

УДК 576.835

## НАРУШЕНИЕ ЭНДОСОМАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ СИНТЕЗА НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА ХАНТАВИРУСА ПРОСПЕКТ ХИЛЛ *IN VITRO*

М. Муйангва, Е.Е. Гаранина

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

### Аннотация

Статья посвящена исследованию молекулярных механизмов транспорта нуклеокапсидного белка непатогенного вируса Проспект Хилл (PHV). Вирус Проспект Хилл относится к семейству Bunyaviridae, род *Hantavirus*. Хантавирусы используют внутриклеточные механизмы для доставки вирусной РНК и белков в место сборки вирионов. Несмотря на значимый прогресс в понимании механизмов репликации вируса PHV, значение внутриклеточного транспорта в вирусной репликации остается неизвестным.

Методами иммунофлуоресцентного анализа показано, что нуклеокапсидный белок ко-локализуется с белками ранних, поздних и рециркулирующих эндосом (Rab5, Rab7 и Rab11 соответственно). Иммуноблоттинг выявил снижение уровня нуклеокапсидного белка *in vitro* при подавлении эндосомального транспорта за счет экспрессии доминантно-негативных мутантных форм белков Rab5 и Rab11. На основе полученных результатов сделано заключение, что для репликации вируса PHV необходимо полноценное функционирование ранних, поздних и рециркулирующих эндосом. Полученные результаты имеют большое значение в понимании молекулярных и клеточных механизмов патогенеза хантавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** рекомбинантный лентивирус, нуклеокапсидный белок, хантавирус, Проспект Хилл, PHV, Rab-белки, эндосомы

### Введение

На сегодняшний день на территории Российской Федерации, а также в странах Северной Америки, восточной Европы участились случаи заболеваний вирусными геморрагическими лихорадками, возбудителями которых являются хантавирусы.

Хантавирусы принадлежат к семейству Bunyaviridae [1]. В качестве переносчиков хантавирусных инфекций выступают мышевидные грызуны. Заражение происходит при контакте с инфицированной мочой, слюной и фекальной массой грызунов [2]. Хантавирусы Нового Света классифицируют на патогенные – вирусы Хантаан (HTV), Син Номбре (SNV) – и непатогенные – вирус Проспект Хилл (PHV).

Геном хантавирусов образован 3-сегментированной одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью, содержащей большой (L), средний (M) и малый (S) сегменты [3]. L-сегмент кодирует вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу,

средний сегмент – гликопротеиды оболочки G1 и G2, а малый S-сегмент – нуклеокапсидный белок.

Нуклеокапсидный белок хантавирусов имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа и является наиболее консервативным по сравнению с другими белками хантавирусов. Нуклеокапсидный белок изначально синтезируется в наибольшем количестве в инфицированных клетках и является основной антигенной детерминантой в первичной диагностике геморрагических лихорадок [4].

Известно, что при инфицировании хантавирусы используют существующие клеточные органеллы для завершения своего жизненного цикла, в частности эндосомы [5]. Эндосомы – это одномембранные органоиды, участвующие в клатрин-опосредованном эндоцитозе. В зависимости от морфологии и наличия функциональных маркеров различают три вида эндосом – ранние, поздние и рециркулирующие эндосомы [6]. Функциональными маркерами эндосом служат Rab-белки, относящиеся к семейству Ras-белков [7]. Низкомолекулярные Rab-белки ассоциированы с клеточной мембраной посредством ковалентной связи между аминокислотной группой и липидами. Активация Rab-белков осуществляется за счет связывания с молекулой ГДФ, что обуславливает взаимодействие с эффекторными белками, в то время как неактивная форма Rab-белков связана с ГДФ.

Функциональным маркером ранних эндосом является белок Rab5 [8, 9], поздних эндосом – белки Rab7 и Rab9 [10, 11], а рециркулирующих эндосом – Rab11 [12, 13]. Белок Rab5 участвует в регуляции доставки биомолекул в ранние эндосомы [14, 15]. Хотя белки Rab7 и Rab9 и характеризуют поздние эндосомы, тем не менее они отличаются по выполняемым функциям. Rab7 участвует в транспортировке биомолекул от поздних эндосом в лизосомы [16]. Rab9 принимает участие в транспорте от поздних эндосом к аппарату Гольджи, где происходит сборка вирионов хантавирусов Старого света [17, 18]. Белок Rab11 участвует в транспорте белков от аппарата Гольджи в плазматическую мембрану, где происходит сбор вирионов хантавирусов Нового света [19, 20].

Немаловажным фактором, определяющим цель настоящего исследования, является отсутствие эффективных методов лечения хантавирусных инфекций. Ключевым шагом к разработке новых методов терапии хантавирусных заболеваний станет расширение понимания молекулярных механизмов патогенеза хантавирусных инфекций. Особенности внутриклеточного транспорта белков хантавирусов еще недостаточно исследованы, несмотря на значительный прогресс в данной области.

Цель настоящего исследования – анализ механизмов внутриклеточного транспорта нуклеокапсидного белка хантавируса PHV *in vitro*.

### Материалы и методы

**Получение рекомбинантного лентивируса, экспрессирующего нуклеокапсидный белок хантавируса PHV.** Создание рекомбинантного лентивируса, экспрессирующего нуклеокапсидный белок хантавируса PHV описано ранее [21]. Для получения рекомбинантных репликационно-дефектных лентивирусов проводили ко-трансфекцию с использованием кальций-фосфатного метода тремя плазмидами: оболочечной плазмидой pCMV-VSV-G (ID 8454, Addgene, США), упаковочной плазмидой psPAX2 (ID 12260, Addgene, США) и векторной

плазмидой pWPT-GFP (ID 12255, Addgene, США) в качестве положительного контроля или созданной нами pLX-PHV-S. Сбор супернатанта, содержащего рекомбинантный лентивирус, проводили 3 раза каждые 24 ч. Титр рекомбинантного лентивируса был определен с помощью проточной цитометрии. Титр рекомбинантных лентивирусов составил  $3.2 \cdot 10^9$  трансдуцирующих ед./мл.

