R K P D G S Y R L V Q D L R
tta cca gta agg aaa cct gat ggc tcc tac cga tta gtg caa gac ttg aga
K I N E I V Q K R H P A V P N P Y
aaa att aat gaa ata gta caa aaa cgg cat cca gcg gtt cca aac cca tac
T L M S K I P N E N R W F S V I D
acc ttg atg agt aaa atc cca aat gaa aac agg tgg ttc agt gtt ata gat
L K D A F W S I P L D H E S R D I
tta aag gat gcc ttt tgg tct att cca ctg gat cat gaa agc aga gac ata
F A F E W E D P E S G R K Q Q Y R
ttt gcc ttt gaa tgg gaa gat cct gag agt ggg cgg aaa cag cag tat cgg
W T V L P Q G F T E S P N L Y Y F
tgg aca gtc cta ccc cag ggg ttt aca gaa tcg cca aat ttg tat tac ttc
L Q Y V D D L
cta caa tat gtc gat gac ctc
    
```

Рис. 1. Аминокислотная и нуклеотидная последовательности генов полимеразы и обратной транскриптазы HERV-I-родственного ретровируса курицы. Стрелкой указано предполагаемое начало гена обратной транскриптазы; жирным шрифтом выделены консервативные участки, для которых подобраны ПЦП-праймеры; X — неизвестная аминокислота; *стоп-кодон

гибридизацию в жестких условиях осуществляли по общепринятой методике [14]. Условия отмывки гибридации были следующими: $2 \times \text{SSC}$, 0,1 % SDS (20 мин при комнатной температуре), $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1 % SDS (2 раза по 20 мин при 65 °C). Зондом служил продукт ПЦП, полученный при использовании праймеров PRO и JO.

Нуклеотидная последовательность генов *pro* и *pol* HERV-I-родственного ретровируса из генома курицы помещена в банк данных GeneBank/EMBL/DDJB под номером AY182230.

Результаты и обсуждение. При проведении ПЦП с праймерами PRO и JO на геномной ДНК курицы образуется продукт ~850 п. н., что может свидетельствовать об амплификации ретровирусных генов *pro* и *pol* [12]. После секвенирования продукта ПЦП установлено, что данные гены принадлежат новому ретровирусу. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности этих генов представлены на рис. 1. Поскольку полученная нуклеотидная последовательность содержала многочисленные стоп-кодона, то для поддержания от-

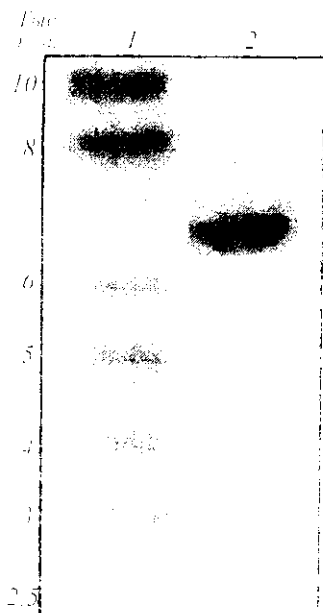


Рис. 2. Саузерн-блот-гибридизация геномной ДНК курицы: 1 — маркер длины рестрикционных фрагментов Smart Ladder (Eurogenetec); 2 — рестрикция геномной ДНК курицы рестриктазой *SacI*

крытой рамки считывания мы добавили несколько нуклеотидов, обозначенных «?».

Саузерн-блот-гибридизация подтверждает наличие ретровируса в геномной ДНК. На радиоавтографе виден фрагмент длиной ~7 тыс. п. н. (рис. 2).

Чтобы установить предполагаемое происхождение нового эндогенного ретровируса, был проведен его филогенетический анализ. Для анализа использовали аминокислотные последовательности генов обратной транскриптазы 28 ретроэлементов: 1) эндогенные ретровирусы (RVsparrow, RVrook, RVredwing, RVpartridge, RVwren, RVpigeon, RVbowerbird, RVtinamou), обнаруженные в геномах других видов птиц при использовании ПЦП-праймеров PRO и JO; 2) ретровирусы (преимущественно экзогенные), представляющие все семь известных ретровирусных родов: род ALV (вирус саркомы Рауса, RSV); род MLV (вирус лейкоза мышей, MLV; вирус некроза селезенки уток, SNV; эндогенные ретровирусы человека типа E и типа I, HERV-E и HERV-I; вирус лейкоза кошек, FeLV; вирус лейкоза обезьян, GaLV); вирусы D типа (обезьяний вирус Мезон-Пфайзера, MPMV; вирус синдрома приобретенного иммунодефицита обезьян, SRV1); вирусы млекопитающих В типа (вирус опухоли молочной железы мышей, MMTV); лентивирусы (вирус иммунодефицита человека типа 1, HIV-1; вирус иммунодефицита кошек, FIV); спума-ретровирус человека, HSRV); род HTLV/BLV (вирус Т-клеточного лейкоза человека, HTLV; вирус лейкоза быка, BLV); 3) эндогенные ретровирусы

курицы *ev-1* (ALV-родственный ретровирус) и EAV-HP; 4) LTR-несодержащий ретротранспозон курицы CR1; 5) LTR-содержащий ретротранспозон дрозофилы *gypsy*.

