

РАЗЛИЧНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АПОПТОЗА И ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *bcl-2* В ПОКОЯЩИХСЯ И ДЕЛЯЩИХСЯ ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА, ЗАРАЖЕННЫХ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ

© Н. Е. Федорова, Т. М. Соколова,¹ М. Г. Меджидова, А. А. Куш

Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва;

¹ электронный адрес: tmsokolovavir@mail.ru

Цель работы состояла в сравнительном изучении динамики митохондриального пути апоптоза при цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) клеток, различающихся пролиферативным состоянием и чувствительностью к вирусу. Установлено, что в покоящихся фибробластах человека (ФЧ) цитомегаловирус (ЦМВ) может регулировать митохондриальный апоптоз на уровне транскрипции гена *bcl-2* двунаправленно, оказывая как антиапоптотическое, так и проапоптотическое действие. Эффект подавления транскрипции *bcl-2* более выражен в линии ФЧ-977, которая высокочувствительна к ЦМВ, чем в клетках ФЧ-1608. Влияние пролиферативного состояния на митохондриальный апоптоз было изучено на клетках линии ФЧ-110044 в фазе G₀ или S. Установлена прямая корреляция динамики накопления цитохрома *c* и каспазы 3 (маркеров митохондриального апоптоза) и продукции IE72, pp65 и gB (белков ЦМВ). В G₀-фибробластах вирусная репликация была высокопродуктивной и уровни экспрессии гена *bcl-2* были в 10 раз выше, чем в S-фазных клетках, в которых продукция белков и гибель клеток были медленными. Повышение транскрипции гена и накопления белка Bcl-2 усиливало жизнеспособность клеток и обеспечивало синтез вирусных белков. Нарушение структуры актиновых микрофиламентов, мишени действия каспазы 3, совпадало с угнетением транскрипции гена *гамма-актина* в S-фазных ФЧ-110044. Наши данные раскрывают индуцированные ЦМВ механизмы митохондриального апоптоза, приводящие к быстрой гибели инфицированных покоящихся фибробластов и медленной гибели клеток, зараженных в стадии синтеза ДНК.

Ключевые слова: маркеры апоптоза, цитомегаловирус, пролиферация фибробластов человека, транскрипция генов *Bcl-2* и *гамма-актина*.

Принятые сокращения: ОТ — обратная транскриптаза, ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием в качестве матрицы кДНК, синтезированной с помощью ОТ, ЦМВ — цитомегаловирус человека, ЦМВИ — цитомегаловирусная инфекция, ФБ — фосфатный буфер, ФЧ — фибробласты человека, ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка.

Цитомегаловирус (ЦМВ) относится к часто обнаруживаемым у людей патогенам (Mocarski, Courcelle, 2001). Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) в организме человека чаще протекает в хронической и латентной формах. Реактивация и острые формы ЦМВИ наблюдаются у людей с иммунодефицитами (ВИЧ-инфекция, после трансплантации органов). Вызываемые ЦМВ нарушения в регуляции клеточного цикла и физиологического апоптоза изучаются как основные причины вызываемых патологий (Федорова и др., 2003; Hertel, Mocarski, 2004; Andoniou, Degli-Esposti, 2006). Структурно-функциональный анализ ЦМВ-генома показал, что многие кодируемые белки полифункциональны и контролируют процессы вирусной репликации, клеточного деления, апоптоза и иммунного ответа, действуя в разных ситуациях как стимуляторы или как ингибиторы (Goldmacher, 2005; McCormick, 2008). Вирусные сверххранные белки IE72 и IE86 активируют вступление в клеточный цикл, но затем останавливают его прохождение в разных фазах (Castillo et al., 2002). Одна из функций этих белков — защита клетки от апоптоза с участием Akt-киназного пути (Castillo et al.,

2005). При активной вирусной репликации ключевые факторы пролиферации и апоптоза белки E2F, Rb и p53 могут регулироваться ЦМВ как позитивно, так и негативно. Для эффективной репликации ЦМВ необходимы клетки с полноценным геном *p53* (Casavant et al., 2006).

Процессы апоптоза при ЦМВИ находятся под контролем двух вирусных ингибиторов — vICA и vMIA (Skaletskaya et al., 2001; Arnoult et al., 2004; Reboredo et al., 2004). Митохондрии играют важную роль в апоптозе (Gulbins et al., 2003). Процессы митохондриального апоптоза индуцируются различными стрессовыми и токсическими воздействиями на клетку и ее геном (Глазунова, Штиль, 2008). Вирусные инфекции представляют собой наиболее сложные случаи регуляции этого процесса. Временное сохранение жизнеспособности клеток в период вирусной репликации завершается развитием цитопатического действия и гибелью клеток (Goldmacher, 2005; McCormick, 2008).

Основная функция белков семейства Bcl-2 — регуляция проницаемости митохондриальной мембраны и контроль высвобождения апоптозных факторов из внут-

ренного пространства митохондрий в цитоплазму (Chirkov, Green, 2008). Bcl-2 относится к ингибиторам митохондриального апоптоза, локализованным на митохондриальной мембране. С участием его и проапоптозных BH-3-белков Bax, Bak, Bad и др. происходят открытие мембранных каналов и освобождение цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму. Цитохром *c* участвует в формировании комплекса апоптосомы и активирует прокаспазу 3, что приводит к протеолитическому гидролизу ряда важных клеточных субстратов (Hengartner, 2000). Роль семейства клеточных Bcl-белков при ЦМВИ мало изучена. В то же время выяснение роли этих белков в регуляции инфекционного процесса необходимо для понимания молекулярных механизмов и путей ЦМВ-индуцированной гибели клеток.

В связи с этим в настоящей работе впервые исследован механизм транскрипционной регуляции генов *Bcl-2* и *гамма-актина* при ЦМВИ в зависимости от пролиферативного состояния клеток и уровня синтеза вирусных белков, а также проведен сравнительный анализ индукции маркеров митохондриального апоптоза (*Bcl-2*, цитохром *c* каспазы 3) и изменений структуры цитоскелета.

Материал и методика

Реактивы: культуральная среда ДЕМ, содержащая L-глутамин и ЭТС (ПанЭко, Москва); моноклональные антитела к белкам ЦМВ Iер72, pp65 и gB (ГУ НИИ вирусологии РАМН, Россия), к *Bcl-2* (Novocastra, Англия), к цитохрому *c* (Promega, США), к альфа-тубулину (Sigma, США); поликлональные антитела к каспазе 3 (Promega, США); родамин-фаллоидин (Sigma, США); антимышьи иммуноглобулины, меченные ФИТЦ или пероксидазой хрена (Дакко, Дания); ферменты и буферы для ОТ-ПЦР и ДНК-маркеры молекулярной массы (МВ Fermentas, Латвия); агароза (Biorad, Швеция); соли и абсолютный метанол (Merck, Германия); параформальдегид (Sigma, США).