#### **Исследование внутриклеточного транспорта нуклеокапсидного белка хантавируса PHV.**

**Трансфекция культуры клеток линии A549.** Исследование проведено с использованием культуры эпителиальных клеток карциномы легкого линии A549, которые являются модельным объектом для изучения патогенеза хантавирусных инфекций и восприимчивы к инфицированию хантавирусами. Все работы с культурами клеток проводили в ламинарном шкафу второго класса биологической защиты в соответствии с общепринятыми методиками. Культуру клеток A549 поддерживали на среде DMEM (ПанЭко) с содержанием 10%-ной сыворотки крови плодов коровы (fetal bovine serum – FBS, HyClone), 2 mM L-глутамин (ПанЭко) и 1%-ной смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (100 ед./мл, Биолот). Первоначально культуру клеток A549 (конфлюентность монослоя 60–70%) трансфицировали плазмидами (табл. 1), кодирующими доминантно негативную (DN) и дикую форму (WT) белков ранних, поздних и рециркулирующих эндосом с помощью трансфицирующего реагента TurboFect (ThermoFisher Scientific Inc., США). Для приготовления трансфекционной смеси 1 мкг плазмидной ДНК разводили в 100 мкл бессывороточной среды DMEM, после чего добавляли 1 мкл трансфицирующего агента. Трансфекционную смесь перемешивали в течение 10 с на вортексе с дальнейшей инкубацией в течение 15 мин при комнатной температуре. По истечении времени инкубации трансфекционную смесь добавляли к клеткам и инкубировали в термостате при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Через 3 ч после трансфекции меняли среду на свежую. Эффективность трансфекции анализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss).

Табл. 1

Плазмиды для трансфекции

Источник	Плазида	Номер каталога
Addgene	DsRed-Rab7 WT	12661
Addgene	DsRed-Rab5 DN	13051
Addgene	DsRed-Rab5 WT	13050
Addgene	DsRed-Rab11 DN	12680
Addgene	DsRed-Rab11 WT	12679

**Трансдукция клеток линии A549 рекомбинантным лентивирусом.** Трансдукцию рекомбинантным лентивирусом LV-PHV-S проводили спустя 48 ч после трансфекции плазмидной ДНК. Клетки были инфицированы полученными рекомбинантными лентивирусами, экспрессирующими нуклеокапсидный белок хантавируса PHV, с множественностью инфицирования, равной 10 (англ. Multiplicity of infection, MOI). Далее клетки инкубировали во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, при 37 °C.

**Анализ биосинтеза нуклеокапсидного белка *in vitro* методом иммунофлуоресцентного анализа.** Клетки линии A549 культивировали на покровных стеклах, предварительно обработанных поли-L-лизинном, которые помещали в 24-луночный планшет. Трансфицированные культуры A549 промывали раствором фосфатно-солевого буфера в модификации Дюльбекко (от англ. DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) и фиксировали в холодном метаноле в течение 20 мин при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . После фиксации промывали раствором DPBS. Нарушение проницаемости клеточных мембран достигали путем добавления 0.1%-ного раствора TritonX-100 и инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем лунки промывали раствором PBS. Блокировку проводили в 0.05%-ным DPBS с 10%-ной сывороткой осли (Sigma) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белков-мишеней добавляли первичные антитела к нуклеокапсидному белку N вируса ANDV в разведении 1:100 (получены в лаборатории Стивена Сент-Джоура (г. Рино, США) А.А. Ризвановым) [22] в DPBS с 10%-ной сывороткой осли. Инкубировали с первичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали раствором PBS и инкубировали с вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa 488 (donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488, Invitrogen) в разведении 1:1 000. После инкубации клетки промывали раствором DPBS и инкубировали в 1X DAPI (Sigma) в течение 10 мин при комнатной температуре для окрашивания ядер. Далее клетки промывали раствором DPBS. На заключительном этапе готовили слайды. Анализ слайдов был выполнен в лаборатории лазерной конфокальной микроскопии МДЦ АМ КФУ на приборе LSM 780 (Carl Zeiss).

**Анализ биосинтеза нуклеокапсидного белка *in vitro* методом иммуноблоттинга.** Непосредственно перед использованием проводили экстракцию белков в лизирующем буферном растворе. Суспензию клеток инкубировали в течение 10 мин при  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  и быстро охлаждали на льду. Для электрофореза белков готовили 12%-ный ПААГ в качестве разделяющего геля и 4%-ный ПААГ в качестве концентрирующего геля. Устанавливали режим работы электрофоретической камеры: 90 В для концентрирующего геля и 150 В для разделяющего геля, при температуре  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Перенос белков из ПААГ на PVDF-мембрану осуществляли на приборе Trans-Blot SD SemiDry Transfer Cell (Biorad, США), в специальном буфере для переноса – Transfer Buffer (BioRad). Перенос белков на PVDF-мембрану проводили в течение 1 ч при напряжении 15 В ( $5.5\text{ мА/см}^2$ ).

Блокирование неспецифического связывания антител к мембране проводили путем инкубации PVDF мембраны в 5%-ном растворе молока в PBS-T в течение 1 ч при постоянном перемешивании на шейкере при комнатной температуре. После промывки мембрану инкубировали с первичными антителами при комнатной температуре и постоянном перемешивании в 5%-ном растворе молока с PBS-T в течение 12 ч. В качестве первичных антител использовали следующие антитела:

1) антитела кролика к нуклеокапсидному белку в разведении 1:500 (получены в лаборатории Стивена Сент-Джоура А.А. Ризвановым [22]);

2) антитела мыши к  $\beta$ -актину (sc-8007, Santa Cruz) в разведении 1:2 000.

