

СИГНАЛЬНЫЕ ПЕПТИДЫ ЯДЕРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ (NLS) И ИХ РОЛЬ В ПАТОГЕННОСТИ ВИРУСОВ

Носальская Т.Н., Мартынов А.В., Бомко Т.В.

Институт микробиологии и иммунологии им. И. И.
Мечникова НАМН Украины

Известно, что нормальное функционирование интерфазного ядра (как и других органоидов эукариотической клетки, ограниченных липидными мембранами) обеспечивается механизмами, контролирующими селективный транспорт молекул между цитозолем и внутренним компартментом. В интерфазных ядрах роль своеобразного «молекулярного сита» выполняет ядерная оболочка, в которую встроены специализированные структурные комплексы - ядерные поры. Именно в ядерных порах локализована система нуклеоплазматического транспорта белков и рибонуклеопротеиновых частиц. Макромолекулы, импортирующиеся в ядро или экспортирующиеся из ядра в цитозоль, несут специальные сигналы, которые узнаются белками комплексов ядерных пор. В случае импортируемых макромолекул эти сигналы обозначаются как сигналы ядерной локализации (Nuclear Localization Signal, NLS). После вхождения в ядро импортированные белки (например, белки хроматина, факторы транскрипции и процессинга РНК и многие другие) перераспределяются по ядерным субдоменам. В настоящее время в интерфазных ядрах описано несколько структурно-функциональных субдоменов: ядрышки, тела Кахала (Cajal bodies), интерхроматиновые гранулы (nuclear speckles), протеасомы, тельца, Polysomb bodies, стрессовые белки (PML bodies) и некоторые другие [1,2].

Наиболее значимые факты, проливающие свет на эту проблему, получены при анализе белков ядрышка. В ряде работ показано, что для белков, участвующих в синтезе и процессинге рибосомной РНК, существует особый класс аминокислотных последовательностей, которые обеспечивают их накопление в ядрышке. Эти последовательности принято называть сигналами ядрышковой локализации (Nucleolar Localization Signal, NoLS). В настоящее время большое количество таких сигнальных последовательностей обнаружено в белках вирусов, растений, животных и грибов. Интересно, что некоторые NoLS перекрываются с хорошо известными NLS [3-5].

NLS были впервые идентифицированы в большом Т-антигене обезьяньего вируса 40 и из нуклеоплазмина, а затем были идентифицированы в большом количестве белков. Обычно они содержат короткие отрезки остатков лизина или аргинина в виде моно- или двудольных сигналов. NLS включают мотив «pat4», который состоит из непрерывного участка четырех основных аминокислот (аргинина и лизина). Мотив «pat7», который начинается с пролина и за

которым в пределах трех остатков следует сегмент, содержащий три основных остатка из четырех [6] или двудольные сигналы [7].

Состав последовательности NLS хорошо известен, и это позволяет достаточно точно предсказывать их присутствие в белках. Так, Cokol M. и соавт. [8] с помощью повторного «мутагенеза in silico» установили до 214 потенциальных NLS. Этот набор соответствовал 43% всех известных ядерных белков и ни одному из известных неядерных белков. Авторы подсчитали, что > 17% всех эукариотических белков могут быть импортированы в ядро. Кроме того, было обнаружено перекрытие между NLS и ДНК-связывающей областью для 90% белков, для которых были известны как NLS, так и ДНК-связывающие области. Таким образом, эволюция, похоже, использовала часть существующего механизма связывания ДНК при компартиментализации ДНК-связывающих белков в ядре. Однако только 56 из 214 установленных NLS-мотивов перекрываются с ДНК-связывающими областями. Эти 56 NLS позволили de novo предсказывать участки частичного связывания ДНК для ~ 800 белков у человека, мух, червей и дрожжей.

Поскольку субдомены ядра не имеют ограничивающих мембран, очевидно, что поддержание их устойчивого структурно-функционального состояния требует наличия специальных механизмов, кардинально отличающихся от механизмов, обеспечивающих общий гомеостаз ядра и других мембранных органелл клетки. При этом необходимо учитывать, что большинство ядерных белков (за исключением коровых гистонов и ламинов) являются высоко динамичными, т.е. связаны со своими сайтами не стабильно, а только на протяжении небольшого времени, называемого «временем удержания».

Вопрос о том, каков механизм «узнавания» импортированными белками мест своей локализации в сложной системе интерфазного ядра, остается открытым.

Первый шаг ядерного импорта происходит, когда импортин отличает свой груз от других клеточных белков. Белки, предназначенные для транспорта в ядро, содержат целевые последовательности аминокислот – сигналы ядерной локализации (NLS). Лучшее всего охарактеризованный транспортный сигнал – это классический NLS (cNLS) для импорта ядерного белка, который состоит либо из одного (одночастного), либо из двух (двудольных) участков основных аминокислот [7,9].

Примером однораздельных cNLS является большой Т-антиген SV40 NLS (126PKKKRRV132), а примером двудольных cNLS является нуклеоплазмин NLS (155KRPAATKKAGQAKKK170). Последовательные остатки N-концевого лизина одночастного NLS обозначаются как P1, P2 и т.д. Структурные [10,11] и термодинамические [12] исследования выявили многие ключевые требования к cNLS. Эти исследования показывают, что для

однораздельных cNLS требуется лизин в положении P1, за которым следуют основные остатки в положениях P2 и P4, чтобы получить свободную консенсусную последовательность K(K/R)×(K/R). Кроме того, с помощью сканирования аланином Muc, одночастичных SV40 и искусственных двудольных cNLS SV40 было обнаружено, что аффинность связывания cNLS с импортином α , измеренная *in vitro*, коррелирует с устойчивым ядерным накоплением и скоростью импорта соответствующего груза cNLS *in vivo* [12]. Эти данные устанавливают границы связывающей способности cNLS, где функциональная cNLS имеет константу связывания ~ 10 нМ для импортина α . Нефункциональные последовательности, близкие к cNLS, либо связывают импортин α слишком слабо, чтобы быть эффективно импортированным, либо слишком сильно, чтобы эффективно высвободиться из рецептора в ядре, хотя факторы высвобождения кариоферина, такие как Nup2 и Cse1, могут помочь на этой стадии высвобождения груза [13-15].

