

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ЦИТОМЕГАЛОВИРУСУ СВЯЗАНЫ С ПРОЛИФЕРАТИВНЫМ СОСТОЯНИЕМ И ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ГЕНОВ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО И ИММУННОГО ИНТЕРФЕРОНОВ

Соколова Т.М.¹, Федорова Н.Е.¹, Меджидова М.Г.¹,
Терехов С.М.², Урываев Л.В.¹, Куц А.А.¹

¹ Лаборатория энзимологии и лаборатория клеточной инженерии ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва

² Медико-генетический центр РАМН, Москва

Резюме. Выявлена прямая связь динамики развития инфекционного процесса и уровня клеточной резистентности к ЦМВ с высокой транскрипционной активностью генов $IFN\alpha$ и индукцией транскрипции гена $IFN\gamma$ в диплоидных фибробластах человека. Показано, что регуляция транскрипции мРНК $IFN\alpha$ позитивно ассоциирована с синтезом клеточной ДНК. В то же время активность генов $IFN\beta$ и $IFN\gamma$ в 3-х исследованных линиях фибробластов человека находится на низком уровне и не повышается в фазе синтеза ДНК. Уровни транскрипции генов $IFN\alpha$ в диплоидных фибробластах человека (ФЛЭЧ 110044), синхронизированных в состоянии покоя (G_0) или в фазе синтеза ДНК (S), существенно отличаются: в делящихся клетках уровни экспрессии генов $IFN\alpha$ в 100 раз выше, чем в покоящихся. Форма развития ЦМВ-инфекции в покоящихся фибробластах характеризуется как продуктивная или острая. Наоборот, в активно пролиферирующих клетках наблюдается задержка вирусных синтезов и отсрочка клеточной гибели. Остановка репликации ЦМВ в какой-то мере моделирует состояние латентной инфекции и ассоциирована с высокой транскрипционной активностью генов $IFN\alpha$. В резистентной к ЦМВ линии фибробластов кожи взрослого человека (ФКЧ-1608) исходные и индуцируемые уровни транскрипции мРНК $IFN\alpha$ в 10 раз выше, чем в высокочувствительной линии фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ-977). Кроме того, в клетках, резистентных к вирусу, на раннем сроке инфекции происходит кратковременная индукция транскрипции мРНК $IFN\gamma$, которая отсутствует в высокочувствительных клетках. На поздних сроках инфекции (24-48 ч) в чувствительных клетках (ФЛЭЧ 977 и 110044) ЦМВ частично подавляет транскрипцию мРНК $IFN\alpha$. Механизмы клеточной резистентности и контроля развития ЦМВ-инфекции в диплоидных фибробластах человека преимущественно связаны с генной активностью $IFN\alpha$ и индукцией $IFN\gamma$. Участие генов $IFN\beta$ в защите диплоидных фибробластов человека от ЦМВ не обнаружено.

Адрес для переписки:

Соколова Татьяна Михайловна
123098, Москва, ул. Гамалеи, 16,
ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН,
Лаборатория энзимологии.
Тел.: (499) 190-30-58.
Факс: (499) 190-28-67.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Ключевые слова: фибробласты человека, транскрипция мРНК интерферонов, цитомегаловирусная инфекция.

Sokolova T.M., Fedorova N.E., Medjidova M.G., Terekhov S.M., Uryvaev L.V., Kushch A.A.

MECHANISMS OF CELL RESISTANCE TO CYTOMEGALOVIRUS ARE CONNECTED WITH CELL PROLIFERATION STATE AND TRANSCRIPTION ACTIVITY OF LEUKOCYTE AND IMMUNE INTERFERON GENES

Abstract. Cytomegalovirus (CMV) infection in diploid human fibroblasts (HF) and levels of cell resistance to this virus were shown to be in direct correlation with high α -interferon (IFN α) gene activity and induction of IFN γ gene transcription. Regulation of IFN α mRNA transcription was revealed to be positively associated with cellular DNA synthesis. At the same time, activities of IFN β and IFN γ genes were at the constantly low level and were not induced in DNA-synthetic phase (S-phase) of the cells. Levels of IFN α mRNA synthesis are quite different for G₀- vs S-phase-synchronized HF110044 cell cultures: appropriate values for dividing cells (S-phase) proved to be 100-fold higher than in resting state (G₀). The mode of CMV infection in resting HF-cell could be considered either as acute, or a productive one. On the contrary, proliferating cells exhibited lagging viral syntheses and delayed cell death. Arrest of CMV replication may be, to some extent, comparable with latent infectious state, being associated with high production of IFN α . Both basal and induced levels of IFN α mRNA in CMV-resistant adult human skin fibroblast cells (HSF-1608) were 10-fold higher than in human embryo lung cell line (HELFL-977), which is highly sensitive to CMV. Moreover, a short-time induction of IFN γ genes was observed in resistant cells, whereas no such effect was noticed in highly sensitive cells. CMV reproduction in sensitive cell lines (HELFL-977 and HELFL-110044) partially inhibits IFN α mRNA transcription at the later stages of infection (24 to 48 hours). Thus, cellular resistance and control of CMV infection in diploid fibroblasts are associated predominantly with high transcription of IFN α gene, and with temporal induction of IFN γ gene. We did not reveal any participation of IFN β genes in protection of human diploid fibroblasts from CMV. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 457-466)

Введение

Функционирование системы интерферона (IFN) является важной составляющей антивирусного, антипролиферативного и иммунного ответов на вирусную инфекцию [2]. Человеческие IFN разделены на типы I и II [11, 14]. Первый тип включает многочисленные подтипы IFN α , а также IFN β , IFN ω , IFN τ , IFN κ , IFN ϵ , IFN λ и IFN ξ . Ко второму типу относится IFN γ . В настоящее время наиболее изучены α (лейкоцитарный), β (фибробластный) и γ (иммунный) IFN, которые производятся как лекарственные средства. IFN α представлены в геноме человека группой более чем 20-ти генов, локализованных кластером в 9-й хромосоме (9p22). Рядом с генами IFN α в той же хромосоме расположен и единственный ген IFN β (9p21). Гены IFN типа I не содержат интронов. Ген IFN γ расположен в 12-й хромосоме человека (12q14) и имеет 3 интрона. В настоящее время известна первичная структура экспрессируемых мРНК 12 видов IFN α из нескольких типов клеток и только по одному виду IFN β и IFN γ (MGC cDNA libraries, NCBI, <http://mgc.nci.nih.gov>) [31]. Хотя IFN типа I связываются на поверхности клеток с общим рецептором, состоящим из 2-х трансмембранных субъединиц (AR-1 и AR-2), между IFN α и IFN β имеются отличия в индуцируемых сигнальных процессах [11]. IFN γ имеет другой рецептор связывания с клетками — GR, также состоящий из 2-х субъединиц (GR1 и GR2). После взаимодействия IFN со специфическими рецепторами происходит активация тирози-

