

Силибинин ингибирует вторжение вируса гепатита С в гепатоциты путём блокирования клатрин-зависимого переноса

Julie Blaising,^{1,2†}, Pierre L. Lévy,^{2†}, Claire Gondeau,³, Capucine Phelip,^{2†}, Mihayl Varbanov,^{1§}, Elodie Teissier,¹, Florence Ruggiero,⁴, Stephen J. Polyak,⁵, Nicholas H. Oberlies,⁶, Tijana Ivanovic,^{7,8}, Steeve Boulant,^{9***†¶} and Eve-Isabelle Pécheur,^{1*†¶}

1 UMR CNRS 5086, IBCP, Lyon, France.

2 UMR Inserm U1052/CNRS 5286, Cancer Research Center of Lyon, University of Lyon, Lyon, France.

3 Inserm U1040, Institut de Recherche en Biothérapie, Hôpital St Eloi, Montpellier, France.

4 IGFL, ENS de Lyon, Lyon, France.

5 Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA.

6 Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina at Greensboro, Greensboro, NC, USA.

7 Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.

8 Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado, Boulder, CO 80309, USA.

9 Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

Получено 31.12.2012; отредактировано 01.05.2013; одобрено 20.05.2013.

Для корреспонденции: *E-mail eve-isabelle.pecheur@inserm.fr; Tel. (+33) 472681975; Fax (+33) 472681971. **E-mail s.boulant@dkfz-heidelberg.de; Tel. (+49) 6221421560; Fax (+49) 221 42 1559.

Текущие адреса: †UMR Inserm U1052/CNRS 5286, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon, Lyon, France; ‡Department of Infectiology, CHS Nachwuchsgruppe am CellNetworks Cluster und DKFZ, University of Heidelberg, Germany; § UMR7565, Université de Lorraine, CNRS, Nancy, France.

¶Равный вклад. Авторы декларировали отсутствие конфликта интересов.

Резюме

Вирус гепатита С (HCV) - глобальная угроза здоровью, инфицировано 170 миллионов человек по всему миру. Предыдущие работы показывают, что экстракт расторопши, известный как силимарин, и его основной компонент силибинин ингибирует HCV инфицирование. Здесь мы исследовали механизм анти-HCV действия соединений, входящих в состав силимарина, на молекулярном уровне. Используя конфокальный имиджинг живых клеток, трекинг единичных частиц, трансмиссионую электронную микроскопию и биохимические подходы на HCV-инфицированных клетках гепатомы человека и первичных гепатоцитах, мы показываем, что силибинин мощно ингибирует HCV-инфицирование и блокирует вторжение путём замедления переноса через клатрин-

покрытые ямки и везикулы. Детальный анализ показал, что силибинин изменял формирование и клатрин-покрытых ямок, и везикул в клетках, и вызывал ненормальное поглощение и перенос трансферрина, хорошо известного транспорта клатринового внутриклеточного пути. Силибинин также ингибировал инфицирование другими вирусами, которые попадают в клетку путём клатрин-опосредованного эндоцитоза, включая реовирус, вирусы везикулярного стоматита и гриппа. Наша работа показывает, что силибинин ингибирует ранние стадии HCV инфицирования, влияя на внутриклеточный перенос вирионов. Это даёт новые осознания молекулярных механизмов действия силибинина против HCV-вторжения и также предлагает силибинин в качестве потенциальной противовирусной терапии широкого спектра,

Введение

Вирус гепатита С, уже инфицировавший 170 миллионов человек по всему миру, является главной причиной цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, отвечая за 40-45% всех трансплантаций печени в Соединённых Штатах (Mukherjee and Sorrell, 2008). Хотя ингибиторы протеазы HCV были недавно одобрены американским Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (US Food and Drug Administration) в сочетании с лечением, основанным на интерферонах, эти молекулы показывают токсичность и не являются эффективными против всех генотипов. Наиболее вероятно, что терапии HCV будут улучшены схемами, включающими много лекарств, нацеленных на различные аспекты жизненного цикла вируса. Вторжение вируса это привлекательная цель для терапевтического воздействия, с возможностями предотвратить прикрепление вируса к рецептору (рецепторам), интернализацию и/или слияние. Силимарин, экстракт плодов растения расторопши пятнистой *Silybum marianum*, является популярным фитопрепаратом, используемым как гепатопротектор (Tamao and Diamond, 2007), и ингибирующим инфицирование выращенным в клеточной культуре HCV (Polyak et al., 2007). Его главный компонент, силибинин, доступен в водонерастворимой форме (далее

называется SbN) и в форме соли дисукцината для инъекций, под названием Legalon-SIL®. Клинические исследования докладывают, что Legalon-SIL®, но не нерастворимая форма SbN, принимаемая перорально, сокращает вирусную нагрузку у пациентов с хроническим гепатитом С (Ferenci *et al.*, 2008; Hawke *et al.*, 2010), даже у интерфероновых отказников (Rutter *et al.*, 2011), и предотвращает реинфицирование трансплантата после трансплантации печени (Beinhardt *et al.*, 2011). Недавние работы доложили, что высокие дозы силимарина и силибинина блокируют активность NS5B-полимеразы HCV *in vitro* (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2010; Polyak *et al.*, 2010; Wagoner *et al.*, 2010; 2011). Несколько докладов отмечают противовирусную активность через ингибирование вторжения, слияния, трансмиссии и агрегирование HCV (Wagoner *et al.*, 2010; 2011; Dahari *et al.*, 2011; Polyak *et al.*, 2013). Поэтому мы решились исследовать механизмы, с помощью которых силибинин предотвращает вторжение HCV. Используя работы по имиджированию живых клеток, мы открыли, что силибинин ингибирует HCV-инфицирование человеческих гепатоцитов путём блокирования эндосомального переноса. Мы показываем, что он изменяет клатрин-опосредованный эндоцитоз (CME) и предотвращает инфицирование клетки вирусами, которые вторгаются этим путём и требуют эндосомального созревания/триггеринга. Стало быть, силибинин может представлять собой мощное антивирусное соединение, которое нацелено на ранние стадии жизненного цикла вируса.

Результаты

HCV инфицирует первичные человеческие гепатоциты клатрин-зависимым путём.

Вначале мы определили, как HCV вторгается в гепатоциты человека. Частицы HCV, выращенные в клеточных культурах (HCVcc JFH-1), были добавлены к клеткам Huh7.5, и им позволили интернализироваться в течение 20 минут. Вирионы идентифицировались с использованием иммуно-электронной микроскопии (Maillard *et al.*, 2011).

Репрезентативные микрофотографии в разные моменты пост-

инфицирования показаны на Fig. 1A: через 5 минут после добавления вируса, вирионы обнаруживались в плазматической мембране, в основном в похожих на псевдоподы, выпуклостях в цитоплазму. Через 5–10 минут частицы вируса были связаны с внутриклеточными мембранными инвагинациями, покрытыми (электрон-плотно) клатрином, т.е. в клатрин-покрытых ямках (ССР). После \approx 10 минут, вирионы наблюдались внутри клатрин-покрытых структур. После 20 минут большинство HCV частиц были интернализированы (Fig. 1B, слева). В присутствии человеческого моноклонального нейтрализующего антитела CBH-5 (Haid *et al.*, 2009), интернализация частиц HCV была полностью ингибирована (Fig. 1B, справа; Fig. 1C). Таким образом, СМЕ представляет собой путь вторжения для частиц HCV, и ингибирование интернализации частицы HCV ингибиторами СМЕ в клетках Huh7 далее подтверждает эти данные (здесь не показано, см. Blanchard *et al.*, 2006; Collier *et al.*, 2009). Для проверки того, является ли СМЕ также путём инфицирования для HCV в случае первичных человеческих гепатоцитов (PHH), мы инфицировали PHH с помощью HCV генотипов 1b или 3a, полученных из сыворотки крови, в присутствии или отсутствии хлорпромазина (CPZ). Ингибирование СМЕ приводило к 70–80%-ному понижению инфективности сывороточного HCV в отношении PHH (Fig. 1D), генотип-независимым образом. Кстати, в условиях наших экспериментов, CPZ не показал цитотоксичности ни в отношении клеток Huh7.5 (не показано), ни в отношении PHH (Fig. 2A). Таким образом, СМЕ представляет собой главный путь вторжения, приводящий к продуктивному инфицированию человеческих гепатоцитов природным HCV.

Силибинин - главный в силимарине ингибитор слияния HCV с клеткой

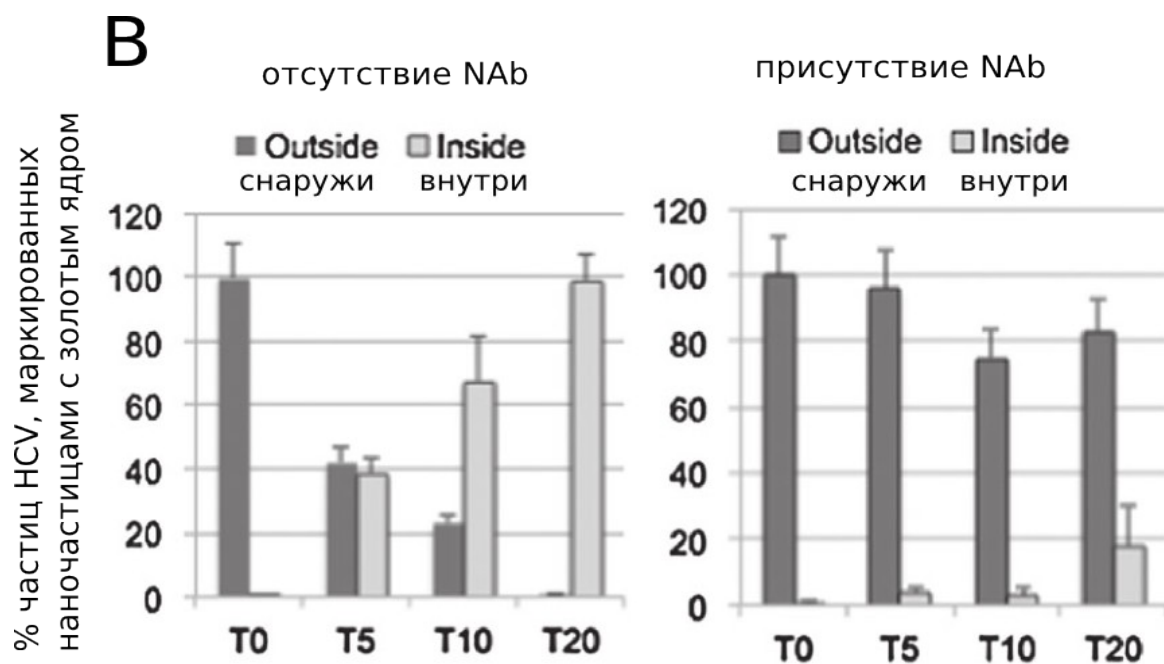
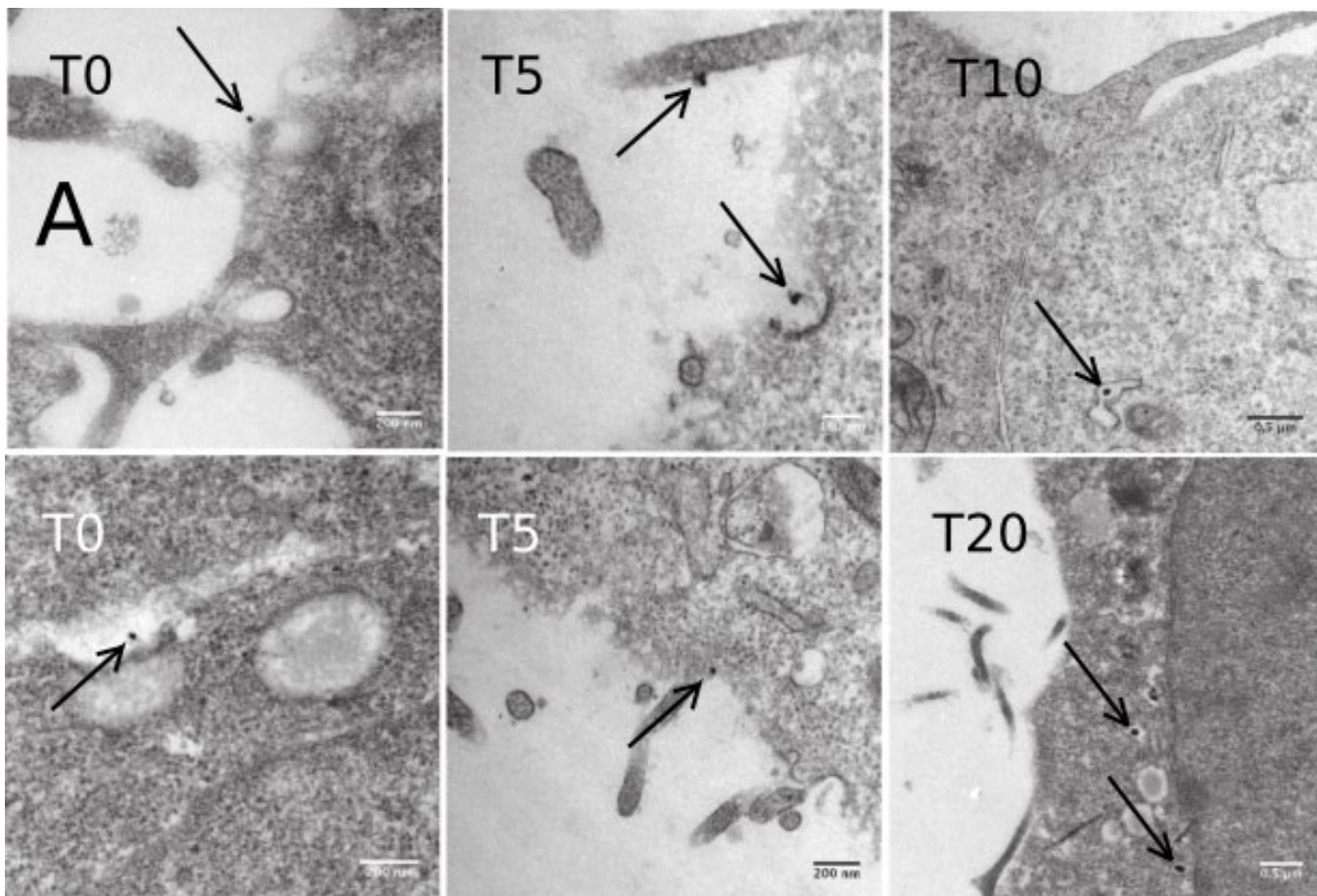
Мы недавно показали, что силимарин ингибирует вторжение и слияние HCV (Wagoner *et al.*, 2010; 2011). Здесь, используя наши анализы слияния HCV с липосомами (Lavillette *et al.*, 2006; Haid *et al.*, 2009), мы идентифицировали флавонолигнаны силимарина, отвечающие за антивирусную активность. Среди очищенных соединений, силибин А, изосилибин А и силибинин были наиболее мощны в блокировании

