

Посвящаем памяти Леона Владимировича Бакиновского

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ДЕЗОКСИНОИРИМИЦИНА НА МОРФОГЕНЕЗ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

© 2012 г. А. В. Тимохова¹, Л. В. Бакиновский², А. И. Зинин², В. И. Попенко¹, А. В. Иванов¹,
П. М. Рубцов¹, С. Н. Кочетков¹, С. Н. Белжеларская^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва 119991

²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук, Москва 119991

Поступила в редакцию 09.11.2011 г.

Принята к печати 29.12.2011 г.

Вирусный гепатит С (ВГС) – одно из широко распространенных и опасных заболеваний человека. Число терапевтических средств при лечении ВГС ограничено, вакцины для его профилактики нет, поэтому большое значение имеет разработка новых противовирусных стратегий. Одной из них может быть воздействие на морфогенез вируса, что приводит к его угнетению. Поскольку важным этапом морфогенеза, предопределяющим правильную сборку вириона ВГС, является гликозилирование белков оболочки вируса в инфицированной клетке, можно предположить, что производные аналога глюкозы – дезоксиноиримицина (DNJ, ингибиторы α -глюкозидазы) будут нарушать процесс сборки структурных белков и формирование частиц ВГС. В работе изучено влияние алкилированных производных DNJ (N-пентил-DNJ и N-бензил-DNJ) на морфогенез ВГС в модельной системе – клетках насекомых, синтезирующих три вирусных структурных белка с образованием вирусоподобных частиц. В присутствии этих производных нарушается внутриклеточное N-гликозилирование оболочечных гликопротеинов ВГС. В концентрации 1 мМ производные DNJ повышают содержание гликопротеинов gpE1 и gpE2, их электрофоретическая подвижность уменьшается, что, по-видимому, обусловлено блокированием α -глюкозидаз в эндоплазматическом ретикулуме клетки и накоплением гипергликозилированных N-гликанов в гликопротеинах ВГС. Взаимодействие последних с кальнексином приводит к образованию непродуктивных димеров и подавляет продуктивную сборку вирусоподобных частиц.

Ключевые слова: бакуловирус AcMNPV, клетки насекомых Sf9, вирус гепатита С (ВГС), структурные белки ВГС, гликопротеины ВГС, вирусоподобные частицы ВГС, α -глюкозидазы, дезоксиноиримицин (DNJ), NBnDNJ, NPnDNJ, NBDNJ, кальнексин, кальретикулин.

AFFECT OF DEOXYNOJIRIMYCIN DERIVATIVES ON HEPATITIS C VIRUS MORPHOGENESIS by A. V. Timokhova¹, L. V. Bakinovskii^{2*}, A. I. Zinin², V. I. Popenko¹, A. V. Ivanov¹, P. M. Rubtsov¹, S. N. Kochetkov¹, S. N. Beljelarskaya^{1*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: belj@eimb.ru; ²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia). Viral hepatitis C is one of the wide-spread and dangerous human diseases. The choice of drugs for treatment of chronic hepatitis C virus (HCV) infection is limited and prophylactic vaccines do not exist. Thus, the development of new antiviral strategies and substances are of great importance. The targeting of viral morphogenesis might be used as an alternative approach to existing strategies of HCV blocking. The glycosylation of viral envelope proteins is an important step of viral particle morphogenesis that determines the correct assembly of HCV virions. The derivatives of glucose analog deoxynojirimycin (DNJ) – inhibitors of α -glucosidase can impair the assembly of structural proteins and HCV particle formation. In the present work the affect of alkylated derivatives of DNJ N-pentyl-DNJ and N-benzyl-DNJ to HCV morphogenesis in a model system insect cells producing three viral structural proteins with formation of virus-like particles was studied. Intracellular N-glycosylation of HCV envelope glycoproteins was shown to be impaired by DNJ derivatives. At 1 mM concentrations of these substances the level of gpE1 and gpE2 glycoproteins increase and their electrophoretic mobility decrease which seems to be due to inhibition of α -glucosidase in endoplasmic reticulum and ac-

Принятые сокращения: ВГС – вирус гепатита С; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ЭР – эндоплазматический ретикулум; БОЕ – бляшкообразующие единицы; DNJ (deoxynojirimycin) – дезоксиноиримицин; NBnDNJ (N-benzyl-deoxynojirimycin) – N-бензилдезоксидезоксиноиримицин; NPnDNJ (N-pentyl-deoxynojirimycin) – пентилдезоксидезоксиноиримицин; NBDNJ (N-butyl-deoxynojirimycin) – N-бутилдезоксидезоксиноиримицин; DNJHCl – 1-дезоксидезоксиноиримицин гидрохлорид – дезоксиноиримицин гидрохлорид.

* Эл. почта: belj@eimb.ru

cumulation of hyperglycosylated N-glycans in HCV glycoproteins. The interaction of the latters with calnexin leads to formation of unproductive dimers and blocks productive assembly of virus-like particles.

Keywords: baculovirus AcMNPV, hepatitis C virus (HCV), HCV structural proteins, HCV-like particles (VLPs), Sf9 insect cells, DNJ, NBn-DNJ, NPn-DNJ, NB-DNJ, calnexin, calreticulin.

По оценкам ВОЗ вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано около 200 млн. человек (3% населения Земли), и инфекция продолжает распространяться [1], часто приводя к хроническому поражению печени, циррозу или злокачественному перерождению клеток печени. Смертность больных хронической формой гепатита С составляет примерно 30%. При гепатите С до сих пор используется, в основном, комбинированная терапия α -интерфероном и рибавирином, а профилактических и терапевтических вакцин нет [2, 3]. Эффективность лечения зависит от генотипа вируса, 40% пациентов не поддается лечению [2–5]. Поиски ингибиторов ВГС наталкиваются на уникальные особенности вируса, такие как высокая изменчивость, геномная вариабельность, способность к преодолению иммунного ответа. Низкая эффективность репликации вируса в культуре клеток и отсутствие подходящих животных моделей затрудняют изучение жизненного цикла вируса и блокирование инфекции [6, 7]. В настоящее время исследуются соединения, направленно действующие на вирусные ферменты, однако этот подход, основанный только на поиске ферментных мишеней, может столкнуться с проблемой устойчивости вируса. В качестве альтернативного подхода можно попытаться воздействовать на морфогенез вируса [8–14].