новых киназ (JAK) и фосфорилирование латентных цитоплазматических факторов транскрипции (STAT). Транслоцируясь в ядро, они взаимодействуют с регуляторными участками IFN-зависимых генов. В случае IFN α и IFN β сигнальными эффекторами являются JAK-1 и Tyk-2 киназы и IFN-стимулируемый фактор ISGF3, состоящий из 2-х транскрипционных факторов — STAT1 и STAT2. В передаче сигнала IFN γ участвуют тирозиновые киназы JAK-1 и JAK-2 и гомодимер фактора транскрипции STAT1, который, транслоцируясь в ядро, взаимодействует с γ -активируемой последовательностью (GAS), найденной в IFN γ -зависимых генах. При вирусной инфекции происходит преимущественная активация IFN-регулируемого фактора IRF-3, а также дополнительно факторов IRF-7 и IRF-9 [27].

ДНК- и РНК-содержащие вирусы кодируют белки, нарушающие процесс сигнальной активации JAK-STAT IFN-генов [20]. Имеющиеся данные показывают, что вирусы, относящиеся к разным таксономическим группам (герпеса, гриппа, гепатита А, энцефалита, иммунодефицита человека), используют неодинаковые механизмы как индукции, так и подавления активности генов системы IFN [9, 15, 19, 25, 26]. Анализ экспрессии клеточных генов в фибробластах человека, зараженных ЦМВ, выполненный с применением технологии ДНК-чипов, показал изменения активности более чем 250 генов [8, 17, 33]. Наиболее выраженная реакция наблюдалась в группе IFN-зависимых генов и генов, участвующих в контроле

клеточной пролиферации и программированной клеточной гибели (апоптоза). Уровень стимуляции генной активности отдельных IFN-регулируемых генов нативным (инфекционным) ЦМВ по сравнению с инактивированным (неинфекционным) был заметно ниже. Поэтому ЦМВ скорее негативно регулировал клеточный противовирусный ответ. Так, ЦМВ нарушал экспрессию генов IFN и МНС класса II, снижая уровень JAK1 в результате деградации [24]. Установлено, что вирионный белок pp65 ЦМВ подавлял процесс сигнальной трансдукции генов клеточной защиты [7, 9]. Применив специальный метод (SVD-ДНК-чип анализ) для оценки ранее полученных данных действия ЦМВ-инфекции на транскрипцию генов человека, были выявлены новые функционально-важные гены, участвующие в регуляции транскрипции, клеточного цикла, онкогенеза, иммунного и интерферонного ответа [10]. Вместе с тем многие вопросы, связанные с функционированием генов системы IFN в ЦМВ-инфицированных клетках, остаются нерешенными. К ним относятся такие, как зависимость экспрессии индивидуальных генов IFN I и II типа от скорости и формы развития ЦМВ-инфекции (острая и латентная). Не исследована транскрипционная активность генов системы IFN при разных пролиферативных состояниях клеток. Отсутствовали экспериментальные доказательства связи резистентности клеток к ЦМВ инфекции с регуляцией активности IFN-генов на уровне транскрипции.

Цель настоящей работы состояла в выяснении:

- 1) влияния пролиферативного состояния клеток на транскрипционную активность IFN-генов;
- 2) зависимости клеточной резистентности к ЦМВ от транскрипционной активности IFN-генов. Для этого в динамике ЦМВ-инфекции на молекулярном и клеточном уровнях были изучены конститутивная и вирусиндуцированная активность генов IFN α , IFN β и IFN γ в диплоидных фибробластах человека, различающихся по чувствительности к ЦМВ и имеющих в момент заражения разную пролиферативную активность.

Материалы и методы

Клетки. Использовали 3 клеточные линии диплоидных фибробластов: легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-110044 (получена из ГУ НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург) и ФЛЭЧ-977, а также кожи взрослого человека ФКЧ-1608 (получены из Медико-генетического центра РАМН, Москва). Клетки культивировали в среде ДМЕМ (ПанЭко, РФ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, ПанЭко, РФ), глутамина и гентамицина в атмосфере 5% CO₂.

Вирус. ЦМВ, штамм АД 169, был любезно предоставлен проф. D. Emanuel (США). Вирус (инфекционный титр 6 lg БОЕ/мл) вносили в дозе 1-5 БОЕ на клетку (ИМ). После адсорбции вирусный материал удаляли, клетки отмывали и инкубировали в питательной среде ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки как описано выше.

Синхронизация фибробластов в состоянии пролиферативного покоя (G₀) и синтеза ДНК (S) достигалась лишением клеток сывороточных факторов роста на 48 ч с последующей стимуляцией пролиферации путем добавления среды с 15% ЭТС [6]. Эксперименты на контрольных (незараженных) и опытных (зараженных ЦМВ) клетках ставили параллельно. Сроки исследования составляли 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 и 120 ч (см. раздел Результаты).