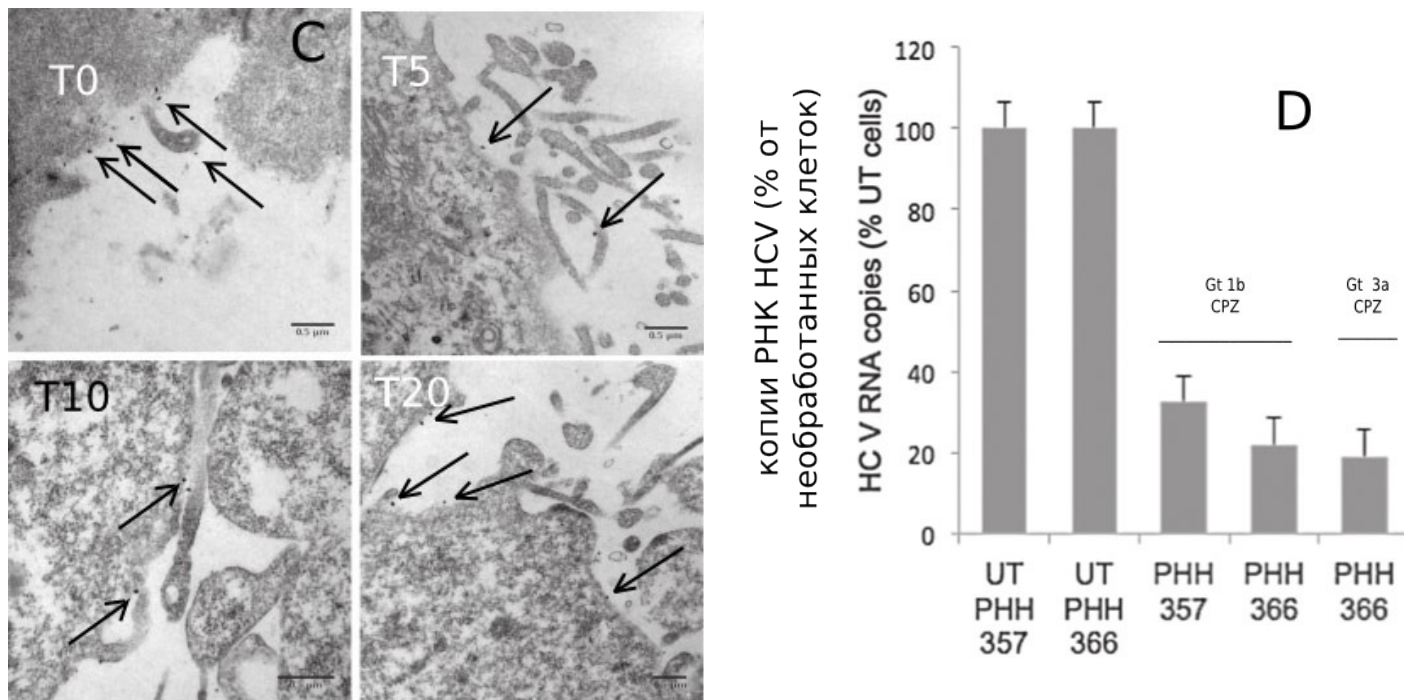
слияния, далее шли силибин В, изосилибин, силикрестин, таксифолин, изосиликрестин и силидианин (Table 1). Поскольку силибинин, смесь 1:1 силибина А и силибина В, является главным компонентом, содержащимся в силимарине, мы заключили, что большую часть активности силимарина по анти-слиянию, можно атрибутировать силибинину. Поэтому в последующих экспериментах мы сосредоточились на силибинине. Мы также протестировали ингибирующие слияние свойства Legalon-SIL®, водорастворимой формы силибинина для инъекций; эта формула ингибировала HCV-опосредованное слияние в том же микромолярном диапазоне концентраций, что и водонерастворимая форма силибинина (далее называемая SbN) (Table 1).

Силибинин препятствует HCV-инфицированию PNH и эндосомальному переносу

Наша недавняя работа показала, что и Legalon-SIL®, и SbN, оба ингибируют HCV-инфицирование для клеток Huh7.5 (Polyak *et al.*, 2010; Wagoner *et al.*, 2011). Здесь мы показываем, что обе формулы ингибируют инфицирование PNH вирусом HCV JFH-1 или сывороткой крови от HCV-инфицированных пациентов. Legalon-SIL®- и SbN-обработка PNH дала 42%- ($P < 0.05$) и 80%-ное снижение ($P < 0.005$) JFH-1-инфицирования соответственно, по сравнению с модельно-обработанными клетками (Fig. 3A). Схожим образом, обработка с помощью Legalon-SIL® и SbN клеток Huh7.5 дала снижение инфицирования HCV JFH-1 на 2 порядка (Fig. 3B). Инфицирование PNH сывороточным HCV также уменьшилось на 76% с помощью Legalon-SIL и на 60% с помощью силибинина ($P < 0.01$) (Fig. 3A). Кстати, Legalon-SIL® показал больший ингибирующий эффект на HCV генотипа 1b, чем 2a (JFH-1), что соответствует недавним наблюдениям, что Legalon-SIL® ингибирует HCV 1b, но не субгеномные репликоны 2a (Wagoner *et al.*, 2011; Esser-Nobis *et al.*, 2013). Важно, что Legalon-SIL® или SbN в концентрациях, использовавшихся в этой работе, не показали никакой цитотоксичности ни в отношении PNH, ни в отношении клеток Huh7.5, что измерено квантификацией клеточного АТФ и образца MTS соответственно (Fig. 2B).

Fig. 1. HCV вторгается в гепатоциты путём клатрин-опосредованного эндоцитоза.





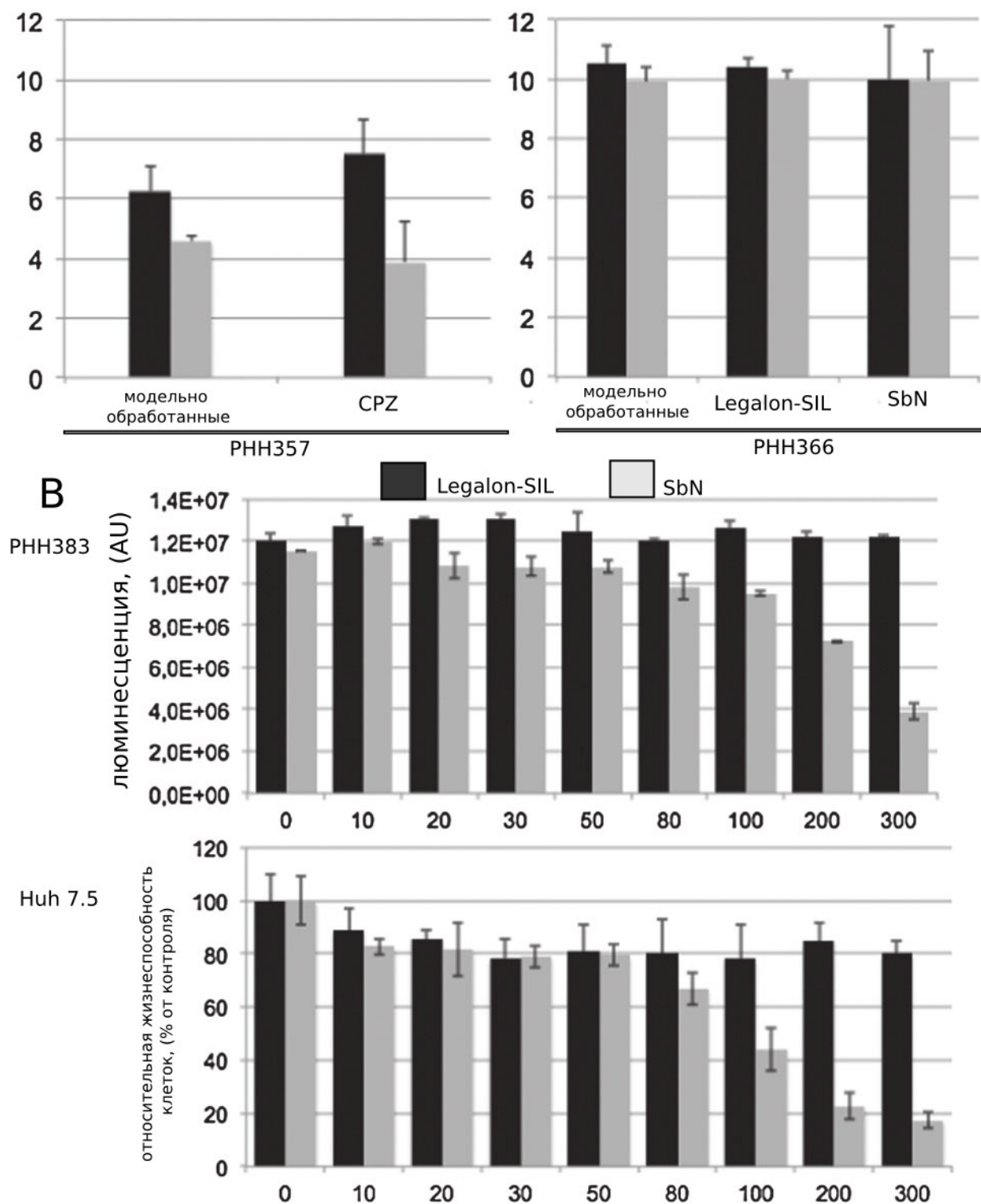
A. Клетки Nuh7.5 инкубировались совместно с HCVcc JFH-1 (MOI 3) в течение 30 минут при 4°C. Далее клетки немедленно фиксировались (T0); или нагревались до 37°C и фиксировались после 5 (T5), 10 (T10) или 20 минут (T20). Инфицированные JFH-1 клетки далее приготавливались для иммуно-электронной микроскопии, как описано у Maillard et al., 2011. HCV иммуномаркировался с помощью антитела anti-E2 AP-33. Показаны репрезентативные микрофотографии. Стрелочка: маркированные золотом вирионы.

