

Ивин Юрий Юрьевич

**РОЛЬ СЕКЬЮРИТИ-БЕЛКОВ L И 2A ВИРУСА ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА
В РАЗВИТИИ КЛЕТОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ**

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Научный руководитель:

Ишмухаметов Айдар Айратович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН.

Официальные оппоненты:

Забережный Алексей Дмитриевич – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности».

Иванов Александр Владимирович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1 и на сайте: <http://www.chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Течение вирусной инфекции в многоклеточных организмах и отдельных клетках представляет собой чрезвычайно сложный процесс, в который вовлечены многие десятки молекул-участников со стороны вируса и клеток. Будучи облигатными клеточными паразитами, вирусы способны размножаться только внутри жизнеспособных клеточных структур, используя для этого энергетические и структурные ресурсы хозяина. Вирусные инфекции – неотъемлемая часть жизни многоклеточных организмов и эволюции всего эукариотического мира. В ходе совместного существования эти части органического мира выработали множество сценариев взаимодействия. В зависимости от типа клеток размножение вирусов может вызывать их гибель, индуцируя развитие серьезных заболеваний у многоклеточных организмов, или, напротив, не приводить к существенным изменениям в жизни хозяина. Понимание закономерностей течения процессов в зараженной клетке – необходимое условие для эффективной борьбы против вирусных патогенов, вызывающих болезни.

Развитие клеточной патологии при вирусной инфекции – это результат взаимодействия клеточных защитных противовирусных систем и вирусных противозащитных инструментов. В геноме клетки закодировано множество белков, главной целью которых является поиск чужеродных молекул и структур и запуск каскадов реакций, направленных на подавление размножения патогена в рамках одной клетки и распространения в соседние. Эти белки составляют основу защитной системы внутреннего клеточного иммунитета. В нее входят молекулы, вовлеченные в интерфероновый ответ, запуск апоптотической программы и многих видов индуцируемого клеточного стресса, РНКазы и многие другие белки. В ответ на реакции клеточного иммунитета и вирусы эволюционно выработали инструменты, позволяющие ограничивать действие защитных систем, модифицирующие внутриклеточную среду для собственного эффективного размножения. Такие вирусные белки были названы факторами вирулентности или секьюрити-белками. Ввиду ограниченности размера вирусного генома по сравнению с клеточным, такие белки должны иметь максимально возможную функциональность, высокую варибельность и генетическую нестабильность, что делает их интереснейшим объектом для исследования. Одним из важнейших свойств секьюрити-белков является участие в модификации клеточной смерти. От того, каким типом клеточной смерти погибнет клетка: апоптотическим, некротическим или иным, зависит потенциальное распространение инфекции и общее течение заболевания.

Семейство *Picornaviridae* состоит из самых многообразных групп вирусов, многие из которых способны вызывать тяжелые заболевания у человека и животных. Зачастую, представители этого семейства – литические вирусы, инфицирование которыми приводит к

гибели клеток и выходу новых вирусных частиц. К такому типу относится вирус энцефаломиокардита 1 серотипа (EMCV-1) представитель рода *Cardiovirus*, один из модельных представителей семейства. EMCV-1 способен инфицировать многие виды позвоночных животных, в том числе человека, обезьян, свиней, мышей, вызывая развитие миокардита, энцефаломиелита и диабета. Вспышки распространения этого вируса являются одной из важных экономических проблем свиного животноводства. В составе генома EMCV-1 выделяют по меньшей мере два секьюрити-белка: L и 2A. Изучение свойств и механизмов их взаимодействия с клеточным иммунитетом повысит уровень понимания биологии пикорнавирусов и молекулярных основ вызываемых ими заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Свойства секьюрити-белков пикорнавирусов изучены недостаточно. Лишь белки L и 2A представителей родов *Aphthovirus*, *Erbovirus*, *Enterovirus* и *Cardiovirus* являются функционально охарактеризованными. У остальных представителей семейства свойства белков предсказаны теоретически. EMCV-1, представитель рода *Cardiovirus*, является одним из модельных и хорошо изученных представителей семейства. Несмотря на это, существует множество противоречивых данных относительно функциональных свойств его секьюрити-белков. Существует ряд научных работ, в которых авторы приписывают каждому из них множество функций, однако часто результаты исследований противоречат друг другу. К примеру, многие работы посвящены изучению белков L или 2A вне контекста вирусного генома с использованием *in vitro* подходов и различных генно-инженерных систем невирусной природы. Роль в подавлении клеточной трансляции, как одного из способов борьбы с иммунитетом клетки, как и антиапоптозные функции приписывают то одному секьюрити-белку L, то другому – 2A. Механизм функционирования обоих белков остается неясен. Противоречия в описании функциональных свойств секьюрити-белков, видимо, связаны с различными моделями и способами изучения этих свойств, в том числе с использованием различных клеточных линий. Для более глубокого и системного изучения функций обоих белков требуется использовать подход, который основан на инактивации секьюрити-белков по отдельности и совместно путем внесения мутаций в геном EMCV-1 и последующем сравнении свойств полученных мутантов.

Целью настоящего исследования являлось изучение в рамках одной экспериментальной системы роли белков L и 2A модельного вируса энцефаломиокардита 1 серотипа в процессе гибели зараженных клеток и модификации трансляционных процессов.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи исследования**:

1. получить и охарактеризовать мутантные EMCV-1 по белку 2A и по белкам L и 2A одновременно;

2. изучить трансляционную активность в клетках HeLa и ВНК-21 при инфекции мутантными EMCV-1 по L и 2A белкам;
3. изучить особенности гибели клеточных культур HeLa, ВНК-21 и RD при инфекции мутантными EMCV-1 по L и 2A белкам;
4. изучить возможность ингибирования развития патологических процессов в зараженных клетках при подавлении развития апоптоза и работы вирусных противовозщитных механизмов.

Научная новизна

Впервые получен жизнеспособный EMCV-1 с функционально инактивированными обоими секьюрити-белками L и 2A, что доказало факультативную роль секьюрити-белков в размножении вируса энцефаломиокардита. С использованием двух клеточных культур разного происхождения (HeLa и ВНК-21) показано отсутствие влияния белка 2A на течение трансляционных процессов в зараженных клетках. Обнаружено постадийное ингибирование клеточной трансляции в течение инфекции, зависимое от присутствия в геноме активного белка L.

Впервые с использованием нескольких клеточных линий показано, что тип клеточной смерти при инфекции EMCV-1 зависит как от активности белков L и 2A, так и от типа культуры клеток. Выявлена зависимость активности секьюрити-белков и типа клеточной смерти в трех клеточных культурах.

Впервые описана гибель клеток при кардиовирусной инфекции, сочетающая некротические и апоптотические признаки. Показана возможность ингибирования развития патологических процессов в зараженных клетках путем подавления развития апоптотической программы и нарушения работы вирусных секьюрити-белков при активном вирусном размножении.

Теоретическая и практическая значимость работы

В современном мире новые вирусные возбудители заболеваний человека и животных выявляются все чаще. Геномы практически всех известных вирусов кодируют белки, участвующие в подавлении клеточного иммунитета – секьюрити-белки. В настоящее время известно два представителя рода *Cardiovirus*, к которому относится EMCV-1, вызывающие заболевания человека, слабоизученные вирус Саффолд и вирус виллойского энцефалита. Данные о влиянии белков L и 2A EMCV-1 на синтез клеточных и вирусных белков и выбор типа клеточной смерти при инфекции углубляют фундаментальное понимание течения процессов внутри зараженной клетки. Решение поставленных задач на модельном объекте, которым является EMCV-1, является основой для построения модели взаимодействия пикорнавирусов с клеткой, что крайне полезно для изучения белков других вирусных групп. В настоящей работе

мы показали возможность подавления развития патологических процессов в зараженной клетке при сохранении размножения вируса путем ингибирования развития программы апоптоза и нарушения функционирования секьюрити-белков. Этот феномен не только доказывает фундаментальную гипотезу о природе гибели клетки при инфекции в результате взаимодействия клеточных защитных и вирусных противозащитных программ, но и имеет потенциальную практическую значимость. Поскольку гибель зараженной клетки запрограммирована генетически, но является управляемой, можно влиять на развитие клеточной патологии при инфекции, путем блокирования этих программ. В ходе исследования мы блокировали апоптотическую программу, используя ингибиторы других типов гибели клеток можно достичь еще более впечатляющих результатов. Мутации активных центров секьюрити-белков можно заменить на химическую инактивацию их функций. Применение химической инактивации функций белков и программ гибели внутри клетки может привести к ингибированию развития клеточной патологии и, как следствие – возникновению нового комплексного подхода к лечению вирусных заболеваний. Изученные свойства аттенуированных вирусных мутантов EMCV-1, имеющих функционально инактивированные секьюрити-белки, являются теоретической основой для создания живых аттенуированных вакцин против кардиовирусов. Подход, используемый в исследовании, который заключается в создании вирусных мутантов по исследуемым белкам, их адаптации к клеточным культурам с целью повышения жизнеспособности, может быть применен для изучения свойств многих вирусных секьюрити-белков.

Методология и методы исследования

Для выполнения исследований и решения поставленных задач с учётом теоретической базы использовали современные лабораторные методы, включая вирусологические, иммунологические, цитологические и молекулярно-генетические, отражающие новизну научных подходов в изучаемой области. Основным научный подход работы заключался в создании мутантных вирусов энцефаломиокардита 1 серотипа с функционально инактивированными секьюрити-белками L и 2A и последующем сравнении течения инфекции нескольких клеточных линий мутантными вирусами и вирусом дикого типа.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана схема получения жизнеспособных мутантных вирусов EMCV-1 с функционально инактивированным белком 2A и белками L и 2A совместно.
2. При функциональной инактивации белка 2A EMCV-1 происходит активация каспазо-зависимой программы гибели зараженных клеточных культур. Гибель клетки при этом может сопровождаться одновременно некротическими и апоптотическими признаками.