Клетки: линии диплоидных фибробластов из легкого эмбриона человека ФЧ-110044 (ГУ НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург) и ФЧ-977 (Медико-генетический центр РАМН, Москва); линия из фибробластов кожи взрослого донора ФЧ-1608 (Медико-генетический центр РАМН, Москва). Клетки выращивали на среде ДЕМ, содержащей 2 mM L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина и 10 % ЭТС.

Вирус-референс-штамм ЦМВ AD169 получен от д-ра D. Emanuel (США). Вирус размножали в высокочувствительных клетках линий ФЧ-110044 и ФЧ-977. Титры инфекционного вируса достигали 7 lg на 3-и сут при множественности инфекции 0.01 БОЕ/кл. Определенные инфекционной активностью вируса проводили методом «черных» бляшек в 96-луночной панели. Очаги инфицированных клеток (бляшек) выявляли иммуноцитохимическим методом с использованием смеси антител к белкам ЦМВ Iер72 и pp65.

Синхронизацию клеток ФЧ в состоянии покоя G₀ и в фазе синтеза ДНК (S-фаза) проводили лишением клеток сывороточных ростовых факторов, как описано ранее (Федорова и др., 2003). Для синхронизации в S-фазе к G₀-клеткам добавляли свежую среду, содержащую 15 % ЭТС. Как было установлено ранее, через 24 ч после стимуляции сывороткой большинство клеток находится в стадии синтеза ДНК.

Заражение ЦМВ и условия культивирования синхронизированных культур. ФЧ в состоянии G₀ стимулировали к пролиферации добавлением 15 % ЭТС (популяция 1) или оставляли в среде, содержащей 0.2 % ЭТС, для предотвращения стимуляции к делению (популяция 2). S-фазные ФЧ культивировали в среде с 15 % ЭТС (популяция 3). Дополнительно G₀- и S-фазные ФЧ были разделены на две группы — опытные и контрольные. Опытные заражали ЦМВ с инфекционной множественностью 1—5 БОЕ/кл. После адсорбции вируса клетки промывали фосфатным буфером (ФБ) и продолжали культивирование в среде с 15 % ЭТС в течение всего периода наблюдения (9 сут). Опытные (инфицированные вирусом) и контрольные (без вируса) G₀- и S-фазные ФЧ культивировали в одних и тех же условиях и исследовали параллельно.

Имуноцитохимический метод выявления вирусных и клеточных белков. Зараженные ЦМВ и контрольные ФЧ промывали 0.1 M ФБ, pH 7.4, и фиксировали для выявления белков ЦМВ абсолютным метанолом 20 мин при 4 °C. Для выявления клеточных белков фиксацию клеток проводили 4%-ным параформальдегидом в ФБ в течение 20 мин при 20 °C с последующей обработкой 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 20 мин. К фиксированным клеткам добавляли антитела к *Bcl-2*, цитохрому *c* и альфа-тубулину и поликлональные антитела к каспазе 3 согласно протоколам фирм-производителей. Затем клетки промывали ФБ и инкубировали с антивидовыми антителами, мечеными ФИТЦ или пероксидазой хрена. Актиновые филаменты исследовали после окраски родамин-фаллоидином.

Транскрипцию мРНК *Bcl-2* и мРНК *гамма-актина* определяли полуквантитативным методом ОТ-ПЦР. Выделение РНК из фибробластов проводили с помощью гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформа (Chomczynski, Sacchi, 1987). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили на препарате поли(А)РНК с универсальным праймером олиго(dT)16 в инкубационной смеси с ферментом обратная транскриптаза MuLV в концентрации 200 ед./мкл при 42 °C в течение 1 ч. Аликвоты полученных кДНК разводили в 10—10³ раз и добавляли в ПЦР. Специфические ПЦР-праймеры рассчитывали (Сokolova и др., 2005) по известной первичной структуре альфа- и бета-транскриптов мРНК гена В-клеточной лимфомы (*Bcl-2*; NCBI accession M13994, M13995; Tsujimoto, Croce, 1986) и мРНК транскриптов гена *гамма-актина* (ACTG1; NCBI accession M19283; Erba et al., 1988). Известно, что ген *Bcl-2* транскрибируется альтернативным сплайсингом в 3 вида мРНК. С помощью использованной пары праймеров были определены альфа- и бета-транскрипты двух экзонов гена. Условия проведения ПЦР: 50 циклов амплификации на матрицах кДНК в смеси с термостабильной Tag-полимеразой (5 ед./мкл) при температуре отжига 55 °C. ДНК-амплификаты анализировали электрофоретически в 1.5%-ных агарозных гелях с бромистым этидием (БЭ). Размер специфического продукта *Bcl-2* (209 н. п.) и *гамма-актина* (681 н. п.) устанавливали по положению ДНК-маркеров в диапазоне 100—1000 н. п.

Результаты

Влияние пролиферативного состояния ФЧ в момент заражения на динамику синтеза ЦМВ-белков изучали в линии клеток ФЧ-110044.

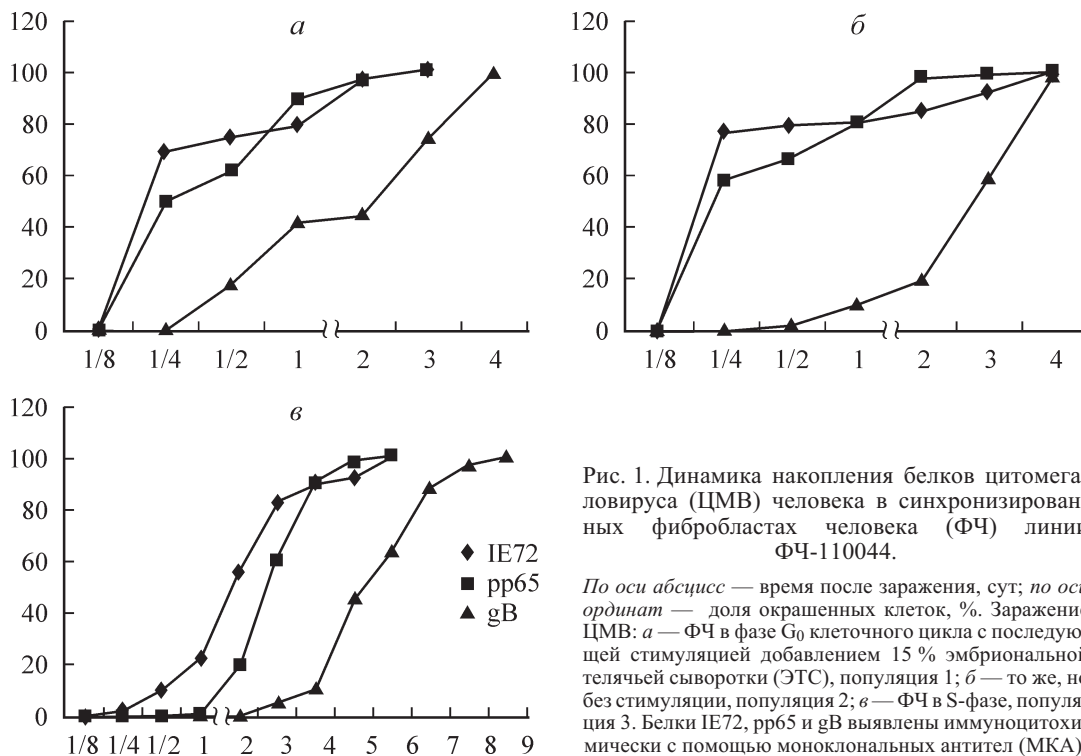


Рис. 1. Динамика накопления белков цитомегаловируса (ЦМВ) человека в синхронизированных фибробластах человека (ФЧ) линии ФЧ-110044.