B. Квантификация интернализации JFH-1: частицы вируса добавлялись к клеткам Nuh7.5, в присутствии или отсутствия СВН-5. Вирионы иммуномаркировались по ядру HCV. Для каждого момента времени, на поверхностях 100 μm² анализировался процент (среднее значение ± SD (стандартное отклонение)) неинтернализированных (тёмные) или интернализированных (светлые) частиц от общего количества адресованных вирусных частиц.

C. Репрезентативные микрофотографии полученные в присутствии антитела СВН-5; срез, 0.5 μm.

D. Ингибирование инфицирования HCV первичных человеческих гепатоцитов (PHH) с помощью CPZ. Через три дня после посева, PHH (культуры 357 или 366) предварительно обрабатывались 90 минут с помощью 20 μg ml⁻¹ CPZ и инфицировались с помощью 25 μl сывороточного HCV генотипов 1b или 3a (вирусные нагрузки соответственно 2.1 × 10⁷ и 7.0 × 10⁶ копий РНК ml⁻¹). Прививочный материал удалялся после 16 часов. Клетки лизировались и общая РНК экстрагировалась через 72 часа после инфицирования. Клеточное содержание РНК HCV оценивалось с помощью RT-qПЦР и выражалось в процентах инфицирования в сравнении с необработанными PHH (100%).

Fig. 2. CPZ и силибинин не цитотоксичны при экспериментальных условиях.



А. (слева) РНН (357) предварительно обрабатывались CPZ (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 90 мин) и инфицировались либо HCVcc JFH-1 (MOI 1; чёрным), либо 25 μl сывороточным HCV генотипа 1b (вирусная нагрузка 2.1×10^7 РНК копий ml^{-1} ; серым). После 16 часов при 37°C, прививочный материал удалялся, монослои отмывались с помощью William's E среды и добавлялась свежая среда Lanford. Клетки собирались после 72 часов после инфицирования. (Справа) РНН (366) модельно

обрабатывались или обрабатывались 80 μ M Legalon-SIL [®] или SbN, инкубировались при 37°C в течение 1 часа 30 минут. Клетки держались 20 минут при 4°C, прививались HCV JFH-1 (MOI 1; чёрным) или сывороточным HCV генотипа 1b (серым) и синхронизировались 1 час при 4°C. Далее клетки инкубировались 40 минут при 37°C, прививочный материал удалялся и добавлялась свежая среда, содержащая 80 μ M Legalon-SIL [®] или силибинина. Культуры PNH собирались по истечении 48 часов для полного выделения РНК, с использованием раствора гуанидиум изотиоцианата (RNAlater, Eurobio), и оценивались с помощью Nanodrop TM на 60 нм.

В. Жизнеспособность клеток в отсутствии и присутствии возрастающих концентраций Legalon-SIL [®] или SbN; изучение PNH проводилось с использованием люминесцентного метода CellTiter-Glo (смотри "Экспериментальные процедуры"). Изучение клеток Huh7.5 базировалось на анализе MTS, результаты выражались в процентах от контроля (отдельный эксперимент). Результаты приведены как средние значения \pm SD (стандартное отклонение) трижды проведённых экспериментов.

Эти данные демонстрируют, что обе формы силибинина являются мощными ингибиторами инфицирования сывороточным HCV первичных гепатоцитов, наиболее физиологически релевантной клеточной модели.

Для характеристики механизмов, с помощью которых силибинин защищает человеческие гепатоциты от инфицирования HCV, мы использовали 3D-конфокальную микроскопию, чтобы оценить внутриклеточный транспорт HCV в клетках Huh7.5. Клетки были либо модельно предварительно обработанными, либо предварительно обработаны с помощью SbN, и инфицированы HCVcc. В отсутствие препарата, HCV (определяемый с помощью красной маркировки ядра) обнаруживался связанным с клатрин-позитивными структурами и ранним эндосомальным маркером EEA1 в течение 30 минут (Fig. 3C).

Через 60–90 минут после инфекции, частицы отделялись от ранних эндосом и сливались с поздними эндосомальными маркерами Lamp1 и Rab7 (Fig. 3C и D). В клетках, обработанных SbN, на ранних и поздних этапах пост-инфекции, вирионы главным образом были заключены в клатрин-позитивные структуры и немного их обнаруживалось в EEA1-позитивных структурах (Fig. 3C и D). Это означает, что SbN тормозит внутриклеточный транспорт HCV. Для дальнейшего изучения этого эффекта, мы наблюдали вторжение псевдочастиц HCV (HCVpp) и их

транспорт в клетках Huh7.5, используя микроскопию живых клеток. HCVpp помечались липофильной краской R18 (Lavillette et al., 2006), очищались и тщательно характеризовались. Исследование R18-HCVpp с помощью электронной микроскопии не выявило никаких дефектов (Fig. 4A), а иммунофлуоресцентный анализ показал, что сигналы GAG-белка ядра HCVpp [из вируса мышинной лейкемии (Bartosch et al., 2003)], HCV E2 и R18 колокализовались вместе в инфицированных клетках (Fig. 4B). Квантификация, проведённая на 180-ти клетках, случайно отобранных из трёх отдельных экспериментов, показала 80%-ную колокализацию между сигналами HCV E2 и R18. Очищенные HCVpp после окрашивания R18 показали лишь 15% потери инфективности, по сравнению с неокрашенными HCVpp, что означает, что окрашивание *per se* не изменяет инфективность HCVpp.

Клетки Huh7.5, образующие лёгкую цепочку клатрина, связанную с усовершенствованным флуоресцирующим зелёным белком (eGFP) инфицировались очищенным R18-HCVpp; затем, вирусы и клатрин-покрытые структуры имиджировались одновременно с помощью конфокальной микроскопии (Видео S1). Покадровый анализ показал ассоциирование HCVpp с клатрин-позитивными структурами в клетках Huh7.5. Визуализировались и клатрин-зависимые эндоцитозные события, и внутриклеточный перенос в клатрин-покрытых структурах. Типичное событие вторжения HCV показано на Fig. 5A: раскадрована посадка вирионов на поверхность клетки. После связывания, HCV ассоциируется с дискретным eGFP-содержащим пятном (30 секунд). Затем увеличивается сигнал от клатрина-eGFP вокруг вириона, указывая на процесс созревания клатрин-покрытой везикулы (CCV, 30-59 секунд).

После 88 секунд, сигнал от клатрин-eGFP исчезал, предположительно благодаря снятию покрытия CCV (Ehrlich et al., 2004). Вслед за исчезновением клатринового сигнала, наблюдалось быстрое направленное движение помеченной вирусной частицы. Эта перемена места походила на таковую, наблюдавшуюся после клатрин-зависимого поглощения других вирусов (Ehrlich et al., 2004; Cureton et al., 2009; 2012).

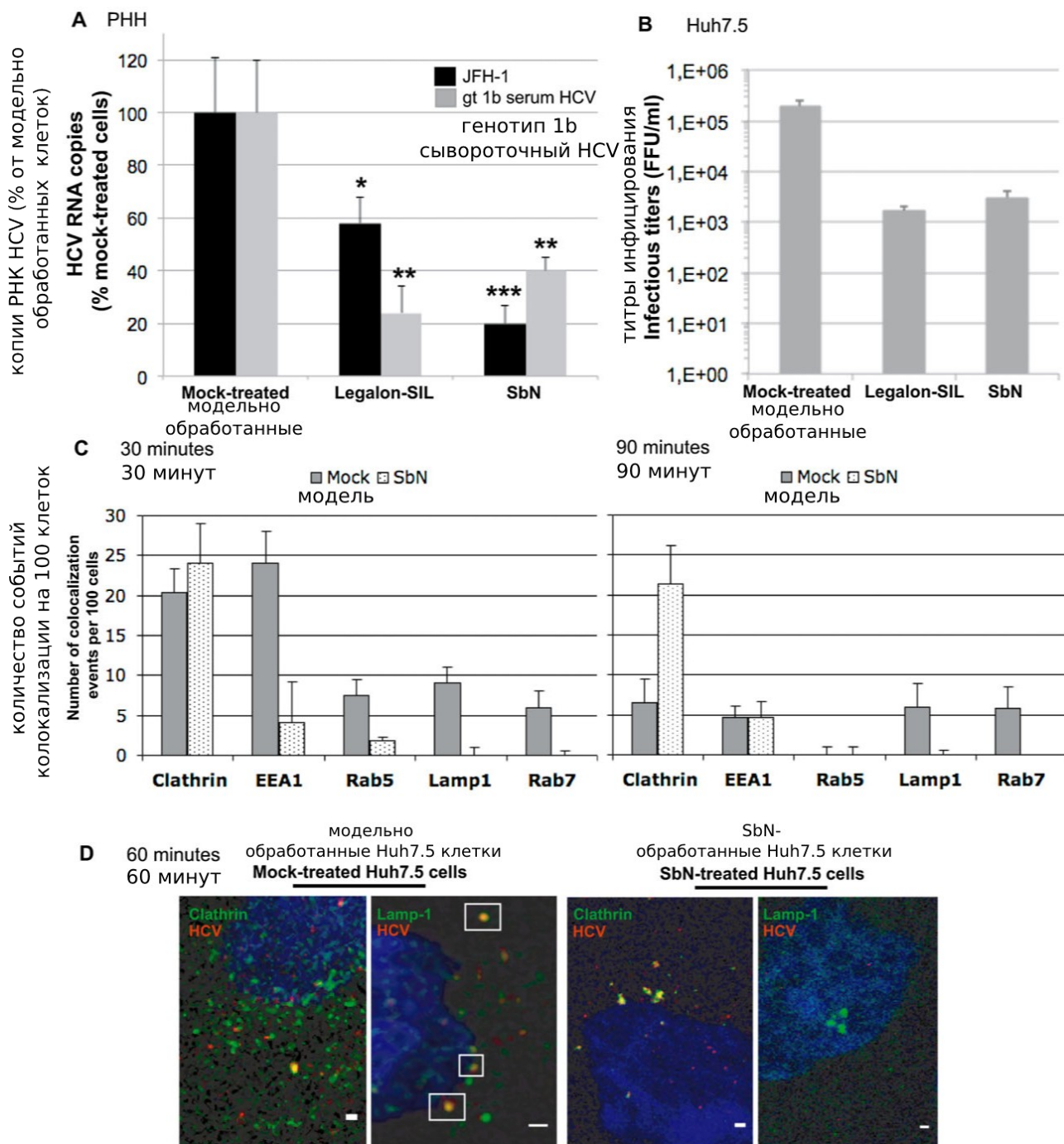
В среднем, сигнал клатрин-eGFP колокализовался с HCV в течение 30–100 секунд, в соответствии с динамикой событий CME, наблюдавшейся прежде (Ehrlich et al., 2004; van der Schaar et al., 2008). В SbN-обработанных клетках, HCV оставался заключённым к клатрин-позитивные структуры в течение большего промежутка времени. Трекинг-анализ выявил общее замедление движения HCV- и клатрин-позитивных структур в SbN-обработанных клетках против необработанных клеток: 3 против 11 μm (Fig. 5A; Видео S2).

Таблица 1. Силибинин - наиболее мощный ингибитор слияния HCV с клеткой среди флавонолигнанов, содержащихся в силимарине.

