

КАК ВИРУС ПРОНИКАЕТ В КЛЕТКУ

Ю.А. Чизмаджев

Юрий Александрович Чизмаджев, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор кафедры биофизики МГУ, заведующий лабораторией биоэлектрохимии Института электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН. Руководитель проектов 00-15-97849, 02-04-48287.

Первую публикацию см.: Природа. 2003. №4. С.69—74.

Как известно, клетка содержит огромное количество мембранных образований от изолированных везикул до непрерывной сети эндоплазматического ретикулума. И вся эта система находится в состоянии постоянной перестройки, которая включает множественные акты слияния и деления. Так, в аппарате Гольджи белок упаковывается в контейнеры-везикулы, которые сливаются с плазматической мембраной. Это завершает процесс экзоцитоза. Другой пример — слияние синаптической мембраны и секреторных пузырьков с нейромедиаторами, в результате чего и происходит передача нервного импульса, одного из основных переносчиков информации.

Доставка крупных частиц внутрь клетки осуществляется посредством эндоцитоза. Клетка заглатывает частицы из внешней среды, которые обволакиваются участком плазматической мембраны, образуется впятина, перемычка разрушается, и контейнер оказывается внутри клетки. Его разборка — это уже другая история, а нам остается подчеркнуть, что и эндоцитоз, и экзоцитоз опосредованы множеством белков, чья природа и механизм действия не вполне установлены.

Кроме «полезного» слияния клетка сплошь и рядом переживает случаи слияния «вредного». Например, когда ее атакует вирус, которому достаточно сказать: «Сезам, откройся!», и липидная оболочка вируса сливается с плазматической мембраной. При этом формируется так называемая пора слияния, и вирусная ДНК или РНК начинают хозяйничать внутри клетки. Справедливости ради надо отметить, что уникальную способность вирусов «вскрывать сейфы» уже используют во благо организму. В генной терапии подбирают безвредные вирусы-взломщики, к которым пришивают полезный ген, способный помочь больной клетке.

Разобраться в физическом механизме слияния биологических объектов чрезвычайно трудно. Как всегда, в подобных случаях на помощь приходят модельные системы. Обращаясь в недавнее прошлое, следует подчеркнуть, что в середине 80-х были достигнуты впечатляющие успехи в изучении механизма слияния липидных бислоев [1]. Однако к середине 90-х выяснилось: интермедиаты этого процесса, принятые в теоретических моделях, имеют настолько высокую энергию, что его расчетная скорость, вопреки экспериментальным данным, ничтожно мала. Кроме того, хотя было доказано, что специальные белки играют ключевую роль в ходе слияния, оставалось неясным, что же они делают. Решению этих задач были посвящены экспериментальные и теоретические работы нашей лаборатории, которые проводились во второй половине 90-х.

Путь вируса в клетку

Мир вирусов весьма разнообразен. Общее для них то, что любой наследственный материал (в форме ДНК или РНК) бережно упакован в защитный скафандр из белков. Вирусные частицы (вирионы) отличаются по форме и размерам. Так, диаметр сферических вирионов — от 20 до 300 нм. Некоторые вирусы имеют дополнительную липидную оболочку, в которую включены специализированные белки, способствующие слиянию мембран. Такие вирусы называются оболочечными. Требования к липидно-белковой оболочке двойственны. С одной

стороны, она должна уберечь наследственный материал от превратностей судьбы, а с другой — легко разрушаться, когда вирус начинает активную жизнь внутри клетки-жертвы.

