



УДК 578.825:578.826:578.22:578.27

Л. О. Білявська, О. Ю. Повниця, С. Д. Загородня,
Н. В. Нестерова, Ю. Б. Шамара, К. С. Науменко

Синтез мажорних вірусних білків за умов змішаного інфікування клітин MDBK

(Представлено академіком НАН України В. С. Підгорським)

Створено модель адено-герпетичної інфекції клітин MDBK та досліджено рівень синтезу мажорних білків адено- та герпесвірусів за умов змішаного інфікування. Показано, що одночасне інфікування клітин двома вірусами призводить до значного інгібування репродукції вірусу герпесу, внаслідок пригнічення синтезу основного капсидного білка вірусу, та менш вираженого інгібування репродукції аденовірусу.

Ключові слова: змішана інфекція, аденовіруси, герпесвіруси, проточна цитометрія, мажорні білки вірусів.

Ураження клітини чи популяції клітин кількома вірусами різних генотипів чи видів може призводити до змін репродукції вірусів-асоціантів. Експериментальні та клінічні дослідження показали різноманітні механізми, форми і наслідки взаємодії різних вірусів у культурі тканин та на рівні організму: одночасна інфекція може призводити до підвищення патогенезу, зміни тропізму, передачі вірусів або навіть бути необхідною умовою інфекційного процесу коінфікуючих вірусів [1]. В інших випадках вона може бути не вигідною для окремих вірусів, внаслідок зростання конкуренції за доступні ресурси в клітині. Тому дослідження взаємовідносин між вірусами на клітинному рівні залишається на сьогодні одним із актуальних та важливих питань. Особливе місце в розвитку змішаних інфекцій займають віруси, що здатні тривалий час зберігатися в латентному стані в організмі, до таких вірусів належать ДНК-вмісні адено- та герпесвіруси. Розуміння взаємодії вірусів між собою за умови змішаного інфікування важливе для розробки нових та більш ефективних шляхів боротьби з цими вірусними інфекціями. Рівень синтезу структурних компонентів віріону — білків є одним із ключових моментів репродукції вірусу, адже недостатня кількість компонентів гальмує процес вірусного морфогенезу та утворення нового покоління інфекційних вірусних часток. Ми ставили за мету дослідження синтезу деяких білків адено- та герпесвірусів за умов змішаного інфікування популяції клітин.

© Л. О. Білявська, О. Ю. Повниця, С. Д. Загородня, Н. В. Нестерова, Ю. Б. Шамара, К. С. Науменко, 2015

Матеріали і методи. *Об'єкти досліджень.* Для моделювання змішаної інфекції використано культуру епітеліальних клітин MDBK — нирки телят, аденовірус людини 5-го серотипу (HAdV-5) та вірус простого герпесу 1-го типу (HSV-1/US). Клітини та віруси культивували відповідно до стандартних методик [2, 3]. Використовували схему одночасного (коінфекція) інфікування клітин MDBK обома вірусами, з множинністю інфікування 6 ВУО/кл (включення утворюючих одиниць на клітину) для HAdV-5 і 0,02 ВУО/кл (бляшкоутворюючих одиниць на клітину) для HSV-1/US [4]. Особливості репродукції вірусів за умови змішаного інфікування досліджували через 48 год після зараження.

Цитоморфологічні дослідження. Інтенсивність репродукції вірусів у клітинах та інфекційний титр вірусів визначали за відсотком інфікованих клітин [5], використовуючи 0,01% барвник акридиновий оранжевий ("Sigma", США).

Імунофлуоресцентний аналіз (МФА). Для виявлення вірусу герпесу коінфіковані клітини обробляли імуноглобулінами миші проти HSV-1, кон'югованими з FITC (НДІ грипу, РАМН). Ідентифікацію аденовірусу проводили, використовуючи імуноглобуліни кроля проти гексона аденовірусу та антисироватку до глобулінів кроля, мічену FITC ("ThermoScientific", США) [6, 7]. Зразки досліджували в люмінесцентному мікроскопі МЛ-2 ("ЛОМО", Росія) при збільшенні $\times 400$.

Клітинний імуноферментний аналіз (ІФА). З планшета, що містить клітини, коінфіковані HAdV-5 і HSV-1/US, через 24–48 год інкубації видаляли культуральну рідину, проводили фіксацію клітин 96% етанолом протягом 10 хв, 70% етанолом протягом 60 хв та 6N HCl протягом 30 хв. Постановку ІФА здійснювали за загальноприйнятою методикою [8]. Результати аналізували спектрофотометрично на рідері "Multiskan FC" ("ThermoScientific", США) при довжині хвилі 492 нм.