Lange A. и соавт. [16] установили, что наиболее изученной системой транспорта макромолекул между цитоплазмой и ядром является классический путь ядерного импорта. В этом пути белок, содержащий классический основной сигнал ядерной локализации (NLS) импортируется гетеродимерным импортным рецептором, состоящим из β -кариоферина (импортина β), который опосредует взаимодействия с комплексом ядерной поры, и адаптерного белка импортина α , который напрямую связывает классический NLS.

Boulikas T. и соавт. [17] обнаружили около десяти различных форм основных гексапептидов, содержащих по крайней мере четыре аргинина и лизина, характерных для ядерных белков для всех видов эукариот, включая дрожжи, растения, мух и млекопитающих. Эти основные гексапептиды считаются различными версиями NLS. Выдвинуто предположение, что несколько (до 10%) белковых факторов, лишенных типичного корового пептида NLS, могут проникать в ядро благодаря сильному перекрестному соединению с их партнерами по белковым факторам, которые обладают коровым NLS. Те цитоплазматические белки, которые, как было установлено, содержат NLS-подобный пептид, либо тесно связаны с белками клеточной мембраны, либо являются неотъемлемыми компонентами больших цитоплазматических белковых комплексов. С другой стороны, некоторые версии основных NLS содержатся во многих белках клеточных мембран и секретируемых белках. Предполагается, что в этих случаях N-концевой гидрофобный сигнальный пептид внеклеточных белков и внутренние гидрофобные домены трансмембранных белков являются более сильными детерминантами их субклеточной локализации. Положение ядерных NLS среди гомологичных ядерных белков может сохраняться, а может и не сохраняться; однако, если он потерян из гомологичного сайта, он появляется в другом месте белка.

Авторами определен набор правил для понимания природы сигналов ядерной локализации: (1) ядерный NLS, как предполагается, чаще всего состоит из гексапептида с 4 аргининами и лизинами; (2) в этом гексапептиде не обязательно должны присутствовать остатки спартиновой и глутаминовой кислот, а также объемные аминокислоты (F, Y, W); (3) кислотные остатки и пролин или глицин, которые разрывают α -спираль, часто находятся во фланкирующей области этого гексапептидного участка; (4) гидрофобные остатки не должны присутствовать в центральной фланкирующей области NLS, позволяя NLS экспонироваться на белке [17].

Сигнально-опосредованный ядерный импорт в настоящее время хорошо известен для белков. Типичный ядерный белок содержит передаваемый сигнал базовой ядерной локализации (NLS), который распознается рецептором импортина. NLS распознается в цитоплазме либо импортином- β , либо импортином- α .

Импортин- α классифицируется как адаптерная молекула, поскольку NLS связывает импортин- α , который, в свою очередь, связывается с импортином- β до прохождения через ядерную пору. В целом семейство импортных белков включает не менее 21 члена семейства в клетках человека, в дополнение к адаптерным белкам импортина- α , которые придают дополнительную специфичность для различных грузов. Суперсемейство кариоферина также включает ряд экспортных белков, ответственных за ядерный экспорт, которые распознают сигнал гидрофобного ядерного экспорта (NES). Как только он распознает свой NLS-груз, импортин- β отвечает за стыковку импортируемого груза с дистальным участком ядерной поры. Транслокация в центральный канал и через него все еще остается мало изученным процессом, но ключевой регуляторной молекулой представляет собой небольшую GTPase Ran [18]. Ran связывает цитоплазматический импортин/груз NLS, который находится в форме, связанной с GDP. При входе в ядро Ran обменивает свой GDP на GTP (осуществляется строго ядерным обменом Ran. фактор, RCC1). Затем Ran-GTP возвращается в цитозоль в комплексе с грузом exportin/NES, и GTP гидролизует до GDP, готового к следующему раунду импорта. Многие капсидные белки вирусов содержат NLS, которые ведут себя как ядерный импортный груз в моделях, аналогичных описанному выше. Однако основная цель ядерного импорта для входящего вируса – перенос его ДНК (или РНК) в ядро. Хотя многие из импортированных капсидных белков связывают вирусную нуклеиновую кислоту, имеется очень ограниченная информация об импорте реального комплекса белок-нуклеиновая кислота. Учитывая, что капсидные белки независимо попадают в ядро во время инфекции (например, для сборки потомства вирусных частиц) и что NLS часто скрыты внутри капсидов входящих вирусов (и поэтому не видны рецепторам импортина), остается неясным, как сам

вирус может изменять правила, налагаемые механизмом клетки [19].

С целью нарушения или узурпирования ядерных функций, полипептиды РНК-вируса могут получить доступ к ядру различными путями. Одним из первых описаний ядерной локализации вирусного белка с положительной цепью РНК было в альфавирусе, Semliki Forest вирусе (SFV). Было обнаружено, что как белок капсида (С) SFV, так и nsP2, локализуются в ядре и/или ядрышке и содержат NLS, которые напоминают клеточные структуры [20-22]. Было показано, что белок С содержит два сигнала нацеливания на ядрышко в N-концевой области [23]. Неизвестно функциональное значение того, почему эти белки локализуются в ядре или ядрышке, и как это связано с их функцией в репликации вируса. Неструктурный белок nsP2 участвует в регуляции сборки нуклеокапсида и связывания вирусной РНК. Однако белок С также связывается с рибосомами, способствуя разборке и сборке вирусной частицы. Консервативный сайт связывания рибосомы (RBS) был идентифицирован в белке С альфавирусов [24]. Было выдвинуто предположение, что белок С с Mr 33 000 будет диффундировать к NPC и локализоваться в ядрышке. Однако Michel M.R. и соавт. [21] показали, что накопление белка С в ядре зависит от энергии, что позволяет предположить, что транспорт через NPC был активным. Белок С может локализоваться преимущественно в ядрышках посредством взаимодействия между RBS и вновь синтезированной рРНК или рибосомными субъединицами. Сообщалось, что рекомбинантный SFV, nsP2 которого содержит измененный NLS, имеет идентичные свойства с вирусом дикого типа. Fazakerley J.K. и соавт. [25] сообщили, что это изменение влияет на нейровирулентность SFV, и предположили, что это может быть связано с изменениями в процессах, включающих репликацию РНК и/или ядерный транспорт nsP2.