По окончании инкубации мембрану отмывали и инкубировали со вторичными антителами при комнатной температуре в течение 1 ч при постоянном перемешивании на шейкере. В качестве вторичных антител использовали антитела к видоспецифичным иммуноглобулинам, конъюгированным с пероксидазой хрена (goat anti-rabbit IgG-HRP, Sigma, A6154, разведение 1:2 000). Визуализацию иммунопреципитата проводили с использованием субстрата для иммуноблоттинга ECL (Promega, США) при комнатной температуре в течение 1 мин. Детекцию сигнала осуществляли с помощью гель-документирующей системы Gel Doc<sup>TM</sup> XRS+ (Bio Rad).

### Результаты и их обсуждение

Многие вирусы, включая хантавирусы, используют внутриклеточные механизмы транспорта биомолекул для собственной репликации, тем самым оказывая негативное влияние на жизненный цикл клетки. В своем жизненном цикле хантавирусы используют эндосомы, принимающие участие в проникновении вируса в клетку, его репликации и эксцизии вирусных частиц [23–25]. Исследование молекулярных механизмов патогенеза хантавирусной инфекции, в частности внутриклеточного транспорта нуклеокапсидного белка, открывает перспективу разработки альтернативных методов лечения вирусных геморрагических лихорадок. Настоящее исследование направлено на уточнение внутриклеточных механизмов транспорта нуклеокапсидного белка модельного хантавируса PHV.

**Исследование внутриклеточной локализации нуклеокапсидных белков хантавируса PHV и белков различных эндосом.** Для исследования внутриклеточной локализации нуклеокапсидного белка хантавируса PHV и Rab-белков нами первоначально был получен рекомбинантный лентивирус LV-PHV-S [21]. Первоначально культуру клеток линии A549 трансфицировали плазмидной ДНК, кодирующей доминантно негативную и нормальную форму белков Rab5 и Rab11. Эффективность трансфекции оценивали методом флуоресцентной микроскопии (рис. 1).

Ко-локализацию нуклеокапсидного белков и белков эндосом дикого типа (Rab5, 7 и 11) оценивали на конфокальном микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

Было обнаружено, что нуклеокапсидный белок рекомбинантного лентивируса LV-PHV-S ко-локализуются с белками дикого типа Rab5 (ранние эндосомы), Rab7 (поздние эндосомы) и Rab11 (рециркулирующие эндосомы) (рис. 2).

Анализ литературных данных выявил связь эндосом с жизненным циклом хантавирусов. Имеющиеся данные показывают, что вирусы Uukuniemi (семейство Bunyaviridae) и Андес (ANDV) используют белки Rab5, Rab7 и Rab8, Rab11 соответственно в своем жизненном цикле [26, 27]. Полученные нами данные впервые показывают ко-локализацию нуклеокапсидного белка непатогенного хантавируса PHV с белками ранних (Rab5), поздних (Rab7) и рециркулирующих эндосом (Rab11).

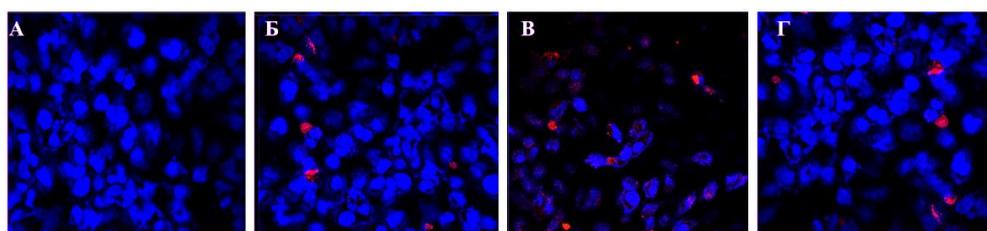


Рис. 1. Анализ эффективности трансфекции культуры клеток A549 плазмидой ДНК, кодирующей дикую форму белков Rab, 48 ч после трансфекции: А – нетрансфицированный контроль, Б – культура клеток A549, трансфицированная плазмидой DsRed-Rab5-WT, В – культура клеток A549, трансфицированная плазмидой DsRed-Rab7-WT, Г – культура клеток A549, трансфицированная плазмидой DsRed-Rab11-WT. Шкала 20 мкм

