

УДК 577.21;578.821

РОЛЬ N-ГЛИКАНОВ ГЛИКОПРОТЕИНА E1 ВИРУСА ГЕПАТИТА С В ПРОЦЕССЕ СБОРКИ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА И ФОРМИРОВАНИИ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

© 2013 г. О. В. Орлова¹, В. Л. Друца², П. В. Спирин¹, В. И. Попенко¹,
В. С. Прасолов¹, П. М. Рубцов¹, С. Н. Кочетков¹, С. Н. Белжеларская^{1*}

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

²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899

Поступила в редакцию 15.05.2012 г.

Принята к печати 21.06.2012 г.

Оболочечные белки E1 и E2 вируса гепатита С (ВГС) играют ключевую роль в его жизненном цикле. Являясь основными компонентами вириона вируса, они участвуют в формировании инфекционных частиц. Вирусные белки оболочки содержат N-гликаны, которые могут непосредственно воздействовать на сворачивание белков, на образование функционального гликопротеинового комплекса, связывание вируса с клеткой и на другие функции этих белков. Влияние N-гликанов гликопротеина E1 ВГС на процесс сборки структурных белков анализировали с помощью сайт-направленного мутагенеза в модельной системе – клетках насекомых Sf9, синтезирующих три вирусных структурных белка с образованием вирусоподобных частиц с участием бакуловирусной системы экспрессии. Удаление единичных сайтов гликозилирования гликопротеина E1 не сказывается на эффективности его синтеза в клетках насекомых, а электрофоретическая подвижность мутантных белков E1 возрастает пропорционально снижению числа сайтов гликозилирования. Повреждение сайтов гликозилирования N1 или N5 гликопротеина E1 влияет на образование нековалентного гетеродимера E1E2 – прототипа природного комплекса, входящего в состав вириона ВГС. Показано также, что отсутствие углеводных цепей в сайтах N1 и N5 E1 существенно уменьшает эффективность его синтеза в клетках млекопитающих HEK293T.

Ключевые слова: вирус гепатита С (ВГС), белки оболочки E1 и E2 ВГС, вирусоподобные частицы, N-гликозилирование белков, олигонуклеотид-направленный мутагенез, бакуловирусная система экспрессии, клетки насекомых Sf9, клетки млекопитающих HEK293T.

ROLE OF N-LINKED GLYCANS IN HCV GLYCOPROTEIN E1 IN THE FOLDING OF STRUCTURAL PROTEINS AND FORMATION VIRAL PARTICLES, by O. V. Orlova¹, V. L. Drutsa², P. V. Spirin¹, V. I. Popenko¹, V. S. Prasolov¹, 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; ²Chemical Department, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia). Envelope proteins of HCV play a major role in virus lifecycle. These proteins are main components of the virion. They are involved in virus assembly. Envelope proteins are modified by N-linked glycosylation which is supposed to play a role in their stability, in the assembly of the functional HCV glycoprotein heterodimer, protein folding and viral entry. The role of N-linked glycosylation sites in HCV E1 protein in structural proteins assembly was analyzed by site-directed mutagenesis in a model system – insect cells producing three viral structural proteins with formation of virus-like particles. Removing of single N-linked glycosylation sites in HCV E1 protein does not affect the efficiency of its expression in insect Sf9 cells. E1 electrophoretic mobility is increasing in parallel with decreasing the number of glycosylation sites. The destroying of glycosylation sites N1 or N5 in E1 influences the assembly of noncovalent glycoprotein heterodimer E1E2 – the prototype of natural complex incorporated in virion. The lack of glycans in N1 and N5 sites of E1 was shown to affect the efficiency of its expression in mammalian HEK293 T cells.

Keywords: hepatitis C virus (HCV), HCV structural proteins, virus-like particles, site-directed mutagenesis, recombinant baculovirus, insect Sf9 cell, mammalian cells HEK293T, HCV glycoprotein glycosylation.

DOI: 10.7868/S0026898413010126

Принятые сокращения: ВГС – вирус гепатита С; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ЭР – эндоплазматический ретикулум; БОЕ – бляшкообразующие единицы.

* Эл.почта: belj@eimb.ru

Многие белки эукариотических клеток подвергаются посттрансляционному процессингу. Один из наиболее распространенных типов посттрансляционной модификации белка — это N-гликозилирование, при котором малоразветвленная олигосахаридная цепочка, состоящая из девяти остатков маннозы (Man) и трех остатков глюкозы (Glc), присоединяется к специфическим остаткам аспарагина в последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr (где X — любая аминокислота, кроме пролина) [1]. Присоединение олигосахарида к белку сопряжено с его фолдингом, при котором гликопротеин входит в кальнексин-кальретикулиновый цикл, специфически взаимодействуя с лектиноподобными шаперонами эндоплазматического ретикулума (ЭР) клетки, которые обеспечивают его частичное сворачивание. Наличие N-олигосахаридов (N-гликанов) может стабилизировать структуру белка, влиять на специфичность белок-белковых взаимодействий [2–9], а также играет важную роль в сворачивании большинства связанных с мембраной и секретируемых гликопротеинов. Гликозилирование есть характерный тип модификации поверхностных белков оболочечных вирусов.

Вирус гепатита С (ВГС) — единственный представитель рода *Hepacivirus* — относится к семейству *Flaviviridae*. Его геном кодирует один полипротеин-предшественник длиной примерно 3000 а.о., который подвергается процессингу в ЭР с образованием десяти зрелых структурных и неструктурных белков вируса [10–13]. Детальное строение вирусной частицы ВГС и способ ее формирования остаются мало изученными [12], причем наименее изучен процесс сборки вирионов и их выход из клетки. Обоснованно предполагается, что свойства вириона зависят от гликозилирования оболочечных белков ВГС в зараженной клетке, их взаимодействия и характера укладки [14, 15].