Содержание мРНК α -, β - и IFN γ определяли с помощью полуквантитативного варианта метода обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) [3, 13]. Для выделения суммарной клеточной РНК использовали метод гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформ [12]. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили на матрице поли(А)РНК с универсальным праймером олиго(дТ)16 и ферментом обратная транскриптаза (200 ед/мкл МВИ «Fermentas» Латвия) при 42°C 1 ч. Аликвоты полученных кДНК без разведения и в 10-кратных разведениях (от 10⁻¹ до 10⁻⁴) амплифицировали в ПЦР со специфическими парами праймеров, рассчитанными нами по известным нуклеотидным последовательностям мРНК IFN α , β и γ [3, 4]. Условия проведения ПЦР: 50 циклов амплификации на матрицах кДНК с термостабильной Taq-полимеразой (5 ед/мкл МВИ «Fermentas», Латвия) при температуре отжига 53-55°C (точно соответствующим рассчитанным для каждой пары праймеров). ПЦР-продукты анализировали электрофорезом в агарозных гелях по окраске бромистым этидием. Результаты фотографировали и анализировали с помощью видеосистемы «Gel Imager» и «Gel analysis». По интенсивности поглощения специфической полосы в геле оценивали относительное количество ПЦР-продуктов. Размер специфического продукта устанавливали по положению маркеров из набора ДНК 100-1000 н.п. (МВИ «Fermentas», Латвия). Размеры ДНК-продуктов: IFN α – 383 н.п., IFN β – 393 н.п. и IFN γ – 469 н.п. Первичная структура рассчитанных ПЦР-праймеров и доказательство специфичности полученных ПЦР-продуктов в блот- и дот-гибридизации с внутренними зондами описаны нами ранее [Соколова и др., 2005]. Проведено выравнивание всех известных нуклеотидных последовательностей, экспрессируемых мРНК разных видов α -, β - и γ -интерферонов,

которые представлены последовательностями MGC в NCBI Генбанке (<http://mgc.ncbi.nih.gov>) [31].

Анализ взаимодействия использованных олигонуклеотидных праймеров с исследованными матрицами показал, что пара праймеров для IFN α универсальна. Прямой праймер безошибочно связывается с кДНК 5-ти разновидностей IFN α (4, 7, 8, 17 и 21), а обратный – комплементарен участкам мРНК 7-ми вариантов IFN α (1, 2, 4, 7, 13, 14 и 21) (рис. 1). Пары праймеров для мРНК IFN β и IFN γ являются высокоспецифичными, так как связываются только с собственными матрицами [3].

Выявление вирусных белков (IEp72, pp65, gB) в клетках на разных сроках ЦМВ-инфекции проводили методом иммуоферментного анализа *in situ* с использованием моноклональных антител (МКА) [6]. Клетки, окрашенные МКА, подсчитывали и выражали в процентах от общего числа клеток.

Инфекционный титр ЦМВ определяли микрометодом «черных бляшек» под агаровым покрытием с помощью смеси МКА к структурным ЦМВ-белкам (pp65 и gB) [1].

Результаты

Развитие ЦМВ инфекции в культурах диплоидных фибробластов, отличающихся пролиферативным состоянием и чувствительностью к вирусу

В изученных линиях диплоидных фибробластов человека ФЛЭЧ-110044, ФЛЭЧ-977 и ФКЧ-

1608, находящихся в момент заражения в 2-х пролиферативных состояниях покоя (G_0) или в фазе синтеза ДНК (S), сравнили динамику развития инфекционного процесса, которая характеризовалась: 1) скоростью синтеза вирусных белков на разных стадиях репродукции ЦМВ; 2) продукцией инфекционного вируса и 3) продолжительностью жизни зараженных клеток. Данные, представленные на рисунке 2а показывают, что в клетках линии ФЛЭЧ-110044 активность развития инфекционного процесса зависит от их пролиферативного состояния: в состоянии покоя (G_0) развитие ЦМВ инфекции в фибробластах человека было более быстрым по сравнению с фазой синтеза ДНК (S) (использована высокая инфицирующая доза вируса – ИМ 1-5 БОЕ/кл). Скорость синтеза позднего белка оболочки gB и продукция инфекционно активного вируса были существенно выше в покоящихся ФЛЭЧ. В активно делящихся ФЛЭЧ наблюдалась задержка синтеза позднего вирусного белка (на 48 ч) и снижение на 1 lg титра инфекционного вируса (на рис. 2а сроки 3-48 ч и 72-120 ч соответственно). Наблюдение за жизнеспособностью клеток позволило установить, что гибель большей части клеточной популяции (ЦПД вируса) в культуре покоящихся ФЛЭЧ-110044 происходила на 4-5 день. В пролиферирующих клетках клеточная гибель наступала намного позднее, только на 10-11 день, и сопровождалась патологическими митозами [6].

Сравнительное изучение клеточной резистентности к ЦМВ проводили на 2-х клеточных линиях фибробластов человека (ФЛЭЧ-977 и ФКЧ-

А		Б	
alpha 4	GGCSTTGATACTCCTGGCACA	alpha 4	AGAAATACAGCCCTTGTGCCT
alpha 7	alpha 7
alpha 21	alpha 21
alpha 17	alpha 17
alpha 8	alpha 8T.....
alpha 10G...	alpha 10	G.....
alpha 1	.A.....G.....	alpha 1
alpha 13G.....	alpha 13
alpha 2	.A.....G.....	alpha 2
alpha 14	.A.T.....G....A.....	alpha 14
alpha 6	.A..A....G.....	alpha 6	.A..G.....
alpha 5	.A.T.....GA.AA.....	alpha 5A.
omega 1	CA.....G.G..T...CAC..	omega 1GAC.....
epsilon 1	AAGT..A.A....T..AATA.	epsilon 1	..G.C.....A.C.....

Рисунок 1. Гомология участков мРНК разных подтипов семейства IFN α в местах взаимодействия с прямым (А) и обратным (Б) праймерами

Примечания. Последовательность обратного праймера является комплементарной мРНК IFN α . Показаны нуклеотидные отличия участков мРНК IFN α и родственных омега- и эпсилон-ИФН. Сплошная линия обозначает совпадающие нуклеотиды.

1608) при заражении их низкой дозой вируса 0,2 БОЕ/кл в состоянии покоя (рис. 26). Видно, что в эмбриональных клетках легкого (ФЛЭЧ-977) скорость и уровень накопления ранних (IEp72 и pp65) и позднего (gB) вирусных белков выше по сравнению с клетками кожи взрослого человека (ФКЧ-1608). Продукция инфекционного вируса чувствительными эмбриональными клетками была в 2,5 раза больше (6 Ig БОЕ/мл) и их гибель наступала раньше (на 2-3 день). На основании этих данных линия клеток ФЛЭЧ-977 отнесена к высокочувствительной к ЦМВ, а линия клеток ФКЧ-1608 обладала резистентностью к ЦМВ [5].