Ингибирование слияния HCV с клеткой (%)											
соединение	Композиция а (% от всего)	Концентрация (мкМ)									
		10.4	20.7	25	50	75	83	100	125	150	IC50, мкМ
Силимарин	/	42±2	60±5	66±9	70±3	80±8	84±10	97±2	100	/	15±4
Силибинин	39.8 (16+23.8)	22±2	33±4	42±10	66±12	72±6	82±6	83±2	95±3	97±1	34±3
Силибин А	16	10±3	38±6	50±3	58±7	67±9	75±7	81±3	92±3	98±2	25±3
Силибин В	23.8	19±7	44±10	48±6	61±3	68±6	70±8	78±8	/	100	29±4
Изосилибин А	6.4	45±5	58±10	63±6	73±3	/	76±6	82±3	94±4	98±3	15±3
Изосилибин В	4.4	39±7	44±4	48±5	56±8	62±6	63±4	70±5	81±2	93±5	31±4
Силикристин	11.6	19±6	36±8	43±6	49±4	60±4	66±10	73±6	89±3	94±3	53±3
Изосиликристин	2.2	10±4	25±3	/	33±6	47±7	51±8	64±10	78±4	87±5	81±2
Силидианин	16.7	16±8	30±10	/	37±7	41±8	48±9	50±5	56±9	73±6	100±3
Таксифолин	1.6	28±8	40±6	/	48±8	53±10	67±9	71±8	78±11	89±9	60±3
Legalon-SIL®.	/	38±9	43±3	62±8	70±5	78±7	80±11	98±2	100	100	22±7
DMSO	/	0	0	0	0	0	0	0	2	3	/

а Композиция продуктов из расторопши от Madaus GmbH, выраженная в % от всего материала (по Davis- Searles et al., 2005). Отметим, что сумма < 100%, потому что остаток от 20 до 30% состоит из нехарактеризованных полифенолов и жирных кислот. Силибинин состоит из силибина А и силибина В в смеси 1:1. Слияние между HCVpp и R18-помеченными липосомами измерялась путём записывания кинетики смешивания липидов методом флуоресцентной спектроскопии (Lavilette et al., 2006). Значения кинетики слияния за последние 30 секунд (финальная степень слияния) использовались для вычисления процента слияния в присутствии или отсутствии препарата. Результаты выражены в процентах ингибирования слияния в терминах \pm SD трёх отдельных экспериментов. DMSO, посуда отдельно. Посчитаны значения IC50 для ингибирования слияния.

Fig. 3. Силибинин тормозит HCV инфицирование первичных человеческих гепатоцитов и эндосомальный перенос.



A. PNH модельно обрабатывались 80 μ M Legalon-SIL® или SbN, инкубировались при 37°C в течение 1 часа 30 минут. Клетки держались 20 минут при 4°C, инкубировались HCV JFH-1 (MOI 1; чёрным) или сывороточным HCV генотипа 1b (серым) и синхронизировались 1 час при 4°C. Далее PNH инкубировались 40 минут при 37°C, прививочный материал удалялся и добавлялась свежая среда, содержащая 80 μ M Legalon-SIL® или SbN. Клетки собирались для полного выделения РНК через 48 часов. Содержание РНК HCV выражено как процент

инфицирования по сравнению с модельно обработанными РНН (100%).
Результаты приведены в среднем \pm SD трёх измерений.

В. Вирусная инфективность при обработке 80 μ M SbN или Legalon-SIL® клеток Huh7.5 определялась путём последовательных разбавлений вирионов JFH-1, начиная с MOI равного 1. После 72 часов в культуре, клетки фиксировались в метанол/ацетоне и приготавливались к иммунофлуоресценции ядра HCV с использованием антитела С7-50. Далее под микроскопом подсчитывались флуорес-центные очаги инфекции (выражено как FFU ml⁻¹).

С. Квантификация количества событий колокализации между HCVcc JFH-1 и индцированными эндосомальными маркерами, подсчитанными на 100 клеток, модельно- или SbN-обработанных; 30 мин/90 мин, время после переноса HCV-инфицированных клеток в 37°C. Результаты в среднем \pm SD из двух независимых экспериментов. (смотри D).

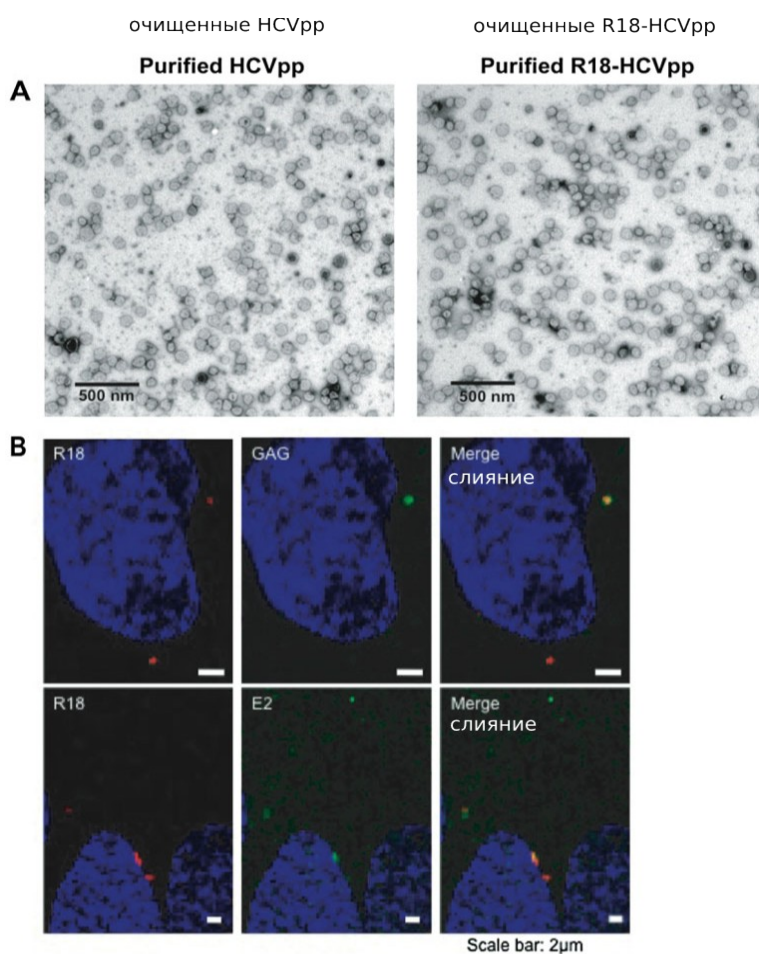
Д. Клетки Huh7.5 модельно (DMSO)- или предварительно обрабатывались 80 μ M SbN 30 мин при 37°C, инкубировались с JFH-1 (9.9×10^5 FFU ml⁻¹; MOI 1) в течение 1 часа при 4°C, в среде, содержащей SbN. После удаления несвязавшихся вирионов, клетки, в среде содержащей 80 μ M SbN были перенесены в 37°C на 60 мин, зафиксированы и ко-иммуноокрашены на ядро HCV (красным) и лёгкую клатриновую цепь или Lamp1 (эндо-лизосомальный маркер) (зелёным).

Fig. 4. Характеризация очищенных частиц R18-HCVpp.

Псевдотипированные частицы, произведённые из клеток 293Т осаждались через сахарозную подушку и ресуспендировались в PBS (HCVpp) или PBS, содержащий R18 (2 наномоль на 100 μ l частиц) (Lavillette et al., 2006) (R1-HCVpp), до конечной 100-кратной концентрации по сравнению с клеточным супернатантом. Далее, HCVpp, маркированные или нет с помощью R18, очищались в градиенте сахарозы и ресуспендировались в PBS после удаления сахарозы центрифугированием (смотри «Экспериментальные процедуры»).

А. Исследование очищенных HCVpp, маркированных R18 или нет, с помощью электронной микроскопии (негативное окрашивание уранил ацетатом).

В. Иммуноокрашивание HCVpp с помощью GAG вируса крысиной антимышиной лейкемии, или мышиним anti-HCV E2

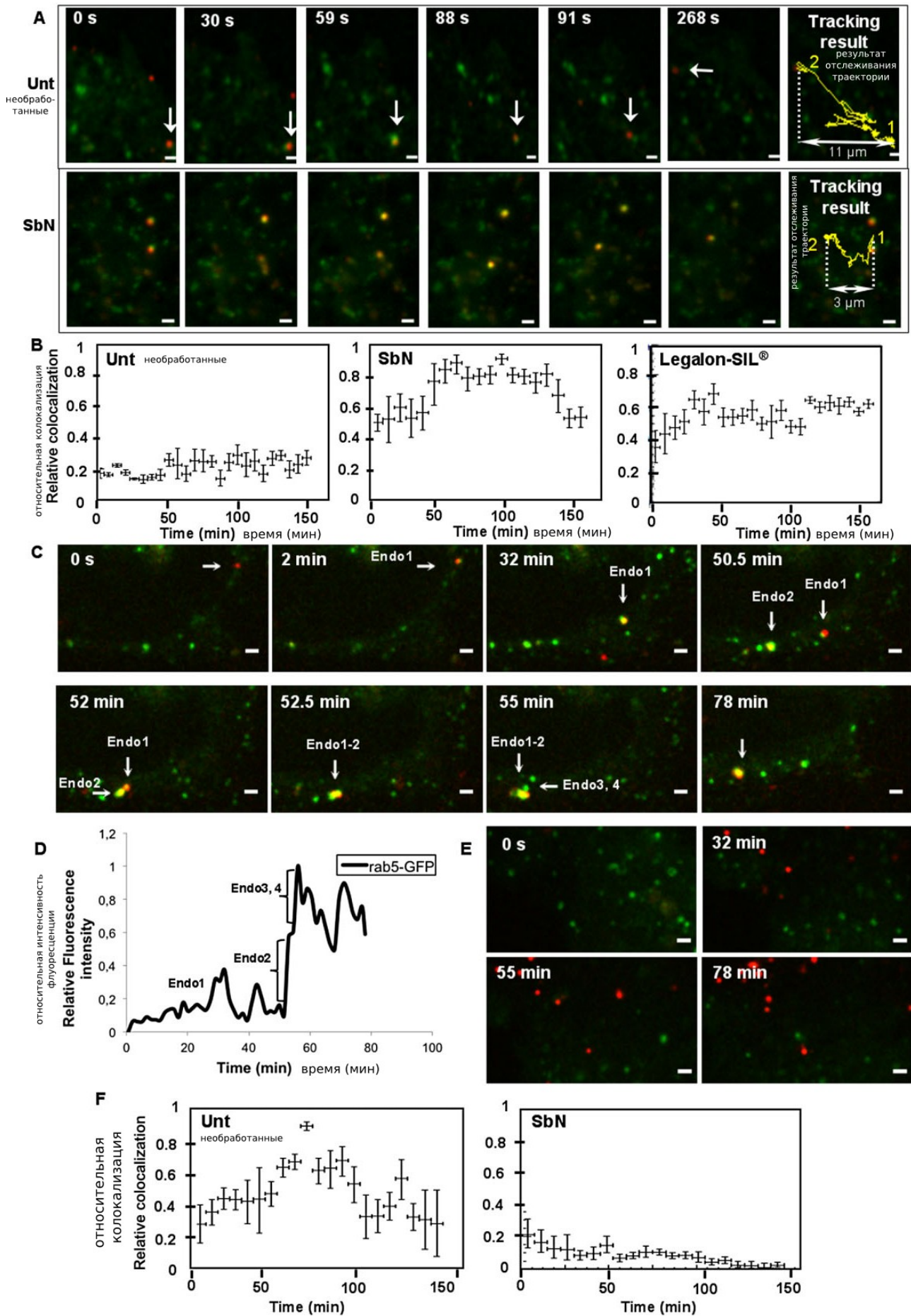


(AP33), с последующим вторичным присоединением козьих анти-крысиных или анти-мышинных антител к Cy2 или Dylight488 (Pierce) соответственно. Флуоресценция R18 наблюдалась прямо, ядра маркировались с помощью DAPI. Исследование проведено с использованием конфокального инвертированного спектрального микроскопа Zeiss LSM 710.

