



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

5

2010

ISSN 0507-4088
9 770507 408005



издательство
"МЕДИЦИНА"

Н. П. Семенова¹, Е. Н. Прокудина¹, Д. К. Львов¹, В. Е. Небольсин²

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

¹ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН; ²ОАО "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. Semenova¹, E. N. Prokudina¹, D. K. Lvov¹, V. E. Nebolsin²

¹D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences; ²ОАО 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-

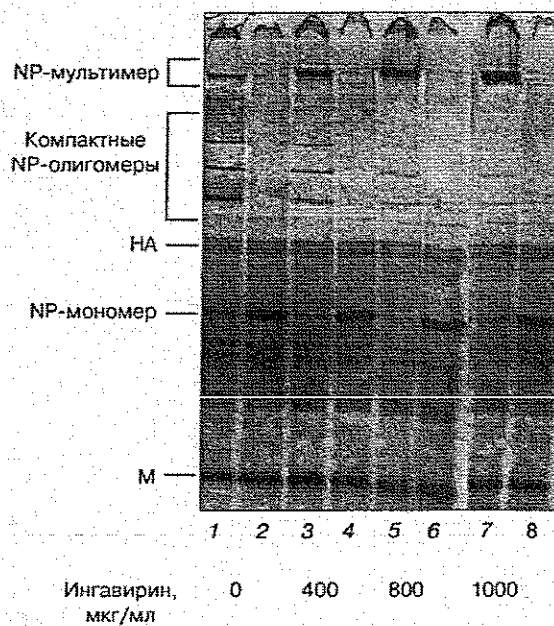


Рис. 1. Влияние увеличивающихся концентраций Ингавирина® на конформационное созревание NP вируса гриппа. Представлены результаты авторадиографии зараженных меченых клеток после анализа в ПААГ. Объяснение в тексте

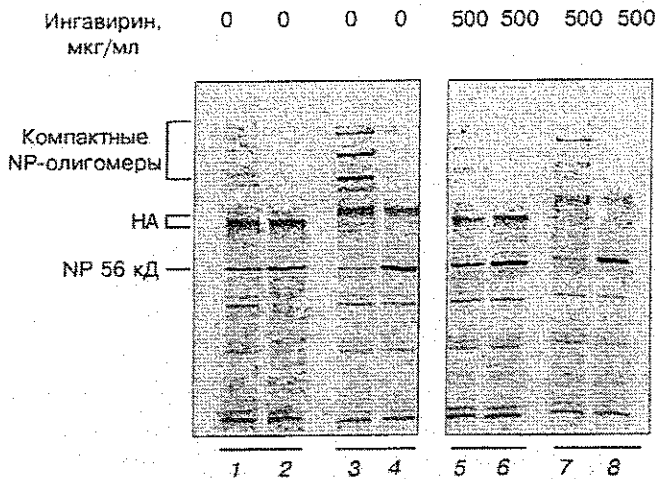


Рис. 2. Влияние Ингавирин[®] на внутриклеточную трансформацию NP в клетках MDCK, зараженных вирусом гриппа.

Представлены результаты автордиографии зараженных меченых клеток после анализа в ПААГ. Дорожки 1, 3, 5, 7 — образцы, не прогретые перед анализом в ПААГ; дорожки 2, 4, 6, 8 — образцы, прогретые 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[®] 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[®] 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[®] 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[®], происходило эффективное формирование компактных олигомеров (дорожка 3). В то же время в аналогичных образцах, обработанных Ингавирином[®] (дорожка 7), наблюдалось заметное снижение образования компактных NP-олигомеров.

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

Влияние Ингавирин[®] 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[®] 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[®] (дорожка 2), что может свидетельствовать о начале экспорта NP из ядра в цитоплазму. В отличие от контрольных образцов в клетках, обработанных Ингавирином[®] 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.

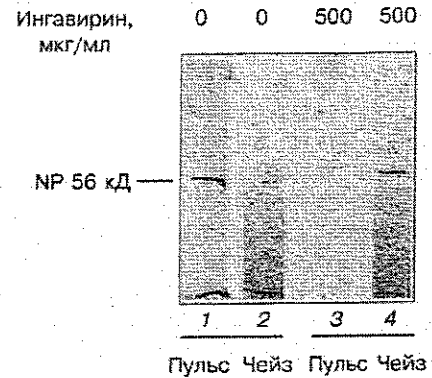


Рис. 3. Импорт NP в ядро и влияние Ингавирин[®] на этот процесс. Представлены результаты автордиографии зараженных меченых клеток после анализа в ПААГ.

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[®].

Таким образом, выполненные эксперименты показали, что одним из механизмов антивирусного действия Ингавирин[®] 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[®] с клетками методом автордиографии. На рис. 4 показано распределение 3Н-Ингавирин[®] в клетках (а) и ядрах зараженных клеток (б). Наблюдается тенденция преимущественного связывания 3Н-Ингавирин[®] с ядерными мембранами. Локализация меченного тритием Ингавирин[®] 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[®], можно сделать следующие заключения: одним из возможных механизмов антивирусного действия Ингавирин[®] является его влияние на конформационное созревание одного из основных полифункциональных белков вируса гриппа — NP. Проведенные эксперименты показали, что Ингавирин[®] нарушает процесс биоге-

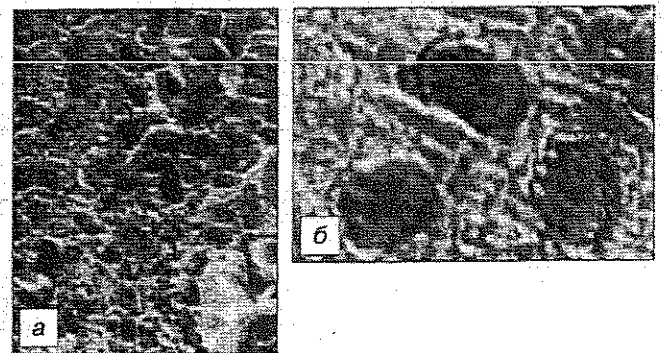


Рис. 4. Радиоавтографы клеток MDCK (а) и клеточных ядер (б) после контакта с 3Н-Ингавирином[®].

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. Portela 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. Гафарова¹, Г. И. Турбина², М. М. Гараев¹

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

¹ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва; ²ГУЗ 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

¹D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow; ²Lipetsk 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.