

УДК 577.612.127

ВИРУС КОКСАКИ ТИПА В3 ВЫЗЫВАЕТ АУТОФАГИЮ В КАРДИОМИОЦИТАХ *in vivo**

© 2015 Ксиа Жей^{1#}, Бинг Бей^{3#}, Бохей Ю¹, Тенайинг Венг¹,
Хуапэнг Венг², Яо Венг², Хуиян Ли³, Лей Тонг¹, Ян Венг¹,
Фенгмин Женг¹, Вернан Жао^{2**}, Жаохуа Жонг^{1**}

¹ Harbin Medical University, Department of Microbiology,
194 Xuefu Road, Harbin 150086, China; E-mail: zhongghz@hrbmu.edu.cn

² Harbin Medical University, Department of Cell Biology,
194 Xuefu Road, Harbin 150086, China; E-mail: zhaowr@ems.hrbmu.edu.cn,
zhaowenran2002@aliyun.com

³ First Affiliated Hospital of Harbin Medical University,
Department of Cardiology, 23 Youzheng Street, Harbin 150001, China

Поступила в редакцию 20.11.14
После доработки 09.02.15

Вирусный миокардит – это общее заболевание, приводящее к хронической кардиомиопатии и нарушению сердечной деятельности. Вирус Коксаки типа В (СVB) является одним из главных патогенов, вызывающих вирусный миокардит. Ранее показано, что аутофагия способствует репликации СVB в клетке хозяина. В представленной работе миокардит вызывали у мышей Balb/c 3-недельного возраста путем введения им вируса Коксаки, и затем изучали результаты воздействия вирусной инфекции на клетки миокарда (кардиомиоциты). Исследования, проведенные методом электронной микроскопии, показали, что напоминающие аутофагосомы везикулы появлялись в кардиомиоцитах зараженных мышей на 3-, 5- и 7-й дни после введения СVB. При этом в миокарде инфицированных вирусом мышей и в кардиомиоцитах, изолированных из желудочков сердца зараженных животных, существенно возрастал уровень липидированной формы легких цепей 3 (LC3), ассоциированных с микротрубочками белка 1 (т.е. происходила трансформация цитоплазматического белка LC3-I в мембранный белок аутофагосом – LC3-II). Увеличение уровня белка LC3-II происходило одновременно с нарастанием количества вирусной РНК и белка в миокарде или в изолированных кардиомиоцитах. Уровни экспрессии вирусной РНК и продукции вирусного белка в первичной культуре кардиомиоцитов существенно снижались после обработки клеток ингибитором аутофагии – 3-метиладенином (3-МА). Помимо этого, было обнаружено, что в миокарде и в кардиомиоцитах инфицированных мышей возрастал уровень экспрессии и повышалась степень фосфорилирования протеинкиназы ERK (extra-cellular signal regulated kinase), хотя роль этого фермента в регуляции аутофагии еще не выяснена. Таким образом, было продемонстрировано, что ответом кардиомиоцитов на введение СVB является активизация процесса формирования аутофагосом *in vivo*, что может способствовать репликации вируса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус Коксаки В, кардиомиоциты, миокард, аутофагия, аутофагосома.

Вирусный миокардит – широко распространенное заболевание, сопровождающееся серьезными осложнениями и приводящее к гибели животных в детском и юношеском возрасте [1–3]. Среди наиболее известных вирусных патогенов, вызывающих миокардит, особо выделяется вирус Коксаки типа В (СVB) [4–5]. Он относится к группе энтеровирусов (*Enterovirus*) семейства пикорнавирусов (Picornaviridae); у СVB отсутствует оболочка, а геном представляет со-

бой одноцепочечную РНК. Несмотря на то, что большинство вызываемых этим вирусом сердечных патологий протекают бессимптомно, серьезные формы миокардитов могут привести к повреждению миокарда и остановке сердца [6–8]. Примерно у 10% пациентов с симптомами вирусного миокардита в конце концов развивается хроническая кардиомиопатия [9–11]. Ранее было установлено, что в развитие вызываемого СVB миокардита помимо прямого вирусного поражения миокарда вносит свой вклад и иммунная система организма хозяина, однако, механизмы патогенеза этого заболевания еще предстоит выяснить [12–14]. Исследования последних лет показали, что процесс инфицирования вирусом СVB включает в себя аутофагию [15–20].

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 14-311, 12.04.2015.

** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

Аутофагия – это протекающий во многих клетках естественный катаболический процесс, при котором долгоживущие белки и поврежденные органеллы деградируют в лизосомах [21]. Считается, что аутофагия может служить для обеспечения клетки питательными веществами и энергией в условиях голодания, при повреждении или патогенной инвазии [22, 23]. Процесс аутофагии начинается с формирования в цитоплазме клеток небольшой плоской замкнутой мембранной структуры непонятного происхождения, напоминающей распластаный пустой мешочек и известной под названием «изолированная мембрана» или «фагофор». Такой плоский мембранный мешок затем увеличивается, вытягивается, потом изгибается и, наконец, замыкается, образуя везикулу – аутофагосому, окруженную двумя липидными бислоями и включающую в себя те или иные внутриклеточные компоненты. Впоследствии эта аутофагосома сливается с лизосомой с образованием аутофаголизосомы, где и происходит деградация заключенного в ней клеточного материала под влиянием лизосомальных ферментов [24, 25]. Аутофагия играет важную роль при вирусной инфекции. Некоторые вирусы способны избегать переваривания, тогда как другие, например, CVB могут использовать аутофагию для стимуляции своей репликации [17, 18].

Из литературы известно, что CVB3 и CVB4 могут индуцировать образование аутофагосом *in vitro*, а ингибирование процесса аутофагии приводит к снижению продукции вирусных частиц [17–19]. Предполагается, что CVB3 ингибирует слияние аутофагосом с лизосомами и тем самым обеспечивает себя достаточным количеством мембранных структур, на которых осуществляется самосборка вирусного РНК-репликативного комплекса [26]. Взаимосвязь между репликацией CVB и аутофагией была продемонстрирована также и *in vivo*. На клетках HeLa и на панкреатических клетках было показано, что CVB3 индуцирует образование аутофагосом и ингибирует их слияние с лизосомами [18]. Специфическое нарушение аутофагии в ацинарных панкреатических клетках значительно тормозило репликацию CVB, особенно на ранних стадиях инфицирования, и улучшало функционирование поджелудочной железы [17]. Учитывая все эти данные, можно предположить, что блокирование аутофагии может быть использовано в качестве способа борьбы с CVB инфекцией. Однако оставалось неясным, имеется ли взаимосвязь между вирусной репликацией и аутофагией в клетках миокарда, являющихся первичной мишенью для CVB.

Аутофагия была необходима для поддержания структуры и функционирования кардиомио-

цитов [27]. Например, было установлено, что генетически обусловленный недостаток белка Atg5 (autophagy protein 5) у мышей приводил к развитию сердечной дисфункции, сопровождающейся расширением желудочков, тогда как при стимуляции аутофагии путем экспрессии дополнительного количества Atg7 наблюдалось улучшение в функционировании миокарда и увеличивалась продолжительность жизни этих животных [28]. Напротив, естественная аутофагия в ацинарных клетках поджелудочной железы могла и не играть большой роли, поскольку недостаток Atg5 почти не оказывал влияние на морфологию и функционирование этих клеток [17]. Возможно, что биологическое значение аутофагии не одинаково в клетках различных типов. Ну и наконец, было замечено, что аутофагия активируется при ишемии миокарда и кардиомиопатии, вызванной генетическими отклонениями от нормы [23–27, 29].

