



УДК 578.(233.4 + 245)

АКТИВАЦИЯ ГЕНА *RIG-I*, КОДИРУЮЩЕГО ДEXH/D-БЕЛОК, ПРИ ИНФЕКЦИИ КЛЕТОК RH ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

© 2004 г. Г. С. Монастырская^{**}, М. Б. Костина^{*}, О. Б. Филокова^{*},
Е. В. Протопопова^{**}, С. Н. Коновалова^{**}, А. В. Качко^{**},
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 Новосибирской обл.

Поступила в редакцию 05.06.2003 г. Принята к печати 16.07.2003 г.

Методом вычитающей гибридизации показано, что инфекция культуры клеток эмбриональной почки человека вирусом клещевого энцефалита приводит примерно к 10-кратному усилению транскрипции гена *RIG-I*, кодирующего белок, принадлежащий к семейству РНК-геликаз, содержащих последовательность ДEXH/D. Обсуждается возможность участия этого белка в системах защиты клетки от вирусной инфекции.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; вычитающая гибридизация; РНК-геликазы; ген *RIG-I*.

ВВЕДЕНИЕ

Клещевой энцефалит – острое лихорадочное вирусное заболевание человека, характеризующееся развитием менингоэнцефалитов с выраженными парезами и параличами. В последние годы ежегодно регистрируется до 11 тыс. случаев клещевого энцефалита в России и до 3 тыс. случаев в странах Европы [1]. За последние 25 лет уровень заболеваемости клещевым энцефалитом в России увеличился приблизительно в 7 раз [2]. Возбудителем заболевания является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), принадлежащий к роду *Flavivirus*, семейство *Flaviviridae*. Вирионы ВКЭ содержат нуклеокапсид с упакованной одноцепочечной +РНК, состоящей из ~11000 нт и кодирующей полипептид длиной около 3400 а.о., который расщепляется клеточными и вирусными протеинами на 3 структурных и 7 неструктурных вирусных полипептидов [3]. Неструктурный белок NS3 ВКЭ предположительно обладает РНК-геликазной активностью [4, 5]. Этот белок вместе с другим неструктурным белком NS5 (РНК-зависимая РНК-полимераза) образует в инфицированной клетке флавиовирусный полимеразный комплекс, который обеспечивает репликацию вирусной РНК в цитоплазме [6, 7].

Несмотря на интенсивность исследования флавиовирусов, о деталях их взаимодействия с генетическими и биохимическими системами клетки известно довольно мало. Причина этого состоит в том, что вплоть до недавнего времени возможности полногеномного анализа изменений экспрессии генов при вирусной инфекции были ограничены отсутствием соответствующих методов и, в еще большей степени, недостаточностью информации о структуре генома человека.

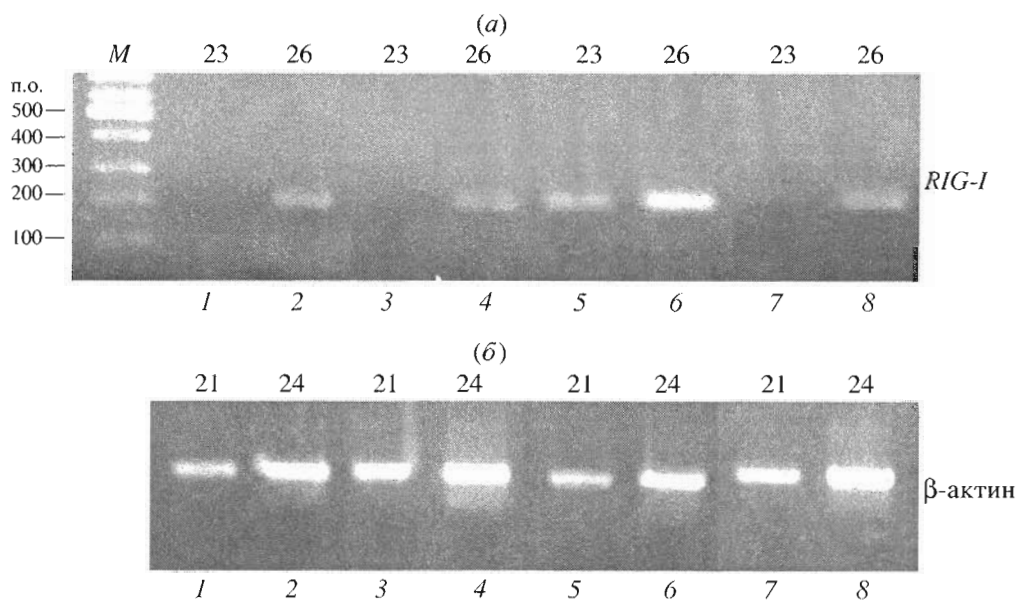
В последние годы был значительно усовершенствован метод вычитающей гибридизации [8, 9], который дает возможность экспериментального выявления изменений экспрессии генов. Более того, недавние успехи в определении структуры генома человека [10] кардинально расширили границы полногеномного анализа, дав возможность быстрой идентификации дифференциально экспрессирующихся генов. Ранее мы применили метод вычитающей гибридизации для выявления клеточных генов, меняющих уровень экспрессии при их инфекции альфа- и флавиовирусами [11, 12]. Здесь мы представляем данные об индукции в инфицированных ВКЭ клетках гена *RIG-I*, кодирующего белок, относящийся к семейству РНК-геликаз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки почек эмбриона человека линии RH высокочувствительны к инфекции ВКЭ и поддерживают его размножение до высокого титра. Выход