Гликопротеины оболочки вириона E1 и E2 содержат 5–6 и 9–10 потенциальных сайтов гликозилирования соответственно [11]. Следует отметить, что до сих пор не известно ни точное число сайтов гликозилирования E1, ни то, какие именно сайты участвуют в модифицировании белка и все ли эти потенциальные сайты “работают” *in vivo*.

После гликозилирования гликопротеины E1 и E2 ВГС могут либо димеризоваться, с образованием функциональных нековалентных комплексов, либо образовывать дисульфидные мостики и формировать агрегаты, содержащие неправильно свернутые нефункциональные белки. В образовании комплексов участвуют два клеточных белка-шаперона — кальнексин и кальретикулин. Первый взаимодействует с гликопротеинами, участвующими в образовании функциональных комплексов, а кальретикулин — с неправильно упакованными гликопротеинами, образующими агрегаты

[14–16]. Комплексы первого типа обеспечивают связывание вируса с рецепторами клетки и проникновение вирусной частицы в клетку, влияют на формирование его антигенного состава и, возможно, играют определенную роль в вирусном патогенезе [17]. Образование агрегатов неправильно свернутых гликопротеинов может приводить к образованию дефектных вирусных частиц, способных, возможно, подавлять способность вируса связываться с клеткой и нарушать выход вируса из клетки [18–20].

Мы исследовали влияние N-гликанов гликопротеина E1 ВГС на процесс сборки структурных белков и формирование вирусных частиц с помощью сайт-направленного мутагенеза в модельной системе, в которой вирусоподобные частицы (ВПЧ), морфологически подобные природному вириону, формируются в клетках насекомых, трансфицированных бакуловирусными векторами; эти векторы направляют экспрессию генов структурных белков ВГС [15]. Для создания мутантов E1 применена схема олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием “стандартных” двутяжевых плазмидных векторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные клетки, клеточные культуры и плазмиды. Использовали штаммы *Escherichia coli* DH5a и DH10Bac (“Gibco-BRL”, США), линию клеток Sf9 *Spodoptera frugiperda* и эмбриональные клетки почки человека линии HEK293T.

Бактериальные клетки трансформировали плазмидными ДНК согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (“Amersham”, США). Выделение и очистку плазмид, расщепление рестриктазами, лигирование, электрофорез ДНК в агарозном геле и другие генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным протоколам [21].

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 [22]. Для определения титра вируса, амплификации рекомбинантного вируса, заражения клеток Sf9 рекомбинантным бакуловирусом, а также для анализа вирусной экспрессии использовали ту же инструкцию.

Эмбриональные клетки почки человека линии HEK293T культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пируват натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл соответственно, при температуре 37°C и атмосфере 5% CO₂.

Использованные праймеры

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
16-Haml	CCA CTA CGA CAA TAC G
15-Hamr	GAG CAA GTC GAC GTG
26-N5tl	GGA CTG CCA ATG CTC AAT CTA TCC CG
17-N6tl	TGG TCA CTT ACA ACA GC
23-N5br	GAG CAT TGG CAG TCC TGC ACT GT
17-N6br	CTG TTG TAA GTG ACC AG
17-N7tl	GAA CTG GTC TAA GGT TC
17-N7br	AAC CTT AGA AGA CCA GTT CC
24r-Hpsr	AG CTG CAG TTA CCC GTC AAC GCC
29-EN1m	TTA TGA AGT GCG CCA AGT GTC CGG CAT AT
30-EN2m	AAC GAC TGC TCC CAA TCA AGC ATT GCG TAT
27-EN3m	GTT CAG GAG GGT CAA AGC TCC CGT TGC
24-EN4m	CGC GGC CAG GCA AGC CAG CGT CCC
19 Haml	CAC TAC GAC AAT ACG ACG T
18 Hamr	AGC AAG TCG ACG TGA CGT

Рекомбинантные конструкции. несущие кДНК, соответствующие генам структурных белков ВГС, рекомбинантные бакмиды, а также рекомбинантный бакуловиреус bv-CE1E2 получали и анализировали по ранее отработанным методикам [23].

Сайт-направленный мутагенез. Фрагмент ДНК, содержащий последовательность кДНК гена, кодирующего гликопротеин E1 ВГС, клонировали в плазмиде рKS(-) по сайтам ClaI-PstI с использованием стандартного протокола. Для получения серии рекомбинантных плазмид, несущих кДНК белка E1 с точечными заменами в сайтах гликозилирования, сконструировали олигонуклеотидные праймеры (таблица). Каждый праймер состоит из 18–30 н. и содержит последовательность, кодирующую сайт N-гликозилирования: Asn-X-Thr/Ser (X ≠ Pro), в котором триплет, кодирующий Asn, замещен триплетом, кодирующим Gln.

Для мутагенеза использовали метод, описанный Друца и соавт. [24]. ПЦР проводили на программируемом термостате “ЦиклоТемп 107” (ЗАО “Ресурс Прибор”, Россия). Оптимальные условия ПЦР подбирали эмпирически, в каждом случае стремясь использовать минимальное число циклов, в течение которых происходит накопление количества целевого продукта, достаточного для последующего клонирования. Наличие всех заданных замен нуклеотидов подтверждали секвенированием. Полученные мутантные варианты встраивали в бакуловирусные векторы, как описано ранее [23]. В результате получили векторы рFastBacHTb-CE1mutE2 и BacMam-CE1mutE2-GFP.

Анализ суммарной клеточной ДНК. Суммарную клеточную ДНК выделяли из клеток насекомых через 72 ч после заражения рекомбинантными ба-

куловирусами bv-CE1E2, bv-E1mut, bv-E1mutE2, bv-CE1mutE2 (с множественностью заражения 5 БОЕ/кл) [23]. Наличие кДНК генов структурных белков ВГС в суммарной клеточной ДНК оценивали с помощью ПЦР, используя праймеры к бакуловирусному вектору рFastBacHT (прямой 5'-GTGGTTGGCTACGTATACTCC-3', обратный 5'-CCTCTACAAATGTGGTATGGC-3').

