

как в большей мере индуцирует фагоцитарную активность макрофагов и нарастание численности клеток-эффекторов, отвечающих за врожденные иммунные реакции. Возможно, что суммирование действия этих антигенов стафилококка позволит повысить эффект лечебного и профилактического действия каждого антигена.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Асташкина Е.А. Внеклеточные белоксодержащие антигены *Staphylococcus aureus* и их иммунобиологические свойства. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 2017.
2. Грубер И.М., Доненко Ф.В., Асташкина Е.А., Игнатова О.М., Егорова Н.Б., Ванеева Н.П., Черкасова Л.С., Тарасова О.Е., Киселевский М.В. Способ получения протективной белоксодержащей фракции бактерий. Патент РФ на изобретение № 2533815 от 20.11.2014.
3. Грубер И.М., Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Михайлова Н.А. Стратегия разработки противостафилококковых иммунопрофилактических и иммунотерапевтических препаратов. Эпидемиол. и инфекцион. болезни. Актуальные вопросы. 2013; 4: 31-38.
4. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В. и др. Этиология инфекционного эндокардита в России. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2015; 17(1): 4-10.
5. Егорова Н.Б., Ефремова В.Н., Курбатова Е.А., Грубер И.М. Экспериментальная и клинико-иммунологическая оценка бесклеточной стафилококковой вакцины «Стафиловак». Журн. микробиол. 2008; 6: 102-108.
6. Ефремова В.Н., Егорова Н.Б., Масюкова С.А. Бесклеточная антистафилококковая вакцина для лечения хронической стафилококковой инфекции. Патент РФ на изобретение № 2122862 от 10.12.1998.
7. Корзя Л.И. Исследование иммунологических свойств комплекса водорастворимых антигенов, полученного из разных штаммов стафилококка. Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 1982.
8. Курбатова Е.А. Разработка поликомпонентной вакцины из антигенов условно-патогенных микроорганизмов (экспериментальное и клинико-иммунологическое исследование). Дис. докт. мед. наук. М., 1997.
9. Хайтов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология: Учебник. М., Медицина, 2010.
10. Burlak C., Hammer C.H., Robinson M.A. et al. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. Cell Microbiol. 2007; 9: 1172-1190.
11. Daum R.S. *Staphylococcus aureus* vaccines. Руководство «Vaccines». S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, P.A. Offit. Vaccines, Saunders Elsevier, 2008.
12. Mohamed N., Wang M.Y. et al. Vaccine development to prevent *Staphylococcus aureus* surgical-site infections. British J. of Surgery. 2017; 104(2): e41-54.
13. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Annu Rev. Microbiol. 2010, 64: 143-162.
14. Sibbald M.J., Ziebandt A.K., Engelmann S. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. 70(3): 755-788.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*М.К.Гулимов<sup>1</sup>, Л.Р.Романцова<sup>1</sup>, А.В.Астапенко<sup>1</sup>, Ю.Р.Щетинина<sup>1</sup>, Е.В.Прокофьева<sup>1</sup>, Г.В.Мовсесян<sup>1</sup>, В.В.Зверев<sup>1,2</sup>, Ю.И.Амму<sup>1</sup>*

## ВЛИЯНИЕ АУТОФАГИИ НА РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА КРАСНУХИ

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, <sup>2</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

*Цель.* Данное исследование направлено на изучение роли аутофагии во внутриклеточном цикле вируса краснухи. *Материалы и методы.* Для того, чтобы оценить взаимосвязь процесса аутофагии и репликации вируса краснухи, эпителиальные клетки A549 заражали диким и аттенуированным вариантами штамма вируса краснухи — С-77w и С-77a, соответственно, со множественностью заражения 1 инф.ед./кл, параллельно измеряли накопление вирусной РНК и уровень экспрессии генов, участвующих в инициации и элонгации аутофагосомы и ее слиянии с лизосомой — Beclin1, Atg5, Rab7 и SQSTM1 (p62), а также в присутствии ингибитора (BFLA) и индуктора (Rapamycin) аутофагии. *Результаты.* Для мРНК генов Beclin1 и Atg5 была характерна их повышенная экспрессия на 24-48 (для дикого штамма) и 24-72 (для аттенуированного

