



УДК 578.(233.4+245)

ПОЗДНЯЯ АКТИВАЦИЯ ИНТЕРФЕРОНИНДУЦИРУЕМЫХ ГЕНОВ *IFI-54K* И *IFI-56K* ПРИ ИНФЕКЦИИ КЛЕТОК ЛИНИИ RH ЧЕЛОВЕКА ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

© 2003 г. Б. Г. Гаврилов^{**}, Г. С. Монастырская*, Т. В. Великодворская*, О. Б. Филюкова*, С. Н. Коновалова^{**}, А. А. Качко^{**}, Е. В. Протопопова^{**}, Л. Г. Николаев*, В. Б. Локтев^{**}, Е. Д. Свердлов*

* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{**} Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Кольцово, Новосибирская обл.

Поступила в редакцию 14.06.2002 г. Принята к печати 05.09.2002 г.

Для исследования индуцируемых и супрессируемых клеточных генов в клетках линии RH почек эмбриона человека при инфекции вирусом клещевого энцефалита использован метод вычитающей гибридизации. Обнаружено, что в инфицированных клетках в 50–100 раз повышена экспрессия стимулируемых интерфероном генов *IFI-54K* и *IFI-56K*.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; вычитающая гибридизация; интерферониндуцируемые гены.

ВВЕДЕНИЕ

Клещевой энцефалит – острое лихорадочное вирусное заболевание человека, характеризующееся развитием менингоэнцефалитов с выраженными парезами и параличами. В последние годы в России ежегодно регистрируется 5–10 тыс. случаев клещевого энцефалита, причем за последние 25 лет уровень заболеваемости клещевым энцефалитом увеличился приблизительно в 7 раз [1]. Возбудителем заболевания является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), принадлежащий к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Вирионы ВКЭ содержат нуклеокапсид с упакованной одноцепочечной РНК, состоящей из ~11000 нт и кодирующей 10 вирусных полипептидов. Нуклеокапсид окружен вирусной мембраной, содержащей вирусные белки Е и М [2].

Взаимодействие вируса с клеткой во многих случаях включает в себя использование им многочисленных способов преодоления защитных систем хозяина, например, системы интерферонов, интерлейкина-1 или фактора некроза опухолей, участвующего в каскаде, приводящем к апоптозу [3]. Генетические системы, вовлеченные во взаимоотношения между вирусами и клетками-хозяевами, представляют собой сложный комплекс,

включающий, в частности, гены интерферонов и белков, продуцируемых клеткой в ответ на стресс.

Изменение экспрессии клеточных генов при вирусной инфекции может вызываться как непосредственно воздействием вирусных продуктов на клеточные регуляторные системы, так и опосредованно, путем воздействия на регуляторные системы клетки клеточных же продуктов, индуцированных вирусами. В свою очередь продукты, кодируемые хозяйскими генами, могут участвовать в регуляции экспрессии вирусных генов [4–7].

Индукция клеточных генов при вирусной инфекции, по-видимому, включает каскадные механизмы, когда продукты, непосредственно индуцируемые вирусом, в свою очередь индуцируют или репрессировывают множество клеточных генов. Наиболее изученной каскадной системой отклика клетки на вирусную инфекцию является система интерферонов. Многие вирусы индуцируют синтез интерферонов, которые в свою очередь влияют на разнообразные биохимические процессы в клетке и, в частности, способны защищать клетки от вирусной инфекции [8, 9]. Известно, что флавивирусы также способны индуцировать синтез интерферонов типа I [10, 11].

Несмотря на значительную медицинскую важность флавивирусов, детали их взаимодействий с клетками инфицируемых организмов изучены крайне недостаточно, особенно это касается взаимодействия вируса с генетическими и биохимическими системами клеток. Причина этого состоит в том, что вплоть до недавнего времени возмож-

Сокращения: ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции.