3. При функциональной инактивации белка L EMCV-1 путем разрушения домена Zn-палец активация апоптогической программы гибели зараженных клеточных культур зависит от типа клеток.
4. При функциональной инактивации белка 2A EMCV-1 путем введения делеции с 11 по 125 аминокислотный остаток не происходит изменений в процессе подавления клеточной трансляции при инфекции, но нарушается процессинг капсидных белков.
5. Одновременная инактивация белков L и/или 2A EMCV-1 и ингибирование активации каспаз приводит к торможению развития программ клеточной гибели при инфекции EMCV-1.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 3, 4, 6 и 7 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в ходе работы данных определяется достаточным числом исследований, комплексным подходом к проведению исследований, выполненным с использованием современных методов и статистической обработкой полученных результатов. Все выводы диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы. Материалы исследования были представлены и обсуждены на следующих конференциях: международная конференция Europic 2012 («Uncoupling EMCV-induced injuries from viral reproduction by mutual cell/virus disarmament», Сан-Рафаэль, Франция, 3–7 июня 2012 г.); конференция Europic 2014 («Two cardiovirus security proteins exhibit distinct antiapoptotic activities which are partly host-specific», Бланкенберг, Бельгия 9–14 марта 2014 г.); конференция Virology Africa 2020 («Cardiovirus security proteins L and 2A exhibit antiapoptotic activities which are partly host-specific», Кейптаун, ЮАР, 10–14 февраля 2020 г.).

Личное участие автора в получении результатов

Автор провёл анализ научной литературы по исследуемой области, определил цель и задачи исследования, разработал дизайн экспериментов. Результаты, представленные в настоящей работе, были получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор лично провёл статистическую обработку и сформулировал основные положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации. Основные публикации по материалам исследования были подготовлены лично автором или при его непосредственном участии. Личный вклад в выполнение творческой части исследования составил более 90%.

Публикации

Основные результаты диссертационного исследования полностью отражены в печати. По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы: 1 в рецензируемом научном издании, рекомендованном ВАК, 2 в журналах, индексируемых в международных библиографических базах данных – Web of Science, Scopus, PubMed.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 133 страницах и состоит из введения и 4-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, а также заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, содержащий 192 источника. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 44 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение и характеристика лабораторных штаммов EMCV-1, мутантных по белкам L и 2A

В работе использовали полученные ранее в лаборатории штамм Менго EMCV-1 дикого типа (WT) и мутантный вирус Zfm^{mut}, имеющий аминокислотные замены цистеина на аланин в положениях № 19 и 22 белка L, разрушающие функциональный домен Zn-палец. В ходе настоящей работы были получены мутантные вирусы: Δ2A, содержащий делецию участка, кодирующего с 11 по 125 а.о. белка 2A, и Zfm^{mut}&Δ2A, имеющий описанные мутации в обоих белках L и 2A. Вводимая делеция затрагивает известные потенциальные функциональные участки белка 2A. Мутации вносили в исходные плазмидные конструкции, кодирующие WT и Zfm^{mut}, с помощью генно-инженерных методов. Первый пассаж используемых в работе вирусов получали с помощью трансфекции клеток ВНК-21 геномной РНК, полученной из соответствующих плазмидных конструкций. Для получения рабочих пулов вируса WT и мутантного вируса Zfm^{mut} (Рисунок 1) провели дополнительный пассаж в клетках ВНК-21. Мутантные вирусы Δ2A и Zfm^{mut}&Δ2A (Рисунок 1) после трансфекции имели неоднородный фенотип негативных колоний. Их пассировали 3 раза для достижения гомогенной популяции по фенотипу, а затем клонировали методом негативных колоний в клетках ВНК-21. Отдельные клоны размножали для получения рабочих пулов в течение 2 пассажей в клетках ВНК-21.

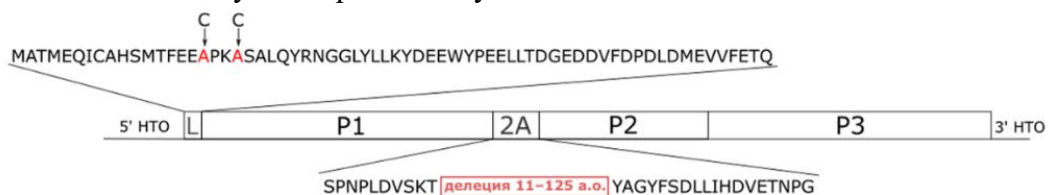


Рисунок 1 – Схема мутаций в геноме использованных вирусов. Замена остатков цистеина (C) на аланин (A) была проведена в белке L вирусов Zfm^{mut} и Zfm^{mut}&Δ2A. Делеция в последовательности белка 2A с 11 по 125 а.о. была проведена в вирусах Δ2A и Zfm^{mut}&Δ2A

Генетический анализ рабочих пулов мутантных вирусов Zfmut, $\Delta 2A$ и Zfmut $\Delta 2A$ показал наличие всех искомым аминокислотных замен и делеций (Рисунок 1). В геноме вирусов $\Delta 2A$ и Zfmut $\Delta 2A$ было обнаружена аминокислотная замена треонина на аланин в позиции № 99 белка VP2, которую можно охарактеризовать как адаптационную. В вирусе WT не было обнаружено дополнительных мутаций. Полученные мутантные вирусы по белкам L и 2A мы охарактеризовали по кинетике накопления вирусной РНК с помощью количественного ПЦР в режиме реального времени и циклу продукции инфекционных вирусных доз в нескольких клеточных линиях с помощью титрования методом негативных колоний.

Кинетика накопления инфекционных доз и кинетика репликации генома в клетках ВНК-21 оказались идентичными у всех исследуемых вирусов (Рисунок 2). Мы показали, что в клетках ВНК-21 функциональная инактивация белков L и 2A не оказывает влияния на способность к размножению EMCV-1.

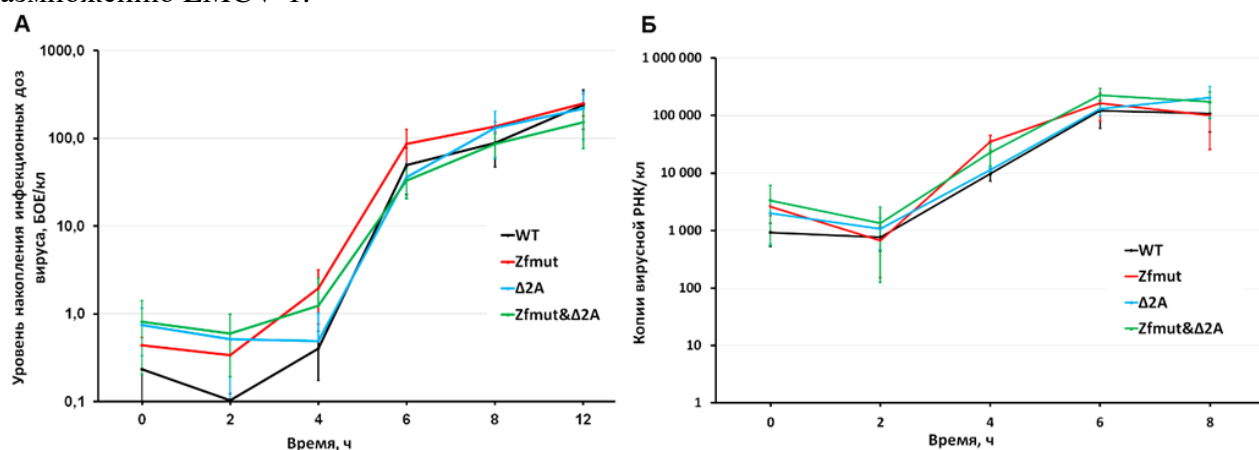


Рисунок 2 – (А) Кинетика накопления инфекционных доз исследуемых вирусов WT, Zfmut, $\Delta 2A$ и Zfmut $\Delta 2A$ в клетках ВНК-21, (n=5); (Б) Кинетика накопления геномной РНК исследуемых вирусов WT, Zfmut, $\Delta 2A$ и Zfmut $\Delta 2A$ в клетках ВНК-21, (n=3). Данные представлены как средние \pm стандартное отклонение, анализ проведен с помощью критерия Стьюдента, статистически значимых различий между всеми исследуемыми вирусами по уровню накопления инфекционных доз и копий вирусной РНК выявлено не было ($p > 0,05$)

Введение мутаций, ведущих к инактивации белков L и 2A, приводило к снижению эффективности размножения мутантных вирусов в клетках HeLa. Подавление функциональной активности одного из секьюрити-белков вело к 5-кратному снижению урожайности мутантных вирусов Zfmut и $\Delta 2A$ спустя 8 ч после начала инфекции. Кинетика размножения мутантов Zfmut и $\Delta 2A$ достоверно не различалась. Введение мутаций в оба секьюрити-белка (Zfmut $\Delta 2A$) послужило причиной более, чем 20-кратному понижению накопления инфекционных вирусных доз (Рисунок 3А). Кинетика накопления геномной РНК WT и $\Delta 2A$ в клетках HeLa не различалась, в то время как инактивация белка L приводила к снижению эффективности ее накопления (Рисунок 3Б). Результаты экспериментов в клетках HeLa позволяют сделать важное наблюдение: несмотря на отсутствие падения эффективности накопления копий РНК-генома $\Delta 2A$ (Рисунок 3Б), эффективность продукции инфекционных доз мутанта достоверно снижается (Рисунок 3А).

Подавление эффективности продукции инфекционных доз в клетках HeLa при частичной делеции 2A, по-видимому, не связано с нарушением функционирования репликативного аппарата, а является следствием нарушения других процессов вирусного жизненного цикла.