Метод проточної цитометрії. Для дослідження білків вірусів використовували моноспецифічні антитіла до гексона аденовірусу, отримані за стандартною методикою Келлера, та кролячі моноспецифічні антитіла до основного білка капсиду вірусу простого герпесу 1 типу (VP5) ("Abcam", Великобританія). Як антитіла також використовували мічений FITC білок А та мічені FITC антикролячі імуноглобуліни ("Sigma", США). Суспензію клітин ($2 \cdot 10^6$ клітин) обробляли 1%-м розчином Triton X-100 на фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) (pH 7,2) та вносили розчин відповідних антитіл у ФСБ з 1% бичачим сироватковим альбуміном (БСА) та 0,1% Triton X-100. Клітини відмивали та додавали розчин мічених антитіл (білка А чи антитіл до імуноглобулінів кроля) у ФСБ з 1% БСА та 0,1% Triton X-100. Для аналізу зразків використовували проточний цитометр (BeckmanCoulterEpicsLX, США) з лазером при довжині хвилі 530 нм та відповідним фільтром/детектором [9, 10]. Обробку результатів проводили з використанням програми "FlowingSoftware", version 2.5 (США).

Електрофоретичне розділення білків та імуноблотинг. Розділення білків вірусів виконували за Laemmli [11] в 10% SDS-поліакриламідному гелі. Постановку імуноблотингу проводили за модифікованою методикою [12]. Перенесення білків на нітроцелюлозну мембрану здійснювали протягом 1 год при 600 В, 100 мА, використовуючи напісху електрофоретичну блот-систему Semi-Dry ("Sigma", США). Мембрану протягом ночі інкубували з антитілами кроля до вірусних білків, тричі відмивали ТФС-Т (забуферений Tris-HCl з 0,1% Tween 20) та інкубували при 20 °C протягом 2 год з антикролячими антитілами, міченими пероксидазою. Після промивання нітроцелюлозну мембрану інкубували з хромогеном діамінобензидином (DABS, "Sigma", США). Обробку результатів проводили з використанням програми "ImageJ" (США).

Статистичну обробку даних виконували згідно зі стандартними підходами до обчислення статистичних помилок (стандартне відхилення), використовуючи комп'ютерну програму Microsoft Excel 2010.

Результати та їх обговорення. У нашій лабораторії було розроблено та досліджено модель змішаної адено-герпетичної інфекції клітин MDBK: оптимізовано умови і параметри інфікування клітин HAdV-5 та HSV-1/US, охарактеризовано вплив вірусів на структурно-функціональний стан клітин [4]. Для дослідження особливостей взаємодії між аденовірусом та вірусом герпесу за умов змішаного інфікування клітин MDBK та вивчення повноцінності утвореного вірусу було проведено визначення титрів вірусів, отриманих *de novo* через 48 год після інфікування клітин [13]. При інфікуванні клітин MDBK титр HAdV-5 становив $3,5 \cdot 10^7$ ВУО/мл, а титр HSV-1/US — $3 \cdot 10^5$ ВУО/мл, тоді як при коінфікуванні клітин титри інфекційності вірусів становили $8,5 \cdot 10^4$ та $6,8 \cdot 10^3$ ВУО/мл відповідно. Таким чином, показано взаємне інгібування утворення повноцінного потомства обох вірусів, інфекційні титри HAdV-5 та HSV-1/US знижувалися відповідно на 3 та 2 порядки порівняно з моноінфекціями. Інгібування може бути пов'язане з пригніченням синтезу структурних компонентів віріонів, що беруть участь у дозріванні вірусного капсиду та упаковці геному вірусу, формуванні вірусної частки. У аденовірусу одним із таких компонентів є мажорний білок гексон, який складає близько 60% маси аденовіріону, а для вірусу герпесу — основний білок капсиду (VP5), що формує ікосаедричні вершини капсидної оболонки.

Рівень синтезу вірусних білків у коінфікованих клітинах MDBK оцінювали за допомогою МФА та ІФА, проточної цитометрії, імуноблотингу.