Автор для переписки (эл. почта: bgg@humgen.siocb.ras.ru; тел.: (095) 330-69-92; факс: (095) 330-65-38).

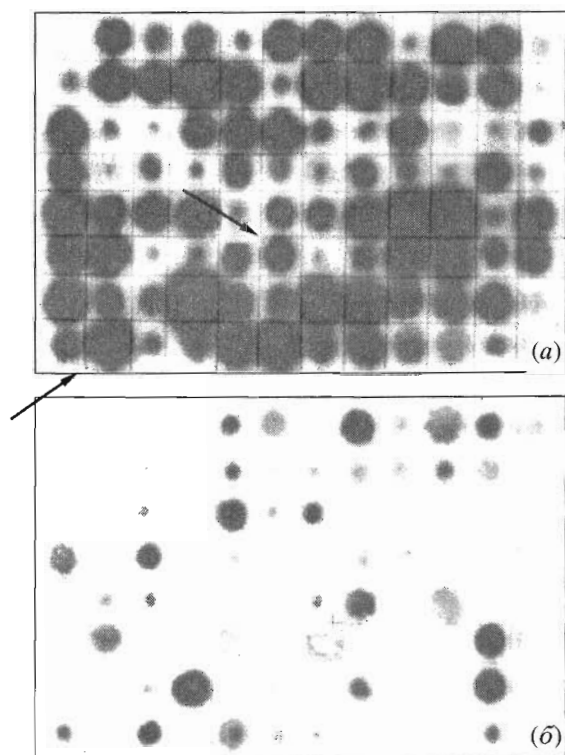


Рис. 1. Гибридизация предположительно позитивно регулируемых клонов после вычитания контрольной кДНК из кДНК клеток RH, зараженных ВКЭ в течение 24 ч. Идентичные фильтры гибридизовали с зондами, приготовленными из инфицированной кДНК минус контрольная (а) или из контрольной кДНК минус инфицированная (б). Дифференциально экспрессирующиеся клоны, соответствующие мРНК генов *IFI*, указаны стрелками.

ности полногеномного анализа изменений экспрессии генов при вирусной инфекции были ограничены отсутствием соответствующих методов и, в еще большей степени, недостаточностью информации о структуре генома человека.

В последние годы был значительно усовершенствован метод вычитающей гибридизации [12, 13] и развит метод ДНК-микрочипов [14], которые дают возможность экспериментального выявления изменений экспрессии генов. Более того, недавние успехи в определении структуры генома человека [15] кардинально расширили возможности полногеномного анализа, дав возможность быстрой идентификации дифференциально экспрессирующихся генов.

В данной работе мы применили метод вычитающей гибридизации для выявления клеточных генов, меняющих экспрессию при инфекции их вирусом клещевого энцефалита. Среди генов, экспрессия которых повышается при инфекции ВКЭ, нами были обнаружены интерферониндуцируемые гены. Особенностью индукции этих генов при инфекции ВКЭ является ее очень поздний ха-

рактер, что может свидетельствовать о существовании вирусной системы защиты от подавления интерферонами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки почек эмбриона человека линии RH высокочувствительны к инфекции ВКЭ и поддерживают его размножение до высокого титра. Выход вирусных частиц быстро увеличивается между 12 и 24 ч после заражения, а затем стабилизируется [16]. Прямое определение продукции структурного вирусного белка Е при помощи моноклональных антител показало, что в инфицированных клетках RH пик синтеза белка Е наступает приблизительно через 18–20 ч после инфицирования клеток (данные не приведены). Было описано сохранение персистентной инфекции ВКЭ для клеток RH в течение двух месяцев [17], при этом синтез вирусных антигенов сохраняется по крайней мере в течение 5–7 сут (срок наблюдения).

