

УДК 577.21; 578.821

Роль гликозилирования белка E2 вируса гепатита С в функционировании белков оболочки вируса в клетках насекомых и млекопитающих

О. В. Орлова¹, В. Л. Друца², П. В. Спири¹, А. В. Иванов¹, В. С. Прасолов¹, П. М. Рубцов¹, С. Н. Кочетков¹, С. Н. Белжеларская^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: belj@eimb.ru

Поступила в редакцию 15.09.2014

РЕФЕРАТ Белки оболочки вируса гепатита С (ВГС) E1 и E2, являясь компонентами вириона, участвуют в формировании инфекционных частиц вируса в зараженной клетке. Детальное строение частицы ВГС остается малоизученным, причем наименее изучен процесс сборки вирионов и их выход из клетки. Предполагается, что свойства вириона зависят от гликозилирования белковой оболочки вируса в клетке, а гликаны в некоторых сайтах гликозилирования этих белков важны для их функционирования и прохождения жизненного цикла ВГС. N-гликаны гликопротеинов могут влиять на формирование вирусных частиц, связывание вируса с клеткой и патогенез гепатита С. Мы изучили влияние гликанов на сворачивание гликопротеина E2, образование функциональных гликопротеиновых комплексов и формирование вирусных частиц в клетках насекомых и млекопитающих. С этой целью в сайты N-гликозилирования E2 вируса гепатита С (генотип 1b штамм 274933RU) вводили точечные мутации и анализировали мутантные белки в бакуловиральной системе экспрессии. Удаление единичных сайтов гликозилирования гликопротеина E2, за исключением сайта N6, не сказывалось на эффективности его синтеза в клетках насекомых Sf9, а электрофоретическая подвижность мутантных белков возрастала пропорционально снижению числа сайтов гликозилирования. В отличие от клеток Sf9, уровень синтеза гликопротеина E2 ВГС в клетках Hek293T человека зависел от присутствия гликанов в сайтах гликозилирования N1 и N8. В то же время удаление гликанов в сайтах N1, N2 и N10 приводило к накоплению непродуктивных димеров E1E2 в виде агрегатов и подавлению продуктивной сборки вирусоподобных частиц как в клетках насекомых, так и в клетках млекопитающих. Удаление единичных сайтов гликозилирования E2 ВГС не влияло на синтез РНК структурных белков и образование вирусоподобных частиц в клетках насекомых и млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бакуловиральная система экспрессии, белки оболочки E1 и E2, вирус гепатита С, вирусоподобные частицы, N-гликозилирование белков, клетки насекомых Sf9, клетки млекопитающих Hek293T и Huh7.0, олигонуклеотид-направленный мутагенез.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БОЕ – бляшкообразующие единицы; ВГС – вирус гепатита С; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С – один из существенных патогенов человека, который вызывает тяжелые заболевания печени, включая цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Выбор средств, применяемых при инфекции ВГС, очень ограничен, а профилактической вакцины не существует. Высокая репликативная активность вируса вместе с отсутствием у вирусной РНК-полимеразы корректорской функции создают

условия для большой генетической изменчивости вируса.

Все это приводит к тому, что в сыворотке инфицированного человека ВГС циркулирует не как один вид, а как совокупность квазивидов, геномы которых различаются на 1–5%. Разные штаммы вируса гепатита С одного подтипа могут отличаться по нуклеотидной последовательности на 5–15%, подтипы на 10–30%, а отдельные генотипы на 30–50% [1].

Некоторые штаммы обладают повышенной вирулентностью, но конкретные молекулярные детерминанты, определяющие такой фенотип, еще не определены. Основной клеточной мишенью ВГС являются гепатоциты. Связывание вирусной частицы с клеткой все еще недостаточно изучено, известны не все рецепторы, в том числе специфичные для ВГС.

Связывание вирусной частицы с поверхностными рецепторами гепатоцитов и ее поглощение клетками определяются гликопротеинами оболочки вируса. Механизм сборки вирусных структурных белков и РНК в новые вирусные частицы, а также пути проникновения вируса в клетку по-прежнему недостаточно изучены [2]. ВГС – единственный представитель рода *Hepacivirus* – относится к семейству *Flaviviridae*. Его геном кодирует один полипротеин-предшественник. Под воздействием клеточных и вирусных протеаз образуются структурные и неструктурные белки вируса [3–5]. Капсидный белок С и белки оболочки Е1 и Е2 относятся к структурным белкам. Белки оболочки подвергаются посттрансляционной модификации – N-гликозилированию, при которой малоразветвленная олигосахаридная цепочка, состоящая из девяти остатков маннозы (Man) и трех остатков глюкозы (Glc), присоединяется к специфическим остаткам аспарагина в последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr (где X – любая аминокислота, кроме пролина) [6, 7]. Гликопротеины вирусной оболочки высоко гликозилированы. Степень консервативности сайтов гликозилирования 9–11 в Е2 и 4–5 в Е1 очень высока, что указывает на их важную роль в функционировании этих белков в жизненном цикле ВГС [8]. Следует отметить, что до сих пор не известно истинное число сайтов гликозилирования белков, какие именно сайты участвуют в модификации белка и все ли потенциальные сайты подвергаются гликозилированию *in vivo*.

Характер гликозилирования гликопротеина играет важную роль в его функции. Так, гликопротеин Е2 может быть рецепторсвязывающей субъединицей оболочки ВГС. Показано, что ряд гликанов Е2, в зависимости от штамма, может определять возможность проникновения вируса в клетку, создавая условия для взаимодействия гликопротеина Е2 с клеточными рецепторами. Определенные гликаны Е2 вовлечены в модуляцию иммунного ответа. Предполагается, что гликаны, связанные с вирусной оболочкой, влияют на укладку белков с участием шаперонов эндоплазматического ретикулума (ЭР) и продуктивную сборку вирусных частиц, способных проникать и инфицировать новую клетку. Присоединение олигосахарида к белку сопряжено с его фолдингом, при этом гликопротеин входит в кальнексин-кальретинуловый цикл, специфически взаимодействуя с шаперо-

нами ЭР, которые обеспечивают его частичное сворачивание. Связывание гликопротеинов с шаперонами и освобождение от них сопровождаются отщеплением («подстриганием») избыточных остатков глюкозы и маннозы и регликозилированием N-связанных гликанов.

Белок оболочки Е2 накапливается в люмене ЭР как в виде правильно свернутого гликопротеина, так и в виде агрегатов неправильно свернутых белков. Некоторое количество Е2 остается негликозилированным в цитозоле и после убиквитинирования удаляется через протеасомный путь. Известно, что белок кальнексин взаимодействует с нековалентно связанными комплексами Е1Е2, а кальретинулин – с агрегатами неправильно свернутых димеров Е1Е2 [9]. Комплексы первого типа обеспечивают связывание вируса с рецепторами клетки и проникновение вирусной частицы в клетку, влияют на формирование его антигенного состава и, возможно, играют определяющую роль в вирусном патогенезе [10]. Образование агрегатов неправильно свернутых гликопротеинов может приводить к появлению дефектных вирусных частиц, не способных, вероятно, к связыванию с новыми клетками [11–13]. Белки оболочки ВГС также могут влиять на сворачивание друг друга. Так, Е2 действует как шаперон при фолдинге Е1 и формировании функциональных гетеродимеров, но и белок Е1 также помогает продуктивной укладке Е2 [14, 15]. Процесс сборки вирионов ВГС недостаточно изучен из-за отсутствия приемлемых клеточных моделей, позволяющих получать инфекционные вирусные частицы. Роль гликанов в функционировании белков оболочки вируса различных генотипов в зараженной клетке также остается малоизученной.

