

УДК 611.93.573.324.11

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Л. А. Рухкян, Р. А. Захарян, С. Н. Айрапетян

## О механизме подавляющего действия дс-РНК на сорбцию вируса на клеточной мембране

(Представлено академиком АН Армянской ССР Э. Г. Африкяном 9/X 1985)

Среди факторов, определяющих противовирусную резистентность клетки организма, наиболее изученными являются система интерферонов и активируемые ими механизмы, подавляющие размножение вируса на стадии внутриклеточных этапов репродукции: синтез вирусспецифических ферментов, белков, нуклеиновых кислот (<sup>1</sup>). В то же время возможные механизмы десенсилизации плазматической мембраны клетки к процессу адсорбции вируса, т. е. первого этапа контакта вирусной частицы с клеткой, практически не изучены.

Ранее нами на модельных экспериментах было продемонстрировано, что двуспиральная РНК (дс-РНК—индуктор интерферона) является одновременно мембранно-активным соединением—значительно стимулирует пейсмекерную активность нейрона, и эта стимуляция сопровождается увеличением в клетке уровня сАРМ, входа ионов  $\text{Ca}^{++}$ .

Предыдущими нашими работами было показано, что фосфорилирование мембраны приводит к подавлению сродства хеморецепторов для синаптических медиаторов, имеющих пептидную природу (<sup>2</sup>). Судя по аналогии рецептор-лиганд взаимодействия предполагалось, что процесс вирус-мембрана взаимодействие также будет находиться в зависимости от степени фосфорилирования поверхностной мембраны клетки. Проверке данного предположения посвящена настоящая работа, в которой исследованы: процесс адсорбции вируса на плазматической мембране клетки в условиях воздействия дс-РНК, роль ионов  $\text{Ca}^{++}$ , уровень фосфорилирования мембранных белков при подавлении адсорбции вируса.

Полученные результаты позволяют сформулировать механизм понижения сродства плазматической мембраны клетки к адсорбции вируса путем фосфорилирования плазматической мембраны, возможно вирусных рецепторов.

В работе использована однослойная культура фибробластов куриного эмбриона. В качестве питательной среды употребляли среду 199 с 10% бычьей сыворотки. Клетки культивировали в чашках Карреля. Опыты проводили с вирусом осповакцины, адаптированным к куриным эмбрионам, которым заражали 11—13-дневных эмбрионов. После 48 ч инкубации при 37° из хорионаллантоисной оболочки в физиологическом растворе готовили взвесь, которая служила исходным материалом для

получения концентрированного вируса, осповакцины в градиенте концентрации 10—40 % сахарозы. Инфекционную активность вируса тестировали методом бляшкообразования. Исходный титр вируса составлял  $1 \cdot 10^7$  БОЕ/мл. Монослой фибробластов ( $1,2 \cdot 10^6$ ) находился в контакте с вирусом 45 мин; затем клетки отмывали и определяли титр связавшегося и несвязавшегося вируса; количественные данные вычислены по анализам 5 параллельных опытов в каждом эксперименте. В зависимости от условий опыта в среду вводили вещества, действие которых исследовали: дс-РНК, полученная из дрожжей,—100 мкг/мл; гидролизованная дс-РНК (0,2 М NaOH, 37°, 24 ч)—100 мкг/мл; ЭГТА—1 мМ; очищенная ДНК вируса осповакцины.

Измерение входа  $\text{Ca}^{++}$  в клетку проводили радиондикаторным методом.  $^{45}\text{Ca}$  добавляли к монослою культуры фибробластов ( $1,5 \cdot 10^6$ ) в конечной концентрации 0,1 мКи/мл. Дальнейшую обработку клетки проводили согласно методу, описанному в работе (3). Фосфорилирование белков плазматической мембраны проводили по (4).

В первой серии экспериментов мы изучали инфекционную активность вируса осповакцины на клеточной культуре куриных фибробластов, предварительно обработанных в течение 40 мин дс-РНК, гидролизованной дс-РНК, ЭГТА; также определялась инфекционность очищенной ДНК вируса осповакцины.

Влияние дс-РНК, частично гидролизованной дс-РНК и ионов  $\text{Ca}^{++}$  на инфекционность вируса осповакцины

| Номер эксперимента | Обработка до контакта с вирусом                                                                      | % к контролю                  |                             |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
|                    |                                                                                                      | вирус, оставшийся несвязанным | понижение бляшкообразования |
| 1                  | Монослой+вирус                                                                                       | 9                             | 100                         |
| 2                  | Монослой+дс-РНК+вирус                                                                                | 52                            | 25                          |
| 3                  | Монослой+частично гидролизованная дс-РНК+вирус                                                       | 40                            | 53                          |
| 4                  | Монослой+частично гидролизованная дс-РНК, удаление среды с дс-РНК+свежая среда (3 ч инкубации)+вирус | 15                            | 82                          |
| 5                  | Монослой+ЭГТА+дс-РНК+вирус                                                                           | 28                            | 48                          |
| 6                  | Монослой+ЭГТА+дс-РНК*+вирус                                                                          | 10                            | 80                          |
| 7                  | Монослой+дс-РНК+ДНК вируса                                                                           | —                             | 43**                        |
| 8                  | Монослой+частично гидролизованная дс-РНК+ДНК вируса                                                  | —                             | 100**                       |

\* Частично гидролизованная дс-РНК.