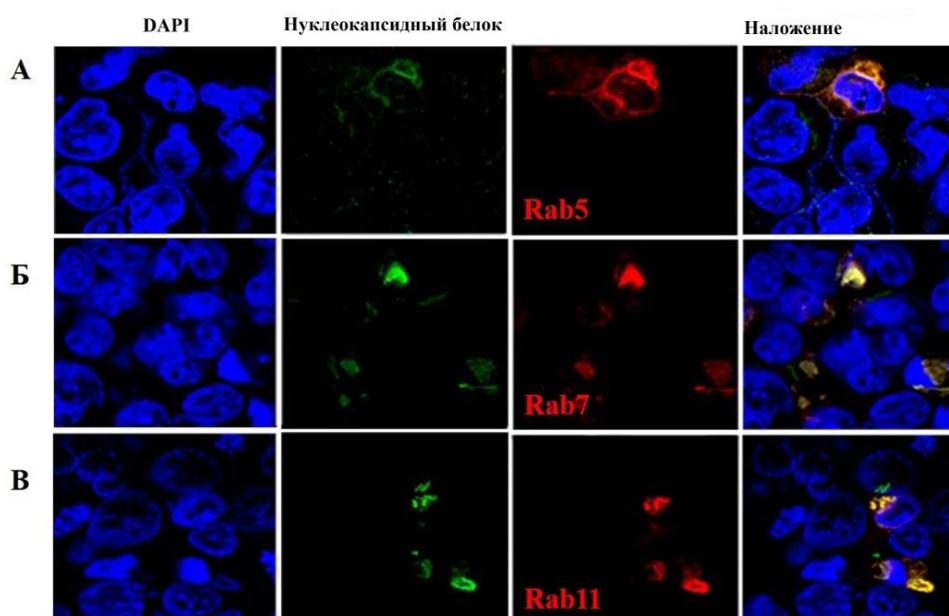


Рис. 2. Внутриклеточная ко-локализация нуклеокапсидных белков хантавируса PHV и белков различных эндосом. Флуоресцентная конфокальная микроскопия. Синяя флуоресценция – DAPI. Зеленая флуоресценция – окрашивание к нуклеокапсидному белку вируса PHV. Красная флуоресценция – DsRed-Rab5, DsRed-Rab7 или DsRed-Rab11, позволяет детектировать локализацию ранних, поздних или рециркулирующих эндосом. А – ко-локализация нуклеокапсидного белка рекомбинантного лентивируса LV-PHV-S с белком Rab5 ранних эндосом. Б – ко-локализация нуклеокапсидного белка рекомбинантного лентивируса LV-PHV-S с белком Rab7 поздних эндосом. В – ко-локализация нуклеокапсидного белка рекомбинантного лентивируса LV-PHV-S с белком Rab11 рециркулирующих эндосом. Шкала 20 мкм

**Исследование влияния ингибирования эндосомального транспорта на биосинтез нуклеокапсидного белка хантавируса PHV.** Цель данного этапа работы состояла в исследовании подавления эндосомального транспорта в результате экспрессии доминантно-негативных мутантных форм белков Rab5 и Rab11 на биосинтез нуклеокапсидного белка хантавируса PHV *in vitro*. Семейство Rab

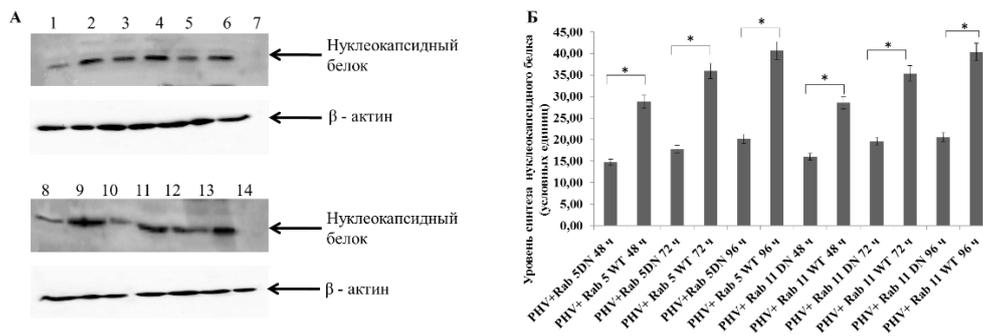


Рис. 3. Анализ внутриклеточного содержания нуклеокапсидного белка в лизатах клеток A549, трансфицированных плазмидными конструкциями доминантно-негативного мутантного или дикого типа Rab5 и Rab11, и трансдуцированных рекомбинантным лентивирусом LV-PHV-S. Иммуноблотинг. А – анализ синтеза нуклеокапсидных белков в лизатах клеток A549, трансфицированных плазмидными конструкциями доминантно-негативного мутантного или дикого типа Rab5 и Rab11, и трансдуцированных 48 ч спустя рекомбинантным лентивирусом LV-PHV-S. NTC – контроль, нетрансдуцированные клетки. 1, 3, 5 – клетки, трансфицированные DsRed-Rab5-DN. 2, 4, 6 – DsRed-Rab5-WT. 8, 10, 12 – DsRed-Rab11-DN. 9, 11, 13 – DsRed-Rab11-WT. 7, 14 – нетрансфицированные клетки. Клетки собирали через 48 ч (1, 2, 7, 8, 9), 72 ч (3, 4, 10, 11) и 96 ч (5, 6, 12, 13, 14) после трансдукции. Основная полоска – нуклеокапсидный белок хантавируса с молекулярной массой 50 кДа. Б – количественный анализ внутриклеточного содержания нуклеокапсидного белка хантавируса клеток A549, трансдуцированных рекомбинантным лентивирусом LV-PHV-S через 48 ч после трансфекции плазмидными конструкциями доминантно-негативного мутантного или дикого типа Rab5 и Rab11. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  С.О.,  $p < 0.05$ . Звездочкой отмечены статистически значимые данные

включает множество белков (Rab1–25), участвующих во внутриклеточном транспорте. В настоящем исследовании нами было обследовано только две точки внутриклеточного транспорта: ранний (Rab 5) и поздний (Rab 11). В дальнейшем нами планируется проведение расширенного исследования роли Rab-эндосом в репликации хантавирусов.

Использовались следующие плазмиды: DsRed-Rab5-WT, DsRed-Rab11-WT, DsRed-Rab5-DN и DsRed-Rab11-DN. Плазмиды DsRed-Rab5-WT и DsRed-Rab11-WT кодируют белки Rab5 и Rab11 дикого типа, а плазмиды DsRed-Rab5-DN и DsRed-Rab11-DN – доминантно-негативную мутантную форму белков Rab5 и Rab11. Мутантная доминантно-негативная форма белков Rab5 и Rab11 приводит к блокированию процесса эндоцитоза на стадии ранних и рециркулирующих эндосом соответственно [27, 28]. Обе формы белков Rab5 и Rab11 были использованы для сравнения внутриклеточного уровня нуклеокапсидного белка, синтезирующегося с разработанного нами лентивируса LV-PHV-S. Исследования проводили с помощью иммуноблотинга.