Для вычитающей гибридизации в качестве драйвера мы использовали кДНК, выделенную из контрольных неинфицированных клеток RH, в качестве трейсера – кДНК из клеток, инфицированных ВКЭ в течение 6 (ранняя стадия инфекции) или 24 ч (когда устанавливается стабильная система взаимодействия вируса с хозяином). В результате вычитания кДНК трейсера обогащается последовательностями, соответствующими мРНК, количество которых возрастает при инфекции.

После вычитания кДНК, обогащенную вирусиндуцируемыми последовательностями, клонировали в векторе рGEM-T, и индивидуальные клоны переносили в лунки микротитровальных планшетов, создавая упорядоченную библиотеку.

Для выявления дифференциально экспрессирующихся генов клоны библиотеки переносили на два одинаковых фильтра, один из которых гибридизовали с обогащенной трейсерной кДНК, а другую – с кДНК, полученной после “противоположного” вычитания, т.е. вычитания, в котором в качестве трейсера использовали кДНК, приготовленную из неинфицированных, а в качестве драйвера – кДНК из инфицированных клеток. Ожидаемый результат такой параллельной гибридизации заключается в том, что последовательности, соответствующие мРНК, содержание которых повышено в инфицированных клетках, должны проявляться как наиболее интенсивно гибридизующиеся с кДНК трейсера из инфицированных клеток по сравнению с кДНК трейсера из неинфицированных. Из результатов сравнительной гибридизации для одного из микротитровальных планшетов упорядоченной библиотеки (рис. 1) видно, что основная масса клонов выявляется как клоны с повышенной экспрессией в инфицированных клетках. Затем были идентифицированы (и далее не