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

Получение и очистка ВПЧ. Клетки, растущие в монослое при 27°C, заражали рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (20 БОЕ/кл). Через 72 ч клетки (2×10^8) собирали, отмывали три раза фосфатно-солевым буфером (PBS), ресуспендировали в лизирующем буфере TNC (10 mM Трис-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM PMSF, ингибиторы протеаз (1 : 200)), содержащем 0.25% дигитонина, и разрушали ультразвуком. ВПЧ из гомогенизированных лизатов очищали от клеточ-

ных остатков низкоскоростным центрифугированием (1200 g, 15 мин, 4°C). Затем ВПЧ концентрировали в две стадии – центрифугированием через 30%-ную сахарозную подушку при 230000 g в течение 16 ч при 4°C и высокоскоростным ультрацентрифугированием при 230000 g, 3 ч, при 4°C. Осадок ВПЧ ресуспендировали в TNC-буфере, содержащем 1 mM PMSF и ингибиторы протеаз (1 : 200). Очищенные частицы анализировали с помощью электронной микроскопии и вестерн-блотинга [21, 25].

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 (ФГБУ “НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского” Минздравсоцразвития России, Москва). В качестве вторичных антител использовали конъюгаты пероксидазы хрена с антителами против IgG мыши (AB6706-1EA) (“Sigma”).

Вестерн-блот и иммуноосаждение. Через 72 ч после заражения рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (множественность заражения 20 БОЕ/кл) клетки Sf9 собирали, трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере PBS (1.47 mM KH_2PO_4 , 4.29 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 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). Лизат наносили на 12%-ный ПААГ, каждый образец содержал 10 мкг белка. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL (“Amersham Biosciences”) 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 к кальретикулину (в разведении 1 : 1000 и 1 : 2000 соответственно), а затем с 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 осаждали 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%-ном ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с первичными антителами в разведениях, указанных выше, а затем обрабатывали вторичными антителами.

Электронная микроскопия. Каплю образца очищенных ВПЧ (~10 мкл) наносили на свежеео-низированную угольно-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 1.5%-ным водным раствором уранилацетата, высушивали на воздухе и исследовали в электронном микроскопе JEM-100CX (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

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 и 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%-ном ПААГ.

Флуоресцентная микроскопия и проточная цитофлуориметрия. Через 72 ч после трансфекции клетки HEK293T анализировали на микроскопе Leica DMI 4000 (США). Через 48 ч после трансфекции рекомбинантными плазмидными клетками млекопитающих снимали с подложки раствором трипсина, собирали центрифугированием, дважды промывали фосфатно-солевым буфером и анализировали в проточном цитофлуориметре (“Beckman Coulter EPICS”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Ранее мы показали, что в клетках насекомых происходит синтез структурных белков ВГС – кор-белка (С) и белков оболочки E1 и E2, посттрансляционное гликозилирование последних, а также сборка *in vitro* и образование ВПЧ [23]. В данной работе мы изучили влияние N-гликанов белка E1 на образование гетеродимеров E1E2 и ВПЧ в модельной системе – клетках насекомых Sf9, которые трансдуцированы бакуловирусными векторами pFastBacHT, содержащими ген поли-

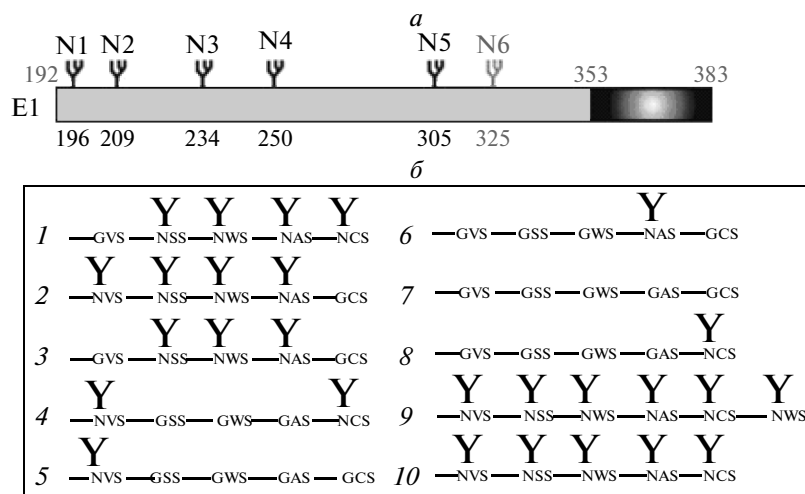


Рис. 1. Сайты N-гликозилирования в структурном белке E1 ВГС и его мутантных вариантах. *a* – Схема расположения сайтов гликозилирования N1-N5 и дополнительного сайта N6 в полипептидной цепи E1 ВГС. *б* – Схематическое изображение мутантных вариантов гликопротеина E1 с модифицированными (нарушенными) сайтами гликозилирования: 1 – N1; 2 – N5; 3 – N1 и N5; 4 – N2, N3 и N4; 5 – N2, N3, N4 и N5; 6 – N1, N2, N3 и N5; 7 – N1– N5; 8 – N1, N2, N3 и N4; 9 – с введенным дополнительно сайтом гликозилирования N6; 10 – исходный вариант E1 дикого типа. Сайты гликозилирования отмечены знаком “Y”.

протеина CE1E2 ВГС (генотип 1б, штамм 274933RU [26]). С этой целью использовали олигонуклеотид-направленный мутагенез на двутажевых плазмидных векторах и получили генетические конструкции, кодирующие десять вариантов белка E1 ВГС с мутациями в шести сайтах гликозилирования (рис. 1). Полученные конструкции экспрессировали в клетках насекомых и анализировали эффективность синтеза мутантных белков и влияние модификации сайтов гликозилирования на процессинг структурных белков ВГС, накопление gpE1 и gpE2 в ЭР клеток насекомых и их гликозилирование, на взаимодействие гликопротеинов с кальнексином и кальретикулином, а также на образование продуктивного комплекса E1E2 и формирование ВПЧ. Для экспрессии в клетках млекопитающих получали конструкции, кодирующие белок E1 с мутациями в пяти сайтах гликозилирования.