Оболочечные вирусы проникают в клетку двумя путями (рис.1). В первом случае вирус связывается с рецепторами клеточной поверхности, затем в результате эндоцитоза, везикулы, содержащие вирион, отпочковываются. В таком состоянии вирус упакован в дополнительную оболочку, образованную клеточной мембраной. От второй оболочки он освобождается при слиянии везикулы с эндосомой, в которой кислая среда активирует белки слияния и тем самым способствует объединению мембраны вириона с эндосомальной. В результате наследственный материал попадает в цитоплазму и может добраться до ядра. На первых стадиях этого процесса, включая проникновение в эндосому, вирус играет пассивную роль. Здесь используется обычный механизм эндоцитоза, причем доверчивая клетка даже не знает, какую опасность таит в себе этот «подарок судьбы». И только оказавшись в эндосоме, вирус активируется и берет всю игру на себя, вызывая слияние своей оболочки с эндосомальной мембраной. Именно так действует всем известный вирус гриппа.

Другие вирусы, например вирус иммунодефицита человека (HIV), не нуждаются для активации в низких рН и проникают в клетку более простым путем, в ходе которого их оболочки сразу сливаются с плазматической мембраной, и наследственный материал оказывается в клетке. Теперь ему остается только добраться до ядра.

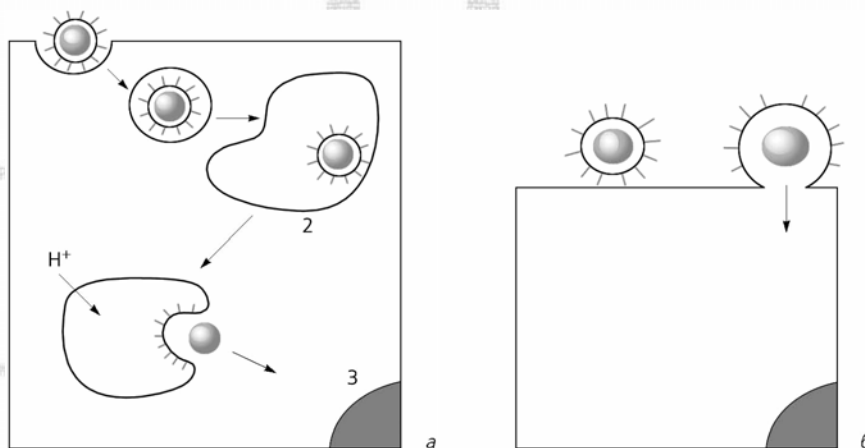


Рис.1. Два пути проникновения оболочечного вируса в клетку: а — эндоцитоз и слияние в эндосоме: 1 — вирус, 2 — эндосома, 3 — ядро; б — слияние с плазматической мембраной.

Таким образом, в любом случае ключевое событие в битве оболочечного вируса с клеткой — слияние его липидной оболочки с плазматической или лизосомальной мембраной. Именно этой важнейшей стадии инфицирования клетки и посвящен наш рассказ. Конкретно речь пойдет о вирусе гриппа А. Благодаря особенностям своего строения он оказался наиболее удобным объектом для экспериментального изучения механизма слияния.

Вирус гриппа

Этот оболочечный вирус имеет примерно сферическую форму с диаметром около 0,13 мкм (рис.2). В его центральной части находятся молекулы РНК и ряд белков, необходимых вирусу на первых стадиях жизни в клетке. Сердцевина вириона окружена оболочкой из белка М1, следом за ней располагается липидная мембрана. Белковая оболочка, утопленная в липидной мембране, напоминает рыболовную сеть, которая крепится на сваях. Размер ячеек в белковой сети примерно $4,4 \text{ нм}^2$, так что такая крупная «рыба», как комплекс РНК-белок, пройти сквозь них не может. Липидная оболочка формируется из плазматической мембраны инфицированной клетки при отпочковывании синтезируемого вируса. В этой мембране закорены три белка: нейраминидаза (Н), ионный канал М2 и гемагглютинин (ГА). При закислении среды благодаря ионному каналу внутри вириона понижается рН, что приводит к разру-

шению белковой оболочки М1. Одновременно активируется гемагглютинин, главная составляющая «машины слияния». В ходе ее работы мембраны вируса и клетки смыкаются, и в цитоплазму открывается путь для чужеродного генетического материала.