Полученные результаты показали существенные различия внутриклеточного уровня нуклеокапсидного белка хантавируса PHV в клетках A549, трансфицированных плазмидной ДНК, кодирующей белки Rab5 и Rab11 мутантного и дикого типов (рис. 3). Уровень синтеза нуклеокапсидного белка был в два раза меньше в клетках A549, трансфицированных кДНК-мутантной доминантно-негативной

формой белков Rab5 и Rab11, чем в клетках, трансфицированных плазмидной ДНК, кодирующей Rab-белки дикого типа. Уровень внутриклеточного содержания нуклеокапсидного белка хантавируса увеличивался также с длительностью инкубации клеток после трансдукции. Уровень  $\beta$ -актина в клетках использовали для нормализации результатов.

На основе полученных результатов впервые показана зависимость внутриклеточного содержания нуклеокапсидного белка хантавирусов PHV от функционирования эндосомального аппарата. В ранее опубликованных работах было показано, что блокирование белка Rab11 в клетках, инфицированных ANDV, значительно снижает уровень внутриклеточного содержания нуклеокапсидного белка данного хантавируса [27]. Трансфекция инфицированных клеток вирусом, экспрессирующим кРНК, специфичной к Rab11, приводила к снижению биосинтеза нуклеокапсидного белка в 10 раз. В настоящем исследовании впервые показана взаимосвязь между блокированием активности Rab-белков, участвующих в процессе эндоцитоза, и продукцией нуклеокапсидного белка непатогенного вируса PHV. Подавление функции Rab5- и Rab11-белков приводит к снижению биосинтеза нуклеокапсидного белка на всех временных интервалах. Показано, что ингибирование функции Rab5- и Rab11-белков при трансфекции плазмидной ДНК DsRed-Rab5-DN и DsRed-Rab11-DN снижает продукцию нуклеокапсидного белка в два раза.

Биологической функцией ранних эндосом в эндоцитозе является заключение и сортировка биомакромолекул [8, 14]. При разрушении биомакромолекулы транспортируются к лизосомам. При переработке они отправляются к рециркулирующим эндосомам. В число биомакромолекул, перерабатываемых рециркулирующими эндосомами, входят клеточные рецепторы – трансферрин [30, 31], рецепторы поли-иммуноглобулина [32] и хантавирусные клеточные рецепторы – интегрины  $\beta 3$  [33].

Подавление функции Rab5- и Rab11-белков, возможно, приводит к снижению внутриклеточного содержания нуклеокапсидных белков хантавирусов из-за нарушения функции ранних и рециркулирующих эндосом. Хантавирусам необходимы рециркулирующие эндосомы для переработки клеточных рецепторов, участвующих в инфицировании клеток и транспорте хантавирусных белков к плазматической мембране.

### Заключение

В ходе проведенного исследования были получены новые данные, объясняющие молекулярные механизмы внутриклеточного транспорта нуклеокапсидного белка хантавируса PHV. Показано, что нуклеокапсидный белок модельного штамма PHV ко-локализуется с ранними, поздними и рециркулирующими эндосомами. Блокирование функциональной активности эндосомальных белков приводит к снижению продукции нуклеокапсидного белка *in vitro*. Полученные результаты расширяют представление о молекулярных и клеточных механизмах патогенеза хантавирусной инфекции. Таким образом, блокирование функциональной активности эндосомальных белков можно рассматривать как потенциальный подход в терапии вирусных геморрагических лихорадок.

**Благодарности.** Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Работа поддержана также Российским научным фондом (проект № 15-14-00016).

#### Литература

1. *Elliott R.M.* Molecular biology of the Bunyaviridae // *J. Gen. Virol.* – 1990. – V. 71, No 3. – P. 501–522. – doi: 10.1099/0022-1317-71-3-501.
2. *Jonsson C.B., Figueiredo L.T., Vapalahti O.* A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2010. – V. 23, No 2. – P. 412–441. – doi: 10.1128/CMR.00062-09.
3. *Vaheri A., Strandin T., Hepojoki J., Sironen T., Henttonen H., Makela S., Mustonen J.* Uncovering the mysteries of hantavirus infections // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – V. 11, No 8. – P. 539–550. – doi: 10.1038/nrmicro3066.
4. *Vapalahti O., Kallio-Kokko H., Narvanen A., Julkunen I., Lundkvist A., Plyusnin A., Lehvaslaiho H., Brummer-Korvenkontio M., Vaheri A., Lankinen H.* Human B-cell epitopes of Puumala virus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response // *J. Med. Virol.* – 1995. – V. 46, No 4. – P. 293–303. – doi: 10.1002/jmv.1890460402.
5. *Ramanathan H.N., Jonsson C.B.* New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles // *Virology.* – 2008. – V. 374, No 1. – P. 138–150. – doi: 10.1016/j.virol.2007.12.030.
6. *Mellman I.* Endocytosis and molecular sorting // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1996. – V. 12. – P. 575–625. – doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.575.
7. *Stenmark H.* Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – V. 10, No 8. – P. 513–525. – doi: 10.1038/nrm2728.
8. *Bucci C., Parton R.G., Mather I.H., Stunnenberg H., Simons K., Hoflack B., Zerial M.* The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway // *Cell.* – 1992. – V. 70, No 5. – P. 715–728. – doi: 10.1016/0092-8674(92)90306-W.
9. *Gorvel J.-P., Chavrier P., Zerial M., Gruenberg J.* rab5 controls early endosome fusion in vitro // *Cell.* – 1991. – V. 64, No 5. – P. 915–925. – doi: 10.1016/0092-8674(91)90316-Q.
10. *Rink J., Ghigo E., Kalaidzidis Y., Zerial M.* Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes // *Cell.* – 2005. – V. 122, No 5. – P. 735–749. – doi: 10.1016/j.cell.2005.06.043.
11. *Ganley I.G., Carroll K., Bittova L., Pfeffer S.* Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability // *Mol. Biol. Cell.* – 2004. – V. 15, No 12. – P. 5420–5430. – doi: 10.1091/mbc.E04-08-0747.
12. *Grant B.D., Donaldson J.G.* Pathways and mechanisms of endocytic recycling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – V. 10, No 9. – P. 597–608. – doi: 10.1038/nrm2755.
13. *van Ijzendoorn S.C.* Recycling endosomes // *J. Cell Sci.* – 2006. – V. 119, No 9. – P. 1679–1681. – doi: 10.1242/jcs.02948.
14. *Nielsen E., Severin F., Backer J.M., Hyman A.A., Zerial M.* Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules // *Nat. Cell Biol.* – 1999. – V. 1, No 6. – P. 376–382. – doi: 10.1038/14075.
15. *Pal A., Severin F., Lommer B., Shevchenko A., Zerial M.* Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease // *J. Cell Biol.* – 2006. – V. 172, No 4. – P. 605–618. – doi: 10.1083/jcb.200509091.

