

# Биобезопасная модель аденовирусной инфекции: влияние бактериальных протеаз на инфицирование клеток человека *in vitro*

Е.В. Мартынова<sup>1</sup>, Ю.В. Данилова<sup>2</sup>, В.А. Анохин<sup>1</sup>, С.Ф. Хайбуллина<sup>3</sup>, А.А. Ризванов<sup>2</sup>, М.Р. Шарипова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

<sup>3</sup> Институт Виттемора–Питтерсона, США

## Biosafety model of adenovirus infection: effects of bacterial proteases for infection of human cells *in vitro*

E.V. Martinova<sup>1</sup>, Y.V. Danilova<sup>2</sup>, V.A. Anohin<sup>1</sup>, S.F. Khaiboullina<sup>3</sup>, A.A. Rizvanov<sup>2</sup>, M.R. Sharipova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kazan State Medical University, Kazan

<sup>2</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

<sup>3</sup> Whittmore Peterson Institute, Reno, USA

Для определения противовирусной активности различных биологически активных соединений предложена модель аденовирусной инфекции на основе культуры клеток человека HEK293A и рекомбинантного аденовируса Ad-EGFP, экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок EGFP. Аденовирусы имеют белковый капсид размером 70–90 нм и способны инфицировать делящиеся и неделящиеся клетки *in vitro* и *in vivo*. Рекомбинантные аденовирусы являются репликационно-дефектными в клетках человека и животных. Разработанная модель позволила нам определить действие бактериальных протеаз на инфицирование культуры клеток аденовирусом. Данная модель также может быть использована для скрининга препаратов с потенциальной противовирусной активностью.

**Ключевые слова:** рекомбинантные аденовирусы, инфицирование, культура клеток, бактериальные протеиназы, проточная цитометрия.

В педиатрической практике аденовирусная инфекция является одной из наиболее часто встречающихся вирусной респираторной инфекцией, на долю которой приходится до 34% от всех респираторных заболеваний [1–2]. В этиологии острых вирусных диарей аденовирусы занимают, по разным источникам, от шестого до четвертого места. Особенностью этой инфекции является склонность к рецидивированию, хроническому течению и персистенции в лимфоидной ткани. Поэтому аденовирусной инфекции принадлежит важная роль в формировании хронической ЛОР-патологии у детей (хронические рецидивирующие тонзиллиты, назофарингиты, ангины) и образовании контингента часто болеющих детей, что в настоящее время является актуальной проблемой педиатрии [2].

Несмотря на современное разнообразие средств этиотропной химиотерапии, специфического лечения аденовирусной инфекции не существует. С точки зрения доказательной медицины, ни один из противовирусных препаратов не рекомендован для лечения аденовирусной инфекции, т.к. не проведено убедительных клинических и доклинических исследований, несмотря на наличие ряда перспективных препаратов. Поскольку аденовирусная инфекция является антропонозной инфекцией и исследования на животных моделях ограничены, то с целью

To determine the antiviral activity of various biologically active compounds, the model of adenovirus infection on the basis of cell cultures of human HEK293A and recombinant adenovirus Ad-EGFP, expressing green fluorescent protein EGFP. Adenoviruses have a capsid size of 70–90 nm and are able to infect dividing and nondividing cells *in vitro* and *in vivo*. Recombinant adenoviruses are the replicative defect in the cells of humans and animals. The developed model allowed us to determine the effect of bacterial proteases in the infected cell cultures with adenovirus. This model can also be used for screening drugs with potential protivovirusnoy activity.

**Key words:** recombinant adenoviruses, infection, cell culture, bacterial proteases, flow cytometry.

проведения доклинических испытаний имеющихся и вновь синтезированных этиотропных препаратов для лечения аденовирусной инфекции, мы предлагаем модель аденовирусной инфекции *in vitro* на основе рекомбинантного аденовируса Ad-EGFP и культуры клеток человека. Такой аденовирус используют для доставки генетической информации в генной терапии [3]. Данная модель позволяет работать в стандартной лаборатории второго класса биобезопасности и может упростить скрининг потенциальных различных противовирусных препаратов для проведения их доклинических и клинических исследований.