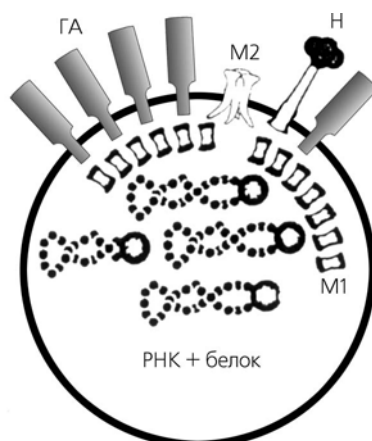


Рис. 2. Схема вириона гриппа: ГА – гемагглютинин, М2 – ионный канал, Н – нейраминидаза, М1 – белковая оболочка

Структура гемагглютинина

На поверхности вирусной оболочки гемагглютинин присутствует в виде тримеров (рис.3). Каждая его молекула состоит из двух субъединиц: ГА1, обеспечивающей первичный контакт с клеткой-мишенью, и ГА2, отвечающей за слияние. В исходном, нейтральном, состоянии (при рН7) все тримеры ориентированы примерно перпендикулярно к поверхности мембраны, их протяженность ~ 13 нм. Каждая молекула гемагглютинина прочно закорена в своей мембране и, что очень важно, имеет в своем составе короткий (25 аминокислот) пептид, который при рН7 спрятан внутри тримера и локализован недалеко от основания белка. После уменьшения рН с 7 до 5 молекулы гемагглютинина глобально перестраиваются, и пептид слияния не просто выходит на свободу, а перемещается в самый верхний конец молекулы и проникает в мембрану жертвы.

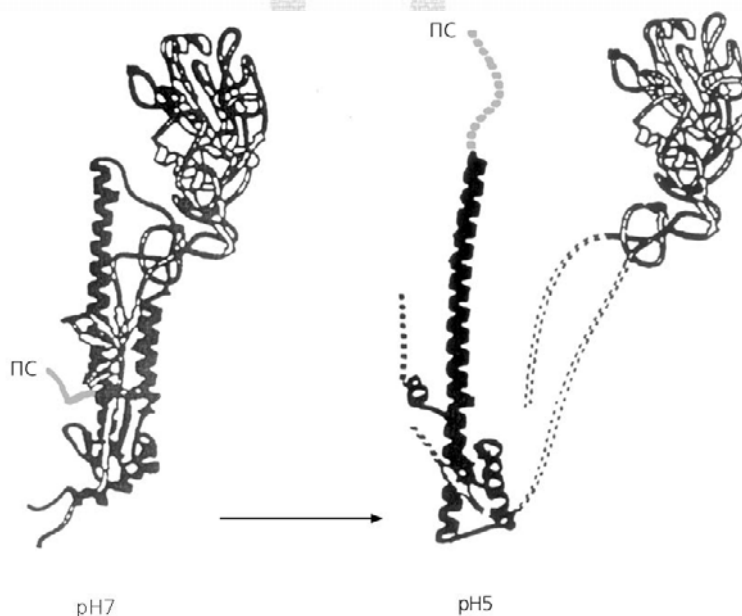


Рис.3. Структура гемагглютинина в исходном (рН7) и в активном (рН5) состояниях. ПС — пептид слияния, который в кислой среде меняет свою конформацию.

В нейтральной среде молекула гемагглютинина напоминает пружину, зажатую защелкой, роль которой играет пептид слияния, спрятанный в «гидрофобный карман» тримера. Но стоит снизить рН до 5, как пептид выходит из заточения и молекула ГА может перейти в новое конформационное состояние. Выделяющаяся при этом энергия, судя по измерениям, довольно велика, но еще не достаточна для сближения мембран клетки и вируса. Чтобы решить эту задачу, молекулы гемагглютинина действуют не поодиночке, а коллективно. Как показали эксперименты, в ходе взаимодействия вируса с клеткой-мишенью образуются розетки из шести-восьми тримеров, внутри каждой из которых находятся изогнутые липидные участки с радиусом ~10 нм (рис.4).