Далее мы исследовали во времени степень колокализации HCVpp с клатрин-покрытыми структурами, в живых клетках, обработанных или не обработанных SbN/Legalon-SIL[®]. Ранние пост-инфицированные (< 50 мин), необработанные клетки показали очень мало событий колокализации (Fig. 5B, слева). Колокализация между клатрином и HCVpp длилась в среднем 30–100 с, что вероятно соответствует событиям эндоцитоза. На более поздних пост-инфекционных периодах (> 50 мин), наблюдался больший уровень колокализации, вероятно благодаря накоплению HCVpp в путях рециклинга/деградации. После обработки SbN или Legalon-SIL[®] (Fig. 5B средняя и правая панели соответственно), количество событий колокализации росло, со временем достигая плато, и было значительно больше, чем в модельно-обработанных клетках. В присутствии силибинина, вирионы HCV интернализировались как обычно, но охватывались как ловушкой клатрин-покрытыми структурами, которые накапливались в цитозоле. Затем мы изучили кинетику переноса HCVpp в ранний эндосомальный отсек. R18 -маркированные HCVpp добавлялись к Nuh7.5, выделяющими eGFP-слитый Rab5, маркер ГТФ-азы ранних эндосом. Внутриклеточное положение и перенос вирусных частиц атрибутировалось с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии живых клеток (Fig. 5C). После интернализации, наблюдалось быстрое рекрутирование Rab5-eGFP на вирион-содержащие структуры.

Fig. 5. Силибинин препятствует ранним шагам вторжения HCV в клетки Nuh7.5.

А. Снимки R18-меченых HCVpp (красные точки, белая стрелка), интернализированных в eGFP-клатрин-покрытые ямки (зелёным) в DMSO-обработанных клетках (необработанных) (Видео S1) или обработанных 80 μ M SbN (SbN; Видео S2). Жёлтый трек обозначает начало (1) и конец (2) траектории HCVpp. Масштабная линейка 1 μ m.



В. Относительная колокализация между клатрин-покрытыми структурами и HCV как функция времени, в модельно-(Unt), силибинин (SbN)- или Legalon-SIL®-обработанных клетках. Для оценки погрешности измерения количества событий колокализации и HCV, среднее значение и стандартное отклонение этих величин вычислялось с использованием подсчётов через 6-минутный период (смотри «Экспериментальные процедуры»).

С. Снимки переноса R18-меченых HCVpp (стрелка) в eGFP-Rab5-положительной эндосоме (Endo1, зелёным) в необработанной клетке. Endo1 сливается с Endo2, содержащей HCVpp, далее следует слияние с пустой Endo3 и Endo4 (Видео S3). Масштабная линейка 1 μm .

D. Профили флуоресцентной интенсивности рекрутирования eGFP-Rab5 к Endo-1 со снимков С. Endo-2, -3 и -4 показывают последовательное слияние с Endo-1.

E. Снимки экспрессии Rab5-eGFP клеткой, обработанной 80 μM SbN и инфицированной R18-меченым HCVpp (красным) (Видео S4). Масштабная линейка, 1 μm .

F. Относительная колокализация между Rab5-положительными структурами и HCV как функция времени в модельно- (Unt) или SbN-обработанных клетках.

Наблюдались события слияния между Rab5-положительными эндосомами, и вирионы оставались ассоциированными более чем на 70 минут с ранними эндосомами. Кинетический анализ Rab5-eGFP и флуоресцентные интенсивности HCVpp подтвердили эти наблюдения. В течение первых 2–3 минут, флуоресценция быстро возрастала благодаря мощному рекрутированию Rab5 к первой эндосоме (Endo1) (Fig. 5D). На 52 минуте флуоресценция резко возрастала, поскольку Endo1 успешно слилась со второй эндосомой, также содержащей HCVpp (Endo2) и пустыми эндосомами (Fig. 5, Endo3 и 4 и Видео S3). При обработке SbN, события колокализации между HCVpp и Rab5-положительными структурами не наблюдались (Fig. 5E; Видео S4). Это полностью согласовывалось с нашими наблюдениями на фиксированных образцах (Fig. 3C).

Статистический анализ во времени показывал высокий уровень событий колокализации Rab5-HCV в необработанных клетках, но в клетках, обработанных SbN, *этот уровень* был близок к нулю (Fig. 5F). Эти данные показывают, что в SbN-обработанных клетках, частицы HCV остаются запертыми в клатрин-покрытых структурах и оказываются не в состоянии слиться с Rab5-положительными ранними эндосомами. Поэтому

силибинин препятствует ранним шагам вторжения HCV и эндосомальному переносу.

Силибинин препятствует вторжению других вирусов

Для определения того, является ли силибинин общим ингибитором клатрин-зависимого вторжения вируса, были протестированы влияния SbN на инфицирование вирусом гриппа путём измерения *de novo* продукции инфекционных частиц. SbN умеренно ингибировал инфицирование вирусом гриппа клеток MDCK, только если присутствовал на стадиях, предшествующих вторжению (Fig. 6A, треугольники). Это ингибирование было только частичным, поскольку вирус гриппа также использует клатрин-независимые пути вторжения (Rust et al., 2004). Затем мы оценили влияние SbN на инфицирование клеток BSC1 вирусом везикулярного стоматита (VSV) (Fig. 6B). Инфекционная проба с генетически модифицированным VSV, кодирующим люциферазу светлячка, показала, что клетки, предварительно обработанные SbN, предотвращали инфицирование дозо-зависимым образом. Интересно, что IC₅₀ для SbN для VSV был схож с тем, который наблюдался для HCV [60 и 40 μ M (Polyak et al., 2010) соответственно], что вызывает предположение, что препарат может использовать схожие ингибиторные механизмы для блокирования инфицирования HCV и VSV.

Затем мы протестировали влияние SbN на инфицирование клеток безоболочечным реовирусом млекопитающих. В присутствии препарата наблюдалось 70%-ное уменьшение количества вирион-инфицированных клеток (Fig. 6C). Напротив, он не влиял на инфицирование промежуточными субвирионными частицами (ISVPs), которые вторгаются в клетку независимо от CME (Martinez et al., 1996). Совокупно, наши результаты демонстрируют, что силибинин является мощным ингибитором, предотвращающим инфицирование вирусами, зависимыми от клатринового пути.

Силибинин препятствует СМЕ в живых клетках

Наши изложенные выше результаты не касаются того, являются ли наблюдавшиеся эффекты специфическими для вирус-содержащих клатриновых структур, или для любой клеточной клатриновой структуры. Для определения влияния силибинина на СМЕ, мы наблюдали поглощение трансферрина (Trf) в клетках Huh7.5 (Fig. 7A). Trf является связывающим железо гликопротеином, который интернализируется СМЕ после включения его клеточного рецептора. В необработанных клетках, после короткой интернализации, Trf локализовался в перинуклеарной области (Fig. 7A, модельно обработанные). В SbN-обработанных клетках, Trf детектировался в очень малом количестве клеток, либо в эндосомальных отсеках, расположенных по всей клетке, либо на плазменной мембране с малой или отсутствующей внутриклеточной локализацией (Fig. 7A SbN-обработанные и правая панель). Для дальнейшего характеризования влияния силибинина на СМЕ, мы сравнили динамики образования ССР в отсутствие или присутствии SbN. Мы использовали наши клетки BSC1, экспрессирующие AP-2-eGFP, прототипные клетки для исследований по клатрину (Boulant et al., 2011). Эксперименты невозможно было провести с клетками Huh7.5 из-за нестабильности конструкции AP-2-eGFP в этих клетках (не показано). Для модельно- и SbN-обработанных клеток, мониторился жизненный цикл ССР, соответствующий времени, прошедшему между появлением и исчезновением составляющих покрытия AP-2 (цветные стрелки на Fig. 7C). Репрезентативные диаграммы для ССР представлены на Fig. 7B. Статистический анализ выявил, что в отсутствие SbN, значащий жизненный цикл структур ССР был 34 ± 17 секунд (Fig. 7C чёрным; D - модель; Видео S5). Контрастирует с этим то, что после 10 минут (короткой) обработки 50 или 80 μ M SbN, значащий жизненный цикл ССР был заметно больше (Fig. 7C зелёным; D короткая обработка; Видео S6). После более продолжительной SbN обработки (25 мин), СМЕ последовательно снижался и большая часть ССР более не были подвижны и арестовывались на плазматической мембране (Fig. 7C красным; D длинная обработка; Видео S7). Более 25% клатрин-покрытых структур

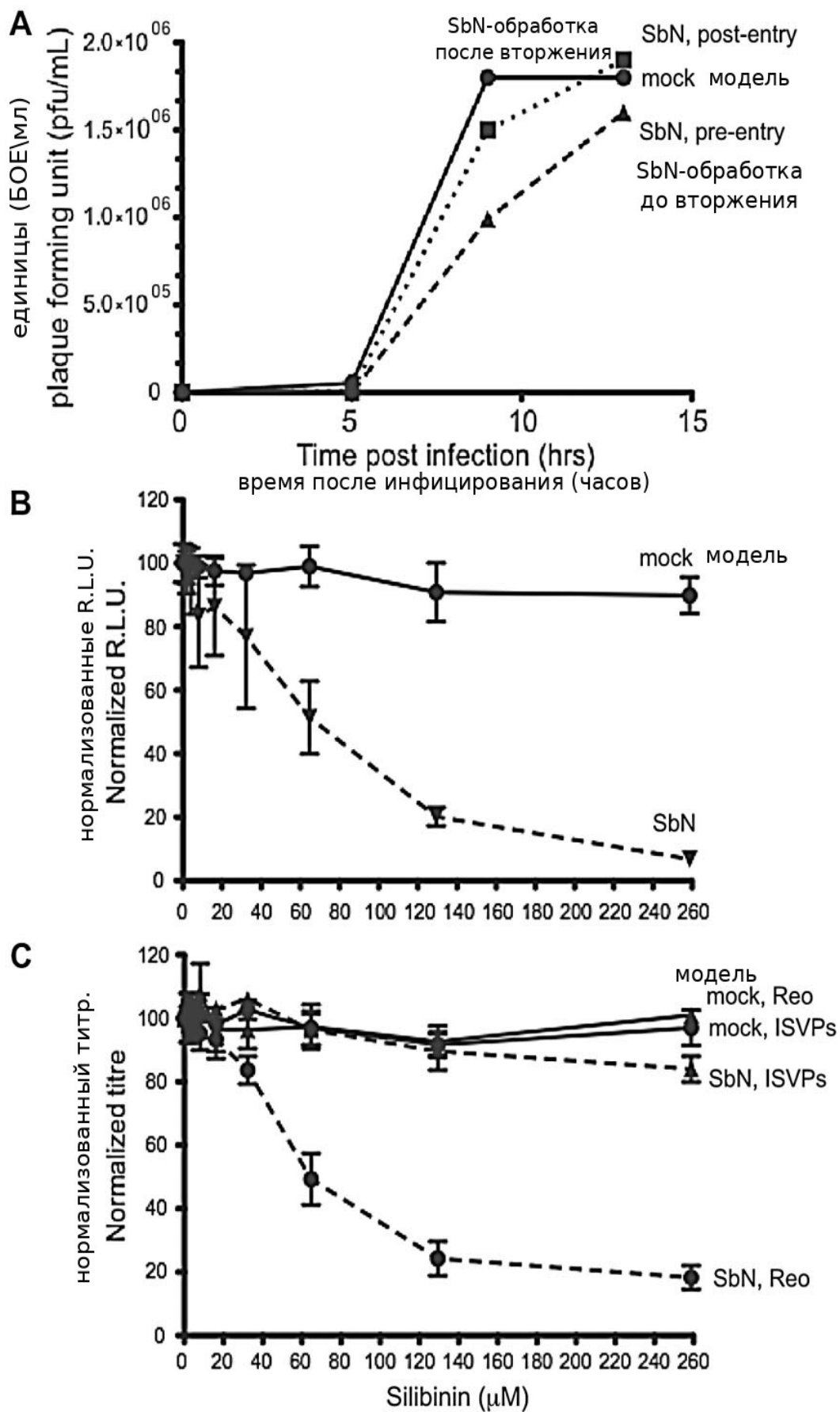
испытывали торможение в присутствии SbN, в противоположность менее чем 2% в модельно-обработанных клетках. Эти результаты демонстрируют, что силибинин последовательно снижает СМЕ путём влияния на сборку и созревания клатрин-покрытых структур. В то время как общая клеточная морфология не изменялась под воздействием силибинина, в клетках наблюдались инфраструктурные изменения. При обзорении с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ), наблюдалось ненормальное количество увеличенных плеоморфических клатрин-покрытых структур в SbN-обработанных клетках Huh7.5 (Fig. 7E). Квантификация выявила 2.2-кратное увеличение количества CCV на поверхности в SbN-обработанных клетках против необработанных клеток ($P < 0.01$). Совместно, эти результаты показывают, что силибинин замедляет СМЕ путём влияния как на сборку, так и на созревание клатрин-покрытых структур.