штамма) часов после заражения. Однако индукции экспрессии мРНК генов Rab7 и SQSTM1 не наблюдали. Данный эффект коррелировал с более отсроченной экспрессией IFN $\beta$ , а также IFN $\beta$ -опосредованной индукцией экспрессии мРНК про-апоптотических генов. Кроме того, аутофагия вносила существенный вклад в продукцию вирусных частиц клетками A549 во внеклеточное пространство, что следует из увеличения их выхода через 48 часов после заражения клеток A549 в присутствии индуктора аутофагии и незначительного снижения — в присутствии ингибитора, при этом значимого эффекта на изменение концентрации вирусной РНК как в супернатантах, так и внутриклеточно не наблюдали. *Заключение.* Таким образом, мы предполагаем, что вирус краснухи может избирательно регулировать процесс аутофагии путем стимулирования инициации и подавления более поздних стадий для предотвращения деградации вирусного потомства и обеспечения своей репликации.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 36—42

Ключевые слова: вирус краснухи, аутофагия

*M.K.Gulimov<sup>1</sup>, L.R.Romantsova<sup>1</sup>, A.V.Astapenko<sup>1</sup>, Yu.R.Schetinina<sup>1</sup>, E.V.Prokofeva<sup>1</sup>, G.V.Movsesyan<sup>1</sup>, V.V.Zverev<sup>1,2</sup>, Yu.I.Ammur*

## AUTOPHAGY REGULATION BY RUBELLA VIRUS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; <sup>2</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

*Aim.* Some viruses can subvert host defense mechanism, autophagy, to their own benefit. We analysed the effect of Rubella virus (RV) infection on autophagy in human alveolar epithelial cells A549. *Materials and methods.* Cells were infected with the wild type and lab-attenuated strain, C-77w and C-77a, respectively, with a multiplicity of infection of 1.0, in parallel, the expression level of genes encoding Beclin1, Atg5, Rab7, and p62 (SQSTM1) proteins participating in different steps of autolysosome formation was measured. To investigate the role of autophagy on RV replication cycle, we measured the amount of infectious RV particles, together with the viral RNA in supernatants and cell lysates, after incubation of A549 cells with wild type or attenuated strain in the presence of the autophagy inhibitor, Bafilomycin A1, or inducer, Rapamycin. *Results.* The significant increase in Beclin1 and Atg5 gene expression at 24–48 (for the wild type) and 24–72 (for the attenuated type) hours after infection was observed, while significant induction of either Rab7 or SQSTM1 gene expression was not noticed. This effect was correlated with more delayed increase of IFN $\beta$  expression and IFN $\beta$ -mediated pro-apoptotic gene expression leading to apoptotic cell death 72–96 hours after infection. Moreover, Bafilomycin A1 diminished the RV infection non significantly, as evidenced by the RT-qPCR and plaque assay, while Rapamycin increased the amount of infectious RV particles released by the infected cells more dramatically with wild type comparing with attenuated strain. *Conclusion.* Thus, we hypothesized that RV can use an antiviral mechanism to prevent degradation and ensure its replication, differentially regulating the process of autophagy, by stimulating the initiation and suppression of later steps.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 36—42

Key words: rubella virus, autophagy

## ВВЕДЕНИЕ

Аутофагия — это эволюционно сложившийся клеточный автономный катаболический и защитный механизм, посредством которого клетки способны утилизировать собственные органеллы, макромолекулы и патогены [5]. Аутофагия сложный процесс, в котором участвует более 30 различных белков, задействованных на разных стадиях и выполняющих определенные функции.

Инициация аутофагии происходит при слиянии белков Vps34 и Beclin1 под контролем mTORC1 (Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1) и активации комплекса белков ATG9, ATG18 и ATG2, перемещающихся в цитоплазме на мембрану эндоплазматического ретикулума (ЭПР), где они принимают участие в образовании небольших выступов мембраны, так называемых омегасом [4].

Достраивание до аутофагосомы происходит во время стадии элонгации, где ключевая роль принадлежит двум комплексам генов: Atg12—Atg5, кодирующему белки Atg5/Atg12/Atg16L, и Atg8/LC3, кодирующему белки LC3-I (light chain 3-I) и LC3-II, обеспечивающих элонгацию. Кроме того, белок LC3-II вовлечен в перенос в аутофагосомы белков-адаптеров, в том числе p62, посредством которых впоследствии происходит избирательная доставка различных макромолекул для их деградации (например, вирусных частиц) [9, 11].

