

УДК 578.2

Анализ доменов белков капсида и NS5A вируса гепатита С, активирующих каскад Nrf2/ARE

О. А. Смирнова¹, О. Н. Иванова¹, Ф. Ш. Мухтаров¹, В. Л. Туницкая¹, Ю. Янсонс²,
М. Г. Исагулянц^{2,3}, С. Н. Кочетков¹, А. В. Иванов^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32

²Riga Stradins University, Latvia, Riga LV-1007, Dzirciema Street, 16

³Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения РФ, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика М.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 16

*E-mail: aivanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.03.2016

Принята к печати 27.06.2016

РЕФЕРАТ Инфицирование вирусом гепатита С (ВГС) вызывает хроническое заболевание печени, которое сопровождается развитием различных патологий и метаболических нарушений. Одним из механизмов патогенеза ВГС считается возникновение в инфицированных клетках окислительного стресса, вызываемого белками вирусного капсида и NS5A. Оба белка активируют систему защиты клетки от окислительного стресса, регулируемую фактором транскрипции Nrf2. В настоящей работе установлено, что данная активация опосредована доменом 1 белка NS5A и двумя фрагментами белка капсида. Показано, что активация фактора Nrf2 каждым белком осуществляется с использованием двух механизмов, один из которых опосредован активными формами кислорода (АФК) и протеинкиназой С, а второй – АФК-независимой активацией казеинкиназы 2 и фосфоинозитид-3-киназы. АФК-зависимый механизм стимулировался фрагментом 37–191 а.о. белка капсида, а АФК-независимый – фрагментом 1–36 а.о., что впервые показало независимость двух механизмов активации фактора Nrf2. Кроме того, сделан вывод о том, что внутриклеточная локализация белков ВГС и различия в их биологических свойствах не играют роли в регуляции системы защиты клетки от окислительного стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус гепатита С, окислительный стресс, регуляция, фактор транскрипции, Nrf2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; а.о. – аминокислотный остаток; ВГС – вирус гепатита С; ОС – окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С (ВГС) вызывает широко распространенное и опасное заболевание печени человека. В большинстве случаев заражение ВГС приводит к хроническому гепатиту, при котором велик риск развития фиброза и цирроза печени, а также гепатоцеллюлярной карциномы и различных метаболических нарушений (стеатоз, сахарный диабет типа 2, нарушения метаболизма железа и другие патологии) [1]. Многочисленные фундаментальные и клинические исследования выявили ряд патогенетических механизмов ВГС, среди которых важную роль играет окислительный стресс (ОС) [2]. ОС представляет собой состояние клетки, при котором нарушается баланс между активными формами кислорода (АФК)

и нейтрализующими их низкомолекулярными соединениями (антиоксидантами) и ферментами, вовлеченными в защиту от ОС (так называемые ферменты фазы II). Биосинтез многих ферментов метаболизма антиоксидантов и ферментов фазы II контролируется фактором транскрипции Nrf2 (nuclear factor erythroid-2 – related factor 2), который связывается с общим регуляторным элементом ARE (Antioxidant Response Element) в промоторах генов [3]. В отсутствие стресса фактор Nrf2 находится в цитоплазме в комплексе с белком-партнером Keap1. При повышении уровня АФК комплекс разрушается либо вследствие фосфорилирования фактора Nrf2 различными протеинкиназами, либо в результате модификации Keap1, после чего свободный фактор

транскрипции перемещается в ядро и активирует транскрипцию генов ферментов метаболизма антиоксидантов и ферментов фазы II, в частности, гемоксигеназы 1 (HO-1) и NADPH:хиноноксидоредуктазы 1 (Nqo1) [3, 4].

Вирус гепатита С не только вызывает ОС, но и активирует фактор Nrf2 [2]. Ключевую роль в обоих случаях играют вирусные белки – капсидный и NS5A [4–7]. Ранее мы установили, что эти белки активируют систему защиты при помощи двух механизмов, один из которых опосредован АФК и протеинкиназой С, а другой заключается в АФК-независимой активации фактора Nrf2 казеинкиназой 2 и фосфоинозитид-3-киназой [4]. Однако нельзя исключать, что оба пути активации Nrf2 индуцируются неким общим регулятором, расположенным выше в каскаде, все участники которого до сих пор не известны. Задача настоящей работы состояла в том, чтобы выявить наличие (или отсутствие) такой регуляции и определить структурные элементы белков капсида и NS5A, принимающие участие в механизмах активации Nrf2/ARE-каскада.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линия клеток гепатомы человека Huh7.5 любезно предоставлена С. Rice (Рокфеллеровский университет, США). Плаزمида pCMV-core, кодирующая полноразмерный белок капсида ВГС генотип 1b (274933RU), описана ранее [4]. Плазмиды, кодирующие фрагменты 1–36, 37–191 и 1–151 а.о. белка капсида, сконструированы на основе вектора pVax1 [8], а плазмиды, кодирующие полноразмерный белок NS5A ВГС генотип 1b (AJ238799) и его индивидуальные домены D1 (1–249 а.о.), D2 (250–355 а.о.) и D3 (356–447 а.о.), созданы на основе вектора pCMV-Tag3B [7].