Как видно из дендрограммы (рис. 3), обнаруженный нами ретровирус (обозначен «RVchicken») наиболее близок к эндогенному ретровирусу человека типа I (HERV-I). Подобные HERV-I-родственные ретровирусы обнаружены в геноме воробья (RVsparrow) и некоторых других позвоночных [11]. В то же время он не родственен вирусу некроза селезенки (SNV), инфицирующему уток. К сожалению, у синцитиального вируса кур (CSV) ген обратной транскриптазы не секвенирован, но существующие данные позволяют предположить, что REV — это монофилиетическая группа, члены которой являются близкородственными [17]. Таким образом, обнаруженный нами ретровирус, по-видимому, не является эндогенной формой ни CSV, ни других вирусов ретикулоэндотелиоза, для которых эндогенные аналоги остаются неизвестными. Ранее было выдвинуто предположение, что REV (в частности SNV) инфицировали птиц в результате горизонтального переноса от млекопитающих [10].

Из дендрограммы также видно, что эндогенный ретровирус кур EAV-HP располагается возле RSV. Это поддерживает высказанное ранее мнение о принадлежности семейства EAV к роду ALV [9]. Таким образом, обнаруженный нами ретровирус является первым эндогенным ретровирусом курицы, который не родственен ALV.

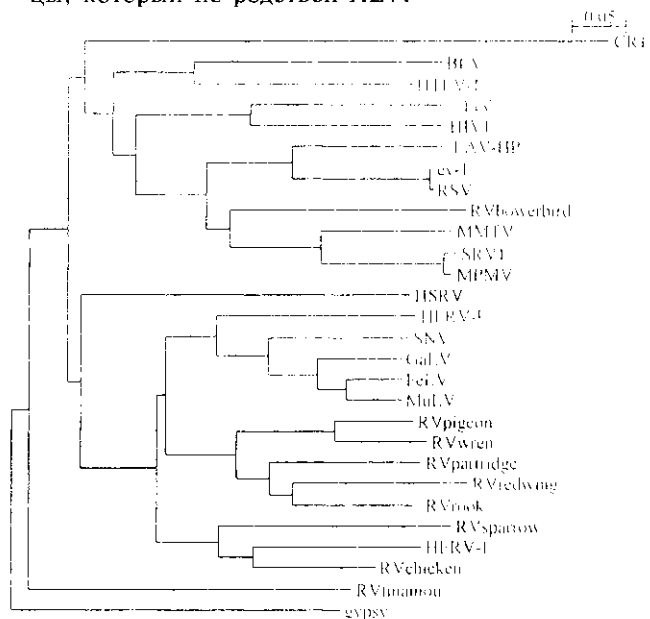


Рис. 3. Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей генов обратной транскриптазы. Последовательности взяты из работ [1, 10, 11, 15, 16]

Нами была исследована экспрессия нового эндогенного ретровируса. При помощи RT-PCR на РНК из фибробластов трехнедельных эмбрионов и последующей гибридизации образующихся продуктов установлено, что провирус экспрессируется: на радиоавтографе видны два фрагмента ~600 и ~850 п. н. (данные не приведены).

Экспрессия характерна и для некоторых других эндогенных ретровирусов птиц [8]. Известно, что экспрессирующийся провирус может рекомбинировать с экзогенными ретровирусами, в результате чего появляются новые высоковирулентные формы ретровирусов, а также препятствовать проникновению экзогенных ретровирусов в клетку и быть причиной инсерционного мутагенеза [18].

В заключение необходимо отметить, что полные нуклеотидные последовательности многочисленных MLV-родственных ретровирусов остаются неизвестными. Эта группа эндогенных ретровирусов, по-видимому, прошла длительный путь эволюции с геномами наземных позвоночных, что не могло не сказаться на их структуре, поэтому необходимы дальнейшие исследования для понимания путей совместной эволюции ретровирусов и их хозяев.