Сокращения: ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; PRRSV – вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции.

[#] Автор для переписки (эл. почта: gal@humgen.siobc.ras.ru; тел./факс: (095) 330-6538).



Индукция транскрипции гена *RIG-I*. ОТ-ПЦР на матрице РНК из клеток линии LH, инфицированных ВКЭ в течение 6 (дорожки 1 и 2) и 24 ч (дорожки 5 и 6), и контрольных клеток, инкубированных после добавления не содержащих вируса буфера в течение 6 (дорожки 3 и 4) и 24 ч (дорожки 7 и 8). Использовали праймеры, соответствующие мРНК гена *RIG-I* (а) и β -актина (б). Число циклов ПЦР указано над каждой дорожкой. М – маркеры молекулярной массы.

вирусных частиц быстро увеличивается между 12 и 24 ч после заражения, а затем стабилизируется [11]. Было описано сохранение персистентной инфекции ВКЭ для клеток RH в течение двух месяцев, при этом синтез вирусных антигенов сохранялся по крайней мере в течение 5–7 сут (срок наблюдения) [13].

Для выявления генов, уровень транскрипции которых изменяется при инфекции ВКЭ, мы проводили вычитающую гибридизацию так, как описано ранее [11, 12] с использованием в качестве драйвера кДНК из контрольных неинфицированных клеток RH, а 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). После вычитания кДНК, обогащенную вирусиндуцируемыми последовательностями, клонировали в векторе рGEM-T, и индивидуальные клоны переносили в лунки микротитровальных планшетов, создав таким образом упорядоченную библиотеку.

Для обнаружения 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 [12]. Отбирали клоны, предположительно ин-

дуцируемые при вирусной инфекции, то есть гибридизующиеся с кДНК, обогащенной трейсером из инфицированных клеток, сильнее, чем с кДНК, обогащенной трейсером из неинфицированных клеток. Среди идентифицированных таким образом клонов два по своей нуклеотидной последовательности на 99% совпали с различными участками гена, кодирующего белок, содержащий последовательность DEXH/D (Asp-Glu-X-His/Asp, X – любая аминокислота) и относящийся к суперсемейству РНК-геликаз (*RIG-I*, № NM_014314 по GenBank).

Для того чтобы подтвердить дифференциальный характер экспрессии этих генов, далее был использован метод ОТ-ПЦР. Результаты ОТ-ПЦР (рисунок) показывают, что мРНК *RIG-I* хорошо представлена в инфицированных клетках и слабо выявляется в неинфицированных. Заметное количество амплифицированного продукта в случае инфицированных в течение 24 ч клеток появляется уже к 23-му циклу амплификации (дорожки ВКЭ 24 ч), тогда как в контрольных клетках – к 26-му циклу (дорожки контроль 24 ч). При тех же условиях ампликон мРНК β -актина в сопоставимых количествах появляется к 21-му циклу амплификации (рисунок), а ампликон мРНК клатрина – к 27-му циклу (данные не приведены). Если принять содержание мРНК β -актина равным примерно 1000 молекул на клетку [14], то можно оценить содержание транскриптов *RIG-I* в инфицированных клетках в 100–200 молекул на клетку. Сравнивая число циклов, необходимых для амплификации до детектируемого уровня кДНК

