

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

## РЕФЕРАТ

по дисциплине: «...»

на тему: Клеточные линии, используемые для изучения арбовирусов.

Выполнил:  
студент .. курса .. группы  
направления подготовки 06.03.01  
«Биология»,  
профиль Биохимия  
Иванов Иван Иванович

Проверил:  
к.б.н.,  
доцент кафедры молекулярной  
биологии и генетики  
ФИО преподавателя.....

Волгоград 2021 г.

## Оглавление

Введение.....	3
1. Культивирование и диагностика арбовирусов.....	4
2. Взаимодействие вирус-вектор.....	6
3. Исследование различных звеньев патогенеза арбовирусных инфекций с использованием клеточных культур.....	9
Заключение.....	11
Список литературы.....	12

## Введение

Арбовирусы – таксономически разнородная экологическая группа вирусов, передающихся восприимчивым позвоночным через укусы кровососущими членистоногими. На сегодняшний день описано более 500 видов вирусов, 50 из которых считаются патогенными для человека [10]. Список арбовирусных инфекций, имеющих медицинскую значимость, пополняется. Это обусловлено несколькими причинами: пластичностью генома [15], результатом чего является приобретение или усиление вирулентных свойств штаммов, изменением климатических условий, появлением хозяев и переносчиков, формирующих энзоотический цикл [26].

Риск возникновения эпидемий актуализирует вопросы изучения арбовирусных инфекций, а тем более процессов, происходящих на молекулярном уровне при взаимодействии вируса с клетками вектора и хозяина. Для детализации механизмов патогенеза, патофизиологии, а также для анализа фенотипических и пролиферативных свойств арбовирусов активно используют *in vitro* модели с применением различных клеточных систем.

## 1. Культивирование и диагностика арбовирусов

Для характеристики циркулирующих на определённой территории арбовирусов применяют методы выделения, накопления, индикации и идентификации вирусов преимущественно в культурах клеток, так как модели *in vitro* имеют относительно низкую стоимость и просты в применении. Чувствительность клеточных линий различна даже в пределах одного вида вируса, ввиду чего ведётся поиск и определение наиболее восприимчивых для арбовирусов клеточных культур.

Sudeep A. B. с соавторами, анализируя три штамма вируса чикунгунья на линиях Vero E6, ВНК-21, RD, А-549 и С6/36, отметили высокую накапливаемость вируса ( $\sim 8 \log$  ТЦД 50/мл) в линиях Vero E6, С6/36 и ВНК-21, причём, в культуре клеток С6/36 поддерживался большой титр вирусных частиц на протяжении всего периода исследования (6 дней) [31]. В аналогичной работе авторы, изучая другие штаммы вируса чикунгунья, проводили исследование на клеточных линиях СНМЕ-5, НЕК293Т/17, НерG2, MRC-5, Hela, SW-982, U937, Vero и С6/36 с оценкой индукции в них апоптоза. К 5 суткам эксперимента в трёх клеточных линиях (НерG2, Vero и MRC-5) были установлены как высокие титры вируса, так и выраженные признаки апоптотических изменений. В линиях СНМЕ-5, НЕК293Т/17 уровень инфицированности и индуцированного апоптоза был ниже, по сравнению с клетками С6/36 [33].

Himmelsbach K. et al. установили, что максимальная репликация вируса Зика наблюдается в клетках Vero, Huh7.5, COS7, 293Т и А549. Сравнительно меньшее количество вирусных частиц регистрировалось в клеточных линиях N29.1 и SH-SY5Y. Выраженное цитопатическое действие (ЦПД) обнаруживалось в клетках А549 и Vero, тогда как COS7, 293Т и Huh7.5. оказались устойчивыми к воздействию вируса [18]. В работе J.F. Chan с соавторами максимальная вирусная нагрузка отмечалась в линиях Vero, LLC-MK2, PK-15, CRFK, RK-13, ВНК21, DF-1 и С6/36. ЦПД был замечен в клетках JEG-3, SF268, RD, ARPE19, Нер-2, HFL, Сасо-2 и Huh-7, причём более 50% поражённой клеточной популяции отмечалось в культуре клеток: JEG-3, SF268, RD, Сасо-2 и в Huh-7 [7]. Результаты, полученные авторами, наглядно подтверждают отличия восприимчивости клеточных линий для разных штаммов арбовирусов.