Fig. 6. Силибинин ингибирует инфицирование вирусами, которые вторгаются в клетки с помощью СМЕ.

А. Клетки MDCK обрабатывались модельно или SbN в течение 30 минут до инфицирования. Вирусы гриппа добавлялись на 1 час при 37°C, затем вымывались. Для оценки влияния SbN на шаги после вторжения, он добавлялся к модельно-обработанным клеткам через 1 час после отмывки. Клетки: модельно обработанные (кружки), предварительно обработанные SbN (стадия до вторжения, треугольники) или обработанные SbN после вторжения вируса гриппа (стадия после вторжения, квадраты).

В. Клетки BSC1 модельно или SbN-обрабатывались в течение 15 мин. Ген VSV , кодирующий люциферазу светлячка, добавлялся к клеткам на 30 мин. Избыточный вирус вымывался с помощью PBS и к инфицированным модельно- (сплошная линия) или SbN-обработанным (пунктирная линия) добавлялась свежая среда, содержащая SbN. Через семь часов, инфицирование VSV было оценено через экспрессию люциферазы светлячка, нормализованную к сигналу, полученному от необработанных клеток. Результаты приведены средние \pm SD трёх экспериментов.

С. То же, что В, за исключением того, что клетки инфицировались 2 часа с помощью вирионов реовируса (кружки) или ISVPs (треугольники). Через два дня после инфицирования, продукция вируса оценивалась на бляшечном образце и результаты нормализовались к титру, полученному на необработанных клетках. Результаты средние \pm SD троекратного эксперимента.



Обсуждение

Впервые, наше исследование поставляет молекулярные подробности механизма действия гепатопротектора силибинина на вторжение и слияние вируса гепатита С. Наши наблюдения ведут к следующим заключениям: (i) и водонерастворимая форма силибинина, и растворимая форма силибинина для инъекций (Legalon-SIL®) ингибируют HCV-инфицирование первичных человеческих гепатоцитов; (ii) силибинин препятствует эндосомальному переносу HCV: частицы вируса запираются в клатрин-позитивных структурах и не могут быть доставлены в ранние эндосомальные отсеки, тем самым предотвращая инфекцию; (iii) силибинин вообще тормозит СМЕ и вызывает внутриклеточное накопление клатрин-покрытых структур с помощью пока неизвестного механизма; и (iv) силибинин эффективно тормозит инфицирование клеток несколькими разными вирусами и поэтому может представлять собой противовирусное соединение широкого спектра.

Клатрин-опосредованный эндоцитоз - это преобладающий механизм, который клетки используют для поглощения внеклеточных компонентов. Многие вирусы разработали стратегии по оседланию этого пути, чтобы получить доступ к внутриклеточной среде и инфицировать клетки (Mercer et al., 2010). Было доложено, что HCV инфицирует клетки клатрин-зависимым путём (Blanchard et al., 2006; Codran et al., 2006; Coller et al., 2009). Наши результаты подтверждают эти предыдущие наблюдения и впервые демонстрируют, что, как культивированный на клетках, так и взятый из сыворотки HCV, в основном использует СМЕ для продуктивного инфицирования РНН.

Fig. 7. Силибинин изменяет клатрин-опосредованный эндоцитоз.

А. Эффект ингибирования силибинином рецептор-опосредованного поглощения Trf в клетках Huh7.5. Клетки модельно- или SbN-обработывались, инкубировались с 50 µg ml⁻¹ человеческим Trf (Alexa647) в течение 7 минут при 37°C в отсутствие или присутствии SbN, переносились в 4°C, коротко ополаскивались кислой средой для удаления связанного с мембраной Trf и подготавливались для конфокальной флуоресцентной микроскопии с вращающимся диском. Слева, репрезентативные фотографии поглощения Trf. Справа, гистограмма, описывающая влияние 80 µM SbN на поглощение Trf;

количество клеток каждой категории нормализовалось к общему количеству проанализированных клеток.

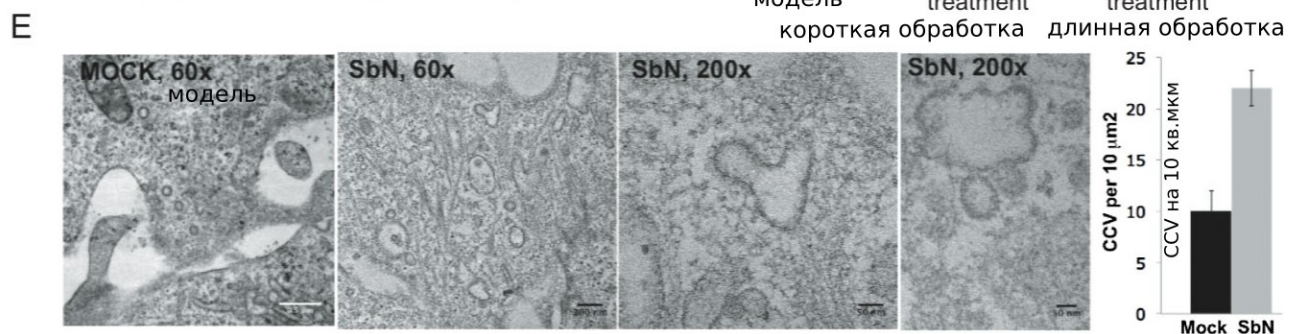
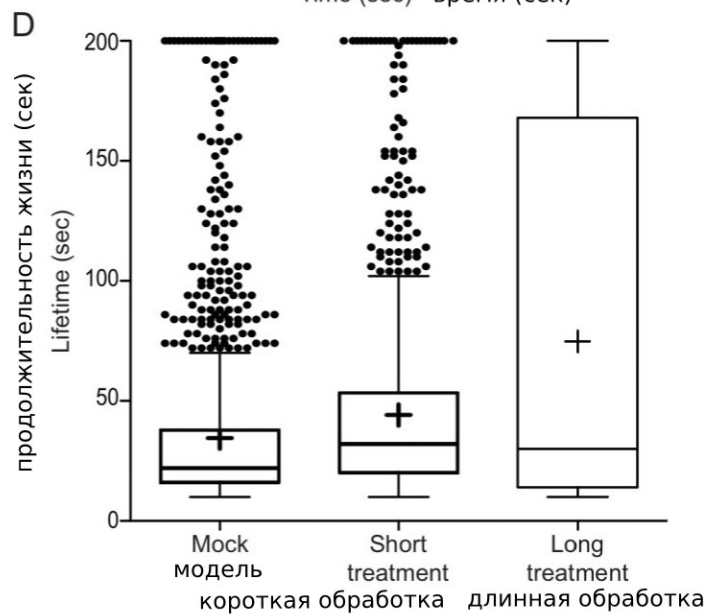
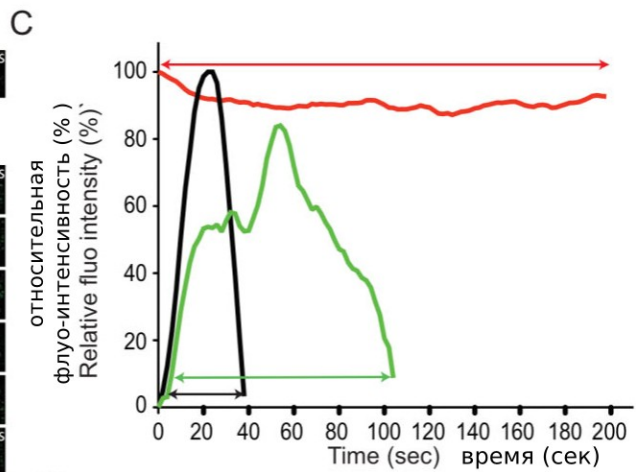
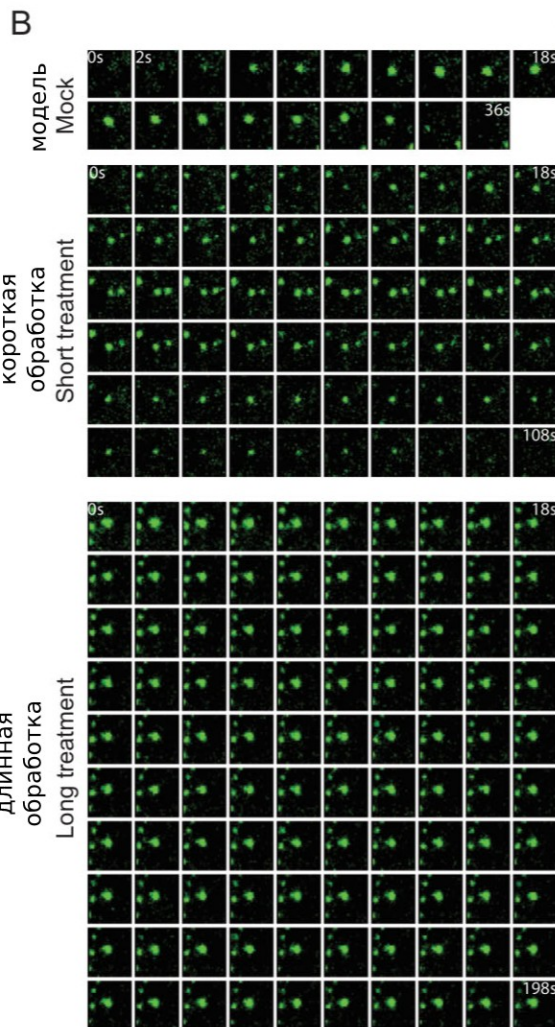
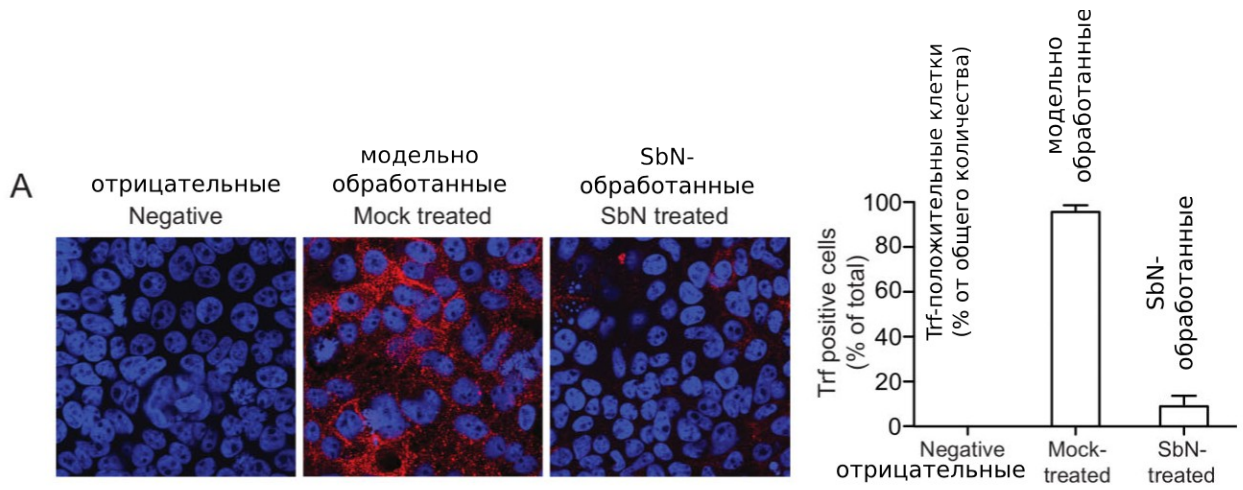
B-D. Клетки BSC1, стабильно экспрессирующие AP-2-eGFP обрабатывались SbN или DMSO (модель). Мониторилась динамика образования CCP, с использованием конфокальной микроскопии с вращающимся диском, с 2-секундным интервалом между фотографиями (Видео S5, S6 и S7). Короткая и длинная обработка: 10 и 25 минут соответственно.

B. Раскадровка при 2-секундных интервалах репрезентативного образования CCP в модельно- или SbN-обработанных клетках (короткая и длинная обработка).