Аутофагосомы созревают в аутолизосомы последовательным слиянием аутофагосомы с лизосомами с помощью ГТФазы Rab7 путем эндоцитоза, что приводит к утилизации содержащихся в ней макромолекул гидролазами и другими лизосомальными ферментами с целью получения энергии или уничтожения чужеродных агентов для защиты организма [6].

При вирусной инфекции аутофагия может выполнять функцию механизма надзора, который поставляет вирусные белки в лизосомальные компартменты [5], однако многие РНК-вирусы могут регулировать процесс аутофагии, препятствуя активации дцРНК-зависимых защитных механизмов [15]. Так, известно, что многие РНК-вирусы способны нейтрализовать или использовать аутофагический процесс с целью изменения клеточной физиологии и метаболизма в пользу облегчения собственной репликации [7]. Создание вирусных фабрик из мембранных внутриклеточных органелл имеет важное значение для размножения РНК-вирусов, накапливающих в качестве репликативных промежуточных продуктов дцРНК в своем жизненном цикле [15]. Было показано, что некоторые РНК-вирусы активируют сигнальный путь класса I PI3K/Akt, регулируя аутофагический процесс с целью обеспечения защитной среды для поддержания своей репликации и предотвращения аутофагической деградации вирионов потомства [3, 10, 15]. Так, вирусы Коксаки В3 [3], Зика [10], Денге [8] и, возможно, вирус краснухи, могут захватывать аутофагические мембраны для создания репликационных комплексов, а также блокировать последующие фазы аутофагии и, таким образом, скрываться от последующей элиминации [3]. Таким образом, точное распознавание уникальных молекулярных стратегий, участвующих в биогенезе мембранных вирусных фабрик, имеет решающее значение для лучшего понимания инфекций и идентификации новых терапевтических целей.

Краснуха — острое вирусное заболевание, актуальность и социальная значимость которого обусловлена способностью вируса краснухи вызывать у женщин во время беременности серьезную фетопатию — синдром врожденной краснухи, нередко заканчивающуюся выкидышем или рождением ребенка с различными тяжелыми пороками развития, такими как слепота, глухота, врожденные пороки сердца [12]. Однако молекулярный механизм тератогенного эффекта, вызванного вирусом краснухи, еще полностью не известен. Известно, что вирус краснухи способен активировать клеточные пролиферативные пути, такие как Ras/Raf/MEK/ERK и PI3K/Akt, регулирующие, кроме того, большую часть мембранного трафика и аутофагию, нарушать цитоскелет и модулировать клеточную гибель [13,14]. Медленное размножение вируса краснухи связано с внутриклеточной эндомембранной системой — вирус краснухи проникает в клетку-хозяина при помощи эндоцитоза. Вирусная оболочка сливается с эндосомальной мембраной, после декапсидации в цитоплазме начинается образование комплексов репликации вируса краснухи — сферул, захватывающих небольшой участок ЭПР и митохондрии, которые обеспечивают защитную среду для репликации вирусной РНК. Как было показано ранее на модели чувствительной культуры клеток кролика SIRC, вирус краснухи замедляет процесс аутофагии, подавляя уровень конъюгации Atg12—Atg5 и ослабляя LC3В липидизацию, а также снижает среднее количество и размер аутофагосом в клетке [13,14]. Вместе, эти данные свидетельствуют о том, что в процессе репликации вирус краснухи способен подавлять аутофагию, не вызывая полного ее блока и, вероятно, приводя к апоптозу. Таким образом, мы предполагаем, что вирус краснухи может дифференциально регулировать последовательность аутофагии в своих интересах. Нашей задачей было оценить взаимосвязь процесса аутофагии и репликации вируса краснухи в эпителиальных клетках A549.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований из музея ФГБУ НИИВС имени И.И. Мечникова были получены ампулы с вирусом краснухи штамма С-77 на 5 (С-77w) и 38 (С-77a) пассажах, а также штамма Wistar RA 27/3 на 30 пассаже. Перевиваемые культуры клеток почки кролика (линия RK-13) и линии Vero были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Перевиваемая культура клеток карциномы легкого A549 была предоставлена Никоновой А.А. (НИИВС им. И.И. Мечникова).