В настоящей работе мы изучали влияние N-гликанов гликопротеина Е2 вируса гепатита С генотипа 1b (штамм 274933RU [16]) на синтез структурных белков, формирование вирусных частиц в клетках насекомых Sf9 и почки человека Нек293Т, трансфицированных бакуловирусными векторами, направляющими экспрессию генов структурных белков ВГС [17].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные клетки, клеточные культуры и плазмиды. Использовали клетки *Escherichia coli*, клетки *Spodoptera frugiperda* Sf9 и клетки млекопитающих Нек293Т и Нuh7.0. Клетки штаммов DH5a и DH10Bac *E. coli* (Gibco-BRL, США) трансформировали плазмидными ДНК согласно рекомендациям фирмы (Amersham, США). Выделение и очистку плазмид, расщепление рестриктазами, лигирование, электрофорез ДНК в агарозном геле и другие генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным протоколам [18].

Клетки насекомых Sf9 культивировали в среде Sf-900 II, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, при 27°C, используя основные технические приемы, разработанные ранее и описанные в инструкции [19]. Для определения титра вируса, амплификации рекомбинантного вируса, заражения клеток Sf9 рекомбинантным бакуловирусом и анализа экспрессии вирусных генов использовали ту же инструкцию.

Клетки эмбриональной почки человека (линия Нек293Т) культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4 mM L-глутамин, 1 mM пируват натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл соответственно, при температуре 37°C и атмосфере 5% CO₂.

Рекомбинантные конструкции, несущие кДНК, соответствующие генам структурных белков ВГС, **рекомбинантные бакмиды**, а также **рекомбинантный бакуловирус** bv-CE1E2 получали и анализировали по ранее отработанным методикам [20].

Сайт-направленный мутагенез. Фрагмент ДНК, соответствующий последовательности кДНК гена, кодирующего гликопротеин E2 ВГС, клонировали в плазмиде pFastBacHTb по сайтам NcoI-EcoRI с использованием стандартного протокола [20]. Для получения серии рекомбинантных плазмид, несущих кДНК белка E2 с точечными заменами в сайтах гликозилирования, сконструировали олигонуклеотидные праймеры (таблица). Каждый праймер состоял из 25–30 нуклеотидов и содержал последовательность, кодирующую сайт N-гликозилирования: Asn-X-Thr/Ser (X≠Pro), в котором триплет, кодирующий Asn, замещен триплетом, кодирующим Gln.

Для мутагенеза использовали метод, описанный Друцей и соавт. [21]. ПЦР проводили в программ-

руемом термостате ЦиклоТемп 107 (ЗАО «Ресурс Прибор», Россия). Наличие всех заданных замен нуклеотидов подтверждали секвенированием.

Анализ суммарной клеточной ДНК. Суммарную клеточную ДНК выделяли из клеток насекомых через 72 ч после заражения рекомбинантными бакуловирусами bv-CE1E2, bv-E2mut, bv-E1E2mut, bv-CE1E2mut (с множественностью заражения 5 БОЕ/кл) [20]. Наличие кДНК генов структурных белков ВГС в суммарной клеточной ДНК оценивали с помощью ПЦР, используя праймеры к бакуловирусному вектору pFastBacHT (прямой 5'-GTGGTTGGCTACGTATACTCC-3', обратный 5'-CCTCTACAAATGTGGTATGGC-3').

Анализ РНК ВГС с помощью ОТ-ПЦР. Клетки Sf9 заражали рекомбинантными бакуловирусами bv-CE1E2mut (5 БОЕ/кл), инкубировали в течение 72 ч при 27°C. Через 72 ч отбирали среду и удаляли клеточный дебрис низкоскоростным центрифугированием, а супернатант центрифугировали через 30% сахарозную «подушку» при 230000 g в течение 16 ч при 4°C (центрифуга Beckman Coulter Optima L-100XP, ротор 80Ti). РНК экстрагировали из осадка с помощью реагента TRIzol (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя и обрабатывали ДНКазой I (Promega). Обратную транскрипцию проводили с использованием Phusion RT-PCR Kit (Thermo Scientific). Полученную кДНК амплифицировали методом ПЦР, используя праймеры к генам структурных и неструктурных белков ВГС. Суммарную клеточную РНК получали из зараженных рекомбинантными бакуловирусами bv-CE1E2mut (5 БОЕ/кл) клеток Sf9, инкубированных при 27°C в течение 72 ч и трижды промытых фосфатно-солевым буфером PBS. Выделение РНК, обратную транскрипцию и амплификацию проводили по протоколам, указанным выше.

Использованные праймеры

Праймер	Ориентация	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
28-E2N1m	–	TG AAT ACC CAA GGC AGC TGG CAC AT
30-E2N2m	–	TGG CAC ATC CAA AGT ACT GCC CTA AAT TGC
30-E2N3m	–	GCC CTA AAT TGC CAA GAC TCC CTC CAA ACT
30-E2N4m	–	GCA CAC AAG TTC CAA TCG TCC GGG TGC CCG
25-E2N6m	–	TGG GGG GAG CAA GAG ACA GAC GTG A
30-E2N7m	–	GTG ATG CTC CTC CAA AAC ACG CGT CCG CCA
30-E2N8m	–	TGT ACA TGG ATG CAA AGT ACT GGG TTC ACT
27-E2N9m	–	GGG GTC GGT CAA CGC ACC TTG ATT TGC
30-E2N10m	–	TAC CCC TGC ACT CTC CAA TTT TTC CAT CAT
27-E2N11m	–	GCC GCA TGC CAA TGG ACT CGA GGA GAG CGC
E2 for	+	AGG TCT AGA ATG TTA TGA TTG TTT TGC TAC
E2 Back	+	CT ATA GTG TCA CCT AAA TCC GAA AGC TTC GGC CTC AGC TTG AG

Клетки Нек293Т трансфицировали рекомбинантными плазмидами VacMamCE1E2mut-GFP (5 БОЕ/кл) и инкубировали при 37°C в течение 48 ч, затем отбирали среду, выделяли РНК, проводили обратную транскрипцию и амплификацию по протоколам, указанным выше.

Антитела к ВГС. Использовали моноклональные антитела мыши к белкам E1 ВГС (Her C E1 1879: sc-65459) и E2 ВГС (Her C E2 BDI167: sc-57769) (SantaCruz Biotechnology, США), а также моноклональные антитела к кальнексину (AF18) и кальретикулину (FMC75) (Abcam, Великобритания). Поликлональные антитела кролика к структурному белку С любезно предоставлены М.Г. Исагулянц (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва). В качестве вторичных антител использовали конъюгаты пероксидазы хрена с антителами против IgG мыши (AB6706-1EA) (Sigma, США).