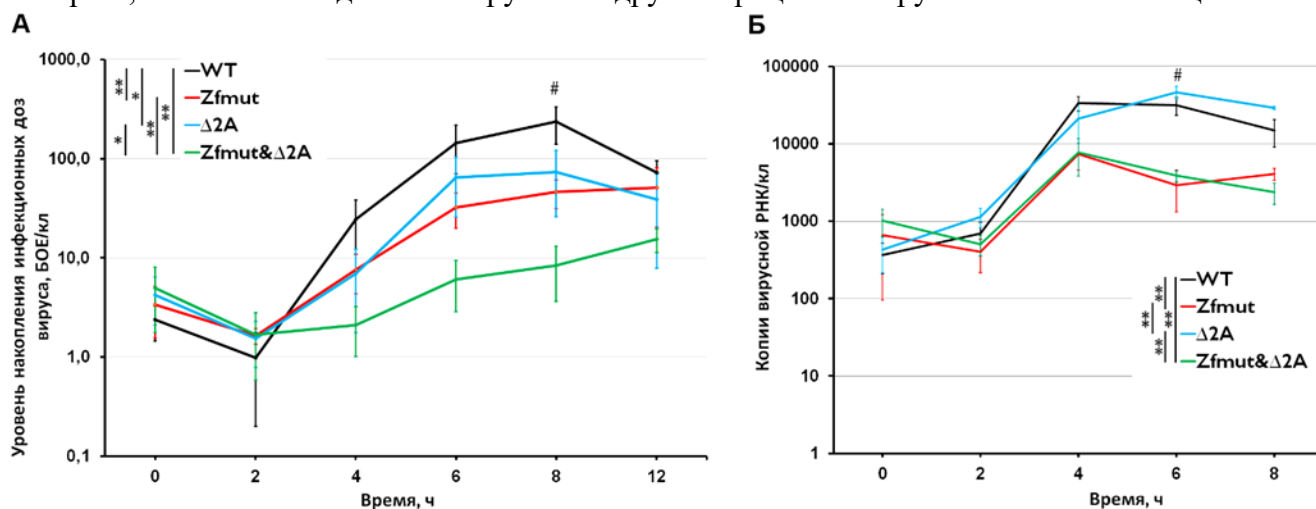


Рисунок 3 – (А) Кинетика накопления инфекционных доз исследуемых вирусов WT, Zfmut, Δ2A и Zfmut&Δ2A в клетках HeLa, (n=7); (Б) Кинетика накопления геномной РНК исследуемых вирусов WT, Zfmut, Δ2A и Zfmut&Δ2A в клетках HeLa, (n=3). Символом «#» обозначены временные интервалы после начала инфекции, для которых обозначены достоверные различия в уровне накопления инфекционных вирусных доз и копий вирусной РНК между исследуемыми вирусами, анализ данных проведен с помощью критерия Стьюдента, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

В клетках RD мутации в одном из секьюрити-белков приводили к умеренному снижению способности вирусов Zfmut и Δ2A к накоплению инфекционных вирусных доз. Одновременная инактивация обоих белков приводила к значительному подавлению жизнеспособности мутантного вируса Zfmut&Δ2A в клетках RD (Рисунок 4).

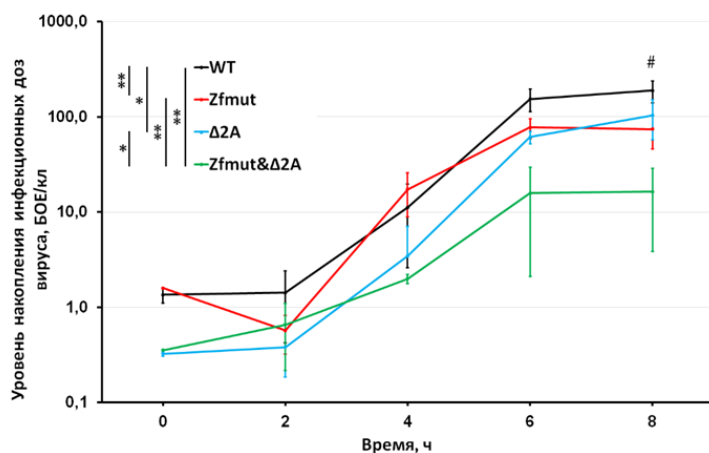


Рисунок 4 – Кинетика накопления инфекционных доз исследуемых вирусов WT, Zfmut, Δ2A и Zfmut&Δ2A в клетках RD. Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, символом «#» обозначен временной интервал после начала инфекции, для которого обозначено достоверное различие в концентрации вирусных доз между исследуемыми вирусами, анализ проведен с помощью критерия Стьюдента, (n=4), * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

Эксперименты показали, что функциональная инактивация обоих секьюрити-белков L и 2A по отдельности и вместе не приводит к полной потере жизнеспособности вируса. В зависимости от культуры клеток хозяина вирус может не изменять способность к размножению при инактивации секьюрити-белков (ВНК-21). В клетках HeLa и RD функциональная инактивация одного из белков приводит к снижению накопления инфекционного вируса. Наблюдается кумулятивный эффект при введении мутаций в белки L и 2A. Функциональная инактивация белка 2A не влияет на кинетику репликации вирусного генома.

2. Изучение роли белков L и 2A в модификации процесса синтеза белков в зараженных клетках

Изучение трансляционных процессов в инфицированных культурах клеток мы проводили с использованием пульс-метода, применяя для детекции синтезирующихся белков аминокислоты, меченые изотопом [¹⁴C]. Заражение клеток HeLa вирусами WT и Δ2A приводило к снижению уровня синтеза клеточных белков при активной наработке вирусных к 3 ч после начала инфекции (Рисунок 5). С помощью количественного изотопного анализа было показано 40%-ное падение общего уровня включения меченых аминокислот в белки зараженных клеток к 3 ч (Рисунок 6А). Вклад в общий уровень включения радиоактивно меченых аминокислот в белки вносит синтез клеточных и вирусных белков, что указывает на то, что клеточная трансляция была угнетена более, чем на 40 %. Через 4 ч после инфицирования WT и Δ2A уровень белкового синтеза повышался до 80% от уровня незараженных клеток HeLa (Рисунок 6А), заметный вклад в это вносила трансляция вирусных белков (Рисунок 5). Через 5–6 ч наступало резкое падение как синтеза вирусных белков, так и клеточной трансляции (Рисунки 5, 6А). Оно сопровождалось повышением уровня фосфорилирования eIF2α по остатку Ser-51, что указывает на запуск каскадов фосфорилирования, направленных на полное и неспецифичное подавление белкового синтеза на поздней стадии инфекции клеток HeLa EMCV-1 WT и Δ2A (Рисунки 5 и 6Б).

При инфекции клеток HeLa мутантами Zfmur и ZfmurΔ2A, профиль белкового синтеза изменялся иначе, чем это происходило при заражении WT или Δ2A. Через 3 ч после инфицирования синтез клеточных белков шёл со схожей интенсивностью, что и в незараженных клетках, а уровень встраивания меченых аминокислот был выше показателей WT- и Δ2A-инфекции. Через 4 ч после заражения Zfmur и ZfmurΔ2A синтез клеточных и вирусных белков существенно ингибировался (Рисунки 5 и 6А).

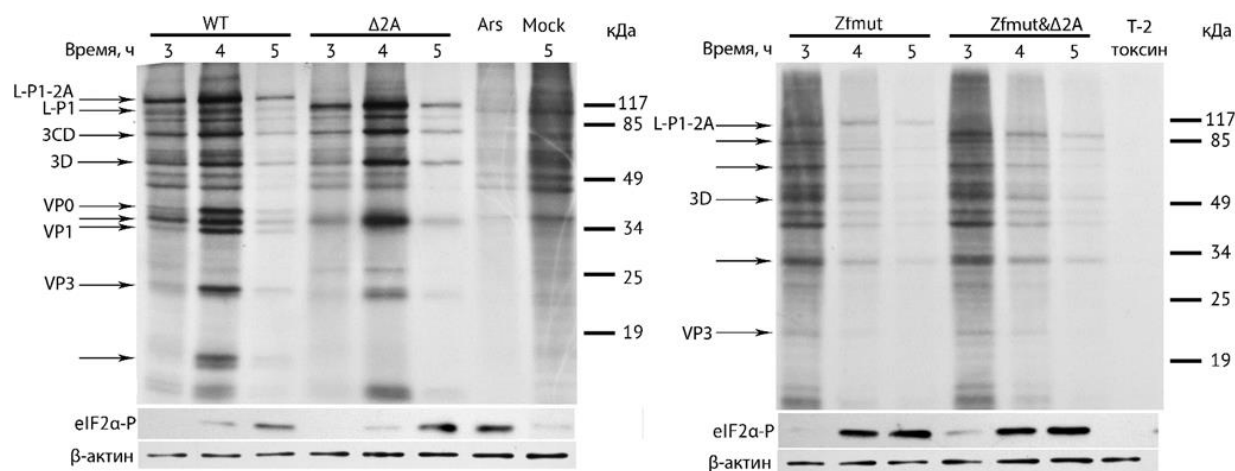


Рисунок 5 – Электрофоретический паттерн синтезируемых белков и уровень фосфорилирования eIF2α в клетках HeLa, зараженных исследуемыми вирусами и обработанных ингибиторами белкового синтеза. Радиоавтография синтезируемых белков в клетках HeLa, зараженных вирусами WT, Zfmur, Δ2A и Zfmur&Δ2A. Эксперимент повторен 4 раза. Ингибиторы синтеза белков: Ars – арсенит натрия, концентрация 100 мкМ, T-2 токсин – концентрация 2 мкг/мл. Mock – незараженные клетки без

воздействия ингибиторов. Сигналы, соответствующие вирусным белкам, отмечены стрелками. Некоторые сигналы вирусных белков были аннотированы, используя литературные данные и путем расчета теоретических масс с помощью ресурса «Анализ последовательности белка» (http://molbiol.ru/scripts/01_18.html)

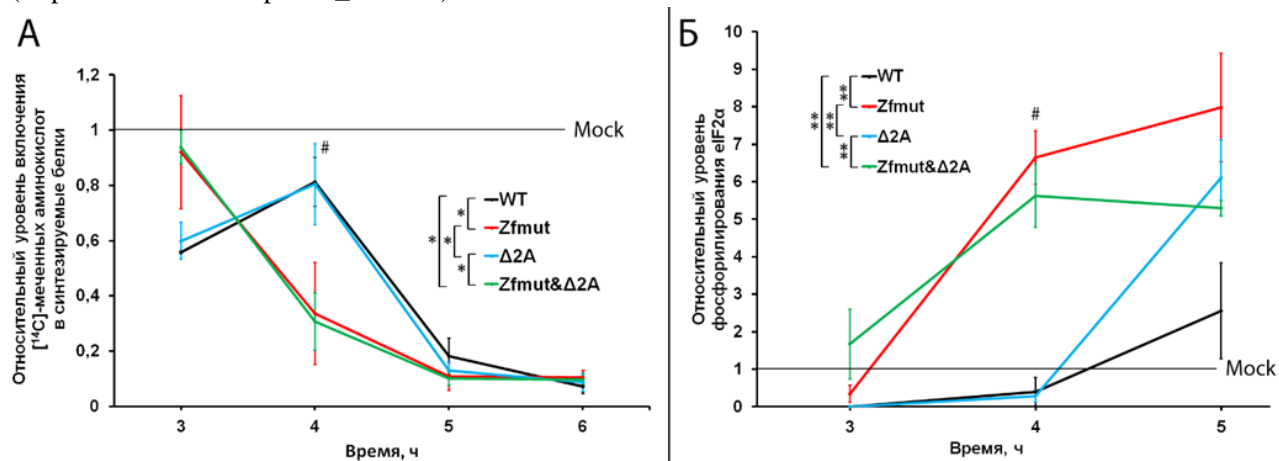


Рисунок 6 – А) Относительный уровень включения аминокислот, меченых изотопом ^{14}C , в синтезируемые белки в ходе инфекции клеток HeLa вирусами WT, Zfm Δ , Δ 2A и Zfm Δ & Δ 2A. Значение, равное 1, соответствует уровню включения аминокислот в синтезируемые белки незараженных клеток (Mock). Данные анализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), (n=3); Б) Относительный уровень фосфорилирования фактора eIF2 α в клетках HeLa в ходе инфекции вирусами WT, Zfm Δ , Δ 2A и Zfm Δ & Δ 2A. Значение, равное 1, соответствует уровню фосфорилирования eIF2 α в незараженных клетках (Mock). Обработку результатов иммуноблоттинга проводили с использованием программы ImageJ. Данные анализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), (n=3). Данные представлены как средние \pm стандартное отклонение, символом «#» обозначен временной интервал, для которого обозначено достоверное различие в относительном уровне включения радиоактивно меченых аминокислот и уровне фосфорилирования eIF2 α , * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