Влияние N-гликанов гликопротеина E1 ВГС на эффективность экспрессии генов вирусных оболочечных белков в клетках насекомых

Ранее мы показали, что в клетках насекомых происходит эффективное посттрансляционное гликозилирование белков оболочки ВГС. Об этом свидетельствует анализ электрофоретической подвижности гликопротеинов E1 и E2 ВГС, которые синтезируются в инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bv-E1E2 клетках насекомых в присутствии и в отсутствие туникамицина, блокирующего гликозилирование белков [23]. Эффективность гликозилирования мутантных вариантов

гликопротеина E1 ВГС, а также влияние N-гликанов гликопротеина E1 на его синтез и процессинг E1 и E2 изучали в клетках насекомых, которые трансдуцированы бакуловирусными векторами, направляющими экспрессию генов структурных белков ВГС.

Экспрессию генов мутантных вариантов белка E1 (E1mut) и белка E2 дикого типа в клетках насекомых, а также эффективность гликозилирования вариантов E1 с мутациями в потенциальных сайтах гликозилирования анализировали с помощью электрофореза в ПААГ и иммуноблотинга с антителами к E1 ВГС. Как видно из рис. 2*a*, нарушение сайтов гликозилирования в различных комбинациях существенно не влияет на эффективность синтеза гликопротеина E1 ВГС в клетках насекомых, при этом электрофоретическая подвижность мутантных белков возрастает пропорционально уменьшению числа сайтов гликозилирования. Введение в белок E1 дополнительного сайта гликозилирования (N6) не влияет на эффективность синтеза гликопротеина E1 и не изменяет его электрофоретическую подвижность. Опыты по обработке мутантных гликопротеинов E1 эндогликозидазой EndoH с последующим вестерн-блотингом показали, что в клетках насекомых происходит гликозилирование синтезированных мутантных гликопротеинов. Мутантные варианты гликопротеина E1 чувствительны к действию эндогликозидазы, хотя и в меньшей степени, чем E1 дикого типа (рис. 2*б*).

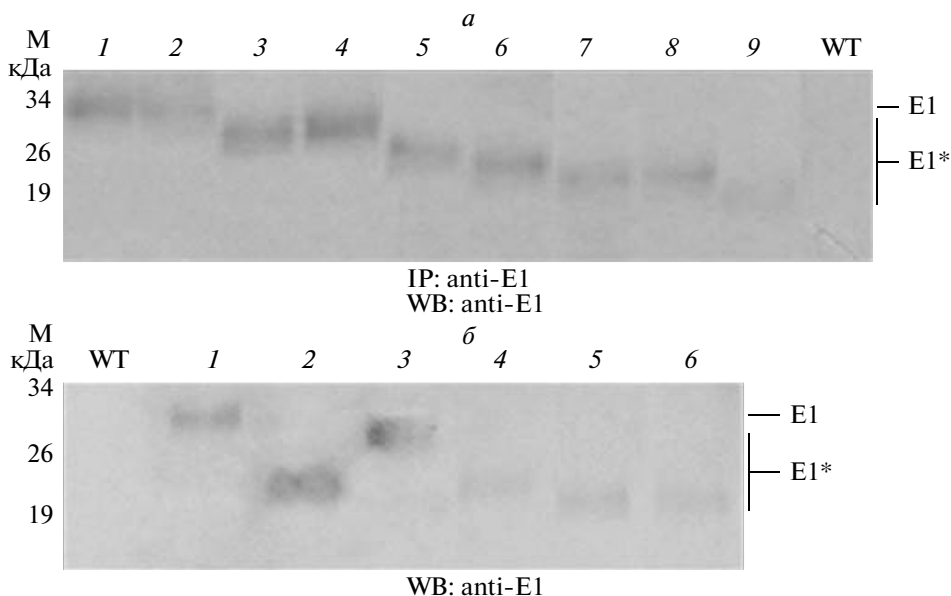


Рис. 2. Анализ синтеза и гликозилирования мутантных белков E1 в комбинации с E2 ВГС в клетках насекомых Sf9. *a* – Вестерн-блоттинг в денатурирующем 12%-ном ПААГ с антителами к E1 ВГС после предварительного иммуноосаждения. Лизаты клеток, синтезирующие E1: 1 – E1 дикого типа; 2 – E1 с дополнительным сайтом гликозилирования N6; E1 с мутациями в сайте гликозилирования 3 – N1; 4 – N5; 5 – N1 и N5; 6 – N2, N3 и N4; 7 – N1, N2, N3 и N4; 8 – N2, N3, N4 и N5; 9 – во всех сайтах гликозилирования N1-N5. *б* – Вестерн-блот-анализ гликозилирования мутантных белков E1 в комбинации с E2 ВГС в клетках насекомых с антителами к E1 ВГС: 1 – E1 дикого типа, обработанный эндогликозидазой H; 3 – E1 с мутацией в сайте гликозилирования N1; 4 – E1 с мутацией в сайте гликозилирования N1, обработанный эндогликозидазой H; 5 – E1 с мутацией в сайте гликозилирования N1 из клеток, обработанных туникамицином; 6 – E1 с мутациями во всех пяти сайтах гликозилирования. WT – бакуловиральный вектор дикого типа (отрицательный контроль). Мутантные белки обозначены – E1*. М – маркерные белки, кДа. IP – иммуноосаждение, WB – Вестерн-блоттинг (здесь и на рис. 3).