По оси абсцисс — время после заражения, сут; по оси ординат — доля окрашенных клеток, %. Заражение ЦМВ: а — ФЧ в фазе G_0 клеточного цикла с последующей стимуляцией добавлением 15 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), популяция 1; б — то же, но без стимуляции, популяция 2; в — ФЧ в S-фазе, популяция 3. Белки IE72, pp65 и gB выявлены иммуноцитохимически с помощью моноклональных антител (МКА).

Иммуноцитохимическое выявление белка сверхраннего IE72, раннего pp65 и позднего gB проводили в клетках, зараженных в трех пролиферативных состояниях, в динамике инфекции (популяции 1—3). В клеточных популяциях 1 и 2 число клеток, содержащих сверхранний IE72 и ранний pp65 белки, быстро нарастало и к концу 1-х сут почти достигало максимального уровня (рис. 1, а, б). В то же время в популяции 2 наблюдали отставание в динамике накопления позднего белка gB (рис. 1, б). В фибробластах популяции 3, зараженных ЦМВ в S-фазе, синтез вирусных белков происходил с задержкой (рис. 1, в): через 1 сут инфекции доля клеток, содержащая сверхранний белок IE72, составляла 20 %, ранний pp65 и поздний gB белки — менее 1 %. Существенное отставание в динамике синтеза вирусных белков в S-фазных фибробластах коррелировало с низкой эффективностью продукции ими инфекционного вируса (Соколова и др., 2007а). Полученные данные согласуются с мнением о том, что пролиферативное состояние клеток в момент заражения ЦМВ является существенным ограничивающим фактором вирусной репликации. Представлялось важным выяснить на модели ЦМВИ роль гена и белка Bcl-2 в развитии ЦМВ-индуцированного апоптоза в описанных выше клеточных популяциях, различающихся пролиферативным состоянием и интенсивностью инфекционного процесса.

Транскрипционный контроль экспрессии гена *bcl-2* в G_0 - и S-фазных ФЧ-110044. Методом полуколичественной ОТ-ПЦР сравнили уровни мРНК *bcl-2* в популяциях 1 и 3, которые существенно различались динамикой накопления вирусных белков. На рис. 2, а—в представлены специфические ДНК-амплификаты *bcl-2* размером 209 н.п., полученные с материалом РНК, выделенной из контрольных и зараженных культур через 1/4, 1/2, 1 и 2 сут после заражения вирусом. При исследовании контрольных клеток наиболее высокие уровни транскрипции *bcl-2* были выявлены в покоящихся ФЧ. Активность гена *bcl-2* в них превышала уровень в S-фаз-

ных клетках в 10 раз (рис. 2, а). Это указывает на индукцию в G_0 -клетках, лишенных сывороточных ростовых факторов, Bcl-2-защитного механизма клеточной выживаемости (Billstrom-Schroeder et al., 2002). При вступлении G_0 -клеток в митотический цикл под действием сыворотки (популяция 1) уровень транскрипции мРНК *bcl-2* быстро снижался (рис. 2, б, верхний ряд, дорожки 1, 3), затем снова возрастал к 24 ч и опять снижался к 48 ч (дорожки 5, 7 соответственно). Таким образом, движение по клеточному циклу и деление клеток сопровождалось изменениями уровней мРНК *bcl-2*. В то же время контрольные S-фазные ФЧ (популяция 3) через 1/2 и 1 сут наблюдения имели низкие (неопределяемые) уровни активности гена *bcl-2* (рис. 2, б нижний ряд, дорожки 3, 5, неразведенная кДНК). Однако ко 2-м сут, когда плотность клеточного монослоя становилась высокой, уровень транскрипции мРНК *bcl-2* в них возрастал (рис. 2, б, нижний ряд, дорожка 7).

Заражение ЦМВ ФЧ на стадии G_0 повышало активность гена *bcl-2* на ранних сроках и через 2 сут (рис. 2, б, верхний ряд, дорожки 2, 4, 8). В инфицированных G_0 -клетках по сравнению с контрольными уровень мРНК был выше не менее чем в 10 раз. В зараженных S-фазных клетках через 1/2 и 1 сут транскрипционная активность гена *bcl-2* также возрастала относительно уровня в контрольной популяции (рис. 2, б, нижний ряд, дорожки 4, 6). Через 1 сут инфекции (период максимально высоких уровней синтеза ранних вирусных белков IE72 и pp65; рис. 1, а) влияние ЦМВ на транскрипцию мРНК *bcl-2* в популяциях 1 и 3 было противоположным (рис. 2, б, дорожки 5, 6 соответственно). В популяции 1 с активной репликацией ЦМВ наблюдали подавление транскрипции мРНК *bcl-2*. Наоборот, в популяции 3 с медленным развитием ЦМВИ стимуляция транскрипции мРНК *bcl-2* сохранялась.

Зависимость чувствительности клеток к ЦМВ от уровня транскрипционной активности *bcl-2* изучали в