И коронавирусы, и артеривирусы демонстрируют сходную организацию генома и принадлежат к Nidovirales. Хотя оба семейства кодируют нуклеопротеины (N-белки), основная функция которых заключается в связывании вирусной РНК, сами белки имеют разный размер и не имеют заметной гомологии. Однако в случае нескольких коронавирусов и артеривирусов [26] оба N белка локализуются не только в цитоплазма, но также в ядрышке инфицированных клеток и клетках, экспрессирующих только N-белки. Точный механизм, с помощью которого белок N коронавируса локализуется в ядрышке, неизвестен. Однако, подобные исследования с белком N вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней артеривируса, показали, что белок N птичьего коронавируса с меткой GFP может локализоваться в ядрышке [26], и в дальнейшем активно транспортируется в ядро. Вместо прямого использования ядерных путей импорта такие белки могут «совмещать» с ядром другие факторы.

Например, было показано, что белок N коронавируса колокализуется с нуклеолином в ядрышке [27] и связывается с нуклеолином через взаимодействие белок: белок и, таким образом, может локализоваться в ядрышке благодаря его ассоциации с нуклеолином. Белки вируса с положительной цепью РНК, которые локализуются в ядре, по-видимому, имеют сходные функции, то есть связывание с вирусной РНК. Можно предположить, что эти белки будут локализовываться в ядре, если они ниже предела исключения размера NPC, потому что они богаты аргинином и лизином и, следовательно, могут ассоциироваться с высокими концентрациями РНК, то есть рРНК в ядрышке, и, следовательно, эта локализация не играет реальной роли в жизненном цикле вируса. Однако есть несколько свидетельств, которые опровергают это. Во-первых, как уже говорилось, некоторые из этих связывающих вирусную РНК белков активно транспортируются в ядро. Второй и, возможно, один из ключевых данных к разгадке функциональной роли ядерной локализации был описан Tijms M.A. и соавт. [28], которые, используя лептомицин В, продемонстрировали, что белок артеривируса N использует в качестве транспортного пути ядерный белок CRM-1, чтобы перемещаться из ядра в цитоплазму, и эта ядерная локализация белка была решающей для его функции в сборке вируса.

Геном *вирусов гриппа А* состоит из восьми одноцепочечных сегментов отрицательной сенситивной РНК. Эти молекулы РНК тесно связаны с несколькими вирусными белками, включая нуклеопротеин (NP) и субъединицы полимеразы (PB1, PB2 и PA), образуя комплексы вирусных рибонуклеопротеидов (vRNP). После прикрепления к поверхности клетки вирус интернализуется посредством рецепторно-опосредованного эндоцитоза. Подкисление везикулы запускает слияние вирусного гемагглютинина. Вирусные и эндосомные мембраны сливаются, высвобождая vRNP в цитоплазму. Одновременно вирусное ядро подкисляется за счет протонно-канальной активности вирусного белка M2, что приводит к необратимым изменениям белка M1 и его диссоциации от vRNP. Указанное является необходимым этапом до проникновения vRNP в ядро, где происходят вирусная транскрипция и репликация. Проблема, с которой сталкиваются vRNP – это перемещение через ядерную мембрану. Входящие vRNP, а также вновь синтезированные вирусные белки должны попасть в ядро. Нуклеоцитоплазматический перенос – это строго контролируемый процесс, который происходит только через комплексы ядерных пор. Эти большие структуры (125 МДа) состоят из нуклеопоринов и охватывают обе ядерные мембраны с расширениями в ядре и цитоплазме. Считается, что молекулы с молекулярной массой менее 40 000–50 000 свободно диффундируют через комплекс ядерных пор; однако более крупные белки должны отображать сигнал ядерной локализации (NLS), позволяя им активно

импортироваться в ядро вместе с членами семейства кариоферринов.

RNP вируса гриппа (шириной 10–20 нм) слишком велики, чтобы диффундировать через комплекс ядерных пор. O'Neill R.E. и соавт. [29] продемонстрировали, что активный импорт vRNP зависит от NP, и показали, что NP может содержать, по крайней мере, три NLS.

Было выдвинуто предположение, что NP содержит обычный двудольный NLS, охватывающий остатки 198–216. Наконец, было показано, что конструкции с делециями, приводящими к потере этих двух NLS, частично локализируются в ядре, что свидетельствует о наличии третьего NLS.

Мутация нетрадиционного NLS нарушила ядерный импорт NP. Пептид, несущий нетрадиционный NLS, может ингибировать ядерный импорт NP в этом анализе импорта и предотвращать взаимодействие NP-кариоферин в анализе связывания, подтверждая решающую роль этого сигнала. Интересно, что пептид, содержащий T-антиген SV40 NLS, был неспособен ингибировать ядерный импорт NP или взаимодействие NP-кариоферин- α , что позволяет предположить, что NP и T-антиген SV40 не имеют общего сайта связывания на кариоферине- α . также был изучен вопрос о том, какие NLS необходимы для того, чтобы вирусный рибонуклеопротеидный комплекс проник в ядро. Обнаружено, что пептид, содержащий нетрадиционный NLS, эффективно ингибировал ядерный импорт рибонуклеопротеидных комплексов. Указанное предполагает, что нетрадиционный NLS является основным сигналом, необходимым не только для ядерного транспорта свободных NP, но и для импорт рибонуклеопротеидных комплексов. Наконец, репликация вируса может быть специфически ингибирована проницаемым для мембраны пептидом, содержащим нетрадиционный NLS, что подтверждает решающую роль этого сигнала во время репликативного цикла вируса [30,31].

Из белков вируса гриппа A NLS были обнаружены в трех субъединицах полимеразы: матричном белке M1 (который ассоциируется с комплексами vRNP), неструктурном белке NS1 и NP, основном компоненте vRNP. NP имеет как минимум две последовательности NLS. Нетрадиционный NLS (называемый NLS1) расположен между остатками 3 и 13 и отвечает за связывание NP с кариоферинами 1 и 2. Консервативные основные остатки в положениях 7 и 8 имеют решающее значение для импорта NP в ядро, и двудольный NLS (остатки от 198 до 216; NLS2). Хотя известно, что оба NLS играют роль в переносе ядер, их относительный вклад в вирусную репликацию плохо изучен.

Ozawa M. и соавт. [32] исследовали их вклад в субклеточную/субядерную локализацию NP, транскрипцию вирусной РНК (vRНК) и репликацию вируса. Отмена нетрадиционного NLS заставила NP локализоваться преимущественно в цитоплазме и повлияла на его активность в транскрипции vRНК.