Влияние N-гликанов гликопротеина E1 ВГС на образование продуктивного комплекса E1E2 в клетках насекомых

О влиянии индивидуальных углеводных цепей в сайтах гликозилирования белка E1 на сворачивание как самого E1, так и гликопротеина E2, можно судить по образованию гетеродимеров E1E2 и взаимодействию с ними клеточных белков-шаперонов кальнексина и кальретикулина. Как известно, с гликопротеинами, участвующими в образовании функциональных комплексов, взаимодействует кальнексин, в то время как кальретикулин взаимодействует с неправильно упакованными гликопротеинами, образующими агрегаты. [14–16]. Используя антитела к кальнексину и кальретикулину, мы проверили, как влияют модификации сайтов гликозилирования в E1 на образование функциональных и нефункциональных гетеродимеров E1E2 в клетках насекомых. Для этого белки из клеточных лизатов вначале осаждали антителами к гликопротеину E2, затем разделяли с помощью электрофореза в ПААГ и, после переноса на нитроцеллюлозную мембрану, выявляли антителами к кальнексину (рис. 3*а*) или кальретикулину (рис. 3*б*).

Оказалось, что при образовании мутантных белков E1, лишенных одного из четырех сайтов

гликозилирования (N2, N3, N4 или N6), в клетках насекомых формируется нековалентный комплекс E1E2, хотя и менее эффективно, чем в случае экспрессии E1 дикого типа. При этом, по мере увеличения числа поврежденных сайтов гликозилирования в E1 взаимодействие гетеродимеров с кальнексином уменьшается, а с кальретикулином увеличивается. С кальретикулином взаимодействуют гетеродимеры, образованные гликопротеином E1 с мутациями во всех сайтах гликозилирования, т.е. агрегаты, содержащие неправильно свернутые нефункциональные гликопротеины E1 и E2. Способность взаимодействовать с E1mut неправильно свернутого E2 уменьшается, если судить по уменьшению количества последнего при сосаждении с антителами к кальретикулину. Интересно, что сборка продуктивного комплекса E1E2 нарушается в результате повреждения сайтов гликозилирования N1 или N5. Отсутствие углеводных цепей именно в этих сайтах, по-видимому, препятствует образованию продуктивного комплекса E1E2, а углеводные цепи, связанные с сайтами N1 и N5, играют наиболее существенную роль в образовании правильной конформации этих белков. Суммируя результаты анализа сборки гетеродимеров E1E2 в клетках насекомых, можно заключить, что мутации сайтов гликозилирования N2, N3, N4 и N6 гликопротеина E1

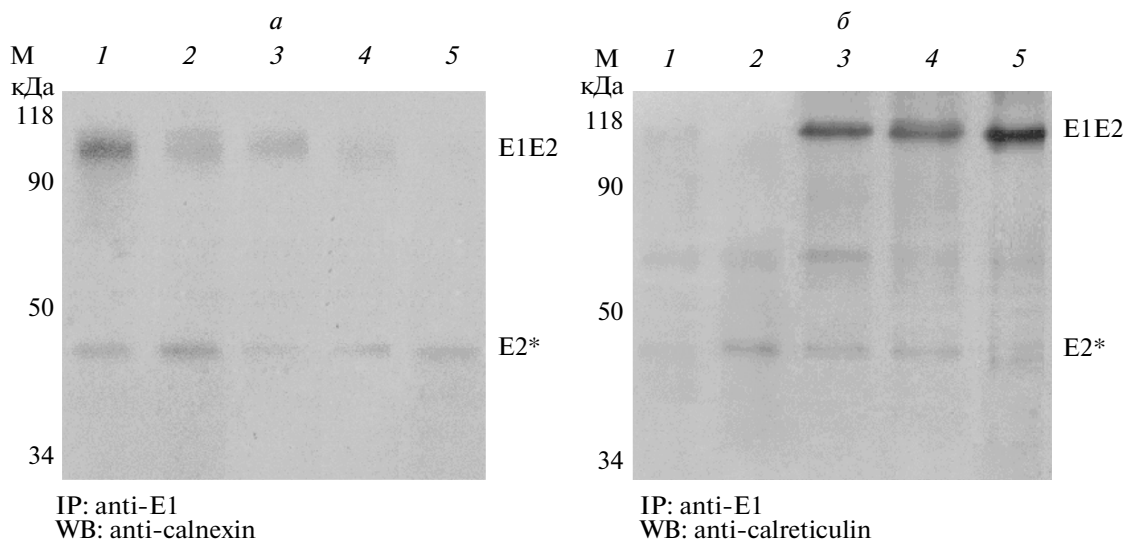


Рис. 3. Вестерн-блот-анализ образования гетеродимеров E1E2 ВГС в клетках насекомых, синтезирующих мутантные варианты E1, с антителами к кальнексину (*а*) и кальретикулину (*б*) после предварительного иммуноосаждения с антителами к E2. Лизаты клеток, синтезирующих E1: 1 – E1 дикого типа; 2 – E1 с мутациями в сайте гликозилирования N3; 3 – E1 с мутациями в сайте гликозилирования N5; 4 – E1 с мутациями в сайтах гликозилирования N1 и N5; 5 – E1 с мутациями во всех пяти сайтах гликозилирования. М – маркерные белки, кДа.

практически не влияют на сборку гликопротеинов оболочки ВГС, в то время как мутации сайтов N1 и N5 ее нарушают.

Влияние N-гликанов гликопротеина E1 на образование вирусоподобных частиц ВГС в клетках насекомых

Ранее мы показали, что синтез белков С, E1 и E2 ВГС в клетках насекомых сопровождается образованием ВПЧ [23]. В настоящей работе мы проверили, как влияет модификация сайтов гликозилирования гликопротеина E1 на образование ВПЧ ВГС в этой системе. Из клеток насекомых, трансдуцированных бакуловирусными векторами pFastBacSE1mutE2, выделяли микросомы, которые затем анализировали с помощью электрофореза в ПААГ и вестерн-блотинга с антителами к E2 (рис. 4*а*) и электронной микроскопии (рис. 4*б*). Как следует из результатов, представленных на этих рисунках, введение мутаций в сайты гликозилирования не препятствует образованию ВПЧ ВГС в клетках насекомых. При модификации сайтов гликозилирования N1 или N5, как показано в предыдущих опытах, такие ВПЧ, вероятно, могут содержать неправильно упакованные гликопротеины.

