



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

5

2010



издательство  
"МЕДИЦИНА"

Н. П. Семенова<sup>1</sup>, Е. Н. Прокудина<sup>1</sup>, Д. К. Львов<sup>1</sup>, В. Е. Небольсин<sup>2</sup>

## Влияние противовирусного препарата Ингавирин® на внутриклеточные преобразования и импорт в ядро нуклеокапсидного белка вируса гриппа А

<sup>1</sup>ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН; <sup>2</sup>ОАО "Валента Фарм", Москва

Представлены результаты исследований влияния противовирусного препарата Ингавирин® на разные этапы внутриклеточных преобразований нуклеокапсидного белка (NP) вируса гриппа. Установлено, что Ингавирин® в диапазоне концентраций 400–1000 мкг/мл нарушает процесс биогенеза NP вируса гриппа, снижает эффективность образования конформационно зрелых компактных NP-олигомеров и задерживает миграцию вновь синтезированного NP из цитоплазмы в ядро. Показана ассоциация меченного тритием Ингавирина® с ядерными мембранами клеток MDCK. Проведенные исследования механизмов антивирусной активности Ингавирина® не только значимы для характеристики данного препарата, но также способствуют выявлению потенциальных мишеней для разработки новых противовирусных препаратов.

Ключевые слова: вирус гриппа, нуклеопротеин, Ингавирин®

### Effect of the antiviral drug Ingavirin® on intracellular transformations and import into the nucleus of influenza A virus nucleocapsid protein

N. P. Semenova<sup>1</sup>, E. N. Prokudina<sup>1</sup>, D. K. Lvov<sup>1</sup>, V. E. Nebolsin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences; <sup>2</sup>ОАО Valenta Pharma

The paper presents the results of studying the effect of the antiviral drug Ingavirin® on different stages of intracellular transformations of influenza A virus nucleocapsid protein (NP). Ingavirin® 400-1000 µg/ml has been found to impair the biogenesis of influenza virus NP, to lower the efficiency of formation of conformationally mature compact NP oligomers, and to retard the migration of newly-synthesized NP from the cytoplasm to the nucleus. It is shown that there is an association of tritium-labeled Ingavirin® with the nuclear membranes of MDCK cells. The investigations of the mechanisms of antiviral activity of Ingavirin® are not only important for the characterization of this drug, but also promote the detection of potential targets to design novel antiviral agents.

Key words: influenza virus, nucleoprotein, Ingavirin®

При оценке перспективности противовирусных агентов существенную проблему представляет выявление адекватных мишеней, чувствительных к воздействию исследуемых агентов. В этой связи знания о биогенезе важнейших вирусных белков открывают широкий круг потенциальных мишеней для поиска и апробации противовирусных препаратов. Основой для выполнения настоящей работы явились результаты фундаментальных исследований, продемонстрировавших цель последовательных преобразований нуклеокапсидного белка (NP) вируса гриппа [7–9]. NP — сложный полифункциональный белок, конечная функциональная форма которого представляет собой NP-полимер [6, 10, 13]. В составе вирусного рибонуклеопротеина (RNP) он является структурной основой для укладки вирусной РНК, необходимой для продукции инфекционного вируса. Биогенез NP — многостадийный процесс, в ходе которого образуются как "продуктивные", так и "абerrантные" промежуточные формы, представляющие собой полимерные структуры, гетерогенные по характеру пространственной организации и размерам [7–9, 11, 13]. Каждая из образующихся в продуктивной цепи биогенеза NP промежуточных структур может служить потенциальной мишенью для приложения адекватного блокирующего агента.

Цель настоящей работы — исследование действия противовирусного препарата Ингавирин® на различные этапы внутриклеточных преобразований NP вируса гриппа.

### Материалы и методы

*Противовирусный препарат* Ингавирин® (2-(имидазол-4-ил) этанамид пентандиовой-1,5 кислоты) — низкомолекулярный пептидоамин, аналог эндогенного пептидоамина, выделенного из тканей морского моллюска *Aplysia Californica*. Меченный тритием Ингавирин® (3H-Ингавирин®) получали методом изотопного обмена.