МФА показав, що в ядрах інфікованих та коінфікованих клітин (рис. 1, б, з) гексон накопичувався у великій кількості через 46–48 год і розподілявся у вигляді дискретно розміщених гранул, суцільного зернистого свічення, розетки чи кільця поблизу ядерної мембрани. На пізніх стадіях репродукції аденовірусу ядерні мембрани руйнувалися навколо такого роду уражених клітин, скупчення пізнього білка виявлялися у вигляді великих пилинок. Відомо, що особливістю HAdV-5 є утворення в ядрах клітин на пізніх стадіях інфекції продовгуватих кристалів, які не містять нуклеїнової кислоти, складаються з білка гексона, який синтезується в значному надлишку та знаходиться в зоні навколо центроядерного включення [13]. Однак нами було показано, що за умов змішаного інфікування клітин (див. рис. 1, з), кількість гексона була нижчою, ніж при аденовірусній інфекції (див. рис. 1, б).

Структурні білки вірусу герпесу в популяції коінфікованих клітин MDBK виявлялися у вигляді дифузного свічення перинуклеарної зони цитоплазми (див. рис. 1, в, д). Через 6 год після інфікування спостерігали яскраве дифузне свічення всієї цитоплазми, вірусні білки детектували в ядрах клітин. Через 15–18 год інтенсивність ядерної флуоресценції коінфікованих клітин значно збільшувалася (див. рис. 1, д), хоча порівняно з моноінфекцією (див. рис. 1, в) вона була набагато слабшою, що вказує на пригнічення репродукції вірусу.

Методом ІФА через 24 год після зараження було виявлено зниження рівня синтезу антигену гексона аденовірусу на 49%, капсидного білка вірусу простого герпесу — на 13%. Через 48 год вірусної коінфекції встановлено 56% інгібування експресії білка VP5 HSV-1/US та 30% стимулювання експресії антигену гексона аденовірусу (рис. 2). Стимулювання експресії гексона, можливо, пов'язано з особливістю репродукції аденовірусу, а саме синтезом капсидних білків, особливо структурного білка гексона, в значному надлишку. Лише невелика кількість його включається до складу новоутвореної вірусної частинки, а більша його частина залишається у вигляді так званого розчинного гексона.

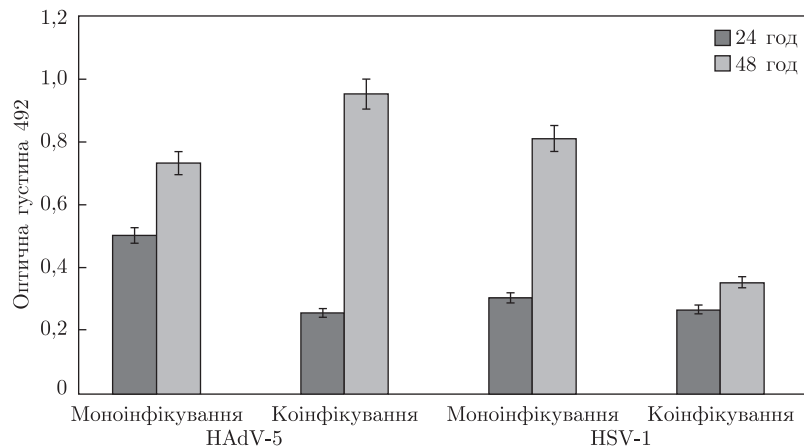


Рис. 2. Рівень капсидного білка гексона HAdV-5 та основного капсидного білка HSV-1/US в умовах моно- та змішаної інфекції клітин MDBK

Метод проточної цитометрії успішно впроваджений рядом дослідників для характеристики систем клітина–вірус [10], оскільки використання антитіл з флуоресціюючими мітками дає можливість кількісно визначати поверхневі та внутрішньоклітинні вірусні антигени, а також досліджувати мембранні рецептори та активність ферментів усередині клітини. При обробці результатів проточної цитометрії отримано гістограми, в яких відображено особливості синтезу білків вірусів у коінфікованих клітинах MDBK (рис. 3).

