

Структурно-функціональна організація геномів бакуловірусів

Л. І. Строковська, І. М. Кіхно, Р. А. Мелешко

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Бул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Baculoviridae — родина різномірних патогенних вірусів, що інфікують комах і характеризуються складним реплікаційним циклом, який завершується включенням віріонів у кристалічний білковий матрикс. Бакуловірусні гени експресуються за типом транскрипційного каскаду, в якому кожний наступний етап залежить від експресії генів на попередньому етапі. Даний огляд узагальнює сучасні уявлення як про згаданий унікальний механізм генної експресії, так і про механізми бакуловірусної реплікації, пов'язаної з ним. Описуються нуклеотидні послідовності та гени, що беруть участь у цих процесах.

Бакуловірусні інфекції виявлено більш ніж у 600 видів комах, до яких відносяться представники *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera* і *Coleoptera* [1]. Спустошення, яке бакуловіруси можуть спричиняти в природній популяції комах, робить їх незамінними як біоінсектициди. Впродовж багатьох років основна зацікавленість, проявлена до бакуловірусів, стосувалася саме цього напрямку. В останнє десятиріччя, у зв'язку з розвитком бакуловірусної експресійної векторної системи, почалося суперінтенсивне дослідження цих вірусів. Бакуловіруси мають великий двоспиральний кільцевий ковалентно замкнений ДНК-геном розміром від 88 до 160 тисяч пар нуклеотидів (тис. п. н.). Розмір вірусного геному визначає довжину нуклеокапсиду, яка може складати від 200 до 400 мкм. Товщина залишається постійною — біля 36 мкм [2]. Нуклеокапсиди упаковані всередині ліпопротеїнової оболонки, утворюючи віріон. Ці структури можуть входити до складу поліедрів або гранул (тілця включення), які формуються в ядрах інфікованих клітин [3]. Поліедри складаються, в основному, з одного білка — поліедрину. За розміром вони коливаються від 1 до 15 мкм у діаметрі, мають зовнішню ліпосахаридну мембрану [4, 5].

Варіації в кількості нуклеокапсидів усередині кожного віріону і кількості віріонів усередині тілця включення стали основою для класифікації

бакуловірусів. У залежності від тілця включення бакуловіруси поділяються на три субгрупи. Субгрупа А — віруси ядерного поліедрозу (NPV): у поліедр включено декілька віріонів — нуклеокапсид у мембрані. Відповідно до особливостей ізоляту кожний віріон може включати в мембрану один (S) чи багато (M) нуклеокапсидів. Субгрупа В — віруси гранульозу (GV): мають віріони, які містять у мембрані лише один нуклеокапсид. Єдиний віріон оточується білком грануліном і утворюється гранула. Субгрупа С — невключені віруси (NOV): віруси, що не утворюють тілця включення. Бакуловіруси звичайно називають за ім'ям хазяїна, з якого їх одержано.

Найдокладніше на молекулярному рівні вивчено NPV *Autographa californica* (AcMNPV). Для геному цього вірусу вперше визначено повну нуклеотидну послідовність [6] (геном складається з 133844 п. н. і містить 41 % G + C). Це дозволило виявити генну організацію і передбачити кодуючий потенціал геному. Ідентифіковано 154 відкриті рамки зчитування (ORFs), які мають ініціюючий метіоніновий кодон і не мають протяжних послідовностей, що перекриваються, тобто поодиноких екзонів. Ці ORFs потенційно можуть кодувати білки, які містять понад 50 амінокислотних залишків. Кодуючі послідовності розташовуються на обох нитках ДНК і мають різну орієнтацію. ORFs звичайно дуже щільно розміщуються на геномі: регуляторні області мають мінімальний розмір.

Схожу будову має і геном NPV *Orgia pseudotsugata* (OrMNPV), для якого нещодавно теж було визначено повну нуклеотидну послідовність [7]. Геном цього вірусу складається з 131990 п. н. і містить 55 % G + C. Ідентифіковано 152 ORFs, з яких 126 мають гомологів в AcMNPV, що складає приблизно 80 % геному. Ідентичність за амінокислотним складом між гомологічними ORFs становить у середньому 56 %.

В залежності від часу експресії протягом розвитку інфекції бакуловірусні гени поділяються на ранні і пізні [8]. Враховуючи функціональне навантаження їх можна поділити на регуляторні, структурні і несуттєві гени [9]. До регуляторних відносяться ранні гени, їхня функція полягає в регуляції реплікації вірусної ДНК і регуляції експресії інших генів. Структурні гени кодують білки віріонів і полієдрів. Організацію і властивості регуляторних і структурних генів буде розглянуто далі. Несуттєвими є такі гени, мутації в яких не впливають на здатність вірусу реплікуватися як у культурі клітин, так і в комах. Можливо, що несуттєві гени необхідні для росту або виживання вірусу за певних специфічних умов.

Дослідження функціональної організації ORFs показало, що практично немає кластерів генів, які були б зв'язані функціонально або в часі. Також було показано, що гени, які транскрибуються в пізній фазі, часто перемішані з генами, транскрипція яких відбувається в ранній чи дуже пізній час. Зроблено припущення, що така організація геному може відігравати регуляторну роль в експресії генів [10].

Однією з особливостей геному бакуловірусів є присутність гомологічних областей (hg) [11, 12]. Ці області (розміром від 0,2 до 1,0 тис. п. н.) складаються з повторюваних послідовностей, які вміщують недосконалий паліндром з 30 п. н. У центрі кожного паліндрому розташований *EcoRI*-сайт. З обох боків паліндрому оточений прямими повторами розміром 20 п. н. Тобто hg складаються з висококонсервативних послідовностей розміром 70 п. н., кількість яких для різних hg відмінна. В геномі AcMNPV виявлено вісім hg-послідовностей.

Області hg функціонують як *cis*-діючі енхансери транскрипції деяких ранніх генів — *39K*, *ie-n*, *p35* і гелікази [13, 14]. Показано, що ці послідовності можуть бути важливими в ініціації реплікації ДНК в інфікованих клітинах [15, 16].

Як і у випадку з багатьма іншими еукаріотичними ДНК-вірусами, в бакуловірусних системах спостерігається високорегульована і впорядкована експресія бакуловірусних генів впродовж інфекційного циклу.