\*\* В № 7 и 8 контролем служил опыт: монослой+ДНК вируса

Как видно из таблицы, дс-РНК, в процентах от контроля, существенно, на 75 %, подавляет инфекционность вируса осповакцины и значительно понижает адсорбцию вируса. Используемая в тех же концентрациях дс-РНК, гидролизованная до моно-, ди-, три- и тетрануклеотидов, оказывает более слабый защитный эффект (31 %). Адсорбция вируса в данном случае составляет 70% от контроля.

Если в отношении дс-РНК защитный эффект от инфицирования вирусом может быть объяснен в конечном итоге и индукцией интерферона, то в случае гидролизованной дс-РНК (31 % защиты и 30 % несвязав-

шегося с клетками вируса) следует допустить наличие другого механизма, обеспечивающего относительно низкий уровень адсорбции по сравнению с контролем.—механизма, действующего в отсутствие индукции интерферона.

В пользу сделанного заключения говорят также результаты эксперимента № 4 (таблица). В противном случае после удаления питательной среды, содержащей продукты гидролиза дс-РНК, противовирусная активность должна была бы сохраниться, более того, полученный результат свидетельствует о том, что индуцируемый механизм защиты функционирует в присутствии индуктора или во всяком случае продуктов гидролиза дс-РНК. Аналогичные результаты получены по активации дс-РНК макрофагов (5). Результаты экспериментов № 5 и 6 свидетельствуют, что удаление из среды ионов  $\text{Ca}^{++}$  значительно снижает защитный эффект как нативной, так и гидролизованной дс-РНК и способствует активной адсорбции вируса клетками. Таким образом, присутствие ионов  $\text{Ca}^{++}$  в питательной среде является существенным фактором, предопределяющим активацию механизма защиты клетки от вируса, не зависящего от индукции интерферона.

В эксперименте № 7 защитный эффект дс-РНК может быть отнесен по существу за счет индукции интерферона, однако из эксперимента № 8 ясно, что индуцируемый механизм защитного действия не активен в случае инфицирования клеток «голой» ДНК вируса осповакцины, т. е. не срабатывает на этапе адсорбции «голой» ДНК на активированной плазматической мембране клетки. Это позволяет предположить, что индуцируемый механизм действует на уровне взаимодействия плазматической мембраны клетки (возможно вирусных рецепторов) и белковой оболочки вируса осповакцины.

Полученные нами ранее данные по стимуляции дс-РНК увеличения входа ионов  $\text{Ca}^{++}$  в клетку, а также данные по активации макрофагов дс-РНК через аналогичную стимуляцию входа ионов  $\text{Ca}^{++}$  позволили и в данном случае предположить стимуляцию дс-РНК и продуктами ее частичного гидролиза входа ионов  $\text{Ca}^{++}$  в клетки, предварительно обработанные индуктором.

На рис. 1 приведены данные о содержании  $\text{Ca}^{++}$  в intactных клетках, в клетках, обработанных дс-РНК и продуктами частичного

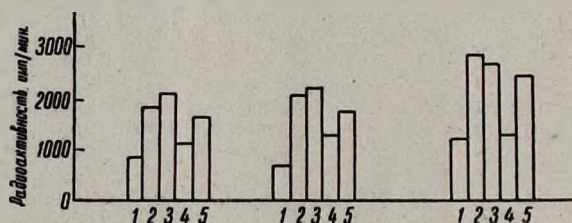


Рис. 1. Увеличение поступления  $^{45}\text{Ca}$  в клетки моно-слоя фибробластов куриного эмбриона. По оси ординат—радиоактивность (имп./мин) экстрактов клеток монослоя фибробластов: 1—контроль, intactные клетки; 2—клетки после контакта с дс-РНК, 3—клетки после контакта с дс-РНК+вирус; 4—клетки+вирус; 5—клетки после контакта с частично гидролизованной дс-РНК

гидролиза дс-РНК. Полученный результат свидетельствует о том, что действительно «активированное» состояние плазматической мембраны коррелирует с увеличением входа  $\text{Ca}^{++}$  в клетку.

Стимулирующий эффект  $\text{Ca}^{++}$  под действием дс-РНК был нами ранее установлен в экспериментах на гигантских нейронах виноградной улитки, где дс-РНК также увеличивала содержание цАМФ внутри нейрона. На основе этих данных стимуляция входа  $\text{Ca}^{++}$  под действием дс-РНК была объяснена фосфорилированием мембранных белков Са-ионофора и переносчика Na-Са обмена. Наряду с этим, как было отмечено выше, процессы фосфорилирования хеморецепторов мембран приводят к подавлению их сродства к своим лигандам.

Для проверки участия процесса фосфорилирования мембран в механизмах, лежащих в основе подавляющего действия дс-РНК, на сорбцию вируса на поверхности клетки в следующей серии экспериментов мы исследовали фосфорилирование плазматической мембраны клеток в условиях понижения сорбции вируса на мембране.