C. Интенсивность флуоресценции во времени репрезентативного CCP, описанного в B, нормализованная к максимуму интенсивности флуоресценции достигнутой в ходе образования CCP (вершина кривой). AP-2-eGFP-меченые ямки в модельно- (чёрным) или SbN-обработанных клетках (короткая обработка, зелёным; длинная обработка, красным). Стрелки соответствуют продолжительности жизни CCP, от инициации CCP (детектирование AP-2-eGFP) до снятия покрытия (распад сигнала AP-2-eGFP).

D. Распределение продолжительности жизни CCP, образованных в модельно- или SbN-обработанных клетках BSC1 (короткая и длинная обработка). Представление продолжительности жизни CCP в виде прямоугольников и "усов". Данные от, как минимум, пяти клеток. Линия внутри прямоугольника означает медиану, крест означает среднее. Верхняя и нижняя части прямоугольника представляют верхний и нижний квартиль соответственно.

E. ТЕМ-исследование клеток Nuh7.5, обработанных или нет SbN в течение 30 минут. Слева направо: модельно – или SbN-обработанные ($\times 60$ k); деталь предыдущего ($\times 200$ k), другая деталь (id.); количественная оценка CCV на $10 \mu\text{m}^2$ в модельно- или SbN-обработанных клетках ($P < 0.01$, статистика теста Стьюдента).



Наш анализ динамики вторжения HCV, в масштабах как микрометров, так и нанометров, выявил интернализацию вириона в CCP и CCV в течение первых нескольких минут контакта между вирусом и плазматической мембраной клеток человеческой гепатомы или первичных гепатоцитов. Интернализация частицы HCV с помощью клатриновой машинерии требует в среднем 30–100 секунд. Это хорошо согласуется с предыдущими работами, сообщающими, что и оболочечные и безоболочечные вирусы достигают CME в течение 30–200 секунд, в зависимости от вируса (Ehrlich et al., 2004; Rust et al., 2004; Cureton et al., 2009; 2012; Boulant et al., 2013). После интернализации CCP, содержащих вирионы, CCV сбрасывает покрытие, путешествует в клетки и сливается с ранними эндосомальными отсеками. Наши исследования по имиджированию вторжения HCV в живые клетки выявило многочисленные события слияния между внутриклеточными везикулами, содержащими HCV и Rab5-положительными эндосомами, и между Rab5-положительными эндосомами, содержащими HCV или нет. Эти частые наблюдения подчеркивают роль этой GTPазы во внутриклеточном трафике HCV. (Farquhar et al., 2012). Вирионы далее сортировались по Rab7-положительным поздним эндосомам и доставлялись к эндолизосомам, причаливая к Lamp1, наиболее вероятно, для деградации. Наши наблюдения выявили, что силибинин изменяет самые первые шаги вторжения HCV и последующий внутриклеточный эндосомальный перенос, необходимый для кислотозависимого триггеринга частиц HCV. Во-первых, вскоре после добавления к клеткам, силибинин значительно уменьшал показатель интернализации вирионов в клетки. Во-вторых, силибинин изменял транспорт вирусов от внутриклеточных везикул к Rab5-положительным ранним эндосомам. HCV оставался запертым в неподвижные клатрин-позитивные структуры и более не колокализовался с Rab5-, Rab7- или Lamp1-позитивными везикулами, указывая на дефект в эндосомальном переносе. HCV, чтобы бы быть инфекционным, требуется доступ к эндосомальным отсекам, содержащим кислоту (Meertens et al., 2006; Tscherne et al., 2006). Тормозя внутриклеточный перенос, силибинин предотвращает кислотозависимый триггеринг HCV, благодаря чему роняет инфективность HCV. Поэтому, анти-HCV активность

силибинина, по всей видимости, связана с изменением внутриклеточного переноса, приводящему к блокированию созревания вирусных частиц в эндосомальных отсеках.

Реовирусная инфекция требует конверсии вириона в ISVPs внутри эндосомального отсека, pH-зависимым образом (Chandran et al., 2002). Напротив, прямое инфицирование клеток с помощью ISVPs, является независимым от pH-ацидификации (Martinez et al., 1996). Наши результаты показывают, что только инфективность вирионов реовирусов уменьшается клетках, обработанных силибинином. Эти находки наводят на мысль, что силибинин может прямо или косвенно влиять на конверсию вирионов в ISVP, поскольку надлежащая конверсия в ISVP в эндосомальном отсеке должна бы приводить к эффективному инфицированию. Стало быть, это наблюдение поддерживает модель, в которой силибинин, изменяя эндосомальный перенос, ингибирует pH-зависимый триггеринг вирусных частиц. Эта модель нуждается в тщательной демонстрации, поскольку путь вторжения ISVP реовирусов неясен и представляется клеточно-специфичным. В клетках некоторых типов, ISVP вторгаются с помощью CME, а в других, они вторгаются либо кавеолин-зависимым, либо динамин-зависимым путём (Schulz et al., 2012; Boulant et al., 2013). Стало быть, недостаток ингибирования вторжения ISVP силибинином, может быть следствием того, что ISVP вторгаются в клетки клатрин-независимым методом.

Как влияние силибинина приводит к уменьшению поглощения вирионов и к изменениям эндосомального переноса, остаётся неясным. Однако, мы наблюдали, что силибинин индуцирует уменьшение скорости формирования CCP и CCV, а TEM-анализ выявил накопление клатрин-покрытых структур внутри цитозоля. Увеличенная обработка силибинином индуцировала почти полный арест CME. Этот арест может иметь причиной исчерпание свободных клатриновых молекул и компонентов покрытия в цитозоле, в силу их накопления на везикулярных структурах, вызванного обработкой силибинином. Это оскудение резервов свободного клатрина может оборвать или арестовать образование CCP на

плазматической мембране и косвенно повлиять на внутриклеточный перенос эндосомальных отсеков. Сходный фенотип наблюдался на клетках, обеднённых ауксилином. Ауксилилин это ко-шапероновый белок, который, совместно с белком теплового шока когнатом 70 (Hsc70), поддерживает снятие покрытия с CCV. В первичных нейронных клетках, из которых удалён ауксилилин, возросло количество CCV, что повлияло на СМЕ. Секвестр компонентов покрытия CCP и CCV был предложен в качестве ответственного за арест СМЕ (Yim et al., 2010). Силибинин-опосредованное накопление клатрин-покрытых структур в цитозоле может вызывать арест или замедление СМЕ, приводящие к уменьшению уровня интернализации HCV.

Изменения эндосомального переноса также могут возникать из-за секвестра клатрина в покрытых структурах цитозоля. Это явление, вызывающее арест СМЕ, может также быть ответственным за общий дефект рециклинга фундаментальных соединений эндосомальных путей.

Альтернативный механизм изменения эндосомального переноса может быть в том, что силибинин ингибирует слияние между внутриклеточными везикулами и эндосомами. Наши предыдущий (Wagoner et al., 2011) и настоящий доклад ясно показывают, что силибинин является мощным ингибитором слияния HCVpp/липосома. Rab5 регулирует слияние эндосом; общая черта Rab(ов) и AP-2 в том, что они являются челноками между цитозолем и мембранами органелл, где связывание достигается через два геранил-геранил липида и через узнавание специфических фосфоинозидов соответственно (Kirchhausen, 2002). Из наших данных, липиды, могут, таким образом, быть общим деноминатором между молекулами, происходящими из силимарина (в частности, силибинином), HCV и эндосомальным трафиком. Эффекты этих молекул очевидны в течение минут после обработки клетки, вируса или липосомальной мембраны, что предположительно отражает скорость сквозной диффузии препарата или его инкорпорирования в мембраны. Все чистые вещества ингибировали слияние HCV в дозах, сопоставимых с ранее описанными IC50 значениями противовирусных препаратов (Polyak et al., 2010).

Биохимические анализы, выполненные с помощью поверхностного плазмонного резонанса, выявили, что обе формы силибинина показывали тропизм к липидам мембран, с очевидным сродством в том же микромолярном диапазоне, что и IC50 для слияния (J.P. Lavergne and E.I. Récheur, неопубл. Данные). Развивая эти линии, мембраны, импрегнированные молекулами, происходящими из силимарина, могут становиться неподатливыми к рекрутированию и/или разбирать машинерию, необходимую для эндосомального переноса и вторжения вируса. Эта “липидная” гипотеза поддерживается нашими данными по вирусам, таким как VSV и реовирус, и данными от других по альфа-вирусам (Pohjala et al., 2011), которые все вторгаются в свои целевые клетки частично или исключительно с помощью СМЕ. Силибинин блокировал инфицирование этими вирусами при IC50 значениях, похожих на те, которые ингибировали вторжение, слияние и инфицирование HCV (Polyak et al., 2010; Wagoner et al., 2011). Также, выстеленные силибином мембраны могут быть неподатливыми к слиянию, что напоминает описанное нами ингибирование слияния HCV маленькой молекулой арбидола (Teissier et al., 2011).

Наши результаты указывают на способ действия, где *in cellulo*, силибинин предотвращает инфицирование HCV путём торможения как вторжения вируса, так и эндосомального переноса. Наблюдалось чёткое воздействие на СМЕ, которое может, по крайней мере частично, отвечать за противовирусную активность силибинина. Наши находки *in cellulo*, что силибинин может предотвращать инфицирование различными вирусами, ведут к обоснованному предположению, что силибинин имеет общее клеточное воздействие, а не специфическую противовирусную активность, направленную на конкретные вирусные функции.

Силибинин десятилетиями используется как гепатопротектор и на сегодня не описано никакой ассоциированной токсичности. Стало быть, маловероятно, что в инъекциях пациентам, силибинин в форме Legalon-SIL® , также вызывает арест СМЕ. Молекулярные механизмы, с помощью которых силибинин препятствует HCV-инфицированию у пациентов и

препятствует реинфицированию пересаженной печени (Beinhardt et al., 2011) остаются туманными. Учитывая отсутствие токсичности, закономерно предположить, что СМЕ не полностью арестовывается, а что скорость эндоцитоза мягко понижается, что может изменить самые ранние шаги вторжения HCV с последующими пертурбациями на стадии слияния. Лёгкие пертурбации тайминга событий этого тонко контролируемого явления, могут направлять частицы HCV по пути деградации, вместо продуктивного пути инфекции. Также было показано, что силибинин бьёт по поздним стадиям HCV-инфекции, такой как репликация HCV, как *in cellulo*, так и в клинике (Polyak et al., 2010; 2013; Wagoner et al., 2011; Esser-Nobis et al., 2013). Силибинин не ингибировал репликацию разных генотипов HCV вследствие мутации неструктурного белка NS4B (Esser-Nobis et al., 2013). Поэтому точный способ действия силибинина в пациентах нужно характеризовать далее, поскольку иммуномодулирующие эффекты силибинина (ингибирование пролиферации Т-клеток, подавление воспаления) также могут объяснять его противовирусную активность (Wagoner et al., 2011; McClure et al., 2012).

Одобрённые на сегодняшний день анти-HCV терапии базируются на пегилированном IFN, рибавирине и специфических ингибиторах ферментов HCV. Доказано, что этот многопрепаратный режим эффективен (Farnik and Zeuzem, 2012); однако, хотя он и уменьшает вирусную нагрузку у инфицированных пациентов, он не предотвращает размножение вируса, поскольку не нацелен на стадии вторжения вируса. Добавление к этому режиму такого противовирусного соединения как силибинин, который нацелен на ранние стадии жизненного цикла HCV может улучшить эффективность терапии.

