

Роль белка *pif1* оболочки вируса ядерного полиэдроза *Spodoptera littoralis* в процессе проникновения вируса в клетку

О. Ю. Ревякина, И. М. Кихно

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

i.m.kikhno@imbg.org.ua

Исследовали роль pif1 – белка оболочки вируса ядерного полиэдроза S. littoralis в процессе проникновения вируса в колончатую клетку кишечника насекомого. Показано, что делетирование pif1 из вирусного генома не блокирует процесс слияния вирусной и клеточной мембран, детектируемого методом восстановления флуоресценции октадецил-родамин-В-хлорида. С привлечением техники ОТ-ПЦР показано, что функцией pif1 является обслуживание одного или нескольких этапов жизненного цикла вируса, предшествующих проникновению вирусной ДНК в ядро, предположительно таких, как интернализация нуклеокапсида, его транспортировка, освобождение вирусной ДНК из капсида и ее внедрение в ядро.

Ключевые слова: проникновение вируса в клетку, бакуловир, pif1.

Введение. Несмотря на огромное разнообразие вирусов, способы проникновения их в клетку сходны. В частности, проникновение в клетку всех изученных оболочечных вирусов основано на слиянии вирусной и клеточной мембран [1]. Этот процесс обслуживается белками прикрепления и слияния, являющимися компонентами вирусной оболочки. Как известно, гомология между белками слияния разных вирусов отсутствует, при этом их структурные преобразования в процессе слияния мембран характеризуются общими чертами, что позволяет предположить общую консервативную модель процесса, описанию которой посвящено много обзоров последних лет [2].

Следует отметить, что большая часть данных по механизму слияния получена при изучении мелких РНК-содержащих вирусов, у которых наличие одного белка слияния является необходимым и доста-

точным для обеспечения всех этапов процесса. Крупные ДНК-содержащие оболочечные вирусы со сложной структурой имеют происхождение и эволюционную историю, отличные от мелких вирусов [3]. Из-за своей сложности процесс проникновения этих вирусов в клетку остается практически неизученным, хотя вовлеченность в слияние мембран целого комплекса вирусных белков позволяет сделать предположение о том, что механизм этого процесса может не совпадать с генеральной парадигмой.

Бакуловirusы, являясь патогенами насекомых, неинфекционны для млекопитающих, что делает их удобной моделью при изучении процесса проникновения в клетку крупных вирусов со сложной структурой. Бакуловirusы имеют более длительную эволюционную историю, чем вирусы теплокровных, в связи с этим интересно изучить способ их проникновения в клетки как наиболее ар-

хаичный. Помимо этого, некоторые специфические свойства бакуловирусов предполагают наличие особых способов их попадания в клетку. Уникальным свойством бакуловирусов является существование двух форм вирусных частиц, формирующихся на разных стадиях жизненного цикла и отличающихся по происхождению и составу мембран, тропизмом к разным клеткам и способом проникновения в эти клетки.

Так называемые BV (budded virus) частицы формируются на ранних этапах жизненного цикла вируса. BV проникают в клетку в результате эндоцитоза [4]. Оболочечному белку gp64, обеспечивающему прикрепление и слияние BV с мембраной эндосомы, присущи свойства стандартного белка слияния. Обслуживаемый им процесс характеризуется наличием общих черт с таковым, описанным для других вирусов [5], что позволяет предположить его соответствие общепринятой модели. Частицы BV отвечают за системное инфицирование всех органов и тканей насекомого.

PDV частицы формируются на заключительных стадиях инфекционного процесса. Их название (polyhedra derived virus) отражает включенность частиц в белковую капсулу – полиэдр. Нуклеокапсиды PDV ответственны за первичное инфицирование колончатых клеток кишечника, они внедряются в цитоплазму в результате прямого слияния оболочек вирусов и мембран микроворсинок этих клеток [6]. Механизм процесса неизвестен, белок слияния PDV не идентифицирован. Оболочка PDV наиболее изученного представителя бакуловирусов – вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) *Autographa californica* (*Ac*) включает около 44 белков, кодируемых вирусом [7]. Показано, что как минимум четыре из них являются абсолютно необходимыми в процессе внедрения нуклеокапсида в клетку – три так называемых фактора пероральной инфекционности – pif1 [8], pif2 [9], pif3 [10] и p74 [11]. Делетирование генов упомянутых белков ведет к утрате инфекционности PDV. Гены этих белков присутствуют в геномах абсолютно всех (более 30) секвенированных бакуловирусов, что предполагает консервативный механизм проникновения в клетку PDV. Установлено, что pif3 не участвует в процессах прикрепления и слияния, его роль остается не-

