

13. Lee K.H., Medlock J.M., Heo S.T. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, and migratory birds. *J. Bacteriol. Virol.* 2013; 43 (4): 235–43.
14. Zhang W.S., Zeng X.Y., Zhou M.H., Jiao Y.J., Wen T., Guo X.L. et al. Seroepidemiology of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Jiangsu Province. *Disease Surveillance.* 2011; 26: 676–8.
15. Zhao L., Zhai S., Wen H., Cui F., Chi Y., Wang L. et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, Shandong province, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18 (6): 963–5.
16. Denic S., Janbeih J., Nair S., Conca W., Tarig W.U.Z., Al-Salam S. Acute thrombocytopenia, leucopenia, and multiorgan dysfunction: the first case of SFTS Bunyavirus outside China? *Case Rep. Infect. Dis.* 2011; 2011: 204056.
17. Takahashi T., Maeda K., Suzuki T., Ishido A., Shigeoka T., Tominaga T. et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J. Infect. Dis.* 2014; 209 (6): 816–27.
18. Bao C., Guo X., Qi X., Hu J., Zhou M., Varma J.K. et al. A family cluster of infections by a newly recognized bunyavirus in eastern China, 2007: further evidence of person-to-person transmission. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 53 (12): 1208–14.
19. Gai Z., Liang M., Zhang Y., Zhang S., Jin C., Wang S.W. et al. Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through blood contact. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54 (2): 249–52.
20. Liu Y., Li Q., Hu W., Wu J., Wang Y., Mei L. et al. Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12 (2): 156–60.
21. Tang X., Wu W., Wang H., Du Y., Liu L., Kang K. et al. Human-to-human transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through contact with infectious blood. *J. Infect. Dis.* 2013; 207 (5): 736–9.
22. Cui F., Cao H., Wang L., Zhang S.F., Ding S.J., Yu X.J. et al. Clinical and epidemiological study on severe fever with thrombocytopenia syndrome in Yiyuan country, Shandong province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 88 (3): 510–2.
23. Sun Y., Jin C., Zhan F., Wang X., Liang M., Zhang Q. et al. Host cytokine storm is associated with disease severity of severe fever with thrombocytopenia syndrome. *J. Infect. Dis.* 2012; 206 (7): 1085–125.
24. Zhang Y.Z., He Y.W., Dai Y.A., Xiong Y., Zheng H., Zhou D.J. et al. Hemorrhagic fever caused by a novel Bunyavirus in China: pathogenesis and correlates of fatal outcome. *Clin. Inf. Dis.* 2012; 54 (4): 527–33.
25. The Korea Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of severe fever with thrombocytopenia syndrome. (in Korean) Available at: <http://www.cdc.go.kr/CDC/notice/CdcKrIntro0201.jsp?menuId=HOME001>

Поступила 10.06.16

Принята в печать 11.10.16

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© ЖИРНОВ О.П., 2017
УДК 578.831.1:578.23].083.2

Жирнов О.П.

АКТИВАЦИЯ ПАРАМИКСОВИРУСОВ ПРОТЕАЗАМИ В КУЛЬТУРАХ НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТОК

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Изучали размножение парамиксовирусов Сендай и болезни Ньюкасла (ВБН) в культурах нормальных и раковых клеток. В культуре клеток почки собаки MDCK и ее дериватов с тетрациклинрегулируемой экспрессией трансмембранных протеаз HAT и TMPRSS2 наблюдалось образование неинфекционных вирионов с нерасщепленным белком F0. Тетрациклиновая индукция протеаз HAT и TMPRSS2 в инфицированных клетках приводила к протеолизу F0 → F1 + F2 и образованию высокоинфекционного вируса. При расщеплении протеазой HAT, помимо F0 (м. м. 65 кД), F1 (50 кД) и F2 (15 кД), у вируса Сендай выявлялся дополнительный фрагмент F3 с м. м. 38 кД, что указывало на наличие второго сайта расщепления в молекуле F1, чувствительного к протеазе HAT. При размножении вируса Сендай и ВБН в культуре раковых клеток Сасо-2 и H1299 синтезировался инфекционный вирус, содержащий часть молекул в расщепленной форме F1 + F2. В культуре H1299 в вирусе Сендай наряду с F0, F1 и F2 обнаруживался также фрагмент 38К. Количество расщепленного белка F1 + F2 и инфекционного вируса в раковых культурах Сасо-2 и H1299 значительно возрастало на поздних сроках инфекции, что указывало на индукцию клеточных вирусактивирующих протеаз в раковых клетках при вирусной инфекции. ВБН вызывал значительно более быструю гибель раковых клеток Сасо-2 по сравнению с вирусом Сендай. Полученные данные показывают, что раковые клетки в отличие от нормальных клеток могут синтезировать протеазы, активирующие инфекционность парамиксовирусов, и по этой причине они становятся более уязвимыми для парамиксовирусной инфекции по сравнению с нормальными клетками.

Ключевые слова: парамиксовирусы; протеолитическая активация; протеазы; HAT; TMPRSS2; апоптоз; клеточный лизис; вирусные онколитики.

Для цитирования: Жирнов О.П. Активация парамиксовирусов протеазами в культурах нормальных и раковых клеток. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62 (2): 65–72.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-65-72>

Для корреспонденции: Жирнов Олег Петрович, д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: zhirnov@inbox.ru

Zhironov O.P.

PARAMYXOVIRUSES ACTIVATION BY HOST PROTEASES IN CULTURES OF NORMAL AND CANCER CELLS

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Multiplication of paramyxovirus Sendai and Newcastle disease virus (NDV) was studied in cultures of normal and tumor cells. Production of noninfectious virus with uncleaved F0 was observed in canine kidney cell line MDCK (line H) and its derivatives carrying tetracycline-regulated expression of transmembrane protease HAT or TMPRSS2 with trypsin-like cleavage specificity. Under tetracycline induction, a cleavage F0 (65 kD)→F1 (50 kD)+F2(15 kD) and production of infectious virus were observed in these cell cultures. Under tetracycline induction, the additional subunit 38K (m.w. 38 kDa) of the F protein was detected both in infected MDCK-HAT cells and in newly synthesized Sendai virus in addition to F0, F1 and F2, indicating thereby a second HAT-sensitive proteolytic site in the F0 molecule. Highly infectious virus containing cleaved F1+F2 was produced in cultures of cancer cells Caco-2 and H1299. Virus Sendai synthesized in H1299 cells contained 38 K subunit indicating a cleavage of the F0 at a second site by H1299 host cell proteases. Levels of cleaved F1+F2 and infectious virions were higher at the late stage of infection in cancer cells, suggesting thus the induction of virus-activating proteases in Caco-2 and H1299 cells under infection with paramyxoviruses. NDV virus was found to induce more rapid death of cancer cells Caco-2 than Sendai virus. Cooperatively, the obtained data show that cancer cells in distinction to nonmalignant cells can synthesize protease(s) activating infectivity of paramyxoviruses. Thus, they are more vulnerable to paramyxovirus infection than normal cells.