В качестве ингибиторов протеинкиназ использовали Ro 31-8220, вортманнин и 5,6-дихлор-1-β-D-рибофуранозилбензимидазол (DRB) (Sigma).

Культуральные работы

Клетки Huh7.5 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальную сыворотку крупного рогатого скота (HyClone, США), 2 мМ глутамина, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина, при 37°C во влажной атмосфере 5% CO₂.

Работа с репортерной плазмидой

Клетки Huh7.5 высевали на 24-луночные планшеты, трансфицировали смесью репортерной плазмиды pP-ARE (0.25 мкг) [4] и целевой экспрессионной плазмиды (0.25 мкг) с использованием реагента Turbofect. Через 30 ч лизировали клетки и измеряли активность люциферазы как описано ранее [4].

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени

Клетки Huh7.5 трансфицировали описанным выше методом, через 40 ч отбирали культуральную среду, выделяли суммарную РНК, проводили обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени согласно [4].

Вестерн-блоттинг

Клетки Huh7.5 трансфицировали на 6-луночных планшетах, лизировали через 40 ч после трансфекции, дальнейшие манипуляции проводили как описано ранее [4], используя моноклональные антитела мыши к гемоксигеназе 1 (ab13248), NADPH:хиноноксидоредуктазе 1 (ab28947) и β-актину (ab3280) фирмы Abcam (Великобритания), а также вторичные антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (sc-2005) компании Santa-Cruz (США). Для анализа внутриклеточной локализации фактора Nrf2 клетки лизировали, фракции цитоплазматических и ядерных белков разделяли с использованием коммерческого набора NE-PER (Thermo Scientific). Nrf2 детектировали в каждой фракции методом иммуноблоттинга, используя поликлональные антитела кролика к Nrf2 (sc-722) и вторичные антитела к IgG кролика (sc-2004) фирмы Santa-Cruz.

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали, используя программу StatPlus (AnalystSoft, Канада). Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическую значимость различий вычисляли, используя парный критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Участие фрагментов белков капсида и NS5A в активации каскада Nrf2/ARE анализировали тремя методами: оценивали относительные уровни экспрессии двух ферментов фазы II (Nqo1, HO-1) и определяли внутриклеточную локализацию фактора Nrf2. Показано, что из всех описанных доменов белка NS5A только домен 1 (остатки 1–249 а.о.) обладает способностью активировать фактор Nrf2, т.е. вызывать его транслокацию из цитоплазмы в ядро (рис. 1А) и усиливать экспрессию Nrf2-зависимых генов (рис. 1Б,В). Примечательно, что из трех доменов белка NS5A лишь домен 1 обладает определенной трехмерной структурой [9], в то время как домены 2 и 3 неструктурированы [10, 11]. Наши данные также свидетельствуют о том, что именно домен 1 обладает прооксидантной активностью [7]. Кроме того, показано, что способность белка NS5A активировать