## Материал и методы

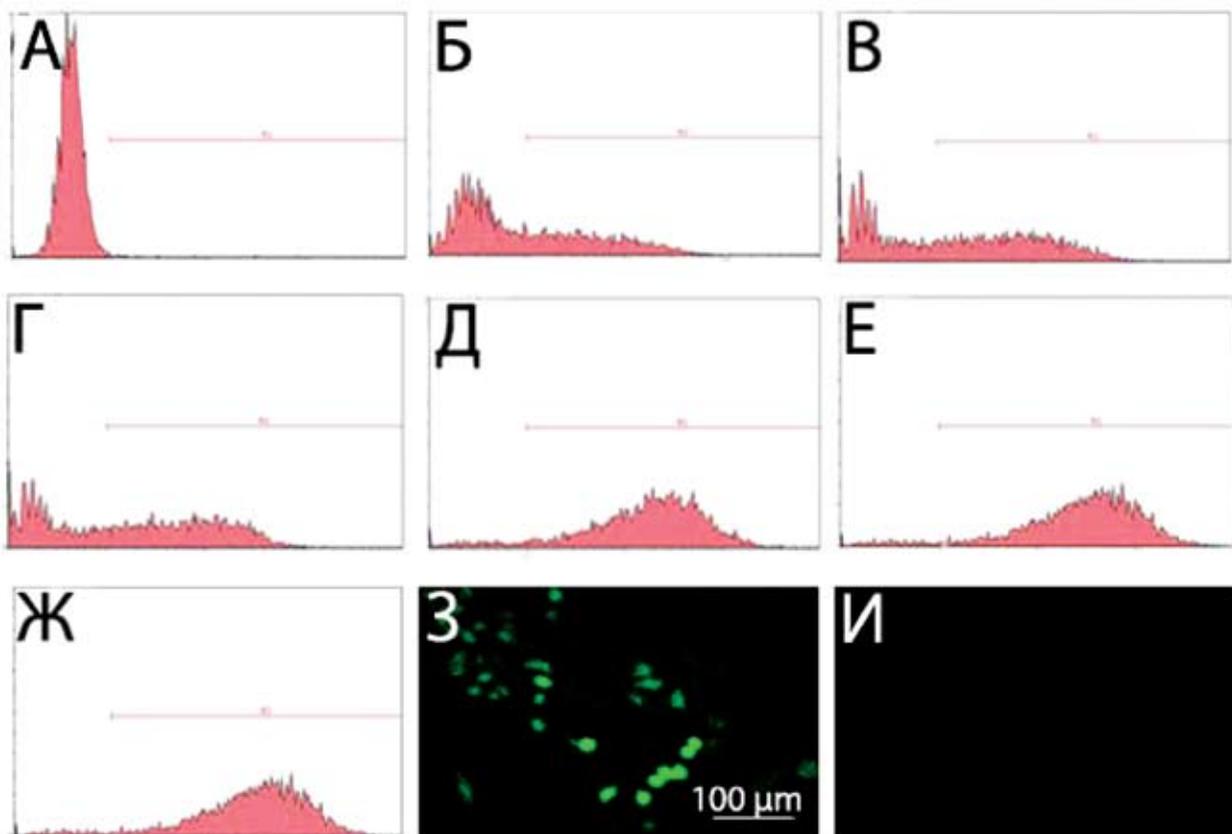
**Культивирование клеток HEK293A.** Все работы с культурой клеток проводили в стерильном ламинарном боксе биологической безопасности класса II с соблюдением общепринятых правил работы с эукариотическими клетками. Эмбриональные клетки почки человека HEK293A (Invitrogen, США) культивировали в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы и пенstrepa (Sigma, США). Клетки инкубировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Пересев клеток проводился при плотности клеточного монослоя 60% с применением 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (БиоЛот, Россия).