Транскрипционная активность IFN-генов в фибробластах человека, отличающихся пролиферативным состоянием и чувствительностью к ЦМВ

Сравнительное определение конститутивных уровней экспрессии IFN-генов в диплоидных фибробластах человека, находившихся в состоянии пролиферативного покоя и в фазе синтеза ДНК показало, что в S-фазе клеточного цикла у фибробластов линии ФЛЭЧ-110044 активность генов IFN α в 100 раз выше по сравнению с покоящимися клетками этой линии, синхронизированными в G₀ (рис. 3а). Это означает, что в фибробластах человека транскрипционная активность генов IFN α позитивно коррелирует

с уровнем синтеза клеточной ДНК. Можно предположить, что в регуляции генов IFN α принимают участие известные регуляторы клеточного цикла и синтеза клеточной ДНК (p53, циклин-зависимых киназ, E2F и др.) [18]. Высокие уровни транскрипции мРНК IFN α в фазе синтеза ДНК, которые определяются полуколичественной ОТ-ПЦР в разведении кДНК в 1000 раз, не сопровождаются секрецией из клеток биологически активного IFN (данные не приводятся).

Параллельно, в разные сроки ЦМВ инфекции (6, 12, 24 и 48 ч), исследовали зараженные и незараженные клетки линии ФЛЭЧ-110044, находящиеся в момент внесения вируса в состоянии G₀ или S. В динамике ЦМВ инфекции высокая транскрипционная активность генов IFN α сохранялась в клетках, зараженных в фазе синтеза ДНК (рис. 3б, показан срок 24 ч). В то же время в клетках, инфицированных в состоянии покоя, уровни экспрессии генов IFN α по-прежнему оставались более низкими. Важно отметить, что в этих клетках к 24 ч инфекции ЦМВ вызывал заметное угнетение транскрипции мРНК IFN α по сравнению с контролем (дорожки 1 и 2, рис. 3б). Подобного ингибиторного действия ЦМВ не было обнаружено в фибробластах, инфицированных в фазе синтеза ДНК.

Сопоставлены уровни экспрессии генов IFN α в 2-х линиях человеческих фибробластов, охарактеризованных нами выше как чувствительная

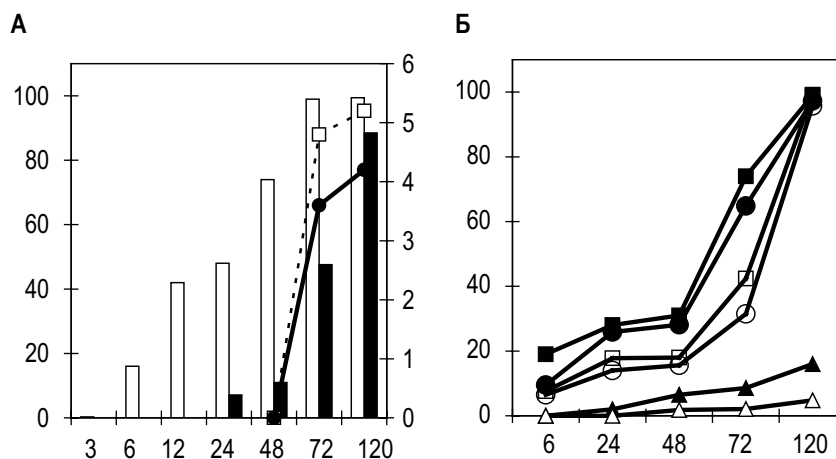


Рисунок 2. Синтез вирусных белков и продукция инфекционного ЦМВ в эмбриональных фибробластах легкого человека ФЛЭЧ-110044, находящихся в различных пролиферативных состояниях

Примечания. А. По оси ординат слева – количество клеток, окрашенных МКА к gB, %; справа – титр инфекционного ЦМВ, Ig БОЕ/мл. По оси абсцисс – время после заражения, ч. Диаграмма показывает динамику синтеза позднего структурного белка gB, линейный график – продукцию инфекционного вируса. Светлые столбики и пунктирная линия – клетки, зараженные ЦМВ в состоянии покоя (G₀); черные столбики и сплошная линия – клетки, зараженные в фазе синтеза ДНК (S-фаза). Множественность заражения 1-5 БОЕ/кл. Динамика синтеза белков ЦМВ в высокочувствительной ФЛЭЧ-977 (легкого эмбриона) и резистентной ФКЧ-1608 (кожи взрослого донора) культурах фибробластов человека.

Б. По оси ординат – количество клеток, окрашенных МКА, %. По оси абсцисс – время после заражения, ч. Количество клеток, окрашенных МКА к IEp72 в клетках ФЛЭЧ-977 (■) и ФКЧ-1608 (□); МКА к pp65 в клетках ФЛЭЧ-977 (●) и ФКЧ-1608 (○); МКА к gB в клетках ФЛЭЧ-977 (▲) и ФКЧ-1608 (Δ). Множественность заражения ЦМВ 0,2 БОЕ/кл.

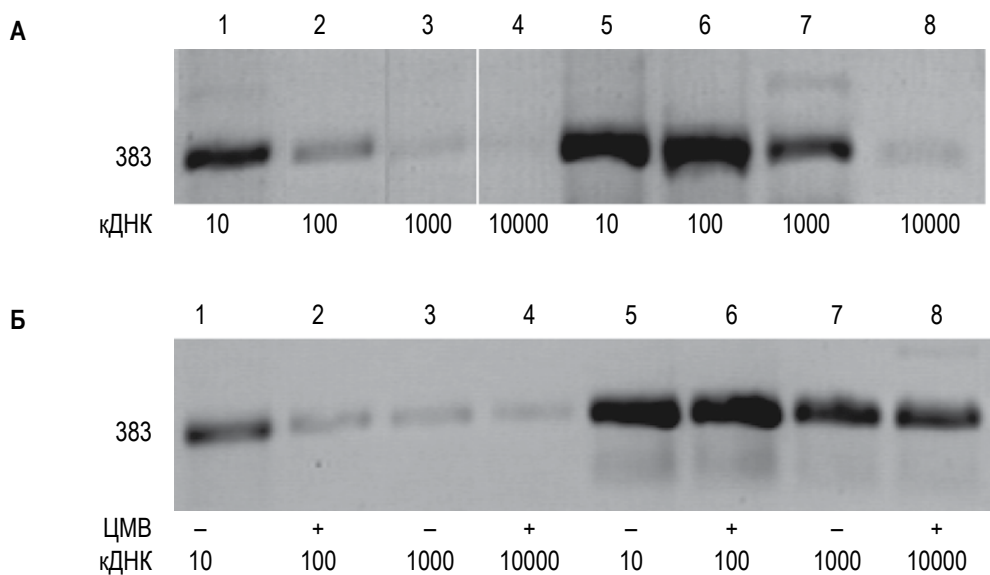


Рисунок 3. Уровни транскрипции мРНК $IFN\alpha$ в диплоидных фибробластах чувствительной к ЦМВ линии легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-110044, синхронизированных в состоянии покоя (G_0 , дорожки 1-4) и синтеза ДНК (S, дорожки 5-8)