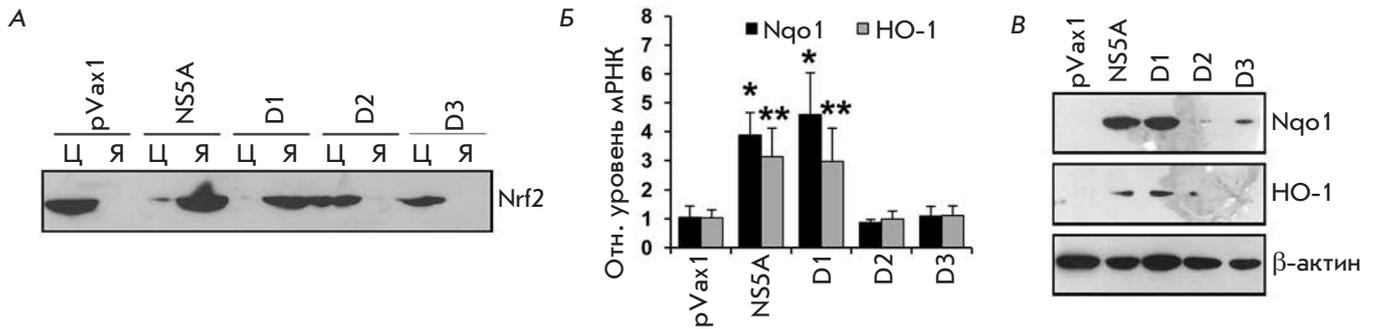


Рис. 1. Активация каскада Nrf2 / ARE доменом 1 белка NS5A приводит к транслокации фактора транскрипции Nrf2 из цитоплазмы в ядро (A) и активации экспрессии генов, кодирующих NAD(P)H:хинооксидоредуктазу 1 (Nqo1) и гемоксигеназу (HO-1) человека (Б, В). Внутриклеточную локализацию фактора Nrf2 определяли путем разделения фракций цитоплазматических (Ц) и ядерных (Я) белков и детекции фактора Nrf2 в них методом иммуноблоттинга. Уровни экспрессии Nqo1 и HO-1 оценивали методами обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (Б) и иммуноблоттинга (В). * $p < 0.01$ и ** $p < 0.05$ по сравнению с pVax1

каскад Nrf2/ARE не связана ни с его посттрансляционной модификацией – фосфорилированием доменов 2 и 3 [12], ни со способностью нарушать экспрессию интерферона β в ответ на ВГС-инфекцию [1].

Для изучения вклада различных фрагментов белка капсида (1–191 а.о.) в активацию каскада Nrf2/ARE использовали его укороченные фрагменты 1–36 и 37–191 а.о., каждый из которых проявил способность вызывать окислительный стресс с помощью различных механизмов [8]. Кроме того, использовали фрагмент 1–151 а.о., который активировал все АФК-продуцирующие ферменты, как и полноразмерный белок капсида, но локализовался не на эндоплазматическом ретикулуме, а в ядре, как и форма 1–36. Установлено, что все укороченные формы белка капсида активировали фактор Nrf2 (рис. 2А) и экспрессию Nrf2-зависимых генов (рис. 2Б,В). Таким образом, в структуре белка капсида есть как минимум два участка, обладающих способностью активировать каскад Nrf2/ARE.

Известно, что активация каскада Nrf2/ARE может происходить при участии разнообразных протеинкиназ, включая протеинкиназу С, казеинкиназу 2, фосфоинозитид-3-киназу, р38, митоген-активируемые протеинкиназы ERK1/2 и JNK и киназу гликогенсинтазы 3 (GSK3), причем вклад каждой киназы зависит от стимула и типа клеток ([3, 4] и ссылки в них). В случае каждого фрагмента белка для установления механизма активации использовали антиоксидант пирролидиндитиокарбамат (PDTС), а также ингибиторы протеинкиназы С (Ro 31-8220, Ro), казеинкиназы 2 (DRB) и фосфоинозитид-3-киназы (вортманнин, Wo), т.е. тех ферментов, которые, по нашим данным, участвуют в активации Nrf2 полноразмерным белком NS5A. Используя репор-