ВГС – единственный представитель рода *Hepacivirus* – относится к семейству *Flaviviridae*. Его геном представлен одноцепочечной РНК длиной 9600 н. Полипротеин, синтезируемый с единственной рамки считывания, подвергается процессингу с образованием десяти зрелых структурных и неструктурных белков [6, 7, 15, 16]. Три структурных белка – кор-белок С (core protein) и гликопротеины оболочки, gpE1 и gpE2, – входят в состав вирионов ВГС, однако детальное строение вирусной частицы и способ ее формирования остаются недостаточно изученными [15]. Наименее изучен этап сборки вирионов и их выход из клетки. Известно, что взаимодействие структурных белков ВГС и характер их укладки влияют на свойства вирионов ВГС [17].

Упомянутые гликопротеины gpE1 и gpE2 могут либо димеризоваться при нековалентном взаимодействии в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) с образованием функциональных, предшествующих почкованию, комплексов, либо образовывать агрегаты, содержащие неправильно свернутые нефункциональные гликопротеины, посред-

ством дисульфидных мостиков. В образовании комплексов участвуют два хозяйских белка-шаперона, один из которых – кальнексин – взаимодействует с гликопротеинами, участвующими в образовании функциональных комплексов, а другой – кальретикулин – взаимодействует с неверно упакованными гликопротеинами, образующими агрегаты [17–21]. Посттрансляционные модификации белков происходят в ЭР и аппарате Гольджи. Один из наиболее общих типов модификации – это N-гликозилирование, при котором малоразветвленная олигосахаридная цепочка, состоящая из девяти остатков маннозы (Man) и трех остатков глюкозы (Glc), добавляется к специфическим остаткам аспарагина в последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X – любая аминокислота, кроме пролина [22]. N-гликозилирование характерно для поверхностных белков оболочечных вирусов. Добавление олигосахарида к пептиду сопряжено с его синтезом, при котором происходит частичное сворачивание белка. Гликозилирование происходит путем ферментативных модификаций гликана-субстрата и следующего за этим процессинга, в ходе которого происходит ветвление, удлинение и сиалирование гликанов.

N-гликозилирование начинается с перемещения заранее сформированного олигосахарида Glc3-Man9-GlcNAc2 от липида-носителя на остаток аспарагина синтезирующегося полипептида. Затем основной олигосахарид укорачивается путем последовательного отделения глюкозных остатков при участии α -глюкозидазы I и α -глюкозидазы II с образованием “высокоманнозного” гликана Man9-GlcNAc2 [23]. Локализованный в аппарате Гольджи фермент маннозидаза I удаляет четыре остатка маннозы, образуя Man5GlcNAc2, а к оставшимся остаткам маннозы добавляется N-ацетилглюкозамин. В результате образуется цепочка GlcNAcMan5GlcNAc2. Далее комплекс гликанов преобразуется при участии ферментов NAcGlc-трансферазы I, маннозидазы II, NAcGlc-трансферазы II и NAcGlc-трансферазы IV. Затем фукозилтрансфераза, галактозилтрансфераза и сиалилтрансфераза завершают модификацию, присоединяя к гликопротеину фукозу, три остатка галактозы (Gal) и три остатка сиаловой кислоты (SA) соответственно. В процессе ферментативных модификаций гликана гликопротеин входит в кальнексин-кальретикулиновый цикл, на протяжении которого лектины ЭР специфически взаимодействуют с гликопротеином, обеспечивая его сворачивание. Если это сворачивание невер-

но, α -глюкозидаза дегликозилирует белок, который повторно взаимодействует с кальнексином/кальретикулином [24]. Этот цикл продолжается до тех пор, пока белок не примет нативную форму. Нарушение действия α -глюкозидаз ведет к образованию тригликозилированных гликанов, усиливающих взаимодействие гликопротеина с кальретикулином и, как следствие, к образованию агрегатов неверно свернутых гликопротеинов. Это приводит к образованию дефектных вирусных частиц, нарушает секрецию вируса из клетки и подавляет способность вируса связываться с клеткой [13, 14, 25, 26].

Иминосакхара и их алкилированные производные, способные нарушать действие α -глюкозидаз, используются в качестве ингибиторов процессинга N-гликанов, они воздействуют на сворачивание и сборку вирусных оболочечных белков и блокируют морфогенез вируса [9–12]. Такие соединения, в том числе – производные дезоксиоиримицина (DNJ), блокирующие действие α -глюкозидазы, могут быть потенциальными противовирусными агентами [9, 11, 12]. Для проверки этого предположения в настоящей работе использовали синтетические алкилированные производные DNJ – N-пентилдезоксоириимицин (NPnDNJ) и N-бензилдезоксоириимицин (NBnDNJ).

Для тестирования препаратов против ВГС обычно используют клеточную линию гепатокарциномы Nuh-7,5, в которой реплицируется субгеномный репликон ВГС, кодирующий неструктурные белки NS2–NS5B. Эти клетки являются удобной системой для изучения соединений, направленно воздействующих на вирусные ферменты. Мы предлагаем в качестве альтернативы использовать модельную систему, в которой вирусоподобные частицы (ВПЧ) формируются в клетках насекомых, трансфицированных бакуловирусными векторами; эти векторы направляют экспрессию генов структурных белков ВГС [21]. Такие ВПЧ, состоящие из структурных белков ВГС и морфологически подобные природному вириону, использованы в настоящей работе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные клетки, клеточные культуры и плазмиды. Использовали штаммы *Escherichia coli* DH5a и DH10Bac (“Gibco-BRL”, США) и линию клеток Sf9 *Spodoptera frugiperda*. Бактериальные клетки трансформировали плазмидными ДНК согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (“Amersham”). Выделение и очистку плазмид, расщепление рестриктазами, лигирование, электрофорез ДНК в агарозном геле и другие генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным протоколам [27]. Рекombинантные бакмиды получали и анализировали, как описано в инструкции [28]. Рекombинантную бакмидную

ДНК вводили в клетки насекомых в присутствии реагента CellFECTIN (“Gibco-BRL”).

Клетки насекомых культивировали в среде Sf-900 II, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, при 27°C, используя основные технические приемы, разработанные ранее и описанные в инструкции [28]. Для определения титра вируса, амплификации рекombинантного вируса, заражения клеток Sf9 рекombинантным бакуловирусом, а также для анализа вирусной экспрессии использовали ту же инструкцию.

Рекombинантные конструкции, несущие кДНК, соответствующие генам структурных белков ВГС, рекombинантные бакмиды, а также рекombинантный бакуловирус bv-CE1E2 получали и анализировали по ранее описанным методикам [29].