Вестерн-блот и иммуноосаждение. Через 72 ч после заражения рекомбинантными бакуловирусами bv-E2mut, bv-E1E2mut, bv-CE1E2mut (множественность заражения 5 БОЕ/кл) клетки Sf9 собирали, трижды отмывали в PBS (1.47 mM KH_2PO_4 , 4.29 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl), ресуспендировали в лизирующем буфере TNC, содержащем 0.25% дигитонина, и разрушали ультразвуком. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (15000 g, 15 мин, 4°C). Клеточный лизат наносили на 12% ПААГ, каждый образец содержал 10 мкг белка. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL (Amersham Biosciences, США) методом полусухого электропереноса. Мембраны промывали в буфере PBS, содержащем 5% сухого обезжиренного молока, инкубировали с первичными антителами к структурным белкам E1 или E2 ВГС (в разведении 1 : 1500 для E1 и 1 : 2000 для E2), к кальнексину или к кальретикулину (в разведении 1 : 1000 и 1 : 2000 соответственно), а затем с вторичными антителами (в разведении 1 : 20000). Иммуные комплексы проявляли, используя хемилюминесцентные реагенты ECL и ECL Plus (Western blotting detection reagents and analysis systems, Amersham Biosciences), согласно рекомендациям производителя.

Для иммуноосаждения клетки, инфицированные рекомбинантными бакуловирусами bv-E2mut, bv-E1E2mut и bv-CE1E2mut собирали через 72 ч после заражения, лизировали, удаляли клеточные обломки и ядра. Структурные белки и образуемые ими комплексы осаждали моноклональными антителами к E1 ВГС и E2 ВГС, кальнексину и кальретикулину в разведении 1 : 100 (согласно рекомендациям производителя). Осажденные белки разделяли при помощи электрофореза в 12% ПААГ, переносили на нитро-

целлюлозную мембрану и инкубировали с первичными антителами в разведениях, указанных выше, а затем обрабатывали вторичными антителами.

Анализ гликозилирования – обработка эндогликозидазой Н (Endo Н). Белки клеточного лизата инкубировали с соответствующими моноклональными антителами при 4°C. Полученный комплекс осаждали с помощью белок-G-сефарозы (BioVision, США). К осажденному белку (20 мкг) добавляли 1 мкл десятикратного денатурирующего буфера (5% SDS, 0.4 M DTT), объем смеси доводили водой до 10 мкл и кипятили в течение 10 мин. Затем объем доводили до 20 мкл, добавляя 2 мкл десятикратного реакционного буфера G5 (50 mM цитрат Na), 3 мкл воды и 5 мкл раствора Endo Н (5 ед. акт.) (P0702S BioLabs Inc., Великобритания). Инкубировали в течение 15 ч при 37°C и анализировали при помощи электрофореза в 12% ПААГ.

Получение и очистка вирусоподобных частиц (ВПЧ). Клетки, растущие в монослое при 27°C, заражали рекомбинантным бакуловирусом bv-CE1E2 (10 БОЕ/кл). Через 72 ч клетки (2×10^8) собирали, отмывали 3 раза PBS, ресуспендировали в лизирующем буфере TNC: 10 mM Трис-НСl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM PMSF, коктейль ингибиторов протеаз II (Protease Inhibitor Cocktail II, Calbiochem, США) (1 : 200), содержащем 0.25% дигитонина, и разрушали ультразвуком. ВПЧ из гомогенизированных лизатов очищали от клеточных остатков низкоскоростным центрифугированием (1200 g, 15 мин, 4°C). Затем ВПЧ концентрировали центрифугированием через 30% сахарозную «подушку» при 230000 g в течение 16 ч при 4°C. Осадок ВПЧ ресуспендировали в буфере TNC, содержащем 1 mM PMSF, ингибиторы протеаз (1 : 200), и анализировали с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы.

Центрифугирование в сахарозном градиенте. Осадок ВПЧ, ресуспендированный в 100 мкл буфера TNC, содержащего 1 mM PMSF и ингибиторы протеаз (1 : 200), наслаивали на градиент концентраций сахарозы (от 10 до 60% в 50 mM Трис-НСl, 100 mM NaCl, pH 7.4) и центрифугировали при 200000 g в течение 2.5 ч при 4°C (центрифуга Beckman Coulter Optima L-100XP, ротор 80Ti). Собирали 10 фракций по 1 мл, затем каждую фракцию концентрировали высокоскоростным ультрацентрифугированием при 230000 g в течение 16 ч при 4°C, осадок растворяли в 100 мкл буфера TNC, содержащего 1 mM PMSF и ингибиторы протеаз (1 : 200), и анализировали с помощью вестерн-блотинга [18, 22].

Анализ связывания ВПЧ с рецептором CD81. Клетки Huh7.0 инкубировали в присутствии ВПЧ, полученных в клетках Sf9, в течение 1 ч при 4°C. В качестве контроля использовали клетки Huh7.0,

предварительно инкубированные с антителами к CD81 (20 мкг/мл, 1 ч при 4°C) для блокировки рецептора CD81. Клетки собирали, дважды промывали PBS для удаления не связавшихся ВПЧ и анализировали с помощью вестерн-блотинга с антителами к E2.

Флуоресцентная микроскопия и проточная цитофлуориметрия. Через 48 ч после трансфекции рекомбинантными плазмидами VacMamCE1E2mutGFP клетки Нек293Т снимали с подложки раствором трипсина, собирали центрифугированием, дважды промывали фосфатно-солевым буфером и анализировали в проточном цитофлуориметре (Beckman Coulter EPICS, США) и с помощью вестерн-блотинга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание генно-инженерных конструкций и сайт-направленный мутагенез

Ранее мы изучили влияние N-гликанов белка E1 ВГС на его фолдинг и сборку продуктивных гетеродимеров E1E2 в клетках насекомых и млекопитающих. Мы показали, что гликаны, связанные с сайтами N1 и N5 белка E1, играют наиболее существенную роль в образовании правильной конформации этих белков [23]. В настоящей работе мы исследовали участие гликанов гликопротеина E2 ВГС

(генотип 16 штамм 274933RU [16]) в сворачивании гликопротеинов, образовании функциональных гликопротеиновых комплексов и формировании вирусных частиц в клетках насекомых и млекопитающих. Для этого ввели точечные мутации в сайты N-гликозилирования E2 и экспрессировали гены мутантных белков в клетках насекомых и млекопитающих с использованием бакуловирусной системы экспрессии [17, 20].

Фрагмент ДНК, соответствующий последовательности кДНК гена, кодирующего гликопротеин E2 ВГС, клонировали в плазмиде pFastVacHTb по сайтам NcoI–EcoRI с использованием стандартного протокола [20]. Для получения серии рекомбинантных плазмид, несущих кДНК белка E2 с точечными заменами в сайтах гликозилирования, сконструировали олигонуклеотидные праймеры согласно Друца и соавт. [20, 21] (см. «Экспериментальную часть»). Присутствие всех заданных замен нуклеотидов подтверждали секвенированием. В результате получили векторные ДНК pFastVacHTbE2mut, содержащие гены E2 с введенными мутациями, которые использовали затем при конструировании векторов pFastVacHTbE1E2mut, pFastVacHTbCE1E2mut и VacMamCE1E2mutGFP. На рис. 1 показана схема расположения потенциальных сайтов N-гликозилирования в белке E2 ВГС и в сконструированных мутантных вариантах E2.