Примечания. **А** – в момент заражения ЦМВ (0 ч); **Б** – через 24 ч после заражения. Инфицированные клетки обозначены ЦМВ (+), контрольные ЦМВ (-). Слева указан размер ПЦР-продукта $IFN\alpha$ (383 н.п.). Внизу указаны 10-кратные разведения кДНК в ПЦР.

(ФЛЭЧ-977) и резистентная (ФКЧ-1608) к ЦМВ клеточные культуры. В резистентной к ЦМВ линии ФКЧ-1608 конститутивные уровни транскрипции мРНК $IFN\alpha$ были в 10 раз выше, чем в высокочувствительной линии ФЛЭЧ-977 (рис. 4а, клетки синхронизированы в состоянии G_0). Отличия в обеих линиях клеток были выявлены до заражения (0 ч, дорожки 1-4) и через 6 и 12 ч после заражения клеток (дорожки 5-12). На ранних сроках инфекции ЦМВ индуцировал синтез мРНК $IFN\alpha$, но уровень ее транскрипционной активности оставался выше в резистентных к ЦМВ ФКЧ по сравнению с чувствительными ФЛЭЧ. Кроме того, в чувствительной линии ФЛЭЧ-977 ЦМВ вызывал заметное угнетение синтеза мРНК $IFN\alpha$ на поздних сроках инфекции (24 и 48 ч) (рис. 4б), что подтверждает результат, представленный выше на клетках ФЛЭЧ-110044 (рис. 3б). Полученные данные позволяют заключить, что резистентность клеток к ЦМВ инфекции прямо зависит от пролиферативного состояния клеток и активности генов $IFN\alpha$.

Уровни синтеза мРНК $IFN\beta$ и $IFN\gamma$ в изученных линиях фибробластов человека по данным полуколичественного ОТ-ПЦР анализа были очень низкими (невывяляемыми в неразведенной кДНК до заражения) и этим существенно отличались от мРНК $IFN\alpha$. Транскрипционная активность генов $IFN\beta$ и $IFN\gamma$ не зависела от пролиферативного состояния клеток и не возрастала в фазе синтеза ДНК (рис. 5, показаны ПЦР-продукты $IFN\gamma$). При изучении активности гена $IFN\gamma$ было обнаружено,

что ЦМВ избирательно стимулировал его транскрипцию на раннем сроке инфекции (6 ч) только в устойчивых к вирусу фибробластах линии ФКЧ-1608 (рис. 5, дорожка 8). В высокочувствительных клетках ФЛЭЧ-977, зараженных ЦМВ, активации гена $IFN\gamma$ не происходило. Стимуляция транскрипции мРНК $IFN\gamma$ также наблюдалась в линии клеток ФЛЭЧ-110044, менее чувствительных к ЦМВ, чем ФЛЭЧ-977, но только на более позднем сроке инфекции 24 ч при заражении их в состоянии G_0 (рис. 5, дорожка 2). Сравнительное изучение уровней генной активности $IFN\beta$ в клеточных линиях с разной чувствительностью к ЦМВ не показало заметных отличий в низких уровнях экспрессии гена. ЦМВ вызывал небольшую стимуляцию транскрипции мРНК $IFN\beta$ к 12 ч инфекции в высокочувствительной культуре ФЛЭЧ-977 (данные не приводятся). Поэтому уровень резистентности исследованных линий фибробластов человека к ЦМВ не был связан с уровнями экспрессии мРНК $IFN\beta$.

Обсуждение

В организме человека ЦМВ преимущественно находится в латентной форме. Активация ЦМВ-инфекции происходит на фоне иммунодефицитных состояний [2, 23]. ЦМВ обладает рядом механизмов иммуносупрессии и ускользания от иммунного ответа организма. Продукты генов US2, US3, US6, US11 вирусного генома интерферируют с процессингом и презентацией антигенов. Более того, ген UL18 ЦМВ кодирует гомолог HLA I класса, а вирусный белок pp65 селектив-

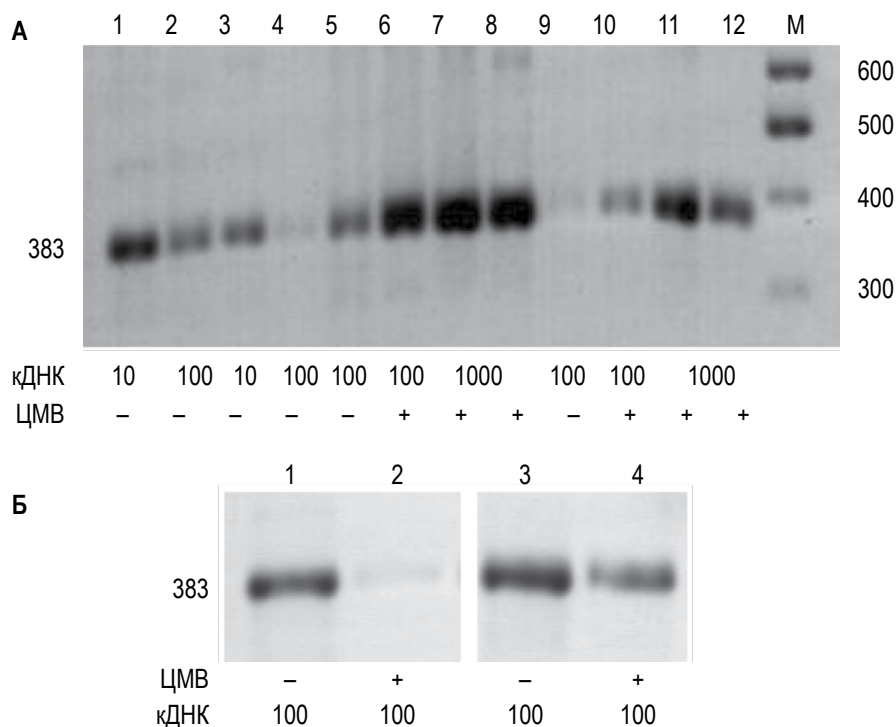


Рисунок 4. Экспрессия генов $IFN\alpha$ в высокочувствительной ФЛЭЧ-977 и резистентной ФКЧ-1608 к ЦМВ культурах диплоидных фибробластов человека