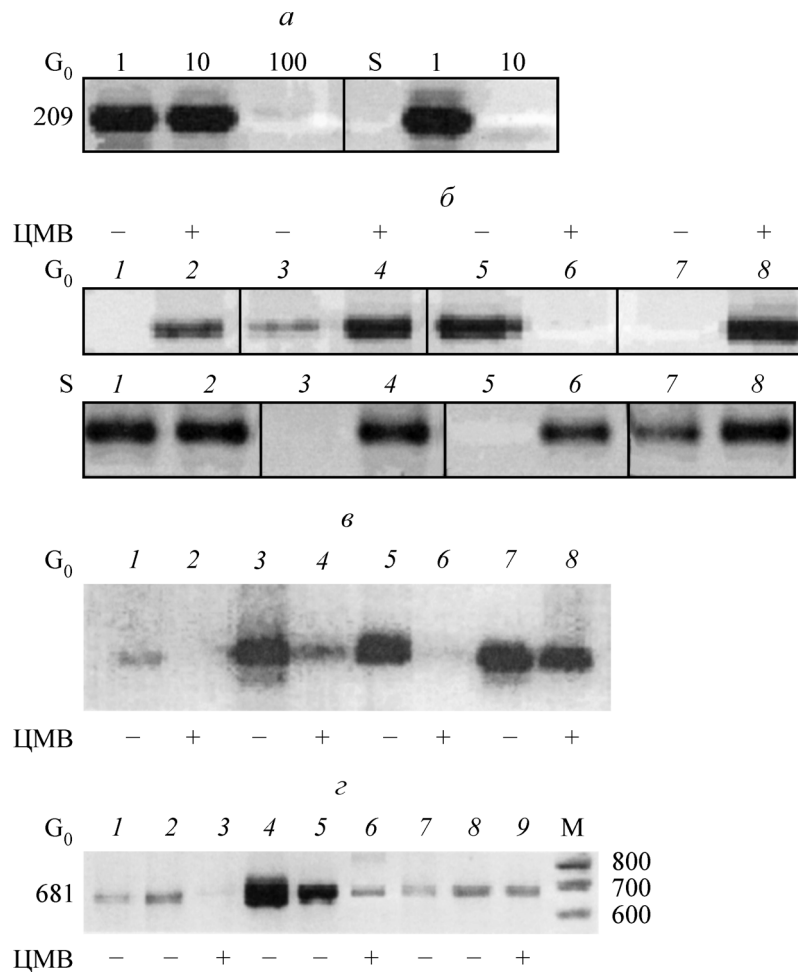


Рис. 2. Уровни транскрипции мРНК *bcl-2* и мРНК *гамма-актина* в контрольных ФЧ и зараженных ЦМВ в состоянии покоя (фаза G₀) и синтеза ДНК (фаза S).

Электрофорез ОТ-ПЦР-продуктов в 1.5%-ном агарозном геле с бромистым этидием. *а* — мРНК *bcl-2* в ФЧ-110044 в состоянии покоя и синтеза ДНК до заражения ЦМВ; *дорожки*, обозначенные цифрами 1, 10 и 100, соответствуют разведениям кДНК; 209 — размер ПЦР-продукта *bcl-2*, н. п., *б* — мРНК *bcl-2* в динамике ЦМВ-инфекции в клетках ФЧ-110044 (популяции 1 и 3). Заражение в фазе G₀ (разведение кДНК 1/10) и в S-фазе (кДНК без разведения). Сроки определения, сут: 1/4 (*дорожки* 1, 2), 1/2 (*дорожки* 3, 4), 1 (*дорожки* 5, 6) и 2 (*дорожки* 7 и 8). *в* — мРНК *bcl-2* в двух линиях ФЧ с разной чувствительностью к ЦМВ. Заражение вирусом ФЧ в фазе G₀ (разведение кДНК 1/10) с последующей стимуляцией 15%-ной ЭТС. ФЧ-977 (высокочувствительные к ЦМВ): *дорожки* 1, 2 — через 1/4 сут; 5, 6 — через 1/2 сут. ФЧ-1608 (малочувствительные к ЦМВ): *дорожки* 3, 4 — через 1/4 сут; 7, 8 — через 1/2 сут. *г* — мРНК *гамма-актина* в ФЧ, зараженных ЦМВ. Разведение кДНК 1/1000; *дорожки* 1–3 — клетки ФЧ-110044 (популяция 1); 4–6 — ФЧ-110044 (популяция 3); 7–9 — клетки ФЧ-977 (синхронизированные в фазе G₀). Сроки определения: 0 ч — до заражения (*дорожки* 1, 4, 7) и 1/2 сут — после него (*дорожки* 3, 6, 9); *слева* — размер ПЦР-продукта *гамма-актина* (681 н. п.), М — маркеры ДНК, *справа* — молекулярная масса. *а–г*: «-» и «+» — соответственно ФЧ, контрольные и зараженные ЦМВ клетки.

опытах на двух линиях ФЧ, синхронизированных в состоянии G₀: высокочувствительной ФЧ-977 (легких эмбриона человека) и низкочувствительной ФЧ-1608 (кожи взрослого человека) (Соколова и др., 2007а, 2007б). В обеих линиях клеток влияние ЦМВ на транскрипцию мРНК *bcl-2* было ингибирующим уже на ранних сроках инфекции (рис. 2, *в*, *дорожки* 2, 4, 6). При этом высокочувствительные ФЧ-977 через 1/4 сут после стимуляции состояния покоя добавлением 15 % ЭТС имели более низкие уровни транскрипции мРНК *bcl-2*, чем резистентные ФЧ-1608 (рис. 2, *в*, *дорожки* 1, 3 соответственно). Через 1/2 сут ЦМВИ в чувствительной линии фибробластов подавление генной активности усиливалось, тогда как в резистентной становилось слабо выраженным (рис. 2, *в*, *дорожки* 6, 8 соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что чувствительность линий ФЧ к ЦМВ и степень угнетения вирусом транскрипции гена *bcl-2* позитивно коррелируют между собой.

Влияние пролиферативного состояния ФЧ-110044 на индукцию синтеза белка Bcl-2 при ЦМВИ. В популяциях 1 и 2 через 1 сут продуктивной ЦМВИ белок Bcl-2 накапливался максимально быстро, уже начиная с ранних сроков после заражения (рис. 4, *а*), в целом коррелируя с выраженной стимуляцией в них транскрипции мРНК. За этот период почти все клетки ФЧ-110044 популяций 1 и 2 были маркированы антителами к Bcl-2. В популяции 3 синтез антиапоптотического белка происходил с выраженным отставанием и выявлялся в 100 % клеток только на 7-е сут. Отсутствие белка-антигена Bcl-2 в S-фазных ФЧ популяции 3 в течение 1-х и 2-х сут наблюдения позитивно коррелировало с более низкими уровнями мРНК *bcl-2* в делящихся клетках. В отличие от метода ОТ-ПЦР иммунохимическое определение белка-антигена в популяции 1 не выявило снижения уровня Bcl-2 через 1 сут после заражения. На рис. 3, *а* представлена локализация Bcl-2 в виде цитоплазм-

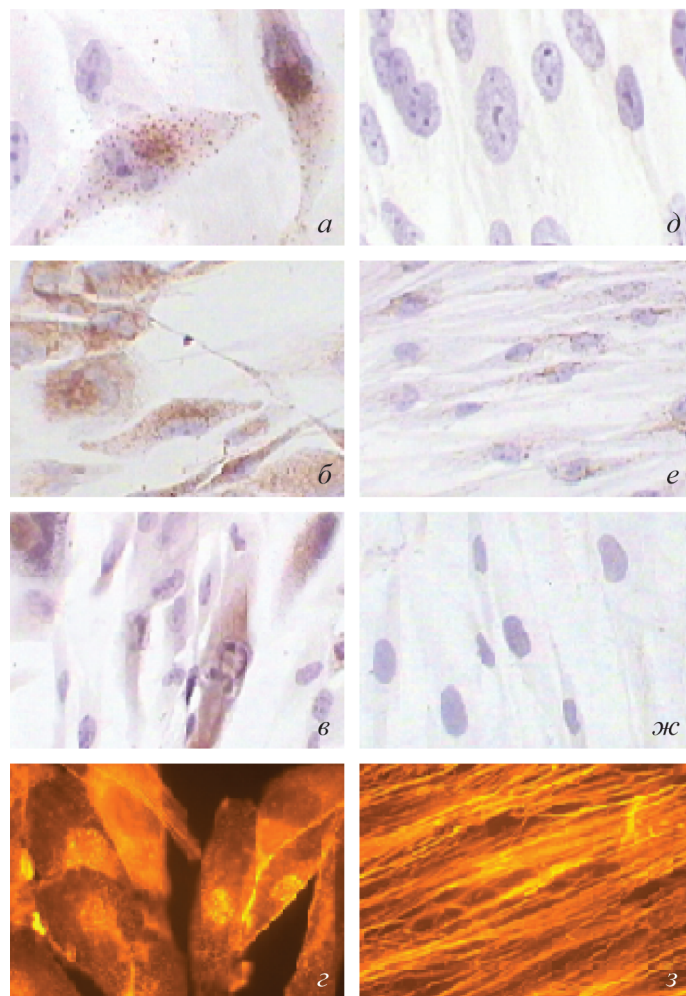


Рис. 3. Иммуноцитохимическое выявление маркеров апоптоза.