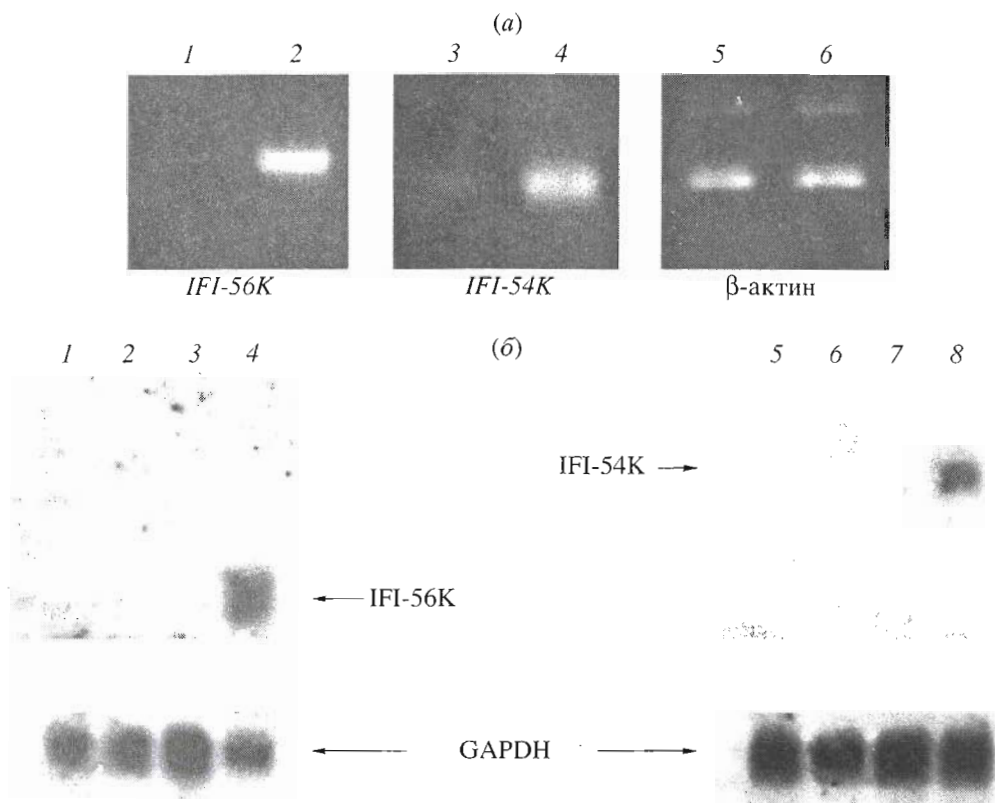


Рис. 2. Индукция транскрипции генов *IFI-54K* и *IFI-56K*. (а) – ОТ-ПЦР на матрице кДНК, полученной на основе РНК из зараженных и контрольных клеток. Использовались праймеры, соответствующие мРНК генов *IFI-54K* и *IFI-56K*. Дорожки: 1 – кДНК *IFI-56K* неинфицированных клеток (контроль); 2 – кДНК *IFI-56K* клеток, инфицированных ВКЭ в течение 24 ч; 3 – кДНК *IFI-54K* неинфицированных клеток (контроль); 4 – кДНК *IFI-54K* клеток, инфицированных ВКЭ в течение 24 ч; 5 – кДНК β-актина неинфицированных клеток; 6 – кДНК β-актина клеток, инфицированных ВКЭ в течение 24 ч. Число циклов ПЦР – 30 (*IFI-56K* и *IFI-54K*); 21 (β-актин). (б) – Нозерн-гибридизация суммарной РНК из инфицированных ВКЭ и контрольных клеток с зондами, соответствующими мРНК белков *IFI-54K* и *IFI-56K*. GAPDH – гибридизация тех же фильтров с контрольным зондом, соответствующим мРНК глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы. Дорожки: 1, 5 – РНК контрольных (6 ч) клеток; 2, 6 – РНК клеток, инфицированных ВКЭ в течение 6 ч; 3, 7 – РНК контрольных (24 ч) клеток; 4, 8 – РНК клеток, инфицированных ВКЭ в течение 24 ч.

анализировались) клоны, соответствующие вирусным генам. Такая идентификация была осуществлена путем гибридации с меченой ^{32}P вирусной кДНК (данные не приведены). Таких клонов оказалось примерно 20%. Нуклеотидные последовательности вставок 29 невирусных клонов были определены и сопоставлены с последовательностями, депонированными в базах данных (результаты полного анализа будут опубликованы отдельно).

Среди идентифицированных таким образом клонов два по своей нуклеотидной последовательности соответствовали известным интерферониндуцируемым генам человека *IFI-54K* и *IFI-56K*. Эти последовательности и были детально проанализированы в данной работе. Для того чтобы подтвердить дифференциальный характер экспрессии этих генов, далее были использованы два метода – ОТ-ПЦР и Нозерн-блот-гибридизация, результаты которых представлены на рис. 2.

Результаты ОТ-ПЦР (рис. 2а) показывают, что обе последовательности хорошо представлены в инфицированных клетках и слабо выявляются в неинфицированных. Заметное количество амплифицированного продукта в случае инфицированных клеток появляется после 29–30 циклов амплификации. При тех же условиях ампликон мРНК β-актина в сопоставимых количествах появляется к 21 циклу амплификации (рис. 2а), а ампликон мРНК GAPDH – к 24 циклу (данные не приведены).

Если принять содержание β-актина равным примерно 1000 молекул на клетку [18], то можно оценить содержание транскриптов *IFI* в инфицированных клетках в 1–2 молекулы на клетку. Это подтверждается и данными Нозерн-блот-гибридизации (рис. 2б), где интенсивности гибридационных полос, соответствующих мРНК *IFI-54K* и *IFI-56K*, составляют 1–2% интенсивности полос мРНК GAPDH, содержание которой составляет около 100 молекул на клетку. Сравнивая число

циклов, необходимых для амплификации до детектируемого уровня кДНК *IFI-54K* и *IFI-56K*, полученных из инфицированных и неинфицированных клеток, можно оценить, что содержание их мРНК возрастает в результате индукции в 50–100 раз.