Иминосакхара. В работе использовали NBDNJ (“Santa Cruz Biotechnology”, США), дезоксиоиримицингидрохлорид (1-deoxynojirimycin hydrochloride, DNJHCl) (“Sigma-Aldrich”, США), а также синтезированные в Институте органической химии РАН NBnDNJ и NPn-DNJ. Все ингибиторы растворяли в деионизованной воде до концентрации 100 мМ. Растворы стерилизовали, фильтруя через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм (“TPP”, Швейцария).

Суммарную клеточную ДНК выделяли из клеток насекомых через 72 ч после заражения рекombинантными бакуловирусом bv-CE1E2 (с множественностью заражения 5 БОЕ/кл) [31]. Наличие кДНК генов структурных белков ВГС в суммарной клеточной ДНК оценивали с помощью ПЦР, используя праймеры к бакуловирусному вектору pFastBacHT (“Invitrogen”, США)

Получение микросом. Через 72 ч после заражения клеток Sf9 рекombинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (10 БОЕ/кл) собирали 10^7 клеток, растущих в монослое, и отмывали трижды фосфатно-солевым буфером (PBS). Клетки ресуспендировали в 0.05 М буфере Hepes–KOH, pH 7.4, содержащем 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 20% глицерина и ингибиторы протеаз (Protease Inhibitor Cocktail SetII 1 : 200, “Calbiochem”, США), а затем разрушали в гомогенизаторе Поттера [30]. Неразрушенные клетки и ядра удаляли центрифугированием: 800 g, 10 мин, 4°C, а из супернатанта осаждали микросомы при 50000 g, 60 мин, 4°C (ротор 50Ti, центрифуга “Beckman Coulter Optima” L-100XP). Осадок ресуспендировали в том же буфере, не содержащем DTT, и анализировали с помощью вестерн-блотинга и электронной микроскопии.

Получение и очистка ВПЧ. Клетки, растущие в монослое при 27°C, заражали рекombинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (20 БОЕ/кл). Через 72 ч клетки (2×10^8) собирали, отмывали три раза PBS, ресуспендировали в лизирующем буфере TNC (10 мМ Трис–HCl, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1 мМ

CaCl₂, 1 mM PMSF, ингибиторы протеаз (1 : 200), 0.25% дигитонина) и разрушали ультразвуком. ВПЧ из гомогенизированных лизатов очищали от клеточных остатков низкоскоростным центрифугированием (1200 g, 15 мин, 4°C). Затем ВПЧ центрифугировали в две стадии – центрифугируя через 30%-ную сахарозную подушку при 230000 g в течение 16 ч при 4°C и подвергая высокоскоростному ультрацентрифугированию при 230000 g, 3 ч, при 4°C. Осадок ВПЧ ресуспендировали в TNC-буфере, содержащем 1 mM PMSF и ингибиторы протеаз (1 : 200). Очищенные ВПЧ анализировали с помощью электронной микроскопии и вестерн-блоттинга [27, 30].

Антитела к ВГС. Использовали моноклональные антитела мыши к белкам E1 ВГС (Her C E1 1879: sc-65459) и E2 ВГС (Her C E2 BDI167: sc-57769) (“Santa Cruz Biotechnology”, США), а также моноклональные антитела к кальнексину (AF18) и кальретикулину (FMC75) (“Abcam”, Великобритания). Поликлональные антитела кролика к структурному белку С любезно предоставлены М.Г. Исагулянц (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва). В качестве вторичных антител использовали конъюгаты пероксидазы хрена с антителами против IgG мыши (AB6706-1EA) (“Sigma”).

Вестерн-блоттинг и иммуноосаждение. Через 72 ч после заражения рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (множественность заражения 20 БОЕ/кл) клетки Sf9 собирали, трижды отмывали в PBS (1.47 mM KH₂PO₄, 4.29 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl), ресуспендировали в лизирующем буфере TNC, содержащем 0.25% дигитонина, и разрушали ультразвуком. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (15000 g, 15 мин, 4°C). Клеточный лизат наносили на 12%-й ПААГ, каждый образец содержал 10 мкг белка. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL (“Amersham Biosciences”, США) методом полусухого электропереноса. Мембраны промывали в буфере PBS, содержащем 5% сухого обезжиренного молока, инкубировали с первичными антителами к структурным белкам E1 и E2 ВГС (в разведении 1 : 2000 для E2 и 1 : 1500 для E1;), к кальнексину и кальретикулину (в разведении 1 : 1000 и 1 : 2000 соответственно), а затем со вторичными антителами (в разведении 1 : 20000). Иммуные комплексы проявляли, используя хемилюминесцентные реагенты ECL и ECL (Plus Western blotting detection reagents and analysis systems (“Amersham Biosciences”), согласно рекомендациям производителя.

Для иммуноосаждения клетки, инфицированные рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2, собирали через 72 ч после заражения, лизировали, удаляли клеточные обломки и ядра. Структурные белки и образуемые ими комплексы осажда-

ли моноклональными антителами к E1 ВГС и E2 ВГС, кальнексину и кальретикулину в разведении 1 : 100 (согласно рекомендациям производителя). Осажденные белки разделяли при помощи электрофореза в 12%-м ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с первичными антителами в разведениях, указанных выше, а затем обрабатывали вторичными антителами.

Электронная микроскопия. Препараты для электронной микроскопии готовили следующим образом. Каплю образца очищенных ВПЧ (~10 мкл) наносили на свежеионизированную угольную коллодиевую пленку-подложку на медной сеточке (150 меш). После адсорбции в течение 3–5 мин избыток раствора удаляли фильтровальной бумагой, препараты негативно контрастировали в течение 2 мин водным раствором уранилацетата (1.5%), высушивали на воздухе и исследовали в электронном микроскопе JEM-100CX (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Анализ РНК с помощью ОТ-ПЦР. Клетки Sf9 (4 × 10⁶), растущие в монослое, инфицировали рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (5 БОЕ/кл), инкубировали при 27°C в течение 72 ч, затем из среды удаляли клеточный дебрис путем низкоскоростного центрифугирования, а супернатант центрифугировали при 50000 g в течение 18 ч, пропуская через 30%-ную сахарозную “подушку” (центрифуга Beckman Coulter Optima L-100XP, ротор 50Ti). РНК экстрагировали из осадка с помощью реагента TRIzol (“Invitrogen”, США) и обрабатывали ДНКазой I (“Perkin Elmer”, США). Обратную транскрипцию проводили согласно протоколу ImProm-ITTM Reverse Transcriptase (“Promega”). кДНК амплифицировали, используя праймеры к гену структурного белка С ВГС.