Key words: paramyxoviruses; proteolytic activation; proteases; HAT; TMPRSS2; apoptosis; cell lysis; viral oncolytics.

For citation: Zhironov O.P. Paramyxoviruses activation by host proteases in cultures of normal and cancer cells. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(2): 65-72. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-65-72>

For correspondence: Oleg P. Zhironov, Dr. Biol. Sci., Professor, Head of the Laboratory of Viral Pathogenesis, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: zhironov@inbox.ru

Acknowledgements. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grants Nos. 17-04-01726 and 17-04-01934). The study of the apoptosis of malignant cells was supported by the Russian Science Foundation and the German Research Foundation (DFG) (Collaboration project No. 18-44-04028). The study of the paramyxovirus reproduction was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. №14-15-01073).

The author is grateful to E. Böttcher-Friebertshäuser and Prof. H. D. Klenk (Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany) for the MDCK cell cultures used for HAT and TMPRSS2 protease expression. The author is grateful to Prof. P.M. Chumakov (V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia) and Prof. S. Ludwig (Institute of Molecular Virology, Münster, Germany) for helpful discussion.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 07 July 2016

Accepted 11 October 2016

Введение

Парамиксовирусы относятся к оболочечным вирусам, содержащим одноцепочечную РНК негативной полярности. В вирусном геноме закодировано 6 основных генов: NP – P – M – F – HN – L, которые экспрессируются один за другим по механизму старт – стоп с образованием соответствующих 6 основных структурных полипептидов [1]. В гене P закодированы дополнительные уникальные антиинтерфероновые белки V и С, которые образуются по механизму сдвига рамки трансляции вирусной мРНК [2, 3]. Известно, что белок F, выполняющий функцию слияния вирусной и клеточной мембраны, претерпевает точечное разрезание клеточными протеазами на 2 фрагмента F1 и F2. У различных штаммов парамиксовирусов участок расщепления F0 имеет либо единственный остаток Arg↓, либо полиаргининовый сайт с мотивом Arg – X – Arg/Lys – Arg↓, который расщепляется протеазами трипсинового и фуринового типа соответственно [4, 5]. Протеолитическое разрезание активирует сливающую функцию белка F и повышает способность вируса заражать клетки-мишени [4–6].

В инфицированных клетках вновь синтезированные вирусные белки формируют вирусное потомство и затем индуцируют цитопатогенное действие, которое приводит к отсроченной гибели клеток после завершения репродукции вируса. В последние годы наблюдается повышенный интерес к изучению механизмов вирусной

гибели клеток, что связано с развитием нового направления в химиотерапии раковых опухолей с помощью вирусов – так называемых вирусных онколитиков [7–9]. Одними из наиболее перспективных кандидатов на роль онколитического агента рассматриваются парамиксовирус Сендай и вирус болезни Ньюкасла (ВБН), которые имеют высокую тропность к инфекциям клеток человека и высокий литический потенциал [10].

Механизмы размножения вируса и гибели клеток имеют двоякую зависимость как от свойств вируса, так и от природы клеток. В частности, вызывает интерес изучение регуляции протеолитической активации вируса клеточными протеазами в нормальных и раковых клетках. В этом сравнении важное значение приобретает тот факт, что раковые клетки имеют дефекты в системе интерферона, что делает их наиболее уязвимыми для вирусов. С другой стороны, возникает вопрос, какие свойства вируса и какие вирусные белки вовлечены в регуляцию размножения вирусов различных семейств в процессе лизиса клеток.

В настоящей работе изучали размножение парамиксовирусов Сендай и ВБН в клеточных культурах, которые различались уровнем экспрессии протеаз, способных расщеплять вирусный белок слияния F0 (м. м. 68 кД) → F1 (50 кД) + F2 (15 кД) и активировать инфекционность вируса. Сравнивали зависимость механизма гибели клеток от интенсивности разрезания белка F0 →

F1 в клетках различного происхождения. Оказалось, что интенсивность разрезания вирусного белка F0 → F1 значительно усилена в опухолевых клетках и это коррелирует с повышением продукции инфекционного вируса и усилением вирусиндуцированного клеточного слияния и формирования гигантских симпластов на поздних сроках инфекции. Таким образом, полученные данные указывают на то, что раковые клетки более уязвимы для парамиксовирусной инфекции по сравнению с нормальными клетками.

Материал и методы

Клетки. Культуры эпителиальных клеток MDCK-H (эпителиальная линия почки собаки MDCK-H), Caco-2 (линия аденокарциномы толстого кишечника), H1299 (эпителиальная линия легочной карциномы) культивировали в минимальной среде Дульбеко (DMEM) с добавлением 10% фетальной сыворотки коров («Gibco BRL») и антибиотиков гентамицина (25 мкг/мл), пенициллина (50 Ед/мл), стрептомицина (50 мкг/мл) [11]. Культуру клеток MDCK-H, содержащую интегрированный ген протеазы human airway trypsin (HAT) (MDCK-HAT) либо ген протеазы transmembrane protease serin S2 (TMPRSS2) (MDCK-SS2) под тетрациклинрегулируемым промотором, культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки коров, или с добавлением в среду 0,5 мкг/мл доксициклина для индукции соответствующих протеаз [12]. Все клеточные линии получены из коллекции клеточных культур Института вирусологии Марбурга (Германия).

Вирусы. Вирус Сендай (штамм 960/Z) и ВБН (штамм LaSota) размножали в аллантаисной полости 10-дневных безлейкозных куриных эмбрионов в течение 72 ч при 36°C при множественности заражения около 10⁴ фокусобразующих единиц (ФОЕ) на эмбрион. Вирусосодержащую аллантаисную жидкость эмбрионов отбирали, аликвотили и хранили при -80°C.