На фотографиях (а—жс) показаны зараженные ЦМВ (слева) и контрольные (справа) ФЧ-110044, меченные МКА к белку Bcl-2 (а, д), цитохрому с (б, е) и каспазе 3 (в, жс); об. 60×. з, з — актиновые филаменты, окрашенные родамином-фаллоидином; об. 90×.

матических гранул. С помощью антител в незараженных контрольных клетках Bcl-2 не был обнаружен, возможно из-за его малой доступности в составе митохондриальной мембраны (рис. 3, д).

Выход цитохрома с в цитоплазму ЦМВ-инфицированных ФЧ-110044 изучали иммуноцитохимическим методом. В цитоплазме ЦМВ-инфицированных клеток с признаками характерного цитопатического действия наблюдали интенсивное диффузное окрашивание цитохрома с (рис. 3, б). Такой характер окрашивания свидетельствует о выходе цитохрома с из митохондрий в цитоплазму и об активации митохондриального пути апоптоза. В контрольных фибробластах с типичной морфологией окраска цитохрома с в цитоплазме была слабой или отсутствовала (рис. 3, е). Динамика высвобождения цитохрома с была наиболее быстрой в популяции 1 (заражение ЦМВ на стадии G₀ клеточного цикла и затем стимуляция пролиферации, рис. 4, б). В популяции 2 (заражение ЦМВ на стадии G₀ без стимуляции) выход цитохрома с в цитоплазму отставал приблизительно на 1 сут. Возможно, это объясняется более медленным синтезом позднего белка оболочки gB в нестимулированных добавлением сыворотки ФЧ-110044 (рис. 1, б). В клетках популяции 3 (зараженные ЦМВ в фазе синтеза ДНК) накопление цитохрома с в цитоплазме происходило

медленно и достигало 100 % только к 7-м сут после заражения.

Обнаружение активной формы каспазы 3 представлено на рис. 3, в и 4, в. В контрольных культурах ФЧ-110044 не было обнаружено клеток, содержащих активную форму каспазы 3 (рис. 3, жс). В зараженных ЦМВ G₀-клетках (популяции 1 и 2) выявление активированной формы фермента коррелировало с динамикой высвобождения цитохрома с и быстрее происходило в G₀-фибробластах после стимуляции пролиферации (популяция 1) и значительно медленнее — в популяции 3 (рис. 3, в; 4, в). Индукция обоих маркеров митохондриального апоптоза — цитохрома с и каспазы 3 — происходила на ранних сроках продуктивной ЦМВИ в популяциях 1 и 2 и, следовательно, коррелировала с уровнями синтеза ранних вирусных белков. В культуре, инфицированной в фазе S, прирост количества меченых клеток с активной каспазой 3 происходил медленно и только к 7-м сут достигал уровня 100 %.

Влияние ЦМВИ на структуру цитоскелета. С использованием окраски родамином-фаллоидином актиновых филаментов, ОТ-ПЦР-анализа мРНК *гамма-актина*, а также антител к α -тубулину было изучено действие ЦМВИ на два компонента цитоскелета — микрофиламенты и микротрубочки. В контрольных клетках

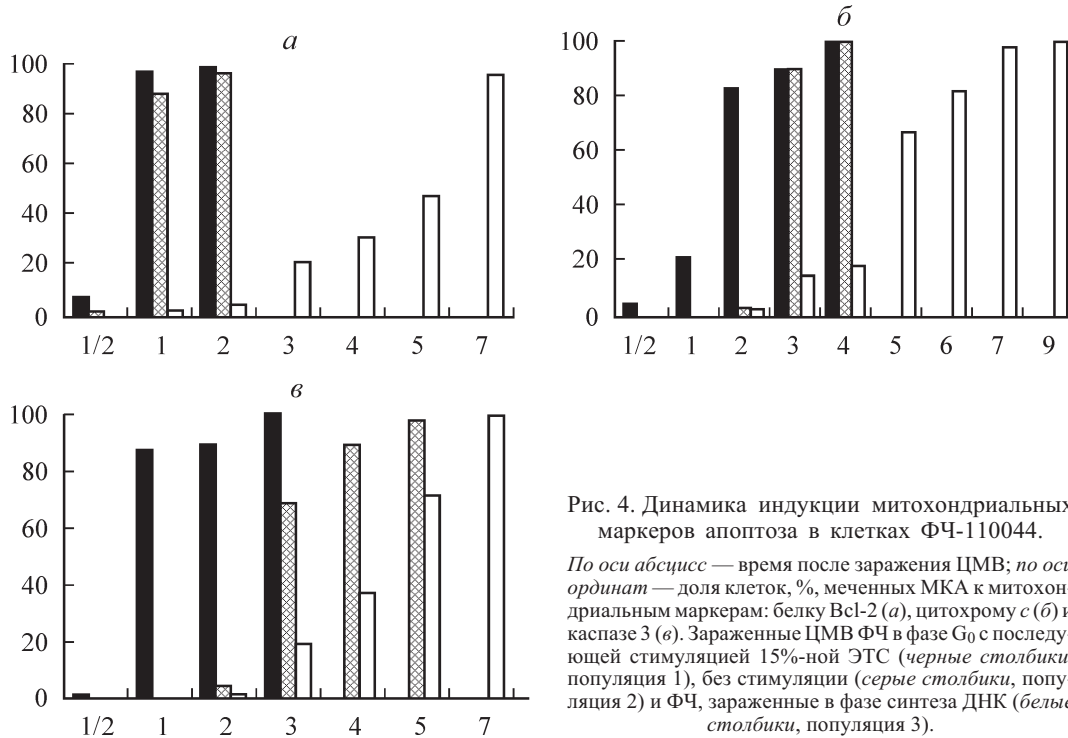


Рис. 4. Динамика индукции митохондриальных маркеров апоптоза в клетках ФЧ-110044.

По оси абсцисс — время после заражения ЦМВ; по оси ординат — доля клеток, %, меченных МКА к митохондриальным маркерам: белку *Bcl-2* (а), цитохрому *c* (б) и каспазе 3 (в). Зараженные ЦМВ ФЧ в фазе G_0 с последующей стимуляцией 15%-ной ЭТС (черные столбики, популяция 1), без стимуляции (серые столбики, популяция 2) и ФЧ, зараженные в фазе синтеза ДНК (белые столбики, популяция 3).