Однако авторам удалось создать вирус, NP которого содержали аминокислотные замены в NLS1, которые, как известно, отменяли его функцию ядерной локализации, хотя этот вирус был сильно аттенуирован. Эти результаты показывают, что, хотя нетрадиционный NLS не важен для репликации вируса, он необходим для эффективного синтеза вирусной мРНК.

С другой стороны, двудольный NLS, чей вклад в ядерный транспорт NP ограничен, был важен для транскрипции vRНК и накопления в ядрышках NP. Таким образом, двудольный NLS, но не нетрадиционный NLS, NP важен для репликации вируса гриппа А [32,33].

Коронавирус 2 (SARS-CoV-2), вызывающий тяжелый острый респираторный синдром, представляет собой непосредственную серьезную угрозу для здоровья населения во всем мире. Рядом авторов проведен глубокий молекулярный анализ, с целью восстановления эволюционного происхождения повышенной патогенности SARS-CoV-2 и других коронавирусов, которые являются серьезными патогенами человека. Используя комплексную сравнительную геномику и методы машинного анализа, авторы определили ключевые геномные особенности, которые отличают SARS-CoV-2 и вирусы, вызвавшие две предыдущие смертельные вспышки коронавируса, SARS-CoV и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), от менее патогенных коронавирусов. Эти особенности включают усиление сигналов ядерной локализации в белке нуклеокапсида и отдельные вставки в гликопротеине шипа, которые, по-видимому, связаны с высокой смертностью от этих коронавирусов, а также с переключением хозяина с животных на человека. Выявленные особенности могут быть решающими факторами патогенности коронавируса и возможными целями для диагностики, прогнозирования и лечения.

SARS-CoV-2 привел к самой разрушительной пандемии со времен испанского гриппа 1918 года, что вызвало острую необходимость выяснения эволюционной истории и геномных особенностей, которые привели к повышенной патогенности и безудержному распространению этого вируса, а также тех коронавирусов, которые вызвали предыдущие смертельные вспышки. Лучшее понимание вирусной патогенности и передачи зоонозов имеет решающее значение для прогнозирования и предотвращения будущих вспышек. Используя комплексный подход, включающий машинный анализ и сравнительную геномику, определили три ранее необнаруженных вероятных детерминанты патогенности и зоонозной передачи. Усиление NLS в нуклеокапсидах коронавирусов с высоким CFR подразумевает важную роль субклеточной локализации нуклеокапсидного белка в патогенности коронавируса. Поразительно, но вставки в спайковый белок, по-видимому, были получены независимо друг от друга кластерами SARS и MERS коронавирусов с высоким CFR, как в домене,

участвующем в слиянии вирус-клетка, так и в домене, опосредующем распознавание рецептора. Постепенное усиление NLS в нуклеокапсидах и различные вставки в спайковый белок коронавирусов с высоким CFR подразумевают, что эти изменения отражают не одно событие, которое произошло у общего предка, а скорее конвергентную тенденцию в эволюции коронавирусов в вирусы с высоким CFR. Эти вставки, скорее всего, повышают патогенность высокоэффективных вирусов и способствуют их зоонозной передаче человеку. Все эти особенности характерны для коронавирусов с высоким CFR и их животных (в частности, летучих мышей), заражающих родственников в одном семействе, которые демонстрируют, что появление SARS-CoV-2 является естественной частью продолжающейся эволюции коронавируса и совместимо с возможностью будущей зоонозной передачей людям дополнительных высокопатогенных штаммов [34].

Изучая участки, идентифицированные внутри нуклеокапсида, которые предсказывают высокий CFR коронавирусов, обнаружено, что эти делеции и вставки приводят к существенному усилению мотивов,

которые определяют ядерную локализацию [35], в частности, у коронавирусов с высоким CFR. Делеции, вставки и замены в N-белках коронавирусов с высоким CFR соответствуют двум одночастным сигналам ядерной локализации (NLS), одному двудольному NLS и сигналу ядерного экспорта (NES). В ходе эволюции коронавирусов эти ядерные сигналы локализации и экспорта заметно усиливаются в кладах, которые включают вирусы с высоким CFR и их родственников от животных (в первую очередь, летучих мышей), как показано увеличение положительного заряда аминокислот, составляющих NLS. В кладе, включающем SARS-CoV и SARS-CoV-2, накопление положительных зарядов наблюдалось в однораздельном NLS, двудольном NLS и NES, тогда как в кладе, включающем MERS-CoV, положительные заряды накапливались в основном в первом из двух одночастных NLS. Во всех случаях усиление этих сигналов представляет собой постепенную значительную тенденцию, которая сопровождала эволюцию коронавирусов одновременно с появлением более патогенных штаммов (эмпирическое значение $P < 0,001$; рис. 1 и 2).