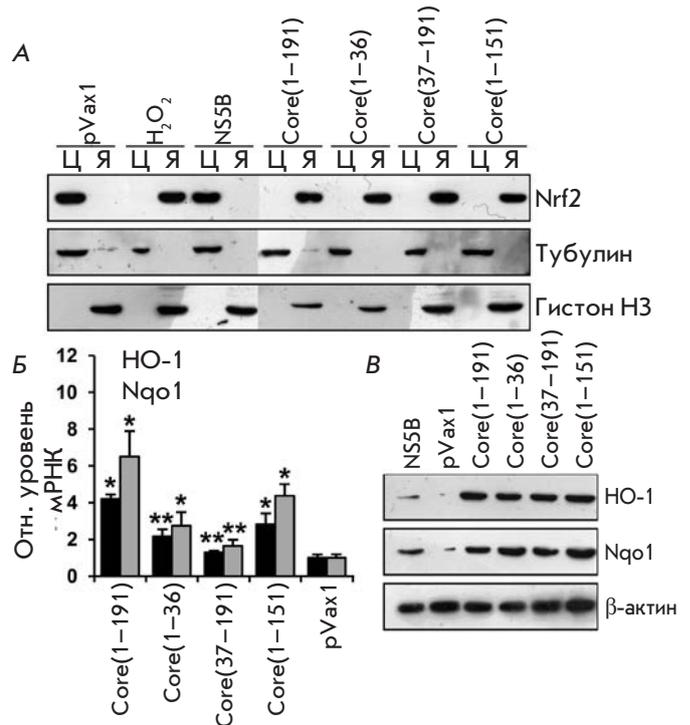


Рис. 2. Фрагменты 1–36 а.о. и 37–191 а.о. белка капсида (Core) вируса гепатита С активируют каскад Nrf2/ARE, вызывая перенос фактора транскрипции Nrf2 из цитоплазмы в ядро (A) и активируя экспрессию генов, кодирующих NAD(P)H:хинооксидоредуктазу 1 (Nqo1) и гемоксигеназу (HO-1) человека (Б, В). Внутриклеточную локализацию фактора Nrf2 определяли, разделяя фракции цитоплазматических (Ц) и ядерных (Я) белков и определяя фактор Nrf2 в них методом иммуноблоттинга. Уровни экспрессии Nqo1 и HO-1 оценивали с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (Б) и иммуноблоттинга (В). * $p < 0.01$ и ** $p < 0.05$ по сравнению с pVax1

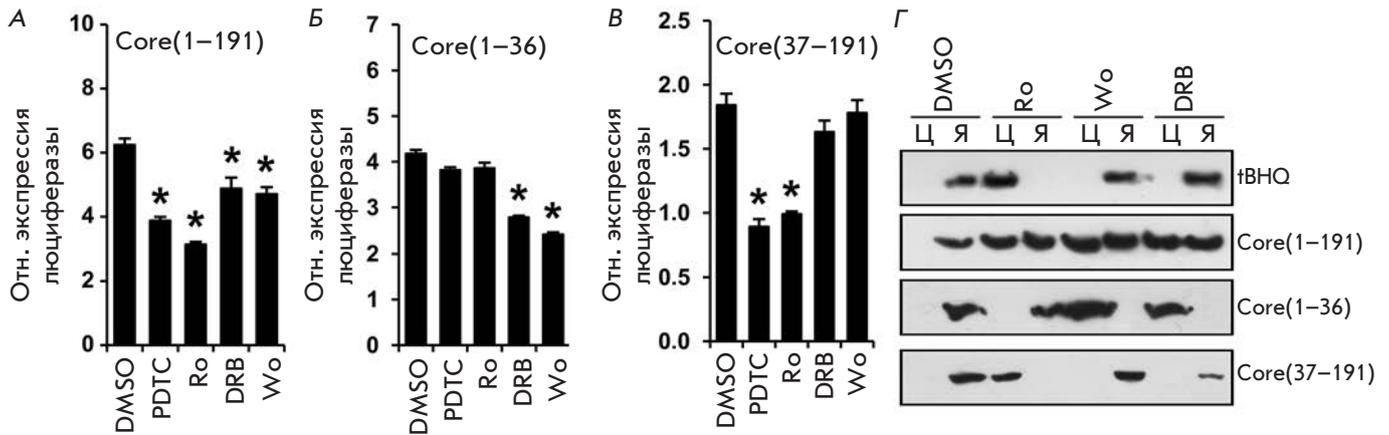


Рис. 3. Фрагмент 1–36 а.о. белка капсида (Core) активирует каскад Nrf2/ARE по АФК-независимому механизму при участии казеинкиназы 2 и фосфоинозитид-3-киназы, а фрагмент 37–191 а.о. – по АФК-зависимому механизму при участии протеинкиназы С. Роль киназ и активных форм кислорода оценивали по уровню экспрессии люциферазы в клетках Huh7.5, трансфицированных репортерной плазмидой рР-ARE, и конструкций, кодирующих полноразмерный (А) белок капсида или его фрагменты 1–36 а.о. (Б) или 37–191 а.о. (В), или анализом внутриклеточной локализации фактора Nrf2 (Г). Внутриклеточную локализацию фактора Nrf2 определяли, выделяя фракции цитоплазматических (Ц) и ядерных (Я) белков и определяя фактор Nrf2 в них методом иммуноблоттинга. Через 18 ч после трансфекции в культуральную среду добавляли ингибиторы протеинкиназ Ro 31-8220 (Ro, ингибитор протеинкиназы С), DRB (ингибитор казеинкиназы 2) или вортманнин (Wo, ингибитор фосфоинозитид-3-киназы) индивидуально или совместно с антиоксидантом пирролидиндитиокарбаматом (PDTC). **p* < 0.01