известной, тогда как pif1, pif2 и p74 являются белками, способствующими прикреплению [10, 12]. Авторами указанных работ показано, что эффективность прикрепления делеционных мутантов по этим генам в три раза снижена в сравнении с вирусом дикого типа. При этом прикрепившийся вирус проявляет способность к слиянию с мембранами клеток микроворсинки, детектируемому методом восстановления флуоресценции октадецил-родамин-В-хлорида (R18), что, по мнению авторов, позволяет исключить возможность непосредственного вовлечения этих белков в процесс слияния. При этом остается непонятным, почему прикрепление и слияние одной трети вирусных частиц не ведет к продуктивной инфекции.

Настоящая работа посвящена дальнейшему функциональному изучению одного из факторов инфекционности ВЯП *Spodoptera littoralis* (*Spli*), а именно – pif1. В экспериментах *in vitro* исследована способность к слиянию делеционного мутанта по данному гену, а также при помощи техники ПЦР сделана попытка приблизиться к ответу на вопрос – какой из этапов вирусного цикла блокирован отсутствием продукта этого гена?

Материалы и методы. *Вирус и насекомые.* В экспериментах использован ВЯП *Spli* дикого типа штамма M2 и полученный ранее на основе этого штамма бляшечный изолят *Spli* 4 с делецией по гену *pif1* [8]. В экспериментах использовали личинок *Spli* разных возрастов, выращенных в условиях инсектария при искусственном вскармливании. Личинок заражали, скармливая им суспензию полиэдров или очищенных PDV с добавлением 10 % сахарозы.

Очистка полиэдров и PDV частиц. Полиэдры и PDV частицы очищали в соответствии с процедурой, описанной Браунагелем и соавт. [13]. 40 г личинок, погибших от ядерного полиэдроза, гомогенизировали в 100 мл раствора 0,1 % SDS, гомогенат фильтровали через несколько слоев марли. Полиэдры осаждали центрифугированием фильтрата при 6000 об/мин в течение 10 мин. Осадок суспендировали в растворе 0,15 M NaCl и центрифугировали в том же режиме. Ресуспендировали осадок в воде и наслаивали на ступенчатый (50–60 %, по массе) градиент концентрации сахарозы. После центрифугирования на протяжении 1 ч при

25000 об/мин отбирали полиэдры, сконцентрированные на границе раздела фаз. Суспензию разбавляли водой в несколько раз и полиэдры осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в малом объеме воды, доводя концентрацию до $5 \cdot 10^9$ полиэдров в 1 мл.

PDV освобождали из полиэдров, прибавляя к 900 мкл суспензии 300 мкл $0,2 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$ и инкубируя суспензию в течение 15 мин при комнатной температуре. Нейтрализовали суспензию добавлением $0,1 \text{ M}$ трис-НСl, pH 7,4. От нерастворенных полиэдров избавлялись центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин в центрифуге Eppendorf. Супернатант наслаивали на ступенчатый градиент (20–60 %) концентрации сахарозы. После центрифугирования в течение 1 ч при 90000 g отбирали полосу на границе раздела фаз, содержащую PDV частицы. Суспензию PDV разбавляли в 3–4 раза водой и вирусные частицы осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 90000 g. Осадок осторожно ресуспендировали в охлажденном буфере PBS (137 mM NaCl , $2,7 \text{ mM KCl}$, $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1 \text{ mM KH}_2\text{O}_4$, pH 7,4).

Количество PDV подсчитывали, руководствуясь критерием Волкман [14], согласно которому 1 мкг вирусных белков соответствует $1,8 \cdot 10^9$ PDV частиц. Концентрацию белков PDV определяли при помощи BSA assay kit («Pierce», США) по инструкции производителя.