Признавая важность аутофагии для функционирования кардиомиоцитов, мы попытались ответить на вопрос, может ли CVB3 провоцировать аутофагию в этих клетках. В качестве модели были использованы мыши, зараженные CVB3 и заболевшие вирусным миокардитом. Также изучена роль аутофагии в репликации вируса в первичной культуре кардиомиоцитов, обработанных ингибитором аутофагии 3-метил-аденином (3-МА). Все полученные данные свидетельствовали о том, что заражение животных вирусом CVB3 вызывало аутофагию в кардиомиоцитах *in vivo* и это способствовало размножению вируса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антитела и химические реактивы. Поликлональные антитела против энтеровирусного белка VP1 (M 7064, «Dako», США), антитела против белка LC3-I/II (L7543; «Sigma», США), против ERK1/2 и фосфо-ERK1/2 (9102L и 9101, «Cell Signaling», США) и антитела против β -актина (TA09, «Zhongshan Golden Bridge», Китай) использовали в разведении 1 : 1000; вторичные козы антимышиные IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (2B-2305, «Zhongshan Golden Bridge», Китай) – в разведении 1 : 5000, 3-метил-аденин (3-МА, «Sigma-Aldrich», США).

Клеточная культура и вирус. Клетки HeLa культивировали в среде RPMI 1640 («Life Technologies», США) с добавкой 5%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS, «Biological Industries», Израиль) и смеси антибиотиков (пенициллин–стрептомицин). Вирус CVB3 штамма Нэнси был получен в Центре контроля

эндемических заболеваний Китая. Вирус размножали в клетках HeLa, культивированных как описано выше. Титр вируса определяли путем подсчета бляшек лизиса [30] и выражали в ФФЕ/мл (фокус-формирующие единицы).

Заражение мышей вирусом. Линейные мыши Balb/c были получены из питомника Харбинского медицинского университета. Эксперименты с животными были выполнены в соответствии с Правилами по работе с лабораторными животными Харбинского медицинского университета. Самцам мышей 3-недельного возраста внутрибрюшинно вводили CVB3 ($1,2 \times 10^8$ ФФЕ/0,3 мл). Через 0, 3, 5 и 7 дней с момента инфицирования мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Сердца перфузировали обратным током через аорту 10 мл раствора 2%-ного параформальдегида и 2%-ного глутаральдегида в 100 мМ Na-какодилатном буфере с рН 7,4 при комнатной температуре. Немедленно после перфузии сердца удаляли, желудочки вырезали и использовали для гистопатологического и электронно-микроскопического исследований и для экстракции РНК и белка.

Изоляция кардиомиоцитов и их заражение вирусом. Первичную культуру мышечных клеток (кардиомиоцитов) из миокарда желудочков сердца получали как было описано ранее [31, 32]. Чистоту препарата определяли визуально с помощью фазово-контрастного микроскопа. Изолированные кардиомиоциты (10^5 /мл) культивировали в течение 2 ч, а затем обрабатывали 40 мкМ 3-МА в течение 1 ч и заражали CVB3 (10^4 ФФЕ/мл) в течение 8 ч. Из клеток, полученных от инфицированных животных или выращенных в культуре, экстрагировали белковую фракцию и анализировали ее методом Ds-Na-ПААГ электрофореза и иммуноблоттинга.

Полуколичественный анализ методом ПЦР в режиме реального времени (RT-ПЦР). Определение CVB3 РНК проводили полуколичественным RT-ПЦР с помощью LightCycler 2.0 («Roche», Швейцария). Смесь SybrGreen master mix («TaKaRa», Китай) была использована в соответствии с инструкцией производителя. Кардиомиоциты культивировали в 6-луночных планшетах, экстрагировали из них фракцию общей РНК с помощью 500 мкл реагента TRIzol reagent («Invitrogen», США) и перерастворяли ее в 20 мкл бидистиллированной воды. Синтез кДНК проводили с использованием 1 мкл РНК, антисмыслового праймера и реагента PrimeScript RT reagent («TaKaRa», Япония). RT-ПЦР выполняли в 20 мкл смеси, содержащей $1 \times$ SybrGreen master mix, 1 мкл кДНК и по 600 нМ прямого и обратного праймеров. В качестве внутреннего контроля была использована GAPDH мРНК.

Каждый эксперимент выполняли в трех независимых повторах. Уровень РНК определяли $2^{\Delta\Delta Ct}$ методом, указанным в работе [33]. Праймеры для CVB3: 5'-GCACACACCCCTCAAACCAGA-3' (смысловой) и 5'-ATGAAACACGGACACCCAAAG-3' (антисмысловой). Праймеры для GAPDH (глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа): 5'-AGGGCATCTTGGGCTACAC-3' (смысловой) и 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGA-3' (антисмысловой).

Вестерн-блоттинг. Желудочки сердца или изолированные кардиомиоциты промывали буфером PBS и лизировали в течение 15 мин на льду в буфере для радиоиммунопреципитационного теста (RIPA, «Thermo», США), содержавшего коктейль из ингибиторов протеаз и 1%-ного фенолметилсульфонилфторида (PMSF, «Bio-otime», Китай). Для получения осветленных экстрактов клеточные лизаты центрифугировали при 12 000 g и 4° в течение 10 мин. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда с использованием набора Protein Assay Kit («Bio-Rad», США). Ds-Na-электрофорез проводили в 15%-ном ПААГ и переносили белки на поливинилдендифторидные мембраны (PVDF, «Millipore», США). Мембраны блокировали в течение 1 ч 5%-ным обезжиренным молоком в буфере для блокирования (TBS, содержащий 0,3%-ный Tween 20) и обрабатывали первичными антителами в течение ночи при 4°. Мембраны трижды промывали буфером для блокирования и инкубировали с конъюгатами вторичных антител («Dako», США) в течение 2 ч при комнатной температуре. Иммунореактивные полосы визуализировали хемилюминесцентным методом с использованием в качестве субстрата SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate («Thermo», США). Для внутреннего контроля был использован β -актин.

Электронная микроскопия. Желудочки инфицированных мышей фиксировали 2%-ным глутаральдегидом в течение 24 ч и затем обрабатывали 1%-ным тетроксидом осмия («Electron Microscopy Sciences», США). Из ткани готовили ультратонкие срезы с помощью ультрамикротомы («Reichert-Jung», Германия) и окрашивали их насыщенным раствором уранилацетата и цитратом свинца (все – «Electron Microscopy Sciences», США) при комнатной температуре. Срезы изучали на трансмиссионном электронном микроскопе (H7650; «Hitachi», Япония).