L. G. Borisenko, A. V. Rynditch

New endogenous retrovirus from the chicken genome

Summary

Pro and pol genes of a novel HERV-I-related retrovirus have been sequenced from the chicken genome. This is the first discovery of not-ALV-related endogenous retrovirus in the genome of domestic chicken. This retrovirus is similar to the MLV-related retroviruses which are widespread within genomes of vertebrates. Nevertheless, the novel retrovirus is not clustered with the MLV-related exogenous spleen necrosis virus (SNV) infecting chicken. The chicken HERV-I-related retrovirus is shown to be expressed in embryo fibroblasts.

L. G. Borisenko, A. V. Rynditch

Новий ендогенний ретровірус з геному курки

Резюме

При проведенні полімеразної ланцюгової реакції з праймерами для консервативних ділянок ретровірусних генів протеази та зворотної транскриптази в геномі курки знайдено новий ендогенний ретровірус. Він гомологічний MLV-родинним ретровірусам, які зустрічаються в геномі багатьох хребетних, але не споріднений з екзогенними MLV-родинними ретровірусами, які інфікують курей. Це перше повідомлення щодо ендогенного ретровірусу курки, який не належить до роду ALV (вірус лейкозу птахів). Показано, що новий ретровірус експресується в ембріональних фібробластах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Herniou E., Martin J., Miller K., Cook J., Wilkinson M.,

Tristem M. Retroviral diversity and distribution in vertebrates // J. Virol.—1998.—72.—P. 5955—5966.
 2. Geryk J., Dezelee P., Barnier J., Svoboda J., Nehyba J., Karakoz I., Rynditch A., Yatsula B., Calothy G. Transduction of the cellular src gene and 3' adjacent sequences in avian sarcoma virus PR2257 // J. Virol.—1989.—63.—P. 481—492.
 3. Yatsula B., Geryk J., Briestanska J., Karakoz I., Svoboda J., Rynditch A., Calothy G., Dezelee P. Origin and evolution of the c-src-transducing avian sarcoma virus PR2257 // J. Gen. Virol.—1994.—75.—P. 2777—2781.
 4. Venugopal K. Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses // Res. Vet. Sci.—1999.—67.—P. 113—119.
 5. Robinson H., Astrin S., Senior A., Salazar F. Host susceptibility to endogenous viruses: defective glycoprotein-expressing proviruses interfere with infections // J. Virol.—1981.—40.—P. 745—751.
 6. Crittenden I., Fadley A., Smith E. Effects of endogenous leukosis virus genes on response to infection with avian leukosis and reticuloendotheliosis viruses // Avian Diseases.—1982.—26.—P. 279—294.
 7. Kuhnlein U., Fairfull R., Gowe R., Kulenkamp A., Mou L., Zadworny D. Synergism between the endogenous viral loci ev6 and ev9 in inducing immunological tolerance to avian leukosis virus // Br. Poult. Sci.—1993.—34.—P. 93—104.
 8. Борисенко Л., Риндич А. Эндогенные ретровирусы птиц: структура, экспрессия и эволюция // Биополимери і клітина.—2002.—18, № 1.—С. 37—47.
 9. Dimcheff D., Drovetski S., Krishnan M., Mindell D. Cospeciation and horizontal transmission of avian sarcoma and leukosis virus gag genes in galliform birds // J. Virol.—2000.—74.—P. 3984—3995.
 10. Martin J., Herniou E., Cook J., O'Neill R., Tristem M. Interclass transmission and phyletic host tracking in murine leukemia virus-related retroviruses // J. Virol.—1999.—73.—P. 2442—2449.
 11. Martin J., Herniou E., Cook J., O'Neill R., Tristem M. Human endogenous retrovirus type I-related viruses have an apparently widespread distribution within vertebrates // J. Virol.—1997.—71.—P. 437—443.
 12. Tristem M. Amplification of different retroelements by PCR // BioTechniques.—1996.—20.—P. 608—612.
 13. Felsenstein J. PHYLIP — Phylogeny Inference Package (version 3.2) // Cladistics.—1989.—N 5.—P. 164—166.
 14. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982.—545 p.
 15. Xiong Y., Eickbush T. H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences // EMBO J.—1990.—9, N 10.—P. 3353—3362.
 16. Haas N. B., Grabowski J. M., North J., Moran J. V., Kazazian H. H., Burch J. B. E. Subfamilies of CR1 non-LTR retrotransposons have different 5'UTR sequences but are otherwise conserved // Gene.—2001.—265.—P. 175—183.
 17. Chen P.-Y., Cui Z., Lee L.-F., Witter R. L. Serologic differences among nondefective reticuloendotheliosis viruses // Arch. Virol.—1987.—93.—P. 233—245.
 18. Coffin J. Endogenous viruses // RNA tumor viruses.—New York, 1984.—P. 1109—1203.

УДК 578.828

Надійшла до редакції 14.10.02