Анализ гликозилирования – обработка эндогликозидазой H (Endo H). Белки клеточного лизата инкубировали с соответствующими моноклональными антителами при 4°C. Полученный комплекс осаждали с помощью белок-G-сефарозы (“BioVision”, США). К осажденному белку (20 мкг) добавляли 1 мкл десятикратного денатурирующего буфера (5% SDS, 0.4 M DTT), объем смеси доводили водой до 10 мкл, кипятили в течение 10 мин. Затем объем доводили до 20 мкл, добавляя 2 мкл десятикратного реакционного буфера G5 (50 mM цитрат Na), 3 мкл воды и 5 мкл раствора Endo H (5 ед. ак.) (P0702S “BioLabs Inc.”, Великобритания). Инкубировали в течение 15 ч при 37°C и анализировали при помощи электрофореза в 12%-м ПААГ.

Анализ цитотоксичности ингибиторов α-глюкозидазы методом МТТ (mitochondrial toxicity test). К клеткам Sf9 (1 × 10⁶), растущим в монослое, добавляли свежую среду, содержащую ингибиторы в различной концентрации и инкубировали при 27°C в течение 72 ч. За час до конца инкубации

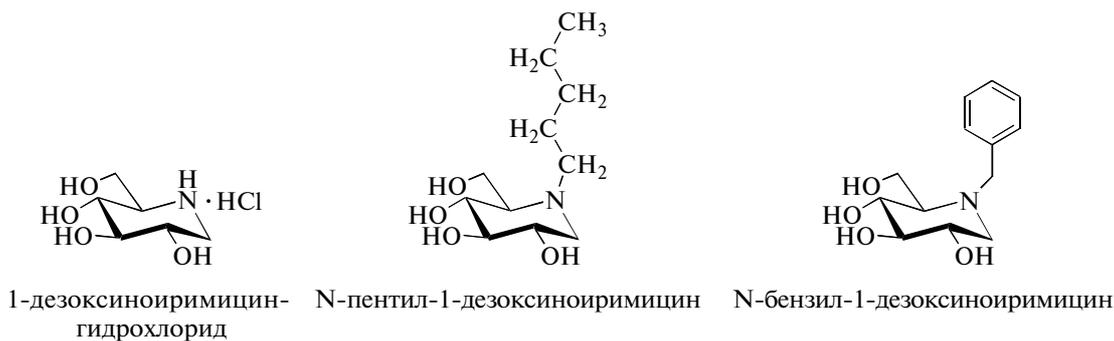


Рис. 1. Структура дезоксиноиримидина и его аналогов.

культуральную среду, заменяли на раствор МТТ (“Sigma-Aldrich”) (5 мкг/мл в PBS). Раствор предварительно стерилизовали путем фильтрования с использованием фильтров 0.22 мкм (“TPP”) и оставляли на 1 ч при 27°C. Затем раствор МТТ замещали изопропанолом и через 5 мин. восстановленный МТТ определяли спектрофотометрически при 544 нм на спектрометре Genesys™2 (ThermoSpectronic 3 WED 317001) [31].

Анализ цитотоксичности ингибиторов α-глюкозидазы с использованием красителя нейтрального красного. Клетки Sf9 (1 × 10⁶ клеток на лунку) в 24-луночных плашках после прикрепления выдерживали в течение 24 ч при 27°C. Затем клетки инфицировали рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (5 БОЕ/кл). Через 1 ч после инфекции среду замещали на свежую, содержащую NBnDNJ и NPnDNJ в концентрации 1 мМ и NBDNJ в концентрации 200 мкМ, и инкубировали при 27°C в течение 24 ч. За 3 ч до окончания инкубации среду отбирали, добавляли свежую среду, содержащую раствор нейтрального красного (“Sigma-Aldrich”, N-4638) в концентрации 50 мкг/мл, и инкубировали еще в течение 3 ч. Затем клетки промывали PBS, добавляли фиксирующий раствор (смесь 1%-ной уксусной кислоты и 50%-ого этанола) и инкубировали в течение 10 мин. Абсорбцию красителя лизосомами клеток определяли при 544 нм. Измерения проводили на приборе Genesys™2 ThermoSpectronic 3 WED 317001 [31, 32].

Определение жизнеспособности клеток в присутствии ингибиторов α-глюкозидазы. Клетки Sf9 (1 × 10⁶), растущие в монослое при 27°C, заражали рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (20 БОЕ/кл). Через 1 ч после инфекции заменяли среду на свежую и добавляли ингибиторы в различных концентрациях. Клетки инкубировали при 27°C в течение 72 ч. К неинфицированным клеткам Sf9 (1 × 10⁶), растущим в монослое при 27°C, также добавляли ингибиторы и инкубировали в тех же условиях. Жизнеспособные клетки

определяли под микроскопом Olympus (Tokyo SK Microscope with Light Source) по окрашиванию трипановым синим (“Sigma”) [33]. Для подсчета количества жизнеспособных клеток использовали от 6.1 × 10⁶ до 8.8 × 10⁶ клеток Sf9 в 3–5 повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы показали, что в клетках насекомых происходит синтез кор-белков С, gpE1 и gpE2 ВГС и их посттрансляционное гликозилирование [29]. В настоящей работе изучили влияние ингибирования α-глюкозидазы производными DNJ [8, 11, 12] на морфогенез ВГС. С этой целью синтезировали NBnDNJ и NPnDNJ. Отрицательным контролем служил DNJHCl [8–11]. В качестве положительного контроля использовали известный ингибитор α-глюкозидазы NBDNJ (рис. 1).

Мы изучили влияние этих соединений на процессинг структурных белков ВГС, накопление гликопротеинов gpE1 и gpE2 в ЭР клеток насекомых и их гликозилирование, на образование ВПЧ, а также на взаимодействие gpE1 и gpE2 с кальнексинном и кальретикулином. Влияние алкилированных производных DNJ на морфогенез ВГС оценивали в модельной системе образования ВПЧ в клетках насекомых Sf9, трансфицированных бакуловирусными векторами pFastBacHT, содержащими ген полипротеина CE1E2 ВГС (генотип 16, штамм 274933RU [34]), направляющими экспрессию генов структурных белков ВГС.