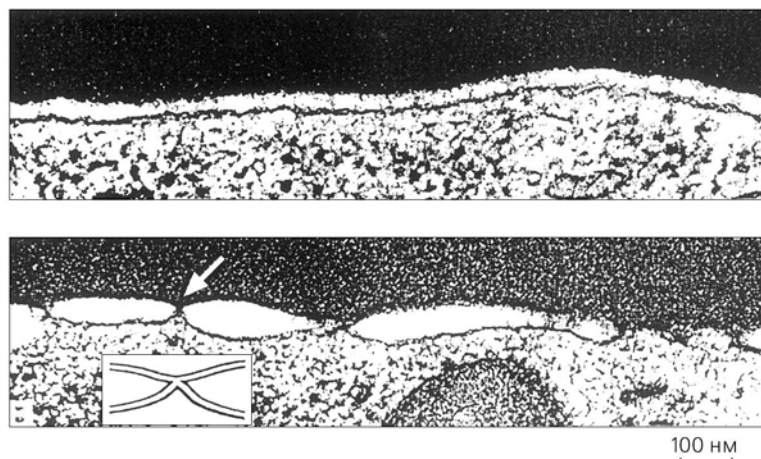


Рис.4. Образование димплов между мембранами эритроцитов и клеток, экспрессирующих гемагглютинин. а — граница мембран эритроцита и клетки, экспрессирующей ГА, рН7,4; б — то же, но рН4,9, видно большое количество контактных областей (стрелка). На врезке показана схема контакта.

С помощью электронно-микроскопических и электрофизиологических исследований удалось обнаружить такие локальные вспучивания, получившие название димплов [2].

Именно здесь, на вершухах димплов, начинается перестройка липидов, приводящая к образованию поры слияния. Теоретическая модель этого процесса [3] состоит в следующем: белки слияния, изгибая мембраны, не только сближают их, но и обеспечивают энергией, облегчая образование монослойной перемычки — сталка; липиды из удаленных монослоев деформируются без больших энергетических затрат. В результате образуются новые промежуточные структуры — низкоэнергетические интермедиаты, обеспечивающие слияние.

Экспериментальные модели

Под слиянием клеток, вирусов или клеточных органелл понимается объединение ограниченных мембранами водных объемов и самих мембран. Для наблюдения за этим процессом используют растворимые в липиде флуоресцентные метки. Если такая метка изначально содержится в клетках А, то появление ее в клетках В говорит о слиянии. Правда, бывают случаи, когда происходит так называемое полуслияние, т.е. объединяются только внешние монослои клеток, сближенные в области локального контакта. Чтобы различить случаи полу- и полного слияния, в клетки А вводят водорастворимый краситель. Его перетекание из одних клеток в другие свидетельствует о полном слиянии с образованием поры, через которую осуществляется связь. Так в эксперименте изучают массовое слияние, например в суспензии вирусов и клеток. Однако возможности этой методики ограничены, с ее помощью трудно разобраться в деталях процесса, включая образование локального контакта, появление поры и ее развитие. Подобные задачи можно решать только с использованием более точного метода, позволяющего следить за одиночными объектами, т.е. с помощью методов флуоресцентной

микроскопии и современной электрофизиологии. Впервые это было сделано при изучении экзоцитоза в тучных клетках с использованием микроэлектронной техники.

Однако вирусные частицы настолько малы, что непосредственно применить к ним микроэлектронную технику нельзя. И тут на помощь пришла генная инженерия. На основе фибробластов получены клетки (названные HAb2), которые содержат на своей плазматической мембране молекулы гемагглютинаина. Они оказались прекрасной моделью вирусной частицы с диаметром порядка 10 мкм, на которой можно проводить электрические измерения.