Бакуловірусні гени експресуються в транскрипційному каскаді, де кожна наступна фаза залежить від експресії генів протягом попередньої фази. Бакуловірусні гени можна розділити на дві генеральні категорії — ранні і пізні гени. Ранні гени транскрибуються хазяйською РНК-полімеразою II [17]; пізні гени транскрибуються вірусспецифічною РНК-полімеразою [18]. Ранні гени поділяються на безпосередньо ранні і затримано ранні, а пізні — на пізні і дуже пізні. Промотори ранніх генів характеризуються наявністю консервативної послідовності CAGT, у межах якої відбувається ініціація транскрипції [19]. У переважній більшості пізніх і дуже пізніх генів транскрипція ініціюється в межах консервативної ділянки з 12 нуклеотидів, у центрі якої розміщена ТААГ послідовність [3, 20]. Промотори дуже пізніх генів відрізняються від промоторів пізніх генів наявністю додаткових промоторних елементів, які мають назву «вибухових» послідовностей і розміщені в лідерній ділянці промоторів від ТААГ до кодона АТГ [21]. Більшість генів транскрибується протягом однієї фази, але транскрипція деяких генів відбувається впродовж двох або трьох фаз.

Численні дослідження показали, що продукти ранніх бакуловірусних генів беруть участь у регуляції реплікації вірусної ДНК і регуляції транскрипції пізніх і дуже пізніх генів. Пізні і дуже пізні гени кодують структурні білки, що беруть участь у процесі вірусного морфогенезу і утворенні полієдрів. Активація пізніх і дуже пізніх генів залежить від експресії ранніх вірусних генів і від реплікації вірусної ДНК. Бакуловіруси мають унікальний і складний транскрипційний механізм, за допомогою якого експресується багато РНК, що перетинаються, із спільними 5'- або 3'-кінцями. Виходячи з аналізу декількох транскрипційних одиниць було припущено, що регуляція експресії генів у часі може відбуватися через деактивацію ранніх нижчезрештованих промоторів і наступну активацію вищезрештованих пізніх промоторів [22].

Безпосередньо ранні гени, до яких відносяться гени *ie-1* і *ie-2*, транскрибуються за повної відсутності експресії вірусного геному, тобто ці гени трансактивуються хазяйськими факторами і не потребують синтезованих *de novo* продуктів інших вірусних генів. В останні роки переконливо доведено, що гени *ie-1* і *ie-2* відіграють дуже важливу роль у розвитку інфекції. Виявлено, що саме ці гени є трансактиваторами багатьох затримано ранніх генів, експресія яких необхідна для процесу реплікації вірусної ДНК і експресії пізніх і дуже пізніх генів [23, 24].

Продуктом гена *ie-1* є мультифункціональний

білок IE-1 (67 кДа), який було виділено і охарактеризовано [25, 26]. При інфікуванні вірусом дико-го типу IE-1 синтезується дуже рано і зберігається до пізньої фази. Одна з декількох електрофоретичних форм IE-1 пов'язана з BV віріонами і це підтверджує раніше висловлене припущення щодо проникнення IE-1 до клітин разом з віріонами. Трансрегуляторний білок IE-1 містить N-кінцевий домен, необхідний для трансактивації вірусних промоторів, і C-кінцевий домен, який є суттєвим для утворення ДНК-білкового комплексу [27].

Для гена *ie-2* в досліджах з транз'єнтної експресії встановлено, що цей ген трансактивує вірусні промотори, прямо чи опосередковано стимулює реплікацію ДНК і затримує клітинний цикл [28, 29]. Припускається, що продукт цього гена — білок IE-2 (42 кДа) — бере участь в активації гена *ie-1* у тих випадках, коли кількість білка IE-1 обмежена [23].

Аналіз результатів досліджень останніх років свідчить про те, що майже всі ранні гени експресують декілька РНК-транскриптів, які ініціюються з різних регуляторних ділянок промоторів. Деякі з цих транскриптів виявляються лише в ранній фазі інфекції, інші зберігаються на постійному рівні до пізньої фази. Можливо, саме ця властивість разом з наявністю послідовностей, що перекриваються, є основним фактором, який забезпечує раннім генам регуляторну роль у процесах реплікації ДНК і експресії пізніх і дуже пізніх генів.

Нещодавно в кількох лабораторіях здійснено експерименти, результати яких призвели до значного прогресу в розумінні факторів, які беруть участь в реплікації бакуловірусної ДНК. Це стосується ідентифікації припустимих ділянок ініціації реплікації ДНК (*origins, ori*) і виявлення бакуловірусних генів, за наявності яких відбувається реплікація ДНК.

Для ідентифікації потенційних *ori* реплікації використано дві різні стратегії. Перша полягала в генерації дефектних віріонів, які мали мажорні геномні делеції, але в яких залишалися послідовності, необхідні для реплікації ДНК. Друга стратегія стосувалася пошуку клонуваних послідовностей вірусного геному, які підтримували реплікацію плазмідної ДНК, введеної в інфіковані клітини комах.

У кількох лабораторіях виявлено, що серійні пасажи АсМNPV при високій множинності вірусу в культурі продукували віріони зі зміненим геномом [15, 30—32]. У таких мутантах знайдено вставки хазяйської ДНК або невеликі делеції в ділянках геному, які не впливали на репродукцію вірусу в культурі. Але віріони з мажорними геномними

делеціями також утворювалися після серійних пажів. Такі віріони не здатні реплікуватися самостійно, тому їх неможливо отримати за допомогою методу бляшок. Виявлено, що в геномах таких дефектних віріонів залишалися тільки *cis*-діючі послідовності, які були необхідні для реплікації дефектних геномів і мали характеристики реплікативних *ori* [32, 34]. *Trans*-діючі фактори вносилися інтактним вірусом-помічником. Докладне дослідження структури вірусного геному після кожних п'яти пажів АсМNPV нерозведеним вірусом у культурі клітин Sf з'ясувало, що перші делеції відбуваються після 10—15 пажів [33]. Практично всі ранні делеції локалізовані в локусі гена *fp25* і в ділянці хітиназного гена, яка не є суттєвою для репродукції вірусу в культурі [35]. При подальших пасажах геномні делеції поширюються на сусідні ділянки.

Аналіз ДНК після 81-го пажу виявив, що більшість молекул ДНК мають розмір 50 тис. п. н. Такі дефектні геноми склалися з багатьох повторів *HindIII-K* фрагмента геному розміром 2,8 тис. п. н. На основі отриманих результатів зроблено припущення, що *ori* реплікації вірусної ДНК розміщується в *HindIII-K* фрагменті. Тут же локалізовано ділянку, яка включає паліндроми і повтори, але гомології з *hr*-послідовностями не було виявлено [36]. Аналогічний фрагмент (*HindIII-M*) локалізований в геномі OpMNPV [37].