ФЧ-110044 характер окраски свидетельствовал о типичной структуре тяжелой актиновых филаментов (рис. 3, з). В ЦМВ-инфицированных культурах структура актиновых тяжей нарушалась и характер окрашивания был диффузным (рис. 3, з). Дезорганизация актиновых фибрилл быстрее проявлялась в ФЧ в фазе G_0 с последующей стимуляцией 15%-ной ЭТС, чем в клетках, не стимулированных сывороткой. Медленное развитие ЦМВИ в S-фазных ФЧ также сопровождалось изменениями в структуре актиновых волокон, но с отставанием в динамике. Сравнительное исследование транскрипции мРНК *гамма-актина* при ЦМВИ в популяциях клеток 1 и 3 выявило подавление уровня транскриптов уже через 1/2 сут после заражения ЦМВ (рис. 2, з, дорожки 3, б, разведения кДНК 1/1000). В незараженных S-фазных ФЧ выявлен высокий уровень транскрипции актинового гена и эффект его ингибирования был более выраженным (рис. 2, з, дорожки 4, б соответственно). В G_0 -клетках линии ФЧ-977 на раннем сроке продуктивной ЦМВИ (1/2 сут) не было обнаружено снижения транскрипции мРНК *гамма-актина*. В этом случае причиной дезорганизации актиновых филаментов, скорее всего, являлось посттрансляционное расщепление актина каспазой 3. Окрашивание инфицированных ЦМВ клеток антителами к α -тубулину не выявило существенных различий в распределении и характере окраски сети микротрубочек, что свидетельствует об устойчивости тубулина к каспазе 3 (данные не приводятся).

Обсуждение

Изменения активности клеточных генов под действием ЦМВ имеют сложный характер и касаются большого числа клеточных генов, среди которых гены, регулирующие пролиферацию, апоптоз и антивирусное состояние занимают существенное место (Challacombe et al., 2004). В настоящей работе впервые были сопоставлены динамика развития и характеристики митохондриального апоптоза,

индуцированного ЦМВ в покоящихся (в фазе G_0) и в пролиферирующих (в фазе S) ФЧ. Исследованные модели существенно различаются скоростью развития инфекционного процесса, уровнями накопления вирусных продуктов и динамикой митохондриального апоптоза. Согласно полученным данным, динамика индукции маркеров апоптоза в ЦМВ-инфицированных ФЧ-110044 зависела от пролиферативной активности клеток в момент заражения и прямо коррелировала с синтезом вирусных белков. Наиболее быстрая индукция маркеров митохондриального апоптоза — цитохрома *c* и активной каспазы 3 — выявлена в клетках, инфицированных в состоянии покоя. В клетках, находящихся в момент заражения в фазе синтеза ДНК, процессы ЦМВ-индуцированного апоптоза развивались с задержкой на 4–5 сут. Результаты нашей работы подтверждают данные о влиянии пролиферативного состояния клеток в момент заражения на динамику развития ЦМВИ (Fortunato et al., 2002; Федорова и др., 2003) и показывают ассоциацию процессов вирусиндуцированного митохондриального апоптоза с остановкой пролиферации. В S-фазных клетках, в которых происходит блокада экспрессии вирусных IE-генов, а также замедлен синтез белков раннего pp65 и позднего gB, индукция апоптотических процессов в митохондриях происходила медленно. Даже на фоне высоких уровней экспрессии гена *fas* — сигнального рецептора апоптоза (Федорова и др., 2008) — и, как следует из представленной работы, низких уровней экспрессии гена *bcl-2* ЦМВ не способен вызвать быстрое развитие апоптоза в S-фазных клетках. Резистентность к вирусу в S-периоде, по-видимому, обусловлена ростом активности антивирусных генов (2',5'-OAC, альфа- и гамма-ИФН) (Соколова и др., 2007а, 2007б).

Одна из задач настоящей работы состояла в сравнении транскрипционной активности гена *Bcl-2* в клетках, находящихся в различных пролиферативных состояниях. Для этого анализировали незараженные контрольные культуры ФЧ, синхронизированные в состоянии покоя и

синтеза ДНК (G_0 - и S-фазы). Более высокие уровни транскрипции мРНК *bcl-2* в G_0 -ФЧ, лишенных ростовых факторов, по сравнению с S-фазными ФЧ указывает на защитную роль гена *bcl-2* в условиях индукции апоптоза при сывороточном голодании, что согласуется с данными литературы (Billstrom-Schroeder et al., 2002). Этот вывод подтверждают данные о том, что добавление к покоящимся фибробластам ростовых факторов вызывало быстрое снижение уровня транскрипции мРНК *bcl-2*.

Наши результаты впервые демонстрируют способность ЦМВ контролировать гибель клеток, стимулируя или подавляя транскрипцию клеточного гена *bcl-2*. Так как изменение экспрессии гена *bcl-2* может привести к разным формам развития вирусной инфекции — от острой с быстрой гибелью клеток до хронической с медленным развитием патологического процесса, — представляло интерес сравнить уровни его генной активности в клетках, зараженных ЦМВ. Для этого использовали 2 модели: клетки одной линии (ФЧ-110044) заражали ЦМВ в двух разных пролиферативных состояниях и клетки трех линий ФЧ, находившиеся в состоянии G_0 (ФЧ-110044, ФЧ-977 и ФЧ-1608), но различающиеся чувствительностью к ЦМВ (по скорости синтеза вирусных белков и продукции инфекционного вируса). В исследованных линиях клеток изменения генной активности *bcl-2* не были однозначными по динамике инфекции. В фибробластах линии ФЧ-110044 на ранних сроках ЦМВИ (1/4 и 1/2 сут) активность гена *bcl-2* возрастала, но через 1 сут падала (рис. 2, а, б). В клетках ФЧ-977 и ФЧ-1608 на ранних сроках ЦМВИ, наоборот, наблюдали подавление генной активности *bcl-2* (рис. 2, в). Быстрая гибель зараженных ФЧ в фазе G_0 при продуктивной ЦМВИ сочеталась с падением уровня транскрипции гена *bcl-2*. Стимуляция активности гена *bcl-2* в клетках ФЧ-110044, по-видимому, необходима ЦМВ для отсрочки гибели клеток и обеспечения вирусной репликации. Подобный эффект *bcl-2* показан на модели вируса простого герпеса (Sciortino et al., 2006). Позитивная регуляция *bcl-2* при ЦМВИ дополняла действие кодируемого вирусом ингибитора митохондриального апоптоза vMIA (Arnoult et al., 2004; Reboredo et al., 2004). При медленном развитии инфекционного процесса в S-фазных ФЧ-110044 выключения транскрипции *bcl-2* не происходило (рис. 2, б). Сопоставление данных транскрипции гена *bcl-2* свидетельствует о прямой связи негативной регуляции генной активности с чувствительностью к ЦМВ в двух линиях клеток (ФЧ-977 и ФЧ-1608). Однако следует отметить, что в ФЧ-110044, среднечувствительных к ЦМВ, вирусный контроль *bcl-2* имел двунаправленный временной характер: стимуляция на ранних сроках инфекции и подавление к концу 1-х сут, в период максимального накопления сверххраненных и ранних вирусных белков. Скорость развития апоптоза в клетках ФЧ-110044 позитивно коррелировала с эффектом временного выключения экспрессии *bcl-2* и остановкой пролиферации как в момент заражения, так и в ходе вирусной репликации. Важно сопоставить влияние ЦМВ на транскрипционную активность генов *bcl-2* и *fas* в этих линиях клеток. В ФЧ-110044 подавление апоптозного гена *fas* (Федорова и др., 2008) сопровождалось повышением уровня транскрипции пролиферативного *bcl-2*. В ФЧ-977 стимуляция гена *fas* ассоциировалась с подавлением *bcl-2*. Следует отметить, что в ФЧ-977 рост транскрипции мРНК 2', 5'-олигоаденилатсинтетазы при ЦМВИ также коррелировал с падением транскрипции *bcl-2* мРНК (Соколова и др., 2007а). Результаты анализа ОТ-ПЦР транс-