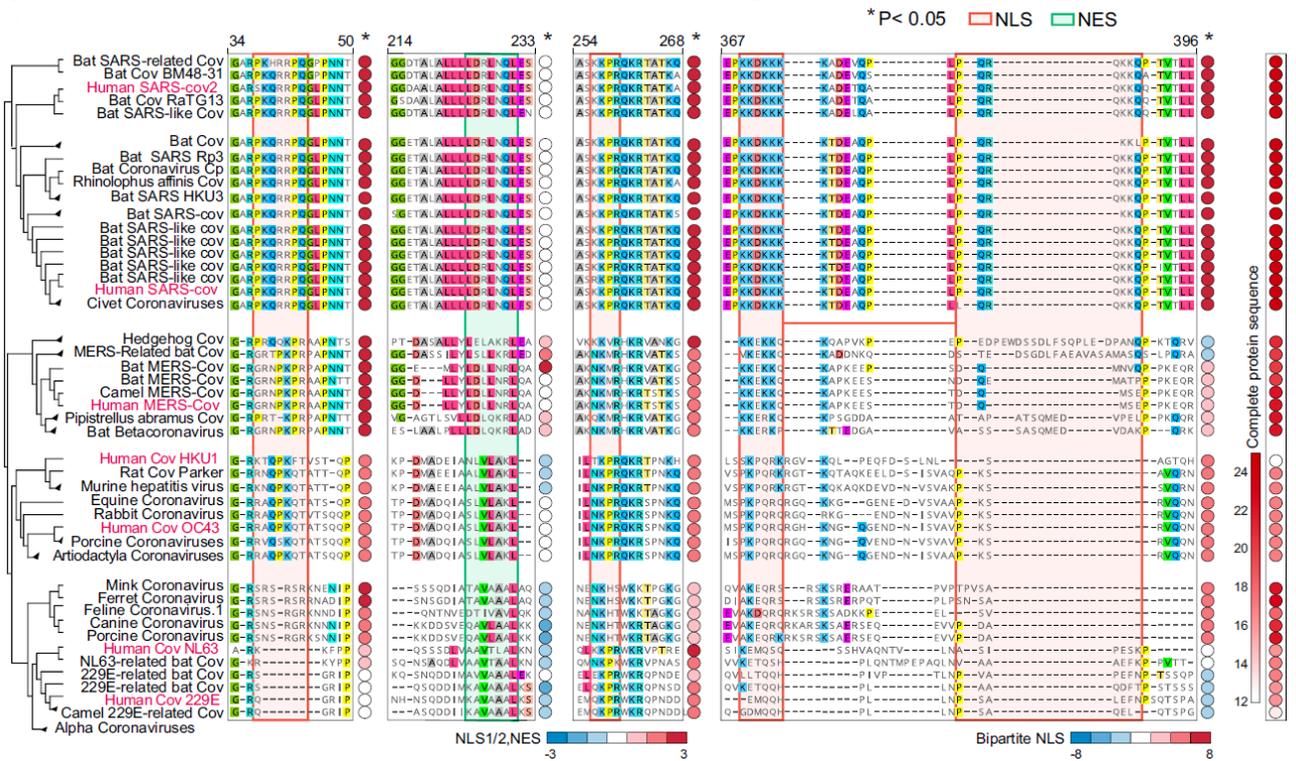


Рис. 1. Предполагаемые детерминанты патогенности коронавируса в нуклеокапсиде и спайковом белке. (Слева) Филогенетическое дерево и выравнивание белка нуклеокапсида у разных видов коронавируса с неукорененным деревом, построенным на основе аминокислотных последовательностей нуклеокапсида. NLS и NES обведены оранжевым и зеленым цветом соответственно. Кружок рядом с каждой сигнальной последовательностью обозначает заряд пептида, красный цвет означает более высокий заряд, а синий - более низкий заряд. (Справа) Общий заряд каждой полной белковой последовательности (По материалам из [34]).

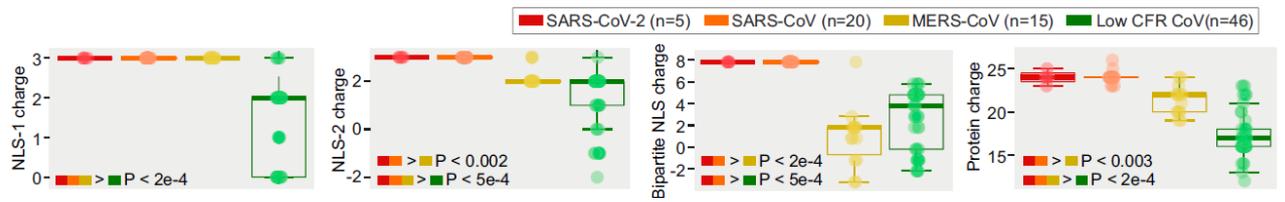


Рис. 2. Предполагаемые детерминанты патогенности коронавируса в нуклеокапсиде и спайковом белке. Коробчатые диаграммы, отображающие (слева, в центре слева и в центре справа) заряд трех мотивов NLS и (справа) заряд полного нуклеокапсидного белка для штаммов SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV и штаммов с низким CFR. Односторонние значения P суммы рангов показаны, когда они значимы между любыми двумя группами, поддерживая постепенное увеличение заряда (По материалам из [34]).

Заряд полного белка нуклеокапсида постепенно эволюционирует в сторону более высоких положительных значений, в частности, из-за образования NLS, как демонстрирует анализ перестановки последовательностей, что подразумевает ключевую роль этих мотивов в функции клетки с ядрышками (которые присутствуют только во время интерфазы). Эти данные согласуются с возможным ингибированием цитокиназа в этих клетках. Белок N является многофункциональным, способствует эффективности вирусной транскрипции и патогенезу, а также взаимодействует как с геномной РНК, так и с белком М. Следовательно, увеличение заряда может повлиять на любую или все эти функции. Несмотря на эту потенциальную плейотропию, накопление положительных зарядов напрямую усиливает NLS, что коррелирует с ростом CFR коронавирусов. Смысл этих наблюдений, таким образом, состоит в том, что паттерн локализации нуклеокапсидных белков штаммов с высоким CFR отличается от такового для штаммов с низким CFR и может вносить вклад в повышенную патогенность штаммов с высоким CFR [36].

О локализации белка нуклеокапсида в ядрах и, в частности, в ядрышках коронавирусов сообщалось Wurm T. и соавт. [27], которые с помощью конфокальной микроскопии исследовали субклеточную локализацию нуклеопротеинов (N-протеинов) вируса трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV) и вируса гепатита мышей (MHV) (коронавирусы группы I и группы II соответственно). Было показано, что белки локализуются либо только в цитоплазме, либо в цитоплазме и структуре ядра.

Эти результаты согласуются с данными [37] о вирусе инфекционного бронхита (коронавирус группы III), в которых показано, что локализация N-белка в ядрышках является общей чертой семейства коронавирусов и, возможно, имеет функциональное значение. Сигналы ядерной локализации были идентифицированы в области домена III белка N от всех трех групп коронавируса, и это позволило предположить, что транспорт белка N в ядро может быть активным процессом. Кроме того, полученные результаты показывают, что белок N может нарушать деление клеток. Таким образом, установлено, что примерно 30% клеток, трансфицированных N-белком, по-видимому, подвергались клеточному делению.

Наиболее вероятным объяснением этого является то, что белок N вызывал задержку или остановку клеточного цикла, скорее всего, в фазе G2/M. Во фракции трансфицированных клеток, экспрессирующих белки коронавируса N, наблюдались многоядерные клетки и делящиеся клетки с ядрышками (которые присутствуют только во время интерфазы). Эти данные согласуются с возможным ингибированием цитокиназа в этих клетках.