Определение инфекционности вируса методом вирусных фокусов в клеточной культуре. 2-дневную культуру клеток MDCK-H инкубировали в течение 1 ч при 37°C с разведениями исследуемых вирусов, приготовленными на среде DMEM. Через 7–8 ч клеточные культуры фиксировали 4% параформальдегидом и последовательно инкубировали с антителами, специфичными для вируса Сендай или ВБН и антивидовым конъюгатом пероксидазы хрена. Единичные инфицированные клетки (вирусные центры) окрашивали тетраметилбензидиновым субстратом «True Blue» (KPL). Центры инфекции (ЦОЕ – центробразующие единицы) подсчитывали на 1 мл исследуемой суспензии в световом микроскопе при 75-кратном увеличении [13].

Анализ апоптозного профиля хроматиновой ДНК. Осадки клеток суспендировали в 50 мкл фосфатного буфера (ФБ) и смешивали с 250 мкл буфера, содержащего 0,6% додецилсульфата натрия (ДСН), 10 мМ ЭДТА и 15 мМ Трис-НСl (рН 8,0), к полученной суспензии добавляли 70 мкл 5 М NaCl. Полученную смесь оставляли на ночь при 4°C и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 20 мин для удаления агломератов хроматина. Супернатант последовательно обрабатывали РНКазой А (0,1 мг/мл) и протеиназой К (0,5 мг/мл) при 37°C по 30 мин каждой. Суспензию смешивали с тремя объемами 96% этанола, инкубировали при -20°C в течение 2 ч, сформированные преципитаты ДНК осаждали при 14 000 об/мин 20 мин, растворяли в 10 мМ Трис-НСl (рН

8,0) и анализировали в 1% агарозном геле, как описано ранее [14].

Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блот-анализ (ВБ). Полипептиды зараженных клеток фракционировали в полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем ДСН, и из геля белки переносили на нитроцеллюлозную бумагу Protran 0,45 мк («Schleicher & Schull») полусухим методом [15]. Мембрану промывали в ФБ, инкубировали 2 ч в 3% обезжиренном молоке и далее в течение 2 ч в ФБ, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина («Sigma») и специфические антивирусные антитела. В работе использовали антитела к очищенному белку F0 вируса Сендай и ВБН, цыплячьую сыворотку против цельного ВБН («Нарвак», Россия). Затем мембрану промывали ФБ и обрабатывали видоспецифическим конъюгатом пероксидазы хрена («Dako») с последующей усиленной идентификацией позитивных компонентов с помощью усиленной хемилюминесценции (ECL) с суперсубстратом («Pierce») [14].

Электрофорез в полиакриламидном геле и окраска гелей. Полипептиды вирусных проб фракционировали в ПААГ и после электрофореза гели фиксировали в растворе, содержащем смесь этанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 5:1:5 по объему. После фиксации гели окрашивали Кумаси голубым G-350 и несвязавшуюся краску отмывали раствором, содержащим 5 и 7% этанола и уксусной кислоты соответственно [16, 17].

Результаты

В первой части работы исследовали протеолиз вирусного белка F0 → F1 и уровень продукции инфекционного вируса при размножении вируса Сендай и штамма LaSota ВБН в к MDCK (линия Н) и ее производных линиях, содержащих гены трансмембранных протеаз HAT и TMPRSS2 под контролем тетрациклинового промотора [12], а также 2 линии раковых клеток человека Caco-2 (линия эпителиальных клеток аденокарциномы кишечника человека) и H1299 (линия эпителиальных клеток карциномы респираторного тракта человека). Как видно на рис. 1, вирус Сендай, выращенный в клетках MDCK-SS2 (см. рис. 1, а) и MDCK-HAT (см. рис. 1, б) без индукции доксициклином, содержал нерасщепленный белок F0 (м. м. 60 кД). Такой вирус имел низкую инфекционность, которая заметно возрастала в 1000 раз и более после обработки трипсином (табл. 1). Аналогичные данные получены с вирусом Сендай в культуре клеток MDCK-H (не показано). При размножении вируса в культурах клеток MDCK-HAT и MDCK-SS2 в присутствии доксициклина, индуцирующего синтез протеаз HAT и TMPRSS2, вирусное потомство имело расщепленный белок F1 (м. м. 50 кД) (см. рис. 1, а, б; дорожки 2 и 4). Количественная оценка, выполненная на основании сканирования гелей, показала, что около 40–70% белка F0 в вирусе, синтезируемом в клетках с доксициклином, переходило в расщепленную форму F1. Такой вирус имел высокую инфекционность, которая не возрастала после обработки трипсином (см. табл. 1).

В вирусе Сендай, продуцируемом в клетках MDCK-HAT при индукции протеазы HAT, помимо F0 (м. м. 65 кД) и F1 (50 кД) выявлялся дополнительный фрагмент 38К с м. м. 38 кД (см. рис. 1, б; дорожки 2, 4). Для доказательства того, что фрагмент 38К является продуктом белка F, проводили вестерн-блот-анализ с применением анти-F-антител. Как видно на рис. 2, фрагмент 38К реагировал с анти-F-антителами наряду с F0- и F1-белками,

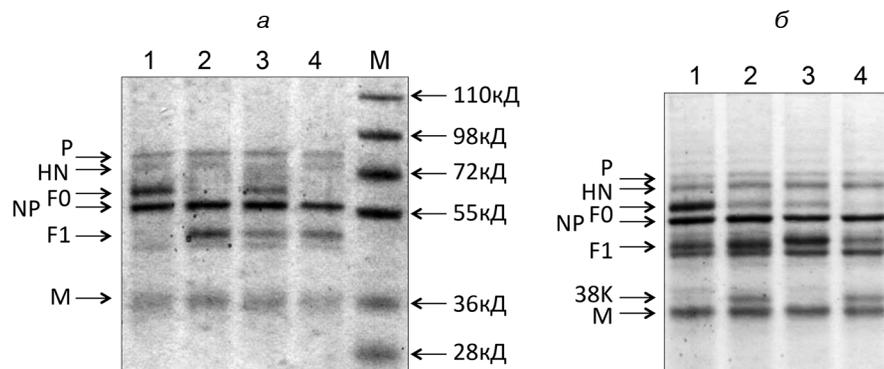


Рис. 1. Белковый профиль вируса Сендай, выращенного в клеточных культурах.