Влияние ингибиторов α-глюкозидазы на накопление gpE1 и gpE2 ВГС и их гликозилирование

Для изучения влияния ингибиторов α-глюкозидазы на накопление gpE1 и gpE2 ВГС и их гликозилирование в ЭР клетки, зараженные bv-CE1E2, обрабатывали NBnDNJ и NPnDNJ в концентрациях 10, 200 и 1000 мкМ. В качестве положительного контроля использовали белки из кле-

ток, обработанных NBDNJ в концентрации 200 мкМ. Через 24 ч после заражения клетки лизировали, белки экстрагировали и анализировали с помощью вестерн-блотинга (рис. 2).

Как видно, при обработке зараженных рекомбинантным вирусом клеток насекомых NBnDNJ или NPnDNJ в концентрации 200 мкМ и 1 мМ, так же как и в случае положительного контроля (NBDNJ в концентрации 200 мкМ), наблюдалось снижение электрофоретической подвижности gpE2*, по сравнению с клетками, инфицированными в отсутствие ингибиторов. Этот сдвиг подвижности характеризует накопление тригликозилированных N-гликанов в гликопротеинах ВГС в результате ингибирования α -глюкозидазы ЭР. Более выраженное снижение подвижности и увеличение накопления гликопротеина gpE2 ВГС в клетках насекомых, зараженных рекомбинантным вирусом, наблюдали в присутствии 1 мМ NBnDNJ или NPnDNJ, — по сравнению с клетками, выращенными в отсутствие ингибиторов или в присутствии NBDNJ в концентрации 200 мкМ (рис. 3).

Взаимодействие вирусных гликопротеинов gpE1u gpE2 с кальнексином

Лизаты клеток Sf9, инфицированных рекомбинантным вирусом bv-CE1E2, и выращенных в присутствии 1 мМ NBnDNJ и 1 мМ NPnDNJ, осаждали антителами к кальнексину, с последующим электрофорезом в денатурирующем ПААГ и анализировали с помощью вестерн-блотинга с антителами к E2 (рис. 4). Добавление ингибиторов приводит к существенному уменьшению количества gpE2 на вестерн-блоте, что, по-видимому, обусловлено его неправильным сворачиванием, нарушающим, в свою очередь, его взаимодействие с gpE1.

Вестерн-блот-анализ гликопротеинов gpE1 и gpE2 ВГС, синтезированных в клетках насекомых в присутствии ингибиторов и осажденных антителами к кальнексину, показал, что образуются непродуктивные димеры E1E2. Эти результаты свидетельствуют о том, что удержание гипергликозилированных N-гликанов, индуцированное угнетением α -глюкозидазы, предотвращает взаимодействие вирусных гликопротеинов с кальнексином в клетках насекомых, подавляя продуктивную сборку гликопротеинов ВГС.

Взаимодействие вирусных гликопротеинов gpE1u gpE2 с кальретикулином

При иммуноблотинге белков лизатов инфицированных клеток, выращенных в присутствии и в отсутствие ингибиторов, с антителами против E2, после предварительного иммуноосаждения антителами к кальретикулину, обнаружилось, что ко-

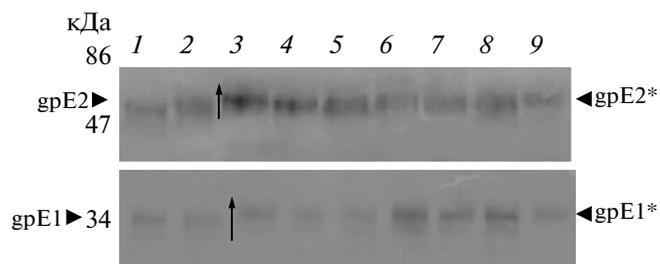


Рис. 2. Действие NBnDNJ и NPnDNJ на экспрессию гликопротеинов E1 и E2 ВГС в зараженных рекомбинантным вирусом bv-CE1E2 клетках насекомых. Иммуноблотинг белков лизатов инфицированных клеток с антителами против белков E1 (нижняя панель) и E2 (верхняя панель) после разделения в денатурирующем 12%-ном ПААГ. 1 – bv-CE1E2; 2 – bv-CE1E2 + DNJ (200 мкМ) – отрицательный контроль; 3 – bv-CE1E2 + NBDNJ (200 мкМ) – положительный контроль; 4 – bv-CE1E2 + NBnDNJ (10 мкМ); 5 – bv-CE1E2 + NBnDNJ (200 мкМ); 6 – bv-CE1E2 + NBnDNJ (1 мМ); 7 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (10 мкМ); 8 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (200 мкМ); 9 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (1 мМ); маркерные белки, кДа. Стрелками обозначен сдвиг электрофоретической подвижности gpE2*.

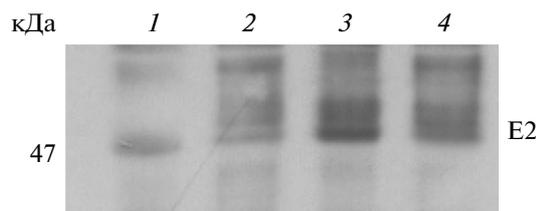


Рис. 3. Анализ экспрессии гликопротеинов E1 и E2 ВГС в клетках насекомых Sf9, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2, в присутствии различных производных DNJ. Электрофорез в денатурирующем 12%-ном ПААГ. Иммуноблотинг белка E2 лизатов инфицированных клеток с антителом анти-E2-ВГС: 1 – bv-CE1E2; 2 – bv-CE1E2 + NBDNJ (200 мкМ, положительный контроль); 3 – bv-CE1E2 + NBnDNJ (1 мМ); 4 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (1 мМ); маркерные белки, кДа

личество gpE2 уменьшается, а его подвижность снижается. Этот факт может указывать на присутствие в гликопротеине гипергликозилированных гликанов, усиливающих его взаимодействие с кальретикулином (рис. 5).

Таким образом, можно сделать вывод, что внутриклеточное N-гликозилирование гликопротеинов оболочки ВГС в клетках насекомых нарушается в присутствии N-алкилированных иминосахаров в концентрациях от 200 мкМ до 1 мМ, что индуцирует нарушение упаковки гликопротеинов ВГС и последующее формирование ВПЧ. Для дальнейшего анализа сворачивания гликопротеинов ВГС и их сборки в присутствии исследуемых ингибиторов необходимы конфор-

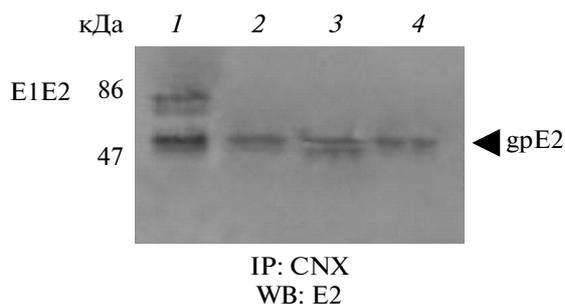


Рис. 4. Вестерн-блот-анализ продуктов экспрессии генов ВГС в клетках Sf9, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 в присутствии производных DNJ. Иммуноблоттинг белков лизатов инфицированных клеток с антителами против E2, после предварительного осаждения антителами к кальнексину (CNX): 1 – bv-CE1E2; 2 – bv-CE1E2 + NBDNJ (200 мкМ); 3 – bv-CE1E2 + NBnDNJ (1 мМ); 4 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (1 мМ).