RIG-I, полученных из инфицированных и неинфицированных клеток, можно подсчитать, что содержание их мРНК возрастает в результате индукции в 5–10 раз. Такое изменение уровня мРНК вполне существенно, так как в процессе вирусной инфекции экспрессия генов обычно изменяется в 2–3 раза. Так, при исследовании 218 генов, индуцируемых в клетках, инфицированных вирусом ветряной оспы, не удалось выявить генов с индукцией более чем в 3 раза [15], уровень транскрипции большинства генов изменялся в 2 или меньшее число раз. Аналогичные данные опубликованы для вирусов простого герпеса, папилломавирусов, вирусов гепатитов В и С [16–18].

РНК-геликазы представляют собой многочисленное семейство белков, присутствующих во всех организмах – от бактерий до млекопитающих и вовлеченных практически во все стадии метаболизма РНК [19]. Основной активностью РНК-геликаз является NTP-зависимое расплетение двуспиральных участков РНК, необходимое в первую очередь при репликации вирусной РНК [5], трансляции, сплайсинге, репарации [19], РНК-интерференции [20]. Подсемейство РНК-геликаз, содержащее консервативную последовательность DEXH/D [21], по видимому, может обладать функцией РНК-шаперонов, обеспечивая формирование необходимой для функционирования РНК пространственной структуры [22].

Ген *RIG-I* (Retinoic acid-inducible gene 1) относится к семейству генов, кодирующих белок с последовательностью DEXH/D, был идентифицирован как ген, экспрессия которого стимулируется ретиноевой кислотой в культуре клеток промиелоцитарного лейкоза [23]. Ген *RIG-I* расположен на хромосоме 9 человека. По особенностям своей первичной структуры белок RIG-I был отнесен к семейству РНК-геликаз, хотя его геликазная активность прямо не показана. По данным Имаизуми и соавт. [24], экспрессия этого белка индуцируется липополисахаридом в клетках сосудистого эпителия. Транзистентная экспрессия *RIG-I* в клетках эндотелия в свою очередь приводит к примерно четырехкратному стимулированию активности гена циклооксигеназы-2 (COX-2), вовлеченно-го в регуляцию ангиогенеза и апоптоза [24, 25].

Свиной гомолог человеческого гена *RIG-I*, названный *RHIV-1*, индуцируется вирусом репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV) [26] и вирусом ложного бешенства (*pseudorabies*) [27] при заражении им альвеолярных макрофагов.

Флавивirusы кодируют свою вирусную РНК-геликазу – белок NS3, который входит в состав вирусного полимеразного комплекса вместе с другим неструктурным белком NS5 [4, 5]. NS3 обладает также протеиназной и NTP-азной активностями. Он относится к геликазам семейства

SFII и содержит 7 консервативных аминокислотных последовательностей (включая DEXH/D), расположенных на поверхности доменов 1 и 2 этого трехдоменного фермента [28, 29]. Подобный тип геликаз кодируется также поксвирусами, герпесвирусами, пестивирусами и рядом других вирусов. Ген вирусной геликазы NS3 считается одной из основных мишеней для новых антивирусных препаратов [30]. Индукция в инфицированных клетках фермента, имеющего аналогичную функцию с одним из жизненно важных вирусных неструктурных белков, – необычный факт.

Усиление транскрипции клеточных генов при вирусном заражении может отражать два типа процессов. Во-первых, индуцируются гены, необходимые клетке для защиты от вирусной инфекции; ярким примером здесь могут служить гены интерферонов. С другой стороны, индукция клеточных генов может быть необходима для размножения самого вируса. Например, при инфекции цитомегаловирусом индуцируются ферменты биосинтеза предшественников ДНК, необходимые для репликации вирусного генома в покоящихся клетках [31].