16. *Vanlandingham P.A., Ceresa B.P.* Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284, No 18. – P. 12110–12124. – doi: 10.1074/jbc.M809277200.
17. *Lombardi D., Soldati T., Riederer M.A., Goda Y., Zerial M., Pfeffer S.R.* Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network // *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* – 1993. – V. 12, No 2. – P. 677–682.
18. *Schmaljohn C.S., Nichol S.T.* Bunyaviridae // *Fields Virology* / Ed. by D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Straus. – Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007. – P. 1741–1789.
19. *Chen W., Feng Y., Chen D., Wandinger-Ness A.* Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor // *Mol. Biol. Cell.* – 1998. – V. 9, No 11. – P. 3241–3257. – doi: 10.1091/mbc.9.11.3241.
20. *Ravkov E.V., Nichol S.T., Compans R.W.* Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a New World hantavirus // *J. Virol.* – 1997. – V. 71, No 2. – P. 1147–1154.
21. *Muyangwa M., Garanina E.E., Martynova E.V., Rizvanov A.A.* Lentivirus expression of hantavirus nucleocapsid proteins // *BioNanoScience.* – 2016. – V. 6, No 4. – P. 403–406. – doi: 10.1007/s12668-016-0250-9.
22. *Ризванов А.А.* Вирусные и невирусные методы введения в организм рекомбинантных нуклеиновых кислот: Дис. ... д-ра биол. наук. – Казань, 2010. – 283 с.
23. *Townsend A.C., Weisberg A.S., Wagenaar T.R., Moss B.* Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway // *J. Virol.* – 2006. – V. 80, No 18. – P. 8899–8908. – doi: 10.1128/JVI.01053-06.
24. *Manna D., Aligo J., Xu C., Park W.S., Koc H., Heo W.D., Konan K.V.* Endocytic Rab proteins are required for hepatitis C virus replication complex formation // *Virology.* – 2010. – V. 398, No 1. – P. 21–37. – doi: 10.1016/j.virol.2009.11.034.
25. *Engel S., Heger T., Mancini R., Herzog F., Kartenbeck J., Hayer A., Helenius A.* Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection // *J. Virol.* – 2011. – V. 85, No 9. – P. 4198–4211. – doi: 10.1128/JVI.02179-10.
26. *Lozach P.Y., Mancini R., Bitto D., Meier R., Oestereich L., Overby A.K., Pettersson R.F., Helenius A.* Entry of bunyaviruses into mammalian cells // *Cell Host Microbe.* – 2010. – V. 7, No 6. – P. 488–499. – doi: 10.1016/j.chom.2010.05.007.
27. *Rowe R.K., Suszko J.W., Pekosz A.* Roles for the recycling endosome, Rab8, and Rab11 in hantavirus release from epithelial cells // *Virology.* – 2008. – V. 382, No 2. – P. 239–249. – doi: 10.1016/j.virol.2008.09.021.
28. *Sharma D.K., Choudhury A., Singh R.D., Wheatley C.L., Marks D.L., Pagano R.E.* Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, No 9. – P. 7564–7572. – doi: 10.1074/jbc.M210457200.
29. *Choudhury A., Dominguez M., Puri V., Sharma D.K., Narita K., Wheatley C.L., Marks D.L., Pagano R.E.* Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells // *J. Clin. Invest.* – 2002. – V. 109, No 12. – P. 1541–1550. – doi: 10.1172/JCI15420.
30. *Ren M., Xu G., Zeng J., De Lemos-Chiarandini C., Adesnik M., Sabatini D.D.* Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – V. 95, No 11. – P. 6187–6192.

31. Schlierf B., Fey G.H., Hauber J., Hocke G.M., Rosorius O. Rab11b is essential for recycling of transferrin to the plasma membrane // *Exp. Cell Res.* – 2000. – V. 259, No 1. – P. 257–265. – doi: 10.1006/excr.2000.4947.
32. Apodaca G., Katz L.A., Mostov K.E. Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes // *J. Cell Biol.* – 1994. – V. 125, No 1. – P. 67–86. – doi: 10.1083/jcb.125.1.67.
33. Jones J.C., Turpin E.A., Bultmann H., Brandt C.R., Schultz-Cherry S. Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells // *J. Virol.* – 2006. – V. 80, No 24. – P. 11960–11967. – doi: 10.1128/JVI.01678-06.