Примечания. Фибробласты синхронизированы в состоянии покоя G_0 . Инфицированные клетки обозначены ЦМВ (+), контрольные ЦМВ (-). Дорожки: **А** – ФКЧ-1608 (1, 2 – 0 ч; 5, 6, 7 – 6 ч и 8 – 12 ч); ФЛЭЧ-977 (3, 4 – 0 ч; 9, 10, 11 – 6 ч и 12 – 12 ч); М – маркер ДНК 100-1000 н.п.; **Б** – ФЛЭЧ 977 (1, 2 – 24 ч; 3, 4 – 48 ч). Другие обозначения см. на рис. 3.

но подавляет образование антигенных пептидов [20, 27]. Представленные данные впервые свидетельствуют о существовании в фибробластах человека IFN -зависимого транскрипционного механизма контроля развития ЦМВ-инфекции, в котором ведущая роль принадлежит генам $IFN\alpha$. Клеточная резистентность и задержка репродукции ЦМВ в пролиферирующих фибробластах человека коррелировала с исходно более высокой активностью генов $IFN\alpha$. Покоящиеся фибробласты с более низкими уровнями транскрипции мРНК $IFN\alpha$ оказались более чувстви-

тельными к ЦМВ. Вместе с тем, конститутивная активность генов $IFN\alpha$, вероятно, обусловлена тканевой специфичностью и возрастным фактором источника получения клеточной культуры. Клетки кожи взрослого донора (ФКЧ-1608) с более высокой конститутивной активностью генов $IFN\alpha$ были более резистентными к ЦМВ-инфекции по сравнению с клетками легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ-977 и ФЛЭЧ-110044).

Согласно нашим данным, в механизмах регуляции процессов синтеза $IFN\alpha$, β и γ в диплоидных фибробластах человека, по-видимому, имеются существенные отличия. Установлено, что в фазе синтеза ДНК транскрипционная активность генов $IFN\alpha$ существенно возрастала (в 100 раз) и достигала очень высоких уровней (определялась методом ОТ-ПЦР при разведении кДНК в 1000 раз). В отличие от $IFN\alpha$, транскрипция генов $IFN\beta$ и $IFN\gamma$ не зависела от пролиферативного состояния фибробластов и находилась на низком уровне. Включение или выключение IFN -генов зависело от стадии и формы развития ЦМВ-инфекции. В клетках, которые в момент заражения ЦМВ фибробласты человека были синхронизированы в фазе синтеза ДНК, форма развития ЦМВ-инфекции напоминала латентную (наблюдалась задержка синтеза ранних белков и вирусной репродукции). Состояние латентно-

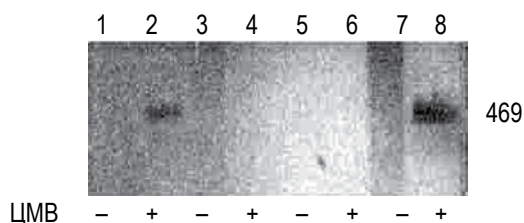


Рисунок 5. Индукция мРНК $IFN\gamma$ в чувствительных и резистентных к ЦМВ фибробластах человека при вирусной инфекции

Примечания. Инфицированные ЦМВ клетки обозначены ЦМВ (+), контрольные ЦМВ (-). Дорожки: чувствительная ФЛЭЧ-110044 (1, 2 – G_0 ; 3, 4 – S-фаза, 24 ч); высокочувствительная ФЛЭЧ-977 (5, 6 – G_0 , 6 ч); резистентная ФКЧ-1608 (7, 8 – G_0 , 6 ч). Размер ПЦР-продукта $IFN\gamma$ (469 н.п.) указан справа.

сти развивалось на фоне высокой транскрипционной активности генов $IFN\alpha$. Наоборот, при заражении фибробластов в состоянии покоя, когда уровни транскрипции мРНК $IFN\alpha$ были в 10-100 раз ниже, форма развития ЦМВ-инфекции приобретала острый, продуктивный характер. При высокой множественности заражения покоящихся фибробластов почти все чувствительные клетки (88-97%) к 24 ч инфекции содержали вирусные белки Iер72 и рр65 и около 50% клеток – белок gB. На ранних сроках острой вирусной инфекции (заражение чувствительных к ЦМВ неделящихся фибробластов) ЦМВ наиболее сильно активировал транскрипцию генов $IFN\alpha$ и фермента 2', 5'-ОАС [5]. Значительно слабее и только кратковременно ЦМВ индуцировал синтез мРНК $IFN\beta$ и $IFN\gamma$. При этом стимуляция активности гена $IFN\gamma$ позитивно коррелировала с клеточной резистентностью к ЦМВ, а повышенная экспрессия гена $IFN\beta$, наоборот, – с чувствительностью клеток к вирусу. Возможно, что разные штаммы ЦМВ отличаются IFN -индуцирующей активностью (в работе использован штамм AD169). По данным литературы [22], штамм Towne ЦМВ в чувствительной культуре фибробластах человека стимулировал транскрипцию гена $IFN\beta$ через 3 и 6 ч после заражения, при этом в культуральную среду секретировался биологически активный $IFN\beta$. В стимуляции экспрессии гена $IFN\beta$ участвовали универсальный фактор NF- κ B и фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3-K). Сверхранний вирусный белок IE86 эффективно блокировал индукцию $IFN\beta$ [32]. Наиболее вероятными активаторами генов $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ были вирионный белок gB (в условиях высокой множественности заражения) и сверхранний белок IE72, который образовывался в первые 3 ч острой ЦМВ-инфекции и способен индуцировать синтез IFN -регулируемых факторов транскрипции (IRF1, IRF3 и др.) [27,29]. Однако последующее развитие острой ЦМВ-инфекции сопровождалось накоплением ингибиторов транскрипции генов $IFN\alpha$. По нашим данным, к 24 ч инфекции в чувствительных линиях ФЛЭЧ в продуктах ЦМВ репликации содержались антагонисты генной активности $IFN\alpha$.