Припущення стосовно здатності *hr*-послідовностей функціонувати як *origins* реплікації вірусної ДНК виникло давно [11] і знайшло вагому підтримку внаслідок визначення, що ці послідовності теж залишаються в геномах дефектних вірусних часток [15]. Використання методу транз'єнтної реплікації дозволило виявити, що сім *hr*-послідовностей геному АсМNPV, вбудованих у плазмиди, підтримували реплікацію цих плазмід у вірус-інфікованих клітинах комах [15, 36—38]. Відносний рівень ефективності реплікації різних *hr*-послідовностей не залежав від кількості присутніх паліндромів [38]. Недавніми дослідженнями показано, що суттєвою для ініціації реплікації є центральна ділянка паліндрому в області *EcoRI*-сайта [38]. Індивідуальна роль цих восьми *ori* впродовж реплікації вірусної ДНК і їхня функціональна активність *in vivo* невідомі. Але окремі результати свідчать, що не всі потенційні *ori* необхідні для реплікації геному [15, 33]. Наявність декількох *ori* не є унікальною властивістю бакуловірусів. Так, геном вірусу герпесу HSV-1 має три *ori*, але присутності лише одного будь-якого *ori* достатньо для реплікації геному [39]. Геном вірусу райдужності Chilo (CIV) має шість потенційних *ori* [40].

Результати низки робіт з реплікації плазмід в інфікованих клітинах комах показали, що передумовою для *ori*-залежної реплікації є кільцева топологія плазмід. Лінійна ДНК, навіть яка має *ori*, не реплікується [15, 38]. Ці дані узгоджуються з кільцевою природою бакуловірусного геному і дають підставу для припущення щодо правомірності моделі для реплікації бакуловірусної ДНК, яка використовує проміжні тета- чи ролінг-кільцеві структури. Ролінг-модель підтримується результатами дослідження структури геномів дефектних вірусних часток, ДНК яких являє собою конкатамери фрагмента *HindIII-K* [33]. Крім того, визначення структури плазмід, які реплікуються в інфікованих клітинах комах, також виявило конкатамери плазмідної ДНК [38]. При дослідженні структури реплікативних молекул ДНК NPV *Malacosoma neustria* (MnNPV) в інфікованих клітинах комах з використанням електронного мікроскопу виявлено молекули, за формою схожі на тета-структури [41]. Зроблено припущення, що реплікація ДНК MnNPV відбувається за Кернсом з проміжними тета-формами. Але також знайдено молекули ДНК, контурна довжина яких значно перебільшувала довжину геному, а це свідчить про можливість і ролінг-моделі реплікації бакуловірусної ДНК. При реплікації за ролінг-моделлю для ініціації реплікації потрібно один *ori* для продукування множини геномів. Наявність декількох *ori* може сприяти швидкій початковій ампліфікації кільцевої ДНК при використанні тета-моделі реплікації. Таким чином, на даному етапі досліджень питання про модель реплікації бакуловірусної ДНК і про роль та функціонування припустимих *ori* реплікації залишається відкритим. Більш того, зовсім недавно опубліковано результати досліджень, в яких показано, що промотори вірусних ранніх генів можуть функціонувати з такою ж ефективністю, як і *hg*-послідовності в процесі ініціації реплікації плазмідних ДНК у вірус-інфікованих клітинах [42]. Автори припускають, що ділянки вірусного геному, здатні зв'язувати хазяїнські і вірусні транскрипційні фактори, можуть функціонувати як *ori* реплікації. Нещодавно в геномі MnNPV виявлено особливу ділянку, функціональна навантаженість якої залишається поки що недослідженою, але цілком імовірним є припущення про зв'язок цієї ділянки з *ori* реплікації [43]. В процесі пасирування MnNPV у клітинах *Antheraea pernyi* спостерігається поява вірусних геномів, електрофоретична картина яких після обробки ендонуклеазами рестрикції відрізняється від вихідної. В певній ділянці цих геномів, що дістала назву «гарячої точки», відмічено розрив при обробці

будь-якою з використаних ендонуклеаз рестрикції. Оскільки малоімовірною є поява в процесі пасирування в геномі вірусу полілінкерної ділянки з сайтами для семи використаних ендонуклеаз рестрикції, припущено наявність вірусних форм, що несуть розрив у даній точці геному незалежно від обробки ферментами рестрикції. Структурно-функціональні особливості ділянки, в якій локалізовано розрив, досліджуються.

Гени, які беруть участь у реплікації ДНК, виявлено при застосуванні бібліотеки клонуваних ділянок бакуловірусного геному, введених в неінфіковані клітини комах разом з репортерною плазмідною, що мала очікуваний *ori* реплікації. При цьому визначали мінімальний комплект клонів, при яких відбувалася реплікація плазміди. Саме таким чином шість генів, суттєвих для транзійтної реплікації ДНК, і чотири стимуляторних гени було ідентифіковано для AcMNPV [36, 44] і OpMNPV [45, 46].

Отже, в реплікації плазмідної ДНК у клітинах комах за присутності вірусного геному беруть участь 10 генів: ДНК-полімераза і геліказ, *ie-1*, *lef-1*, *lef-2*, *lef-3*, *p35*, *ie-2*, *pe-38* і *lef-7*. Один із генів, важливий для реплікації ДНК, — це ДНК-полімераза (*dna-pol*) [47—49]. Гени ДНК-полімерази клонувано і секвеновано для кількох бакуловірусів [47—49]. Бакуловірусна ДНК-полімераза (115 кДа) має характеристики, подібні до еукаріотичних ДНК-полімераз, але відрізняється за рядом фізичних та біохімічних властивостей від клітинних ДНК-полімераз [50, 51]. Амінокислотні послідовності ДНК-полімераз різних бакуловірусів схожі між собою. У двох лабораторіях показано, що ген ДНК-полімерази є важливим для реплікації ДНК [15], але за певних умов може відігравати лише стимулюючу роль [44].

Необхідними ферментами для реплікації ДНК є гелікази. Ген з частковою гомологією до геліказ (*p143*) ідентифіковано в AcMNPV [52]. Він кодує білок з м. м. 143 кДа, який містить області, типові для геліказ. Показано, що цей ген має вплив на коло хазяїв для бакуловірусів. NPV *Bombux mori* (BmNPV) і AcMNPV інфікують клітини культур *B. mori* і *Spodoptera frugiperda* відповідно, але не реплікуються в гетерологічних лініях. Проте рекомбінанти AcMNPV, які містили фрагмент геліказного гена BmNPV замість відповідної послідовності AcMNPV, були здатні реплікуватися в обох культурах [53]. Тобто цей ген, без сумніву, є суттєвим для реплікації бакуловірусної ДНК.