Флуоресцентное мечение PDV частиц. Флуоресцентную метку R18 вводили в вирусную оболочку по описанному методу [15]. 7 мкл спиртового раствора R18 (1 мкг/мл) добавляли к 500 мкл суспензии PDV, содержащей 1 мг/мл вирусных белков. Препарат инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч, разбавляли в 3 раза буфером PBS и центрифугировали в центрифуге Eppendorf при максимальной скорости в течение 30 мин при температуре 4°C . PDV дважды отмывали в трех объемах PBS, осадок меченых PDV ресуспендировали в 500 мкл PBS.

Получение препаратов мембранных везикул из клеток кишечника. Средние отделы кишечника семидневных личинок были изъяты при помощи микрохирургических инструментов и лупы и под-

вергнуты обработке согласно методу [16]. 500 мг препарата ткани кишечника гомогенизировали на льду в 200 мкл буфера А (300 mM маннитол, 5 mM ЭДТА, 17 mM трис-НСl, pH 7,5) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз («Promega», США) в пробирке Eppendorf при помощи вначале пестика, а затем – набора иголок разного диаметра (от 23 до 26 G). Далее прибавляли 4,5 мл буфера А с ингибиторами протеаз и 4,5 мл 24 mM MgCl_2 и инкубировали гомогенат на льду в течение 15 мин. Центрифугировали гомогенат при 5000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4°C . Супернатант отбирали и центрифугировали при 19000 об/мин в течение 30 мин при температуре 4°C . Осадок ресуспендировали в том же объеме буфера А и MgCl_2 и повторяли процедуру высокоскоростного центрифугирования. Полученный осадок мембранных везикул ресуспендировали в малом объеме PBS буфера.

Мониторинг слияния мембран. Слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной регистрировали, как описано для ВЯП Ac [17], по методу, основанному на восстановлении флуоресценции R18, встроенного в вирусную оболочку в концентрации, вызывающей самогашение флуоресценции [18]. 10 мкл суспензии мембранных везикул (1 мг/мл) смешивали с различными количествами M2 или 4 PDV (от $1 \cdot 10^9$ до $1 \cdot 10^{10}$), объемы образцов доводили до 200 мкл буфером PBS. Образцы инкубировали в темноте при температуре 27°C в течение 4 ч с покачиванием. Затем объем каждого образца доводили до 1 мл буфером PBS и интенсивность флуоресценции измеряли при помощи спектрофлуориметра Cary eclipse («Varian», США) при длине волны возбуждения 560 нм и длине волны эмиссии 590 нм. Интенсивность флуоресценции каждого образца измеряли повторно после добавления тритона X-100 до конечной концентрации 1 %. Процент восстановления флуоресценции подсчитывали по стандартной формуле:

$$\% \text{ восстановления} = 100 (F_s - F_0) / (F_t - F_0),$$

где F_s – интенсивность флуоресценции образца; F_0 – интенсивность флуоресценции меченых PDV; F_t – интенсивность флуоресценции образца после добавления тритона X-100.