Мы исследовали также появление мРНК *IFI-54K* и *IFI-56K* в процессе инфекции и обнаружили, что после 6 ч инфекции их экспрессия методом Нозерн-гибридизации не детектируется (рис. 2б). Таким образом, индукция генов *IFI* относится к поздним эффектам инфекции ВКЭ.

По литературным данным, при действии на клетки интерферона и некоторых ДНК-содержащих вирусов, белки *IFI-54K* и *IFI-56K* индуцируются достаточно быстро. Так, уровень *IFI-56K* достигает максимума через 4–8 ч и начинает спадать через 16 ч после воздействия интерферона [19]. Индукция *IFI-54K* до уровня, сопоставимого с содержанием *GAPDH*, при действии интерферона или заражении цитомегаловирусом наблюдалась уже через 2 ч [20]. Сообщалось также об индукции *IFI-54K* и *IFI-56K* до уровня, сопоставимого с содержанием *GAPDH*, через 6 ч после обработки интерферонами α/β или после инфекции вирусом простого герпеса *HSV-1* в присутствии ингибитора белкового синтеза – циклогексимида (в отсутствие этого ингибитора индукции не наблюдалось). Этот эффект был объяснен тем, что *HSV-1* содержит гены, которые кодируют белки, ингибирующие систему противовирусной защиты клетки, основанную на индукции интерферона [21, 22].

Эффект вирусного ингибирования интерфероновой защиты клетки известен также для аденовирусов [23, 24]. В этом случае в ингибировании принимает участие продукт, кодируемый геном *E1A* аденовируса, в результате чего при инфекции диким типом аденовируса не происходит индукции интерферониндуцируемых генов, тогда как мутанты по гену *E1A* осуществляют такую индукцию.

Поздняя индукция и низкий уровень мРНК индуцируемых интерфероном генов в клетках РН, инфицированных ВКЭ, может объясняться двояко. Во-первых, она может быть следствием опосредованной индукции этих генов интерферонами, т.е. сначала вирус индуцирует синтез интерферона, который затем включает группу интерферониндуцируемых генов. В другом случае индукция этих генов может происходить при участии вирусных белков, но ВКЭ обладает системой подавления индукции интерферониндуцируемых генов. Обе эти возможности реализуются некоторыми вирусами [25]. Спектр индуцируемых генов и механизм их индукции зависят как от типа интерферона, преимущественно индуцируемого в данной системе, так и от особенностей вирусных систем, вовлеченных в репликацию.

Если предположение о прямой индукции генов *IFI-54K* и *IFI-56K* ВКЭ верно, это означало бы, что даже такие небольшие вирусы, как флавивирусы, выработали в процессе коэволюции с клетками-хозяевами систему адаптации к противовирусным системам клетки.

Эффект подавления противовирусной защиты недавно описан для вируса гепатита С, способность которого к репликации обусловлена блокированием основного клеточного противовирусного механизма, связанного с индукцией *IFN*-регуляторного фактора *IRF-1* и протеинкиназы *R*. Блок осуществляется неструктурным вирусным белком *NS5A* [26]. Строение генома и стратегия репликации вируса гепатита С и вируса клещевого энцефалита имеют много общего, поэтому нельзя исключить, что наблюдаемые для вируса гепатита С эффекты имеют место и в случае ВКЭ. Интересно, что при хронической форме гепатита С, вызванного вирусом, в печени больного человека синтез мРНК *IFI-56* возрастает в 5–13 раз, а индукция *IFI-54* не выявляется [27]. При этом в печени больных хроническим гепатитом, вызванным ДНК-содержащим вирусом гепатита В, индукция генов *IFI* не выявлялась вообще.

Кроме того, клетки РН сами по себе могут быть дефектны в отношении индукции интерферониндуцируемых генов. Предположение о дефектности клеток РН согласуется с характерными отличиями в протекании их инфекции по сравнению с линией клеток 293, аналогичной по происхождению: если в первом случае устанавливается перманентная система инфекции и клетки, продуцируя вирус, не подвергаются лизису, то во втором лизис наступает уже через 24–36 ч после инфекции.