*Вирус и клетки.* В работе использовали вирус гриппа А, штамм А/Утка/Украина/1/63 (H3N8) и перевиваемую линию клеток почки собаки MDCK. Зараженные вирусом гриппа клетки метили 35-S-метионином или 14-C-гидролизатом белка (50 мкКи/мл) в разные сроки после заражения.

*Фракционирование клеток на ядерную и цитоплазматическую фракции* проводили, как описано ранее [1, 2].

*Для изучения влияния Ингавирина® на конформационное созревание NR вируса гриппа* культуру клеток MDCK заражали вирусом гриппа А, штамм А/

Контактная информация:

Семенова Наталья Петровна, вед. науч. сотр.; e-mail: semenovnp@rambler.ru.

Утка/Украина/1/63/ (H3N8) с расчетной множественностью 10 БОЕ/кл. После адсорбции вирус удаляли и вносили Ингавирин® в концентрации 400, 800 и 1000 мкг/мл. Через 4 ч после заражения среду с Ингавирином® удаляли и проводили мечение зараженных клеток 14-С-гидролизатом белка в течение 3 ч. Затем метку удаляли, образцы заливали диссоциирующим буфером и [4] и разделяли на 2 равные части, одну из которых не прогревали перед анализом в полиакриламидном геле (ПААГ) для сохранения полимерных форм NP, другую прогревали при 100°C в течение 3 мин для диссоциации NP-полимеров до NP-мономеров. Образцы анализировали в ПААГ.

Для изучения влияния Ингавирина® на кинетические преобразования NP в конформационно зрелые NP-олигомеры культуру клеток MDCK заражали вирусом гриппа А штамм А/Утка/Украина/1/63/ (H3N8) с множественностью 10 БОЕ/клетка. Ингавирин® в концентрации 500 мкг/мл вводили сразу после заражения. Через 5 ч после заражения среду с Ингавирином® удаляли и проводили кратковременное "пульсовое" мечение клеток 35-S-метионином в течение 5 мин. Через 5 мин метку удаляли, культуры заливали средой с избытком немеченого метионина и выдерживали при 37°C в течение 30 мин (чейз) для выяснения судьбы вновь синтезированных структур. Аналогичным образом обрабатывали клетки без Ингавирина®. Клеточные лизаты разделяли на 2 равные порции, одну из которых не прогревали перед анализом в ПААГ для сохранения полимерных форм NP, а другую прогревали при 100°C в течение 3 мин для диссоциации NP-полимеров до NP-мономеров.

Для изучения влияния Ингавирина® на импорт NP вируса гриппа в ядро культуру клетки MDCK заражали вирусом гриппа А штамм А/Утка/Украина/1/63/ (H3N8) в дозе 10 БОЕ/клетка. Ингавирин® в концентрации 1000 мкг/мл вводили сразу после заражения. Через 5 ч после заражения проводили кратковременное "пульсовое" мечение клеток 35-S-метионином в течение 5 мин. Затем их заливали немеченой средой и выдерживали при 37°C в течение 30-минутного чейза. Аналогичным образом обрабатывали клетки без Ингавирина®.

Из клеток получали очищенную фракцию ядер. Лизат ядер подвергали иммуносорбции с поликлональными анти-NP-антителами методом радиоиммунопреципитации. Иммунопреципитаты растворяли в диссоциирующем буфере, прогревали при 100°C для получения мономерных NP и анализировали в ПААГ.

**Авторадиография клеток.** Клетки MDCK, зараженные вирусом гриппа А штамм А/Утка/Украина/1/63/ (H3N8), инкубировали с 3Н-Ингавирином® в концентрации 30 мкКи/мл 3 ч. Затем меченую среду удаляли, клетки троекратно отмывали физиологическим раствором, фиксировали в растворе этанол-ледяная уксусная кислота (3 : 1), промывали трихлоруксусной кислотой и этанолом. Высушенные стекла фиксировали на предметном стекле и покрывали расплавленной фотоэмульсией. Покрытые эмульсией препараты выдерживали в темноте при 4°C в течение разного времени, а затем проявляли, фиксировали, аккуратно промывали водой, окрашивали красителем Гимзы. Полученные препараты про-

сматривали в световом микроскопе (клетки — ув. 10, ядра — ув. 40). Регистрировали треки, образовавшиеся на фотоэмульсии, как показатели субклеточной локализации 3Н-Ингавирина®.