Нуклеокапсидные (N) белки *семейства Coronaviridae* не имеют заметной гомологии, но имеют общий ядрышко-цитоплазматический паттерн распределения. В нуклеокапсидных белках присутствуют три предполагаемых мотива сигнала ядерной локализации. Чтобы определить роль этих предполагаемых NLS во внутриклеточной локализации SARS-CoV N, Timani K.A. и соавт. [38] провели анализ конфокальной микроскопии с использованием кроличьей антисыворотки против N. Показано, что нуклеокапсидные белки дикого типа были распределены в основном в цитоплазме. N-конец белка, который содержит NLS1 (aa38–44), был локализован в ядре. С-конец белка, который содержит как NLS2 (aa257–265), так и NLS3 (aa369–390), был локализован в цитоплазме и ядрышке. Результаты, полученные из анализа различных делеционных мутаций, показывают, что область, содержащая аминокислоты 226–289, способна опосредовать локализацию ядрышка. Делеция двух гидрофобных участков, которые активируют NLS3, восстанавливает его активность и локализуется в ядре. Кроме того, делеция богатой лейцином области (220-LALLLLDRLNRL) приводила к накоплению нуклеокапсидных белков в цитоплазме и ядрышке, а при слиянии этого пептида с EGFP локализация была цитоплазматической, что позволяет предположить, что нуклеокапсидный белок может действовать как белок-челнок. Различия в свойствах ядерной/ядрышковой локализации N от других членов семейства коронавирусов предполагают уникальную функцию N, которая может играть важную роль в патогенезе SARS [38].

Известно, что во время противовирусной защиты передача сигналов интерферона (IFN) запускает ядерный транспорт фосфорилированного тирозином STAT1 (PY-STAT1), который происходит

через подмножество ядерных переносчиков кариоферина альфа (KPNA). Многие вирусы, включая вирус Эбола, активно противодействуют передаче сигналов STAT1, чтобы противодействовать противовирусным эффектам IFN. Белок VP24 вируса Эбола (eVP24) связывает KPNA, подавляя ядерный транспорт PY-STAT1 и делает клетки невосприимчивыми к IFN. Xu W. и соавт. [39] описали структуру С-конца человеческого KPNA5 в комплексе с eVP24. В комплексе eVP24 распознает уникальный неклассический сигнал ядерной локализации (NLS), сайт связывания на KPNA5, который необходим для эффективного ядерного транспорта PY-STAT1. eVP24 связывает KPNA5 с очень высокой аффинностью, для эффективного конкурентного и ингибирования ядерного транспорта PY-STAT1. Напротив, связывание eVP24 не влияет на транспорт классического NLS-груза. Таким образом, eVP24 противодействует внутреннему врожденному иммунитету клетки, избирательно воздействуя на ядерный импорт PY-STAT1, не затрагивая при этом транспорт другого груза, который может потребоваться для репликации вируса [39].

Вирус простого герпеса 1 (HSV-1) представляет собой типичный альфа-герпесвирус, который может спровоцировать ряд тяжелых заболеваний у человека.

Хорошо известно, что характеристика субклеточной локализации является благоприятным способом оценки потенциальной роли большого количества белков. Xing J. и соавт. [40] обнаружили, что в белках, кодируемых HSV-1, 21 белок демонстрирует цитоплазматическую или субцитоплазматическую локализацию, 16 белков демонстрируют ядерное или субядерное распределение, а другие белки существуют как в ядре, так и в цитоплазме. Более того, большинство белков оболочки обнаруживают цитоплазматическую локализацию, в то время как большинство белков капсида, по-видимому, обогащены или полностью локализованы в ядре, что позволяет предположить, что субклеточное распределение конкретного белка связано с его функцией во время репликации вируса [40]. Установлено, что UL2 расположен исключительно в ядре без присутствия других вирусных компонентов, что опосредуется действием различных ядерных рецепторов импорта [41].

Биоинформатический анализ, проведенный Li M. и соавт. [42] показал, что UL2 содержит два потенциальных NLS в богатой аргинином области (от 9 до 17 аминокислот и от 69 до 75) и один богатый лейцином мотив (от 225 до 240 аминокислот). Путем конструирования серии усеченных мутантов UL2, слитых с EYFP, истинный функциональный NLS был идентифицирован по аминокислотам от 1 до 17, с ключом aa I2RRR14, который необходим для ядерного накопления UL2.

Сообщается, что UDG герпеса является многофункциональным белком, который является высококонсервативным и важным для производства

вирусной ДНК среди UL2 HSV-1, UL2 HSV-2, вируса псевдобешенства (PRV) UL2, HCMV UL114, ORF59 вируса ветряной оспы и вируса опоясывающего лишая человека и U81 вируса герпеса человека 6. В частности, UDG участвует в пути репарации разрезания оснований, который правильно отделяет ошибочно вставленный урацил от синтетической вирусной ДНК. Исследования показали, что NLS некоторых вирусных белков необходимы для эффективной репликации вируса. Например, NLS с N-концом на основном aa-концевом участке VP1-2 является благоприятным для репликации HSV-1 и экспрессии генов [42], NLS UL31 важен для репликации PRV, а NLS-опосредованное ядерное нацеливание на HCMV белок большой тегумента UL48 необходимо для роста вирусов.

На основе бактериальной искусственной хромосомы HSV-1 и метода гомологичной рекомбинации были сконструированы три рекомбинантных вируса с мутациями идентифицированного NLS, делецией и ревертантом UL2 для оценки влияния ядерного нацеливания UL2 на репликацию HSV-1. По сравнению с HSV-1 дикого типа, делеция UL2 значительно ограничивала вирусную продукцию, а мутации NLS, нацеленные на UL2 в цитоплазму (панклеточное распределение) в клетках, инфицированных рекомбинантным вирусом, показали определенную степень недостаточности пролиферации HSV-1. Более того, рекомбинантный вирус с делецией UL2 обнаружил серьезные нарушения синтеза вирусной ДНК и экспрессии мРНК, и эти процессы были частично нарушены в рекомбинантном вирусе с мутацией UL2 NLS. Авторы установили функциональный NLS в UL2 и показали, что NLS-опосредованная ядерная транслокация UL2 важна для эффективного производства HSV-1 [43].