Статистический анализ. Все данные были представлены как средние значения \pm s.d. Различия между тестируемыми и контрольными значениями определяли в t-тесте Стьюдента и считали их статистически значимыми при $p < 0,05$ (*) и $p < 0,01$ (**).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

CVB3 индуцирует формирование везикул, похожих на аутофагосомы. Активацию аутофагии в кардиомиоцитах мы оценивали по следующим критериям. Во-первых, наблюдая за изменениями в морфологии миокарда инфицированных животных, обращали внимание на наличие бимембранных везикул, похожих на аутофагосомы. Во-вторых, оценивали уровень липидированной формы легких цепей 3 (LC3) ассоциированного с микротрубочками белка 1 (LC3-II) в миокарде и изолированных кардиомиоцитах, инфицированных вирусом CVB3 мышей.

Для создания модели вирусного миокардита *in vivo* мы использовали самцов мышей Balb/c трехнедельного возраста, зараженных внутрибрюшинно вирусом CVB3 (0,3 мл, 4×10^8 ФФЕ/мл). Миокард забирали на 0-, 3-, 5- и 7-й дни после введения вируса (р.и.) и проводили его гистологический анализ. Некротические локусы с воспалительным инфильтратом появлялись уже на 3-й день после заражения животных вирусом (рис. 1, А). Поскольку канонический миокардит характеризуется первичным воспалением миокарда [11, 34, 35], мы заключили, что внутрибрюшинная инокуляция CVB3 мышам приводила к развитию острого миокардита.

Из миокарда желудочков сердца, полученных от животных на 0-, 3- и 5-й дни (р.и.), готовили сверхтонкие срезы для трансмиссионной электронной микроскопии. Установлено, что в кардиомиоцитах незараженных животных хорошо просматривались миофибриллы и правильно расположенные митохондрии (рис. 1, В). На 3-й день после инфекции наблюдалось исчезновение организованных миофибрилл, а цитоплазма подвергающихся некрозу клеток была заполнена митохондриями неправильной формы. И самое важное, что появлялись группы бимембранных везикул размером 0,2–0,35 мкм (рис. 1, В). Эти везикулы напоминали аутофагосомы, поскольку содержали элементы цитозоля – небольшие пятнышки, похожие на рибосомы. Несмотря на то, что в наблюдаемых на электронных микрофотографиях пораженных вирусом областях не были представлены для сравнения интактные кардиомиоциты, маловероятно, чтобы похожие на аутофагосомы везикулы формировались не в миоцитах, поскольку именно эти клетки характеризуются наличием большого количества митохондрий в цитоплазме [36]. В отличие от CVB3-инфицированных клеток HeLa, в пораженных вирусом кардиомиоцитах этих везикул было много меньше. Кроме того, размер наблюдаемых везикул в зараженных клетках миокарда был меньше, чем в ацинарных клетках

поджелудочной железы, где были обнаружены мегафагосомы [17, 18]. Мы считаем, нам удалось продемонстрировать, что после заражения животных вирусом CVB3 в их кардиомиоцитах действительно происходит формирование везикул, похожих на аутофагосомы.

Уровень LC3-II значительно повышен в миокарде CVB3-инфицированных животных. Самосборка аутофагосом сопровождается переходом цитозольного белка LC3-I в свою липидированную форму – LC3-II, встраивающуюся в мембрану аутофагосом [37]. Таким образом, переход LC3-I > LC3-II отражает процесс формирования аутофагосом и свидетельствует о наличии аутофагии. Для установления аутофагии *in vivo* мы заражали мышей вирусом CVB3 и на 0-, 3-, 5- и 7-й дни р.и. определяли в их миокарде уровни вирусной РНК, вирусного белка VP1, белков LC3-I/II и киназы ERK (рис. 2, А).

Как следует из рис. 2, А, белки LC3-I и LC3-II не были обнаружены ни в миокарде неинфицированных животных, ни на 0-й день р.и. инфекции, тогда как на 3–7-й дни после заражения вирусом CVB3 уровни этих белков значительно возрастали, что свидетельствовало об изменении экспрессии генов под влиянием CVB3 *in vivo*. Причем, уровень экспрессии LC3-II значительно превышал уровень LC3-I на 3-й день р.и. (рис. 2, В), что совпадало с накоплением в клетках везикул, похожих на аутофагосомы (рис. 1, В, части с, d). Повышение уровня LC3-II совпадало по времени и с синтезом вирусной РНК (рис. 2, D) и белка (рис. 2, С). На 5- и 7-й дни р.и. соотношение LC3-II/LC3-I существенно снижалось одновременно с некоторым снижением уровней вирусных РНК и белка. Можно предположить, что на продукцию вируса и синтез белков LC3 отрицательно влиял некротический процесс, протекающий в кардиомиоцитах, и сопровождающий его фагоцитоз. Эти данные подтверждаются и нашими предыдущими наблюдениями, свидетельствующими о постепенном снижении уровней вирусных РНК и белков в миокарде новорожденных мышат, инфицированных CVB3 [38].

Процесс аутофагии каким-то образом согласован также с активацией киназы ERK (протеинкиназа, регулируемая внеклеточными сигналами) (рис. 2, А и 3, В), но в деталях эту взаимосвязь мы в своей работе не изучали. Несмотря на то, что в проведенном нами исследовании наблюдались вариации интенсивности процесса аутофагии в миокарде после заражения животного вирусом, можно было четко проследить прямую зависимость между увеличением уровня LC3-II и началом репликации CVB3 в кардиомиоцитах.