Перевиваемые клеточные линии RK-13, Vero, A549 культивировали в питательных средах RPMI 1640 (Gibco, США), MEM (Gibco) или DMEM (Gibco), соответственно, в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, HyClone, США), 1мМ глутамин (Gibco) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco) при температуре +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. При получении монослоя клеток проводили пересев культуры.

За день до заражения клетки A549 высаживали из расчета  $2 \times 10^6$  в 6-луночный планшет (Greiner Bio-One, Австрия), непосредственно перед заражением 80–90% клеточный монослой промывали раствором Хэнкса (Gibco) и инкубировали с соответствующим вирус-содержащим материалом со множественностью заражения (МОИ) 1.0 инфекционная частица на клетку в течение 3 часов при 35°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, затем удаляли вирусный материал и культивировали зараженные клетки в 3.0 мл питательной среды DMEM с 2% ЭТС на лунку при 33 °C (С-77a) или 37 °C (С-77w) в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Клеточный монослой лизировали, используя 300 мкл лизирующего буфера RLT RNAeasy kit (Qiagen, Германия) на лунку через 0, 24, 48, 72 и 96 ч после заражения. Лизаты клеток центрифугировали при 1 000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант хранили при -70 °C до использования.

Аналогично проводили эксперименты, добавляя к культуре клеток ингибитор (Bafilomycin A1, BFLA, Sigma Aldrich, USA) или индуктор (Rapamycin, Sigma Aldrich, USA) аутофагии в конечной концентрации 100 нМ каждый за час непосредственно перед заражением.

Титрование вируса краснухи по реакции цитопатического действия (ЦПД) проводили в 96-луночном планшете (Greiner Bio-One) в культуре клеток RK-13. Клетки трипсинизировали, считали в камере Горяева и пересаживали на планшеты с плотностью  $1.5-3 \times 10^4$  на лунку в 100 мкл среды. Готовили 10-кратные серийные разведения вирусных образцов в среде без добавления ЭТС. Использовали 6 лунок на 8 разведений каждого вирусного образца. В каждую лунку добавляли 100 мкл разведений вируса краснухи. Планшеты инкубировали при 32-37 °C при 5% CO<sub>2</sub> в течение 10-12 дней. Учет результатов проводили через 8-12 суток. Титры вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lgТЦД<sub>50</sub>/мл.

Тотальную РНК выделяли из клеточных лизатов с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) согласно инструкции производителя или фенол-хлороформной экстракцией. Очищенную РНК элюировали с мембраны колонок RNeasy Mini Spin дважды 50 мкл воды, не содержащей РНКаз, и оценивали концентрацию РНК на приборе NanoDrop 8 000 (Thermo Scientific, Германия). Примесь ДНК удаляли обработкой ДНКазой 20 U (Синтол, Россия) в течение 30 мин.

При определении уровня экспрессии целевых генов 1 мкг тотальной РНК инкубировали при 42°C в течение 1 ч со следующими компонентами: 1 ед. обратной транскриптазы RevertAid H Minus (Thermo Scientific), 5 мкМ случайных гексамеров или праймера oligo(dT) (Синтол, Россия), 5-кратный буферный раствор (250 мМ Трис-НСl (рН 8.3), 250 мМ КCl, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ DTT), 1 мМ каждого dNTP и 20 ед. ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo Scientific). Фермент инактивировали прогреванием реакционной смеси при 70 °C в течение 10 мин.

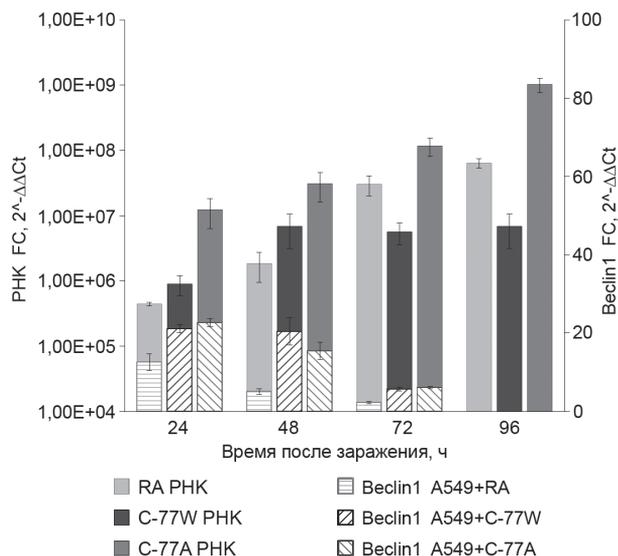
Аmplификацию с использованием ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем 2.5ЧSYBR® Green PCR Master Mix (Синтол), по 200 нМ прямого и обратного праймера для каждого анализируемого гена и 10–50 нг кДНК в двух повторах. ПЦР проводили на приборе DТprime5 (ДНК-технология, Россия): 15 мин при