В ЦМВ-геноме найден гомолог клеточного IL-10, который играет ключевую роль в контроле экспрессии генов IFN и антигенов главного комплекса гистосовместимости (HLA), подавляет пролиферацию лимфоцитов и моноцитов и продукцию ими провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1, IL-6) [21, 30]. По своему действию IL-10 относится к иммуносупрессивным лимфокинам. Установлено, что он подавляет ответ клеток на $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, блокируя транскрипционный фактор STAT1 путем активации

универсального ингибитора SOCS. Недавно показано, что белок Iер72 в ядрах инфицированных клеток, непосредственно взаимодействуя с факторами транскрипции STAT1 и STAT2, предотвращает их ассоциацию и фактора IRF9 с промоторами IFN -стимулированных генов [26]. По механизму действия белок Iер72 имеет сходство с недавно открытым у мышиноного ЦМВ белком M27 (79 kDa), который инактивирует сигнальную трансдукцию, вызываемую $IFN\gamma$ с участием STAT2 [34]. Структурный вирусный белок рр65 (UL83), по данным литературы [7, 9], также способен оказывать ингибирующее действие на индукцию и экспрессию антивирусных генов. Остается неизвестным, могут ли известные антагонисты антивирусного действия IFN (ингибиторы сигнальной трансдукции IFN -зависимых генов) неструктурный ранний вирусный белок Iер72 и основной структурный белок рр65, а также дсРНК-связывающий белок TRS1 и белок IRS1 [16] негативно влиять на экспрессию генов $IFN\alpha$. По нашим данным, скорость и уровень синтеза вирусных белков Iер72 и рр65 в высокочувствительных клетках были значительно выше, чем в резистентных. Как стимулирующий, так и ингибиторный эффекты ЦМВ на экспрессию генов $IFN\alpha$ имели временную зависимость и прямо зависели от динамики синтеза каждого из этих белков. Поэтому, по нашему мнению, из 2-х исследованных вирусных белков наиболее вероятным ингибитором транскрипции генов $IFN\alpha$ был вирионный белок рр65, который накапливался позднее Iер72 и к 24 ч инфекции содержался почти в 100% клеток. К сожалению, остались не исследованными динамика и уровни синтеза клеточного и вирусного IL-10 в диплоидных фибробластах человека, отличающихся пролиферативным состоянием и чувствительностью к ЦМВ.

Из данных, полученных нами на линиях клеток с разной чувствительностью к ЦМВ, следует, что для развития ЦМВ инфекции транскрипционная активность генов $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ более существенна, чем гена $IFN\beta$. Так, высокая активность генов $IFN\alpha$ в фазе синтеза ДНК ассоциируется с остановкой репликации ЦМВ, в какой-то мере моделируя состояние латентной инфекции. В механизме клеточной резистентности к ЦМВ также имеет значение кратковременная стимуляция активности гена $IFN\gamma$. Индукция гена $IFN\beta$, наоборот, выражена слабо и происходит только при острой инфекции в высокочувствительных к ЦМВ клетках. Эти данные совместно с результатами недавно опубликованной работы вносят коррективы в представления о роли $IFN\beta$, который называют также фибробластным, в защите диплоидных фибробластов человека от вирус-

ной (по крайней мере, от цитомегаловирусной) инфекции [26]. Таким образом, резистентность фибробластов человека к ЦМВ прямо коррелирует с конститутивным уровнем генной активности IFN α и сохранением его высокого уровня в процессе вирусной репликации. Ранее нами было показано, что в исследованных линиях клеток уровень репродукции ЦМВ зависит от активности гена IFN-зависимого фермента OAS1 [5]. Сочетанное влияние OAS, IFN α и IFN γ , по-видимому, является частью общего механизма ограничения репликации ЦМВ в фибробластах человека. Таким образом, развитие ЦМВ инфекции находится под контролем экспрессии генов лейкоцитарного и иммунного IFN. В свою очередь, продукты репликации ЦМВ негативно регулируют уровень активности IFN α генов на поздних сроках инфекции.