Этот процесс сопровождался повышением уровня фосфорилирования eIF2 α (Рисунки 5 и 6Б). Подобное глобальное ингибирование белкового синтеза при инфекции WT и Δ 2A происходило на 1 ч позже. В отсутствие активного белка L запуск фосфорилирования eIF2 α происходил раньше. В случае инфекции Zfm Δ и Zfm Δ & Δ 2A не происходило специфического частичного подавления синтеза клеточных белков на ранней стадии инфекции, как это наблюдалось при инфекции WT или Δ 2A.

Проведенные эксперименты указывают на то, что белок 2A EMCV-1 не принимает участия в модификации биосинтеза клеточных белков при инфекции клеток HeLa EMCV-1. Была обнаружена зависимость между наличием активного белка L в составе EMCV-1 и специфичным подавлением синтеза клеточных белков на ранней стадии вирусного цикла (3 ч), не связанным с фосфорилированием eIF2 α . Белок 2A на этот процесс влияния не оказывает. Для более подробного изучения трансляции вирусных белков мы воспользовались методом вестерн-блот гибридизации с помощью сыворотки мышей, специфичной к белкам EMCV-1. Мы анализировали паттерн вирусных белков, синтезированных к 4 ч после начала инфекции, когда наблюдается наибольшая эффективность синтеза вирусных белков WT и Δ 2A (Рисунок 7). Расшифровку белкового паттерна EMCV-1 мы провели с использованием образца, содержащего капсидные белки VP0, VP1, VP2 и VP3, используя данные литературы и расчеты теоретических

масс белков. Количественный анализ результатов иммуноблоттинга свидетельствовал о том, что накопление всех отдельных вирусных белков Zfmут и ZfmутΔ2A происходит менее эффективно, чем белков WT и Δ2A (Рисунок 7). Наблюдаемый факт, вероятно, связан с тем, что полная блокировка трансляции в клетках, инфицируемых мутантами по L, произошла на 1 час раньше (Рисунки 5 и 6А). Инактивация в составе генома белка L приводит к снижению эффективности трансляции вирусных белков в клетках HeLa.

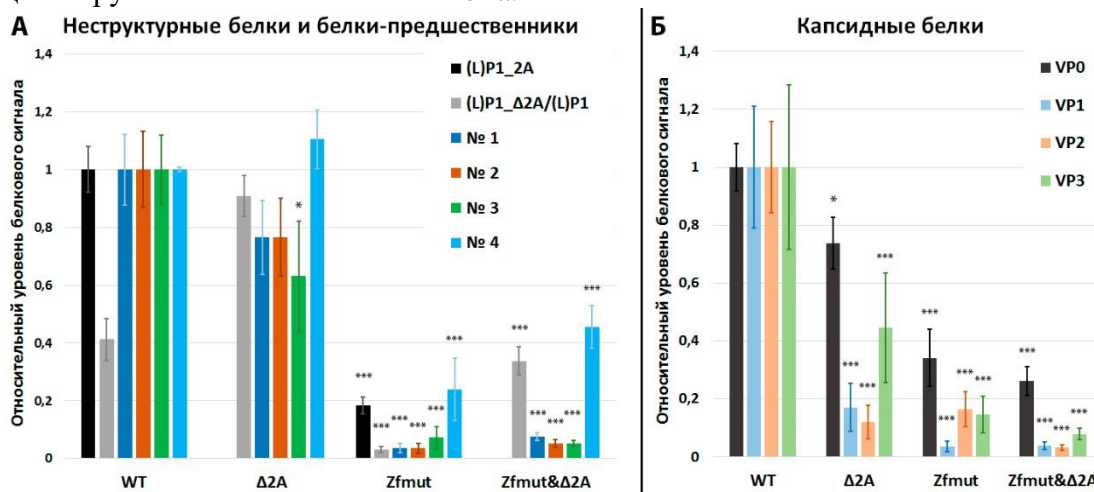


Рисунок 7 – Соотношение уровня сигнала вирусных белков, накопленных спустя 4 часа после начала инфекции клеток HeLa вирусами WT, Zfmут, Δ2A и Zfmут&Δ2A. (А) – относительный уровень сигнала неструктурных белков и белков-предшественников капсидных белков; сигнал № 1 соответствует предшественнику неструктурных белков P3, № 2 – белку 3CD, № 3 – предшественнику VP4-VP2-VP3; № 4 – полимеразе 3D; (Б) – относительный уровень сигнала капсидных белков. Данные были получены в ходе обработки результатов иммуноблоттинга лизатов зараженных клеток с использованием специфической сыворотки против белков EMCV-1. Обработка изображения проводилась с использованием программы ImageJ. Уровень сигнала, равный «1», соответствует уровню сигнала каждого отдельного белка WT. Величину сигналов отдельных белков мутантных вирусов Zfmут, Δ2A и Zfmут&Δ2A нормировали на сигналы соответствующих белков WT. Сигнал (L)P1_Δ2A и (L)P1 нормировали на величину сигнала (L)P1_2A WT. Данные представлены как средние ± стандартное отклонение (n=3). Данные были анализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), уровень сигнала каждого из белковых продуктов вирусов Zfmут, Δ2A и Zfmут&Δ2A сравнивали с сигналом аналогичного белкового продукта WT, * - p<0.05, *** - p<0.001

Количественный анализ сигналов отдельных вирусных белков выявил отличия в эффективности накопления разных групп белков при частичной делеции 2A. Мы не обнаружили значимых отличий в накоплении полипротеина-предшественника (L)P1-2A у вируса WT и аналогичного ему (L)P1-Δ2A у Δ2A, а также в эффективности накопления белковых продуктов № 1, 2 и 4 у этих вирусов. Мы обнаружили умеренное снижение накопления белкового продукта № 3 вируса Δ2A по сравнению с WT (Рисунок 7А). Предшественник капсидных белков VP0, расщепляющийся на VP2 и VP4, также накапливается в клетках HeLa, зараженных Δ2A, со сниженной эффективностью, чем при инфекции WT. Накопление отдельных капсидных белков VP1, VP2 и VP3 вируса Δ2A существенно ингибировано при частичном удалении белка 2A (Рисунок 7Б). Стоит заметить, что при сравнении эффективности накопления вирусных белков в клетках HeLa заметно уменьшение сигнала белков капсида VP2 и VP3 у «двойного» мутанта

Zfmut Δ 2A относительно Zfmut при равенстве синтеза остальных белков (Рисунок 7). Таким образом синтез неструктурных белков при частичной делеции 2A не изменяется к 4 ч после начала инфекции, а синтез предшественников капсидных белков снижается умеренно. Образование отдельных белков VP1, VP2 и VP3 при частичной делеции 2A существенно ингибировано, что указывает на нарушение процессинга капсидных белков. Вероятно, этот эффект приводит к снижению эффективности накопления инфекционных доз Δ 2A в клетках HeLa (Рисунок 3A).

Анализ трансляционной активности в зараженных клетках ВНК-21 показал, что на ранней стадии инфекции, вплоть до 5 часов после ее начала, угнетения синтеза клеточных белков не происходило независимо от инфицирующего вируса. Угнетение всех трансляционных процессов начиналось с 6–7 ч после начала инфекции. Необходимо отметить, что в клетках ВНК-21 не происходило специфического подавления синтеза клеточных белков, какое мы обнаружили в клетках HeLa на ранней стадии инфекции (Рисунок 8). Подавление функции белка L (Zfmut) заметно не сказалось на течении трансляции вирусных и клеточных белков при инфекции ВНК-21. Частичная делеция белка 2A (Δ 2A) также не приводила к заметным изменениям трансляции.

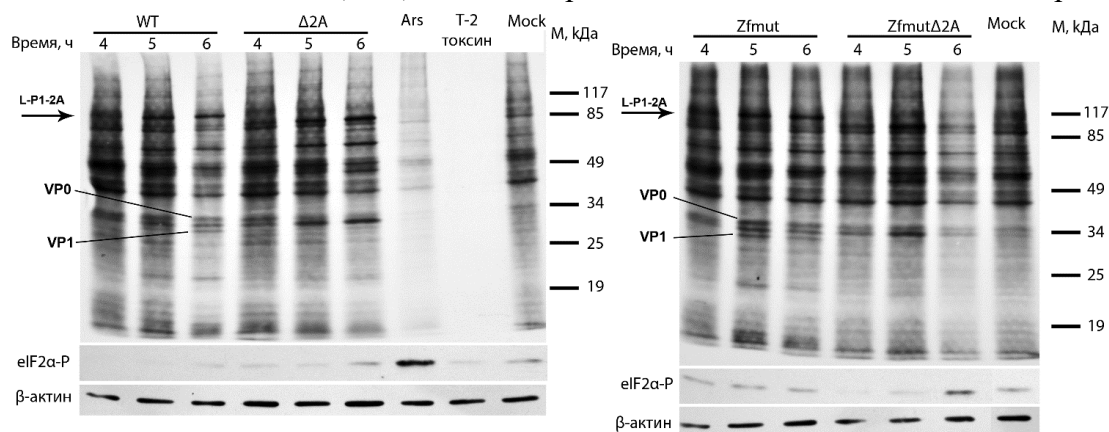


Рисунок 8 – Электрофоретический паттерн синтезируемых белков и уровень фосфорилирования eIF2 α в клетках ВНК-21, зараженных исследуемыми вирусами и обработанных ингибиторами белкового синтеза. Паттерн белков получен пульс-методом включения [14 C]-меченых аминокислот с последующей радиоавтографией. Ars – арсенит натрия, концентрация 100 мкМ, Т-2 токсин – концентрация 2 мкг/мл. Нижний ряд показывает уровень актина в образцах. Эксперимент повторен трижды

Эксперименты с двумя клеточными линиями HeLa и ВНК-21 показали, что белок 2A не влияет на процесс синтеза клеточных белков. При этом удаление последовательности, кодирующей с 11 по 125 а.о. белка 2A, приводит к нарушению процессинга капсидных белков EMCV-1.