95 °С, 40 циклов по 15 с при 95 °С и 30 с при 60 °С. Праймеры были подобраны в программе Primer 3 plus. Расчет уровня экспрессии генов проводили, используя  $\Delta\Delta Ct$ -метод: средние значения полученных пороговых циклов для каждого исследуемого гена нормализовали относительно значений пороговых циклов, полученных для генов «домашнего хозяйства»: GAPDH, PGK1 и ACTB, которые анализировали параллельно для каждого образца ( $\Delta Ct$ ), результаты представляли как кратность изменения (FC) между нормализованными значениями пороговых циклов зараженной культуры клеток непосредственно перед заражением (0 ч) ( $\Delta\Delta Ct$ ) для каждой временной точки (24, 48, 72 и 96 ч).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того, чтобы определить, является ли инициированная аутофагия следствием репликации вируса краснухи, эпителиальные клетки человека A549 заражали диким или аттенуированным вариантами штамма вируса краснухи — C-77w и C-77a, соответственно, полученными и полностью секвенированными ранее в нашей лаборатории [1], а также штаммом сравнения Wistar RA27/3 со множественностью заражения 1 инф.ед./кл. Кинетику репродукции вируса в клетках отслеживали по накоплению вирусной РНК внутриклеточно через 24, 48, 72 и 96 ч после заражения с помощью метода ОТ-ПЦР-РВ. На рис. 1 представлено накопление геномной РНК вируса краснухи в культуре клеток A549. Как видно из рис. 1, количество вирусной РНК всех использованных штаммов вируса постепенно растет в культуре зараженных клеток, что свидетельствует о чувствительности данной культуры клеток к вирусу.

Одновременно в этих же клетках был измерен уровень экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в инициации, элонгации и образовании аутофагосомы — Beclin1, Atg5, Rab7 и SQSTM1 (p62). Наибольший уровень экспрессии мРНК генов



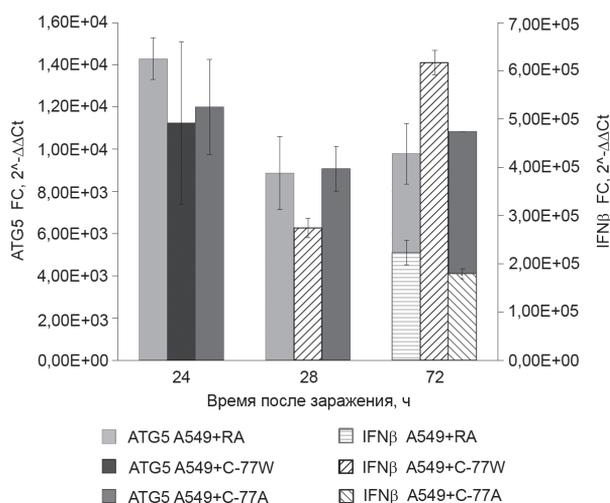
**Рис. 1.** Накопление РНК вируса краснухи (левая шкала) штамма Wistar RA27/3 (RA) и штамма C-77 дикого (C-77W) и аттенуированного вариантов (C-77A), а также экспрессия мРНК белка Beclin1 (правая шкала) в культуре клеток A549 через 24-96 ч после ее заражения вирусом краснухи штаммами — Wistar RA27/3 или C-77 дикого и аттенуированного варианта. Здесь и на рис. 2 результаты представляют кратность изменения (FC) между нормализованными значениями пороговых циклов ( $\Delta Ct$ ) зараженной культуры клеток непосредственно перед заражением (0 ч) ( $\Delta\Delta Ct$ ) для каждой временной точки.