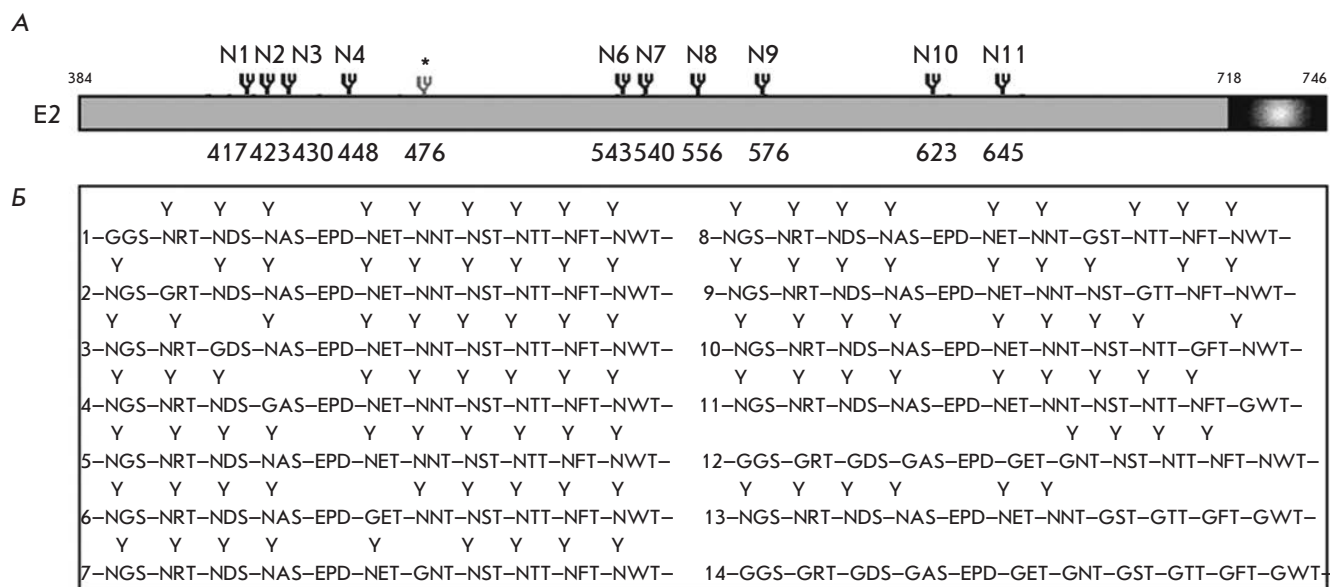


Рис. 1. Сайты N-гликозилирования в структурном белке E2 ВГС и в его мутантных вариантах. А – схема расположения сайтов гликозилирования N1–N11 в полипептидной цепи E2 ВГС. Б – схематическое изображение мутантных вариантов гликопротеина E2 с модифицированными (нарушенными) сайтами гликозилирования: 1 – N1; 2 – N2; 3 – N3; 4 – N4; 5 – исходный вариант E2 дикого типа; 6 – N6; 7 – N7; 8 – N8; 9 – N9; 10 – N10; 11 – N11; 12 – N1–N7(mL); 13 – N8–N11(mR); 14 – N1–N11(ΣN). Сайты гликозилирования отмечены знаком «Y»

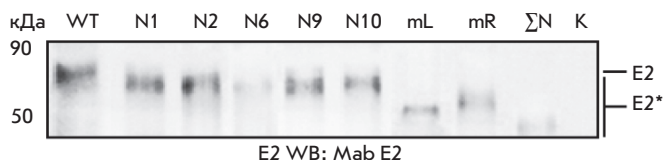


Рис. 2. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в клетках Sf9. Вестерн-блоттинг (WB) в денатурирующем 12% ПААГ с антителами к E2 ВГС. Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами: WT – E2 дикого типа; N1, N2, N6, N9, N10, N1–N7(mL), N8–N11(mR) – E2 с мутациями в соответствующих сайтах гликозилирования; N1–N11(ΣN) – во всех сайтах гликозилирования E2; K – отрицательный контроль (Hsp90). Здесь и на рис. 3–9 цифры слева – маркеры молекулярной массы белков, кДа. * – мутантные белки обозначены E2*

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКА E2 ВГС В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ ВИРУСА В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Влияние N-гликанов гликопротеина E2 ВГС на экспрессию генов мутантных белков E2 в клетках насекомых и млекопитающих

Ранее мы показали, что в клетках насекомых происходит эффективное посттрансляционное гликозилирование белков оболочки ВГС [22]. Мы показали также, что нарушение сайтов гликозилирования гликопротеина E1 ВГС в различных комбинациях не влияет на его синтез в клетках Sf9, но отсутствие углеводных цепей в сайтах N1 и N5 E1 существенно уменьшает уровень его экспрессии в клетках млекопитающих HeK293T [23]. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в клетках насекомых Sf9, проведенный нами, показал, что нарушение сайтов гликозилирования в разных комбинациях (за исключением сайта N6), не влияет на синтез E2, при этом электрофоретическая подвижность мутантных белков возрастает пропорционально уменьшению числа сайтов гликозилирования (рис. 2).

Оказалось, что интенсивность синтеза E2 ВГС в клетках млекопитающих зависит от присутствия гликанов в определенных сайтах гликозилирования. Для анализа влияния N-гликанов гликопротеина E2 ВГС на эффективность экспрессии белков оболочки вируса в клетках млекопитающих были сконструированы плазмиды pFastBacMam1GFP на основе бакуловирусного вектора с кассетами экспрессии под контролем цитомегаловирусного промотора (CMV), несущие кДНК мутантных E2. Полученными векторными ДНК pFastBacMamCE1E2mutGFP, кодирующими E2 с точечными заменами в сайтах гли-

козилирования N1, N2, N4, N8, N10, mL(N1–N7), mR(N8–N11) и ΣN(N1–N11), трансфицировали клетки HEK293T человека. Экспрессию генов мутантных белков E2 ВГС и эффективность их гликозилирования в клетках оценивали по уровню синтеза полипептидов CE1E2mutGFP, используя методы проточной цитофлуориметрии и электрофорез в ПААГ с последующим иммуноблоттингом (рис. 3А,Б).

Согласно результатам проточной цитофлуориметрии, отсутствие сайтов гликозилирования N1 и N8 E2 ВГС приводит к значительному снижению флуоресценции GFP, что свидетельствует о снижении синтеза E2 в составе полипептидов CE1E2mutGFP

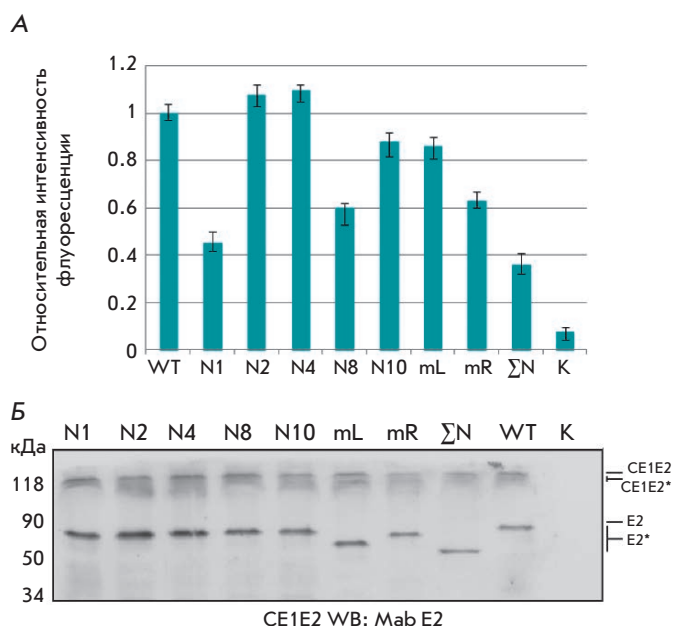


Рис. 3. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в составе полипептида CE1E2 ВГС в клетках млекопитающих. А – анализ флуоресценции зеленого белка GFP в клетках HEK293T, трансфицированных рекомбинантными плазмидами pFastBacMamCE1E2mutGFP, методом проточной цитофлуориметрии. По оси ординат отложены относительные значения интенсивности флуоресценции, по оси абсцисс указаны варианты E2 с мутациями в сайтах гликозилирования N1, N2, N4, N8, N10, mL(N1–N7), mR(N8–N11) и ΣN(N1–N11); Б – вестерн-блоттинг в денатурирующем 8% ПААГ с антителами к E2 ВГС лизатов клеток HeK293T, трансфицированных pFastBacMamCE1E2GFP, синтезирующих различные варианты E2: WT – E2 дикого типа; E2 с мутациями в сайтах гликозилирования N1, N2, N4, N8, N10, N1–N7(mL); N8–N11(mR); N1–N11(ΣN) – во всех сайтах гликозилирования E2; K – отрицательный контроль (Hsp90). Мутантные белки обозначены E2*