В типичном опыте по слиянию клетки HAb2 и эритроцита при закислении окружающего раствора до pH5 образуется пора. Через нее протекает емкостной ток, который заряжает эритроцит. Его изменение во времени отражает расширение поры слияния. Одновременно из мембраны эритроцита в мембрану HAb2 перетекает краситель (рис.5). Сопоставляя две кривые (проводимости и интенсивности флуоресценции) в зависимости от времени, замечаем, что вторая значительно отстает от первой (рис.6). Предполагается, что эта временная задержка вызвана белковой розеткой из тримеров гемагглютинаина, которая образует своеобразный заслон потоку липидного зонда. Первичная пора слияния образуется в области липидных димплов. Следовательно, изменяя липидный состав мембран, можно воздействовать на весь процесс. При сближении липидных бислоев может образоваться перемычка между близлежащими монослоями (так называемый сталк), зародыш будущей поры. Вероятность его образования существенно зависит от липидного состава. Например, введение в монослой лизофосфатидилхоли на (LPC), даже в небольших концентрациях, полностью ингибирует слияние. Эксперименты в системе HAb2-эритроцит показали, что лизофосфатидилхолин здесь столь же эффективен, как и в модельных липидных системах. Иными словами, пора слияния после введения LPC не возникает вообще, хотя, судя по появлению флуоресценции, монослои объединяются.

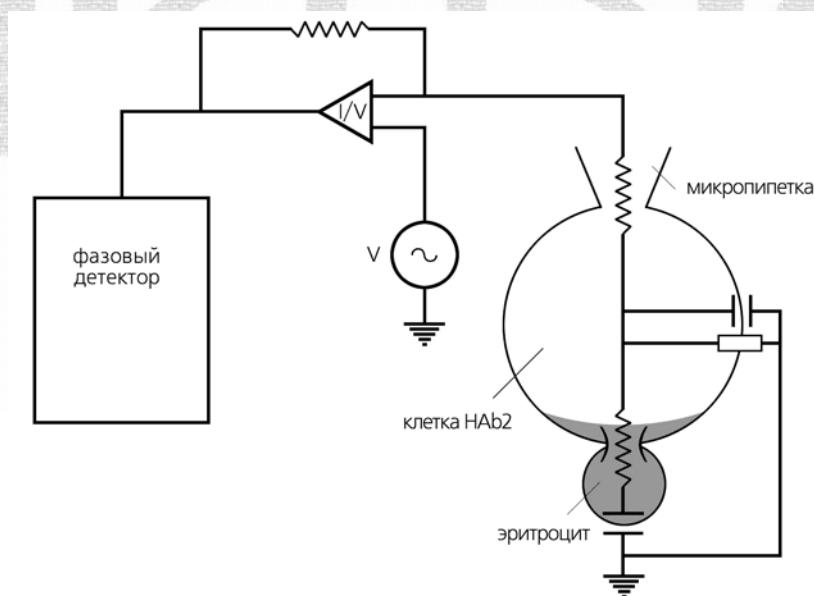


Рис.5. Схема эксперимента по слиянию клетки HAb2 с эритроцитом, мембрана которого окрашена флуоресцирующим липидным зондом. В ходе развития поры слияния краска распространяется по мембране HAb2. Электрический сигнал измеряется с помощью электродов и усилителя тока, а перетекание зонда — с использованием флуоресцентного видеомикроскопа.

Итак, молекулы гемагглютинаина готовят поле для липидных игр. Но этим дело не ограничивается, белок участвует и в последующих стадиях. В специальных опытах, когда понижается активность белка (например, уменьшается степень закисления раствора), вместо полного слияния и образования поры происходит полуслияние, т.е. липидный зонд перераспределяется между клетками, а тока нет. Это значит, что уже после формирования контактов и образования перемычки белок совершает определенную работу, необходимую для возникнове-

ния поры. Такие важные результаты получены в группе Л.В. Черномордика в Национальном институте здоровья (США), а электрофизиологические измерения выполнены сотрудником нашей лаборатории В.А. Фроловым [4]. Результаты опытов в сочетании с теоретическими моделями позволили предложить определенную схему процесса слияния, включающую четыре стадии (рис.7).