крипции гена *bcl-2* в ФЧ-110044 были подтверждены определением белка Bcl-2 иммуноцитохимическим методом с помощью антител. Наиболее эффективно накопление белка происходило в популяции 1 ФЧ-110044 в фазе G_0 после стимуляции ростовыми факторами. Результаты сравнительного анализа скорости синтеза вирусных белков и уровня индукции белка Bcl-2 в популяциях 1 и 2 позволили предположить, что оба процесса позитивно взаимосвязаны.

Активированная каспаза 3 расщепляет ряд важных клеточных субстратов — поли(АДР-рибозу)полимеразу, препятствуя репарации ДНК, и белки цитоскелета, в том числе актин (Hengartner, 2000). В ряде клеточных типов каспаза 3 высвобождает ДНК-эндонуклеазу, что приводит к межнуклеосомному расщеплению ДНК. Хотя при ЦМВИ в ФЧ не обнаружено фрагментации клеточной ДНК в виде «лестницы», синтез клеточной ДНК был подавлен (Федорова и др., 2003) и нарушена структура центросомы, что могло приводить к патологическим митозам (Bystrevskaya et al., 1997). Иммуноцитохимическое исследование актиновых филаментов в ЦМВ-зараженных клетках, проведенное в настоящей работе, подтвердило их разрушение в динамике инфекции. Динамика накопления фибробластов с диффузным характером окрашивания актиновых волокон совпала с увеличением количества клеток, содержащих активную каспазу 3. Сравнительный анализ уровней транскрипции мРНК *гамма-актина* в покоящихся и в S-фазных ФЧ показал, что при ЦМВИ активность гена снижена сильнее в делящихся клетках. Подобные нарушения транскрипционной активности мРНК *бета-актина*, фибрилл цитоскелета и молекул клеточной адгезии обнаружены при ЦМВИ и другими авторами (Hertel, Mocarski, 2004; Lin et al., 2004). В отличие от актиновых волокон сеть микротрубочек мало видоизменялась в ЦМВ-зараженных клетках, что, возможно, объясняется устойчивостью микротубулярных структур к индукторам апоптоза (Домнина и др., 2002). Можно предположить, что в тубулиновых белках, входящих в состав микротрубочек, сайты протеолитического действия каспаз экранированы или отсутствуют.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что для контроля процессов митохондриального апоптоза ЦМВ использует наряду с вирусными генами и клеточный ген *bcl-2*, повышая или снижая его транскрипционную активность в динамике инфекции. Промоторы гена *bcl-2* содержат сайты активации для многих сигналов, в том числе для цАМФ-фактора CREB/ATF1 (Bigelow et al., 2004). TDarpp-белки регулируют Bcl-2 на транскрипционном уровне с участием киназы Akt, которая, как и Bcl-2, является регулятором клеточной выживаемости и блокирует апоптоз, индуцированный ростовыми факторами и химиотерапевтическими воздействиями (Belkhir et al., 2008). Наиболее вероятными сигнальными путями регуляции генной активности *bcl-2*, используемыми ЦМВ, являются P13K/Akt (Johnson et al., 2001; Luo et al., 2003) и интерферонзависимый Jak/STAT (Paulus et al., 2006; Zhou et al., 2008) с участием фермента 2', 5'-олигоаденилатсинтетазы (Соколова и др., 2007а).

Список литературы

Глазунова В. А., Штиль А. А. 2008. Митохондриальные механизмы апоптоза в ответ на повреждение ДНК. Молекуляр. биол. 42 (5) : 765—771.