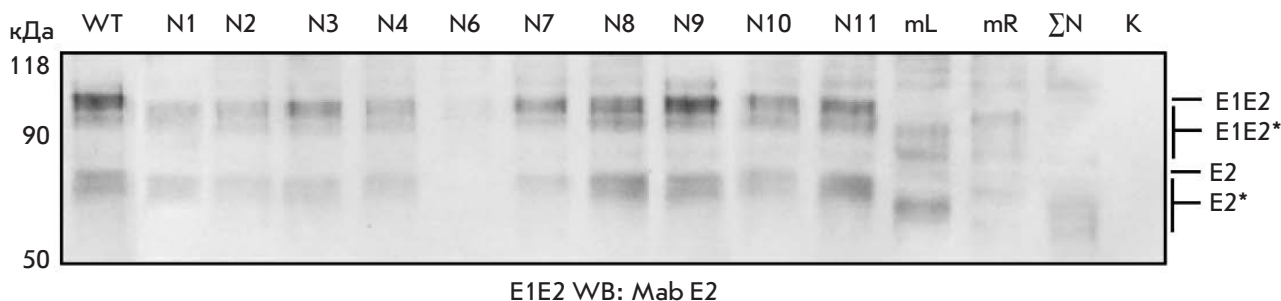


Рис. 4. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в составе E1E2 ВГС в клетках Sf9. Вестерн-блоттинг в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к E2 ВГС. Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами, синтезирующих E2 в составе E1E2: WT – E2 дикого типа; N1, N2, N3, N4, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N1-N7(mL), N8–N11(mR) – E2 с мутациями в сайте гликозилирования; N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования E2; K – отрицательный контроль (Hsp90). Мутантные белки обозначены E2*

в клетках Hek293T по сравнению с исходным. К незначительному снижению синтеза гликопротеина E2 ведет мутация в сайте N10. Электрофорез в ПААГ с последующим иммуноблоттингом показал, что мутантные варианты E2 синтезируются в клетках млекопитающих, и интенсивность их синтеза зависит от присутствия гликанов в определенных сайтах гликозилирования белка. При этом электрофоретическая подвижность белков возрастает пропорционально уменьшению числа сайтов гликозилирования.

Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в составе E1E2 показал, что отсутствие гликанов в любом сайте, кроме N6, не влияет на синтез в клетках Sf9 (рис. 4).

Обработка мутантных гликопротеинов E2 ВГС эндогликозидазой Endo H с последующим вестерн-блоттингом показала, что мутантные варианты гликопротеина чувствительны к действию эндогликозидазы (не представлено), что в клетках насекомых происходит гликозилирование синтезированных мутантных гликопротеинов.

Влияние N-гликанов гликопротеина E2 ВГС на образование продуктивного комплекса E1E2 в клетках насекомых

Мы показали ранее, что сборка гликопротеиновых комплексов E1E2 ВГС в клетках насекомых зависит от нарушения сайтов гликозилирования N1 и N5 гликопротеина E1, в то время как мутации остальных сайтов на сборку не влияют [23]. В настоящей работе о влиянии нарушения сайтов гликозилирования E2 на его свертывание и образование гетеродимеров E1E2 в клетках насекомых, как и в случае с мутантным гликопротеином E1, судили по взаимодействию с ними клеточных кальнексина и кальретикулина (рис. 5A–B).

Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в составе гликопротеиновых комплексов E1E2 в клетках насекомых Sf9 показал, что при нарушении одного из сайтов гликозилирования – N3, N4, N7 или N8 – формируется нековалентно связанный комплекс E1E2 так же, как и в случае экспрессии E2 дикого типа. Мутантные E2, лишённые сайтов N9 и N11, оказывают промежуточный эффект на сборку гликопротеинов оболочки ВГС. По мере увеличения числа поврежденных сайтов (N1–N7(mL) и N8–N11(mR)) взаимодействие гетеродимеров с кальнексином уменьшается, и сборка продуктивного комплекса E1E2 нарушается. Агрегаты неправильно свернутых димеров E1E2, образованные белком E2 с мутациями во всех сайтах гликозилирования, с кальнексином не взаимодействуют. Интересно, что сборка нековалентно связанного комплекса E1E2 нарушается также в результате повреждения одного из сайтов (N1, N2 или N10). Мутации именно этих сайтов гликозилирования E2, по-видимому, препятствуют образованию правильной конформации белков, образующих функциональный комплекс E1E2.

Влияние N-гликанов гликопротеина E2 ВГС на образование вирусоподобных частиц в клетках Sf9 и Hek293T

Показано, что синтез структурных белков С (core), E1 и E2 ВГС в клетках насекомых сопровождается образованием вирусоподобных частиц. Ранее мы показали, что синтезируемые в клетках насекомых рекомбинантные структурные белки ВГС, в том числе мутантный E1, встраиваются в мембраны ЭР, где происходит их сворачивание, образование комплекса E1E2 и формирование ВПЧ. Образование ВПЧ фиксировали во фракциях микросом, очищенных из клеток насекомых Sf9, инфицированных реком-