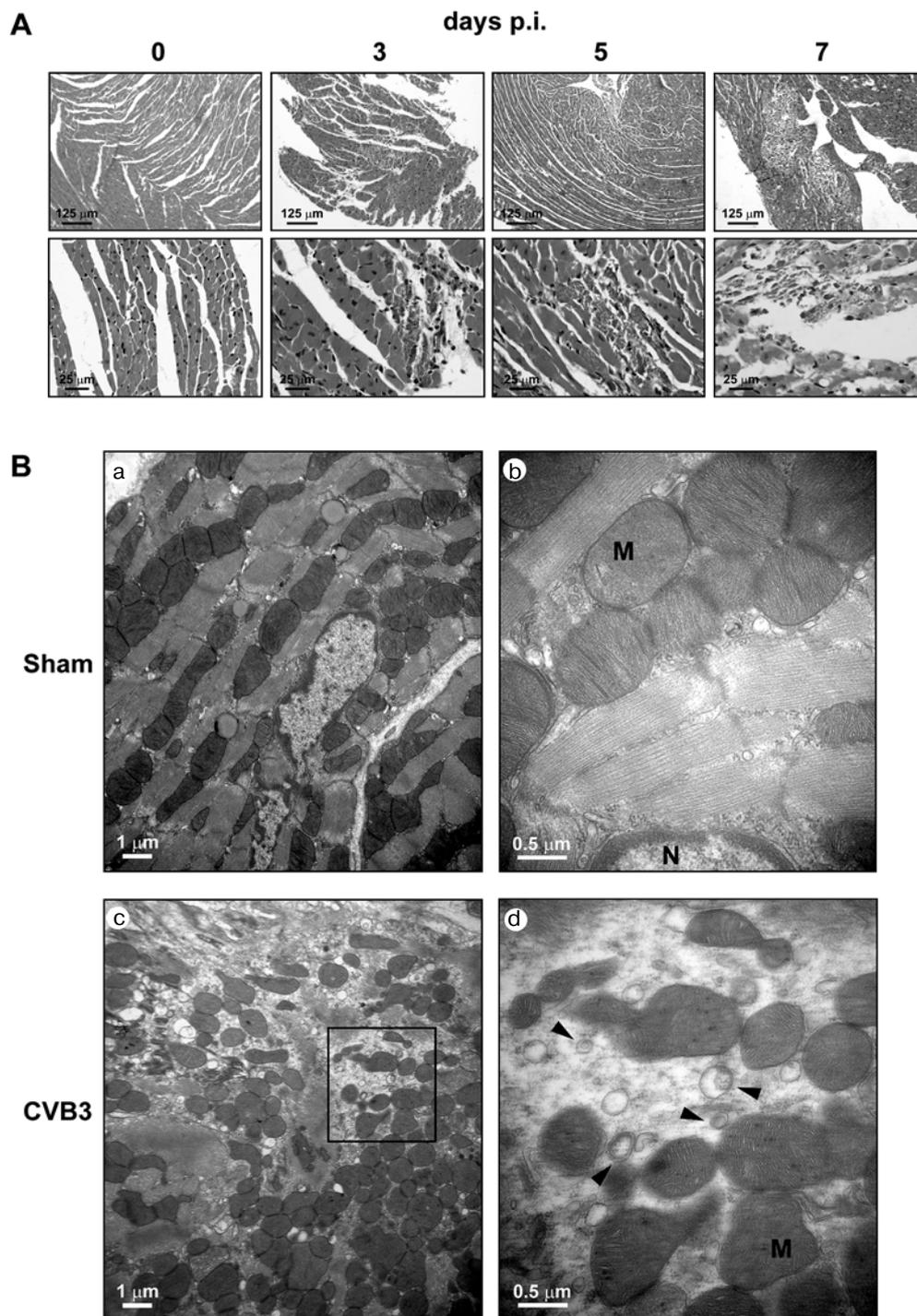


Рис. 1. Заражение вирусом CVB3 мышей вызывает появление похожих на аутофагосомы везикул в клетках их миокарда. Инфицирование мышей Valb/c проводили с 3-недельного возраста из расчета 4×10^8 ФФЕ/мл (по 0,3 мл на мышшь). Миокард забирали на 0-, 3-, 5- и 7-й дни p.i. Гистопатологические изменения изучали методами световой (A) и электронной (B) микроскопии. (A) – срезы ткани гистологического HE-окрашивания. Представлены репрезентативные микроснимки ($n = 5$) со степенью увеличения: 100x (верхний ряд) и 200x (нижний ряд). Показана инфильтрация клеток воспаления в ткани миокарда на 3-, 5-, 7-й дни p.i. Степень поражения миокарда была различной на 3-, 5-, 7-й дни p.i. Поражение миокарда наступало уже на 3-й день и принимало тяжелую форму на 7-й день p.i. (B) – микроснимки, выполненные с помощью электронного микроскопа. Степень увеличения: 8000x (a, c), 15 000x (b, d). (a, b) – Непораженный вирусом миокард, (c, d) – пораженный миокард на 3-й день p.i. В клетках пораженного миокарда присутствовали бимембранные везикулы размером 0,2–0,5 мкм (наконечники стрелок), расположенные вблизи митохондрий (M). Миофибриллы были повреждены, а митохондрии дезорганизованы. На всех снимках указаны размеры масштабных отрезков

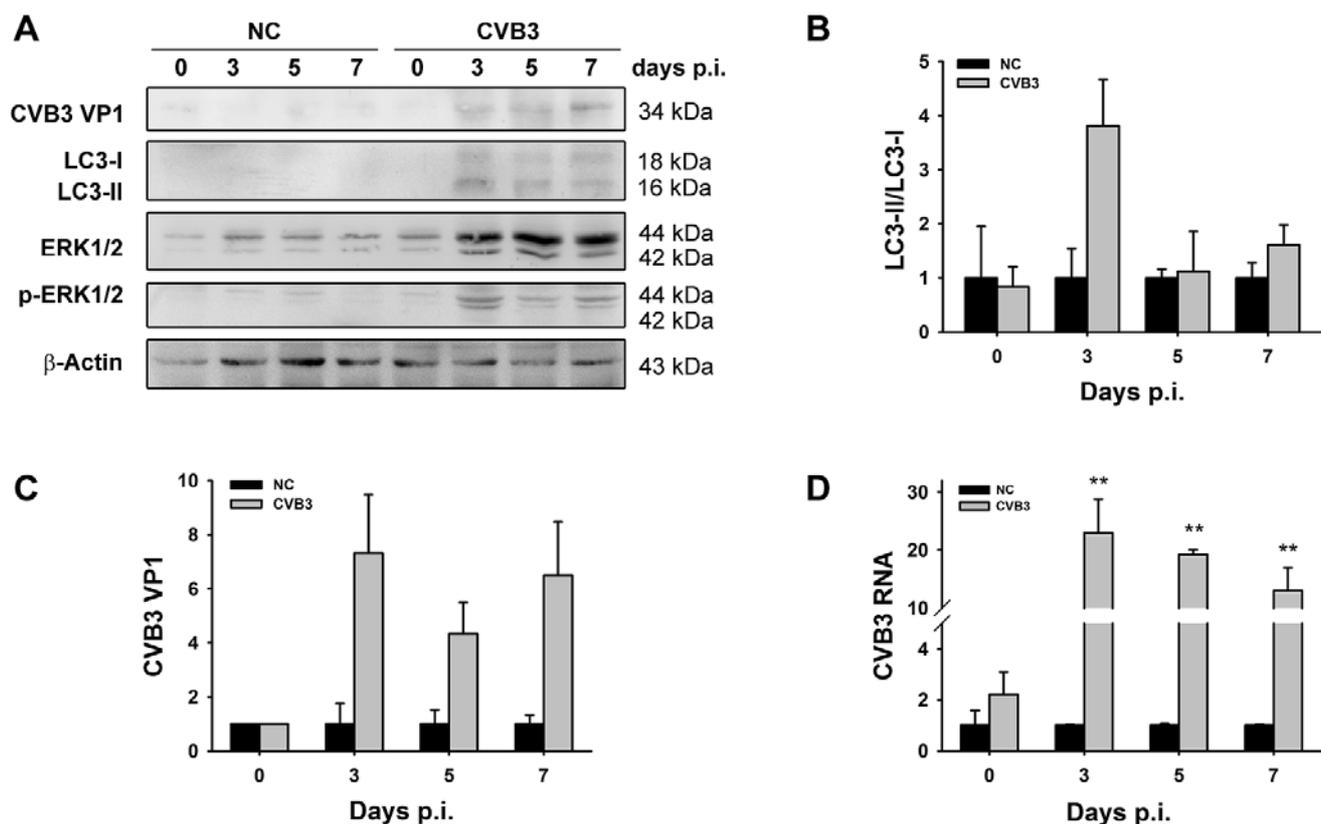


Рис. 2. Повышение уровня LC3-II в миокарде мышей, зараженных вирусом CVB3. Мышей инфицировали CVB3 и на 0-, 3-, 5-, 7-й дни p.i. вырезали миокард желудочков сердца и проводили анализ методами Вестерн-блоттинга (A) и RT-qPCR (D). (B) и (C) – результаты денситометрических измерений уровней белков LC3II (B) и VP1 (C) после Вестерн-блоттинга. ERK1/2 и p-ERK1/2 – дефосфо- и фосфорформы протеинкиназы ERK типов 1 и 2. Здесь и далее на гистограммах представлены средние значения по трем независимым экспериментам, нормированные относительно уровней GAPDH РНК или белка β-актина. NC – миокард из незараженных животных, CVB3 – миокард из зараженных вирусом животных