## Результаты и обсуждение

**Влияние Ингавирина® на конформационное созревание NP вируса гриппа.** Известно, что в клетках, зараженных вирусом гриппа, вирусный NP проходит ряд стадий конформационного созревания. Первоначально образуются незрелые нестабильные NP-мультимеры, которые затем преобразуются в конформационно зрелые компактные NP-олигомеры [8, 9]. Оба типа полимеров выявляются в недиссоциирующих условиях ПААГ при анализе непрогретых образцов. Для выяснения возможных механизмов противовирусного действия Ингавирина® исследовано влияние его различных концентраций на количественное соотношение конформационно незрелых и зрелых форм NP вируса гриппа в зараженных клетках.

На рис. 1 (дорожка 1) показано исходное соотношение незрелых NP-мультимеров и зрелых компактных NP-олигомеров при 3-часовом мечении зараженных клеток без Ингавирина®. При обработке различными концентрациями Ингавирина® (см. рис. 1, дорожки 3, 5, 7) выявлено снижение эффективности перехода незрелых NP-мультимеров в зрелые компактные NP-олигомеры в клетках. В результате относительное количество мультимеров увеличивается по мере повышения концентрации Ингавирина®, тогда как количество компактных NP-олигомеров уменьшается. На рис. 1 также видно, что использованные концентрации Ингавирина® не влияют на количество синтезированного вирусного NP, о чем свидетельствуют одинаковые ко-

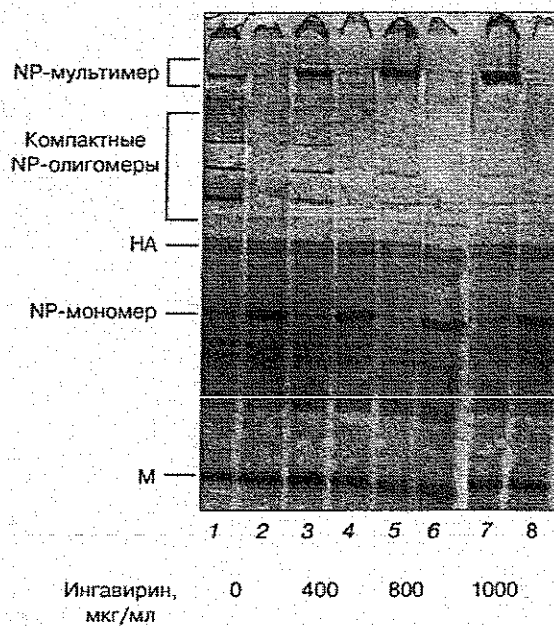


Рис. 1. Влияние увеличивающихся концентраций Ингавирина® на конформационное созревание NP вируса гриппа. Представлены результаты авторадиографии зараженных меченых клеток после анализа в ПААГ. Объяснение в тексте

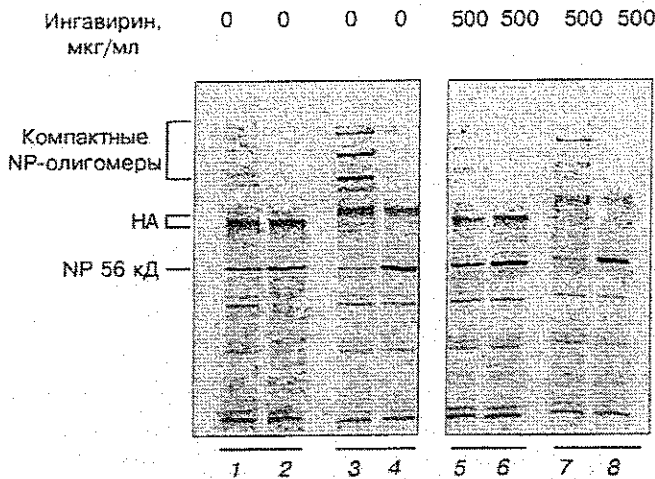


Рис. 2. Влияние Ингавирин<sup>®</sup> на внутриклеточную трансформацию NP в клетках MDCK, зараженных вирусом гриппа.