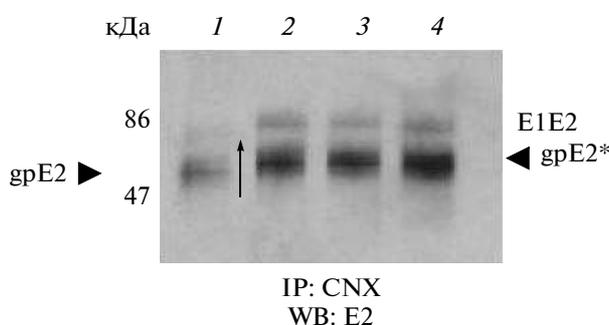


Рис. 5. Вестерн-блот-анализ продуктов экспрессии генов ВГС в клетках Sf9, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2, в присутствии производных DNJ. Иммуноблоттинг белков лизатов инфицированных клеток с антителами против E2, после предварительного осаждения антителами к кальретикулину (CLR): 1 – bv-CE1E2; 2 – bv-CE1E2 + NBDNJ (200 мкМ) – положительный контроль; 3 – bv-CE1E2 + NBnDNJ (1 мМ); 4 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (1 мМ); маркерные белки, кДа. gpE2* – гипергликозилированный гликопротеин. Стрелкой обозначен сдвиг электрофоретической подвижности gpE2*.

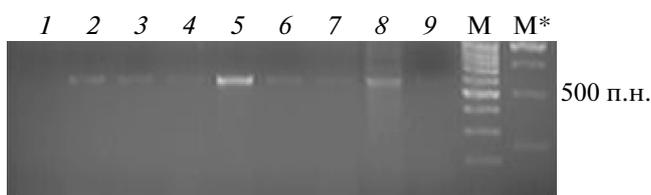


Рис. 6. Электрофоретическая подвижность ОТ-ПЦР-продуктов кДНК генов структурных белков ВГС, полученных на суммарной вирусной РНК ВГС, которые выделены из среды культивирования клеток, зараженных рекомбинантными вирусами, в 1%-м агарозном геле: 1 – bv-WT; 2 – bv-CE1E2; 3 – bv-CE1E2 + NBDNJ (200 мкМ, положительный контроль); 4 – bv-CE1E2 + NBnDNJ (500 мкМ); 5 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (1 мМ); 6 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (500 мкМ); 7 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (1 мМ); 8 – pCR4-ТОРО-CE1E2 (контроль); 9 – ПЦР-смесь (контроль ПЦР); М и М* – маркеры длины фрагментов ДНК: 1000 п.н. и 100 п.н.

мационно-чувствительные антитела против E2, специфичные к разным эпитопам.

Влияние ингибиторов α -глюкозидазы на синтез РНК ВГС

Присутствие структурных белков ВГС E1 и E2 во фракциях микросом и ЭР клеток насекомых свидетельствует об их встраивании в мембраны ЭР, где происходит также их сворачивание и формирование гетеродимеров с последующим образованием ВПЧ.

Как показано нами ранее, а также в работах, опубликованных другими авторами [21, 29, 35], ВПЧ ВГС, полученные в клетках насекомых, содержат кор-частицы с капсидированной вирусспецифической РНК. В клетках млекопитающих формирование вирусных частиц начинается, очевидно, со специфического взаимодействия кор-белка с синтезированной вирусной РНК.

Влияют ли ингибиторы α -глюкозидазы на синтез вирусспецифической РНК ВГС в клетках насекомых Sf9, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2? Чтобы ответить на этот вопрос, из среды культивирования клеток, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 в присутствии производных DNJ, выделяли суммарную вирусную РНК, анализировали ее с помощью ОТ-ПЦР, как описано в разделе "Экспериментальная часть". Полученную кДНК амплифицировали при помощи метода ПЦР с праймерами к генам структурных белков ВГС. В качестве контроля использовали полученную ранее рекомбинантную плазмидную ДНК pCR4-ТОРО-CE1E2 [21]. Фрагменты, содержащие последовательность кДНК гена белка С, представлены на рис. 6. Судя по этим данным, в среде культивирования образуются кор-подобные частицы ВГС – капсиды, содержащие фрагменты вирусспецифической РНК.

Как видно, обработка инфицированных рекомбинантным бакуловирусом клеток насекомых NBnDNJ и NPnDNJ в концентрации 500 мкМ и 1 мМ не ингибирует синтез суммарной вирусной РНК.

Влияние ингибиторов α -глюкозидазы на ультраструктуру ВПЧ ВГС

Из результатов, представленных выше, видно, что ингибиторы α -глюкозидазы не влияют на образование ВПЧ ВГС и их количество в клетках Sf9, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2. Об этом свидетельствует также электронно-микроскопическое изучение препаратов микросом, содержащих ВПЧ, образованные в присутствии ингибиторов α -глюкозидазы (рис. 7).

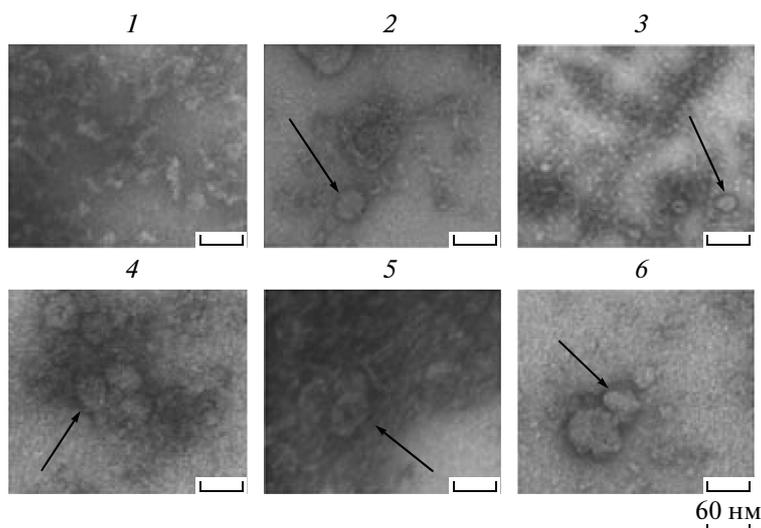


Рис. 7. Электронная микроскопия препаратов микросом клеток Sf9. Препараты получены из клеток насекомых, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2, в присутствии производных DNJ: 1 – bv-WT; 2 – bv-CE1E2; 3 – bv-CE1E2 + 5 мкМ туникамина (контроль гликозилирования); 4 – bv-CE1E2 + NBpDNJ (1 мМ); 5 – bv-CE1E2 + NPnDNJ (1 мМ); 6 – bv-CE1E2 + NBDNJ (200 мкМ, положительный контроль).