Культуру клеток MDCK-SS2 (а) и MDCK-HAT (б) инкубировали в среде без (дорожки 1, 2) и с доксициклином (3, 4), заражали вирусом Сендай и через 20 ч после заражения собирали культуральную жидкость. Образцы культуральной жидкости делили на 2 части, одну из которых не обрабатывали (1, 3), а вторую обрабатывали трипсином (2, 4) и выделяли вирус. Белки вируса анализировали с помощью электрофореза в ПААГ с последующей окраской геля Кумаси голубым R-350. Здесь и на рис. 3: справа показана дорожка с маркерами (М), м. м. указана справа в килодальтонах (кД).

что доказывало его происхождение из белка F0. Эти данные подтверждают наличие второго сайта расщепления в молекуле F1, чувствительного к протеазе НАТ.

38К-фрагмент, как следует из рис. 1, б, и 2, выявлялся в составе вируса, указывая на сохранение его связи с молекулой F1 в вирусной частице.

Таблица 1
Инфекционная активность вируса Сендай при размножении в клеточных культурах MDCK

Культура клеток	Обработка клеток доксициклином	Инфекционность, ФОЕ/мл*	
		без обработки трипсином	с предобработкой трипсином
MDCK-H	-	$1,6 \pm 0,3 \cdot 10^3$	$3,2 \pm 0,4 \cdot 10^7$
	+	$2,1 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$3,3 \pm 0,6 \cdot 10^7$
MDCK-HAT	-	$1,4 \pm 0,3 \cdot 10^3$	$4,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$
	+	$1,7 \pm 0,4 \cdot 10^6$	$2,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$
MDCK-SS2	-	$1,4 \pm 0,3 \cdot 10^2$	$4,3 \pm 0,6 \cdot 10^5$
	+	$1,5 \pm 0,4 \cdot 10^6$	$2,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$

Примечание. * – Культуры клеток почки собаки заражали вирусом Сендай с множественностью около 1 ФОЕ на клетку. Культуральную жидкость в клетках отбирали через 28 ч после заражения и определяли инфекционность вируса методом фокусов в культуре клеток MDCK-H с предварительной обработкой трипсином и без нее, как описано в разделе «Материал и методы».

Таблица 2
Инфекционная активность вируса Сендай при размножении в культуре раковых клеток

Культура клеток	Период вирусного сбора, ч после заражения	Инфекционность, ФОЕ/мл*	
		без обработки трипсином	с предобработкой трипсином
Caco-2	3–36	$1,6 \pm 0,3 \cdot 10^5$	$3,2 \pm 0,4 \cdot 10^6$
	36–72	$2,1 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$3,3 \pm 0,6 \cdot 10^7$
H1299	3–22	$1,2 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$4,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$
	22–45	$1,3 \pm 0,4 \cdot 10^5$	$2,3 \pm 0,6 \cdot 10^6$

Примечание. * – Культуру клеток заражали вирусом Сендай с множественностью около 1 ФОЕ на клетку. Культуральную жидкость в клетках Caco-2 и H1299 отбирали через 22 и 36 ч после заражения соответственно, определяли инфекционность вируса методом фокусов в культуре клеток MDCK с предварительной обработкой трипсином и без нее, как описано в разделе «Материал и методы».

При изучении размножения ВБН в клетках MDCK получены сходные данные (табл. 2). Без индукции доксициклином в клетках MDCK-SS2 и MDCK-HAT синтезировался вирус с низкой инфекционностью, которая возрастала более чем в 100 раз после обработки трипсином. При размножении ВБН в культурах MDCK-SS2 и MDCK-HAT в присутствии доксициклина синтезировался высокоинфекционный ВБН, который после обработки трипсином практически не увеличивал свою инфекционную активность.

В культуре опухолевых клеток Caco-2 и H1299 синтезировался высокоинфекционный вирус Сендай, содержащий белок F0 наряду с F1. При этом было установлено, что содержание F1 возрастало в вирусе на поздних сроках инфекции (20–42 ч после заражения) по сравнению с вирусом на ранних сроках инфекции (3–20 ч после заражения) (рис. 3). Это наблюдалось как в культуре клеток H1299, так и в культуре Caco-2 (не показано).

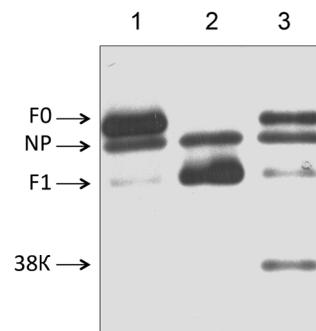


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ белкового профиля вируса Сендай с анти-F-антителами.

Вирус Сендай выращивали в культуре клеток MDCK-HAT без индукции (дорожка 1) и с индукцией тетрациклином (3) синтеза протеазы НАТ. Вирус из культуральной жидкости подвергали электрофорезу и последующей идентификации белка F методом ВБ с использованием специфических антител к белку F. Дорожка 2 – вирус, продуцируемый в культуре без индукции тетрациклином и обработанный трипсином.

Таблица 3
Инфекционная активность ВБН при размножении в культурах нормальных и раковых клеток

Культура клеток	Культивирование клеток с доксициклином	Инфекционность, ФОЕ/мл*	
		без обработки трипсином	с предобработкой трипсином
MDCK-H	-	1,6±0,3·10 ³	3,2±0,4·10 ⁷
MDCK-NAT	-	1,4±0,3·10 ³	4,3±0,6·10 ⁶
	+	1,7±0,4·10 ⁶	2,3±0,6·10 ⁶
Caco-2	-	1,7±0,5·10 ⁵	3,4±0,4·10 ⁶
H1299	-	1,5±0,2·10 ⁴	4,3±0,5·10 ⁵

Примечание. Культуры нормальных немалигнизированных (MDCK) и раковых (H1299 и Caco-2) клеток заражали ВБН (ЛаСота) с множественностью около 1 ФОЕ на клетку. Культуру клеток инкубировали с доксициклином и без него. Культуральную жидкость в клетках отбирали через 25 ч после заражения и определяли инфекционность вируса методом фокусов в культуре клеток MDCK-H с предварительной обработкой трипсином и без нее, как описано в разделе «Материал и методы».

Параллельно с увеличением содержания F1 в вирусе на поздних сроках инфекции возрастала инфекционность такого вируса (табл. 3). Из этого следует, что инфекция парамиксовирусом Сендай опухолевых клеток приводила к индукции эндогенных протеаз, участвующих в расщеплении белка F0 → F1, и усилению инфекционности *de novo* синтезируемого вируса.