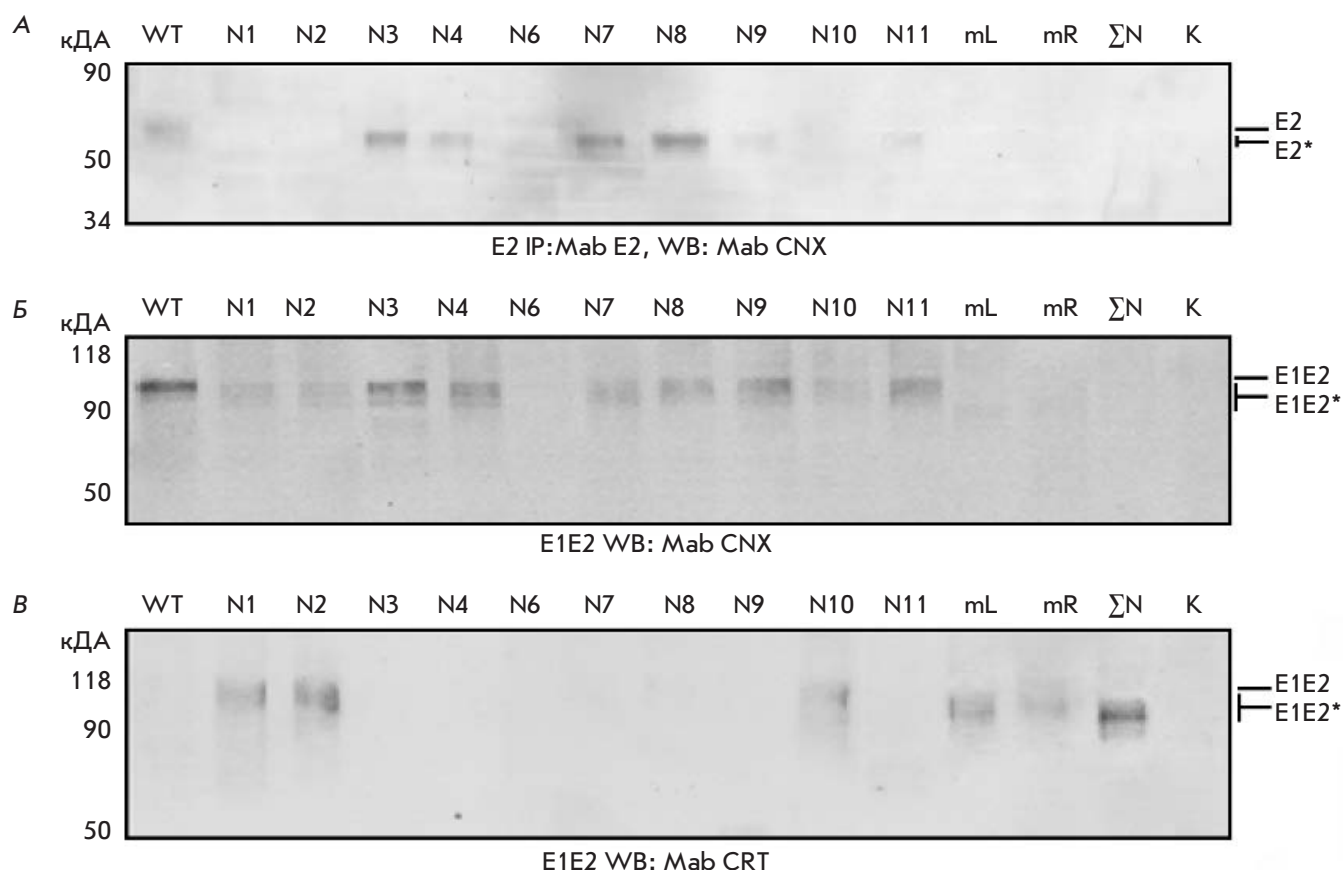


Рис. 5. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в клетках Sf9. А – вестерн-блоттинг в денатурирующем 12% ПААГ с антителами к кальнексину после предварительного иммуноосаждения антителами к гликопротеину E2 ВГС. Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами. WT – E2 дикого типа; N1, N2, N3, N4, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N1–N7(mL), N8–N11(mR) – E2 с мутациями в соответствующих сайтах гликозилирования; N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования E2; Б – вестерн-блоттинг в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к кальнексину и В – к кальретикулину. Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами, синтезирующих E2 с мутациями в составе E1E2; К – отрицательный контроль (Hsp90); мутантные белки обозначены E2*

бинантными бакуловирусами, с помощью электронной микроскопии [20]. Мы обнаружили, что отсутствие гликанов в сайтах гликозилирования белка E1 не влияет на образование ВПЧ в клетках насекомых [23]. В данной работе анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в составе SE1E2 в клетках насекомых Sf9 показал, что нарушение сайтов гликозилирования в разных комбинациях (за исключением сайта N6) не влияет на их синтез, при этом электрофоретическая подвижность мутантных белков возрастает пропорционально уменьшению числа сайтов гликозилирования (рис. 6А).

Мутации, введенные в сайты гликозилирования N3, N4, N7, N8, N9, N11 E2, не препятствуют укладке гликопротеинов в составе SE1E2 ВГС в клетках Sf9. В то же время повреждение сайтов N1, N2 и N10 на-

рушает сборку, приводя к образованию непродуктивных гетеродимеров E1E2 и соответственно к их неправильной упаковке в составе ВПЧ (рис. 6Б,В). Образование агрегатов неправильно свернутых гликопротеинов не препятствует образованию ВПЧ ВГС в клетках насекомых, но, по всей видимости, приводит к образованию дефектных вирусных частиц, отличающихся от природных. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 ВГС в составе SE1E2 в клетках HEK293T показал, что при образовании белков E2, лишенных одного из сайтов гликозилирования N4 или N8, не нарушается правильная упаковка гликопротеинов в составе SE1E2 ВГС, также как и в клетках Sf9. При этом по мере увеличения числа поврежденных сайтов гликозилирования N1–N7(mL) или N8–N11(mR) E2 взаимодействие образо-

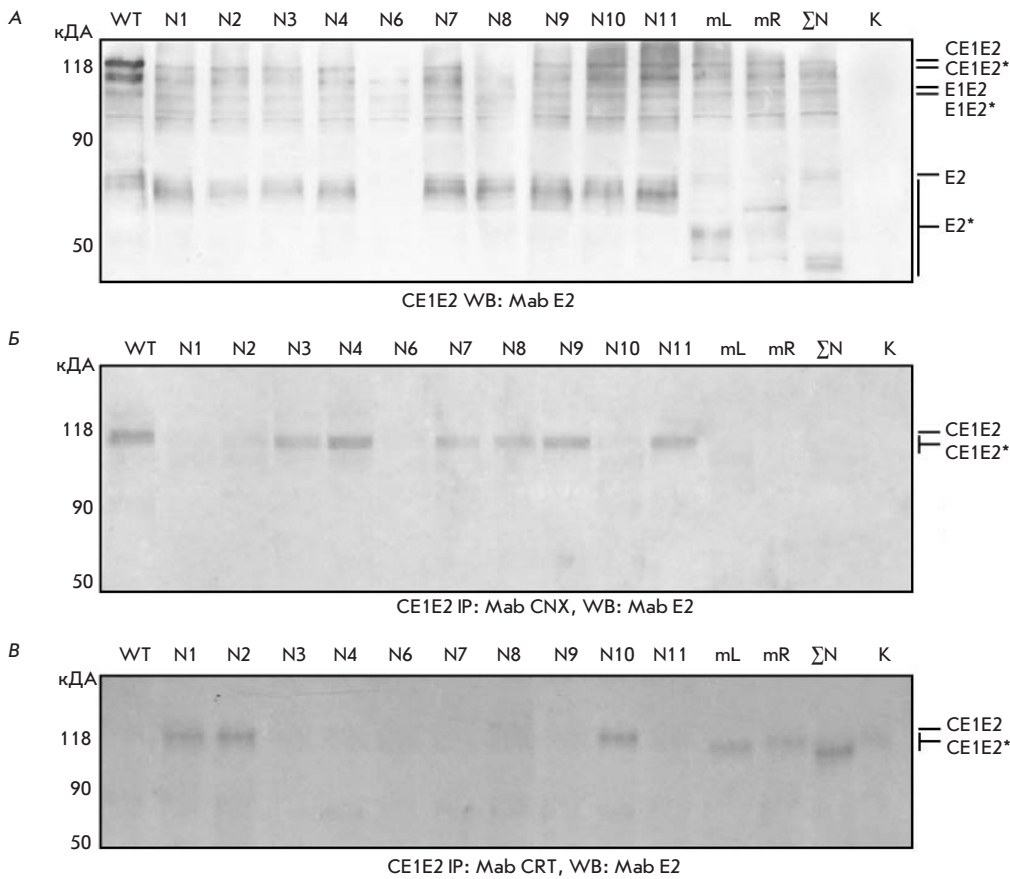


Рис. 6. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в составе CE1E2 ВГС в клетках Sf9. Вестерн-блоттинг в денатурирующем 8% ПААГ с антителами к E2 ВГС (А), с антителами к E2 ВГС после предварительного иммуноосаждения антителами к кальнексину (Б) и кальретикулину (В). Лизаты клеток, зараженных рекомбинантными бакуловирусами, синтезирующими E2 в составе CE1E2: WT – E2 дикого типа; E2 с мутациями в сайте гликозилирования – N1, N2, N3, N4, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N1–N7(mL), N8–N11(mR); N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования E2; K – отрицательный контроль (Hsp90). Мутантные белки обозначены E2*