Виявлено, що ген *ie-1* необхідний також для реплікації вірусної ДНК [54]. Крім активації експресії інших реплікативних генів, він може і безо-

середньо брати участь у реплікації ДНК, що проявляється у зв'язуванні з *ori* реплікації і каталізі раних етапів, які ведуть до утворення реплікативного комплексу.

Окрім генів *ie-1*, ДНК-полімерази і гелікази, в бакуловірусних системах знайдено ще кілька реплікативних генів. Два гени, *lef-1* і *lef-2*, ідентифіковані раніше як гени, необхідні для пізньої генної транскрипції [55, 56], є важливими для реплікації вірусної ДНК. Ці гени безпосередньо причетні до реплікації ДНК АсМNPV і ОпМNPV [36, 44, 46].

На основі біохімічних досліджень зроблено припущення, що геном АсМNPV кодує одонитково-зв'язуючий білок (SSB) [57]. Цей білок було отримано, його молекулярна маса складає 44,3 кДа і відповідає такій білка, який, можливо, є продуктом гена *lef-3*. SSB білки важливі для реплікації ДНК, отже, ген *lef-3* також є важливим для цього процесу. Ще один ген, *p35*, за різних умов може бути стимулюючим [36] або суттєвим для реплікації ДНК [44]. Ген *p35* є інгібітором вірус-індукованого апоптозу в клітинах комах і роль його в реплікації може полягати саме в пригніченні апоптозу, що вберігає інфіковані клітини від передчасної загибелі [58]. Для ефективної транз'єнтно реплікації плазмідної ДНК потрібні ще три гени, які стимулюють реплікацію. Два з цих генів, *ie-2* і *re38*, кодують трансактиватори транскрипції раних генів [23, 59]. Ген *re38* активує експресію гена гелікази, а ген *ie-2* стимулює ген *p-38* і експресію гена *ie-1* [60]. Третій ген, *lef-7*, теж є стимулятором реплікації ДНК [44].

Таким чином, до реплікації плазмідної ДНК у клітинах комах за присутності вірусного геному причетні 10 генів. Які гени беруть участь у реплікації вірусної ДНК *in vivo*, поки ще не ясно. Тільки для двох генів — *ie-1* і *p143* (ген гелікази) за допомогою температурочутливих мутантів показано, що вони є важливими для реплікації бакуловірусної ДНК [52, 61].

Перехід від рання до пізньої генної транскрипції в бакуловірусній системі залежить від реплікації ДНК [62, 63] і залучення нової (аманітинстійкої) РНК-полімерази, яка з'являється в процесі розвитку вірусної інфекції [64, 65]. Визначення низки вірусних генів, що беруть участь в експресії пізніх вірусних генів, — це важливий крок у розумінні механізму, за яким транскрипція і реплікація ДНК разом з РНК-полімеразою нового типу залучаються до транскрипції пізніх генів. До останніх відносять, в основному, гени, що кодують структурні білки віріонів, і деякі гени, які причетні до формування поліедрів. Це гени *vp39*, *cor*, *gp64*,

p38,4, *p74*, *fp25*, *clx* і кілька генів білків оболонки віріонів. Ген *vp39* кодує мажорний капсидний білок 39К, який утворює каркас паличкоподібного нуклеокапсиду. Цей ген локалізовано в геномах АсМNPV [66], ОпМNPV [67, 19], *Lymantria dispar* (LdMNPV) [68].

Ген *cor* кодує 6,9 кДа білок, до складу якого входить більш ніж 40 % аргініну. Цей дуже лужний протаміноподібний білок асоційований з вірусною ДНК усереднені капсидної структури. Його виявлено у віріонах вірусів гранульозу [69, 70] і поліедрозу [71, 72]. Припускається, що лужні аргінінові залишки нейтралізують кислі залишки вірусної ДНК і при цьому утворюється компактна структура. При проникненні в клітини комах ДНК-зв'язуючий білок може фосфорилюватися протеїнкіназою, що спричинює розгортання вірусної ДНК. Це підтверджується присутністю протеїнкінази, асоційованої з очищеними капсидами вірусів гранульозу [73] і поліедрозу [74].

Ген *gp64* кодує мажорний глікопротеїн BV віріонів, який відіграє важливу роль у розвитку інфекції [75]. Припускається, що *gp64* забезпечує проникнення BV віріонів у хазяйські клітини за допомогою ендоцитозу [76]. Синтез білка GP64 проходить у дві фази [77] і регулюється на рівні транскрипції, яка ініціюється раним промотором на раним етапі інфекції і пізнім промотором на пізньому етапі, а між ними виявлено лаг-період [77].

Ген *p34,8* кодує білок 34,8 кДа, який, можливо, є структурним білком, але його роль доки не з'ясовано. Генетичні дослідження показали важливість гена *p34,8* [78]. Припускається, що згаданий білок є компонентом мембрани поліедрів, але дані про це суперечливі [79].

Ген *gp41* кодує О-глікозилюваний структурний білок OV віріонів [80]. Вірогідно, що цей білок розташований між оболонкою і нуклеокапсидом.

Ген *p26,4* кодує структурний ацильований білок 26,4 кДа, асоційований з оболонкою OV віріонів [81].

Ген *p74* кодує білок, який, можливо, також асоційований з оболонкою OV віріонів і відіграє значну роль при інфікуванні цими віріонами тканин середнього кишечника, первинного місця вірусної інфекції у комах [82].

Нещодавно локалізовано ген ще для одного структурного білка DPV-E66 [81]. Білок знайдено в клітинах комах після 12—72 год інфікування. Він локалізується в оболонці OV віріонів, а також у місцях розташування мікропухирців у ядрах інфікованих клітин.

Гени ще для трьох структурних білків виявле-

но нещодавно. Це два гени, які кодують білки оболонки OV віріонів — ODV-E18 і ODV-35, і ген для білка ODV-EC27, що поєднує OV віріони в капсиди [83].

Несуттєвий ген *clx* кодує білок PE, асоційований з оболонкою поліедрів. Цей білок надає поліедрам додаткової міцності [84, 85].

Порушення *fp25* гена призводить до утворення FP-фенотипу, що супроводжується значним зменшенням кількості поліедрів в інфікованих клітинах: утворюються 1—2 поліедри на ядро [86, 87]. FP-мутанти з'являються внаслідок вбудовування транспозонового елемента комахи в локус гена *fp25* [8, 31, 86].