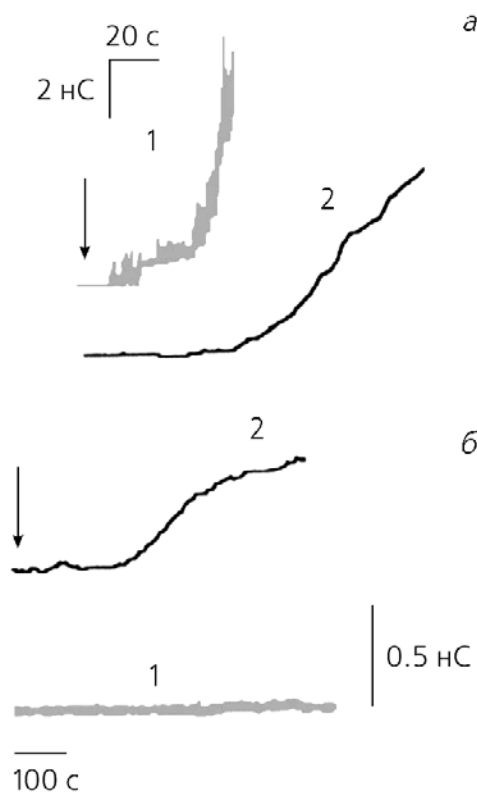


Рис. 6. Кривые проводимости поры (1) и интенсивности флуоресценции (2). а – контроль, б – та же система, но с добавкой лизофосфатидилхолина. По оси абсцисс – время, по оси ординат – проводимость

Однако любая модель всегда отличается от реального объекта. Мембрана клетки HAb2 имеет другой липидный состав, нежели мембрана вириона, различна и плотность гемагглютинаина, а клетка HAb2 не содержит белков M1 и M2. Разработанная в нашей лаборатории методика позволяет изучать слияние одиночного вириона с бислоевой липидной мембраной [5]. В нейтральную среду (буферный раствор с рН7) впрыскиваются вирионы, часть которых адсорбируется на бислое. После этого к плоской мембране прижимается микропипетка, заполненная раствором с рН5. Поскольку кончик пипетки имеет радиус 1 мкм, весьма вероятно, что внутри него, на липидном пятнышке, окажется один или несколько вирионов, в мембрану которых включен флуоресцентный зонд в концентрации самогашения. Низкое рН внутри пипетки инициирует слияние, и зонд диффундирует в бислое. Возникающее при этом разбавление приводит к флуоресценции, которую можно регистрировать (рис.8).

Электрические измерения показали, что наряду с латеральным потоком зонда возникает флуктуирующий электрический ток, который течет через пору слияния и какие-то проводящие структуры в мембране вируса. Специальными опытами доказано, что дело обстоит именно таким образом [6]. В этих экспериментах ионные каналы M2 блокировались амантадином, а закисление внутри вириона достигалось уменьшением рН (до 5) в нижнем отсеке ячейки. Очевидно, что при такой постановке опыта сразу после слияния протоны из нижнего отсека должны устремиться внутрь вириона через открывающуюся пору, что разрушит белковую оболочку из M1 даже при заблокированных каналах M2. Действительно, в этих условиях возникает электрическая активность, точно такая же, как при открытых M2 каналах. Значит, таким способом можно следить не только за эволюцией поры слияния в липидной мембране, но

и за разрушением белкового каркаса. Это чрезвычайно существенно, так как выход генетического материала вируса в цитоплазму лимитируется обеими защитными оболочками — белковой и липидной.