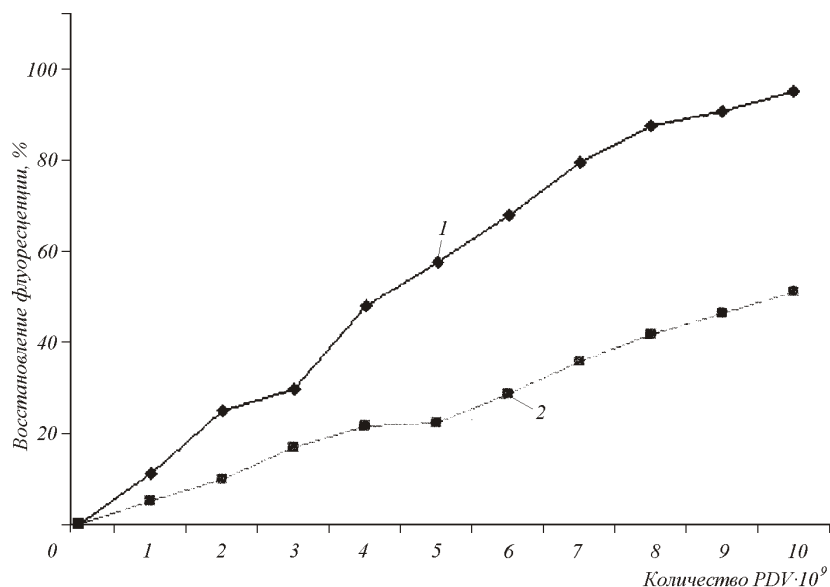


Рис. 1. Зависимость процента восстановления флуоресценции от количества PDV частиц: 1 – M2 PDV; 2 – 4 PDV. Возрастающие количества меченых R18 PDV M2 или PDV 4 смешивали с 10 мкг мембранных везикул и инкубировали в течение 4 ч при температуре 27 °С

Выделение РНК из клеток кишечника. Источником РНК служили ткани средних отделов кишечника, изъятые из зараженных личинок. РНК выделяли при помощи RNA easy Protect mini kit («Qiagen», США) согласно инструкции производителя.

*Аmplификация участка гена *egt* при помощи ОТ-ПЦР.* Для получения кДНКовых копий генов при помощи обратной транскриптазы использовали препараты РНК, выделенные из кишечника инфицированных насекомых. В реакции ПЦР использовали праймеры, гомологичные N-концевой области гена *egt* ВЯП *Spli*: прямой – TCACAGTCTGGTGGT и обратный – CGCTGAGACCTTTGA. Реакции обратной транскрипции и амплификации проводили, используя компоненты One Step RT-PCR kit («Qiagen») в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты и обсуждение. *Исследование кинетики слияния оболочек PDV вирусов *Spli* M2 и 4 с мембранами клеток кишечника.* Метод восстановления флуоресценции R18 широко используют при исследовании слияния мембран. Он основан на том, что встраивание в билипидный слой молекул флюорохрома R18 в определенной концентрации приводит к эффекту так называемого самогашения флуоресценции, вызванного взаимодействием близкорасположенных молекул. Слияние меченых мембран с немечеными вызывает перераспределение R18 между донорной и реципиентной мембра-

нами. Результатом этого является «разбавление» метки, снижение ее концентрации, что сопровождается восстановлением флуоресценции.

Восстановление флуоресценции, регистрируемое при помощи спектрофлуориметра, использовано нами для исследования кинетики слияния меченых PDV частиц с мембранными везикулами, выделенными из препаратов среднего кишечника насекомых.

Различные количества вирусных частиц, меченых R18, инкубировали в смеси с 10 мкг мембранных везикул в течение 4 ч при температуре 27 °С. Возрастание количества PDV M2 от $1 \cdot 10^9$ до $8 \cdot 10^9$ сопровождается пропорциональным повышением процента слияния мембран, детектируемого как увеличение восстановления флуоресценции от 11 до 88 % соответственно (рис. 1). Дальнейшее увеличение количества PDV до $1 \cdot 10^{10}$ приводит к незначительному платообразному возрастанию процента восстановления флуоресценции до 95 %, что является свидетельством насыщения. Подобная тенденция повышения уровня восстановления флуоресценции с увеличением количества вирусных частиц наблюдается и для PDV 4, что подтверждает факт слияния оболочки делеционного мутанта с мембранными везикулами. При этом приблизительно в 2,5 раза больше вирусных частиц по сравнению с вирусом дикого типа необходимо было для достижения одного и того же уровня восста-

новления флуоресценции. Как упоминалось выше, исследование гена *pif1*, проведенное на моделях ВЯП *Spli* и ВЯП *Ac*, продемонстрировало, что фенотипическое проявление этих генов одинаково у обоих вирусов – их делетирование ведет к утрате инфекционности PDV [8, 10].