Представлены результаты автордиографии зараженных меченых клеток после анализа в ПААГ. Дорожки 1, 3, 5, 7 — образцы, не прогреты перед анализом в ПААГ; дорожки 2, 4, 6, 8 — образцы, прогреты при 100 °С в течение 3 мин. Объяснения в тексте.

личества тотального NP в прогретых при 100 °С образцах (дорожки 2, 4, 6, 8).

Таким образом, Ингавирин<sup>®</sup> в диапазоне концентраций 400—1000 мкг/мл снижает эффективность перехода незрелых форм NP в конформационно зрелые компактные NP-олигомеры, не оказывая видимого цитотоксического эффекта.

**Влияние Ингавирин<sup>®</sup> на кинетические преобразования NP в конформационно зрелые NP-олигомеры.** На рис. 2 видно, что в результате 5-минутного пульсового мечения как необработанных (дорожка 1), так и обработанных (дорожка 5) Ингавирином<sup>®</sup> образцов наблюдается сходная картина распределения NP-структур. Однако судьба синтезированных NP в сравниваемых образцах различна. Так, в результате 30-минутного выдерживания в немеченой среде клеток, не обработанных Ингавирином<sup>®</sup>, происходило эффективное формирование компактных олигомеров (дорожка 3). В то же время в аналогичных образцах, обработанных Ингавирином<sup>®</sup> (дорожка 7), наблюдалось заметное снижение образования компактных NP-олигомеров.

Таким образом, Ингавирин<sup>®</sup> в концентрации 500 мкг/мл тормозит преобразование синтезированных NP в конформационно зрелые компактные NP-олигомеры.

**Влияние Ингавирин<sup>®</sup> на импорт NP вируса гриппа в ядро.** Необходимое условие реализации инфекционного процесса в клетках, зараженных вирусом гриппа, — импорт NP в ядро.

На рис. 3 видно, что за 5 мин мечения в образцах без Ингавирин<sup>®</sup> в клеточных ядрах обнаруживается вирусный NP (дорожка 1). Эти результаты указывают на быструю миграцию вновь синтезированного NP из цитоплазмы в ядро. В течение 30-минутного чейза наблюдалось уменьшение количества NP в ядре клеток без Ингавирин<sup>®</sup> (дорожка 2), что может свидетельствовать о начале экспорта NP из ядра в цитоплазму. В отличие от контрольных образцов в клетках, обработанных Ингавирином<sup>®</sup> в течение 5 мин, NP в ядре не обнаруживается (дорожка 3). Лишь в результате 30-минутного выдерживания клеток в немеченой среде в ядрах появляется NP.

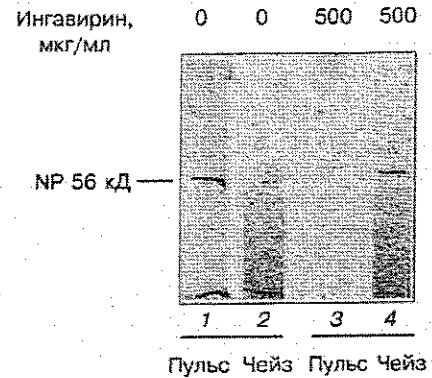


Рис. 3. Импорт NP в ядро и влияние Ингавирин<sup>®</sup> на этот процесс. Представлены результаты автордиографии зараженных меченых клеток после анализа в ПААГ.

Все образцы перед анализом в ПААГ были прогреты при 100 °С в течение 3 мин. Объяснения в тексте.