Для выбора между этими предположениями требуются дополнительные исследования.

Данные, приведенные в этой статье, впервые демонстрируют индукцию генов *IFI-54K* и *IFI-56K* при взаимодействии ВКЭ с клетками человека и, таким образом, выявляют еще одно направление анализа молекулярных систем, определяющих патогенез этой опасной инфекции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стандартные манипуляции (электрофорез, очистка ДНК, гибридизация) проводили по опубликованным методикам с использованием растворов, описанных в руководстве Сэмбука и соавт. [28].

Клетки и вирусы. Вирус клещевого энцефалита (штамм 205) [29] и линия клеток почки эмбриона человека РН были получены из коллекции ГНЦ ВБ “Вектор” (Кольцово, Новосибирской обл.). Клетки РН культивировали в минимальной среде Игла (MEM), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco-BRL) и 80 мкг/мл

гентамицинсульфата. Субмонослой клеток RH инфицировали ВКЭ из расчета 1.0 ТЦПД₅₀ (титр 50% цитопатического действия) на клетку. После инкубации в течение 1 ч при 37°C клеточный монослой трижды промывали средой MEM, затем клеткам добавляли поддерживающую среду MEM, содержащую 2% эмбриональной сыворотки, и инкубировали при 37°C в течение 6 или 24 ч. Контрольные клетки обрабатывали точно так же, за исключением инфицирования вирусом, и выращивали в течение того же времени. Инфекционные титры вирусных суспензий определяли по развитию 50% цитопатического эффекта на клетках почки эмбриона свиньи СПЭВ в 96-луночных планшетах.

Все эксперименты с инфекционным вирусным материалом проводили в лаборатории с уровнем биологической безопасности 3/4 (BSL-3/4).

Получение РНК. Препараты суммарной РНК выделяли из инфицированных и контрольных клеток через 6 и 24 ч после заражения вирусом, используя коммерчески доступный раствор *TriPure Isolation Reagent* (TPIR, Boehringer) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Монослой, содержащий 3–5.0 × 10⁶ клеток, дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и осаждали 5 мин при 2000 об/мин. К осадку клеток добавляли 1 мл раствора TPIR при комнатной температуре; РНК выделяли согласно протоколу фирмы-изготовителя. РНК осаждали изопропанолом, осадок промывали и хранили в 75% этаноле при –70°C.

Вычитающая гибридизация. Первую цепь кДНК синтезировали, используя обратную транскриптазу SuperScript II (Gibco-BRL) и набор реактивов для синтеза кДНК SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) в соответствии с рекомендациями изготовителей. Супрессионному вычитающей гибридизацию с использованием кДНК из инфицированных и неинфицированных клеток проводили как описано ранее [13]. Фрагменты кДНК, полученные в результате вычитающей гибридизации и соответствующие как позитивно, так и негативно регулируемым генам, были клонированы в вектор pGEM-T (Promega) и использовались для трансформации компетентных клеток DH5-α. Полученные библиотеки были ранжированы в 96-луночные планшеты, амплифицированы с помощью ПЦР и перенесены на мембрану Hybond-N (Amersham). Скрининг библиотек проводили с использованием в качестве зондов вычитенных кДНК [12], радиоактивно меченных при помощи рассеянной затравки. Библиотеку позитивно регулируемых генов гибридизовали также с вирусной кДНК, чтобы исключить клоны, соответствующие РНК вируса.

ОТ-ПЦР. Первую цепь кДНК для ОТ-ПЦР синтезировали из 1 мкг обработанной ДНК-азой суммарной РНК инфицированных или неинфици-

рованных клеток, используя рассеянную гексамерную затравку и обратную транскриптазу AMV (Promega) в соответствии с протоколом изготовителя. В качестве отрицательного контроля для выявления примесей геномной ДНК в образцах РНК параллельно для каждого образца проводили реакцию, содержащую все компоненты, кроме обратной транскриптазы.