Несмотря на большое многообразие клеточных культур, некоторые учёные отдают предпочтение таким клеточным линиям, как С6/36 и Vero из-за чувствительности ко многим арбовирусам.

C6/36 – генетически однородная клональная культура клеток, полученная из тканей личинки *Aedes albopictus*. Культивировать данную клеточную линию в лаборатории просто, так как рост возможен при комнатной температуре без поддержания определённой концентрации CO<sub>2</sub>, с осуществлением пересева раз в две недели. C6/36 отличается высоким коэффициентом деления 1:10 – за четыре дня формируется сливающийся монослой клеток [16]. Имеются данные, что клетки C6/36 обладают дисфункциональным противовирусным РНК-интерференционным ответом [31], что определяет высокую репликацию вируса внутри клетки без запуска механизмов апоптоза. Это свойство обуславливает успешное применение этой клеточной линии для выделения и накопления, а также для идентификации на основе иммунологических методов вирусов Западного Нила, денге, чикунгунья, Зика и других арбовирусов [21, 23, 27, 31, 33].

Клеточная линия Vero создана из клеток почки самки африканской зеленой обезьяны вида *Chlorocebus sabaeus* в 1962 году. Впоследствии было выведено несколько субклеточных линий, таких как Vero 81, Vero 76 или Vero E6. Данная модель *in vitro* является клеточной культурой, которая характеризуется способностью роста в бессывороточных условиях. Широкая восприимчивость к различным вирусным инфекциям объясняется дефицитом экспрессии интерферона. Клетки Vero применяются для выделения, титрования вирусных частиц методом бляшек, индикации и идентификации многих арбовирусов, в том числе для вирусов Зика, Западного Нила, денге, жёлтой лихорадки [6, 12, 20, 35]. Клеточная линия Vero была первой перевиваемой линией, одобренной ВОЗ для производства вирусных вакцин. Реализуемые на сегодняшний день вакцины от вируса Японского энцефалита и потенциальные вакцины от вирусов чикунгунья, денге, лихорадки реки Росс, Хантаан, Западного Нила и жёлтой лихорадки были получены с помощью данной линии [20].

Помимо Vero, рассматриваются и другие клеточные линии, например, CCLs, HEK-293, PER.C6, AGE1.CR, EB66. Однако многолетний опыт работы с клеточной линией Vero делают ее субстратом выбора для многих производителей вакцин [13].

## 2. Взаимодействие вирус-вектор

Процессы, происходящие на уровне взаимодействия вирус-вектор, оказывают значимое влияние на эпидемический потенциал и вирулентные свойства вируса. Для их изучения адекватной моделью являются клеточные линии, выделенные из основных видов переносчиков арбовирусных инфекций [9,19].

Генетика переносчиков может влиять на восприимчивость к арбовирусам и их уровень репликации. Требовалось выявить пути и специфические гены, которые действуют как детерминанты инфекционного процесса. Ранние поиски факторов, определяющих векторные свойства членистоногих, были сосредоточены на механизмах противовирусной реакции, действующих как иммунные компоненты у комаров и клещей. Одним из наиболее охарактеризованных процессов является РНК-интерференция. Реакция инициируется при обнаружении вирусного генома на стадии двуцепочечной РНК в цитоплазме инфицированных клеток, распознается и расщепляется белком Dicer-2 на короткие интерферирующие РНК(siRNA), которые в свою очередь совместно с белковым РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) осуществляют расщепление вирусной РНК. При дисфункции пути РНК-интерференции титры арбовируса увеличиваются, что приводит к значительно более высоким темпам инфицирования клеток вектора, что может привести к гибели переносчика. Процесс РНК-интерференции поддерживает концентрацию вируса на уровне ниже фатального для переносчика порога, но достаточном для инфицирования позвоночного хозяина [11, 29, 32].