терную плазмиду рР-ARE, кодирующую люциферазу под контролем минимального ARE-элемента гена *Nqo1* человека [4], показано, что и фрагмент 1–36, и фрагмент 37–191 действительно активируют транскрипцию ARE-зависимых генов. Обработка антиоксидантом или ингибитором протеинкиназы С снижала уровень экспрессии люциферазы в случае полноразмерного белка капсида (рис. 3А) и предотвращала активацию в случае фрагмента 37–191 а.о. (рис. 3В). В клетках, экспрессирующих N-концевой фрагмент, экспрессию люциферазы блокировали только ингибиторы казеинкиназы и фосфоинозитид-3-киназы (рис. 3Б). Аналогичные результаты получены и при изучении действия ингибиторов протеинкиназ на транслокацию фактора Nrf2 (рис. 3Г). Примечательно, что в случае полноразмерного белка капсида ингибиторы всех трех протеинкиназ не предотвращали перенос Nrf2 в ядро, а лишь примерно в 2 раза снижали его, что свидетельствует о сопоставимом вкладе двух рассмотренных механизмов активации каскада.

Полученные нами данные о том, что N-концевой домен белка капсида ВГС активирует Nrf2 по АФК-независимому механизму при участии казеинкиназы 2 и фосфоинозитид-3-киназы, а фрагмент 37–191 – по АФК-зависимому пути при участии протеинкиназы С, позволили подтвердить полную независи-

мость этих двух механизмов. Более того, активация казеинкиназы 2 и фосфоинозитид-3-киназы происходит под действием того же домена белка капсида, который взаимодействует с различными белками клетки-хозяина, включая хеликазу DDX3, фактор транскрипции STAT1 и рецептор лимфотоксина β ([1, 8] и ссылки в них). Кроме того, оба механизма активации каскада Nrf2/ARE запускались как при локализации различных вариантов белка капсида в ядре (фрагменты 1–36 и 1–151), так и при локализации на поверхности эндоплазматического ретикулума (фрагменты 37–191 и 1–191). Это говорит о возможном запуске каскада в процессе биосинтеза белка капсида в эндоплазматическом ретикулуме.

ВЫВОДЫ

В данной работе впервые установлены участки первичной структуры белков капсида и NS5A, активирующие каскад Nrf2/ARE. Показано, что АФК-зависимый и АФК-независимый механизмы этой активации не имеют общих регуляторов. ●

Исследование влияния белков вируса на Nrf2/ARE-каскад выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-01021) (А.И.). Международное сотрудничество исследователей, включая работы

по конструированию плазмид, кодирующих белок капсида и его фрагменты, поддержано грантом Тематического партнерства Шведского института 09272_2013. Юрис Янсонс частично

поддержан грантом VACTRAIN № 692293, Мария Исагуляню – грантом по координации и поддержке исследований BALINFECT № 316275 программы Горизонты 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lemon S.M., Walker C.M., Alter M.J., Yi M.-K. Hepatitis C virus // *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007. P. 1253–1304.
2. Ivanov A.V., Bartosch B., Smirnova O.A., Isaguliants M.G., Kochetkov S.N. // *Viruses*. 2013. V. 5. № 2. P. 439–469.
3. Zhang M., An C., Gao Y., Leak R.K., Chen J., Zhang F. // *Prog. Neurobiol.* 2013. V. 100. P. 30–47.
4. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isaguliants M.G. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 9. P. e24957.
5. Okuda M., Li K., Beard M.R., Showalter L.A., Scholle F., Lemon S.M., Weinman S.A. // *Gastroenterology*. 2002. V. 122. № 2. P. 366–375.
6. Gong G., Waris G., Tanveer R., Siddiqui A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 17. P. 9599–9604.
7. Smirnova O.A., Ivanova O.N., Bartosch B., Valuev-Elliston V.T., Mukhtarov F., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. // *Oxid Med. Cell Longev*. 2016. V. 2016. P. 8341937.
8. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Petrushanko I.Y., Ivanova O.N., Karpenko I.L., Alekseeva E., Sominskaya I., Makarov A.A., Bartosch B., Kochetkov S.N., et al. // *Viruses*. 2015. V. 7. № 6. P. 2745–2770.
9. Tellinghuisen T.L., Marcotrigiano J., Rice C.M. // *Nature*. 2005. V. 435. № 7040. P. 374–379.
10. Hanouille X., Verdegem D., Badillo A., Wieruszkeski J.M., Penin F., Lippens G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 381. № 4. P. 634–638.
11. Liang Y., Ye H., Kang C.B., Yoon H.S. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. № 41. P. 11550–11558.
12. Huang Y., Staschke K., De Francesco R., Tan S.L. // *Virology*. 2007. V. 364. № 1. P. 1–9.