Индукция гена, подобного *RIG-I*, вирусами с различными типами жизненного цикла, такими, как PRRSV и вирус ложного бешенства (см. выше), указывает на то, что ген *RIG-I* относится, скорее всего, к генам, участвующим в защите клеток от инфекции. Хотя точная биологическая роль белка RIG-I на сегодняшний день не установлена, в пользу его антивирусной активности говорят данные о том, что человеческий белок SKI2W из семейства DEXH/D-содержащих геликаз высоко гомологичен дрожжевому антивирусному белку Ski2p, который ингибирует трансляцию неполиадезилрованных (в частности, вирусных) РНК [32, 33]. Другая возможная роль РНК-геликаз обусловлена их способностью разрушать РНК-белковые комплексы [34] и, таким образом, препятствовать сборке вирусных частиц. Обнаружение индукции данного гена вирусом клещевого энцефалита открывает еще один аспект взаимодействий этого вируса с клеткой, молекулярные механизмы которых изучены недостаточно.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стандартные манипуляции (электрофорез, очистка ДНК, гибридизация) проводили по опубликованным методикам с использованием растворов, описанных в руководстве Сэмбука и соавт. [35].

Клетки, вирусы и получение РНК. Вирус клещевого энцефалита (штамм 205) [36] и линия клеток почки эмбриона человека RH были получены из коллекции ГНЦ ВБ “Вектор” (Кольцово Новосибирской обл.). Клетки RH культивировали, инфицировали ВКЭ в течение 6 или 24 ч и

получали суммарную РНК как описано ранее [12]. Все эксперименты с инфекционным вирусным материалом проводили в лаборатории с уровнем биологической безопасности 3/4 (BSL-3/4).

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. Супрессионную вычитающую гибридизацию с использованием кДНК из инфицированных и неинфицированных клеток проводили так, как описано ранее [9]. Фрагменты кДНК, полученные в результате вычитающей гибридизации и соответствующие как позитивно, так и негативно регулируемым генам, были клонированы в векторе 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 [8], радиоактивно меченных при помощи рассеянной затравки.

ОТ-ПЦР. Первую цепь кДНК для ОТ-ПЦР синтезировали из 1 мкг обработанной ДНК-азой суммарной РНК инфицированных или неинфицированных 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 использовали реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме обратной транскриптазы. Для ПЦР-амплификации использовали праймеры следующей структуры: (5')AGAGCACTTGTGGACGCTTT и (5')TGCCTTCATCAGCAACTGAG для *RIG-I* и (5')GAGCGG-GAAATCGTGCGTGACATT и (5')GATGGAGT-TGAAGGTAGTTTCGTG для кДНК β -актина, использовавшейся для контроля уровня синтеза кДНК. ПЦР проводили при условиях, описанных ранее [12]. По данным ПЦР с праймерами для кДНК β -актина, эффективность синтеза кДНК во всех образцах была приблизительно одинаковой.

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 [37] с использованием сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Авторы выражают признательность В.К. Потапову и Н.В. Скапцовой за синтез олигонуклеотидов. Работа финансировалась Международным научно-техническим центром (проект № 1177) и грантами для поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-2006.2003.4 и НШ-2316.2003.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. // *Antiviral Res.* 2003. V. 57. P. 129–146.
2. Воробьева М.С., Воронцова Т.В., Арумова Е.А., Расцепкина М.Н. // *Здоровье населения и среда обитания* (ЗНиСО). 2001. Т. 94. С. 12–17.
3. Heinz F.X., Mandl C.W. // *Apmis.* 1993. V. 101. P. 735–745.
4. Iacono-Connors L.C., Schmaljohn C.S. // *Virology.* 1992. V. 188. P. 875–880.
5. Kadare G., Haenni A.L. // *J. Virol.* 1997. V. 71. P. 2583–2590.
6. Lindenbach B.D., Rice C.M. // *Flaviviridae: The Viruses and their Replication. Fundamental Virology / Eds D.M. Knippe, P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. P. 589–641.*
7. Kapoor M., Zhang L., Ramachandra M., Kusukawa J., Ebner K.E., Padmanabhan R. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 19100–19106.
8. Diatchenko L., Chenchik A., Siebert P.D. // *Suppression Subtractive Hybridization: A Method for Generating Subtracted cDNA Libraries Starting from Poly(A+) or Total RNA. Gene Cloning and Analysis by RT-PCR / Eds P. Siebert, J. Larrick. Natick, MA: BioTechniques Books, 1998. P. 213–237.*
9. Diatchenko L., Lukyanov S., Lau Y.F., Siebert P.D. // *Methods Enzymol.* 1999. V. 303. P. 349–380.
10. 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.
11. 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.
12. Гаврилов Б.Г., Монастырская Г.С., Великодворская Т.В., Филюкова О.Б., Коновалова С.Н., Качко А.А., Протопопова Е.В., Николаев Л.Г., Локтев В.Б., Свердлов Е.Д. // *Биоорганическая химия.* 2003. Т. 29. С. 175–180.
13. 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.
14. Femino A.M., Fay F.S., Fogarty K., Singer R.H. // *Science.* 1998. V. 280. P. 585–590.
15. Jones J.O., Arvin A.M. // *J. Virol.* 2003. V. 77. P. 1268–1280.
16. Paludan S.R., Melchjorsen J., Malmgaard L., Mogenssen S.C. // *Eur. Cytokine Netw.* 2002. V. 13. P. 306–316.
17. Otsuka M., Aizaki H., Kato N., Suzuki T., Miyamura T., Omata M., Seki N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 300. P. 443–447.
18. Chang Y.E., Laimins L.A. // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 4174–4182.
19. Soutanas P., Wigley D.B. // *Trends Biochem. Sci.* 2001. V. 26. P. 47–54.
20. Tabara H., Yigit E., Siomi H., Mello C.C. // *Cell.* 2002. V. 109. P. 861–871.
21. Caruthers J.M., McKay D.B. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 123–133.
22. Lorsch J.R. // *Cell.* 2002. V. 109. P. 797–800.