Полученные результаты демонстрируют замедление импорта вновь синтезированного NP в ядра зараженных клеток в присутствии Ингавирин<sup>®</sup>.

Таким образом, выполненные эксперименты показали, что одним из механизмов антивирусного действия Ингавирин<sup>®</sup> является его влияние на процесс формирования в зараженных вирусом гриппа клетках компактных NP-олигомеров и процесс миграции вирусного NP в ядро.

**Исследование связывания 3Н-Ингавирин<sup>®</sup> с клетками методом автордиографии.** На рис. 4 показано распределение 3Н-Ингавирин<sup>®</sup> в клетках (а) и ядрах зараженных клеток (б). Наблюдается тенденция преимущественного связывания 3Н-Ингавирин<sup>®</sup> с ядерными мембранами. Локализация меченного тритием Ингавирин<sup>®</sup> на ядерных мембранах может предполагать реализацию его антивирусного действия на этапе ядерной фазы, необходимой для репродукции вируса гриппа. Не выявлено заметных различий в локализации и количестве автографов в нормальных и зараженных вирусом гриппа клетках.

Таким образом, суммируя результаты экспериментов по исследованию механизмов антивирусного действия препарата Ингавирин<sup>®</sup>, можно сделать следующие заключения: одним из возможных механизмов антивирусного действия Ингавирин<sup>®</sup> является его влияние на конформационное созревание одного из основных полифункциональных белков вируса гриппа — NP. Проведенные эксперименты показали, что Ингавирин<sup>®</sup> нарушает процесс биоге-

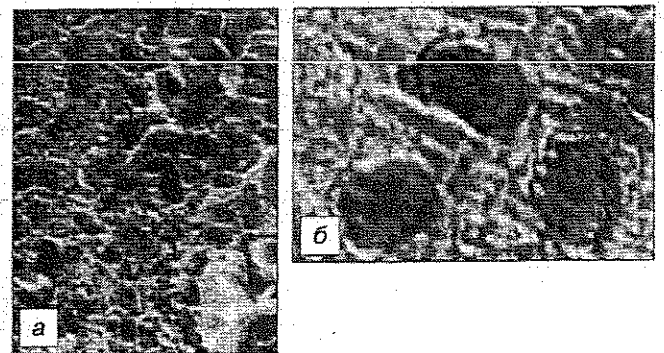


Рис. 4. Радиоавтографы клеток MDCK (а) и клеточных ядер (б) после контакта с 3Н-Ингавирином<sup>®</sup>.

неза NP вируса гриппа, завершающим этапом которого является образование конформационно зрелых компактных NP-олигомеров. Установлено также, что Ингавирин® задерживает миграцию вновь синтезированного NP из цитоплазмы в ядро, которая, как известно, является необходимым условием осуществления инфекционного процесса. Феномен миграции вирионных NP из цитоплазмы в ядра зараженных клеток описан ранее [3, 5]. В последнее время были выполнены исследования ядерной миграции нативных полимерных форм NP и показана зависимость этого процесса от конформационного статуса NP вируса гриппа. Согласно этим данным, в ядро импортируются конформационно зрелые компактные NP-олигомеры [1, 12]. Выявление ассоциации меченного тритием Ингавирина® с ядерными мембранами позволяет предположить, что возможная антивирусная активность Ингавирина® реализуется на этапе ядерной фазы, необходимой для репродукции вируса гриппа.