- Домнина Л. В., Иванова О. Ю., Черняк Б. В., Скулачев В. П., Васильев Ю. М. 2002. Влияние ингибиторов цитоскелетных структур на развитие апоптоза, индуцированного фактором некроза опухолей. Биохимия. 67(7): 890—900.
- Соколова Т. М., Бибикина О. В., Быстров Н. С., Урываев Л. В. 2005. Экспрессия генов системы интерферона и клеточного апоптоза в пробах крови человека. Вопр. вирусол. 50 (1): 19—23.
- Соколова Т. М., Федорова Н. Е., Меджидова М. Г., Терехов С. М., Урываев Л. В., Куц А. А. 2007а. Регуляция уровня генной активности 2', 5'-олигоаденилатсинтазы цитомегаловирусом в фибробластах человека. Вопр. вирусол. 52 (1): 28—36.
- Соколова Т. М., Федорова Н. Е., Меджидова М. Г., Терехов С. Н., Урываев Л. В., Куц А. А. 2007б. Механизмы клеточной резистентности к цитомегаловирусу связаны с транскрипционной активностью генов лейкоцитарного и иммунного интерферонов. Мед. иммунол. 4—5: 457—466.
- Федорова Н. Е., Меджидова А. А., Меджидова М. Г., Куц А. А. 2003. Блок клеточной пролиферации и патологии митоза в клетках, инфицированных цитомегаловирусом: роль периода клеточного цикла в момент заражения. Докл. РАН. 392: 471—474.
- Федорова Н. Е., Соколова Т. М., Меджидова М. Г., Урываев Л. В., Куц А. А. 2008. ЦМВ-индуцированная гибель клеток и экспрессия гена *Fas* в покоящихся и пролиферирующих фибробластах человека. ЖМЭИ. 5: 42—48.
- Andoniou C. E., Degli-Esposti M. A. 2006. Insights into the mechanisms of CMV-mediated interference with cellular apoptosis. Immunol. Cell Biol. 84: 99—106.
- Arnoult D., Bartle L. M., Skaletskaya A., Porcet D., Zamzami N., Park P. U., Sharpe J., Youle R. J., Goldmacher V. S. 2004. Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101: 7988—7993.
- Belkhir A., Dar A. A., Zaika A., Kelly M., El-Rifai W. 2008. tDarpp promotes cancer cell survival by up-regulation of Bcl2 through Akt-dependent mechanism. Cancer Res. 68: 395—403.
- Bigelow R. L. H., Chari N. S., Uden A. B., Spurgers K. B., Lee S., Roop D. R., Toftgard R., McDonnell T. J. 2004. Transcriptional regulation of Bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. J. Biol. Chem. 279: 1197—1205.
- Billstrom-Schroeder M., Christensen R., Worthen G. S. 2002. Human cytomegalovirus protects endothelial cells from apoptosis induced by growth factor withdrawal. J. Clin. Virol. 25 (Suppl. 2): S149—S157.
- Bystrevskaya V. B., Lobova T. V., Smirnov V. N., Makarova N. E., Kushch A. A. 1997. Centrosome injury in cells infected with human cytomegalovirus. J. Struct. Biol. 120: 52—60.
- Casavant N. C., Luo M. H., Rosenke K., Winegardner T., Zurawska A., Fortunato E. A. 2006. Potential role for p53 in the permissive life cycle of human cytomegalovirus. J. Virol. 80: 8390—8401.
- Castillo J. P., Frame F. M., Rogoff H. A., Pickering M. T., Yurochko A. D., Kowalik T. F. 2005. Human cytomegalovirus IE1—72 activates Ataxia Telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. J. Virol. 79: 11 467—11 475.
- Castillo J. P., Kowalik T. F. 2002. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. Gene. 290: 19—34.
- Castillo J. P., Yurochko A. D., Kowalik T. F. 2000. Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. J. Virol. 74: 8028—8037.
- Challacombe J. F., Rechtsteiner A., Gottardo R., Rocha L. M., Browne E. P., Shenk T., Alther M. R., Brettin T. S. 2004. Evaluation of the host transcriptional response to human cytomegalovirus infection. Physiol. Genomics. 18: 5—62.
- Chipuk J. E., Green D. R. 2008. How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization. Trends Cell Biol. 18: 157—164.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156—159.
- Erba H. P., Eddy R., Shows T., Kedes L., Gunning P. 1988. Structure, chromosome location, and expression of the human *gamma-actin* gene: differential evolution, location, and expression of the cytoskeletal *beta-* and *gamma-actin* genes. Mol. Cell Biol. 8: 1775—1789.
- Fortunato E. A., Sanchez V., Yen J. Y., Spector D. H. 2002. Infection of cells with human cytomegalovirus during S phase results in a blockade to immediate-early gene expression that can be overcome by inhibition of the proteasome. J. Virol. 76: 5369—5379.
- Ginsberg D. 2002. E2F1 pathways to apoptosis. FEBS Lett. 529: 122—125.
- Goldmacher V. S. 2005. Cell death suppression by cytomegaloviruses. Apoptosis. 10: 251—265.
- Gulbins E., Dreschers S., Bock J. 2003. Role of mitochondria in apoptosis. Exp. Physiol. 88: 85—90.
- Hengartner M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature. 407: 770—776.
- Hertel L., Mocarski E. S. 2004. Global analysis of host cell gene expression late during cytomegalovirus infection reveals extensive dysregulation of cell cycle gene expression and induction of Pseudomonas independent of US28 function. J. Virol. 78: 11 988—20 011.
- Johnson R. A., Wang X., Ma X. L., Huang S. M., Huang E. S. 2001. Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling. J. Virol. 75: 6022—6032.
- Lin M. F., Wei G. Q., Huang H., Cai Z. 2004. Human cytomegalovirus induces alteration of beta-actin mRNA and microfilaments in human embryo fibroblast cells. J. Zhejiang Univ. Sci. 5: 733—737.
- Luo H. R., Hattori H., Hossain M. A., Hester L., Huang Y., Lee-Kwon W., Donowitz M., Nagata E., Snyder S. H. 2003. Akt as a mediator of cell death. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100: 11 712—11 717.
- McCormick A. L. 2008. Control of apoptosis by human cytomegalovirus. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 325: 281—295.
- Paulus C., Krauss S., Nevels M. 2006. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103: 3840—3845.
- Reboredo M., Greaves R. F., Hahn G. 2004. Human cytomegalovirus proteins encoded by UL37 exon 1 protect infected fibroblasts against virus-induced apoptosis and are required for efficient virus replication. J. Gen. Virol. 85: 3555—3567.
- Sciortino M. T., Perry D., Medici M. A., Grelli S., Serafino A., Borner C., Mastino A. 2006. Role of bcl-2 expression for productive herpes simplex virus 2 replication. Virology. 356: 136—146.
- Skaletskaya A., Bartle L.M., Chitenden T., McCormick A.I., Mocarski E.S., Goldmacher V.S. 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98: 7828—7834.
- Tsujimoto Y., Croce C. M. 1986. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83: 5214—5218.
- Zhou Y., Weyman C. M., Liu H., Almasan A., Zhou A. 2008. IFN-gamma induces apoptosis in HL—60 cells through decreased Bcl-2 and increased Bak expression. J. Interferon Cytokine Res. 28: 65—72.

DIFFERENT REGULATION OF MITOCHONDRIAL APOPTOSIS AND *Bcl-2* GENE EXPRESSION
IN QUIESCENT AND PROLIFERATIVE HUMAN FIBROBLASTS INFECTED
WITH CYTOMEGALOVIRUS

N. E. Fedorova, T. M. Sokolova,¹ M. G. Medzhidova, A. A. Kushch

D. I. Ivanovsky Institute of Virology RAMS, Moscow;

¹ e-mail: tmsokolovavir@mail.ru

The aim of the study was to compare the dynamics of mitochondrial apoptosis (MA) in cells at different stages of proliferation and with different susceptibility to cytomegalovirus (CMV). It has been found that in quiescent human fibroblasts (HF) CMV regulates MA at the level of *bcl-2* gene transcription, exerting both pro- and anti-apoptotic effects. Suppression of *bcl-2* transcription is greater in HF-977 line, which is highly susceptible to CMV in comparison with HF-1068 line. The effect of proliferative activity on MA was studied using CMV-infected HF-110044 line at the G₀- or S-phase. A direct correlation was established between accumulation of cytochrome *c* and caspase 3 (MA markers) and production of IE72, pp65 and gB (CMV proteins). In G₀-fibroblasts, viral replication was highly productive and *bcl-2* expression was 10-fold as high as in S-phase cells, in which viral protein production and cell death were much lower. The increased gene transcription and accumulation of Bcl-2 protein enhanced cell viability and provided synthesis of viral proteins. Impaired structure of actin microfilaments, a caspase 3 target, coincided with pronounced suppression of gamma-actin gene in S-phase HF-110044. Our findings provide an insight into CMV-induced mechanisms of MA which lead to rapid death of infected quiescent fibroblasts and to slow death of cells infected at the stage of DNA synthesis.

Key words: mitochondrial apoptosis markers, cytomegalovirus, proliferation human fibroblasts, transcription of *bcl-2* and gamma-actin genes.