Визначення вірусних генів, що беруть участь у регуляції експресії пізніх генів, є необхідним етапом з'ясування механізму, за яким транскрипція і реплікація ДНК разом з РНК-полімеразою нового типу включаються в транскрипцію пізніх генів. Ідентифікація таких регуляторних генів значно полегшилася завдяки розвитку методу транз'єнтної експресії. Цей метод засновано на здатності бібліотеки клонів, яка перекриває повний вірусний геном, підтримувати експресію репортерного гена, який знаходиться під контролем пізніх вірусних промоторів. Так, у лабораторії Міллера показано, що для підтримки оптимального рівня транз'єнтної експресії репортерного гена, який знаходиться під контролем промотору пізнього *vp39* гена АсМNPV, необхідно 18 генів. Ці гени отримали назву пізніх експресійних факторів (*lefs*) [24, 88—92].

Дев'ять з цих генів необхідні для ефективної реплікації в клітинах комах плазмідної ДНК, яка містить очікуваний *ori* вірусної реплікації. До них відносять: *ie-1*, *ie-2*, *dna-pol*, *p143*, *lef-1*, *lef-2*, *lef-3*, *lef-7*, *p35*. Їхні властивості розглянуто вище. Продукти інших дев'яти генів необхідні для підтримки постійного рівня транскриптів репортерного гена, вбудованого під промотор *vp39*. До них належать: ген *39K* — кодує білок фосфопротеїн pp31, асоційований з вірогенною строною [93]; *lef-8* і *lef-9* — кодують поліпептиди з послідовностями, консервативними для багатьох РНК-полімераз [44, 91]; *lef-4*, *lef-5*, *lef-6*, *lef-10*, *lef-11* і *p47* — функціонують або на рівні транскрипції, або беруть участь у стабілізації мРНК [44, 94].

Нещодавно визначено, що ці ж самі 18 генів необхідні для ефективної транз'єнтної експресії репортерного гена, вбудованого під промотор іншого пізнього гена — *p6.9* [92]. Можливо, для експресії пізніх генів потрібні і клітинні фактори, але на сьогодні ясно, що для їхньої оптимальної експресії потрібна експресія 18 ранніх вірусних генів — *lefs*.

До дуже пізніх генів відносяться гени *polh* і *p10*. Промотори саме цих генів переважно використовуються в бакуловірусних системах для експресії гетерологічних генів. Обидва промотори сильно активуються в дуже пізній фазі розвитку інфекції, яка супроводжується утворенням в ядрах клітин комах поліедрів. Хоча експресія деяких інших генів може також відбуватися протягом дуже пізньої фази інфекції, гени *polh* і *p10* є унікальними через надзвичайно високий рівень транскриптів і генних продуктів, що й зумовило використання промоторів цих генів в експресійних системах.

Поліедрин є мажорним компонентом поліедрів. Цей білок в інфікованих клітинах експресується у великих кількостях і в пізній фазі інфекції його частка складає 25 % і більше від тотального клітинного білка [95]. Білок P10 теж синтезується у великих кількостях і також в дуже пізній час інфекції. В ядрах інфікованих клітин він утворює фібрилярноподібний матеріал [5]. Припускається, що білок P10 причетний до лізису інфікованих клітин, а саме — до дезінтеграції ядер [96]. На відміну від пізніх бакуловірусних промоторів, які активуються між 6 і 12 год транскрипція промоторів генів *polh* і *p10* сильно активується після 18—24 год інфікування. В транз'єнтних експресивних дослідах для трансактивації промотору гена *apolh* потрібні всі 18 генів-*lefs*, необхідних для трансактивації промоторів пізніх генів *vp39* і *p6.9* [55, 56, 60, 90, 97]. Ці ж самі гени були потрібні і при дослідженні рівня експресії з промотору гена *p10* [92]. Але відносно низький рівень експресії з *polh* і *p10* промоторів у цих дослідах припускав, що необхідні додаткові фактори для активації дуже пізніх промоторів.

Показано, що для досягнення оптимального рівня дуже пізніх транскриптів потрібен ген *vlf-1* [92]. Цей ген виявлено при дослідженні структури геному температурочутливого мутанту, в якого білковий синтез впродовж ранньої і пізньої фаз інфекції не порушений, але не синтезується поліедрин [98]. Знайдено що рівні транскриптів генів *polh* і *p10* знижені. Очікуваний продукт цього гена повинен мати новий механізм регуляції генної експресії, оскільки він має амінокислотну послідовність, подібну до такої родини дріжджових і бактеріальних інтеграз. Вірогідно, що цей білок взаємодіє безпосередньо з промотором і є основним кандидатом на роль факторів, які взаємодіють з «вибуховим» елементом, дуже пізніх промоторів [92]. Ген *vlf-1* є першим ідентифікованим геном, який бере участь виключно в експресії дуже пізніх генів. Багато областей бакуловірусного геному транскрибуються в численні РНК, послідовності

яких перекриваються. Такі РНК можуть бути як у сенсовому, так і антисенсовому спрямуванні по відношенню до ORF. Пізні транскрипти часто представлені як серія РНК із спільними 5'-кінцевими і різними 3'-кінцевими послідовностями. Одним з пояснень наявності таких РНК може бути нездатність ефективно впізнавати поліаденілюючий сигнал і/або ефективно термінувати транскрипцію. Проте наявність згаданих РНК може відігравати певну роль у регуляції механізму дії генів. Це припущення знайшло підтвердження при дослідженні транскрипції двох ORFs, які фланкують область гена *polh*. Ці ORFs транскрибуються в пізній фазі інфекції з нитки, протилежної тій, яка використовується для транскрипції *polh*. Рівень загальної мРНК (3,2 тис. п. н.), яка є сенсовою для фланкуючих ORFs, але включає антисенсову *polh*-послідовність, різко зменшується впродовж дуже пізньої фази інфекції. Таке різке зниження прямо пов'язане з початком *polh* транскрипції і може бути наслідком гібридизації *polh*-мРНК з антисенсовою РНК розміром 3,2 тис. п. н. [10]. Ці результати свідчать про те, що транскрипція сусідніх генів може впливати на транскрипцію вище- і/або нижчерозташованих генів.

Таким чином, з наведених даних літератури випливає, що бакуловірусний геном, кодує потенціал якого містить інформацію про більш ніж 150 білків, має складну і впорядковану систему регуляції експресії генів у процесі розвитку інфекції. Регуляція генної експресії здійснюється, в основному, на рівні транскрипції, яка регулюється *trans*-діючими вірусними факторами і *cis*-орієнтованими елементами вірусного геному. Показано, що експресія безпосередньо ранніх генів, які для прояву своєї активності використовують фактори клітин хазяїна, трансактивує експресію затримано ранніх і пізніх генів, що, в свою чергу, спричинює реплікацію вірусного геному і подальшу експресію дуже пізніх генів. У регуляції експресії двох безпосередньо ранніх генів бере участь сплайсинговий механізм.