В работе Blair CD приведены данные о том, что глубокое ингибирование репликации альфавирусов и флавивирусов в культивируемых клетках *A. albopictus*(U4. 4, C6/36), *A. aegypti*(Aeg2) и *A. gambiae* может быть вызвано транзиторной экспрессией или введением в цитоплазму длинной двуцепочечной РНК (dsRNA), полученной из последовательности генома вируса. Тогда как нокдаун Dicer-2 приводил к более чем четырехкратному увеличению количества мРНК вирусного генома и более чем десятикратному увеличению вирусной нагрузки на 14-й день после заражения. Причём трансформация культивируемых клеток комаров или личинок *A. aegypti* с ДНК-конструкцией, способной экспрессировать длинный транскрипт dsRNA, родственной геному вируса денге, приводит к появлению клеток или организмов с наследуемой устойчивостью к данному вирусу[4]. Однако пока добиться получения резистентной линии комаров не удалось. Одной из причин этого является выработка у инфекционного агента стратегий

уклонения от противовирусного ответа [11]. В исследовании Moon SL и соавторов приводится пример обнаружения супрессии РНК-интерференции, опосредованной субгеномными РНК вируса Западного Нила и денге-1в клеточной культуре U4.4 [25].

В качестве основы для создания невосприимчивых к арбовирусам векторов рассматривают и иные процессы, способные контролировать репликацию вируса. Например, Carabajal Paladino L et al. установил, что при ко-трансфекции клеточных линий, полученных от *Ae. aegypti* – Aag2, AF05 и AF319, и *Ae. albopictus* – C6/36, плазмидой несущей в себе ген, кодирующий NS2- белок вируса чикунгунья, и люциферазы светлячка с последующей доставкой в клетки Cas13b - фермента, ответственного за разрушение вирусной РНК, репликация вируса и уровень экспрессии NS2 значительно снижались [32].

Агентами, влияющими на репликацию возбудителей арбовирусных инфекций, являются специфичные для насекомых флавивирусы (insect specific flavivirus, ISF). Первым описанным ISF был вирус слияния клеток (CFAV) – Flavivirus, Flaviviridae, выделенный с помощью клеточной линии от *A. aegypti* [30]. Своё название вирус получил из-за характерного ЦПД, который наблюдался в инфицированных культурах клеток. CFAV был обнаружен и выделен главным образом из комаров рода *Aedes* в регионах, эндемичных по лихорадке денге[3].

Baidaliuk A. с соавторами инфицировали вирусами денге-2 и Зика клеточные линии комаров *A. albopictus* (Aa20 и Aa23), которые предварительно заразили CFAV, и выявили снижение накопления данных арбовирусов в культуре [3].

Схожее влияние оказывает вирус Палм-Крик на репликацию вирусов Западного Нила и долины Мюррей при заражении клеточной линии C6/36[17]. Вирус Nhumigim значительно снижает титры вирусов Западного Нила, денге-2, Зика в клетках C6/36 [14, 28].

В случае коинфекции вектора или хозяина двумя или более родственными вирусами возможно явление реассортации, подразумевающее под собой обмен генетическим материалом, и как следствие возникновение гибридных вирусов. Данный процесс определяет изменчивость возбудителей арбовирусных инфекций, наряду с накоплением в геноме индивидуальных мутаций [5]. Coupreau D с соавторами смоделировали процесс получения реассортантов представителей порядка Bunyavirales вируса Шамонды и вируса Сатупери в клеточных линиях комаров (КС) и млекопитающих (ВНК-21). Более высокая частота реассортации наблюдалась в клетках млекопитающих, однако все получившиеся комбинации реассортации были

идентифицированы как в линии ВНК-21, так и в КС. Анализ конкуренции выявил более сильный отбор реосортантов у млекопитающих, чем у насекомых. Действительно, после 10 пассажей в клетках млекопитающих был обнаружен только один тип вируса, а в клетках насекомых – пять комбинаций [8].

### **3. Исследование различных звеньев патогенеза арбовирусных инфекций с использованием клеточных культур**

На сегодняшний день существует необходимость более глубокого изучения факторов патогенности и молекулярных механизмов, определяющих тропность арбовирусов к тканям макроорганизма и их вирулентные свойства. Важную роль в понимании молекулярного патогенеза арбовирусных инфекций играет применение клеточных культур, их модификация с целью создания модельной системы, которая бы наиболее полно отражала все аспекты исследуемого процесса.

Неструктурный белок-1 (NS1) флавивирусов является фактором репликации. Кроме внутриклеточной, белок имеет внеклеточную и секреторную форму. Внеклеточная форма NS1, транспортируемая на поверхность мембраны заражённых клеток, вызывает выраженный гуморальный иммунный ответ. Антитела к NS1 по механизму антитело-зависимой цитотоксичности опосредует лизис инфицированных клеток [1]. В исследовании Avirutnan P с соавторами продемонстрировано, что растворимый NS1 вируса денге связывается с поверхностью нескольких типов эпителиальных и фибробластных трансформированных клеточных линий (ВНК, СНО-K1, Vero, 293T, HepG2, Hep3B и L929), с первичными, нетрансформированными клетками, включая кератиноциты (HaCat, CCD-1102), фибробластами кожи и легких (Detroit-551 и IMR-90), а также свежеизолированными клетками тонзиллярного эпителия главным образом через взаимодействие со специфическими гликозаминогликанами (гепарансульфатом и хондроитинсульфатом) [2].