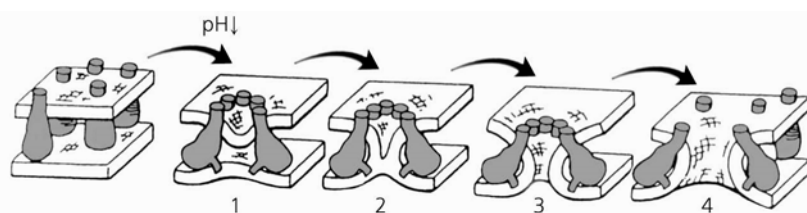


Рис.7. Схема процесса слияния. После понижения pH образуется розетка слияния (1), которая способствует образованию локального мембранного контакта (2) и перемычки, которая затем превращается в пору слияния (3, 4).

Итак, сочетая методы электронной микроскопии и электрофизиологии, удалось обнаружить локальные мембранные контакты (димплы). Введение лизолипида ингибирует биологическое слияние, что доказывает: первым интермедиатом процесса, как и в модельных системах, служит перемычка (сталк). Разработанная методика изучения слияния одиночных вирионов с липидными бислоями позволяет исследовать кинетику этого процесса, а модель слияния, использующая принципиально новые интермедиаты, решает проблему «энергетического кризиса».

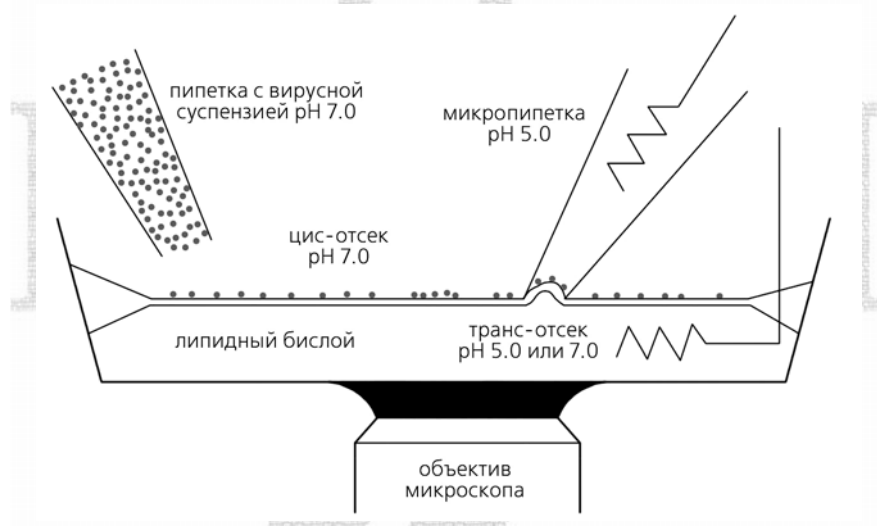


Рис.8. Схема экспериментальной установки. Подробности в тексте.

Выяснение роли липида и белка в таком процессе имеет не только познавательный интерес. В перспективе это важно для разработки новых методов антивирусной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черномордик Л.В., Меликян Г.Б., Чизмаджев Ю.А. // Биол. мембраны. 1987. Т.4. С.117—164.
2. Frolov V.A., Cho M.S., Bronk P. et al. // Traffic. 2000. №1. P.6.
3. Kuzmin P.I., Zimmerberg J., Chizmadzhev Yu.A. et al. // PNAS. 2001. V.98. P.7235—7240.
4. Chernomordik L.V., Frolov V.A., Leikina E. et al. // The Journal of Cell Biology. 1998. V.140. P.1369—1382.
5. Максаев Г.И., Самсонов А.В., Липатов А.С. и др. // Биол. мембраны. 2000. Т.17. С.312—323.
6. Максаев Г.И., Михалев И.И., Фролов В.А. // Биол. мембраны. 2001. Т.18. С.489—495.