3. Изучение механизмов клеточной гибели при кардиовирусной инфекции и роли белков 2A и L в этом процессе

Для изучения роли секьюрити-белков L и 2A в процессе выбора пути клеточной гибели при инфекции EMCV-1 мы использовали подход, который заключался в заражении клеток

нескольких линий мутантными вирусами по белкам L и 2A и анализе изменений, происходящих в клетках. Мы использовали маркерную цитохимическую окраску зараженных клеток на характерные признаки некротической и апоптотической гибели. Окраска клеток пропидий йодидом (PI), который связывается с нуклеиновыми кислотами, но в норме не может преодолеть барьер двойной липидной оболочки, позволяла детектировать нарушение целостности клеточной мембраны – основной признак некротической гибели. Окраска препаратов клеток с помощью набора реагентов TUNEL позволяла оценивать количество разрывов в цепях хромосомной ДНК, одного из признаков развития апоптотической программы клеточной смерти.

Инфекция WT EMCV-1 клеток HeLa приводила к гибели, которая сопровождалась сжатием ядер и нарушением целостности клеточной мембраны, о чем свидетельствовала окраска ядер PI (Рисунок 9А). При этом отсутствовали черты апоптотической гибели: деградация ДНК, активация каспазы-3 (Рисунок 10). Добавление ингибитора каспаз QVD-OPH не привело к каким-либо заметным изменениям признаков клеточной смерти (Рисунок 9А). Обнаруженные признаки клеточной смерти свидетельствуют о её некротической природе при инфекции клеток HeLa вирусом WT.

При инфекции клеток HeLa мутантным вирусом Zfmnt процесс гибели сопровождался образованием многочисленных разрывов в ДНК клеток, а клеточная мембрана не теряла своей целостности. В присутствии ингибитора каспаз QVD-OPH описанные признаки клеточной смерти отсутствовали: не происходило конденсации ядер, отсутствовала деградация ДНК (Рисунок 9Б). Гибель клеток сопровождалась накоплением активной формы каспазы-3 (Рисунок 10). Судя по морфологическим и биохимическим признакам, тип клеточной смерти при инфекции HeLa Zfmnt можно охарактеризовать, как апоптотический.

Гибель клеток HeLa, инфицированных мутантным EMCV-1 по белку 2A, сопровождалась конденсацией ядер и деградацией клеточной ДНК, а также активацией каспазы-3. Описанные признаки отсутствовали при добавлении ингибитора QVD-OPH, что свидетельствовало о каспазной природе клеточной смерти (Рисунки 9В и 10). Окраска с помощью PI клеток HeLa, зараженных Δ 2A, свидетельствовала о нарушении целостности клеточной мембраны. Причем процесс пермеабиллизации ингибировался в присутствии QVD-OPH, что указывает на зависимость этого процесса от активности каспаз (Рисунок 9В). Гибель клеток HeLa при инфекции Δ 2A сопровождалась как апоптотическими, так и некротическими признаками. Морфологически данную клеточную смерть можно идентифицировать как пироптоз. Однако требуются дополнительные исследования для более точной её идентификации. Инфекция клеток HeLa Zfmnt& Δ 2A приводила к их гибели с теми же признаками, что и в случае заражения Zfmnt: фрагментация ядер, деградация клеточной ДНК, активация каспазы-3. Развитие всех описанных признаков ингибировалось в присутствии QVD-OPH (Рисунки 9Г и 10). Описанные признаки

свидетельствует о гибели клеток HeLa при инфекции Zfmut& Δ 2A в результате развития апоптоза. Изучая активацию каспаз в ходе инфекции, мы обнаружили, что в присутствии QVD-ОРН образуются неканонические продукты расщепления каспазы-3 (Рисунок 10, отмечены звездочками). Данная форма каспазы-3, вероятно, не является активной, так как признаки апоптоза оказались ингибированы.

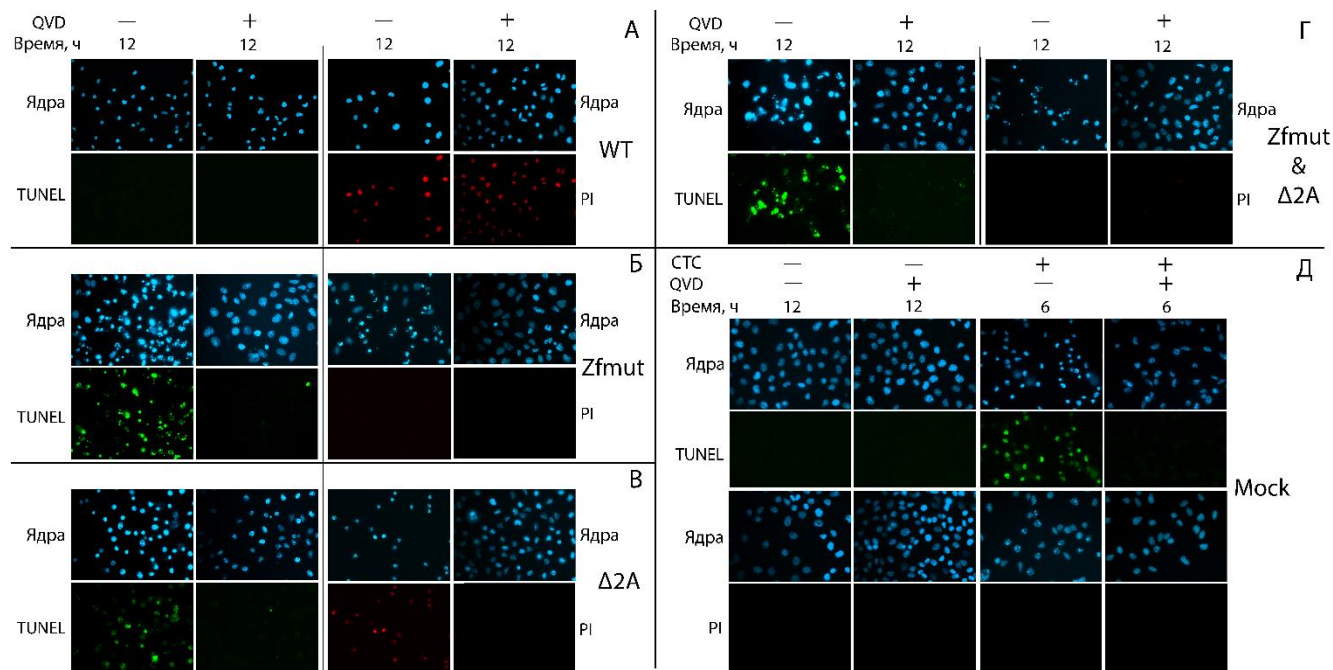


Рисунок 9 – Фрагментация ДНК и пермеабиллизация цитоплазматической мембраны в клетках HeLa при заражении исследуемыми вирусами WT (А), Zfmut (Б), Δ 2A (В) и Zfmut& Δ 2A (Г). Д – незараженные клетки (Mock). Для детекции фрагментации клеточной ДНК использовали набор реагентов TUNEL, для детекции пермеабиллизации клеточной мембраны использовали йодид пропидия (PI). Множественность заражения – 40 БОЕ/кл. QVD – ингибитор каспаз широкого спектра действия QVD-ОРН, конечная концентрация – 20 мкМ. СТС – стауроспорин, индуктор апоптоза, конечная концентрация – 500 нМ. Ядра окрашены красителем Hoechst 33342

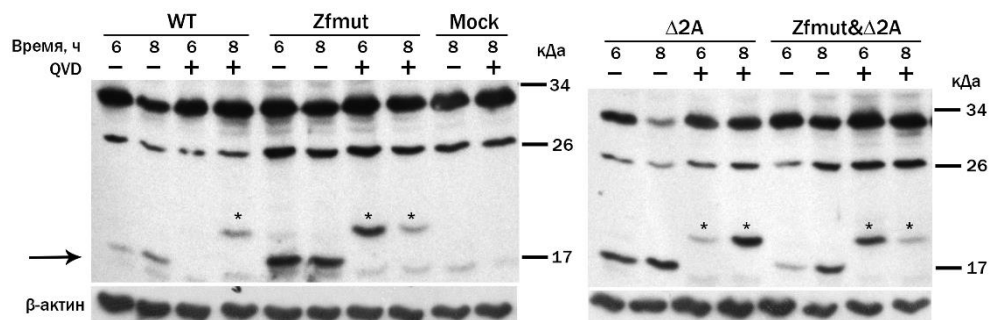


Рисунок 10 – Активация каспазы-3 в клетках HeLa, зараженных исследуемыми вирусами. Вестерн-блот гибридикация лизатов зараженных клеток с использованием антител против каспазы-3 и β -актина. Стрелкой обозначена активированная форма каспазы-3 (17 кДа). Звездочками обозначена форма каспазы-3 в присутствии ингибитора каспаз QVD-ОРН (20 мкМ)

В отличие от клеток HeLa, инфицирование клеток ВНК-21 вирусом дикого типа (WT) и мутантом Zfmut вызвало клеточную гибель, сопровождавшуюся одинаковыми признаками. Ядра клеток конденсировались, клеточная мембрана пермеабилizовывалась, о чем свидетельствовала окраска ядер с помощью PI, отсутствовала деградация хроматина, детектирующаяся с помощью

TUNEL. Добавление ингибитора каспаз QVD-OPH к клеткам при инфекции не приводило к каким-либо изменениям признаков клеточной смерти (Рисунок 11А и Б). Описанные признаки свидетельствовали о том, что инфицирование WT и Zfmut вызывает некротическую гибель ВНК-21. В данной культуре клеток, по-видимому, белок L не проявляет антиапоптотных свойств, которые описаны для клеток HeLa.