e-mail: rizvanov@gmail.com

**Получение рекомбинантного аденовируса.** Генетическую модификацию клеток линии HEK293A с помощью рекомбинантной плазмиды pAd-EGFP, полученной на основе генетического вектора pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen, США), проводили трансфекционным реагентом TurboFect (Fermentas Inc., Канада). TurboFect — раствор положительно заряженных полимеров, образующих компактные, стабильные, положительно-заряженные комплексы с молекулами нуклеиновых кислот. Для трансфекции применяли 12-луночные культуральные планшеты. Использовалась культура клеток HEK293A с плотностью монослоя 60–70%. К 200 мкл культуральной среды DMEM без сыворотки добавляли 2,6 мкл трансфекционного реагента TurboFect, смесь тщательно перемешали на вортексе. В смесь добавляли 2 мкг плазмидной ДНК, смесь тщательно перемешивали, осаждали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15–20 мин. Затем 200 мкл трансфекционной смеси добавляли в лунки культурального планшета. Планшеты инкубировали 3 часа в инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, после чего в лунке меняли среду на свежую DMEM (1 мл на лунку), содержащую 10% FBS и 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина.

Анализ экспрессии зеленого флуоресцентного белка (англ. enhanced green fluorescent protein, EGFP) проводился с помощью флуоресцентной микроскопии на инвертированном флуоресцентном микроскопе исследовательского класса AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия). После трансфекции каждые 2–3 сут. меняли среду на свежую, пока не стали заметны области цитопатического эффекта. Цитопатический эффект является следствием продукции рекомбинантного аденовируса Ad-EGFP, при которой нарушается нормальная жизнедеятельность клеток. При этом клетки становятся округлыми и открепляются от поверхности чашки. На 10 сут. после трансфекции клетки снимали в культуральной среде, суспензию из лунки собирали в стерильную 2 мл пробирку, подвергали криолизу (замораживание-размораживание), отделяли обломки клеток центрифугированием и супернатант использовали в дальнейших экспериментах.

**Тестирование препаратов.** В 24-луночный планшет в 12 лунок посеяли клетки HEK293A из расчета 30 тыс. клеток на лунку. Планшет находился в инкубаторе при температуре 37°C, содержании CO<sub>2</sub> 5%. Через 24 ч были добавлены ферменты и рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP в двух концентрациях. Перед добавлением ферменты и рекомбинантный



Культуры клеток под действием различных концентраций аденовируса с протеазами:  
 А – контроль без вируса; Б – рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP в концентрации 10<sup>3</sup>;  
 В – метцинкиновая металлоэндопептидаза и рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP в концентрации 10<sup>3</sup>;  
 Г – глутамилэндопептидаза и рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP в концентрации 10<sup>3</sup>;  
 Д – рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP в концентрации 10<sup>4</sup>; Е – метцинкиновая металлоэндопептидаза и рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP в концентрации 10<sup>4</sup>; Ж – глутамилэндопептидаза и рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP в концентрации 10<sup>4</sup>; З – инфицированные рекомбинантным вирусом клетки, свечение EGFP;  
 И – контрольные клетки, не инфицированные вирусом. А–Ж – проточная цитометрия;  
 З, И – флуоресцентная микроскопия. Шкала: 100 мкм

аденовирус Ad-EGFP в течение часа находились в инкубаторе. В это время белок капсида аденовируса подвергался протеолизу с помощью бактериальных протеолитических белков.

В работе использовали следующие протеолитические ферменты бацилл: глутамилэндопептидаза *Bacillus pumilus* – сериновая химотрипсиноподобная протеиназа с молекулярной массой 23 кДа, узкой субстратной специфичностью (выраженное предпочтение к связям, образованным глутаминовой кислотой). Белок получен из рекомбинантного штамма *B. subtilis* JB 2036(d58.21), несущего плазмиду с геном соответствующего фермента (ANY15136) по методу, описанному в работе [4].

Метцинкиновая металлоэндопептидаза *B. pumilus* – неспецифический фермент с молекулярной массой 19 кДа. Белок очищен до гомогенного состояния из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* JB 2036 (pCM4), несущего плазмиду с геном фермента (ANEU678894.2) по методу, описанному в работе [5].