Для ПЦР-амплификации использовали праймеры следующей структуры: (5')GAGCAGT-TGTTTCGCTACAGG и (5')TCTCTTCCGTGTCTGT-TCCA для *IFI-54K*, (5')GGTCAAGGATAGTCTG-GAGCAA и (5')CATTCTGGCCTTTCAGGTGT для *IFI-56K* и (5')GAGCGGGAATCGTGCGTGA-CATT и (5')GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG для кДНК β-актина, использовавшейся для контроля уровня синтеза кДНК. Реакционная смесь в объеме 40 мкл содержала 40 нг первой цепи кДНК, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM Трис-НСl pH 8.4, 50 mM KCl, 0.0002 моль/л каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. После предварительного прогрева при 94°C в течение 2 мин к смеси добавляли 2.5 ед. акт. *Taq*-полимеразы и проводили ПЦР по следующей программе: 30 с при 94°C, 30 с при 58°C, 1 мин при 72°C в течение 21–36 циклов. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле. По данным ПЦР с праймерами для кДНК β-актина, эффективность синтеза кДНК во всех образцах была одинаковой.

Нозерн-гибридизация. Препараты тотальной РНК из инфицированных и контрольных клеток (7–15 мкг) разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле, содержащем формальдегид, и переносили на мембрану Hybond-N (Amersham) в соответствии с протоколом производителя. Зонды для гибридизации были получены с помощью ПЦР и соответствующих праймеров. Гибридизацию проводили в буфере, содержащем 25 mM K₃PO₄, 5 × × SSC, 5-кратный раствор Денхардта [28], 50% формамид, 10% декстрансульфат, в течение ночи при 42°C, мембрану отмывали 0.25 × SSC/0.1% SDS и автордиографировали. В качестве контроля использовали аналогичным образом приготовленный зонд, специфичный к GAPDH.