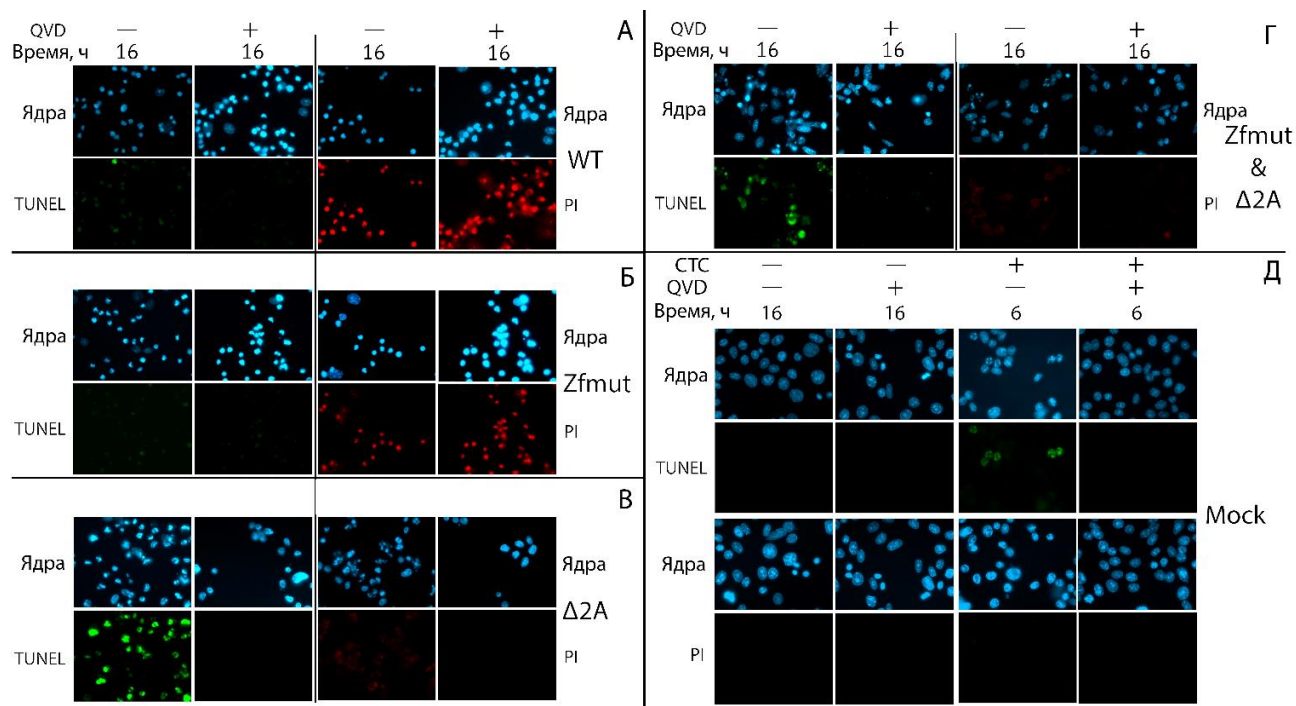


Рисунок 11 – Фрагментация ДНК и пермеабелизация клеточной мембраны в клетках ВНК-21 при заражении исследуемыми вирусами WT (А), Zfmut (Б), Δ2А (В) и Zfmut&Δ2А (Г). Д – незараженные клетки (Mock). Для детекции фрагментации клеточной ДНК использовали набор реагентов TUNEL, для детекции пермеабелизации клеточной мембраны использовали йодид пропидия (PI). Множественность заражения – 40 БОЕ/кл. QVD – ингибитор каспаз широкого спектра действия QVD-OPH, конечная концентрация – 20 мкМ. СТС – стауроспорин, индуктор апоптоза, конечная концентрация – 500 нМ. Ядра окрашены красителем Hoechst 33342

Инфицирование мутантными EMCV-1 Δ2А и Zfmut&Δ2А клеток ВНК-21 приводило к фрагментации ядер и деградации клеточной ДНК, о чем свидетельствовала окраска с помощью системы TUNEL (Рисунок 11В и Г). Добавление в среду культивирования ингибитора каспаз QVD-OPH подавляло развитие описанных черт клеточной гибели.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при введении делеции в последовательность белка 2А EMCV-1, зараженные клетки ВНК-21 погибают в результате апоптоза. Необходимо заметить, что эффективность накопления инфекционных доз всех используемых мутантов EMCV-1 в ВНК-21 оказалась одинакова (Рисунок 2). Это означает, что выбор типа клеточной смерти в случае всех вирусных вариантов не зависел от эффективности размножения, а являлся следствием функционирования или наоборот отсутствия активных секьюрити-белков. В частности, при инфекции клеток ВНК-21 выбор типа клеточной смерти зависел от присутствия в геноме EMCV-1 активного белка 2А, но не зависел от L.

Инфекция WT EMCV клеток RD, как и других используемых клеток, приводила к гибели, сопровождающейся некротическими признаками: сжатием ядер клеток, нарушением целостности клеточной мембраны (Рисунок 12А). Протекание патологических процессов в клетках не являлось чувствительным к наличию ингибитора каспаз QVD-OPH. В случае инфекции клеток RD мутантными вирусами Zfm^{mut}, Δ2A и Zfm^{mut}&Δ2A смерть клеток сопровождалась нарушением целостности клеточной ДНК, которое ингибировалось в присутствии QVD-OPH (Рисунок 12Б, В и Г). Описанные черты гибели говорят о том, что клетки RD при инфекции вирусом энцефаломиокардита 1 серотипа штамма Менго, не имеющего любого из двух секьюрити-белков L и 2A, погибают каспазозависимой гибелью, предположительно, путем апоптоза. Можно заключить, что в условиях инфекции клеток RD и белок L, и белок 2A играют роль в «выборе» типа клеточной смерти.

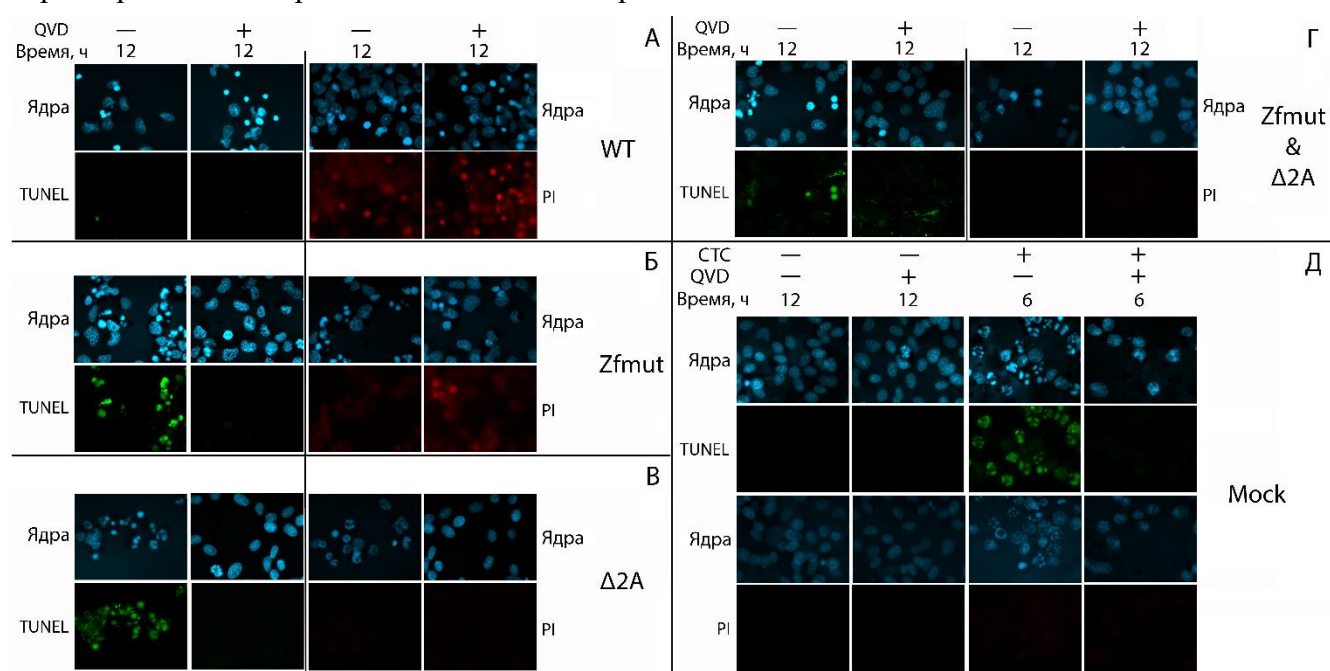


Рисунок 12 – Фрагментация ДНК и пермеаблизация цитоплазматической мембраны в клетках ВНК-21 при заражении исследуемыми вирусами WT (А), Zfm^{mut} (Б), Δ2A (В) и Zfm^{mut}&Δ2A (Г). Д – незараженные клетки (Mock). Для детекции фрагментации клеточной ДНК использовали набор реагентов TUNEL, для детекции пермеаблизации клеточной мембраны использовали йодид пропидия (PI). Множественность заражения – 40 БОЕ/кл. QVD – ингибитор каспаз широкого спектра действия QVD-OPH, конечная концентрация – 20 мкМ. СТС – стауроспорин, индуктор апоптоза, конечная концентрация – 500 нМ. Ядра окрашены красителем Hoechst 33342

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при ингибировании функций белков L и 2A путем внесения мутаций, тип клеточной смерти при инфекции может изменяться. Этот факт указывает на то, что оба белка принимают участие во взаимодействии вирусного патогена с сигнальными путями приводящими к клеточной смерти. Результаты экспериментов указывают на то, что оба белка L и 2A принимают участие в ингибировании каспазозависимой клеточной гибели. Мы показали, что помимо типичного апоптоза и некротической гибели возможен и третий, морфологически отличный, тип клеточной смерти при размножении EMCV-1 в клетках.