### Результаты

**Получение рекомбинантного вируса.** Для получения рекомбинантного аденовируса Ad-EGFP клетки HEK293A трансфицировали линейной формой плазмиды pAd-EGFP. Оценку эффективности трансфекции проводили с помощью флуоресцентной микроскопии по интенсивности экспрессии EGFP, которая составила до 90%. Для определения титра полученного вирусного раствора проводили подсчет клеток в контрольной лунке 24-луночного планшета. По результатам подсчета количества клеток в камере Горяева каждая лунка содержала по 60 тыс. клеток. Идентификацию инфицированных клеток с содержанием рекомбинантного аденовируса Ad-EGFP проводили с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. Е, Ж). Наибольшее количество инфицированных EGFP-позитивных клеток наблюдали в неразведенном образце.

**Скрининг действия препаратов на инфицирование рекомбинантным аденовирусом Ad-EGFP.** Клетки HEK293A обработали предварительно подготовленным рекомбинантным аденовирусом Ad-EGFP с протеазами в различных концентрациях и инфицировали раствором, как описано в разделе «Материал и методы».

Интенсивное свечение, сравнимое с положительным контролем (рис. З, И), наблюдалось в лунках с добавлением ферментов глутамилэндопептидазы и метцинкиновой металлоэндопептидазы с концентрацией рекомбинантного аденовируса Ad-EGFP  $10^4$

(рис. Б–Г). Кроме того, EGFP-позитивные клетки наблюдали при применении препаратов и концентрации рекомбинантного аденовируса Ad-EGFP  $10^3$  (рис. Д–Ж).

### Обсуждение

Разработка моделей аденовирусной инфекции необходима для поиска новых этиотропных препаратов для лечения данного заболевания. Предложенная нами модель может быть использована не только для тестирования химио- и биопрепаратов, но и для скрининга новых способов воздействия на клетки человека, включая генную терапию.

Данный рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP содержит белковый капсид, который, как предполагалось, в процессе взаимодействия с бактериальными протеазами должен разрушаться, как и у вируса дикого типа. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что бактериальные ферменты не способны гидролизировать белки вирусного капсида, о чем свидетельствует эффективная трансдукция клеток рекомбинантным вирусом после обработки бактериальными протеазами. В то же время наблюдалось увеличение эффективности вирусной инфекции в культуре клеток, т.е. тестируемые бактериальные белки способствовали проникновению вирусов внутрь клеток.

Ранее коллективом авторов была разработана клеточная модель ВИЧ-инфекции для скрининга антиретровирусных препаратов на основе рекомбинантного лентивирусного вектора и культуры клеток человека [6]. Тестирование антиретровирусных препаратов показало положительный результат: препараты эффективно подавляли экспрессию рекомбинантного белка GFP. В настоящей работе нами создана новая тест-система для поиска и тестирования препаратов, способных влиять на процесс развития аденовирусной инфекции.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.» № П11053 от 31.05.2010 г. и гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований 11-04-00612-а. Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

### Литература:

1. Учайкин В.Ф. Руководство по инфекционным болезням у детей. М.: ГЭОТАР-МЕД; 2002.
2. Казанцев А.П., Зубик Т.М., Иванов К.С. и др. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней. Руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство; 1991.
3. Hall K., Blair Zajdel M.E., Blair G.E. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochem. J.* 431(3): 321–36.
4. Шамсутдинов Т.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М. и др.

Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом на разных фазах роста. *Биоорганическая химия* 2008; 322–6.

5. Рудакова Н.Л., Балабан Н.П., Данилова Ю.В. и др. Характеристика цинкзависимой эндопептидазы *Bacillus intermedius*. *Биохимия* 2010; 1462–70.

6. Головин Е.В., Мартынова Е.В., Анохин В.А. и др. Биобезопасная клеточная модель ВИЧ-инфекции на основе рекомбинантного лентивируса. *Врач-аспирант* 2011; 409–14.

Поступила 07.08.2012