Проведенные исследования молекулярных механизмов антивирусной активности препарата Ингавирин® не только имеют значение для характеристики данного препарата, но и открывают новые подходы для выявления потенциальных мишеней для противовирусных препаратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Семенова Н. П., Чумаков В. М., Григорьева Т. А., Прокудина Е. Н. Зависимость ядерного импорта полимеров нуклеопротеина вируса гриппа от их конформационного статуса // *Вопр. вирусол.* — 2008 — Т. 53, № 6. С. 21–24.
2. Avalos R. T., Yu Z., Nayak D. P. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells // *J. Virol.* — 1997. — Vol. 71. — P. 2947–2958.
3. Briedis D. J., Conti G., Munn E. A., Mahy B. W. Migration of influenza virus-specific polypeptides from cytoplasm to nucleus of infected cell // *Virology.* — 1981. — Vol. 111. — P. 154–164.
4. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
5. Neumann G., Castrucci M. R., Kawakita Y. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein // *J. Virol.* — 1997. — Vol. 71. — P. 9690–9700.
6. Portea A., Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication // *J. Gen. Virol.* — 2002. — Vol. 83. — P. 723–734.
7. Prokudina E. N., Semenova N. P., Chumakov V. M., Rudneva I. A. Transient disulfide bonds formation in conformational maturation of influenza virus NP // *Virus Res.* — 2004. — Vol. 99. — P. 169–175.
8. Prokudina E. N., Semenova N. P., Chumakov V. M. Stability of intracellular influenza virus nucleocapsid protein oligomers // *Arch. Virol.* — 2005. — Vol. 150. — P. 833–839.
9. Prokudina E. N., Semenova N. P., Chumakov V. M., Grigorieva T. A. Non-compact nucleocapsid protein multimers in influenza virus-infected cells // *Arch. Virol.* — 2007. — Vol. 152. — P. 981–988.
10. Prokudina-Kantorovich E. N., Semenova N. P. Intracellular oligomerization of influenza virus nucleoprotein // *Virology.* — 1996. — Vol. 223. — P. 51–56.
11. Ruigrok W. H., Baudin F. Structure of influenza virus RNP particles. Purified RNA-free influenza virus RNP forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus RNP particles // *J. Gen. Virol.* — 1995. — Vol. 76. — P. 1009–1014.
12. Sugawara K., Muraki Y., Takashita E. et al. Conformational maturation of the nucleoprotein synthesized in influenza C virus-infected cells // *Virus Res.* — 2006. — Vol. 122. — P. 45–52.
13. Ye Q., Krug R. M., Tao Y. J. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA // *Nature.* — 2006. — Vol. 444. — P. 1078–1082.

Получила 17.12.09

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2010  
УДК 578.828.6:578.11.083.2

И. Э. Гафарова<sup>1</sup>, Г. И. Турбина<sup>2</sup>, М. М. Гараев<sup>1</sup>

## Полиморфизм гена интегразы в популяциях ВИЧ-1 субтипа А, циркулирующих на территории Российской Федерации

<sup>1</sup>ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва; <sup>2</sup>ГУЗ Липецкий областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями

Представлены данные изучения генетического полиморфизма гена *pol*, кодирующего вирусную интегразу (ИН), популяции ВИЧ-1 субтипа А, циркулирующей на территории Липецкой области. В работе исследовали 32 образца вируса субтипа А, полученных за период 2002–2007 гг. Полиморфизм в кодонах, связанных с формированием устойчивости ИН к химиопрепаратам, наблюдали у 7 вариантов вируса. У 6 пациентов исследуемой популяции обнаруженные замены имеют характер генетического полиморфизма и не связаны с устойчивостью. При этом только у 1 (3,1%) варианта вируса выявлена минорная мутация устойчивости к RAL, в то время как аналогичные мутации в популяции субтипа G составляют около 10%.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ВИЧ-инфекция, интеграса, субтип А, субтип G, Raltegravir, Elvitegravir

### Investigation of genetic polymorphism of the integrase gene in the HIV-1 subtype A populations circulating in the Russian Federation

I. E. Gafarova, G. I. Turbina, M. M. Garaev

<sup>1</sup>D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow; <sup>2</sup>Lipetsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases

The paper presents the data of an investigation of the genetic polymorphism of the *pol* gene encoding viral integrase (IN) in a HIV subtype A infected population in the Lipetsk Region. The investigators analyzed 32 virus subtype A samples obtained in 2002–2007. Polymorphism at the codons associated with IN resistance to chemicals was observed in

Контактная информация:

Гафарова Ирина Эриковна, ст. науч. сотр.; e-mail: irisha81m@mail.ru.