4. Ингибирование развития клеточной патологии при инфекции EMCV

Исследование роли белков L и 2A вируса энцефаломиокардита 1 серотипа в модификации типа клеточной смерти показало, что ингибирование функций одного или обоих одновременно, как правило, ведет к каспазозависимой смерти зараженной клетки, которая ингибируется в присутствии QVD-ОРН. С целью изучения процессов, происходящих при одновременном подавлении каспаз и функционирования белков L и 2A EMCV-1, мы провели расширенное исследование кинетики гибели зараженных клеток и изменений внутри них.

При инфекции клеток HeLa вирусом WT половина из них погибла к 8 ч после заражения, судя по окраске PI. Добавление ингибитора каспаз QVD-ОРН в среду культивирования не изменило кинетику гибели при инфекции WT, как и тип клеточной смерти (Рисунок 13Б). Кинетика гибели клеток HeLa, зараженных Zfm^{mut}, оцененная с помощью TUNEL, была аналогичной WT-инфекции (половина клеток погибла через 8 ч, Рисунок 13А). Ингибирование функций белка L в составе генома EMCV-1 достоверно не оказывало влияния на кинетику гибели клеток. Однако добавление QVD-ОРН к клеткам HeLa, зараженным Zfm^{mut}, приводило к торможению их гибели. Этот процесс сопровождался нарушением целостности клеточной мембраны (Рисунок 13Б), половина зараженных клеток погибала лишь к 16 ч после инфицирования. Добавление к клеткам QVD-ОРН при заражении Δ2A и Zfm^{mut}&Δ2A так же, как и в случае с Zfm^{mut}, достоверно замедляло процесс гибели популяции клеток. Половина клеток погибала позже 16 ч после инфицирования, и этот процесс сопровождался проникновением PI через мембрану клетки и окрашиванием их ядер (Рисунок 13Б).

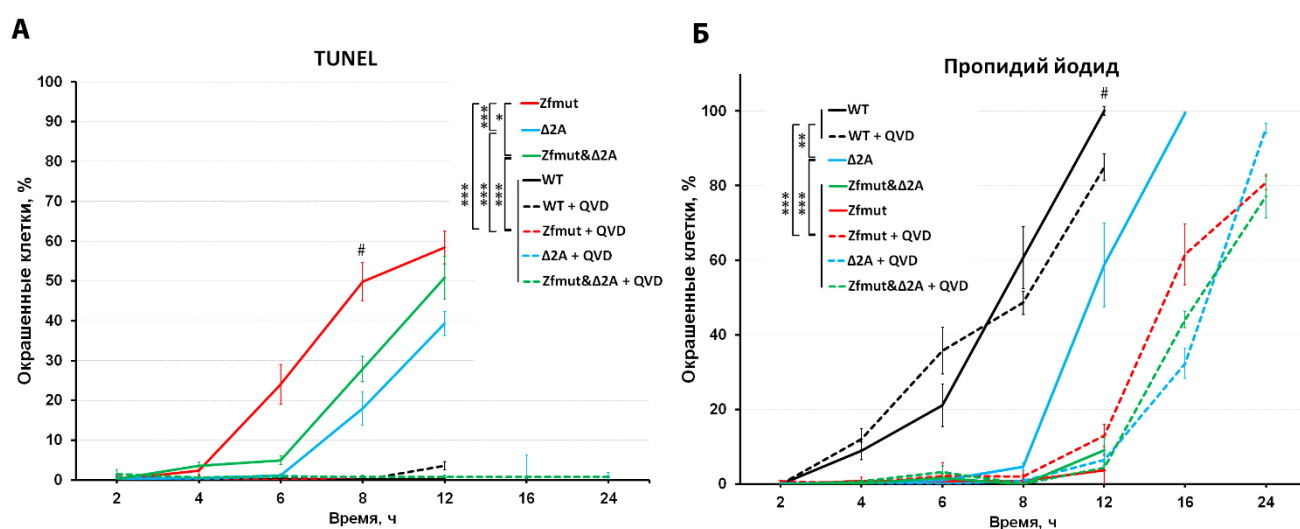


Рисунок 13 – Подсчет окрашенных клеток HeLa в ходе инфекции исследуемыми вирусами WT, Zfm^{mut}, Δ2A и Zfm^{mut}&Δ2A в присутствии и отсутствии ингибитора каспаз QVD-ОРН (20 мкМ) после обработки (А) набором реагентов TUNEL и (Б) пропидий йодидом (PI). Данные представлены как средние ± стандартное отклонение (n=10). Символом «#» обозначены временные интервалы после начала инфекции, для которого обозначено достоверное различие в доле окрашенных клеток, анализ проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), ** – p < 0,01

Изучение кинетики гибели клеток HeLa при заражении исследуемыми мутантными вирусами в присутствии ингибитора каспаз QVD-OPH выявило, что при одновременном подавлении функции одного из белков L и 2A и ингибировании активации каспаз происходит задержка гибели клеток. При этом обнаруженная задержка не связана с возможным снижением эффективности размножения вирусов в присутствии QVD-OPH, так как в этом случае не происходило ингибирование кинетики накопления в клетках инфекционных доз мутантов. Мы наблюдали процесс размножения вирусных мутантов в то время, как клетки продолжали выглядеть жизнеспособными.

Обнаружив феномен задержки развития патологических процессов в клетках при одновременной инактивации одного или нескольких секьюрити-белков и подавлении развития программы апоптоза, было решено провести эксперименты по оценке метаболической активности клеток при заражении исследуемыми вирусами в присутствии ингибитора каспаз. Мы использовали тест на жизнеспособность (CellTiter-Blue/Alamar Blue), который позволяет оценивать метаболическую активность клеточной популяции по превращению резазурина (OD605) в резоруфин (OD573). Снижение значения OD605 свидетельствовало о проявлении метаболической активности и жизнеспособности клеток.

Измерив жизнеспособность клеток HeLa по истечении 12 часов с начала инфекции EMCV-1, мы обнаружили, что клетки, зараженные WT, независимо от наличия QVD-OPH, не проявляли способности метаболизировать резазурин, как и клетки, погибшие после добавления ДДС-Na (Рисунок 14). Это соответствует результату экспериментов, в которых клетки HeLa теряют целостность клеточной мембраны к этому времени инфекции (Рисунок 13Б). Клетки HeLa, инфицированные $\Delta 2A$, не проявляли признаков жизнеспособности (Рисунок 14). К этому времени, судя по окраске PI, погибали 60–80 % клеток (Рисунок 13Б). Метаболическая активность популяции клеток, зараженных Zfmut и Zfmut $\Delta 2A$, оказалась существенно снижена (Рисунок 14). К этому моменту в 50–60 % зараженных клеток развивались апоптотические признаки гибели (Рисунок 13А). Добавление ингибитора каспаз QVD-OPH повышало жизнеспособность клеток HeLa, зараженных мутантами, вызывающими каспазо-зависимую гибель: Zfmut, $\Delta 2A$ и Zfmut $\Delta 2A$. Наименьшее влияние QVD-OPH оказывал на клетки, зараженные $\Delta 2A$ (Рисунок 14).

Таким образом данные эксперимента по оценке метаболической активности зараженных клеток HeLa согласуются с результатами экспериментов по характеристике процесса гибели и показывают, что одновременное подавление развития каспазо-зависимой программы смерти и инактивация секьюрити-белков L и 2A, влияющих на течение клеточной гибели, приводит к замедлению ингибирования метаболических процессов зараженных клеток.

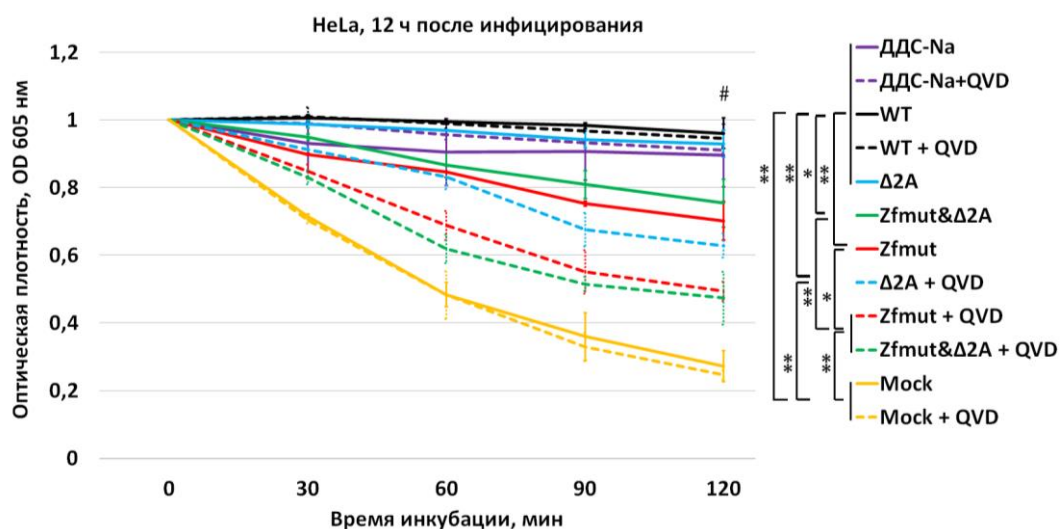


Рисунок 14 – Изменение оптической плотности среды культивирования клеток HeLa, содержащей CellTiterBlue (240 мкМ), измеренное при длине волны 605 нм через 12 часов после начала инфекции исследуемыми вирусами. Mock – неинфицированные клетки. QVD – ингибитор каспаз широкого спектра действия QVD-OPH (20 мкМ), SDS – додецилсульфат натрия (0,1%). Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение (n=2). Анализ данных проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекциями Тьюки для множественного сравнения. Проводили множественное сравнение между всеми группами. Символом «#» обозначен временной интервал после начала инкубации, для которого обозначено достоверное различие в оптической плотности, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Оценку метаболической активности клеток ВНК-21, зараженных исследуемыми мутантными EMCV-1, мы проводили на более поздней стадии – через 16 часов после инфицирования. На этот выбор оказал влияние более затянутый цикл размножения вирусов в этих клетках (Рисунок 2А) и более позднее развитие признаков клеточной смерти (Рисунок 11). Клетки ВНК-21, зараженные WT и Zfmут, гибель которых сопровождалась только некротическими чертами, независимо от наличия ингибитора каспаз, не проявляли активности по метаболизму резазурина в резорурфин (Рисунок 15). В это время популяции клеток, зараженных Δ2A и Zfmут&Δ2A, проявляли способность метаболизировать субстрат, вероятно, из-за того, что не все клетки на этот срок погибли (Рисунок 11). Добавление ингибитора каспаз QVD-OPH восстанавливало метаболическую активность клеток, зараженных мутантами по белку 2A, до уровня незараженных (Рисунок 15). Мы показали с использованием клеток ВНК-21, что одновременное подавление развития апоптотической программы смерти и инактивация секьюрити-белка 2A, проявляющего в этих клетках антиапоптозные свойства, приводит к повышению выживаемости зараженных клеток.