Вирус гепатита С (HCV) представляет собой вирус с положительной цепью РНК семейства флавириусов, который реплицируется в цитоплазме инфицированных гепатоцитов. Ранее в белках HCV были идентифицированы несколько сигналов ядерной локализации (NLS) и ядерных экспортных сигналов (NES), однако имеется мало свидетельств того, что эти белки перемещаются в ядро во время инфекции. Недавно установлено, что белки комплекса ядерных пор (NPC) (называемые нуклеопоринами или Nups) присутствуют в мембранной сети и необходимы во время инфекции HCV. Идентифицировано в общей сложности 11 последовательностей NLS и NES в различных белках HCV. Продемонстрировано прямое взаимодействие между белками HCV и импортином $\alpha 5$ (IPOA5/kar $\alpha 1$), импортином $\beta 3$ (IPO5/kar $\beta 3$) и экспортином 1 (XPO1/CRM1) как *in vitro*, так и в культуре клеток. Эти взаимодействия могут быть нарушены с помощью пептидов, содержащих специфические последовательности NLS или NES белков HCV. Более того, используя синхронизированную систему инфицирования, Levin A. и соавт. в ряде исследований, показали, что эти

пептиды ингибируют инфекцию HCV на различных этапах жизненного цикла вируса. Подавляющее действие этих пептидов делит их на две группы. Первая группа связывает IPOA5 и подавляет инфекцию на стадии репликации жизненного цикла HCV. Вторая группа связывает IPO5 и активна как во время ранней репликации, так и во время ранней сборки. Эта работа очерчивает весь жизненный цикл HCV и активное участие последовательностей NLS во время репликации и сборки HCV. Учитывая обилие последовательностей NLS в белках HCV, установлено, что Nups играют роль в инфицировании HCV, и перемещение репортера NLS double-GFP в инфицированных HCV клетках. Авторами выдвинута гипотеза о том, что NPC-подобные структуры и ядерные транспортные факторы действуют в мембранной сети, создавая среду, способствующую репликации вируса [44-47].

На сегодняшний день многие этапы репликации вируса хорошо изучены на молекулярном уровне. Связывание, проникновение, сборка и почкование вирусов в настоящее время интенсивно изучаются во многих системах. Однако этапы транспортировки ядер во время проникновения и выхода вируса практически остались неизученными.

Структурная организация NPC в настоящее время становится все более ясной, специфические нацеленные сигналы и рецепторы были идентифицированы, и были разработаны различные анализы *in vitro* и *in situ*. Теперь представляется возможным проанализировать различные шаги, которые приводят к нацеливанию вируса в ядро и из него. Основная проблема будет заключаться в том, что разные семейства вирусов используют разные стратегии. Более того, транспорт через ядерную мембрану часто сопровождается сложными этапами разборки, необходимыми для высвобождения генома и дополнительных белков в транспортно-компетентной форме. Природа этих шагов зависит от сложных взаимодействий между клеточными и вирусными молекулами, которые могут различаться между вирусами.

Понимание внутриклеточного движения вирусного генома имеет решающее значение для разработки и совершенствования новых методов лечения генов. Наконец, вирусы остаются важными патогенами для людей, домашнего скота и сельскохозяйственных культур, и понимание путей ядерного переноса открывает возможности для новых противовирусных стратегий [48].

Nuclear localization signal peptides (NLS) and their role in viral pathogenicity

Nosalskaya Tatiana Nikolaevna, Martynov Artur Viktorovich, Bomko Tatiana Vasilievna

The review provides data about nuclear localization signal peptides (NLS) and their function in the cell, incl. with a viral infection process. The binding, penetration, assembly, and budding of viruses are currently being

intensively studied in many systems. However, the stages of nuclear transport during the penetration and release of the virus have remained practically unexplored. NLS were first identified in the large T antigen virus SV40 and from nucleoplasmin, and then were identified in a large number of proteins. They usually contain short base peptides includes lysine or arginine residues in the form of mono- or bipartite signals. NLSs include the "pat4" motif, which consists of a contiguous stretch four essential amino acids (arginine and lysine). Both coronaviruses and arteriviruses show similar genomic organization and belong to *Nidovirales*. Although both families encode nucleoproteins (N-proteins), the main function of which is to bind viral RNA, NLS-containing proteins has different sizes and do not have significant homology. The review provides the characteristics and structure of NLS for many viral proteins, and shows their role in the pathogenicity of viruses.

Keywords: Nuclear localization signal, viruses, coronaviruses, influenza, hepatitis, virulence

References

1. Mao Y.S., Zhang B., Spector D.L. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends in Genetics*. 2011. 27. №8. P.295–306.
2. Boulikas T. Nuclear localization signals (NLS). *Critical Rev. Eukaryotic Gene Expression*. 1993. 3. №3. P. 193–227.
3. Rowland R.R.R., Yoo D. Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Res.* – 2006. – 95, №1-2. – P. 23–33.
4. Zemach A., Li Y., Ben-Meir H., Oliva M., et al. Different Domains Control the Localization and Mobility of like heterochromatin protein1 in Arabidopsis Nuclei W. *Plant Cell*. 2006. 18. P. 133–145
5. Melen K., Kinnunen L., Fagerlund R., et al. Nuclear and Nucleolar Targeting of Influenza A Virus NS1 Protein: Striking Differences between Different Virus Subtypes. *J. Virol*. 2007. 81. №11. P. 5995–6006.
6. Garcia-Bustos J., Heitman J., Hall M.N. Nuclear protein localization. *BBA*. 1991. 107. №1. P. 83–101.
7. Robbins J., Dilworth S.M., Laskey R.A., Dingwall C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*. 1991. 64. №3. P.615–623.
8. Cokol M., Nair R., Rost B. Finding nuclear localization signals. *EMBO Reports*. 2000. 1, №5. P. 411–415.
9. Dingwall C., Laskey R.A. Nuclear targeting sequences — a consensus? *Trend Biochem. Sci*. 1991. 16. P. 478–481.
10. Conti E., Kuriyan J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α . *Structure*. 2000. 8. №3. P. 329–338.
11. Fontes M.R.M., Teh T., Kobe B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear

- localization sequences by mammalian importin- α 11. Edited by K. Nagai. *J Mol. Biol.* 2000. 297. №5. P. 1183–1194.
12. Hodel M.R., Corbett A.H., Hodel A.E. Dissection of a Nuclear Localization Signal. *J. Biol. Chem.* 2000. 276. №2. P. 1317–1325.
13. Matsuura Y., Stewart M. Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J.* 2005. 24. №21. P. 3681–3689.
14. Matsuura Y., Stewart M. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature.* 2004. 432. №7019. P. 872–877.
15. Gilchrist D., Rexach M. Molecular Basis for the Rapid Dissociation of Nuclear Localization Signals from Karyopherin α in the Nucleoplasm. *J. Biol. Chem.* 2003. 278. №51. P. 51937–51949.
16. Lange A., Mills R.E., Lange C.J., et al. Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α . *J Biol Chem.* 2007. 282. №8. P. 5101–5105
17. Boulikas T. Putative Nuclear Localization Signals (NLS) in Protein Transcription Factors. *J. Cell. Biochem.* 1994. 55. P. 32–58.
18. Macara I.G. Transport into and out of the Nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. 65. №4. P. 570–594.
19. Whittaker G.R. Virus nuclear import. *Advanced Drug Del. Rev.* 2003. 55. P. 733–747.
20. Jakob R. Electroporation-mediated delivery of nucleolar targeting sequences from Semliki Forest virus nucleocapsid protein. *Prep. Biochem.* 1995. 25. №3. P. 99–117.
21. Michel M.R., Elgizoli M., Dai Y., et al. Karyophilic properties of Semliki Forest virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 1990. 64. №10. P. 5123–5131.
22. Peranen J., Rikonen M., Liljestrom P., Kaariainen L. Nuclear localisation of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* 1990. 64. №8. P. 1888–1896.
23. Favre D., Studer E., Michel M.R. Two nucleolar targeting signals present in the N-terminal part of Semliki Forest virus capsid protein. *Arch. Virol.* 1994. 137. №1–2. P. 149–155.
24. Wengler G., Wurfner D., Wengler G. Identification of a sequence element in the alphavirus core protein which mediates interaction of cores with ribosomes and the disassembly of cores. *Virol.* 1992. 191. №2. P. 880–888.
25. Fazakerley J.K., Boyd A., Mikkola M.L., Kaariainen L. A single amino acid change in the nuclear localisation sequence of the nsP2 protein affects the neurovirulence of semliki forest virus. *J. Virol.* 2002. 76. №1. P. 392–396.
26. Hiscox J.A. The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. *Virus Res.* 2003. 951. №1–2. P. 13–22.
27. Wurm T., Chen H., Britton P. et al. Localisation to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins and the protein may disrupt host cell division. *J. Virol.* 2001. 75. №19. P. 9345–9356.
28. Tijms M.A., van der Meer Y., Snijder E.J. Nuclear localisation of non-structural protein 1 and nucleocapsid protein of equine arteritis virus. *J. Gen. Virol.* 2002. 83. P. 795–800.
29. O’Neill R.E., Jaskunas R., Blobel G., et al. Nuclear Import of Influenza Virus RNA Can Be Mediated by Viral Nucleoprotein and Transport Factors Required for Protein Import. *J. Biol. Chem.* 1995. 273. №39. P. 22701–22704.
30. Cros J.F., Garcia-Sastre A., Palese P. An Unconventional NLS is Critical for the Nuclear Import of the Influenza A Virus Nucleoprotein and Ribonucleoprotein. *Traffic.* 2005. 6. P. 205–213.
31. Cunningham M.D., Cleaveland J., Nadler S.G. An intracellular targeted NLS peptide inhibitor of karyopherin α :NF- κ B interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. 300. P. 403–407.
32. Ozawa M., Fujii K., Muramoto Y., et al. Contributions of Two Nuclear Localization Signals of Influenza A Virus Nucleoprotein to Viral Replication. *J. Virol.* 2007. 81. №1. P. 30–41.
33. Sun W.W.H., Panté Y.-H.B., N. Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virol. J.* 2007. 4. №49. P. 1–12.
34. Gussow A.B., Auslander N., Faure G., et al. Genomic determinants of pathogenicity in SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2020. P. 1–7.
35. You J. Subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *J General Virol.* 2005. 86. №12. P. 3303–3310.
36. McBride R., van Zyl M., Fielding B. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses.* 2014. 6. №8. P. 2991–3018.
37. Hiscox J.A., Wurm T., Wilson L., et al. The Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Nucleoprotein Localizes to the Nucleolus. *J. Virol.* 2001. 75. №1. P. 506–512.
38. Timani K.A., Liao Q., Ye L., et al. Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Res.* 2005. 114. P. 23–34.
39. Xu W., Edwards M.R., Borek D.M., et al. Ebola Virus VP24 Targets a Unique NLS Binding Site on Karyopherin Alpha 5 to Selectively Compete with Nuclear Import of Phosphorylated STAT1. *Cell Host Microb.* 2014. 16. P. 187–200.
40. Xing J., Wang S., Li Y., et al. Characterization of the subcellular localization of herpes simplex virus type 1 proteins in living cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 2010. 200. №1. P. 61–68.
41. Cai M., Huang Z., Liao Z., et al. Characterization of the subcellular localization and nuclear import molecular mechanisms of herpes simplex virus 1 UL2. *Biol. Chem.* 2017. 398. №4. P. 1–17.
42. Abaitua F., Hollinshead M., Bolstad M., et al. A Nuclear Localization Signal in Herpesvirus Protein VP1-2 Is Essential for Infection via Capsid Routing to the Nuclear Pore. *J. Virol.* 2012. 86. №17. P. 8998–9014.
43. Li M., Zou X., Wang Y., et al. The nuclear localization signal-mediated nuclear targeting of herpes simplex virus 1 early protein UL2 is important for efficient viral production. *AGING.* 2020. 12. №3. P. 2921–2938.
44. Neufeldt C.J., Joyce M.A., Levin A., et al. Hepatitis C virus-induced cytoplasmic organelles use the nuclear

- transport machinery to establish an environment conducive to virus replication. *PLoS Pathog.* 2013. 9. №10. P. 1-16.
45. Levin A, Hayouka Z, Friedler A, Loyter A. Over-expression of the HIV-1 Rev promotes death of nondividing eukaryotic cells . *Virus Genes.* 2010. 40. P. 341–346.
46. Levin A, Hayouka Z, Friedler A, Loyter A. Transportin 3 and importin alpha are required for effective nuclear import of HIV-1 integrase in virus-infected cells . *Nucleus.* 2010. 1. P. 422–431.
47. Levin A., Neufeldt C.J., Pang D., et al. Functional Characterization of Nuclear Localization and Export Signals in Hepatitis C Virus Proteins and Their Role in the Membranous Web. *PLoS ONE.* 2014. 9. №12. P. 1-36.
48. Whittaker G.R., Helenius A. Nuclear Import and Export of Viruses and Virus Genomes. . *Virology.* 1998. 246. №1. P. 1–23.