Стрелки указывают на вирусоподобные частицы.

Однако укладка гликопротеинов, участвующих в образовании ВПЧ в присутствии ингибиторов α -глюкозидазы, может отличаться от природной, поскольку гликопротеины содержат гипергликозилированные гликаны, что приводит к их неправильному сворачиванию. Агрегация гликопротеинов ВГС при этом усиливается. Известно, что ВПЧ ВГС, морфологически сходные с интактными вирионами, содержат не только функциональные, но и частично непродуктивные димеры E1E2 в виде агрегатов. В нашем случае соотношение функциональных и непродуктивных димеров из-за накопления гипергликозилированных гликанов меняется, что может вести к образованию дефектных ВПЧ, не способных связываться с клеткой [12].

Анализ влияния N-алкилированных иминосхаров на жизнеспособность клеток насекомых

Влияние производных DNJ на жизнеспособность инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 клеток Sf9 определяли несколькими методами, как описано в разделе “Экспериментальная часть”. На рис. 8 представлены результаты определения жизнеспособности клеток по окрашиванию трипановым синим [33]. Долю жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле:

$$\begin{aligned} \text{Доля жизнеспособных клеток, \%} &= \\ &= \frac{\text{число неокрашенных клеток}}{\text{общее число клеток}} \times 100\%. \end{aligned}$$

При сравнении инфицированной бакуловирусом и неинфицированной линии клеток насекомых видно (рис. 8), что при заражении вирусом жизнеспособность клеток несколько уменьшается. NBDNJ, NBpDNJ и NPnDNJ в исследованных концентрациях не оказывают существенного токсического воздействия на инфицированные бакуловирусом bv-CE1E2 клетки насекомых. Доля погибших клеток за 72 ч инкубации увеличивается в присутствии 1 мМ NPnDNJ на 4.1%, а в присутствии 1 мМ NBpDNJ – на 8.7%.

Сходные результаты получены и при анализе жизнеспособности клеток при помощи тестов с нейтральным красным и МТТ (данные не представлены). Таким образом использованные нами ингибиторы α -глюкозидазы малотоксичны для клеток насекомых и могут быть использованы в дальнейших исследованиях сборки ВПЧ как в клетках насекомых, а так и в культуре клеток Huh7,5 человека.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важнейшим этапом при конструировании эффективных противовирусных средств является этап поиска молекулярных мишеней, на которые направлено действие этих препаратов. В качестве альтернативы существующим стратегиям блокирования ВГС можно использовать воздействие на морфогенез вируса. Ингибиторами, влияющими на те стадии морфогенеза ВГС, которые определяют вирусную инфекцию, могут быть иминосхара и их производные.

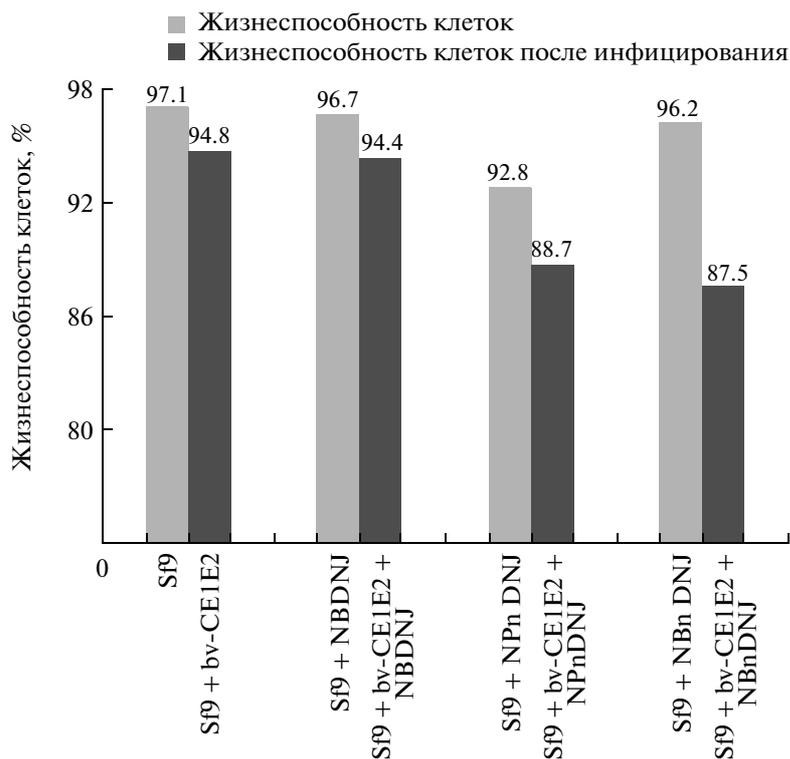


Рис. 8. Анализ жизнеспособности клеток Sf9, инфицированных bv-CE1E2, в присутствии различных производных DNJ: 200 мкМ NBDNJ, 1 мМ NBnDNJ и 1 мМ NPnDNJ. Клетки окрашивали трипановым синим и использовали тест исключения красителя.