По итогам изучения метаболической активности популяции зараженных клеток мы можем заключить, что подавление функции белка EMCV-1, приводящее к каспазо-зависимой гибели, совместно с ингибированием активации каспаз приводит к повышению жизнеспособности клеток, измеренной по способности метаболизировать резазурин.

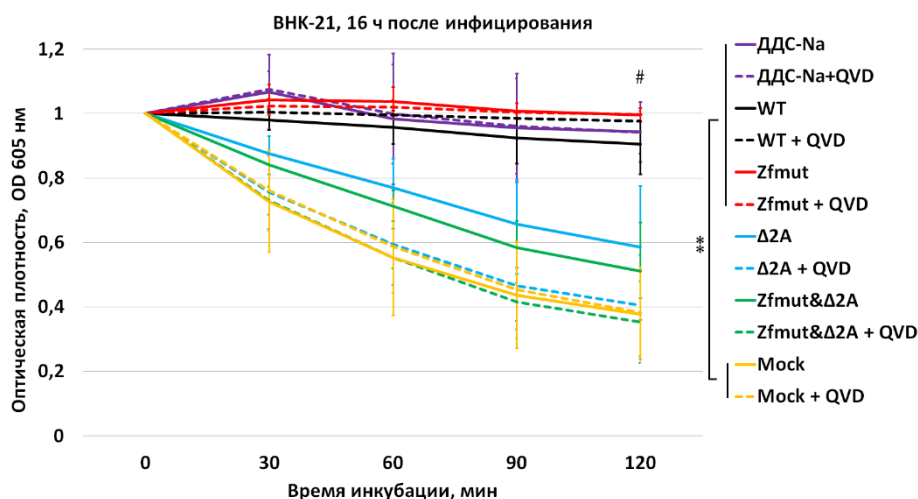


Рисунок 15 – Изменение оптической плотности среды культивирования клеток ВНК-21, содержащей CellTiterBlue (240 мкМ), измеренное при длине волны 605 нм через 16 часов после начала инфекции исследуемыми вирусами. Mock – неинфицированные клетки. QVD – ингибитор каспаз широкого спектра действия QVD-OPH (20 мкМ), SDS – додецилсульфат натрия (0,1%). Данные представлены в виде среднего±стандартное отклонение (n=2). Анализ данных проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекциями Даннета для множественного сравнения. Проводили сравнение с данными оптической плотности в лунках с незараженными клетками (Mock). Символом «#» обозначен временной интервал после начала инкубации, для которого обозначено достоверное различие в оптической плотности, ** – $p < 0,01$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая исследовательская работа посвящена изучению роли белков L и 2A вируса энцефаломиокардита 1 серотипа в развитии патологических процессов в клетках: в процессе ингибирования трансляции клеточных белков и развитии признаков клеточной смерти при инфекции. Методологической основой работы являлось сравнение свойств вирусных мутантов по белкам L и 2A между собой и с вирусом дикого типа. В ходе работы была получена генетическая конструкция pM16.2_Δ2A, кодирующая геном EMCV-1, содержащий делецию в последовательности гена белка 2A. Эта делеция, затрагивает часть белка с 11 по 125 а.о., чем лишает белок 2A функциональной активности. Также была получена конструкция pM16.1_Zfmur&Δ2A, кодирующая геном EMCV-1 с инактивированными белками L и 2A одновременно. Полученные в рамках работы и имеющиеся в распоряжении генетические конструкции позволили получить вирус энцефаломиокардита 1 серотипа дикого типа (WT), мутантные вирусы по белку L (Zfmur), 2A (Δ2A) и по обоим белкам (Zfmur&Δ2A) необходимые для экспериментальной работы. Впервые был получен жизнеспособный вирус энцефаломиокардита с инактивированными белками L и 2A одновременно, что в очередной раз и окончательно доказало факультативную роль этих белков в размножении.

Эксперименты проводились с использованием нескольких клеточных линий, HeLa, ВНК-21 и RD, что повысило достоверность получаемых результатов. Эксперимент с полученными вирусными мутантами по анализу трансляционной активности зараженных клеток показал, что белок 2A не влияет на процесс ингибирования синтеза клеточных белков. Белок L принимает

участие в моделировании синтеза клеточных белков в клетках HeLa. Мы показали, что в ходе инфекции клеток HeLa на ранней стадии происходит специфическое подавление синтеза клеточных белков, за чем следует полная блокировка процессов трансляции, путем фосфорилирования eIF2 α . По-видимому, белок L ответственен за первичное специфическое подавление синтеза. В отсутствие функционального белка L полная блокировка всего белкового синтеза, включая вирусный, происходит быстрее.

Эксперименты по характеристике гибели клеток при инфекции EMCV-1 показали, что оба белка L и 2A влияют на пути активации каспаз, оказывая влияние на течение процесса клеточной смерти. Вирус энцефаломиокардита дикого типа вызывает некротическую гибель зараженных клеток. Нарушение функциональности белка L ведет к развитию апоптотической гибели клеток HeLa и RD, но не ВНК-21. Частичная делеция в последовательности, кодирующей белок 2A, ведет к апоптозу зараженных клеток RD и ВНК-21, а в клетках HeLa развивается каспазозависимая гибель, сопровождающаяся пироптотическими признаками.

Результаты исследований показали важность секьюрити-белков L и 2A для патогенеза EMCV-1 и обеспечения эффективного размножения и распространения инфекции.

Мы показали возможность ингибирования развития признаков клеточной смерти и сохранения метаболической активности клеток, зараженных вирусом энцефаломиокардита, а также отсутствие прямой корреляции между эффективным вирусным размножением и гибелью клеток. Это фундаментальное свойство может иметь важные практические последствия: путем воздействия на функциональную активность клеточных и вирусных белков, принимающих участие в процессе гибели клеток, можно сдерживать патологические процессы, развивающиеся в ходе инфекции пикорнавирусной инфекции. Возможно, это свойство можно расширить и на другие семейства вирусов.

ВЫВОДЫ

1. Функциональная инактивация секьюрити-белков L и 2A по отдельности и совместно не приводит к полной потере жизнеспособности EMCV-1.
2. Белок L EMCV-1 способствует специфическому ингибированию трансляции клеточных белков и ингибирует развитие неспецифического подавления синтеза белков в клетках HeLa.
3. Белок 2A EMCV-1 не участвует в регуляции синтеза клеточных белков в зараженных клетках HeLa и ВНК-21. Белок 2A участвует в процессинге капсидных белков EMCV-1.
4. Мутации белка 2A, нарушающие его функционирование, приводят к развитию каспазозависимой программы гибели в зараженных клетках HeLa, ВНК-21 и RD. Мутации белка L, нарушающие его функционирование, приводят к развитию каспазозависимой программы гибели в зараженных клетках HeLa и RD. Тип клеточной смерти при инфекции EMCV-1 зависит от активности секьюрити-белков и типа клеток.

5. Совместное подавление активации каспаз и ингибирование секьюрити-белков L и 2A вируса энцефаломиокардита 1 серотипа, проявляющие антиапоптозные свойства, приводит к ингибированию процесса гибели клеток и повышению их жизнеспособности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Созданные в рамках настоящей работы мутантные вирусы по белку 2A: Δ2A и Zfmut&Δ2A, а также использованный мутантный вирус Zfmut, могут быть использованы в роли основы для кандидатных живых вакцин против вируса энцефаломиокардита для сельскохозяйственных животных. Принцип изменения генома, используемый для создания мутантных вирусов в настоящей работе, может быть использован для получения мутантных кардиовирусов человека (SAFV, VEHV) с целью изучения свойств этих патогенов и их отдельных белков. При получении вирусов различных групп, мутантных по интересующему белку, с целью изучения функциональных особенностей этого белка, следует придерживаться стратегии, которая заключается в адаптации полученного вирусного мутанта к используемой культуре клеток. Это позволит минимизировать возможные эффекты, связанные с общим снижением эффективности продукции полученного мутантного вируса.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Одним из направлений дальнейшей работы является расшифровка молекулярных механизмов, позволяющих белкам L и 2A влиять на тип клеточной гибели при инфекции. Работа должна быть направлена на поиск молекул внутри клетки и их участков, с которыми взаимодействует L и 2A. Также имеет особую важность исследование влияния -1 рибосомального сдвига из-за активности белка 2A на тип клеточной смерти, а также выяснения роли белка 2B* в этом процессе.

Свойства мутантных вирусов по белкам L и 2A позволяют предполагать, что они могут быть использованы в качестве основы для живых аттенуированных вакцин против EMCV-1 и в целом кардиовирусов. Исследование течения инфекции с использованием животных моделей поможет раскрыть потенциал этого направления исследований.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Suppression of Injuries Caused by a Lytic RNA Virus (Mengovirus) and Their Uncoupling from Viral Reproduction by Mutual Cell/Virus Disarmament/ O. V. Mikitas, **Y.Y. Ivin**, S.A. Golyshev [et al.] // Journal of Virology. – 2012. – Vol. 86. – № 10. – P. 5574-5583. DOI: 10.1128/JVI.07214-11. (Web of Science, Scopus, Pub Med, Q - 1)
2. Роль белков L и 2A вируса энцефаломиокардита типа 1 в ингибировании синтеза клеточных белков и накоплении вирусных белков при инфекции / **Ю.Ю. Ивин**, А.А. Бутусова, Е.Е. Гладнева [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2023. – Vol. 68. – № 5. – P. 428-444. DOI: 10.36233/0507-4088-195. (БАК, К - 1)
3. Comprehensive Elucidation of the Role of L and 2A Security Proteins on Cell Death during EMCV Infection / **Y. Ivin**, A. Butusova, E. Gladneva [et al.] // Viruses. – 2024. – Vol. 16. – № 2. – P. 280. DOI: 10.3390/v16020280. (Web of Science, Scopus, Pub Med, Q1)