Как видно из полученных данных (рис. 2), под действием дс-РНК происходит фосфорилирование белков с молекулярной массой 90—40—50×10<sup>3</sup> дальтон. Таким образом, на основе полученных дан-

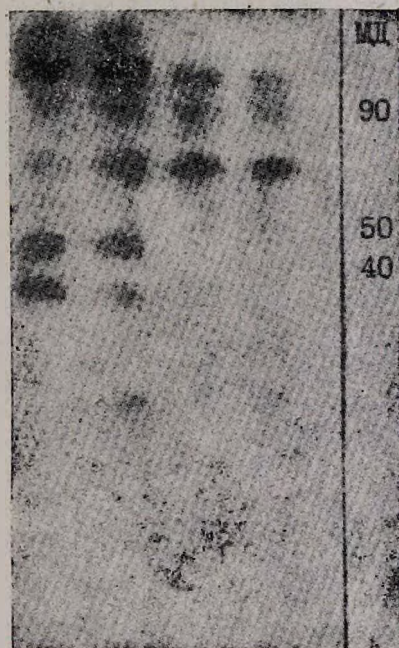


Рис. 2. Фосфорилирование мембранных белков плазматической мембраны в условиях понижения адсорбции вируса. Справа налево: 1, 2—интактные клетки; 3, 4—клетки, обработанные дс—РНК (понижение сорбции вируса на мембране до 50%)

ных можно предположить, что увеличение внутриклеточного  $\text{Ca}^{++}$  и процесс фосфорилирования плазматической мембраны (по аналогии

с другими хеморецепторами) приводят к подавлению сродства мембранного рецептора к вирусу.

$\text{Ca}^{++}$ -зависимость этого процесса можно объяснить, по-видимому, тем, что  $\text{Ca}^{++}$ , являясь стимулятором мембранной протеинкиназы  $\text{C}^{++}$ , приводит к фосфорилированию мембранных белков, в том числе и  $\text{Ca}$ -транспортирующих белков с усилением входа  $\text{Ca}^{++}$  внутрь клетки. Очевидно, что для окончательного выяснения процесса фосфорилирования плазматической мембраны как универсального механизма, определяющего сродство плазматической мембраны к вирусу, требуются более детальные исследования на ряде вирусов, что и является предметом наших настоящих исследований. Предварительные результаты наших исследований свидетельствуют о наличии в плазматической мембране клетки дс-РНК активируемых протеинкиназ.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Армянской ССР  
Ереванский зоотехническо-ветеринарный  
институт МСХ СССР

Լ. Ա. ՌՈՒՆԻՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Ս. Ն. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ

### ԴՅ-ՌՆԹ մեխանիզմի ճեշի ազդեցությունը բջջի քաղամբում վիրուսի առաքելային վրա

Աշխատանքում ուսումնասիրվել են բջջի պլազմատիկ թաղանթի վրա վիրուսի ազատաբջիտն պրոցեսը ԴՅ-ՌՆԹ-ի ազդման պայմաններում, կալցիումի իոնների դերը, թաղանթային սպիտակուցների ֆոսֆորիլացման մակարդակը վիրուսի ազատաբջիտի ընկճման դեպքում:

Յուլյց է տրված, որ ԴՅ-ՌՆԹ-ն ունի պաշտպանական ազդեցություն բջջի վիրուսի վարակվելու նկատմամբ պլազմատիկ մեմբրանների նյութափոխանակային տեղաշարժի մակարդակի վրա և որ կալցիումի իոնների ներկայությունը էական գործոն է հանդիսանում, որը կանխորոշում է պաշտպանական մեխանիզմի ակտիվացիան անկախ ինտերֆերոնի ինդուկցիայից: Պլազմատիկ մեմբրանի ակտիվացած վրճակը կոռելյացիայի է ենթարկվում բջջի մեջ կալցիումի մոտքի մեծացման հետ և բջջի պլազմատիկ մեմբրանի սպիտակուցների ֆոսֆորիլացման հետ: Մտացված արդյունքները հնարավորություն են տալիս պլազմատիկ մեմբրանի վիրուսի առաքելային նկատմամբ խնամակցություն փոքրացման մեխանիզմը ձևակերպել ֆոսֆորիլացման միջոցով:

### ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> S. Baron, F. Dianzani, G. I. Stanton, Texas Reports on Biology and Medicine, vol. 41, p. 715 (1981—1982). <sup>2</sup> S. N. Ayrapetyan, V. L. Arvanov, S. B. Maginyan et al., Cellular and Molecular Neurobiology, vol. 5 № 3, p. 231—242 (1985). <sup>3</sup> Ք. Ի. Աթալլախանով, Փ. Ի. Աթալլախանով, Ժ. Մ. Աբդուլաև, Бюл. экспериментальной биологии и медицины, вып. 7, с. 81—84 (1984). <sup>4</sup> E. G. Lapetina, S. P. Watson, P. Cuatrecasas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, № 23, p. 7431—7435 (1984). <sup>5</sup> S. I. Hamburg, H. B. Flett, I. C. Unkeless et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 350, p. 72—91 (1980).