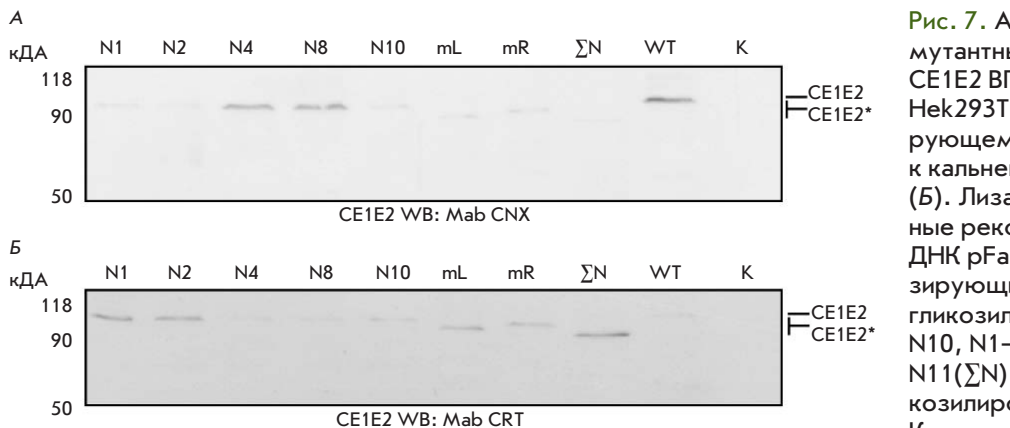


Рис. 7. Анализ экспрессии генов мутантных белков E2 в составе CE1E2 ВГС в клетках млекопитающих HeK293T. Вестерн-блот в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к кальнексину (А) и кальретикулину (Б). Лизаты клеток, трансфицированные рекомбинантными плазмидными ДНК pFastBacMamCE1E2GFP, синтезирующими E2 с мутациями в сайте гликозилирования N1, N2, N4, N8, N10, N1–N7(mL), N8–N11(mR); N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования; WT – E2 дикого типа; K – отрицательный контроль (Hsp90). Мутантные белки обозначены E2*

ванных гетеродимеров с кальнексином уменьшается, а с кальретикулином увеличивается. С кальретикулином взаимодействуют димеры, образованные E2 с мутациями во всех сайтах гликозилирования (ΣN). Интересно, что сборка продуктивного комплекса E1E2 и его упаковка в составе ВПЧ в клетках млекопитающих, как и в клетках насекомых, нарушается в результате повреждения сайтов гликозилирования N1, N2 и частично N10 E2 (рис. 7А,Б).

Отсутствие углеводных цепей в сайтах N1, N2 и в меньшей степени N10 гликопротеина E2, по-видимому, играет существенную роль в нарушении конформации белков функционального комплекса ВПЧ ВГС, препятствуя образованию в клетках полноценных вирусных частиц [24].

Ранее мы показали образование ВПЧ ВГС в клетках насекомых с помощью вестерн-блоттинга с антителами к ВГС и электронной микроскопии. Для опре-

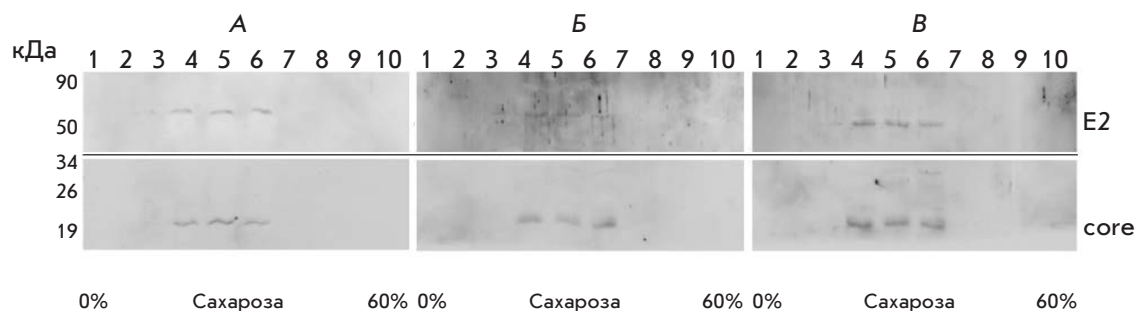


Рис. 8. Анализ вирусоподобных частиц ВГС, полученных в клетках Нек293Т, с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы. Вестерн-блотинг ВПЧ 10 фракций, начиная с верхней, в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к белкам С и E2 ВГС. Клетки Нек293Т трансфицированы рекомбинантными ДНК рFastBacMamCE1E2GFP. А – исходная ДНК; Б – ДНК с мутацией в сайте гликозилирования N1 E2; В – с мутациями во всех сайтах гликозилирования E2

деления биофизических характеристик ВПЧ ВГС, полученных в клетках млекопитающих, ВПЧ очищали и концентрировали центрифугированием через 30% сахарозную «подушку» при 230000 g, а осадок ВПЧ анализировали с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы как описано в «Экспериментальной части». Собранные фракции анализировали с помощью вестерн-блотинга с антителами к структурным белкам (рис. 8А–В).

Иммуноблотинг с антителами к белкам С и E2 показал, что ВПЧ содержатся во фракциях с плотностью 1.14–1.16 г/см³, что может свидетельствовать о присутствии в них фрагментов РНК [25].

ОТ-ПЦР на суммарной РНК клеток насекомых, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом bV-CE1E2mut с праймерами к генам белков С и E2 ВГС, выявляет фрагменты РНК структурных белков (результаты не представлены). Аналогичные результаты получены и для клеток Нек293Т. Таким образом, можно заключить, что N-гликаны гликопротеина E2 ВГС не влияют на синтез РНК структурных белков в клетках насекомых и млекопитающих и, возможно, на включение этих РНК в вирусоподобные частицы.

Влияние рецептора CD81 на связывание рекомбинантных ВПЧ ВГС с клетками гепатомы Нuh7.0

В настоящей работе мы изучали связывание ВПЧ ВГС, несущих мутантные белки E2, с клетками Нuh7.0. Клетки Нuh7.0, обработанные и не обработанные специфическими антителами к CD81, инкубировали с ВПЧ, полученными в клетках насекомых, и анализировали связывание мутантных белков E2 с клетками методом вестерн-блотинга (рис. 9). Предварительно была определена рабочая концентрация Ab CD81 (20 мкг/мл) [26].