Влияние N-гликанов гликопротеина E1 ВГС на образование ВПЧ в клетках млекопитающих

Используя векторную плазмиду pFastBacMam1GFP, полученную нами ранее [23], мы сконструировали также векторы для экспрессии в клетках млекопитающих генов структурных

белков ВГС в составе полипептида CE1E2. Векторами pFastBacMam-CE1mutE2GFP, кодирующими нормальные белки С и E2 и различные мутантные варианты белка E1 с модификациями сайтов гликозилирования, трансфицировали клетки НЕК293Т человека. Экспрессию генов мутантных белков E1 ВГС и эффективность их гликозилирования в клетках человека анализировали с помощью электрофореза в ПААГ и иммуноблотинга (рис. 5*а*).

Как видно из рис. 5*а*, мутантные варианты E1 действительно синтезируются в этих клетках, при этом электрофоретическая подвижность белков возрастает пропорционально уменьшению числа интактных сайтов гликозилирования. Так же, как и в клетках насекомых Sf9, эффективность гликозилирования гликопротеина E1 в клетках НЕК293Т зависит от присутствия гликанов в сайтах гликозилирования белка. Однако, в отличие от того, что наблюдается в клетках насекомых, от присутствия гликанов в потенциальных сайтах гликозилирования зависит и эффективность синтеза E1 ВГС в клетках НЕК293Т. Влияет ли модификация сайтов гликозилирования белка E1 на эффективность синтеза структурных белков ВГС, оценивали по уровню синтеза полипептидов CE1mutE2GFP, используя методы флуоресцентной микроскопии (данные не показаны) и проточной цитофлуориметрии (рис. 5*б*). Как видно, отсутствие сайтов гликозилирования N1 или N5 E1 ведет к значительному уменьшению флуоресценции GFP, что свидетельствует о снижении уровня синтеза полипептидов CE1mutE2GFP – по сравнению с CE1E2GFP. Напротив, отсутствие

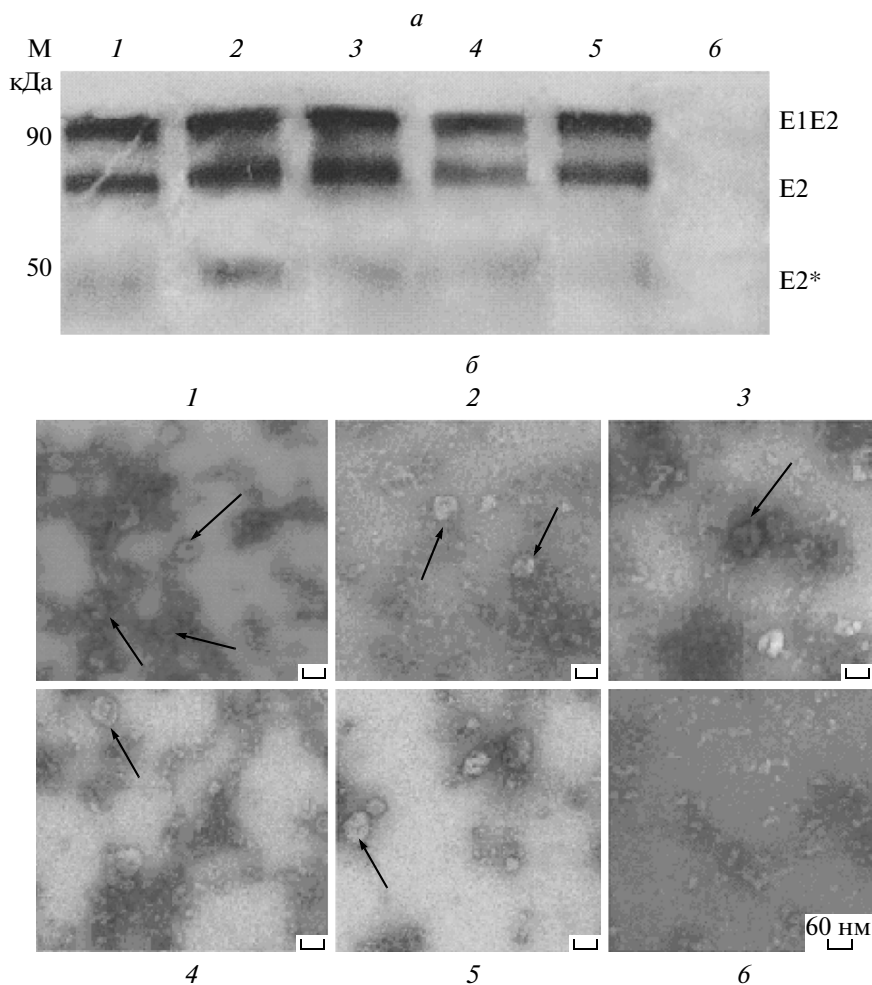


Рис. 4. Анализ ВПЧ ВГС, образующихся в клетках насекомых Sf9, синтезирующих структурные белки вируса. *a* – Вестерн-блот-анализ с моноклональными антителами против белка E2 структурных белков ВГС в ВПЧ, которые выделены из клеток насекомых Sf9, зараженных бакуловирусами bv-CE1E2: 1 – bv-CE1E2 дикого типа; 2 – bv-CE1E2 с мутацией в сайте гликозилирования N1; 3 – bv-CE1E2 с мутацией в сайте гликозилирования N5; 4 – с мутациями в сайтах гликозилирования N2, N3, и N4; 5 – с мутациями во всех пяти сайтах гликозилирования; 6 – бакуловирусом bv-CAT/Gus. М – маркеры молекулярной массы, кДа. Частично дегликолизированный белок обозначен – E2*. *б* – Электронная микроскопия вирусоподобных частиц ВГС во фракциях микросом, очищенных из инфицированных рекомбинантными бакуловирусами клеток Sf9. Положение ВПЧ показано стрелками.