Список литературы

1. Вирусология. Методы / Под ред. Мейхи Б. — М.: Мир, 1988. — 290 с.
2. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы — М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2005. — 368 с.
3. Соколова Т.М., Бибикина О.В., Быстров Н.С., Урываев Л.В. Экспрессия генов системы интерферона и клеточного апоптоза в пробах крови человека // *Вопр. вирусол.* — 2005. — № 1. — С. 19-23.
4. Соколова Т.М., Урываев Л.В. Способ определения цитокинового статуса человека на генетическом уровне. — Пат. на изобретение № 2181177 от 27.04.2002, РФ.
5. Соколова Т.М., Федорова Н.Е., Меджидова М.Г., Терехов С.М., Урываев Л.В., Куш А.А. Регуляция уровня генной активности 2', 5'-олигоденилатсинтетазы в фибробластах человека при цитомегаловирусной инфекции // *Вопр. вирусол.* — 2007. — № 1. — С. 28-36.
6. Федорова Н.Е., Меджидова А.А., Меджидова М.Г., Куш А.А. Блок клеточной пролиферации и патологии митоза в клетках, инфицированных цитомегаловирусом: роль периода клеточного цикла в момент заражения // *Докл. АН.* — 2003. — Т. 392. — № 4. — С. 552-555.
7. Abate D.A., Watanabe S., Mocarski E.S. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response // *J. Virol.* — 2004. — Vol. 78. — P. 10995-11006.
8. Browne E., Wing B., Coleman D., Shenk T. Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblast: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs // *J. Virol.* — 2001. — Vol. 75. — P. 12319-12330.
9. Browne E.P., Shenk T. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 11439-11444.
10. Challcombe J.F., Rechtsteiner A., Gottardo R., Rocha L.M., Browne E.P., Shenk T., Altherr M.R., Brettin T.S. Evaluation of the host transcriptional response to human cytomegalovirus infection // *Physiol. Genomics.* — 2004. — Vol. 18. — P. 51-62.
11. Chen J., Baig E., Fish E.N. Diversity and relatedness among type I interferons // *J. Interferon Cytokine Res.* — 2004. — Vol. 24. — P. 687-698.
12. Chomzynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.* — 1987. — Vol. 162. — P. 156-159.
13. Dallman M.J., Porter A.C.G. Semi-quantitative PCR for the analysis of gene expression // *PCR. A practical approach* / Ed. by M.J. McPherson et al. — Oxford, 1993. — P. 215-224.
14. Diaz M.O., Bohlander S., Allen G. Nomenclature of the human interferon genes // *J. Interferon. Cytokine Res.* — 1996. — Vol. 16. — P. 179-180.
15. Goswami B.B., Kulka M., Ngo D., Cebula T.A. Apoptosis induced by a cytopathic hepatitis A virus is dependent on caspase activation following ribosomal RNA degradation but occurs in the absence of 2'-5' oligoadenylate synthetase // *Antiviral Res.* — 2004. — Vol. 63. — P. 153-166.
16. Hakki M., Geballe A.P. Double-stranded RNA binding by human cytomegalovirus pTRSI // *J. Virol.* — 2005. — Vol. 79. — P. 7311-7318.
17. Hertel L., Mocarski E.S. Global analysis of host cell gene expression late during cytomegalovirus infection reveals extensive dysregulation of cell cycle gene expression and induction of pseudomitosis independent of US28 function // *J. Virol.* — 2004. — Vol. 78. — P. 11988-12011.
18. Iyer V.R., Eisen M.B., Ross D.T., Schuler G., Moore T., Lee J.C., Trent J.M., Staudt L.M., Hudson J.Jr., Boguski M.S., Lashkari D., Shalon D., Botstein D., Brown P.O. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum // *Science.* — 1999. — Vol. 283. — P. 83-87.
19. Karpov A.V. Endogenous and exogenous interferons in HIV-infection // *Eur. J. Med. Res.* — 2001. — Vol. 6. — P. 507-524.
20. Knipe D.M., Samuel C.E., Palese P. Virus-host cell interactions // *Fields virology* / Ed. by D.M. Knipe et al. — Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001. — P. 133-170.
21. Kotenko S.V., Sacconi S., Izotova L.S., Microchnitchenko O.V., Pestka S. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmv IL-10) // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 1695-1700.
22. Lee G.C., Yi H.A., Lee C.H. Stimulation of interferon-beta gene expression by human cytomegalovirus via nuclear factor kappa B and

phosphatidylinositol 3-kinase pathway // *Virus Res.* – 2006. – Vol. 117. – P. 209-214.

23. Loenen W., Bruggeman C., Wiertz E. Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology // *Semin. Immunol.* – 2001. – Vol. 13. – P. 41-49.

24. Miller D.M., Rahill B.M., Boss J.M. Human cytomegalovirus inhibits major Histocompatibility complex class II expression by disruption of the JAK/STAT pathway // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 187. – P. 675-683.

25. Ohyama K., Sano T., Toyoda H. Predominant contribution of IFN-beta expression to apoptosis induction in human uterine cervical fibroblast cells by influenza-virus infection // *Biol. Pharm. Bull.* – 2004. – Vol. 27. – P. 1750-1757.

26. Paulus Ch., Krauss S., Nevels M. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 3840-3845.

27. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons // *Clin. Microb. Rev.* – 2001. – Vol. 14. – P. 778-809.

28. Silvia O.J., Pantelic L., Mackenzie J.S., Shellam G.R., Paradimitriou J., Urosevic N. Virus spread, tissue inflammation and antiviral response in brains of flavivirus susceptible and resistant mice acutely infected with Murray Valley encephalitis virus // *Arch. Virol.* – 2004. – Vol. 149. – P. 447-464.

29. Simmen K., Singh J., Luukkonen B., Lopper M., Bittner A., Miller N., Jackson M., Compton T., Fruh K. Global modification of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 7140-7145.

30. Spenser J.V., Lockridge K.M., Barry P.A., Lin G., Tsang M., Penfold M.E., Shall T.J. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10 // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76. – P. 1285-1292.

31. Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D., Collins F.S., Wagner L.,

Shenmen C.M., Schuler G.D., Altschul S.F., Zeeberg B., Buetow K.H., Schaefer C.F., Bhat N.K., Hopkins R.F., Jordan H., Moore T., Max S.I., Wang J., Hsieh F., Diatchenko L., Marusina K., Farmer A.A., Rubin G.M., Hong L., Stapleton M., Soares M.B., Bonaldo M.F., Casavant T.L., Scheetz T.E., Brownstein M.J., Usdin T.B., Toshiyuki S., Carninci P., Prange C., Raha S.S., Loquellano N.A., Peters G.J., Abramson R.D., Mullahy S.J., Bosak S.A., McEwan P.J., McKernan K.J., Malek J.A., Gunaratne P.H., Richards S., Worley K.C., Hale S., Garcia A.M., Gay L.J., Hulyk S.W., Villalon D.K., Muzny D.M., Sodergren E.J., Lu X., Gibbs R.A., Fahey J., Helton E., Ketteman M., Madan A., Rodrigues S., Sanchez A., Whiting M., Madan A., Young A.C., Shevchenko Y., Bouffard G.G., Blakesley R.W., Touchman J.W., Green E.D., Dickson M.C., Rodriguez A.C., Grimwood J., Schmutz J., Myers R.M., Butterfield Y.S.N., Krzywinski M.I., Skalska U., Smailus D.E., Schnerch A., Schein J.E., Jones S.J.M., Marra M.A. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 16899-16903.

32. Taylor R.T., Bresnahan W.A. Human cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production // *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79. – P. 3873-3877.

33. Zhu H., Cong J.P., Mamtora J., Gingeras T., Shenk T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 14470-14475.

34. Zimmerman A., Trilling M., Wagner M., Wilborn M., Bubic I., Jonjic S., Koszinowski U., Hengel H. A cytomegalovirus protein reveals a dual role for STAT2 in IFN γ signaling and antiviral responses // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201. – P. 1543-1553.

поступила в редакцию 20.03.2007

принята к печати 08.04.2007