Проведенные ранее исследования *in vivo* позволили установить, что адаптерный протеин p62, деградирующий одновременно с аутофagosомами, накапливался в зараженных CVB3 ацинарных клетках поджелудочной железы [39, 40]. Это означало, что CVB3 блокирует течение процесса аутофагии. Напротив, в исследованиях Вонга и соавт. [20] было показано, что уровень p62 оставался неизменным в клетках HeLa во время CVB-инфекции. В своей работе мы также не обнаружили изменений уровня p62 (данные не представлены). Несмотря на то, что многие исследователи рассматривают p62 в качестве одного из маркеров, указывающих на протекание процесса аутофагии [41], пока остается неясным, деградирует ли этот белок исключительно только вместе с аутофagosомами. В частности, Бардаг–Горце и соавт. [42] установили, что уровень p60 повышается при ингибировании протеасомы, а, следовательно, этот белок мог подвергаться протеосомальной деградации. Кроме того, известно, что p62 играет важную роль в

доставке K63-полиубиквитинированных белков для деградации убиквитин-зависимой протеосомной системой [43]. Поскольку инфицирование вирусом CVB3 провоцирует убиквитин-зависимую деградацию белков [44, 45], то постоянство уровня p62, наблюдаемое нами в зараженных клетках миокарда крысы, можно было объяснить его деградацией протеосомой. Остается также невыясненным, обусловлено ли возрастание уровня LC3-II увеличением количества аутофagosом в клетке либо ингибированием лизосомального процессинга аутофagosом.

Ранее было обнаружено, что активация ERK является необходимым условием репликации энтеровируса 71 (EV71) [46–48]. Помимо этого, посредством киназы ERK и ее взаимодействия с LC3 осуществляется регуляция экспрессии генов, ответственных за аутофагию и биосинтез лизосом [49, 50]. Однако, несмотря на то, что индукция аутофагии сопровождается повышением экспрессии и фосфорилированием ERK (рис. 2, A и 3, B), мы не можем утверждать, что

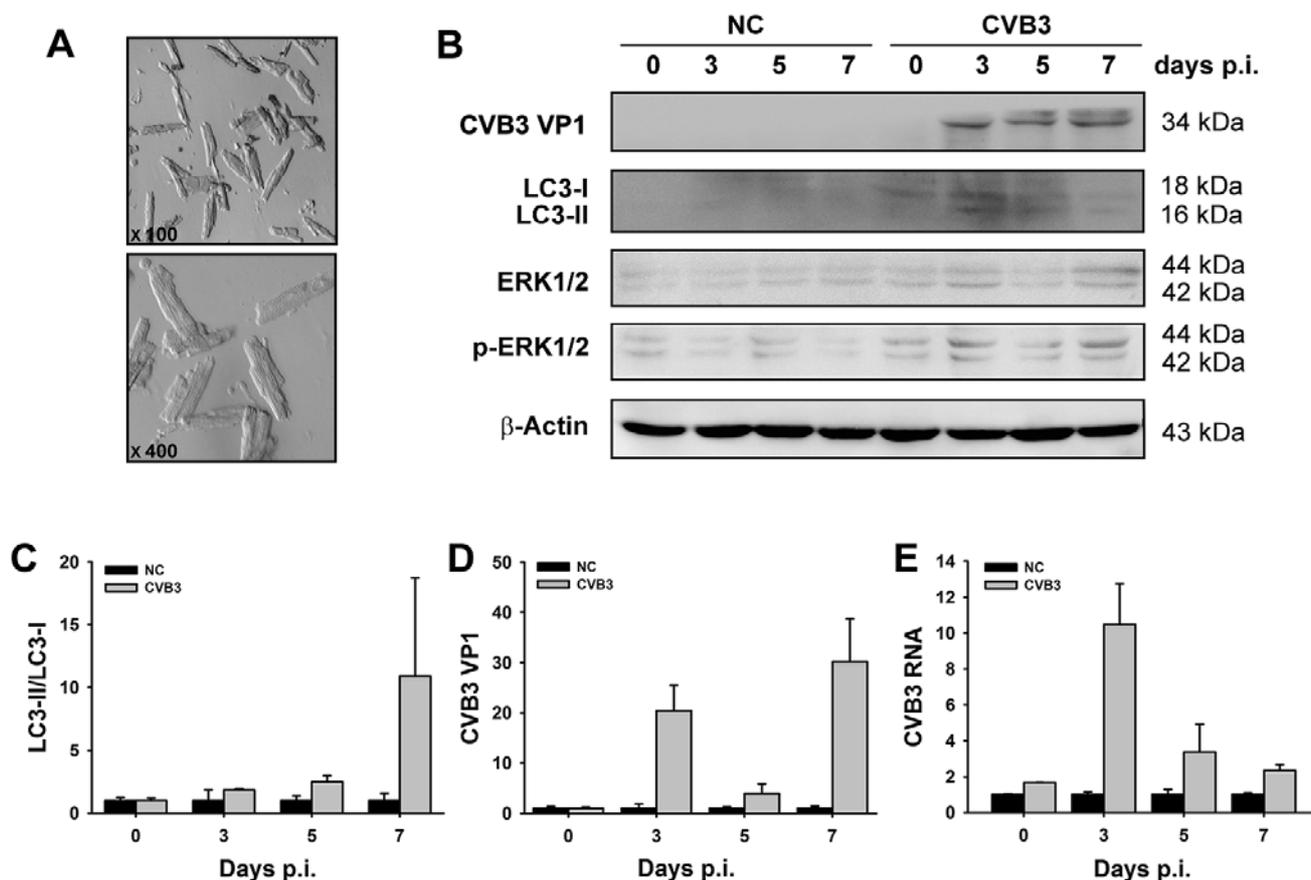


Рис. 3. Изменение соотношения LC3-II/LC3-I (C) и уровней вирусной РНК (E) и белка VP1 (D) в кардиомиоцитах, изолированных из миокарда мышей, инфицированных вирусом CVB3. Миоциты были изолированы на 0-, 3-, 5- и 7-й дни p.i. (A) – микроснимки культуры миоцитов с разрешением 100× и 400×. Вирусная РНК и различные белки были экстрагированы из клеток и проанализированы методом RT-ПЦР (E) и Вестерн-блоттинга (B). (C) и (D) – денситометрические измерения белковых полос LC3 и VP1 после Вестерн-блоттинга, нормализованные относительно уровня β-актина и представлены в виде гистограмм. Каждый эксперимент выполняли в трех независимых повторах. NC – миоциты из незараженных животных, CVB3 – миоциты из зараженных вирусом животных

ее активация является необходимым условием для инициации или протекания процесса аутофагии в кардиомиоцитах, а не выступает как случайное событие.