В следующей части изучали гибель клеток при инфекции вирусом Сендай и ВБН. При морфологическом исследовании с помощью светового микроскопа в культуре клеток MDCK-H выявляли типичные признаки апоптоза в виде сморщенных клеток и характерных апоптотных фрагментов (апоптотных телец), напоминающих гроздь клеточных фрагментов (рис. 4; показаны стрелкой). В культуре клеток MDCK-NAT и MDCK-SS2, инфицированных в присутствии тетрациклина, выявлялись сходные изменения с той разницей, что обнаруживались гигантские многоядерные клетки (рис. 5; показано

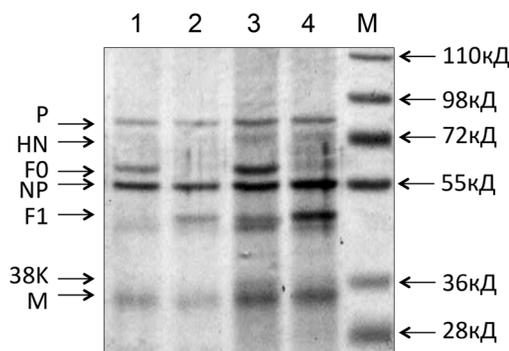


Рис. 3. Белковый профиль вируса Сендай, выращенного в культуре H1299.

Культуру раковых клеток легкого человека H1299 заражали вирусом Сендай и далее инкубировали в среде DMEM без сыворотки. Среду меняли через 20 и 40 ч после заражения, образцы культуральной жидкости, собранной через 20 ч (дорожки 1, 2) и 40 ч (3, 4) после заражения, делили на 2 части, одну из которых не обрабатывали (1, 3), а вторую обрабатывали трипсином (2, 4). Из культуральной жидкости выделяли вирус, и белки анализировали с помощью электрофореза в ПААГ с последующей окраской геля Кумаси голубым R-350.

стрелкой), представляющие собой слившиеся соседние клетки (так называемые симпласты). Появление симпластов обусловлено протеолизом и активацией F0→F1, который вызывал слияние плазматических мембран и объединение соседних клеток. Активирующий протеолиз белка F0 – F1 + F2 происходил под действием индуцируемой протеазы NAT или TMRSS2. В отсутствие доксициклина образования клеточных симпластов в культурах, зараженных вирусом Сендай и ВБН, не обнаруживалось.

В культурах опухолевых клеток выявлялись вирусзависимые вариации клеточной гибели при заражении вирусами. Во-первых, в культуре Caco-2 значительно более быстрое и сильное цитодеструктивное действие развивалось при инфекции ВБН в сравнении с вирусом Сендай. Явные признаки гибели при заражении ВБН появлялись уже к 20 ч после заражения, тогда как при инфекции вирусом Сендай даже через 120 ч не обнаруживалось заметного цитопатического действия (ЦПД) в культуре инфицированных клеток и сохранялась продукция вируса (см. рис. 4). Во-вторых, оба вируса вызывали образование многоядерных симпластов в клеточной культуре Caco-2, что коррелировало с расщеплением вирусного белка F0 → F1 в этой культуре (рис. 5, б). В-третьих, в зараженных клетках Caco-2 не обнаруживалось формирование апоптотной ДНК-лестницы на поздних сроках инфекции как вирусом Сендай, так и ВБН, что указыва-

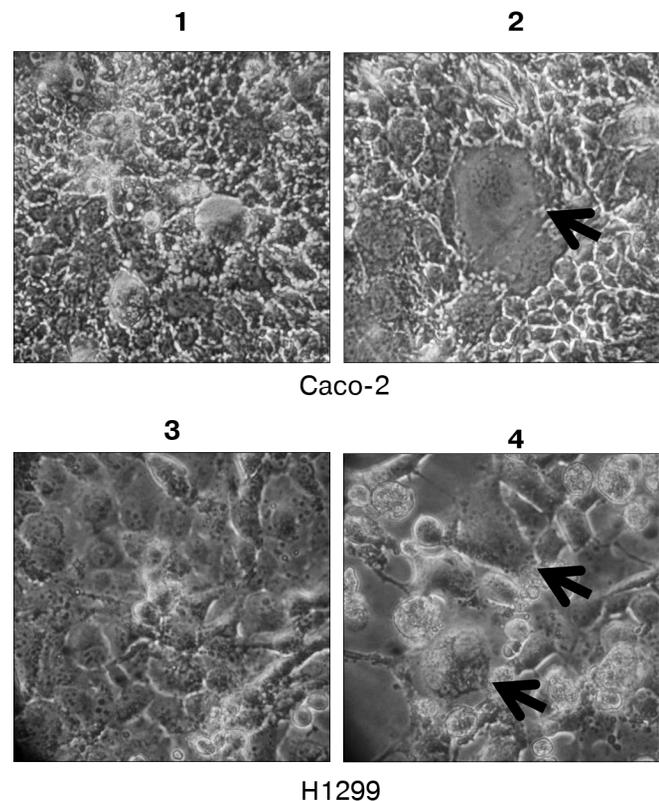


Рис. 4. Образование симпластов в культурах клеток H1299 и Caco-2 под действием вируса Сендай.

Культуру раковых клеток кишечника Caco-2 (1, 2) и легкого H1299 (3, 4) человека заражали вирусом Сендай и далее инкубировали в среде DMEM без сыворотки. Незараженные (1, 3) и зараженные через 25 ч (2; Caco-2) и 48 ч (4; H1299) клеточные культуры фотографировали в световом микроскопе в видимом свете при ув. 250.