В исследовании Yau WL et al. описана разработка стабильной клеточной линии на основе клеток, полученных из опухоли шейки матки (HeLa), в которой возможна экспрессия неструктурных белков флавивирусов без репликации вирусной РНК, для детального изучения их функций в формировании репликационных комплексов. Установлено, что неструктурные белки вируса клещевого энцефалита ассоциируются с мембраной эндоплазматического ретикулума, обеспечивают процессы её ремоделирования и формирования компартментов, где реализуются репликация вирусного генома [34].

NS5 – это неструктурный белок флавивирусов, который обеспечивает репликацию вирусной РНК и блокирует реакции врождённого клеточного иммунного ответа. Используя клеточной линии A549, обнаружили, что NS5 вируса Зика подавляет экспрессию интерферрона, так как ингибирует TANK-

связывающую киназу-1, которая фосфорилирует активатор транскрипции интерферона-3 [22].

В работе Filippone C. с соавторами применяли первичные миобласты человека в качестве модели для изучения механизмов, участвующих в патогенезе миозита, ассоциированного с лихорадкой чикунгунья [10].

Моделирование персистенции вируса Зика в клетках мужской репродуктивной системы проводили на первичных клеточных линиях Сертоли и Лейдига. Высокая восприимчивость клеток Сертоли к вирусу, предположительно связана со слабым противовирусным ответом. Как следствие, инфекция способна проникать в просвет семенных канальцев, где поддерживается длительная репликация вируса. В клетках Лейдига регистрировались относительно низкие титры вируса Зика [24]. Данные результаты подтверждают передачу вирусной инфекции половым путем.

## **Заключение**

Разнообразие экспериментальных клеточных моделей даёт основу для всестороннего анализа возбудителей арбовирусных инфекций и перспектив разработки диагностических и вакцинных препаратов. Вместе с тем, значительным недостатком клеточных линий как биологических моделей является невозможность получения системного представления об изучаемом объекте, поэтому наиболее предпочтительным является сочетание методов *in vitro* и *in vivo*.

## Список используемой литературы

1. Дуева Е.В. Разработка низкомолекулярных ингибиторов репродукции переносимых клещами флавивирусов: Авт.реф. дисс. канд. химич. наук. – Москва: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2016. – 23 с.
2. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* 2007;3(11):e183.
3. Baidaliuk A, Miot EF, Lequime S, et al. Cell-Fusing Agent Virus Reduces Arbovirus Dissemination in *Aedes aegypti* Mosquitoes In Vivo. *J Virol.* 2019;93(18):e00705-19.
4. Blair CD. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol.* 2011;6(3):265-277.
5. Briese T., Calisher C. H., Higgs S. (2013). Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants? *Virology* 446 207–216.
6. Caldas LA, Azevedo RC, da Silva JL, de Souza W. Microscopy analysis of Zika virus morphogenesis in mammalian cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):8370. Published 2020 May 20.
7. Chan JF, Yip CC, Tsang JO, et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non- vector- borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5:e93
8. Coupeau D, Bayrou C, Baillieux P, et al. Host-dependence of in vitro reassortment dynamics among the Sathuperi and Shamonda Simbuviruses. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):381-395.
9. Domingo E. Virus population dynamics examined with experimental model systems. *Virus as Populations.* 2020;195-223.
10. Filippone C, Legros V, Jeannin P, et al. Arboviruses and Muscle Disorders: From Disease to Cell Biology. *Viruses.* 2020;12(6):616. Published 2020 Jun 5.
11. Franz AW, Sanchez-Vargas I, Raban RR, Black WC 4th, James AA, Olson KE. Fitness impact and stability of a transgene conferring resistance to dengue-2 virus following introgression into a genetically diverse *Aedes aegypti* strain. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(5):e2833. Published 2014 May 8.
12. Garcia M, Alout H, Diop F, et al. Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:387. Published 2018 Nov 2.
13. Genzel Y. Designing cell lines for viral vaccine production: where do we stand? *Biotechnol. J.* 2015;10: 728-740.