Уровень LC3-II повышен в кардиомиоцитах, изолированных из миокарда мышей, инфицированных CVB3. В состав сердечной ткани входят клетки различных типов: миоциты, фибробласты, клетки эндотелия и гладких мышц сосудов [51, 52]. В условиях стресса, например, при воспалении, в сердечную ткань проникают также лимфоциты, макрофаги и клетки-предшественники [4, 53, 54]. Несмотря на то, что с помощью электронного микроскопа нам удалось зарегистрировать в клетках миокарда похожие на аутофагосомы везикулы (рис. 1, B), это не означало, что процесс аутофагии действительно имел место именно в кардиомиоцитах. Поэтому мы провели изолирование кардиомиоцитов из миокарда

инфицированных мышей и определение в них изменения уровня LC3. Как следует из рис. 3, C, соотношение LC3-II/LC3-I в изолированных кардиомиоцитах из зараженных животных значительно увеличивалось на 7-й день p.i. Подобным же образом возрастал уровень экспрессии вирусного белка VP1 и активированной формы киназы ERK (p-ERK) (рис. 3, B и C). Несмотря на то, что величины изменений соотношения LC3-II/LC3-I или уровней вирусной РНК и белка в изолированных кардиомиоцитах точно не воспроизвели данные, полученные на цельном миокарде (сравни с рис. 2), они свидетельствовали об индукции аутофагии в кардиомиоцитах во время CVB3-инфекции. Таким образом, основные мишени CVB3, которыми являются кардиомиоциты, реагировали на вирусную инфекцию путем накопления аутофагосом, что могло иметь большое значение для обеспечения

вируса внутриклеточными мембранными структурами, необходимыми для его репликации [55].

Репликация CVB3 в кардиомиоцитах частично подавляется ингибитором аутофагии. Известно, что аутофагия способствовала репликации CVB3 *in vitro* и *in vivo* [17, 18–20]. Для ответа на вопрос, наблюдается ли такая же зависимость между аутофагией и репликацией CVB3 также и в кардиомиоцитах, мы изолировали эти клетки из миокарда здоровых мышей, инфицировали их вирусом CVB3, а затем обрабатывали ингибитором аутофагии (3-МА). Уровни белков LC3-I, LC3-II и VP1 определяли методом Вестерн-блоттинга. Как следует из рис. 4, уровень маркерного белка аутофагии (LC3-II) в изолированных кардиомиоцитах существенно возрастал после добавления CVB3, но заметно снижался после обработки 3-МА. Аналогичные вариации наблюдались и в изменении уровней вирусного белка VP1, что могло свидетельствовать об использовании вирусом аутофагии для облегчения своей репликации. Полученные нами результаты согласовались с данными других авторов [17], обнаруживших, что нарушение гена *Atg5*, кодирующего белок аутофагии, значительно снижало эффективность репликации CVB3 в ацинарных клетках поджелудочной железы и способствовало улучшению функционирования этого органа. Авторы заключили, что ингибирование размножения вируса было связано с уменьшением массы внутриклеточных мембран. Однако мы делаем более осторожный вывод о том, что аутофагия только способствует репликации CVB3, хотя точный механизм взаимосвязи этих двух сложных процессов еще предстоит установить.

Известно, что EV71 также индуцирует аутофагию; продукция вирусных частиц снижалась в присутствии 3-МА и увеличивалась под действием индуктора аутофагии [56]. Не исключено, что индукция аутофагии и накопление аутофагосом в зараженных клетках — это общий механизм поддержания активной репликации разных эн-

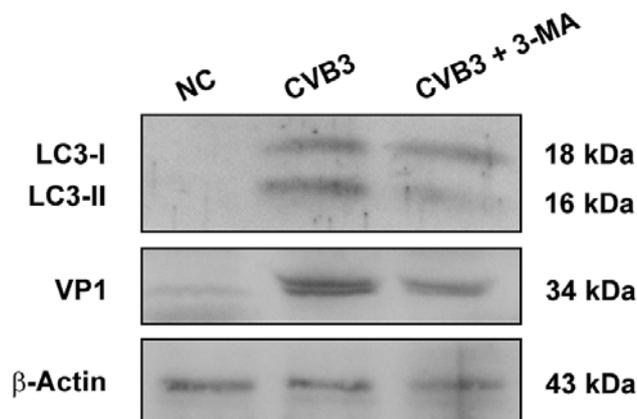


Рис. 4. Блокирование формирования аутофагосом ингибирует репликацию CVB3. Кардиомиоциты были изолированы из незараженных животных и инфицированы CVB3 в отсутствие или в присутствии 3-МА. Белки экстрагировали и анализировали методом Вестерн-блоттинга (эксперимент повторяли 3 раза)

теровирусов. Поэтому аутофагия может являться одной из возможных мишеней для борьбы с энтеровирусной инфекцией терапевтическими методами. Исходя из этого, можно предположить, что поскольку у EV71-инфицированных мышей под действием 3-МА наблюдалось уменьшение последствий вирусного воздействия и симптоматическое улучшение общего состояния организма [57], то этот ингибитор аутофагии окажет такое же действие и на репликацию CVB3 *in vivo*.

Таким образом, было продемонстрировано, что кардиомиоциты реагируют на инфицирование вирусом CVB3 повышением синтеза аутофагосом, которые могут быть использованы вирусом для своей репликации в клетках. Это означает, что направленное воздействие на процесс аутофагии может явиться основой стратегии борьбы и вирусным миокардитом, вызванным CVB3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andreoletti, L., Leveque, N., Boulagnon, C., Brasselet, C., and Fornes, P. (2009) Viral causes of human myocarditis, *Arch. Cardiovasc. Dis.*, **102**, 559–568.
2. Yajima, T. (2011) Viral myocarditis: potential defense mechanisms within the cardiomyocyte against virus infection, *Future microbiol.*, **6**, 551–566.
3. Yajima, T., and Knowlton, K.U. (2009) Viral myocarditis: from the perspective of the virus, *Circulation*, **119**, 2615–2624.
4. Kawai, C. (1999) From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future, *Circulation*, **99**, 1091–1100.
5. Bowles, N.E., Richardson, P.J., Olsen, E.G., and Archard, L.C. (1986) Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy, *Lancet*, **1**, 1120–1123.
6. Gaaloul, I., Riabi, S., Harrath, R., Evans, M., Salem, N.H., Mlayeh, S., Huber, S., and Aouni, M. (2012) Sudden unexpected death related to enterovirus myocarditis: histopathology, immunohistochemistry and molecular pathology diagnosis at post-mortem, *BMC Infect. Dis.*, **12**, 212.
7. Caughey, R.W., Humphrey, J.M., and Thomas, P.E. (2014) High-degree atrioventricular block in a child with acute myocarditis, *Ochsner J.*, **14**, 244–247.