У разі обробки клітин антитілами кроля до гексона HAdV-5 на гістограмі виявлено два піки, які розміщені в зонах Н-1 та Н-2 (рис. 3, а). Саме зона Н-2 це інфіковані клітини з адсорбованими антитілами, їх кількість становила 72%. Суміщення отриманих гістограм неінфікованих та інфікованих клітин MDBK дало можливість охарактеризувати особливості синтезу гексона аденовірусу (див. рис. 3, а). У разі змішаного інфікування клітин на гістограмі спостерігали зменшення піка, який відповідає інфікованим аденовірусом клітинам (зона Н-2), та збільшення піка в зоні неінфікованих клітин (Н-1) (див. рис. 3, а). Синтез білка гексона пригнічувався на 17%. Аналіз гістограм інфікованих HSV-1/US клітин MDBK з моноспецифічними антитілами до VP5 показав значний зсув піка вправо, порівняно з гістограмою неінфікованих клітин (див. рис. 3, б). Кількість мічених клітин становила 94%, що свідчить про інтенсивність репродукції вірусу герпесу та високий рівень накопичення раннього капсидного білка (див. рис. 3, б). Однак за умов змішаної одночасної адено-герпетичної інфекції клітин MDBK спостерігалось значне пригнічення експресії білка VP5, що добре видно при суміщенні отриманих гістограм (див. рис. 3, б). Рівень пригнічення експресії вірусного антигену був істотним та становив 83%. Отже, за умов змішаної адено-герпетичної інфекції клітин MDBK виявлено значне пригнічення експресії капсидного білка вірусу герпесу.

Дослідження білків вірусів з використанням імуноблотингу показало наявність основного білка капсиду вірусу у разі інфікування HVS-1/US клітин MDBK (рис. 4, а, 1), тоді як за умов змішаного інфікування даний білок взагалі не виявлявся (див. рис. 4, а, 3). При аденовірусній інфекції клітин MDBK встановлено інтенсивний синтез гексона та накопичення його у великій кількості, площа піка на діаграмі становила 48% (див. рис. 4, б, 1). За умови змішаного адено-герпетичного інфікування кількість клітин з гексоном зменшувалася до 26%, що свідчить про 46% інгібування синтезу білка (див. рис. 4, б, 3).

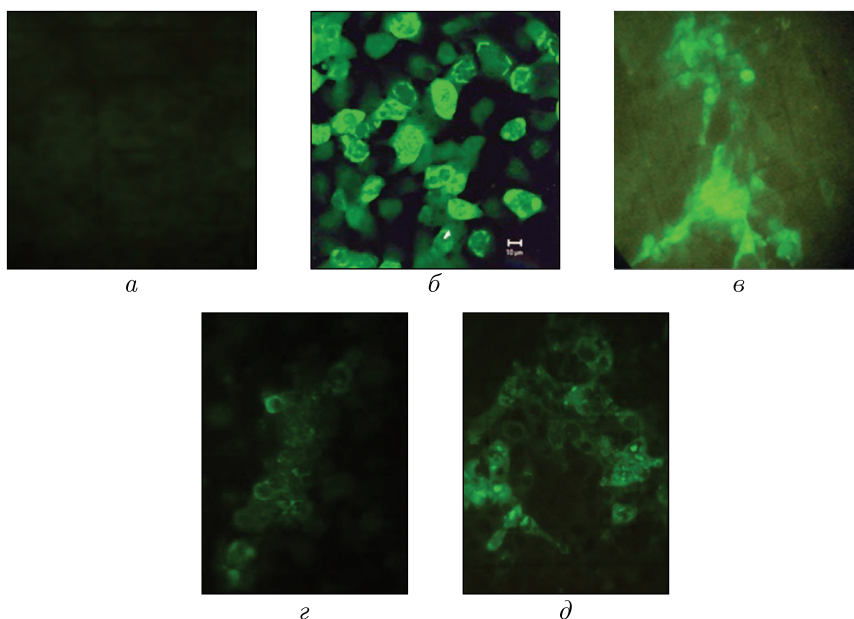


Рис. 1. Імунофлуоресцентний аналіз клітин MDBK: *a* — неінфіковані клітини (негативний контроль); *б* — інфіковані аденовірусом клітини з імуноглобулінами кроля проти гексона аденовірусу та антисироваткою до імуноглобулінів, міченою FITC (позитивний контроль); *в* — клітини, інфіковані HSV-1/US з антитілами миші проти HSV-1, міченими FITC (позитивний контроль); *г* — клітини, коінфіковані HAdV-5 та HSV-1/US з сироваткою кроля проти гексона аденовірусу та сироваткою до імуноглобулінів кроля, міченою FITC; *д* — клітини, коінфіковані HAdV-5 та HSV-1/US з антитілами миші проти HSV-1, міченими FITC. МФА, $\times 400$