В настоящей работе показано, что делеция этого гена не препятствует слиянию оболочки ВЯП *Spli* с клеточной мембраной, что также находится в соответствии с данными, полученными для ВЯП *Ac* [10]. Авторами упомянутой работы показано, что процент восстановления флуоресценции в процессе слияния делеционного мутанта ВЯП *Ac* с мембранами клеток редуцирован в три раза по сравнению с вирусом дикого типа. Это объясняется тем, что в три раза меньше мутантных вирусных частиц прикрепилось к микроворсинкам. Мы не изучали эффективности прикрепления *Spli* к мембранам, как это сделано для ВЯП *Ac*, однако можно предположить, что снижение эффективности слияния 4 PDV в 2,4 раза по сравнению с M2 также является результатом уменьшения эффективности прикрепления этого вируса. Таким образом, *pif1* ВЯП *Spli* можно считать функциональным аналогом *pif1* ВЯП *Ac*, а именно – фактором прикрепления. Косвенным подтверждением этому служит также абсолютная консервативность четырех факторов проникновения PDV в клетку, подразумевающая единый механизм проникновения, поскольку общий механизм требует соответственно консервативности функций его исполнителей.

Исследование наличия в ядрах инфицированных клеток кишечника ДНК PDV. Поскольку делеционные мутанты, хотя и с меньшей эффективностью, но все же прикрепляются к мембранам клеток и сливаются с ними, причем инфекционный процесс оказывается заблокированным, следует допустить, что наряду с функцией прикрепления *pif1* участвует также в запуске других процессов жизненного цикла вируса. Теоретически можно предположить, что функцией *pif1* является обслуживание какого-либо из этапов инфицирования, следующего за слиянием мембран, а именно: внедрения нуклеокапсида в цитоплазму микроворсинки, транспорта его к ядру, преодоления вирусной ДНК барьера ядерной мембраны, репликации ДНК, транскрип-

ции и трансляции вирусных генов, формирования нуклеокапсидов, выхода нуклеокапсидов из клетки. Участие *pif1* в дальнейших событиях представляется маловероятным, поскольку BV частицы с делетированным геном *pif1*, будучи инъецированными насекомым, вызывают нормальный инфекционный процесс [8].

Общеизвестным является факт, что промоторы ранних бакуловирусных генов узнаются ферментными системами клеток-хозяев, и транскрипция этих генов осуществляется хозяйской ДНК-полимеразой. Ранние промоторы функционируют после трансфекции в клетки насекомых и не требуют продуктов вирусных генов для поддержания своей активности [19, 20]. Опираясь на приведенные данные об особенностях ранних бакуловирусных промоторов, мы предположили, что отсутствие транскриптов бакуловирусных ранних генов в ядре клеток кишечника может служить доказательством отсутствия в ядре вирусной ДНК.

Для проверки наличия вирусной ДНК в ядре зараженных клеток был проведен следующий эксперимент. Шестидневных личинок *Spli* заражали вскармливанием им высококонцентрированной суспензии полиэдров PDV M2 или 4 ($3 \cdot 10^9$ полиэдров в 1 мл). Через 7 ч после инфицирования насекомых декапитировали, средние отделы кишечника изымали и освобождали от содержимого. Из средних отделов кишечника выделяли тотальную РНК. При помощи обратной транскриптазы на основе этих препаратов получен пул кДНКовых копий матричных РНК. Реакцию амплификации на основе праймеров, гомологичных N-концевой области раннего гена *egt*, использовали для доказательства наличия или отсутствия кДНКовой копии этого гена в исследуемых образцах. Положительный результат зарегистрирован в реакции амплификации с использованием в качестве матрицы препарата кДНК насекомых, инфицированных вирусом M2 (рис. 2). Неоднократное проведение реакции ПЦР на основе препаратов кДНК насекомых, инфицированных вирусом 4, продемонстрировало отсутствие в них гена вирусной РНК-полимеразы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ДНК вируса с делетированным геном *pif1* не достигает ядра. Следовательно, можно сде-