23. Sun Y.W. RIG-I, A Human Homolog Gene of RNA Helicase, is Induced by Retinoic Acid During the Differentiation of Acute Promyelocytic Leukemia Cells. Shanghai Institute of Hematology, Rui-Jin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai, 1997.
24. Imaizumi T., Aratani S., Nakajima T., Carlson M., Matsumiya T., Tanji K., Ookawa K., Yoshida H., Tsuchida S., McIntyre T.M., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 292. P. 274–279.
25. Smith W.L., Langenbach R. // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 107. P. 1491–1495.
26. Zhang X., Wang C., Schook L.B., Hawken R.J., Rutherford M.S. // *Microb. Pathog.* 2000. V. 28. P. 267–278.
27. Zhang X., Shin J., Molitor T.W., Schook L.B., Rutherford M.S. // *Virology.* 1999. V. 262. P. 152–162.
28. Yan Y., Li Y., Munshi S., Sardana V., Cole J.L., Sardana M., Steinkuehler C., Tomei L., De Francesco R., Kuo L.C., et al. // *Protein Sci.* 1998. V. 7. P. 837–847.
29. Kim J.L., Morgenstern K.A., Griffith J.P., Dwyer M.D., Thomson J.A., Murcko M.A., Lin C., Caron P.R. // *Structure.* 1998. V. 6. P. 89–100.
30. Wang Q.M., Heinz B.A. // *Prog Drug Res.* 2001. V. Spec. P. 79–110.
31. Cavallo R., Lembo D., Gribaudo G., Landolfo S. // *Inter-virology.* 2001. V. 44. P. 224–226.
32. Dangel A.W., Shen L., Mendoza A.R., Wu L.C., Yu C.Y. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 2120–2126.
33. Qu X., Yang Z., Zhang S., Shen L., Dangel A.W., Hughes J.H., Redman K.L., Wu L.C., Yu C.Y. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 4068–4077.
34. Linder P., Tanner N.K., Banroques J. // *Trends Biochem. Sci.* 2001. V. 26. P. 339–341.
35. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, N. Y.; CSHL Press, 1989.
36. 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.
37. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3389–3402.

The Transcription Activation of the *RIG-I* Gene Encoding the DEXH/D Protein in RH Cells Infected with Tick-Borne Encephalitis Virus

G. S. Monastyrskaya^{*,#}, M. B. Kostina^{*}, O. B. Filyukova^{*},
E. V. Protopopova^{**}, S. N. Konovalova^{**}, A. V. Kachko^{**},
L. G. Nikolaev^{*}, V. B. Loktev^{**}, and E. D. Sverdlov^{*}

[#] Phone/fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: gal@humgen.siobc.ras.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

^{**} Vektor State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirskaya oblast, 630559 Russia

It was demonstrated by subtractive hybridization that the infection of a human embryonic kidney cell line with tick-borne encephalitis virus causes an approximately tenfold transcription activation of the *RIG-I* gene, which encodes a protein of the DEXH/D-box-containing RNA helicase family. A possible involvement of the protein in antiviral cell systems is discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: *RIG-I* gene, RNA helicases, subtractive hybridization, tick-borne encephalitis virus