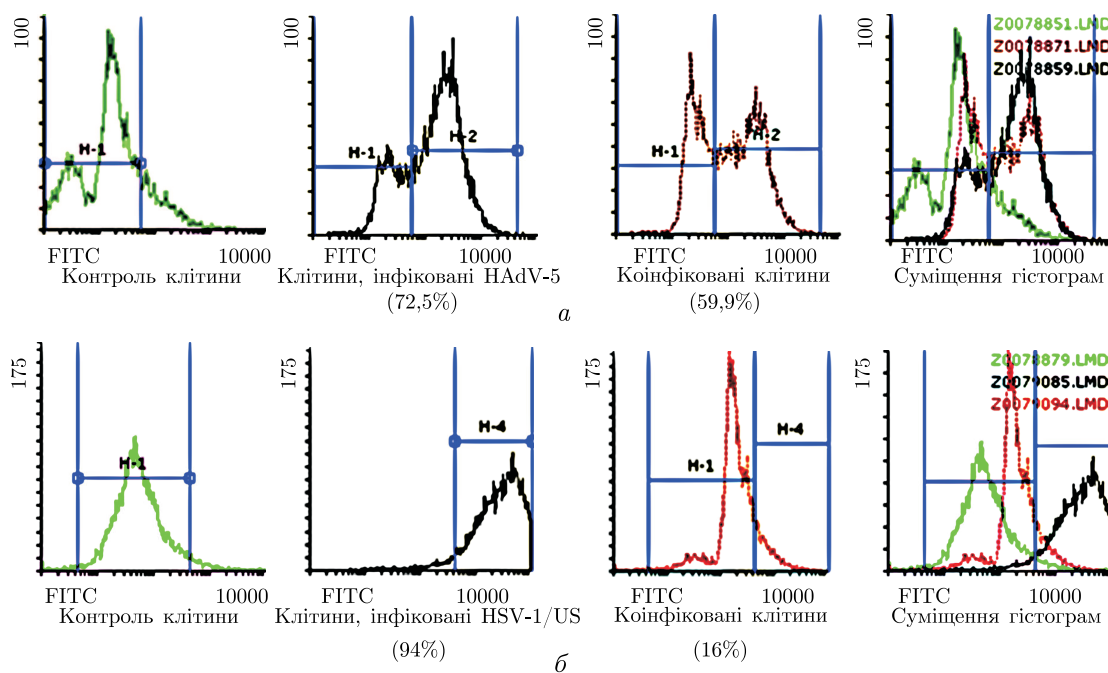


Рис. 3. Порівняльний аналіз синтезу гексона HAdV-5 (*a*) та основного білка капсиду HSV-1/US (*б*) в клітинах MDBK за умови моно- та змішаної інфекції

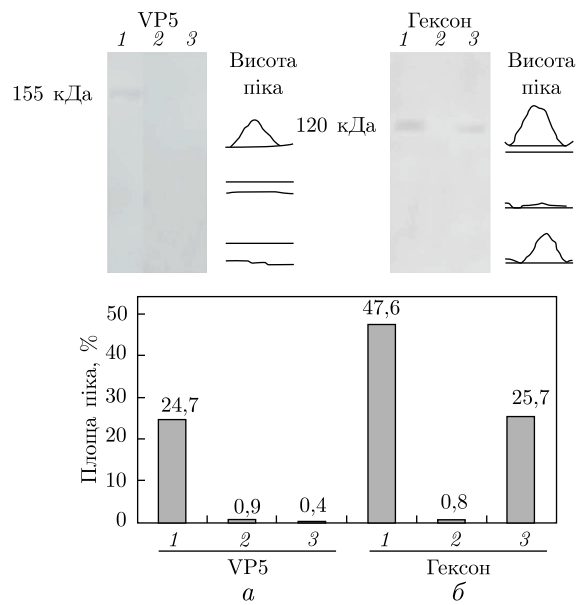


Рис. 4. Імуноблотинг білків вірусів, синтезованих у клітинах MDBK при їх моно- і змішаному інфікуванні HSV-1/US та HAdV-5. *а* — з імуноглобулінами кроля до основного капсидного білка HSV-1/US; *б* — з імуноглобулінами кроля до гексона аденовірусу. Треки: 1 — клітини, інфіковані HSV-1/US чи HAdV-5; 2 — неінфіковані клітини; 3 — коінфіковані клітини