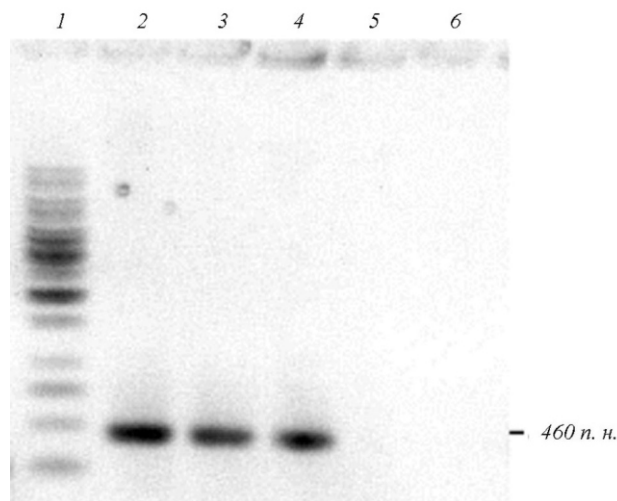


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов амплификации кДНКовых копий РНК, выделенной из клеток кишечника зараженных насекомых: 1 – маркер 1 kb («Fermentas»); 2 – позитивный контроль (амплификация очищенной ДНК ВЯП M2); 3, 4 – насекомые, зараженные PDV M2; 5, 6 – насекомые, зараженные PDV 4

лать вывод, что функция *pif1* состоит в обслуживании этапов инфицирования, предшествующих проникновению вирусной ДНК в ядро, предположительно таких, как внедрение нуклеокапсида в цитоплазму микроворсинки, его транспорт к ядру или внедрение ДНК вируса в ядро.

Поскольку *pif1* является оболочечным белком, а не компонентом нуклеокапсида, трудно допустить его непосредственное участие в транспорте или освобождении ДНК. В этом случае правомерна гипотеза о том, что *pif1*, соединяясь со специфическими рецепторами, может запускать сигнальные пути клетки, обеспечивающие выполнение данных функций [10]. В подтверждение этой гипотезы Окхава и соавт. приводят тот факт, что последовательность аминокислот *pif1* ВЯП *Ac* содержит RGD-мотив, присущий белкам-лигандам интегринов (именно интегрины являются трансдукторами внеклеточных сигналов). Не ставя под сомнение принципиальную возможность проведения в клетку сигнала посредством *pif1*, мы хотим при этом подчеркнуть, что наличие мотива в последовательности аминокислот является необходимым, но недостаточным фактором, чтобы судить о том, действительно ли этот мотив функционален. Допол-

нительным подтверждением функциональной значимости мотива может быть его консервативность у белков-гомологов. В банке генов к настоящему времени представлены последовательности белков *pif1* более чем 30 бакуловирусов. Проведенный нами анализ аминокислотной последовательности этих белков выявил отсутствие консервативного RGD-мотива. Аминокислотная последовательность *pif1* ВЯП *Spli* вообще не содержит такого мотива, что ставит под сомнение его функциональную значимость и у ВЯП *Ac*. Продолжая дискуссию с Окхава и соавт., хотим подчеркнуть преждевременность исключения функции слияния из списка возможных функций *pif1*. Нам представляется вероятным предположение о том, что *pif1* может быть непосредственным исполнителем процесса слияния мембран. Современная парадигма слияния, применяемая как для искусственных билипидных слоев, так и для белок-содержащих биологических мембран, предполагает наличие нескольких стадий этого процесса [21]. Одной из важных стадий процесса является состояние полуслияния, характеризующееся тем, что объединяются внешние слои билипидного комплекса, в то время как внутренние остаются интактными. Следующее за этим состоянием объединение внутренних слоев приводит к полному слиянию, в результате чего формируется пора и смешивается водное содержимое двух компартментов, до этого момента разделенных мембранами. Важно подчеркнуть, что восстановление флуоресценции R18 позволяет детектировать перераспределение флуорохрома между липидами донорной и реципиентной мембран, но при этом невозможно определить, полное или неполное слияние мембран отражает данный процесс. Чтобы различить эти стадии обычно наряду с изучением распределения жирорастворимых компонентов мембран используют анализ распределения их водорастворимых составляющих [22]. Для большинства изученных вирусов наличие одного белка слияния является достаточным для обслуживания всех стадий процесса, поэтому в рамках существующей модели *pif1* не может рассматриваться как кандидат на роль белка слияния. Однако последние данные, полученные при исследовании герпесвирусов, заставляют предположить, что у сложных ДНК-содержа-

щих вирусов механика слияния может быть отличной от описанной.