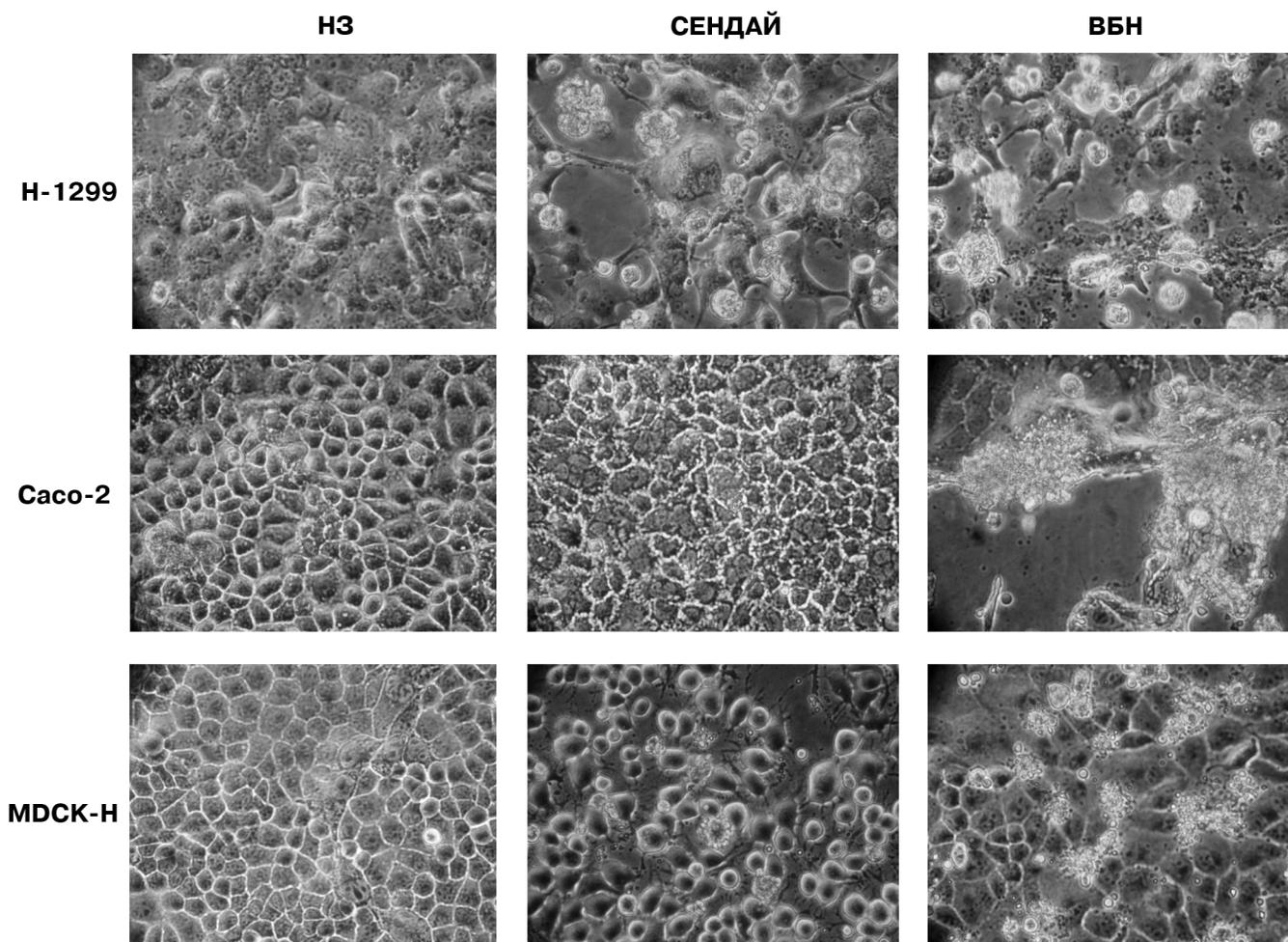


Рис. 5. Цитодеструктивное действие вируса Сендай и ВБН в культурах немалигнизированных и раковых клеток. Культуры немалигнизированных (MDCK) и раковых (H-1299 и Caco-2) клеток заражали вирусом Сендай или ВБН с множественностью около 1 БОЕ на клетку. Через 27 ч после заражения клетки исследовали в световом микроскопе и фотографировали при ув. 250.

ло на некротический тип гибели клеток (рис. 6, дорожки 1–4). В-четвертых, при инфекции раковых клеток H1299 вирусом Сендай и ВБН выявлялись явные отличия признаков гибели от наблюдаемых в культуре Caco-2, поскольку обнаруживалась ступенчатая деградация хромосомной ДНК, указывающая на апоптотный механизм гибели опухолевых клеток под действием как вируса Сендай, так и ВБН (рис. 6; дорожки 6, 7). В-пятых, в отличие от клеток Caco-2 интенсивность и скорость гибели клеток H1299 были сходные при заражении вирусом Сендай и ВБН, при этом явные признаки апоптоза в обоих случаях развивалось уже к 20-му часу после заражения (рис. 5). Эти данные указывают на то, что механизм и интенсивность гибели клеток могут зависеть как от вируса, так и от типа опухолевых клеток.

Обсуждение

Известно, что для парамиксовирусов характерен феномен активации инфекционности вириона, реализуемый посредством точечного протеолитического расщепления поверхностного гликопротеида F0 (м. м. ~ 65 кД) на 2 фрагмента – F1 (50 кД) и F2 (15 кД). Такое расщепление происходит после остатка Арг в определенном участке (протеолитическом сайте) молекулы F0 после остатка

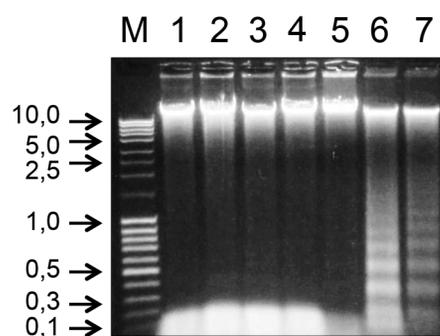


Рис. 6. Профиль клеточной ДНК в клетках Caco-2 и H1299, инфицированных вирусом Сендай и ВБН. Культуру клеток Caco-2 инфицировали вирусом Сендай (дорожки 2, 3) и ВБН (4) и инкубировали 45 ч (2, 4) и 98 (3) после заражения. Незараженные клетки инкубировали параллельно (1). Клетки H1299 заражали вирусом Сендай (8) и ВБН (9) и инкубировали в течение 45 ч после заражения. Дорожка 5 – незараженные клетки H1299. Из клеток выделяли ДНК и фракционировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Дорожка 1 – маркерные ДНК с м. м. 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2,5, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 тыс. пар оснований соответственно (показано стрелками слева).