Відомо, що одним із механізмів взаємного пригнічення процесу утворення білків може бути інгібування трансляції мРНК в інфікованій клітині. Наприклад, суперінфікування HSV-1 клітинної лінії ембріонів щурів, трансформованих HAdV-5, змінює метаболізм РНК HAdV, призводячи до інгібування накопичення специфічних аденовірусних роу(А) мРНК у цитоплазмі. Синтез білка інгібується більше ніж на 50% через 7 год після зараження [14]. Віруси родин адено-, пікорна-, ортоміксо-, параміксовірусів можуть призводити до інтерференції реплікації вірусу простого герпесу, що закінчується абортивною інфекцією, крім того, показано, що цей процес ефективно відбувається в клітинах, трансформованих SV40, HAdV, EBV, HSV-2 і респіраторно-сенцитальним вірусом (RSV) [15]. По-перше, абортивна інфекція може виникати внаслідок пригнічення експресії вірусних генів, що призводить до скорочення продукції деяких вірусних ферментів (тимідинкінази) та вірусної ДНК, що закінчується низьким виходом інфекційного вірусу. По-друге, обмежена продукція потомства вірусу може бути викликана блокуванням послідовних подій реплікації вірусу. Такий збій вірусної системи управління відбувається в результаті неефективного синтезу компонентів віріону [15].

Таким чином, використовуючи різні методи білкового аналізу, досліджено рівень експресії мажорних білків вірусів за умови коінфікування клітин MDBK адено- та герпесвірусом. Виявлено, взаємне пригнічення експресії вірусних білків, показано значне інгібування трансляції основного капсидного білка вірусу герпесу та менш виражене інгібування синтезу гексона аденовірусу, що свідчить про взаємодію досліджуваних вірусів за типом інтерференції.

Цитована література

1. *Da Palma T., Doonan B. P., Trager N. N., Kasman L. M.* A systematic approach to virus-virus interactions // *Virus Research*. – 2010. – **149**, No 1. – P. 1–9.
2. *Leland D. S., Ginocchio C. C.* Role of cell culture for virus detection in the age of technology // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – **20**, No 1. – P. 49–78.
3. *Precious B., Russell W. C.* Growth purification and titration of adenoviruses // *Virology: a Practical Approach*. – Oxford: IRL Press, 1985. – P. 193–205.
4. *Белявская Л. А., Повница О. Ю., Загородняя С. Д., Войчук С. И., Зеленая Л. Б., Шамара Ю. Б., Нестерова Н. В.* Моделирование смешанной адено-герпетической инфекции клеток MDBK, ее характеристика и особенности антивирусного действия веществ // *Молодой ученый*. – 2014. – № 17. – С. 117–125.
5. *Носач Л. Н., Повница О. Ю.* Доклиническое исследование специфического антивирусного действия лекарственных средств в культуре клеток на модели аденовируса. Методические рекомендации // *Вестн. фармакологии и фармации*. – 2007. – № 9. – С. 52–64.
6. *Bordin P., Merlin U., Pugina P., Benzi G., Sichirollo R.* Reliability of the herpes simplex virus immunofluorescent test in corneal disease // *Eur. J. Ophthalmol.* – 1992. – **2**, No 4. – P. 175–178.
7. *Gardner P. S., Mc Guckin R., Mc Quillin J.* Adenovirus demonstrated by immunofluorescence // *Br. Med. J.* – 1972. – No 3. – P. 175.
8. *Lequin R.* Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) // *Clin. Chem.* – 2005. – **51**. – P. 2415–2418.
9. *Wold W. S. M., Tollefson A. E.* Adenovirus. Methods and Protocols. – Totowa, NJ: Humana Press, 2007. – P. 205–213.
10. *Loret S., El Bilali N., Lippé R.* Analysis of herpes simplex virus type I nuclear particles by flow cytometry // *Cytometry*. – 2012. – **81**. – P. 950–959.
11. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – **227**. – P. 680–685.
12. *Mathews S. T., Plaisance E. P., Kim T.* Imaging systems for Westerns: Chemiluminescence vs. infrared detection. – Totowa, NJ: Humana Press, 2009. – P. 499–513. – (Methods in Molecular Biology: protein blotting and detection; Vol. 536).