Знайдено комплекси генів, а також елементи геному, які причетні до реплікації вірусної ДНК і експресії пізніх і дуже пізніх генів. На підставі даних стосовно розподілення генів по вірусному геному, а також наявності багатьох РНК-транскриптів, які перекриваються, із спільними 5'- чи 3'-кінцями передбачається, що регуляція експресії в часі може відбуватися через механізм деактивації раннього нижчерозташованого промотору і наступної активації пізнього вищерозташованого промотору. Крім того, існує можливість регуляції транскрипції за допомогою антисенсового механізму.

Для деяких бакуловірусних генів не виключається регуляція експресії не тільки на рівні транскрипції, але й на рівні трансляції.

Дослідження молекулярно-генетичної організації бакуловірусів та вивчення регуляції експресії генів призвели до створення різноманітних конструкцій бакуловірусних векторів, які стали основою для одержання високоефективних експресійних систем. Ці системи забезпечують високий вихід біологічно активних гетерологічних білків різного походження — прокаріотичних, вірусних, рослинних, еукаріотичних.

L. I. Strokovskaya, I. M. Kikhno, R. A. Meleshko

Structural and functional organization of baculovirus genome

Summary

The Baculoviridae is a diverse family of pathogens which are infectious for arthropods and are characterized by a complex replication cycle that culminates in the occlusion of virions in a crystalline protein matrix. Baculovirus genes are expressed in a transcriptional cascade in which each successive phase is dependent on the expression of genes during the previous phase. The review summarizes our current understanding of this unique gene expression mechanism, as well as a mechanism of baculovirus replication connected with it. The nucleotide sequences and genes involved in these processes are described.

Л. И. Строчковская, И. М. Кихно, Р. А. Мелешко

Структурно-функциональная организация геномов бакуловирусов

Резюме

Baculoviridae — семейство разнородных патогенных вирусов, инфицирующих насекомых и характеризующихся сложным репликационным циклом, который завершается включением вирионов в кристаллический белковый матрикс. Бакуловирусные гены экспрессируются по типу транскрипционного каскада, где каждый следующий этап зависит от экспрессии генов на предыдущем этапе. Данный обзор обобщает современные представления как об этом уникальном механизме генной экспрессии, так и о механизмах бакуловирусной репликации, связанной с ним. Описываются нуклеотидные последовательности и гены, участвующие в этих процессах.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. King L. A., Possee R. D. The baculovirus expression system. A laboratory guid.—London: Chapman and Hall, 1992.—220 p.
2. Fraser M. J. Ultrastructural observations of virion mutation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures // J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.—1986.—95, N 1.—P. 189—195.
3. Rohrmann G. F. Polyhedrin structure // J. Gen. Virol.—1986.—67, N 5.—P. 1499—1514.
4. Vlac J. M., Klinkerberg F. A., Zaal K. J. M. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using recombinant expressing a p10- β -galactosidase fusion gene // J. Gen. Virol.—1988.—69, N 2.—P. 765—776.
5. Williams G. V., Rohel D. Z., Kuzio J., Faulkner P. A.

- cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants // *J. Gen. Virol.*—1989.—70, N 1.—P. 187—202.
6. Ayres M. D., Howard S. C., Kuzio J. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *Virology.*—1994.—202, N 2.—P. 586—605.
 7. Ahrens C. H., Russell R. L. Q., Funk C. I. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome // *Virology.*—1997.—229.—P. 381—399.
 8. Miller L. K. The genetics of baculoviruses // *The biology of baculoviruses* / Eds R. R. Grandos, B. A. Federichi.—Boca Raton: CRC press, 1986.—Vol. 1.—P. 217—238.
 9. O'Reilly D. R., Miller L. K., Luckow V. A. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual.—New York: Freeman, 1992.
 10. Ooi B. G., Miller L. K. The influence of antisense RNA on transcriptional mapping of the 5' terminus of a baculovirus DNA // *J. Gen. Virol.*—1991.—72, N 1.—P. 527—534.
 11. Cochran M. A., Faulkner P. Location of homologous DNA sequences interspersed at 5' regions in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome // *J. Virol.*—1983.—45, N 4.—P. 961—970.
 12. Guarino L. A., Gonzalez M., Summers M. D. Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Virol.*—1986.—60, N 2.—P. 224—229.
 13. Guarino L. A., Summers M. D. Functional mapping of a transactivating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene // *J. Virol.*—1986.—57.—P. 563—571.
 14. Rodems S. M., Frisen P. D. The hr5 transcriptional enhancer stimulates early expression from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome but is not required for virus replication // *J. Virol.*—1993.—67.—P. 5775—5776.
 15. Kool M., Voeten J. T. M., Goldbach R. W. Identification of seven putative origins of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus DNA replication // *J. Gen. Virol.*—1993.—74.—P. 2661—2668.
 16. Pearson M. N., Rohrmann G. F. *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus homologous regions: characterization of their ability to function as replication origins // *J. Virol.*—1995.—69, N 1.—P. 213—221.
 17. Fuchs L. Y., Woods M. S., Weaver R. F. Viral transcription during *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection: a novel RNA polymerase induced in infected *Spodoptera frugiperda* cells // *J. Virol.*—1983.—48, N 2.—P. 641—646.
 18. Yang C. L., Stetler D. A., Weaver R. F. Structural comparison of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerase and the three RNA polymerase from the host, *Spodoptera frugiperda* // *Virus Res.*—1991.—20.—P. 251—264.
 19. Blissard G. W., Rohrmann G. F. Location, sequence, transcription mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus // *Virology.*—1989.—170, N 2.—P. 537—555.
 20. Blissard G. W., Rohrmann G. F. Baculovirus diversity and molecular biology // *Annu. Rev. Entomol.*—1990.—35, N 5.—P. 127—155.
 21. Weyer U., Rossee R. D. Analysis of the promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene // *J. Gen. Virol.*—1989.—70, N 1.—P. 203—208.
 22. Friesen P. D., Miller L. K. Temporal regulation of baculovirus RNA overlapping early and late transcripts // *J. Virol.*—1986.—54, N 1.—P. 392—400.
 23. Carson D. D., Guarino L. A., Summers M. D. Functional mapping of an AcNPV immediately early gene which augment expression of the IE-1 trans-activated 39K gene // *Virology.*—1988.—162, N 2.—P. 444—451.
 24. Todd J. W., Passarelli A. L., Miller L. K. Eighteen baculovirus genes, including Lef-11, p35, 39K and p47, support late gene expression // *J. Virol.*—1995.—69, N 2.—P. 968—974.
 25. Stewart S., Theilmann D. A. Analysis of the OpNPV transactivators IE-1 and IE-2 using monoclonal antibodies // *J. Gen. Virol.*—1993.—74.—P. 1819—1826.
 26. Ohresser M., Morin M., Cerutti M., Delsert C. Temporal regulation of a complex and unconventional promoter by viral products // *J. Virol.*—1994.—68.—P. 2589—2597.
 27. Kovacs G. R., Chio R. J., Guarino L. A., Summers M. D. Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early 1 transcriptional regulatory protein // *J. Virol.*—1992.—66.—P. 7429—7437.
 28. Prikhod'ko E. A., Miller L. K. Role of baculovirus IE2 and its RING finger in cell cycle arrest // *J. Virol.*—1998.—72, N 1.—P. 684—692.
 29. Prikhod'ko E. A., Lu A., Wilson J. A., Miller L. K. *In vivo* and *in vitro* analysis of baculovirus ie-2 mutants // *J. Virol.*—1999.—73.—P. 2460—2468.
 30. Burand J. P., Summers M. D., Smith G. E. Transfection with baculovirus DNA // *Virology.*—1980.—101, N 1.—P. 286—290.
 31. Kumar S., Miller L. K. Effects of serial passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture // *Virus Res.*—1987.—7, N 2.—P. 335—349.
 32. Wickman T. J., Davis T., Grandos R. R. Baculovirus defective interfering particles are responsible for variation in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection // *Biotech. Lett.*—1991.—13.—P. 483—488.
 33. Lee H. J., Krell P. J. Generation and analysis of defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Virol.*—1992.—66.—P. 4337—4339.
 34. Kool M., Voncken J. W., van Lier F. L. Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties // *Virology.*—1991.—183.—P. 739—746.
 35. Potter K. N., Jaques R. P., Faulkner P. Modification of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus passaged *in vivo* // *Intervirology.*—1978.—9, N 1.—P. 76—85.
 36. Kool M., Voeten J. T. M., Goldbach R. W., Vlak J. M. Functional mapping of regions of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis viral genome required for DNA replication // *J. Virol.*—1994.—68, N 2.—P. 680—689.
 37. Pearson M., Bjornson R., Pearson G., Rohrmann G. The *Autographa californica* baculovirus genome: evidence for multiple replication origins // *Science.*—1992.—257.—P. 1382—1384.
 38. Leisy D. J., Rohrmann G. F. Characterization of the replication of plasmids containing hr sequence in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells // *J. Virol.*—1993.—67.—P. 722—730.
 39. Igarashi K., Fawl R., Roller R. J., Roizman B. Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus I lacking both S-component origins of DNA synthesis // *J. Virol.*—1993.—67.—P. 2123—2132.
 40. Handermann M., Schnitzler P., Rozen-Wolff A. Identification and mapping of origins of DNA replication within the DNA sequences of the genome of insect iridescent virus type 6 // *Virus Genes.*—1992.—6, N 1.—P. 19—32.
 41. Кок И. П., Скуратовская И. Н. Кольцевой реплицирующийся бакуловирусный геном // *Цитология и генетика.*—1988.—22, № 5.—С. 39—43.
 42. Wu Y., Carstens E. B. Initiations of baculovirus DNA replication: early promoter regions can function as infection-depend-