сайтов гликозилирования N2, N3 или N4 белка E1 не влияет на уровень синтеза полипептида CE1mutE2GFP.

Таким образом, мы исследовали, влияет ли удаление N-гликанов в определенных позициях белка E1 ВГС на его фолдинг и точность сборки комплекса E1E2, представляющего собой функциональную субъединицу вирионной оболочки зрелой вирусной частицы, и показали, что нарушение сайтов гликозилирования в различных комбинациях в белке E1 не влияет сколько-нибудь существенно на эффективность его синтеза в клетках насекомых. В то же время, для образования функциональных гетеродимеров E1E2 необходимо наличие N-гликанов в сайтах N1 и N5 белка E1, и гликозилирование синтезированных

мутантных гликопротеинов происходит менее эффективно, чем в случае E1 дикого типа. Чем меньше число сайтов гликозилирования, тем слабее взаимодействие гликопротеинов E1mutE2 с кальнексинем, а с кальретикулином оно сильнее. С последним взаимодействуют гликопротеины с мутациями во всех сайтах гликозилирования, образуя нефункциональные агрегаты.

Присутствие структурных белков ВГС во фракциях эндотелиального ретикулума (ЭР) и микросом свидетельствует о том, что синтезируемые в клетках насекомых рекомбинантные белки ВГС, в том числе E1, содержащий мутации, встраиваются в мембраны ЭР, где происходит их сворачивание, образование комплекса E1mutE2 и формирование вирусоподобной частицы. Наличие

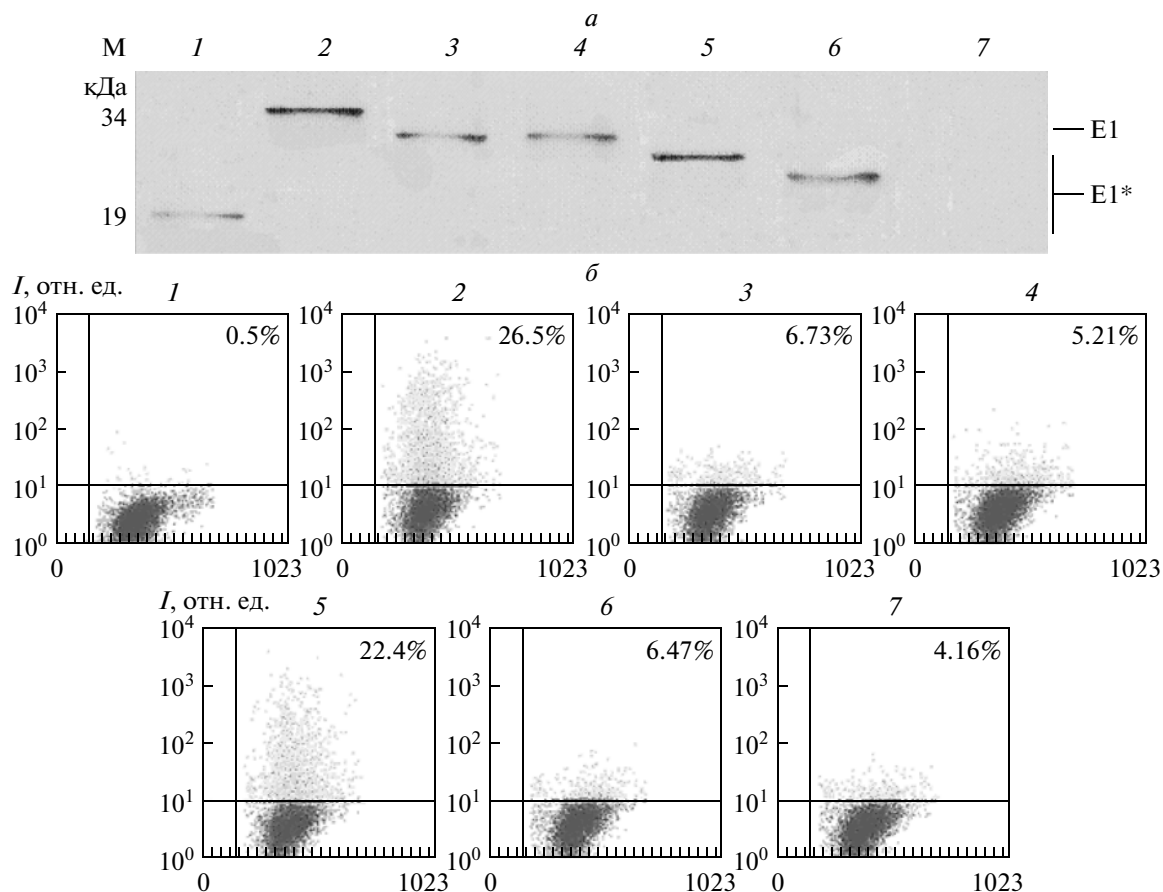


Рис. 5. Анализ экспрессии генов мутантных белков E1 в составе ВПЧ ВГС в клетках HEK293. *a* – Вестерн-блоттинг белков после разделения в денатурирующем 12%-ном ПААГ с антителами к E1 ВГС. Лизаты клеток, синтезирующих E1: 1 – E1 с мутациями во всех сайтах гликозилирования; 2 – E1 дикого типа; 3 – E1 с мутациями в сайтах гликозилирования N1; 4 – E1 с мутациями в сайте гликозилирования N5; 5 – E1 с мутациями в сайтах гликозилирования N1 и N5; 6 – E1 с мутациями сайтах гликозилирования N2, N3 и N4; 7 – лизат клеток HEK293T. Мутантные белки обозначены – E1*. М – маркерные белки, кДа. *б* – Анализ флуоресценции зеленого белка GFP в клетках HEK293T, трансфицированных рекомбинантными плазмидными ДНК pFastBacMam CE1E2GFP с различными мутациями в гене E1, методом проточной цитофлуориметрии. На гистограммах по оси абсцисс указан линейный размер анализируемых частиц (клеток) в относительных единицах, а по оси ординат – относительное значение интенсивности флуоресценции. 1 – Исходные клетки HEK293; Клетки, трансфицированные плазмидными ДНК pFastBacMam CE1E2GFP с геном E1: 2 – E1 дикого типа; 3 – E1 с мутацией в сайте гликозилирования N1; 4 – E1 с мутацией в сайте гликозилирования N5; 5 – E1 с мутациями в сайтах гликозилирования N2, N3 и N4; 6 – E1 с мутациями в сайтах гликозилирования N1 и N5; 7 – E1 с мутациями во всех пяти сайтах гликозилирования.