8. Steinke, K., Sachse, F., Ettischer, N., Strutz-Seebohm, N., Henrion, U., Rohrbeck, M., Klosowski, R., Wolters, D., Brunner, S., Franz, W.M., Pott, L., Munoz, C., Kandolf, R., Schulze-Bahr, E., Lang, F., Klingel, K., and Seebohm, G. (2013) Coxsackievirus B3 modulates cardiac ion channels, *FASEB J.*, **27**, 4108–4121.
9. Spotnitz, M.D., and Lesch, M. (2006) Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus) myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **49**, 42–57.
10. Esfandiarei, M., and McManus, B.M. (2008) Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis, *Annu. Rev. Pathol.*, **3**, 127–155.
11. Doan, D., Rungta, S., Vikraman, N., and Rosman, H. (2010) Fulminant Coxsackie B myocarditis mimicking acute coronary artery occlusion, *Tex. Heart Inst. J.*, **37**, 500–501.
12. Kearney, M.T., Cotton, J.M., Richardson, P.J., and Shah, A.M. (2001) Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: mechanisms, manifestations, and management, *Postgrad. Med. J.*, **77**, 4–10.
13. Weithauser, A., Bobbert, P., Antoniak, S., Bohm, A., Rauch, B.H., Klingel, K., Savvatis, K., Kroemer, H.K., Tschöpe, C., Stroux, A., Zeichhardt, H., Poller, W., Mackman, N., Schultheiss, H.P., and Rauch, U. (2013) Protease-activated receptor-2 regulates the innate immune response to viral infection in a coxsackievirus B3-induced myocarditis, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **62**, 1737–1745.
14. Kong, Q., Wu, W., Yang, F., Liu, Y., Xue, Y., Gao, M., Lai, W., Pan, X., Yan, Y., Pang, Y., and Deng, Y. (2012) Increased expressions of IL-22 and Th22 cells in the coxsackievirus B3-Induced mice acute viral myocarditis, *Virol. J.*, **9**, 232.
15. Robinson, S.M., Tsueng, G., Sin, J., Mangale, V., Rahawi, S., McIntyre, L.L., Williams, W., Kha, N., Cruz, C., Hancock, B.M., Nguyen, D.P., Sayen, M.R., Hilton, B.J., Doran, K.S., Segall, A.M., Wolkowicz, R., Cornell, C.T., Whitton, J.L., Gottlieb, R.A., and Feuer, R. (2014) Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers, *PLoS Pathog.*, **10**, e1004045.
16. Li, M., Wang, X., Yu, Y., Xie, Y., Zou, Y., Ge, J., Peng, T., and Chen, R. (2014) Coxsackievirus B3-induced calpain activation facilitates the progeny virus replication via a likely mechanism related with both autophagy enhancement and apoptosis inhibition in the early phase of infection: an *in vitro* study in H9c2 cells, *Virus Res.*, **179**, 177–186.
17. Alirezaei, M., Flynn, C.T., Wood, M.R., and Whitton, J.L. (2012) Pancreatic acinar cell-specific autophagy disruption reduces coxsackievirus replication and pathogenesis *in vivo*, *Cell Host Microbe*, **11**, 298–305.
18. Kembell, C.C., Alirezaei, M., Flynn, C.T., Wood, M.R., Harkins, S., Kiesses, W.B., and Whitton, J.L. (2010) Coxsackievirus infection induces autophagy-like vesicles and megaphagosomes in pancreatic acinar cells *in vivo*, *J. Virol.*, **84**, 12110–12124.
19. Yoon, S.Y., Ha, Y.E., Choi, J.E., Ahn, J., Lee, H., Kweon, H.S., Lee, J.Y., and Kim, D.H. (2008) Coxsackievirus B4 uses autophagy for replication after calpain activation in rat primary neurons, *J. Virol.*, **82**, 11976–11978.
20. Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B.M., and Luo, H. (2008) Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells, *J. Virol.*, **82**, 9143–9153.
21. Kubli, D.A., and Gustafsson, A.B. (2014) Cardiomyocyte health: adapting to metabolic changes through autophagy, *Trends Endocrinol. Metab.*, **25**, 156–164.
22. Mei, Y., Thompson, M.D., Cohen, R.A., and Tong, X. (2014) Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 243–251.
23. Jimenez, R.E., Kubli, D.A., and Gustafsson, A.B. (2014) Autophagy and mitophagy in the myocardium: therapeutic potential and concerns, *Br. J. Pharmacol.*, **171**, 1907–1916.
24. White, E., Karp, C., Strohecker, A.M., Guo, Y., and Mathew, R. (2010) Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 212–217.
25. Bao, X., Naomoto, Y., Hao, H.F., Watanabe, N., Sakurama, K., Noma, K., Motoki, T., Tomono, Y., Fukazawa, T., Shirakawa, Y., Yamatsuji, T., Matsuoka, J., and Takaoka, M. (2010) Autophagy: Can it become a potential therapeutic target? *Int. Mol. Med.*, **25**, 493–503.
26. Luo, H., and McManus, B.M. (2012) Is autophagy an avenue to modulate coxsackievirus replication and pathogenesis? *Future Microbiol.*, **7**, 921–924.
27. Ghavami, S., Gupta, S., Ambrose, E., Hnatowich, M., Freed, D.H., and Dixon, I.M. (2014) Autophagy and heart disease: implications for cardiac ischemia-reperfusion damage, *Curr. Mol. Med.*, **14**, 616–629.
28. Bhuiyan, M.S., Pattison, J.S., Osinska, H., James, J., Gulick, J., McLendon, P.M., Hill, J.A., Sadoshima, J., and Robbins, J. (2013) Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy, *J. Clin. Invest.*, **123**, 5284–5297.
29. Kobayashi, S., and Liang, Q. (2014) Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 252–261.
30. Zhong, Z., Li, X., Zhao, W., Tong, L., Liu, J., Wu, S., Lin, L., Zhang, Z., Tian, Y., and Zhang, F. (2008) Mutations at nucleotides 573 and 579 within 5'-untranslated region augment the virulence of coxsackievirus B1, *Virus Res.*, **135**, 255–259.
31. Li, D., Wu, J., Bai, Y., Zhao, X., and Liu, L. (2014) Isolation and culture of adult mouse cardiomyocytes for cell signaling and *in vitro* cardiac hypertrophy, *J. Vis. Exp.*, **87**, DOI: 10.3791/51357.
32. Sreejit, P., Kumar, S., and Verma, R.S. (2008) An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice, *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **44**, 45–50.
33. Slack, J.L., Bi, W., Livak, K.J., Beaubier, N., Yu, M., Clark, M., Kim, S.H., Gallagher, R. E., and Willman, C.L. (2001) Pre-clinical validation of a novel, highly sensitive assay to detect PML-RARalpha mRNA using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction, *J. Mol. Diagn.*, **3**, 141–149.
34. Leslie, K., Blay, R., Haisch, C., Lodge, A., Weller, A., and Huber, S. (1989) Clinical and experimental aspects of viral myocarditis, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**, 191–203.
35. Reetoo, K.N., Osman, S.A., Illavia, S.J., Cameron-Wilson, C.L., Banatvala, J.E., and Muir, P. (2000) Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis: biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease, *J. Gen. Virol.*, **81**, 2755–2762.
36. Nakamura, H., Yamamoto, T., Yamamura, T., Nakao, F., Umemoto, S., Shintaku, T., Yamaguchi, K., Liu, P., and Matsuzaki, M. (1999) Repetitive coxsackievirus infection induces cardiac dilatation in post-myocarditic mice, *Jpn. Circ. J.*, **63**, 794–802.
37. Suksee, S., Rossiter, H., Mildner, M., Pammer, J., Buchberger, M., Gruber, F., Watanapokasin, R., Tschachler, E., and Eckhart, L. (2013) Targeted deletion of Atg5 reveals differential roles of autophagy in keratin K5-expressing epithelia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 689–694.
38. Tong, L., Lin, L., Wu, S., Guo, Z., Wang, T., Qin, Y., Wang, R., Zhong, X., Wu, X., Wang, Y., Luan, T., Wang, Q., Li, Y., Chen, X., Zhang, F., Zhao, W., and Zhong, Z. (2013) MiR-10a* up-regulates coxsackievirus B3 biosynthesis by targeting the 3D-coding sequence, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3760–3771.
39. Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2011) Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections, *Cell*, **147**, 724–727.