Секвенирование ДНК. Секвенирование фрагментов кДНК в составе плазмид проводили с помощью автоматического секвенатора ALFexpress II (Amersham-Pharmacia Biotech). Полученные последовательности сравнивали с базой данных GenBank с помощью программы BLAST [30] с использованием сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Авторы выражают признательность В.К. Потапову и Н.В. Скапцовой (ИБХ, Москва) за синтез олигонуклеотидов. Исследования проведены при поддержке Международного научно-технического центра, проект № 1177.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьева М.С., Воронцова Т.В., Арумова Е.А., Расиценкина М.Н. // Здоровье населения и среда обитания (ЗНисО). 2001. V. 94. P. 12–17.
2. Calisher C.H., Karabatsos N. // The Arboviruses: Epidemiology and Ecology / Ed. T.P. Monath. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1988. P. 19–57.
3. Hardwick J.M. // Semin. Cell. Dev. Biol. 1998. V. 9. P. 339–349.
4. Wasyluk B., Imler J.L., Chatton B., Schatz C., Wasyluk C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 7952–7956.
5. Shen J., Devery J.M., King N.J. // Virology. 1995. V. 208. P. 437–449.
6. Shen J., T.-To S.S., Schrieber L., King N.J. // J. Virol. 1997. V. 71. P. 9323–9332.
7. Weir J.P. // Gene. 2001. V. 271. P. 117–130.
8. Sen G.C., Ransohoff R.M. // Adv. Virus Res. 1993. V. 42. P. 57–102.
9. Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H., Schreiber R.D. // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 227–264.
10. Emel'ianov B.A., Novokhatskii A.S. // Vopr. Virusol. 1977. V. 2. P. 216–222.
11. Kedarnath N., Cecilia D., Gore M.M., Banerjee A.C., Ghosh S.N. // Acta Virol. 1983. V. 27. P. 80–82.
12. Diatchenko L., Chenchik A., Siebert P.D. // Gene Cloning and Analysis by RT-PCR / Eds P. Siebert, J. Larrick. BioTechniques Books, Natick, MA, 1998. P. 213–237.
13. Diatchenko L., Lukyanov S., Lau Y.F., Siebert P.D. // Methods Enzymol. 1999. V. 303. P. 349–380.
14. Clarke P.A., te Poele R., Wooster R., Workman P. // Biochem. Pharmacol. 2001. V. 62. P. 1311–1336.
15. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., et al. // Nature. 2001. V. 409. P. 860–921.
16. Nikiforova N.N., Velikodvorskaja T.V., Kachko A.V., Nikolaev L.G., Monastyrskaya G.S., Lukyanov S.A., Konovalova S.N., Protopopova E.V., Svyatchenko V.A., Kiselev N.N., et al. // Virology. 2002. V. 297. P. 163–171.
17. Bugrysheva J.V., Matveeva V.A., Dobrikova E.Y., Bykovskaya N.V., Korobova S.A., Bakhvalova V.N., Morozova O.V. // Virus Res. 2001. V. 76. P. 161–169.
18. Femino A.M., Fay F.S., Fogarty K., Singer R.H. // Science. 1998. V. 280. P. 585–590.
19. Chebath J., Merlin G., Metz R., Benech P., Revel M. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. P. 1213–1226.
20. Navarro L., Mowen K., Rodems S., Weaver B., Reich N., Spector D., David M. // Mol. Cell. Biol. 1998. V. 18. P. 3796–3802.
21. Nicholl M.J., Robinson L.H., Preston C.M. // J. Gen. Virol. 2000. V. 81. P. 2215–2218.
22. Preston C.M., Harman A.N., Nicholl M.J. // J. Virol. 2001. V. 75. P. 8909–8916.
23. Reich N., Pine R., Levy D., Darnell J.E., Jr. // J. Virol. 1988. V. 62. P. 114–119.
24. Kalvakolanu D.V., Bandyopadhyay S.K., Harter M.L., Sen G.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 7459–7463.
25. Nakaya T., Sato M., Hata N., Asagiri M., Suemori H., Noguchi S., Tanaka N., Taniguchi T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 283. P. 1150–1156.
26. Pflugheber J., Fredericksen B., Sumpter R., Jr., Wang C., Ware F., Sodora D.L., Gale M., Jr. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 4650–4655.
27. Patzwahl R., Meier V., Ramadori G., Mihm S. // J. Virol. 2001. V. 75. P. 1332–1338.
28. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 1989.
29. Safronov P.F., Netesov S.V., Mikriukova T.P., Blinov V.M., Osipova E.G., Kiseleva N.N., Sandakhchiev L.S. // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 1991. V. 4. P. 23–29.
30. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.

Late Activation of Interferon-induced Genes *IFI-54K* and *IFI-56K* in Human RH Cells Infected with Tick-borne Encephalitis Virus

**B. G. Gavrilov[#], G. S. Monastyrskaya*, T. V. Velikodvorskaya*,
O. B. Filyukova*, S. N. Konovalova**, A. A. Kachko**, E. V. Protopopova**,
L. G. Nikolaev*, V. B. Loktev**, and E. D. Sverdlov***

Phone: +7 (095) 330-6992; fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: bgg@humgen.siobc.ras.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/110, GSP Moscow, 117997 Russia

** Vektor State Research Center of Virology and Biotechnology, Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia

The genes that were induced and suppressed in human embryonic kidney cell line RH upon the infection with tick-borne encephalitis virus were studied by the method of subtractive hybridization. The expression of interferon-induced genes *IFI-54K* and *IFI-56K* in the infected cells was found to increase 50–100-fold. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: interferon-induced genes, subtractive hybridization, tick-borne encephalitis virus