Поступила в редакцию  
01.02.17

---

**Муйангва Мусалва**, аспирант кафедры биохимии и биотехнологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: *musalwam@yahoo.co.uk*

**Гаранина Екатерина Евгеньевна**, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник  
OpenLab «Генные и клеточные технологии» ИФМиБ

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: *kathryn.cherenkova@gmail.com*

---

ISSN 2542-064X (Print)  
ISSN 2500-218X (Online)

**UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI**  
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2017, vol. 159, no. 1, pp. 58–71

---

**Inhibition of Endosomal Transport Results  
in Decreased Synthesis of Nucleocapsid Protein of PHV Virus**

*M. Muyangwa*<sup>\*</sup>, *E.E. Garanina*<sup>\*\*</sup>

*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*  
E-mail: <sup>\*</sup>*musalwam@yahoo.co.uk*, <sup>\*\*</sup>*kathryn.cherenkova@gmail.com*

Received February 1, 2017

**Abstract**

This paper is devoted to investigation of molecular mechanisms of transport of nucleocapsid protein of non-pathogenic virus Prospect Hill. Prospect Hill virus (PHV) belongs to the family Bunyaviridae, genus *Hantavirus*. Hantaviruses utilize the intracellular trafficking pathways for delivery of viral RNA and proteins to the site of viral assembly. While significant progress has been achieved in understanding PHV replication, the role of intracellular transport in virus replication remains largely unknown. Co-localization of PHV nucleocapsid protein and Rab5, Rab7, and Rab11 (early, late, and recycling endosomes, respectively) has been demonstrated using immunofluorescence assay. Western blot analysis has revealed decreased accumulation of nucleocapsid protein when dominant negative (DN) mutant protein forms Rab5 and Rab11 were expressed in PHV infected cells. Our data suggest that the functional activity of early, late, and recycling endosomes is essential for replication of HPV proteins. The obtained results are of great importance for comprehension of molecular and cellular mechanisms of pathogenesis of hantaviral infection.

**Keywords:** recombinant lentivirus, nucleocapsid protein, hantavirus, Prospect Hill Virus, PHV, Rab proteins, endosomes

**Acknowledgments.** This study was funded by the subsidy allocated to Kazan Federal University as part of the state program for increasing its competitiveness among the world's leading centers of science and education. The work was also supported by the Russian Science Foundation (project no. 15-14-00016).

### Figure Captions

- Fig. 1. The analysis of the efficiency of transfection of the culture of A549 cells with DNA plasmid encoding for Rab wild-type proteins, 48 h after transfection: A – untransfected control, B – A549 cells culture transfected with DsRed-Rab5-WT plasmid, C – A549 cells culture transfected with DsRed-Rab7-WT plasmid, D – A549 cells culture transfected with DsRed-Rab11-WT plasmid. Scale: 20  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 2. Intercellular co-localization of nucleocapsid proteins of PHV hantavirus and proteins of various endosomes. Confocal fluorescence microscopy. Blue fluorescence – DAPI. Green fluorescence – staining to nucleocapsid protein of PHV virus. Red fluorescence – DsRed-Rab5, DsRed-Rab7, or DsRed-Rab11, allows to detect localization of early, late, and recycling endosomes. A – co-localization of nucleocapsid protein of LV-PHV-S recombinant lentivirus with Rab5 protein of early endosomes. B – co-localization of nucleocapsid protein of LV-PHV-S recombinant lentivirus with Rab7 protein of late endosomes. C – co-localization of nucleocapsid protein of LV-PHV-S recombinant lentivirus with Rab11 protein of recycling endosomes. Scale: 20  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 3. The analysis of intracellular content of nucleocapsid protein in A549 cell lysates transfected with the plasmid constructions of dominant negative mutant or wild-type Rab5 and Rab11 and transduced with LV-PHV-S recombinant lentivirus. Western blot analysis. A – analysis of the synthesis of nucleocapsid proteins in A549 cell lysates transfected with the plasmid constructions of dominant negative mutant and wild-type Rab5 and Rab11 and transduced after 48 h with LV-PHV-S recombinant lentivirus. NTC – control, non-transduced cells. 1, 3, 5 – cells transfected with DsRed-Rab5-DN. 2, 4, 6 – DsRed-Rab5-WT. 8, 10, 12 – DsRed-Rab11-DN. 9, 11, 13 – DsRed-Rab11-WT. 7, 14 – non-transfected cells. Cells were collected 48 h (1, 2, 7, 8, 9), 72 h (3, 4, 10, 11), and 96 h (5, 6, 12, 13, 14) after transduction. Main band – nucleocapsid protein of hantavirus with the molecular weight of 50 kDa. B – quantitative analysis of intracellular content of nucleocapsid protein of hantavirus of A549 cells transduced with LV-PHV-S recombinant lentivirus 48 h after transfection with the plasmid constructions of dominant negative or wild-type Rab5 and Rab11. Data are presented as mean value  $\pm$  standard error,  $p < 0.05$ . The asterisk marks statistically significant data.

### References

1. Elliott R.M. Molecular biology of the Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.*, 1990, vol. 71, no. 3, pp. 501–522. doi: 10.1099/0022-1317-71-3-501.
2. Jonsson C.B., Figueiredo L.T., Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2010, vol. 23, no. 2, pp. 412–441. doi: 10.1128/CMR.00062-09.
3. Vaheri A., Strandin T., Hepojoki J., Sironen T., Henttonen H., Makela S., Mustonen J. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, vol. 11, no. 8, pp. 539–550. doi: 10.1038/nrmicro3066.
4. Vapalahti O., Kallio-Kokko H., Narvanen A., Julkunen I., Lundkvist A., Plyusnin A., Lehtvaslaihio H., Brummer-Korvenkontio M., Vaheri A., Lankinen H. Human B-cell epitopes of Puumala virus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response. *J. Med. Virol.*, 1995, vol. 46, no. 4, pp. 293–303. doi: 10.1002/jmv.1890460402.
5. Ramanathan H.N., Jonsson C.B. New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology*, 2008, vol. 374, no. 1, pp. 138–150. doi: 10.1016/j.virol.2007.12.030.
6. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1996, vol. 12, pp. 575–625. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.575.
7. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009, vol. 10, no. 8, pp. 513–525. doi: 10.1038/nrm2728.

