

## **ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО КУРИНОГО ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА PKR В КЛЕТКАХ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ.**

Зобнина А.Е., Румянцев А.М., Падкина М.В., Цыганков М.А.

Санкт-Петербургский государственный университет

*Уникальный код статьи: 5318535d51383*

При изучении влияния интерферона на резистентность клеток к вирусной инфекции основное внимание уделяется исследованию клеточных белков, определяющих индукцию и развитие в клетках противовирусного ответа. Благодаря этому в настоящее время достигнуты значительные успехи в понимании молекулярных механизмов действия интерферона на клетки, являющиеся мишенями для вирусной репликации.

Одним из наиболее известных индуцируемых интерферон-ом белков является дцРНК-зависимая протеинкиназа (PKR), которая участвует в обеспечении противовирусного действия ИФН, служит посредником при активации транскрипции гена ИФН-бета и некоторых индуцируемых ИФН генов, а также является одним из факторов ИФН-зависимого ингибирования клеточной пролиферации. В отношении PKR показано, что ее индукция может зависеть как от типа интерферона, так и от типа клеток. В мышечных клетках как естественный, так и рекомбинантный интерфероны альфа-, бета- и гамма-индуцируют протеинкиназу и фосфорилирование белков P1/eIF-2, в то время как в эпителиальных клетках человека только ИФН-альфа и -бета эффективны в отношении индукции PKR. Рекомбинантный ИФН-гамма очень слабо индуцирует синтез протеинкиназы в этих клетках. Интересно также, что ни один из интерферонов не индуцирует протеинкиназу в фибробластах человека.

Действие протеинкиназы специфично к типу клеток. В обработанных интерфероном клетках обезьяны и мышцы активированная протеинкиназа играет ведущую роль в ингибировании экспрессии реовирусных, тогда как клетки человека были мало чувствительными к интерферону, поскольку индукция протеинкиназы и уровень фосфорилирования белка P1 и фактора eIF-2 не обеспечивают достаточных условий для поддержания противовирусного состояния в этих клетках при реовирусной инфекции.

Напротив, те же клетки чувствительны к интерферону при

заражении вирусом везикулярного стоматита. В предыдущих экспериментах нами были получены 3 варианта модификаций гена куриного интерферона-гамма (ИФН- $\gamma$ ), кодирующие соответствующие белки, лишённые на С-конце потенциальных сайтов расщепления протеазами.

Созданы штаммы дрожжей *Pichia pastoris* – продуценты укороченных форм куриного ИФН- $\gamma$ . Показано, что рекомбинантные белки с привнесёнными модификациями обладают повышенной стабильностью по сравнению с немодифицированным рекомбинантным куриным ИФН- $\gamma$ , секретируемым дрожжами-продуцентами, который подвергается существенной протеолитической деградации. Для подтверждения наличия биологической активности полученных нативного и модифицированных куриных ИФН- $\gamma$  использовали первичную культуру куриных эмбриональных фибробластов (КЭФ), любезно предоставленную сотрудниками Всероссийского Научно-Исследовательского Ветеринарного Института Птицеводства (г.Ломоносов).

Исходя из данных о том, что экспрессия структурного гена протеинкиназы (PKR) в значительной степени индуцируется ИФН I и II типов, биологическую активность куриных интерферонов определяли по изменению уровня экспрессии гена PKR относительно контрольного гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) в клетках КЭФ. Для этого суммарную РНК выделяли из равного количества клеток, после чего синтезировали кДНК методом обратной транскрипции и использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР в режиме реального времени. В качестве контроля использовали клетки, культивированные на среде ДМЕМ без добавок, а также клетки, в культуральную среду которых были добавлены экстракционные белки исходного штамма дрожжей *P.pastoris*, выращенного в тех же условиях, что и штаммы-продуценты ИФН.

Результаты ПЦР показали, что уровень экспрессии гена PKR относительно контрольного гена GAPDH в клетках КЭФ после культивирования с добавлением модифицированных куриных ИФН- $\gamma$  возрастает примерно в 2 раза по сравнению с контрольным образцом, содержащим белки культуральной среды исходного штамма, и примерно на порядок превышает уровень экспрессии гена в клетках, культивированных на среде без добавок. Это свидетельствует о том, что рекомбинантный белок, продуцируемый полученными штаммами, обладает биологической активностью, на которую не оказывают влияние привнесённые модификации.

Наличие экспрессии гена PKR в клетках, в среду которых были

добавлены белки культуральной среды исходного штамма дрожжей, может объясняться тем, что представленные на поверхности куриных фибробластов TLR-рецепторы способны воспринимать дрожжевые белки как антигенные детерминанты и, связывая их, запускать экспрессию PKR.