40. Deretic, V. (2010) Autophagy in infection, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 252–262.
41. Zhang, X.J., Chen, S., Huang, K.X., and Le, W.D. (2013) Why should autophagic flux be assessed? *Acta Pharmacol. Sin.*, **34**, 595–599.
42. Bardag-Gorce, F., Francis, T., Nan, L., Li, J., He Lue, Y., French, B.A., and French, S.W. (2005) Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease, *Life Sci.*, **77**, 2594–2602.
43. Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Geetha, T., Wong, H.C., Krishna, N.R., and Wooten, M.W. (2004) Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 8055–8068.
44. Si, X., Gao, G., Wong, J., Wang, Y., Zhang, J., and Luo, H. (2008) Ubiquitination is required for effective replication of coxsackievirus B3, *PLoS One*, **3**, e2585.
45. Si, X., McManus, B.M., Zhang, J., Yuan, J., Cheung, C., Esfandiarei, M., Suarez, A., Morgan, A., and Luo, H. (2005) Pyrrolidine dithiocarbamate reduces coxsackievirus B3 replication through inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway, *J. Virology*, **79**, 8014–8023.
46. Shi, W., Hou, X., Li, X., Peng, H., Shi, M., Jiang, Q., Liu, X., Ji, Y., Yao, Y., He, C., and Lei, X. (2013) Differential gene expressions of the MAPK signaling pathway in enterovirus 71-infected rhabdomyosarcoma cells, *Braz. J. Infect. Dis.*, **17**, 410–417.
47. Wang, B., Zhang, H., Zhu, M., Luo, Z., and Peng, Y. (2012) MEK1-ERKs signal cascade is required for the replication of Enterovirus 71 (EV71), *Antiviral Res.*, **93**, 110–117.
48. Wong, W.R., Chen, Y.Y., Yang, S.M., Chen, Y.L., and Horng, J.T. (2005) Phosphorylation of PI3K/Akt and MAPK/ERK in an early entry step of enterovirus 71, *Life Sci.*, **78**, 82–90.
49. Colecchia, D., Strambi, A., Sanzone, S., Iavarone, C., Rossi, M., Dall'Armi, C., Piccioni, F., Verrotti di Pianella, A., and Chiariello, M. (2012) MAPK15/ERK8 stimulates autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins, *Autophagy*, **8**, 1724–1740.
50. Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D.C., and Ballabio, A. (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis, *Science*, **332**, 1429–1433.
51. Ghavami, S., Cunnington, R.H., Yeganeh, B., Davies, J.J., Rattan, S.G., Bathe, K., Kavosh, M., Los, M.J., Freed, D.H., Klonisch, T., Pierce, G.N., Halayko, A.J., and Dixon, I.M. (2012) Autophagy regulates trans fatty acid-mediated apoptosis in primary cardiac myofibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 2274–2286.
52. Simon, H.U. (2012) Autophagy in myocardial differentiation and cardiac development, *Circ. Res.*, **110**, 524–525.
53. Howard, C.M., and Baudino, T.A. (2014) Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **70**, 19–26.
54. Fujiu, K., and Nagai, R. (2013) Contributions of cardiomyocyte-cardiac fibroblast-immune cell interactions in heart failure development, *Basic Res. Cardiol.*, **108**, 357.
55. Gregoire, I.P., Rabourdin-Combe, C., and Faure, M. (2012) Autophagy and RNA virus interactomes reveal IRGM as a common target, *Autophagy*, **8**, 1136–1137.
56. Huang, S.C., Chang, C.L., Wang, P.S., Tsai, Y., and Liu, H.S. (2009) Enterovirus 71-induced autophagy detected *in vitro* and *in vivo* promotes viral replication, *J. Med. Virol.*, **81**, 1241–1252.
57. Lee, Y.R., Wang, P.S., Wang, J.R., and Liu, H.S. (2014) Enterovirus 71-induced autophagy increases viral replication and pathogenesis in a suckling mouse model, *J. Biomed. Sci.*, **21**, 80.

COXSACKIEVIRUS B3 INDUCES AUTOPHAGIC RESPONSE IN CARDIAC MYOCYTES *in vivo*

Xia Zhai¹, Bing Bai³, Bohai Yu¹, Tanying Wang¹, Huapeng Wang², Yao Wang², Huiyan Li³,
Lei Tong¹, Yan Wang¹, Fengmin Zhang¹, Wenran Zhao^{2*}, Zhaohua Zhong^{1*}

¹ Harbin Medical University, Department of Microbiology,
194 Xuefu Road, Harbin 150086, China; E-mail: zhonghzh@hrbmu.edu.cn

² Harbin Medical University, Department of Cell Biology, 194 Xuefu Road, Harbin 150086,
China; E-mail: zhaowr@ems.hrbmu.edu.cn, zhaowenran2002@aliyun.com

³ First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Department
of Cardiology, 23 Youzheng Street, Harbin 150001, China

Received November 20, 2014
Revision received February 09, 2015

Viral myocarditis is a common disease that contributes to dilated cardiomyopathy or heart failure. Coxsackievirus B (CVB) is one of the major causative pathogens of viral myocarditis. Previous studies have shown that autophagy is exploited to promote CVB replication in cell lines. To study whether cardiac myocytes responds to CVB infection in a similar way, viral myocarditis was established by the inoculation of three-week-old BALB/c mice with CVB3. Electron microscopic observation showed that autophagosome-like vesicles were induced in the cardiac myocytes of mice infected by CVB3 at days 3, 5, and 7 after viral infection. The lipidated microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), LC3-II, was also significantly increased in both myocardium and cardiac myocytes extracted from the ventricles of mice infected with CVB3. The increased LC3-II coincided with a high level of viral RNA and proteins in both myocardium and the isolated cardiac myocytes. Moreover, viral protein synthesis was significantly decreased in the primary cardiac myocytes by treatment with 3-methyladenine (3-MA), an inhibitor of autophagy. The expression and phosphorylation of extracellular signal regulated kinase (ERK) were also increased in both myocardium and in isolated cardiac myocytes of the virus-infected mice, while the interplay of ERK with autophagic response remains to be studied. This study demonstrated that cardiac myocytes respond to CVB3 infection by increased formation of autophagosomes *in vivo*, which might be exploited for viral replication.

Key words: coxsackievirus B, cardiac myocytes, myocardium, autophagy, autophagosome