С целью разработки новых противовирусных соединений, влияющих на формирование вириона ВГС, синтезированы ингибиторы α -глюкозидазы – производные иминосакхара DNJ – NPnDNJ и NBnDNJ – и показана их способность нарушать процесс внутриклеточного N-гликозилирования гликопротеинов оболочки вируса в клетках насекомых. Незавершенные тригликозилированные N-гликаны, которые образуются при ингибировании α -глюкозидазы, в процессе взаимодействия с кальнексином формируют непродуктивные димеры E1E2 и подавляют продуктивную сборку ВПЧ. Показано, что NPnDNJ и NBnDNJ в концентрациях 500 мкМ и 1 мМ не влияют на синтез РНК ВГС и образование ВПЧ в клетках насекомых, но влияют на гликозилирование белков оболочки вируса, составляющих ВПЧ, и их сворачивание, нарушая гетеродимеризацию gpE1E2. Нами проанализировано влияние производных иминосакхара DNJ на сборку в клетках насекомых гликопротеиновых комплексов, влияющих на формирование частиц, морфологически подобных вирионам ВГС. Изученные ингибиторы α -глюкозидазы, которые действуют на ключевые стадии морфогенеза ВГС, вызывающие сборку нефункциональных гликопротеиновых комплексов и включение их в вирионы, могут быть использованы для раз-

работки противовирусных соединений нового поколения.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-12136, 08-04-00281, 011-04-00231).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chou R., Clark E., Helfand M. 2004. Screening for hepatitis C virus infection: a review of the evidence for the U.S. Preventive services task force. *Ann. Intern. Med.* **140**, 465–479.
2. Durantel D., Carrouee-Durantel S., Branza-Nichita N., Dwek R. A., Zitzmann N. 2004. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 497–504.
3. Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., et al. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 975–982.
4. Dudley T., O'Donnell K., Haydon G., Mutimer D. 2006. Disappointing results of combination therapy for HCV. *Gut.* **55**, 1362–1363.
5. EL-Gogo S., Staib C., Lasarte J.J., Sutter G., Adler H. 2008. Protective vaccination with hepatitis C virus NS3 but not core antigen in a novel mouse challenge model. *J. Gene Med.* **10**, 177–186.
6. Reed K.E., Rice C.M. 2000. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing and pro-

- tein properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **242**, 55–84.
7. Иванов А.В., Кузякин А.О., Кочетков С.Н. 2005. Молекулярная биология вируса гепатита С. *Успехи биохимии.* **45**, 37–86.
 8. Karpas A., Fleet G.W., Dwek R.A., Petursson S., Namgoong S.K., Ramsden N.G., Jacob G.S., Rademacher T.W. 1988. Aminosugar derivatives as potential anti-immunodeficiency virus agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 9229–9233.
 9. Courageot M.-P., Frenkiel M.-P., Dos Santos C.-D., Deubel V., Desprès Ph. 2000. α -glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **74**, 564–572.
 10. Durantel D., Branza-Nichita N., Carrouee-Durantel S., Butters T.D., Dwek R.A., Zitzmann N. 2001. Study of the mechanism of antiviral action of iminosugar derivatives against bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **75**, 8987–8998.
 11. Branza-Nichita N., Durantel D., Carrouee-Durantel S., Dwek R.A., Zitzmann N. 2001. Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J. Virol.* **75**, 3527–3536.
 12. Chapel C., Garcia C., Bartosch B., et al. 2007. Reduction of the infectivity of hepatitis C virus pseudoparticles by incorporation of misfolded glycoproteins induced by glucosidase inhibitors. *J. Gen. Virol.* **88**, 1133–1143.
 13. Chapel C., Garcia C., Roingeard Ph., Zitzmann N., Dubuisson J., et al. 2006. Antiviral effect of α -glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **87**, 861–871.
 14. Helle F., Goffard A., Morel V., Duverlie G., McKeating J., Keck Z.-Y., Fong S., Penin F., Dubuisson J., Voisset C. 2007. The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J. Virol.* **81**, 8101–8111.
 15. Baumert T.F., Ito S., Wong D.T., Liang T.J. 1998. Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus-like particles in insect cells. *J. Virol.* **72**, 3827–3836.
 16. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* **244**, 359–362.
 17. Dubuisson J., Rice C.M. 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J. Virol.* **70**, 778–786.
 18. Kornfeld R., Kornfeld S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631–664.
 19. Yanjie Li., Wenxia F., Lei Zh., Haomiao O., Hui Zh., Yuanming Luo, Cheng Jinl. 2009. Class II α -mannosidase AfAms1 is required for morphogenesis and cellular function in *Aspergillus fumigates*. *Yanjie Glycobiology.* **19**, 624–632.
 20. *Glycoproteins.* 1995. The history of glycoprotein research, personal view. Eds Montreuil J., Vliegthart J.F., Schachter H. Amsterdam, Elsevier, 1–12.
 21. Jones D.M., McLauchlan J. 2010. Hepatitis C virus: assembly and release of virus particles *J. Biol. Chem.* **285**, 22733–22739.
 22. Burda P., Aebi M. 1999 The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**, 239–257.
 23. Trombetta E.S. 2003. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology.* **13**, 77R–91R.
 24. Kornfeld R., Kornfeld S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631–664.
 25. Goldman C., Petry H., Frye S., et al. 1999. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J. Virol.* **73**, 4465–4469.
 26. Xiang J., Wunschmann S., George S.L., Klinzman D., Schmidt W.N., LaBrecque D.R., Stapleton J.T. 2002. Recombinant hepatitis C virus-like particles, expressed by baculovirus: utility in cell-binding and antibody detection assays. *J. Med. Virol.* **68**, 537–43.
 27. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1982. *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
 28. *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. Instruction Manual.* 1993. St. Louis, MO: Life Technologies, Inc., Monsanto Corp. Res.
 29. Белжеларская С.Н., Королева Н.Н., Попенко В.В., Друца В.Л., Орлова О.В., Рубцов П.М., Кочетков С.Н. 2010. Характеристика структурных белков и вирусоподобных частиц вируса гепатита С, синтезированных в клетках насекомых с помощью бакуловирусной системы экспрессии. *Молекуляр. биология.* **44**, 107–119.
 30. King L.A., Possee R.D. 1992. *The Baculovirus Expression System: a Laboratory Guide.* London: Chapman, Hall. p. 229.
 31. Borenfreund E., Babich H., Martin-Alguacil N. 1988. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assay – the Neutral Red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. in vitro.* **2**, 1–6.
 32. Borenfreund E., Puerner J.A. 1985. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**, 119–124.
 33. Medzihradsky F., Marks M.J. 1975. Measures of viability in isolated cells. *Biochem. Med.* **13**, 164–177.
 34. Mokhonov V.V., Novikov D.V., Samokhvalov E.I., Shatalov A.G., Selivanov N.A., Prilipov A.G., L'vov D.K. 2002. Genome analysis of Hepatitis C virus strain 274933RU, isolated in Russian Federation. *Vopr. Virusol.* **47**, 9–12.
 35. Ke A., Gillock E.T., Sweat J.A., Reeves W.M., Consigli R.A. 1999. Use of baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J. Gen. Virol.* **80**, 1009–1016.