8. Bucci C., Parton R.G., Mather I.H., Stunnenberg H., Simons K., Hoflack B., Zerial M. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 1992, vol. 70, no. 5, pp. 715–728. doi: 10.1016/0092-8674(92)90306-W.
9. Gorvel J.-P., Chavrier P., Zerial M., Gruenberg J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, 1991, vol. 64, no. 5, pp. 915–925. doi: 10.1016/0092-8674(91)90316-Q.
10. Rink J., Ghigo E., Kalaidzidis Y., Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 2005, vol. 122, no. 5, pp. 735–749. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.043.
11. Ganley I.G., Carroll K., Bittova L., Pfeffer S. Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. *Mol. Biol. Cell*, 2004, vol. 15, no. 12, pp. 5420–5430. doi: 10.1091/mbc.E04-08-0747.
12. Grant B.D., Donaldson J.G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009, vol. 10, no. 9, pp. 597–608. doi: 10.1038/nrm2755.
13. van Ijzendoorn S.C. Recycling endosomes. *J. Cell Sci.*, 2006, vol. 119, no. 9, pp. 1679–1681. doi: 10.1242/jcs.02948.
14. Nielsen E., Severin F., Backer J.M., Hyman A.A., Zerial M. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat. Cell Biol.*, 1999, vol. 1, no. 6, pp. 376–382. doi: 10.1038/14075.
15. Pal A., Severin F., Lommer B., Shevchenko A., Zerial M. Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *J. Cell Biol.*, 2006, vol. 172, no. 4, pp. 605–618. doi: 10.1083/jcb.200509091.
16. Vanlandingham P.A., Ceresa B.P. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 18, pp. 12110–12124. doi: 10.1074/jbc.M809277200.
17. Lombardi D., Soldati T., Riederer M.A., Goda Y., Zerial M., Pfeffer S.R. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, 1993, vol. 12, no. 2, pp. 677–682.
18. Schmaljohn C.S., Nichol S.T. Fields Virology. *Bunyaviridae*. Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B., Straus S.E. (Eds.). Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2007, pp. 1741–1789.
19. Chen W., Feng Y., Chen D., Wandinger-Ness A. Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell*, 1998, vol. 9, no. 11, pp. 3241–3257. doi: 10.1091/mbc.9.11.3241.
20. Ravkov E.V., Nichol S.T., Compans R.W. Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a New World hantavirus. *J. Virol.*, 1997, vol. 71, no. 2, pp. 1147–1154.
21. Muyangwa M., Garanina E.E., Martynova E.V., Rizvanov A.A. Lentivirus expression of hantavirus nucleocapsid proteins. *BioNanoScience*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 403–406. doi: 10.1007/s12668-016-0250-9.
22. Rizvanov A.A. Viral and non-viral methods of administration of recombinant nucleic acids into the organism. *Doct. Biol. Sci. Diss. Kazan*, 2010. 283 p. (In Russian)
23. Townsley A.C., Weisberg A.S., Wagenaar T.R., Moss B. Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 18, pp. 8899–8908. doi: 10.1128/JVI.01053-06.
24. Manna D., Aligo J., Xu C., Park W.S., Koc H., Heo W.D., Konan K.V. Endocytic Rab proteins are required for hepatitis C virus replication complex formation. *Virology*, 2010, vol. 398, no. 1, pp. 21–37. doi: 10.1016/j.virol.2009.11.034.
25. Engel S., Heger T., Mancini R., Herzog F., Kartenbeck J., Hayer A., Helenius A. Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 9, pp. 4198–4211. doi: 10.1128/JVI.02179-10.
26. Lozach P.Y., Mancini R., Bitto D., Meier R., Oestereich L., Overby A.K., Pettersson R.F., Helenius A. Entry of bunyaviruses into mammalian cells. *Cell Host Microbe*, 2010, vol. 7, no. 6, pp. 488–499. doi: 10.1016/j.chom.2010.05.007.
27. Rowe R.K., Suszko J.W., Pekosz A. Roles for the recycling endosome, Rab8, and Rab11 in hantavirus release from epithelial cells. *Virology*, 2008, vol. 382, no. 2, pp. 239–249. doi: 10.1016/j.virol.2008.09.021.

28. Sharma D.K., Choudhury A., Singh R.D., Wheatley C.L., Marks D.L., Pagano R.E. Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 9, pp. 7564–7572. doi: 10.1074/jbc.M210457200.
29. Choudhury A., Dominguez M., Puri V., Sharma D.K., Narita K., Wheatley C.L., Marks D.L., Pagano R.E. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J. Clin. Invest.*, 2002, vol. 109, no. 12, pp. 1541–1550. doi: 10.1172/JCI15420.
30. Ren M., Xu G., Zeng J., De Lemos-Chiarandini C., Adesnik M., Sabatini D.D. Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, vol. 95, no. 11, pp. 6187–6192.
31. Schlierf B., Fey G.H., Hauber J., Hocke G.M., Rosorius O. Rab11b is essential for recycling of transferrin to the plasma membrane. *Exp. Cell Res.*, 2000, vol. 259, no. 1, pp. 257–265. doi: 10.1006/excr.2000.4947.
32. Apodaca G., Katz L.A., Mostov K.E. Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes. *J. Cell Biol.*, 1994, vol. 125, no. 1, pp. 67–86. doi: 10.1083/jcb.125.1.67.
33. Jones J.C., Turpin E.A., Bultmann H., Brandt C.R., Schultz-Cherry S. Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 24, pp. 11960–11967. doi: 10.1128/JVI.01678-06.

**Для цитирования:** Муйангва М., Гаранина Е.Е. Нарушение эндосомального транспорта приводит к снижению синтеза нуклеокапсидного белка хантавируса. *Проспект Хилл in vitro* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2017. – Т. 159, кн. 1. – С. 58–71.

**For citation:** Muyangwa M., Garanina E.E. Inhibition of endosomal transport results in decreased synthesis of nucleocapsid protein of PHV virus. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2017, vol. 159, no. 1, pp. 58–71. (In Russian)