Beclin1 (рис. 1) и Atg5 (рис. 2) был отмечен через 24-48 (для C-77w) и 24-72 (для C-77a) ч после заражения диким и аттенуированным вариантами вируса краснухи, соответственно. Однако, индукции экспрессии мРНК генов Rab7 и SQSTM1 после заражения культуры клеток как диким, так и аттенуированными вариантами вируса краснухи не наблюдали. Таким образом, мы предполагаем, что вирус краснухи может дифференциально регулировать последовательность аутофагии, стимулируя инициацию и подавляя более поздние стадии, в результате не происходит слияние аутофагосомы с лизосомой, что позволяет вирусу использовать антивирусный механизм в своих интересах.

Кроме того, экспрессия генов Beclin1 и Atg5 через 24-48 ч после заражения культуры клеток A549 диким вариантом вируса краснухи и через 24-72 ч аттенуированным вариантом вируса обратно коррелировала с экспрессией мРНК IFN $\beta$  на 48 и 72 ч после заражения (рис. 2), соответственно, т.е.

более отстроченной (на 24 ч) при заражении аттенуированным вариантом по сравнению с диким. Мы предполагаем, это может быть вызвано выходом собранного вирусного материала потомства и вирусных частиц, включая промежуточные формы дцРНК, опосредованно инициирующие экспрессию  $IFN\beta$ , из «репликационных фабрик» в омегасомах, где происходила их сборка. В дальнейшем экспрессия  $IFN\beta$  приводила к апоптотической гибели зараженных клеток начиная с 96 ч после заражения вследствие, в том числе, активации экспрессии интерферон-зависимых генов, в частности, таких как  $TNFSF10$  (TRAIL) и  $XAF1$ , 2,5-5,0-кратное повышение экспрессии которых определяли через 72 ч после заражения. При этом значимой разницы в индукции экспрессии мРНК про-апоптотических генов в культуре клеток A549 при ее заражении диким или аттенуированным вариантами штамма C-77 вируса краснухи не было установлено. Однако при заражении диким вариантом штамма C-77 экспрессия мРНК гена *Atg5* снижалась ранее (уже через 48 ч после заражения), приводя к более ранней экспрессии мРНК  $IFN\beta$ , по сравнению с аттенуированным вариантом (рис. 2), при этом накопление РНК дикого варианта вируса в культуре клеток A549 замедлялось уже через 48 ч после ее заражения (рис. 1), что, возможно, указывает на ключевую роль *Atg5* в процессе взаимодействия вируса краснухи и аутофагии. Важно также отметить, что по литературным данным способность вируса краснухи индуцировать апоптоз варьирует в зависимости от штамма вируса и типа инфицированных им клеток [2]. Кроме того, интересен тот факт, что вирус краснухи способен активировать множественные апоптотические пути, однако насколько этот вирус влияет на механизмы запрограммированной гибели и микроокружения зараженной клетки до сих пор неизвестно.

Для подтверждения участия аутофагии в процессе репликации вируса краснухи, мы измерили концентрацию вирусных частиц в супернатантах, а также РНК вируса краснухи внутриклеточно в присутствии ингибитора (BFLA) или индуктора (Рапамицин) аутофагии при заражении культуры клеток A549 штаммом C-77 вируса краснухи через 48 часов после заражения. Основным регулятором аутофагии является протеинкиназа mTOR, состоящая из двух отдельных мультипротеиновых комплексов mTORC1 и mTORC2, схожих по своим компонентам, регуляции, функциям, но влияние на аутофагию оказывает непосредственно mTORC1 [5]. Протеинкиназа mTORC1 чувствительна к действию рапамицина, который ингибирует ее, инициируя процесс аутофагии [10]. BFLA блокирует аутофагию на стадии слияния аутофагосомы с лизосомой, тем самым препятствуя элиминации патогена [3]. Установлено, что аутофагия вносит существенный вклад в продукцию вирусных частиц клетками A549, что следует из увеличения их выхода в супернатант в присутствии индуктора аутофагии и незначительного снижения в присутствии ингибитора, при этом значимого эффекта на изменение концентрации вирусной РНК через 48 часов после заражения не наблюдали, что свидетельствовало о том, что вирус краснухи, по-видимому, использует индуцированную аутофагию для облегчения сборки вирионов потомства, а не для репликации РНК. Следует отметить, что наши результаты не воспроизводят ранее опубликованные данные, полученные группой венгерских ис-



**Рис. 2.** Экспрессия мРНК белков *ATG5* (левая шкала) и  $IFN\beta$  (правая шкала) через 24-72 ч после заражения культуры клеток A549 вирусом краснухи штаммами Wistar RA27/3 (RA) или C-77 дикого (C-77W) и аттенуированного варианта (C-77A).