E1mut в составе ВПЧ в клетках Sf9 свидетельствует о том, что мутации в белке не влияют на их образование и количество в клетках. Однако, отсутствие углеводных цепей в сайтах гликозилирования N1 и N5, приводит к неправильному сворачиванию белков и, по-видимому, накоплению непродуктивных димеров E1E2 в виде агрегатов в составе ВПЧ и к подавлению продуктивной сборки вирусоподобных частиц. Образование агрегатов неправильно свернутых гликопротеинов приводит к образованию дефектных вирусных частиц, отличающихся от природных и способных, возможно, нарушать секрецию вируса из клетки и подавлять его способность связываться с последней.

Полученные нами результаты показывают, что мутантные гликопротеины E1 в составе ВПЧ синтезируются в клетках млекопитающих. При этом, отсутствие гликанов в сайтах N2, N3 или N4 не влияет на уровень синтеза структурных белков в составе ВПЧ так же, как и в клетках насекомых Sf9. Однако отсутствие гликанов в сайтах N1 или N5 ведет к значительному уменьшению флуоресценции GFP, которая характеризует уровень синтеза белков, образующих ВПЧ. Следовательно, эффективность экспрессии белков в составе ВПЧ в клетках HEK293T, в отличие от клеток насекомых Sf9, существенно зависит от присутствия гликанов в сайтах гликозилирования N1 и N5 гликопротеина E1. Представленные данные со-

гласуются с аналогичными данными, полученными при изучении роли N-гликанов в других современных системах экспрессии [27, 28].

Дальнейшее изучение влияния N-гликозилирования оболочечных белков E1 и E2 на образование комплекса E1E2 и сборки ВПЧ в модельных системах на основе клеток насекомых и млекопитающих позволит уточнить роль посттрансляционных модификаций структурных белков ВГС в инфекционном цикле вируса и может стать основой для разработки новых подходов к антивирусной терапии.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-12136, 08-04-00281, 011-04-00231) и Министерства образования и науки РФ (Госконтракт № 16.512.11.2266).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burda P., Aebi M. 1999 The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**, 239–257.
- Imperiali B., O'Connor S.E. 1999. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 643–649.
- Lis H., Sharon N. 1993. Review. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.* **218**, 1–27.
- Wyss D., Wagner G. 1996. Structural role of sugars in glycoproteins. *Curr. Opin. Biotechnology.* **7**, 409–416.
- Bas T., Gao G.Y., Lvov A., Chandrasekhar K.D., Gilmore R., Kobertz W.R. 2011. Post-translational N-glycosylation of type I transmembrane KCNE1 peptides implications for membrane protein biogenesis and disease. *J. Biol. Chem.* **286**, 28150–28159.
- Kornfeld R., Kornfeld S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631–664.
- Rudd P.M., Elliott T., Cresswell P., Wilson I.A., Dwek R.A. 2001. Glycosylation and the immune system. *Science.* **291**, 2370–2376.
- Varki A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* **3**, 97–130.
- Helenius A., Aebi M. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* **291**, 2364–2369.
- Reed K.E., Rice C.M. 2000. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing and protein properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **242**, 55–84.
- Иванов А.В., Кузякин А.О., Кочетков С.Н. 2005. Молекулярная биология вируса гепатита С. *Успехи биохимии.* **45**, 37–86.
- 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.
- 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.
- Dubuisson J., Rice C.M. 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J. Virol.* **70**, 778–786.
- Jones D.M., McLauchlan J. 2010. Hepatitis C virus: assembly and release of virus particles *J. Biol. Chem.* **285**, 22733–22739.
- Trombetta E.S. 2003. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology.* **13**, 77R–91R.
- The history of glycoprotein research, personal view. Glycoproteins.* 1995. Eds Montreuil J., Vliegthart J.F., Schachter H. Amsterdam: Elsevier, pp. 1–12.
- Chapel C., Garcia C., Roingard Ph., 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.
- 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.
- 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**, 537–543.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1982. *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. Instruction Manual.* 1993. St. Louis, MO: Life Technologies, Inc., Monsanto Corp. Res.
- 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.
- Друца И.Л., Кабердин В.Р., Королева О.Н., Шилов И.О. 1991. Эффективный метод направленного введения мутации в плазмиды и клонирование одноэтажных фрагментов ДНК. *Биооргани. химия.* **17**, 1487–1493.
- King L.A., Possee R.D. 1992. *The Baculovirus Expression System: a Laboratory Guide.* London: Chapman, Hall. p. 229.
- Мохонов В.В., Новиков Е.И., Самохвалов Е.И. и др. 2002. Анализ генома изолята 274933RU вируса гепатита С, выделенного на территории Российской Федерации. *Вопросы вирусологии.* **47**, 9–12.
- Goffard A., Callens N., Bartosch B., Wychowski C., Cosset F.-L., Montpellier C., Dubuisson J. 2005. Role of N-linked glycans in the function of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* **79**, 8400–8409.
- Helle F., Vieyres G., Elkrief L., Popescu C.-L., Wychowski C., Descamps V., Castelain S., Roingard P. 2010. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J. Virol.* **84**, 11905–11915.