14. Goenaga S, Kenney JL, Duggal NK, et al. Potential for Co-Infection of a Mosquito-Specific Flavivirus, Nhumirim Virus, to Block West Nile Virus Transmission in Mosquitoes. *Viruses*. 2015;7(11):5801-5812. Published 2015 Nov 11.
15. Grubaugh ND, Weger-Lucarelli J, Murrieta RA, et al. Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative Fitness during Host Switching. *Cell Host Microbe*. 2016;19(4):481-492.
16. Guerrero NAS, Bello FJ. Comparative assessment of the replication efficiency of dengue, yellow fever, and chikungunya arboviruses in some insect and mammalian cell lines [published correction appears in *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019 Jun 06;52:e20180511b. García, Felio Jesús Bello [corrected to Bello, Felio Jesús]]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20180511.
17. Hall-Mendelin S, McLean BJ, Bielefeldt-Ohmann H, Hobson-Peters J, Hall RA, van den Hurk AF. The insect-specific Palm Creek virus modulates West Nile virus infection in and transmission by Australian mosquitoes. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):414. Published 2016 Jul 25. doi:10.1186/s13071-016-1683-2
18. Himmelsbach K, Hildt E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. *World J. Virol*. 2018;7,10–20.
19. Huang YS, Higgs S, Vanlandingham DL. Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. *Front Microbiol*. 2019;10:22. Published 2019 Jan 23.
20. Kiesslich S, Kamen AA. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnol Adv*. 2020;44:107608.
21. Kuno G, Gubler DJ, Vélez M, Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ*. 1985;63(2):279-286
22. Lin S, Yang S, He J, et al. Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. *Virology*. 2019;527:180-187.
23. Ma H, Dang Y, Wu Y, et al. A CRISPR-Based Screen Identifies Genes Essential for West-Nile-Virus-Induced Cell Death. *Cell Rep*. 2015;12(4):673-683.
24. Ma W, Li S, Ma S, et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell*. 2017;168(3):542.
25. Moon SL, Dodd BJ, Brackney DE, Wilusz CJ, Ebel GD, Wilusz J. Flavivirus sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery. *Virology*. 2015;485:322-329.
26. Nelson CW, Sibley SD, Kolokotronis SO, et al. Selective constraint and adaptive potential of West Nile virus within and among naturally infected avian hosts and mosquito vectors // *Virus Evolution* – 2018. – Vol. 4, №1

27. Offerdahl DK, Dorward DW, Hansen BT, Bloom ME. Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. *Virology*. 2017;501:54-62.
28. Romo H, Kenney JL, Blitvich BJ, Brault AC. Restriction of Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti* mediated by an insect-specific flavivirus. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):181. Published 2018 Nov 15.
29. Sim S, Jupatanakul N, Dimopoulos G. Mosquito immunity against arboviruses. *Viruses*. 2014;6(11):4479-4504. Published 2014 Nov 19.
30. Stollar V, Thomas VL. 1975. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology* 64:367–377.
31. Sudeep AB, Vyas PB, Parashar D, Shil P. Differential susceptibility & replication potential of Vero E6, BHK-21, RD, A-549, C6/36 cells & *Aedes aegypti* mosquitoes to three strains of chikungunya virus. *Indian J Med Res*. 2019;149(6):771-777.
32. Tng PYL, Carabajal Paladino L, Verkuyl SAN, et al. Cas13b-dependent and Cas13b-independent RNA knockdown of viral sequences in mosquito cells following guide RNA expression. *Commun Biol*. 2020;3(1):413. Published 2020 Jul 31.
33. Wikan N, Sakoonwatanyoo P, Ubol S, Yoksan S, Smith DR. Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage. *PLoS One*. 2012;7(1):e31102.
34. Yau WL, Nguyen-Dinh V, Larsson E, Lindqvist R, Överby AK, Lundmark R. Model System for the Formation of Tick-Borne Encephalitis Virus Replication Compartments without Viral RNA Replication. *J Virol*. 2019;93(18):e00292-19.
35. Zimmerman MG, Bowen JR, McDonald CE, Pulendran B, Suthar MS. West Nile Virus Infection Blocks Inflammatory Response and T Cell Costimulatory Capacity of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Virol*. 2019;93(23):e00664-19.