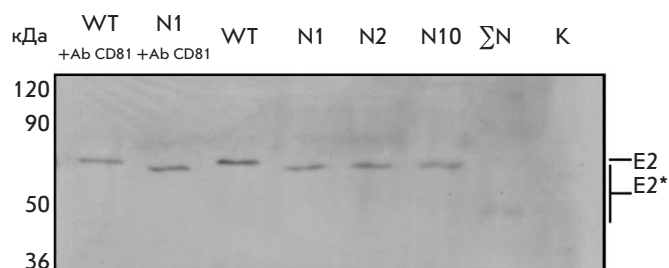


Рис. 9. Анализ связывания мутантных белков E2 в составе рекомбинантных ВПЧ ВГС с клетками Нuh7.0. Вестерн-блотинг мутантных белков E2 в денатурирующем 10% ПААГ с антителами к E2 ВГС. Лизаты клеток Нuh7.0, обработанные и не обработанные антителами к CD81, после инкубации с рекомбинантными ВПЧ, синтезированными в клетках насекомых Sf9, зараженных рекомбинантными бакуловирусами, синтезирующими мутантные E2 в составе CE1E2mut: WT – E2 дикого типа; E2 с мутациями в сайте гликозилирования N1, N2, N10; N1–N11(ΣN) – мутации во всех сайтах гликозилирования E2; WT + Ab CD81, N1 + Ab CD81 – клетки, обработанные Ab CD81; WT, N1, N2, N10, ΣN – клетки, не обработанные Ab CD81; K – отрицательный контроль (Нuh7.0). Мутантные белки обозначены E2*

Показано, что образующиеся в клетках насекомых ВПЧ ВГС, содержащие мутантные варианты E2, связываются с клетками Нuh7.0 независимо от присутствия на их поверхности рецептора CD81. Helle F. и соавт. [26] показали, что вирусные частицы с мутантными белками E2 в своем составе, связываются с клетками НерG2, Нuh7.0 CD81-зависимым способом. Известно, что влияние рецептора CD81 на связывание вирусных частиц ВГС с различными клетками (НерG2, Нuh7.0, NKNT-3, Molt-4) проявляется по-разному [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что важным этапом морфогенеза вируса гепатита С, определяющим правильную сборку вириона, является гликозилирование белков оболочки вируса в инфицированной клетке. Нами показано, что синтезируемые в клетках насекомых и млекопитающих белки оболочки ВГС, в том числе белок Е2, содержащий мутации в сайтах гликозилирования, встраиваются в мембраны ЭР, где происходит их сворачивание, образование комплекса Е1Е2 и формирование вирусоподобной частицы. Исследование роли гликозилирования белков оболочки в морфогенезе вируса гепатита С генотип 1б (штамм 274933RU) показало, что нарушение единичных сайтов гликозилирования N1 и N8 белка Е2 ВГС (так же как N1 и N5 белка Е1 ВГС) ведет к снижению экспрессии этих белков в клетках млекопитающих, в отличие от экспрессии в клетках насекомых. Впервые обнаружено, что нарушение сайтов гликозилирования N1, N2 и N10 белка Е2 (как N1 и N5 белка Е1 ВГС) влияет на образование функциональных гетеродимеров Е1Е2. В отсутствие гликанов в этих положениях происходит в основном образование непродуктивных ди-

меров, но это не препятствует формированию вирусоподобных частиц ВГС как в клетках насекомых Sf9, так и в клетках человека Нек293Т. Высказано предположение, что образующиеся вирусоподобные частицы с неправильно свернутыми гликопротеинами являются дефектными, неспособными инфицировать клетки-мишени. Полученные данные свидетельствуют об образовании в клетках Sf9 и Нек293Т вирусоподобных частиц плотностью 1.14–1.16 г/см³, содержащих фрагменты РНК. Показано, что N-гликаны гликопротеинов ВГС не влияют на синтез РНК структурных белков в клетках насекомых и млекопитающих и, возможно, на их включение в вирусоподобные частицы. В настоящей работе мы показали, что вирусоподобные частицы ВГС, синтезирующиеся в клетках насекомых, связываются с клетками гепатомы Нuh7.0 независимым от рецептора CD81 образом. ●

Работа получила финансовую поддержку РФФИ (гранты № 07-04-12136, 08-04-00281, 011-04-00231) и Министерства образования и науки РФ (госконтракт № 16.512.11.2266).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hnatyszyn H.J. // *Antivir. Ther.* 2005. V. 10. P. 1–11.
- Baumert T.F., Ito S., Wong D.T., Liang T.J. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 3827–3836.
- Reed K.E., Rice C.M. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2000. V. 242. P. 55–84.
- Иванов А.В., Кузякин А.О., Кочетков С.Н. // *Успехи биохимии.* 2005. Т. 45. С. 37–86.
- Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. // *Science.* 1989. V. 244. P. 359–362.
- Burda P., Aebi M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1426. P. 239–257.
- Choukhi A., Ung S., Wychowski C., Dubuisson J. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 3851–3858.
- Goffard A., Dubuisson J. // *Biochimie.* 2003. V. 85. P. 295–301.
- Op de Beeck A., Cocquerel L., Dubuisson J. // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 2589–2595.
- Montreuil J., Vliegthart J.F., Schachter H. // *Glycoproteins.* Elsevier. 1995. P. 1–12.
- Chapel C., Garcia C., Roingard Ph. // *J. Gen. Virol.* 2006. V. 87. P. 861–871.
- Helle F., Goffard A., Morel V., Duverlie G., McKeating J., Keck Z.Y., Fong S., Penin F., Dubuisson J., Voisset C. // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 8101–8111.
- Xiang J., Wunschmann S., George S.L., Klinzman D., Schmidt W.N., LaBrecque D.R., Stapleton J.T. // *J. Med. Virol.* 2002. V. 68. P. 537–543.
- Brazzoli M., Helenius A., Fong S.K., Houghton M., Abrignani S., Merola M. // *Virol.* 2005. V. 332. P. 438–453.
- Cocquerel L., Meunier J.C., Op de Beeck A., Bonte D., Wychowski C., Dubuisson J. // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 1629–1635.
- Мохонов В.В., Новиков Е.И., Самохвалов Е.И. // *Вопросы вирусологии.* 2002. Т. 47. С. 9–12.
- Jones D.M., McLauchlan J. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 22733–22739.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1982.
- Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. *Instruction Manual.* St. Louis, MO: Life Technologies, Inc., Monsanto Corp. Res. 1993.
- Белжеларская С.Н., Королева Н.Н., Попенко В.В., Друца В.Л., Орлова О.В., Рубцов П.М., Кочетков С.Н. // *Молекуляр. биология.* 2010. Т. 44. С. 107–119.
- Друца И.Л., Кабердин В.Р., Королева О.Н., Шилов И.О. // *Биоорг. химия.* 1991. Т. 17. С. 1487–1493.
- Тимохова А.В., Бакиновский Л.В., Зинин А.И., Попенко В.И., Иванов А.В., Рубцов П.М., Кочетков С.Н., Белжеларская С.Н. // *Молекуляр. биология.* 2012. Т. 46. № 4. С. 644–653.
- Орлова О.В., Друца В.Л., Спиринов П.В., Попенко В.И., Прасолов В.С., Рубцов П.М., Кочетков С.Н., Белжеларская С.Н. // *Молекуляр. биология.* 2013. Т. 47. № 1. С. 147–156.
- Clayton R.F., Owsianka A., Aitken J., Graham S., Bhella D., Patel A.H. // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 7672–7682.
- McEwen C.R. // *Anal. Biochem.* 1967. V. 20. P. 114–149.
- Helle F., Vieyres G., Elkrief L., Popescu C.I., Wychowski C., Descamps V., Castelain S., Roingard P., Duverlie G., Dubuisson J. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 11905–11915.
- Tryatni M., Saunier B., Maruvada P., Davis A.R., Ulianich L., Heller T., Patel A., Kohn L.D., Liang T.J. // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 9335–9344.