У герпесвирусов слияние обеспечивается комплексом из четырех консервативных белков – gD, gH, gL, gB, действующих последовательно: gD является прикрепительным белком, комплекс gHL обеспечивает полуслияние, а gB завершает процесс слияния, в результате которого образуется пора [23]. По аналогии с герпесвирусами вполне правомерно предположить, что именно неполное слияние может служить барьером для проникновения нуклеокапсида в клетку, а pif1, вероятно, оказывается исполнителем (или одним из исполнителей) процесса полного слияния. Следует отметить, что хотя процесс слияния герпесвирусов проходит по более сложной схеме, белки комплекса имеют характеристики, общие абсолютно для всех белков слияния. Одной из таких характеристик является наличие гликозилирования. В отличие от всех известных белков слияния pif1 не гликозилирован [8], что будто бы ставит под сомнение его функцию как белка слияния. Однако существуют свидетельства того, что гликопротеины не вовлечены в процесс слияния PDV.

Известно, что обработка туникамицином инфицированных клеток обычно ведет к отсутствию или значительному снижению инфекционности вируса, полученного из этих клеток, поскольку туникамицин нарушает процесс гликозилирования белков слияния. Тогда как это оправданно для BV [24], обработка туникамицином не влияет на инфекционность PDV [25]. Кроме того, некоторые детали процесса слияния PDV отличают его от такового, описанного для других вирусов. У всех изученных вирусов непосредственное эндоцитозом слияние вирусной и клеточной мембран является независимым от рН. Эффективность же слияния PDV возрастает с ростом рН, достигая максимума при значениях 9–11 [17]. Снижение температуры до 4 °C является общеприменяемым методом для блокирования процесса слияния, однако такая температура перmissive для слияния PDV с мембранами микроворсинок [17].

Вышеизложенное позволяет предположить, что на пути изучения проникновения в клетку PDV будут открыты до сих пор неизвестные механизмы

этого процесса, обслуживаемые комплексом белков слияния нового типа.

Дальнейшее исследование инфекционного процесса PDV с привлечением средств электронной микроскопии, а также мониторинг степени слияния мембран при помощи водорастворимых красителей, позволит подтвердить или опровергнуть гипотезу о том, что именно pif1 является белком слияния нового типа.

O. Yu. Reviakina, I. M. Kikhno

A role of Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus envelope protein pif 1 in the process of primary infection of insect midgut

Summary

A role of the envelope protein pif 1 of Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus in the process of viral penetration into the midgut columnar cell of the insect has been investigated. It has been shown that pif1 deletion from viral genome does not block viral and cell membrane fusion detected by octadecyl-rhodamin-B-chloride fluorescence dequenching assays. The use of RT PCR techniques allowed to demonstrate that pif1 was predicted to be an executor of some step(s) of viral life cycle upstream of viral DNA entry into the nucleus, presumably such as nucleocapsid internalization, nucleocapsid transport, viral DNA release from capsid and its penetration into the nucleus.

Keywords: virus entry into the cell, baculovirus, pif1.

O. Ю. Ревякина, I. М. Кіхно

Роль білка pif1 оболонки вірусу ядерного поліедрозу Spodoptera littoralis у процесі первинного інфікування клітин кишечника комах

Резюме

Досліджували роль pif1 – білка оболонки вірусу ядерного поліедрозу S. littoralis у процесі проникнення вірусу в колончасту клітину кишечника комах. Показано, що делетування pif1 з вірусного геному не блокує процесу злиття вірусної і клітинної мембран, що детектується за допомогою методу відновлення флуоресценції октадецил-родамін-В-хлориду. Із застосуванням техніки ЗТ-ПЛР показано, що функцією pif1 є обслуговування одного або кількох етапів життєвого циклу вірусу, які передують проникненню вірусної ДНК в ядро, прогнозовано таких, як інтерналізація нуклеокапсиду, його транспорт, вивільнення вірусної ДНК з капсиду і її входження у ядро.