13. *Носач Л. Н., Дяченко Н. С.* Цитопатология аденовирусной инфекции. – Киев: Наук. думка, 1982. – 124 с.
14. *Spector D., Pizer L.* Herpes virus infection modifies adenovirus RNA metabolism in adenovirus type 5-transformed cells // *J. Virol.* – 1978. – **27**, No 1. – P. 1–12.
15. *Tucker A. G., Docherty J. J.* Adenovirus-transformed cells restrict Herpes simplex virus replication // *Infect. Immun.* – 1975. – **11**, No 3. – P. 556–562.

References

1. *Da Palma T., Doonan B. P., Trager N. N., Kasman L. M.* *Virus Research*, 2010, **149**, No 1: 1–9.
2. *Leland D. S., Ginocchio C. C.* *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007, **20**, No 1: 49–78.
3. *Precious B., Russell W. C.* Growth purification and titration of adenoviruses, *Virology: a Practical Approach*, Oxford: IRL Press, 1985.
4. *Biliavska L. O., Povnitsa O. Y., Zagorodnya S. D., Voychuk S. I., Zelenaiia L. B., Shamara Y. B., Nesterova N. V.* *Molodoi uchenyi*, 2014, No 17: 117–125 (in Russian).
5. *Nosach L. N., Povnitsa O. Y.* *Vistnuk farmakologii i farmacii*, 2007, No 9: 52–64 (in Russian).
6. *Bordin P., Merlin U., Pugina P., Benzi G., Sichiorollo R.* *Eur. J. Ophthalmol.*, 1992, **2**, No 4: 175–178.
7. *Gardner P. S., Mc Guckin R., Mc Quillin J.* *Br. Med. J.*, 1972, No 3: 175.
8. *Lequin R.* *Clin. Chem.*, 2005, **51**: 2415–2418.
9. *Wold W. S. M., Tollefson A.* *Adenovirus. Methods and Protocols*, Totowa, NJ: Humana Press, 2007.
10. *Loret S., El Bilali N., Lippé R.* *Cytometry*, 2012, **81**: 950–959.
11. *Laemmli U. K.* *Nature*, 1970, **227**: 680–685.
12. *Mathews S. T., Plaisance E. P., Kim T.* *Imaging systems for Westerns: Chemiluminescence vs. infrared detection*, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 536, Totowa, NJ: Humana Press, 2009.
13. *Nosach L. N., Dyachenko N. S.* *Cytopathology of adenovirus infection*, Kiev: Naukova dumka, 1982 (in Russian).
14. *Spector D., Pizer L.* *J. Virol.*, 1978, **27**, No 1: 1–12.
15. *Tucker A. G., Docherty J. J.* *Infect. Immun.*, 1975, **11**, No 3: 556–562.

*Інститут мікробіології і вірусології
і.м. Д.К. Заболотного НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 13.03.2015

**Л. А. Белявская, О. Ю. Повница, С. Д. Загородняя, Н. В. Нестерова,
Ю. Б. Шамара, К. С. Науменко**

Синтез мажорных белков вирусов в условиях смешанного инфицирования клеток MDBK

Інститут мікробіології і вірусології і.м. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

Создана модель смешанной адено-герпетической инфекции клеток MDBK и исследован уровень синтеза мажорных белков адено- и герпесвирусов в условиях смешанного инфицирования. Показано, что одновременное инфицирование клеток двумя вирусами приводит к значительному угнетению репродукции вируса герпеса, вследствие угнетения экспрессии основного капсидного белка вируса, и менее выраженному угнетению репродукции аденовируса.

Ключевые слова: смешанная инфекция, аденовирусы, герпесвирусы, проточная цитометрия, мажорные белки вирусов.

L. O. Biliavska, O. Y. Povnitsa, S. D. Zagorodnya, N. V. Nesterova,
Y. B. Shamara, K. S. Naumenko

Synthesis of the major viral proteins under conditions of the mixed infection of cells MDBK

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev

A model of mixed adeno-herpetic infection of MDBK cells is created. The levels of the synthesis of the major proteins of adenoviruses and herpes viruses under conditions of the mixed infection are studied. Simultaneous infection of cells with two viruses resulted in a significant inhibition of the reproduction of the herpes virus and a less pronounced inhibition of the adenovirus reproduction.

Keywords: mixed infection, adenovirus, herpes virus, flow cytometry, major proteins.