следователей при заражении штаммом вируса краснухи To336 эпителиальных клеток кролика SIRC, где при заражении клеток в присутствии индуктора аутофагии вирусный выход незначительно снижался [14]. Вероятно, это связано с использованием разных штаммов и культур клеток. В любом случае, влияние аутофагии на продукцию вируса краснухи требует дальнейшего изучения.

Широко известно, что пути Ras/Raf/MEK/ERK и I класса PI3K/Akt препятствуют аутофагии путем активации mTORC1. В свою очередь, класс III PI3K оказывает противоположное действие, что имеет важное значение для инициации аутофагии и формирования омегасом [5]. Таким образом, взаимодействуя с Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K класса I/Akt и PI3K класса III ветвями трансдукции сигнала, возможно, вирус краснухи может избирательно регулировать аутофагический каскад с последующей стимуляцией инициации и сильным подавлением более поздних этапов. Таким образом, мы предполагаем, что вирус краснухи может использовать антивирусный механизм для предотвращения деградации вирусного потомства и обеспечения своей репликации, дифференциально регулируя процесс аутофагии путем стимулирования инициации и подавления более поздних стадий.

Кроме того, известно, что процесс аутофагии принимает участие в некоторых фазах онтогенеза и органогенеза. Так, исследования показали, что аутофагия играет важную защитную роль в морфогенезе сердца и нервной системы при развитии позвоночных животных [13]. В свете этих наблюдений, актуально предположить, что аутофагия, опосредованная вирусом краснухи, может принимать участие в патогенезе пороков развития органов при синдроме врожденной краснухи. Таким образом, вероятно, терапевтические способы таргетинга процесса аутофагии могут помочь уменьшить тяжелые последствия синдрома врожденной краснухи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев Г.В., Борисова Т.К., Файзулов Е.Б., Забияка Ю.И., Десяткова Р.Г., Зверев В.В. Изучение молекулярных механизмов аттенуации вируса краснухи на примере отечественного штамма С-77. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012, 27(3): 28-34.
2. Adamo M.P., Zapata M., Frey T.K. Analysis of gene expression in fetal and adult cells infected with rubella virus. *Virology*. 2008, 370(1): 1-11.
3. Chang H., Li X., Cai Q. et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway is involved in CVB3-induced autophagy of HeLa cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017, 40(1): 182-192.
4. Delgado M., Singh S., De Haro S. et al. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunological Reviews*. 2009, 227(1): 189-202.
5. Deretic V., Levine B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. *Cell Host Microbe*. 2009, 5(6): 527-549.
6. Jager S., Bucci C., Tanida I. et al. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*. 2004, 117(20): 4837-4848.
7. Jordan T.X., Randall G. Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy. *Microbes and Infection*. 2012, 14(2): 126-139.
8. Heaton N.S., Randall G. Dengue Virus-Induced Autophagy Regulates Lipid Metabolism. *Cell Host Microbe*. 2010, 8 (5): 422-432.
9. Lamark T., Svenning S., Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in Biochemistry*. 2017, 61(6): 609-624.
10. Liang Q., Luo Z., Zeng J. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem. Cell*. 2016, 19 (5): 1-9.
11. Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M. et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008, 451(7182): 1069-1075.
12. Nazme N.I., Hussain M., Das A.C. Congenital Rubella Syndrome — A Major Review and Update. *Delta Med. Col. J*. 2015, 3(2): 89-95.
13. Orosz L., Megyeri K. Well begun is half done: Rubella virus perturbs autophagy signaling, thereby facilitating the construction of viral replication compartments. *Medical Hypotheses*. 2016, 89: 16-20.
14. Pásztor K., Orosz L., Seprényi G. et al. Rubella virus perturbs autophagy. *Med. Microbiol. Immunol*. 2014, 203(5): 323-331.
15. Shi J., Luo H. Interplay between the cellular autophagy machinery and positive-stranded RNA viruses. *Acta Biochim. Biophys. Sin*. 2012, 44(5): 375-384.