Ключові слова: проникнення вірусу в клітину, бакуловірус, pif1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hernandez L. D., Hoffman L. R., Wolfsberg T. G., White J. M. Virus-cell and cell-cell fusion // Ann. Rev. Cell Develop. Biol.–1996.–12.–P. 627–661.*
- Earp L. J., Delos S. E., Park H. E., White J. M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins // Curr. Top. Microbiol. and Immunol.–2005.–285.–P. 25–66.*

3. Shackelton L. A., Holmes E. The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts // *TRENDS Microbiol.*—2004.—**12**.—P. 458–465.
4. Blissard G. W., Wenz J. R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion // *J. Virol.*—1992.—**66**.—P. 6829–6835.
5. Marcovic I., Pulyaeva H., Sokoloff A., Chernomordic L. V. Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates // *J. Cell Biol.*—1998.—**143**.—P. 1155–1156.
6. Granados R. R., Lawler K. A. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection // *Virology*.—1981.—**108**.—P. 297–308.
7. Braunagel S. C., Russell W. K., Rosas-Acosta G., Russell D. H., Summers M. D. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2003.—**100**.—P. 9797–9802.
8. Kikhno I., Gutierrez S., Croizier L., Croizier G., Ferber L. M. Characterization of *pif*, a gene required for *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus // *J. Gen. Virol.*—2002.—**83**.—P. 3013–3022.
9. Pijlman G. P., Pruijssers A. J. P., Vlak J. M. Identification of *pif-2*, a third conserved baculovirus gene required for *per os* infection of insects // *J. Gen. Virol.*—2003.—**84**.—P. 2041–2049.
10. Ohkawa T., Washburn J. O., Sitapara R., Sid E., Volkman L. E. Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of *pif* genes *Ac119* and *Ac022* but not by *Ac115* // *J. Virol.*—2005.—**79**.—P. 15258–15264.
11. Kuzio J., Jacques R., Faulkner P. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies // *Virology*.—1989.—**173**.—P. 759–763.
12. Haas-Stapleton E. J., Washburn J. O., Volkman L. E. P74 mediated specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae // *J. Virol.*—2004.—**78**.—P. 6786–6791.
13. Braunagel S. C., Summers M. D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles // *Virology*.—1994.—**202**.—P. 315–328.
14. Volkman L. E., Summers M. D., Hsieh C. H. Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: comparative neutralization comparative infectivity, and *in vitro* growth studies // *J. Virol.*—1976.—**1**.—P. 820–832.
15. Boyyad A., Menezes J. Comparative study of herpes simplex virus receptor expression on human lymphoid cells // *Virology*.—1990.—**179**.—P. 905–910.
16. Wolfersberger M., Luethy P., Parenti P., Sacci F. V., Giordana B., Hanoret G. M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larvae midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*) // *Comp. Biochem. and Physiol.*—1987.—**86**.—P. 301–308.
17. Horton H. M., Burand J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus of insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion // *J. Virol.*—1993.—**67**.—P. 1860–1868.
18. Srinivasakumar N., Ogra P. L., Flanagan T. D. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay // *J. Virol.*—1991.—**65**.—P. 4063–4069.
19. O'Reilly D. R., Miller L. K. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP glucosyltransferase gene // *J. Virol.*—1990.—**64**.—P. 1321–1328.
20. Kogan P. H., Blissard G. W. A baculovirus gp64 early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements // *J. Virol.*—1994.—**68**.—P. 813–822.
21. Chernomordic L. V., Zimmerberg J., Kozlov M. M. Membranes of the world unite! // *J. Cell Biol.*—2006.—**175**.—P. 201–207.
22. Melikyan G. B., White J. M., Cohen F. GPI-anchored influenza hemagglutinin induced hemifusion of both red blood cell and planar bilayer membranes // *J. Cell Biol.*—1995.—**131**.—P. 679–691.
23. Subramanian R. P., Geraghty R. J. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoprotein D, H, L, and B // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2007.—**104**.—P. 2903–2908.
24. Charlton C. A., Volkman L. E. Effect of tunicamycin on the structural proteins and infectivity of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *Virology*.—1986.—**154**.—P. 214–218.
25. Kelly D. C., Lescott T. Baculovirus replication: glycosylation of polypeptides synthesized in *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus-infected cells and the effect of tunicamycin // *J. Gen. Virol.*—1983.—**64**.—P. 1915–1926.

УДК 578.841:578.23.3
Надійшла до редакції 06.04.07