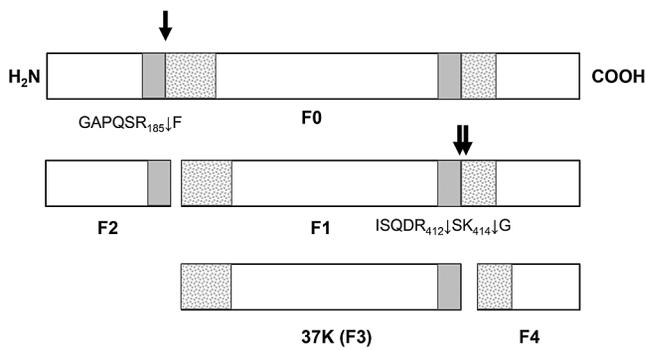


Рис. 7. Схема двухступенчатого протеолиза белка F0 вируса Сендай.

Показана локализация доменов в белке F0 вируса Сендай. Стрелками указаны участки предполагаемого расщепления трипсиноподобной протеазой НАТ. Серым цветом заштрихованы участки распознавания протеазой в протеолитическом сайте F0 при расщеплении на субъединицы F1, F2 и F3, F4; снизу приведены последовательности аминокислот в сайте расщепления (протеолитическом сайте). Гидрофобные участки (так называемые фузионные пептиды) заштрихованы точками.

Арг [4–6]. Существуют 2 типа протеолитического сайта: с единственным остатком Арг (моноаргининовый сайт) и с двумя и более остатками Арг (полиаргининовый сайт) [6]. Для первой группы штаммов активирующими протеазами служат протеазы трипсиновой специфичности, так называемые трипсиноподобные протеазы, тогда как для второй группы роль активирующих протеаз выполняют фурин, кексин, РЕХ6 и подобные протеазы [4–6].

Вирус Сендай и ВБН (штамм ЛаСота) имеют белок F0 с моноаргининовым сайтом разрезания. Расщепление такого участка может происходить под действием трипсина или протеаз со сходной специфичностью. В настоящей работе установлено, что трансмембранные протеазы НАТ и TMPRSS2 обладают способностью расщеплять белок F0 вируса Сендай и ВБН/ЛаСота и активировать его симпластообразующую функцию и инфекционность вирионов. Протеазы НАТ и TMPRSS2 относятся к классу сериновых трансмембранных протеаз типа I, расщепляющих белки-субстраты преимущественно по остатку Arg [18, 19]. Эти протеазы являются гликопротеидами, которые синтезируются в клетках на мембранах и транспортируются на клеточную поверхность, как и вирусный гликопротеид F0. В ходе совместного транспорта протеазы НАТ и TMPRSS2 претерпевают собственный точечный протеолиз для своей активации и после этого способны расщеплять F0 → F1 + F2 на этапе транспорта к плазматической мембране или на ее поверхности.

Важная особенность протеолиза F0 обнаружена в опухолевых клетках H1299 и Сасо-2, которая заключалась в его заметном усилении в клетках на поздних сроках инфекции. Следует подчеркнуть, что протеолиз F0 и активация вируса Сендай и ВБН не развивались в немалигнизированных (нормальных) клеточных линиях, таких как MDCK и CV1. Эти наблюдения говорят о том, что инфекция парамиксовирусами опухолевых клеток приводит к индукции протеаз, способных расщеплять белок F0. В результате такой индукции клеточных протеаз вирус стимулирует собственную активацию инфекционности и симпластообразования и способствует распространению вирусной инфекции в раковых клеточных культурах.

В настоящей работе обнаружено, что протеаза НАТ способна расщеплять белок F0 вируса Сендай не только в каноническом сайте, но и в дополнительном участке, что приводит к образованию нового фрагмента F3 с м. м. около 37К (м.м. 37 кД). Этот вывод подтверждается наблюдениями о сходном расщеплении F0 в клетках MDCK-НАТ при индукции протеазы НАТ, но не в клетках, экспрессирующих TMPRSS2. Рассмотрение первичной структуры гена F0 свидетельствует о том, что таким дополнительным протеолитическим сайтом может служить остаток R (Arg)-412 или K (Lys)-414 в участке SQDR↓SK↓G, имеющем сходство с каноническим сайтом расщепления Arg-185 в участке APQSR↓F. Пока не ясно, имеет ли такое расщепление функциональное значение, например для усиления фузионной функции белка F за счет второго N-концевого пептида, возникающего в субъединице F3 и состоящего из гидрофобных аминокислот (рис. 7). В этом случае вирус Сендай может обладать двумя доменами слияния в субъединицах F1 и 37K (F3) и иметь повышенную способность к образованию клеточных симпластов в различных тканях, включая раковые ткани, характеризующиеся повышенным уровнем протеазы НАТ. Примечательно, что расщепление во втором сайте F1 → F3 + F4 наблюдалось в раковых клетках Сасо-2. Из этого вытекает предположение о том, что в этой линии опухолевых клеток экспрессируется протеаза НАТ (или ее аналоги), вызывающая двухступенчатое расщепление белка F вируса Сендай, F0 → F1 + F2 и F1 → F3 + F4. Важно отметить, что протеолиз F0 и активация вируса Сендай не наблюдались в нетуморогенных (нормальных) клеточных линиях, таких как MDCK и CV1.

Результаты настоящей работы указывают на вариабельность механизмов клеточной гибели, индуцированной вирусом Сендай и ВБН (ЛаСота) в различных клеточных системах. Использованные вирусы Сендай и ВБН вызывали гибель нормальных (немалигнизированных) клеток CV1 и MDCK с явными признаками апоптоза и ступенчатой деградацией хроматиновой ДНК (так называемой ДНК-лестницей). В раковых клетках Сасо-2 и H1299 вирусное цитодеструктивное действие кардинально различалось. Во-первых, гибель одних раковых клеток, таких как Сасо-2, не имела характерного апоптозного профиля деградации хроматиновой ДНК, тогда как в других раковых клетках типа H1299 гибель сопровождалась признаками апоптоза. Во-вторых, вирус Сендай и ВБН вызывали гибель раковых клеток с разной интенсивностью. ВБН вызывал быструю гибель клеточного монослоя, тогда как вирус Сендай вызывал быструю деструкцию клеток H1299 и слабое цитопатическое действие без видимой гибели клеточного монослоя в культуре Сасо-2. Эти данные говорят о том, что механизмы, лежащие в основе вирусиндуцированной гибели раковых клеток, имеют двоякую реципрокную зависимость как от типа опухолевых повреждений клеточного метаболизма, так и от вирусных факторов, воздействующих на биохимические пути апоптоза в клетках. Этот вывод имеет важное значение для стратегии выбора вирусного штамма в онколитическом лечении различных типов опухолей.