- ent sequences in a plasmid-based replication assay // *J. Virol.*—1996.—70, N 10.—P. 6967—6972.
43. Строчковская Л. И., Кихно И. М., Соломко А. П. Новый вид модификации бакуловирусных геномов в культуре клеток насекомых // Доп. НАН України.—1997.—№ 7.—С. 174—179.
 44. Lu A., Miller L. K. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication // *J. Virol.*—1995.—69, N 2.—P. 975—982.
 45. Ahrens C., Pearson M. N., Rohrmann G. F. Identification and characterization of a second putative origin of DNA replication in a baculovirus of *Orgia pseudotsugata* // *Virology.*—1995.—207, N 1.—P. 572—576.
 46. Ahrens C. H., Rohrmann G. F. Identification of essential trans-acting regions required for DNA replication of the *Orgia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: lef-1 is an essential replication gene // *Virology.*—1995.—207, N 1.—P. 417—428.
 47. Tomalski M. D., Wu J., Miller L. K. The location, sequence, transcription and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene // *Virology.*—1988.—167, N 2.—P. 591—600.
 48. Bjornson R. M., Clocker R., Rohrmann G. F. Characterization of the nucleotide sequence of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase gene region // *J. Gen. Virol.*—1992.—73.—P. 3177—3183.
 49. Chaeychomostri S., Ikeda M., Kobayashi M. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus // *Virology.*—1995.—206, N 1.—P. 435—447.
 50. Miller L. K., Jewell J. E., Browne D. Baculovirus induction of a DNA polymerase // *J. Virol.*—1981.—40, N 1.—P. 305—308.
 51. Mikhailov V. S., Ataeva J. O., Murlyev K. A., Kullyev P. K. Changes in DNA polymerase activities in pupae of the silkworm *Bombyx mori* after infection with nuclear polyhedrosis virus // *J. Gen. Virol.*—1986.—67, N 1.—P. 175—179.
 52. Lu A., Carstens E. B. Nucleotide sequence of a gene essential for viral replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *Virology.*—1991.—181, N 1.—P. 336—347.
 53. Croizer G., Croizer L., Argand O., Pounddevigne D. Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host-range by interspecific replacement of a short DNA segment in the p143 helicase gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—91.—P. 48—52.
 54. Guarino L. A., Dong W. Expression of an enhancer-binding protein in insect cells transfected with the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene // *J. Virol.*—1991.—65.—P. 3676—3680.
 55. Passarelli A. L., Miller L. A. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2 // *J. Virol.*—1993.—67.—P. 2149—2158.
 56. Passarelli A. L., Miller L. A. Identification and characterization of lef-1, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression // *J. Virol.*—1993.—67.—P. 3481—3488.
 57. Hang S., Dong W., Guarino L. F. The lef-3 gene of baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus encodes a single-stranded DNA-binding protein // *J. Virol.*—1995.—69.—P. 3924—3928.
 58. Clem R. J., Fehheimer M., Miller L. K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells // *Science.*—1991.—254.—P. 1388—1390.
 59. Krappa R., Knebel-Morsdorf D. Identification of the very early transcribed baculovirus gene PE-38 // *J. Virol.*—1991.—65, N 2.—P. 805—812.
 60. Lu A., Carstens E. B. Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *Virology.*—1993.—195, N 2.—P. 710—718.
 61. Ribeiro B., Hutchinson K., Miller L. A mutant baculovirus with a temperature-sensitive IE-1 transregulatory protein // *J. Virol.*—1994.—68.—P. 1075—1084.
 62. Rice W. C., Miller L. K. Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive *Drosophila* cells // *Virus Res.*—1986.—6, N 1.—P. 155—172.
 63. Erlandson M. A., Gordon G., Carstens E. B. Size and map location of early transcription products on the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome // *Virology.*—1985.—67, N 1.—P. 12—23.
 64. Huh N. E., Weaver R. F. Identifying the DNA polymerase that synthesizes specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Gen. Virol.*—1990.—71, N 1.—P. 195—201.
 65. Huh N. E., Weaver R. F. Categorizing some early and late transcripts directed by the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Gen. Virol.*—1990.—71.—P. 2195—2200.
 66. Thiem S. M., Miller L. K. Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Virol.*—1989.—63, N 5.—P. 2008—2018.
 67. Pearson M. N., Russel R. L. Q., Rohrmann G. F., Beadreau G. S. P39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location // *Virology.*—1988.—167.—P. 407—413.
 68. Bjornson R. M., Rohrmann G. F. Nucleotide sequence of the p39-capsid gene region of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus // *J. Gen. Virol.*—1992.—73.—P. 1505—1508.
 69. Tweeten K. A., Bulla L. A., Consigli R. A. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsids // *J. Virol.*—1980.—33.—P. 866—876.
 70. Jehle J. A., Backhaus H. Genome organization of the DNA-binding protein gene region of *Cryptophlebia leucotreta* granulosis virus is closely related to that of nuclear polyhedrosis viruses // *J. Gen. Virol.*—1994.—75.—P. 1815—1820.
 71. Wilson M. E., Mainprize T. H., Friesen P. D., Miller L. K. Location, transcription and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide // *J. Virol.*—1987.—61, N 2.—P. 661—666.
 72. Maeda S., Voltrath S. L., Hanzlik T. N. Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by recombinant baculovirus // *Virology.*—1991.—184, N 2.—P. 777—780.
 73. Wilson M. E., Consigli R. A. Function of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella* // *Virology.*—1985.—143, N 2.—P. 526—535.
 74. Miller L. K., Adang M. J., Browne D. Protein kinase activity associated with the extracellular and occluded forms of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Virol.*—1983.—46, N 1.—P. 275—278.
 75. Whitford M., Stewart S., Kuzio J., Faulkner P. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Virol.*—1989.—63.—P. 1393—1399.
 76. Volkman L. E., Goldsmith P. A. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis // *Virology.*—1985.—143, N 1.—P. 185—195.
 77. Jarvis D. L., Garsia A., Jr. Biosynthesis and processing of the

- Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein // *Virology*.—1994.—205, N 1.—P. 300—313.
78. Wu J. G., Miller L. K. Sequence, transcription and translation of a late gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus encoding a 34.8K polypeptide // *J. Gen. Virol.*—1989.—70.—P. 2449—2459.
 79. Rohrmann G. F. Baculovirus structural proteins // *J. Gen. Virol.*—1992.—73, N 2.—P. 749—761.
 80. Whitford M., Faulkner P. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Virol.*—1992.—66.—P. 4763—4768.
 81. Hong T., Braunagel S. C., Summers M. D. Transcription, translation, and cellular localization of PDV-xE66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *Virology*.—1994.—204, N 1.—P. 210—222.
 82. Kuzio J., Jaques R., Faulkner P. Identification of p74, gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies // *Virology*.—1989.—173, N 2.—P. 759—763.
 83. Braunagel S. C., He H., Ramamuthy P., Summers M. D. Transcription, translation and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27 // *Virology*.—1996.—222.—P. 100—114.
 84. Whitt M. A., Manning J. S. A phosphorylated 34-kDa protein and subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body // *Virology*.—1988.—163, N 1.—P. 33—42.
 85. Russel R. L., Rohrmann G. F. A baculovirus polyhedrin envelope protein-immunogold localization in infected cells and mature polyhedra // *Virology*.—1990.—174, N 1.—P. 177—184.
 86. Fraser M. J., Smith G. E., Summers M. D. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses // *J. Virol.*—1983.—47, N 1.—P. 287—300.
 87. Beames B., Summers M. D. Location and nucleotide sequence of the 25k protein missing from baculovirus few polyhedra (EP) mutants // *Virology*.—1989.—168, N 2.—P. 344—353.
 88. Li Y., Passarelli A. L., Miller L. K. Identification, sequence, and transcriptional mapping of lef-3, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression // *J. Virol.*—1993.—67.—P. 5260—5268.
 89. Li Y., Miller L. K. Expression and functional analysis of a baculovirus gene encoding a truncated protein kinase homolog // *Virology*.—1995.—206, N 1.—P. 314—323.
 90. Passarelli A. L., Miller L. K. Identification of genes encoding late expression factors located between 56.0 and 65.4 units of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome // *Virology*.—1993.—197, N 2.—P. 704—714.
 91. Passarelli A. L., Todd J. W., Miller L. K. A baculovirus gene involved in late gene expression encodes a large polypeptide with a conserved motif of RNA polymerases // *J. Virol.*—1994.—68, N 7.—P. 4673—4678.
 92. Todd J. W., Passarelli A. L., Lu A., Miller L. Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays // *J. Virol.*—1996.—70, N 4.—P. 2307—2317.
 93. Guarino L. A., Dong W., Xu W. Baculovirus phosphoprotein pp31 is associated with virogenic stroma // *J. Virol.*—1992.—66.—P. 7113—7120.
 94. Carstens E. B., Lu A. L., Chan H. L. B. Sequences, transcriptional mapping, and overexpression of p47, a baculovirus gene regulating late gene expression // *J. Virol.*—1993.—67.—P. 2413—2520.
 95. Quant R. L., Pearson M. N., Rohrmann G. F., Beaudreau G. S. Production of polyhedrin monoclonal antibodies for distinguishing two *Orgyia pseudotsugata* baculoviruses // *Appl. Environ. Microbiol.*—1984.—48.—P. 732—736.
 96. Hu Z. H., Liu M. F., Jin F. Nucleotide sequence of the *Buzura suppressaria* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene // *J. Virol.*—1993.—74, N 8.—P. 1617—1620.
 97. Morris T. D., Todd W., Fisher B., Miller L. K. Identification of lef-7: a baculovirus gene affecting late gene expression // *Virology*.—1994.—200, N 1.—P. 360—369.
 98. Lee H. H., Miller L. K. Isolation, complementation, and initial characterization of temperature-sensitive mutants of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Virol.*—1979.—31, N 1.—P. 240—252.

УДК 577.112

Надійшла до редакції 23.10.2000