Интересно, что раковые клетки характеризуются повреждением биохимических путей, участвующих в регуляции пролиферации и гибели клеток (апоптоза), таких как система интерферона, дефекты факторов транскрипции p53, NFκB и т. п. [20–25]. При заражении различными

цитолитическими вирусами в раковых культурах будет формироваться специфическое соотношение вирусных факторов и клеточного метаболизма, характерного для типа опухоли, которое будет порождать особый фенотип гибели клеток. Из этого следует, что для уничтожения определенного вида опухоли необходим селективный вирус-онколитик, который способен преодолеть онкогенный дефект раковых клеток и вызывать их апоптоз или некроз. В настоящей работе показано, что раковые клетки H1299 обладают высокой чувствительностью к гибели, вызванной как ВБН, так и вирусом Сендай. Напротив, линия клеток из опухоли кишечника человека Сасо-2 имела высокую резистентность к вирусам Сендай и гриппа [26], и только ВБН вызывал быструю деградацию и гибель клеток данного типа. Дальнейшее изучение и понимание механизмов вирусного поражения опухолей позволят выработать принципы такого выбора вирус-онколитиков и создать их банк.

Благодарность. Автор благодарит Е. Böttcher-Friebertshäuser и prof. H.D. Klenk из Института вирусологии Университета Филиппа г. Марбурга (Германия) за предоставление культур клеток МДСК, экспрессирующих протеазы НАГ и TMPRSS2, а также проф. П.М. Чумакова из Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и prof. S. Ludwig из Института молекулярной вирусологии Университета г. Мюнстера (Германия) за полезное и конструктивное обсуждение темы исследований.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 17-04-01726, 17-04-01934). Исследования апоптоза малигнизированных клеток проведены при поддержке совместного проекта Российского научного фонда и немецкого фонда DFG № 18-44-04028. Исследования репродукции парамиксовирусов проведены в рамках гранта РНФ № 14-15-01073.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–15, 17–26 см. REFERENCES)

16. Жирнов О.П., Букринская А.Г. Изучение белков вируса Сендай: протеолитическая активность в составе вирусных частиц. *Вопросы вирусологии.* 1977; (5): 571–8.

REFERENCES

- Lamb R.A., Parks G.D. Paramyxoviridae: their viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer and Lippincott Williams and Wilkins; 2007.
- Huang Z., Krishnamurthy S., Panda A., Samal S.K. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J. Virol.* 2003; 77 (16): 8676–85.
- Park M.S., Garcia-Sastre A., Cros J.F., Basler C.F., Palese P. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *J. Virol.* 2003; 77 (17): 9522–32.
- de Leeuw O.S., Koch G., Hartog L., Ravenshorst N., Peeters B.P. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J. Gen. Virol.* 2005; 86 (Pt. 6): 1759–69.
- Morrison T.G. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003; 1614 (1): 73–84.
- Nagai Y., Inocencio N.M., Gotoh B. Paramyxovirus tropism dependent on host proteases activating the viral fusion glycoprotein. *Behring. Inst. Mitt.* 1991; (89): 35–45.
- Tayeb S., Zakay-Rones Z., Panet A. Therapeutic potential of oncolytic Newcastle disease virus a critical review. *Oncolytic. Virother.* 2015; 4: 49–62.
- Matveeva O.V., Guo Z.S., Senin V.M., Senina A.V., Shabalina S.A., Chumakov P.M. Oncolysis by paramyxoviruses: preclinical and clinical studies. *Mol. Ther. Oncolytics.* 2015; 2.
- Ring C.J. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. *J. Gen. Virol.* 2002; 83 (Pt. 3): 491–502.
- Cuadrado-Castano S., Sanchez-Aparicio M.T., Garcia-Sastre A., Villar E. The therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus. Res.* 2015; 209: 56–66.
- Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A., Poyarkov S.V., Ovcharenko A.V., Anhlan D. et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J. Clin. Virol.* 2009; 45 (4): 322–33.
- Böttcher-Friebertshäuser E., Lu Y., Meyer D., Sielaff F., Steinmetzer T., Klenk H.D. et al. Hemagglutinin activating host cell proteases provide promising drug targets for the treatment of influenza A and B virus infections. *Vaccine.* 2012; 30 (51): 7374–80.
- Zhirnov O.P., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N., Klenk H.D. Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 2011; 21 (4): 169–74.
- Zhirnov O.P., Konakova T.E., Wolff T., Klenk H.D. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J. Virol.* 2002; 76 (4): 1617–25.
- Zhirnov O. P., Ikizler M. R., Wright P. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002; 76 (17): 8682–9.
- Zhirnov O.P., Bukrinskaya A.G. Study on Sendai virus proteins: proteolytic activity within virus particles. *Voprosy virusologii.* 1977; (5): 571–8. (in Russian)
- Zhirnov O.P., Ovcharenko A.G., Bukrinskaya A.G. Myxovirus replication in chicken embryos can be suppressed by aprotinin due to the blockage of viral glycoprotein cleavage. *J. Gen. Virol.* 1985; 66 (Pt. 7): 1633–8.
- Szabo R., Bugge T.H. Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2011; 27: 213–35.
- Murray A.S., Varela F.A., List K. Type II transmembrane serine proteases as potential targets for cancer therapy. *Biol. Chem.* 2016; 397 (9): 815–26.
- Naik S., Russell S.J. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2009; 9 (9): 1163–76.
- Linge C., Gewert D., Rossmann C., Bishop J.A., Crowe J.S. Interferon system defects in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1995; 55 (18): 4099–104.
- Abd-Elrahman I., Hershko K., Neuman T., Nachmias B., Perlman R., Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein Livin (ML-IAP) plays a dual role in tumorigenicity. *Cancer Res.* 2009; 69 (13): 5475–80.
- Gurpinar E., Vousden K.H. Hitting cancers' weak spots: vulnerabilities imposed by p53 mutation. *Trends Cell. Biol.* 2015; 25 (8): 486–95.
- Goldar S., Khaniani M.S., Derakhshan S.M., Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2015; 16 (6): 2129–44.
- Xu D.W., Zhang G.Q., Wang Z.W., Xu X.Y., Liu T.X. Autophagy in tumorigenesis and cancer treatment. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2015; 16 (6): 2167–75.
- Zhirnov O.P., Klenk H.D. Human influenza viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CACO-2 cells. *Virology.* 2003; 313 (1): 198–212.

Поступила 07.07.16

Принята в печать 11.10.16