Экспериментальные процедуры

Клетки и вирусы

РНН изолировались из капсулированных резекций печени двух разных доноров (357 и 366) (Pichard et al., 2006). РНН держались три дня в среде Ланфордапри 37°C в увлажнённой 5% атмосфере CO₂. Клетки предварительно обрабатывались

с помощью CPZ ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$, 90 мин) и инфицировались $25 \mu\text{l}$ сывороточного HCV генотипов 1b или 3a (вирусные нагрузки соответственно 2.1×10^7 и 7.0×10^6 копий РНК на ml^{-1}). После 16 часов при 37°C , прививочный материал удалялся, монослои отмывались с помощью среды Е Вильямса и добавлялась свежая среда Ланфорда. Клетки собирались после 72 часов после инфицирования. Общая РНК изолировалась с использованием раствора гуанидин изотиоцианата (RNAlater, Eurobio) и оценивалась с помощью Nanodrop TM на 260 nm. Внутриклеточные HCV нить-РНК позитивные уровни квантифицировались с помощью RT-qPCR техники, с использованием SuperScript III Platinum One-Step количественной RT-PCR системы (Invitrogen) и LightCycler®480 Real-Time PCR System. Клетки Huh7.5 и BSC1 были выращены и описаны (Polyak et al., 2010; Boulant et al., 2011). Приготовление запаса и титра JFH-1 осуществлялась по Wakita et al., 2005. Штаммы реовируса млекопитающих T1L, происходящие из запасов, полученных от B.N. Fields, выращивались и очищались как описано у Furlong et al., 1988. Вирионы титровались по анализу плашек (Middleton et al., 2002).

Анализы жизнеспособности клеток

РНН из печени донора FT383 сеялись в 96-луночной пластинке и обрабатывались при условиях, использовавшихся для инфекционного теста. Все эксперименты проводились триплетами. После 48 часов контакта с Legalon-SIL® или SbN, супернатант удалялся, добавлялось $50 \mu\text{l}$ PBS, затем $50 \mu\text{l}$ реагента CellTiter-Glo (люминесцентный образец Promega). Биолюминесценция измерялась через 10 минут с использованием ридера микропластин Mithras LB940 (Berthold Technologies, Thoiry, France). Жизнеспособность клеток Huh7.5 в присутствии возрастающих концентраций Legalon-SIL® или SbN оценивалась с использованием соединения MTS, производного тетразолиума (Cory et al., 1991).

Силимарин, силибинин и чистые соединения

Они готовились и использовались как описано: Graf et al., 2007; Polyak et al., 2010; Wagoner et al., 2010. Legalon-SIL TM был щедрым подарком от R.T. Pohl (Madaus GmbH, Кёльн, Германия).

Анализы маркировки и слияния HCVpp

Концентрированные HCVpp приготовленные по Bartosch et al., 2003; Teissier et al., 2011, инкубировались с $2 \mu\text{M}$ R18 (финал) при 4°C в течение 30 минут, как описано у Lavillette et al., 2006. После 16-часового центрифугирования при 150

000 g на 20–60% градиенте сахарозы при 4°C, были собраны фракции по 0.7 ml, проанализированные на целостность с помощью TEM-наблюдения, на инфекционность с помощью экспрессии люциферазы (Chapel et al., 2007), на E2 и GAG вируса мышинной лейкемии с помощью иммунофлуоресценции, и на R18-флуоресценцию. Для имиджирования живых клеток использовались только фракции, сочетавшие все правильные показания, после удаления сахарозы путём 45-минутного центрифугирования на 150 000 g и ресуспезии на ледяном PBS. Слияние между HCVpp и R18-мечеными липосомами выполнялись по Lavillette et al., 2006.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ)

Клетки Huh7.5, инфицированные вирусом JFH-1 (MOI 3) приготавливались к TEM-наблюдению после иммуно-золотого маркирования с помощью анти-E2 антитела AP-33, как детально описано Maillard et al., 2011. В некоторых экспериментах, клетки преинкубировались с человеческим моноклональным антителом CBH-5 (10 µg ml⁻¹), нацеленным на HCV E2, перед добавлением вирионов JFH-1 и с дальнейшим маркированием ядра HCV.

Иммунофлуоресцентная микроскопия

Клетки Huh7.5 (40 000 на лунку) сеялись на 13-мм круглые стекла за 24 часа до инфицирования. Клетки отмывались с помощью PBS и культурная среда, содержащая 80 µM SbN или DMSO добавлялась течение 1 часа. Клетки, помещенные на лед, инфицировались 1 час с помощью JFH-1 HCV (MOI 1). Несвязавшийся вирус смывался с помощью PBS, добавлялась культурная среда с или без силибина и клетки переносились в 37°C. Стекла фиксировались 2% PFA, через 30 мин, 60 или 90 мин после сдвига температуры. HCV иммуно-окрашивался моноклональным мышинным анти-ядерным антителом (C7-50, AbCam), а эндоцитозные отсеки – антиклатриновым, анти-Rab5, анти-Lamp1 или анти-Rab7 антителами (Abcam). Стекла имиджировались с использованием Leica Confocal Spectral TCS SP5 AOBS. Инфекционность вирусов при обработке SbN или Legalon-SIL® клеток Huh7.5 определялась последовательными разбавлениями вирионов JFH-1, начиная с MOI равного 1. После 72 часов в культуре, клетки фиксировались метанолом/ацетоном и приготавливались к иммунофлуоресценции ядра HCV с использованием антитела C7-50. Флуоресцентные фокусы инфицирования (выраженные в FFU ml⁻¹; FFU, focus-forming units – фокусобразующие единицы) подсчитывались под микроскопом, в трех отдельных экспериментах.

Поглощение трансферрина

Клетки Huh7.5 предварительно обрабатывались при 37°C с помощью 50 или 80 μM SbN в течение 10 или 25 минут в модифицированной среде Eagle's от Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)) с 10% FBS. Клетки, отмытые с помощью PBS, инкубировались с Alexa647-меченым Trf (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, финал) в дополнительном DMEM, с или без 50 или 80 μM силибинина в течение 7 минут при 37°C. Клетки отмывались ледяным PBS для удаления несвязавшегося Trf и фиксировались 4% PFA. Квантификация поглощения Trf проводилась при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии. Клетки, показывающие Alexa647-флуоресцентный Trf, локализованный вблизи ядра считались положительными. Клетки, демонстрирующие в своём интерьере мало или отсутствие меченого Trf, с меченым Trf локализованным на плазматической мембране, считались негативными. Для каждого состояния подсчитывались как минимум 50 клеток.

Инфицирование вирусом гриппа и реовирусом

Клеткам MDCK разрешалось поляризоваться путём посева на стеклах за 2–3 дня до инфекции. Клетки, обработанные или нет SbN в течение 30 минут прививались вирусами гриппа в течение 1 часа при 37°C и отмывались. Для оценки влияния SbN на шаги после вторжения, препарат добавлялся к клеткам через 1 час после отмытки. Для инфицирования реовирусом, клетки MDCK отмывались с помощью PBS, и добавлялась DMEM, содержащая 80 μM SbN или DMSO на 20 min при 37°C. Вирионы реовируса или ISVP добавлялись к клеткам при MOI, дающей 50% инфицированных клеток в модельно-обработанных условиях, на 2 часа, при 37°C в отсутствии или присутствии возрастающих доз SbN. Клетки отмывались ледяным PBS и добавлялись моноклональные анти- $\sigma 1$ 5E6 нейтрализующие антитела на 2 часа при 4°C (финальная концентрация 1–2 $\mu\text{g ml}^{-1}$). После ледяных PBS-отмыток, к клеткам добавлялась свежая полная среда на 8–12 часов при 37°C. Клетки затем фиксировались с помощью 4% PFA и иммуноокрашивались с использованием поликлонального кроличьего anti- μNS . Фракция инфицированных клеток оценивалась путём флуоресцентной микроскопии.

Анализ VSV инфицирования

Клетки BSC1 предварительно обрабатывались SbN или DMSO (модель). VSV добавлялся к клеткам на 30 минут. Вирионы удалялись путём отмытки клеток, и

среда, содержащая SbN добавлялась к SbN-преобработанным клеткам, и, для контроля как жизнеспособности клеток, так и неспецифического действия препарата, среда, содержащая SbN добавлялась к модельно-обработанным клеткам.

Имиджирование живых клеток, сбор данных и имидж-анализ

Клетки BSC1, экспрессирующие AP-2 $\sigma 2$ субъединицы, слитые с eGFP держались 12–16 часов при 37°C перед имиджированием. Клетки помещались в перфузионную камеру и держались в феноловой, без красного, DMEM, с добавкой 10% FBS и 20 mM HEPES pH 7.4. Среда заменялась 50 или 80 μ M SbN в той же среде. При различных временах после добавления SbN, динамика образования CCP мониторилась флуоресцентной конфокальной микроскопией живых клеток с вращающимся диском, с имиджированием нижней поверхности клеток [в контакте со стеклом (Saffarian et al., 2009)]. Снимки сохранялись с использованием Slidebook 5 (Intelligent Imaging Zi). Видео брались при частоте 0.5 Hz при времени экспозиции 50 мс, всего 100 рамок. AP-2-покрытые флуоресцентные структуры идентифицировались и отслеживались с использованием программы MATLAB IMAB (Boulant et al., 2011). Клетки Huh7.5 (40 000 на лунку) сеялись на 24 h на двухлуночную камеру LAB-TEK и трансфицировались eGFP-клатрином, с использованием JetPrime™ Polyplus-transfection (Ozyme) согласно производителю. Альтернативно, клетки Huh7.5 трансдуцировались с помощью CellLight® Early Endosomes-eGFP *VaccMam 2.0* (Invitrogen). Имиджирование живых клеток проводилось в период от 48 до 72 часов после трансфекции/трансдукции. Клетки отмывались с помощью фенольной, без красного, DMEM/F-12 (Invitrogen). Среда, содержащая 80 μ M SbN или Legalon-SIL® или DMSO добавлялась к клеткам на 1 час. Помещённые на лёд клетки инфицировались, без света, в течение 1 часа с помощью 40 μ l R18-меченых очищенных HCVpp. Несвязавшийся вирус отмывался при 37°C с помощью DMEM/F-12, содержащей SbN, Legalon-SIL® или DMSO. Пластика помещалась в 37°C-термостатированную камеру микроскопа с 5% CO₂. Перенос вирионов мониторился с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии живых клеток с вращающимся диском. Снимки делались путём последовательных RFP/eGFP экспозиций 200–400 ms каждые 800 ms в течение 15 минут, или каждые 30 секунд в течение 150 минут, с использованием программы 7.5.4 Metamorph (Molecular Devices). Флуоресцентные клатрин-покрытые структуры, Rab5-позитивные эндосомы и вирионы

идентифицировались с использованием ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Траектории определялись с помощью ImageJ plug-in Manual_Tracking (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>).

Статистический анализ

Снимки переноса вирионов делались каждые 30 секунд в течение 150 минут, на случайно выбранной панели в 25 клеток, и было сделано два отдельных эксперимента. С использованием методов обработки снимков, подсчитывались количества клатрин-позитивных или Rab5-позитивных структур и вирионов. Затем вычислялось количество событий колокализации между клатриновыми или Rab5-структурами и HCV. Чтобы оценить ошибку измерений этого количества и HCV, вычислялось среднее значение и стандартное отклонение этих количеств с использованием подсчетов через 6-минутный период. Отношение событий колокализации к HCV вычислялось так, чтобы быть независимым от размера клетки. Поскольку оцененное количество событий не следовало гауссовскому распределению, использовался ROOT Tefficiency метод, базирующийся на доверительных пределах Clopper-Pearson (<http://root.cern.ch/root/html/TEfficiency.html>). Другие статистические анализы делались с использованием t-теста Стьюдента.

Благодарности

Мы благодарим С.М. Rice за клетки Huh7.5, J. Dubuisson за плазмиды и антитела HCVpp, Т. Wakita за вирус JFH-1, Р. Briolotti за экспертную техническую помощь с культурами РНН, R-T. Pohl за щедрый дар Legalon-SIL TM, С. Chamot, О. Duc и С. Lionnet за обучение и помощь при имиджировании клеток (PLATIM, ENS Lyon), J.J. Blaising (CERN, Женева) за экспертизу статистических анализов, Centre Technique des Microstructures за TEM-имиджирование (Université Lyon 1), А.Н. Patel за AP-33, S. Fong за антитела CBH-5 и J. Klinghauf за eGFP-клатриновые плазмиды. E-I.P. поддержано фондом FINOVI и ANRS. S.B. поддержано Harvard Digestive Disease Consortium Feasibility Award, стипендией GlaxoSmithKline и фондом CHS foundation, Германия. S.J.P и N.H.O. частично поддержаны грантом NIH R01AT006842. J.B. является получателем PhD-гранта от Cluster Infectiologie Région Rhône Alpes.

Литература

- Ahmed-Belkacem, A., Ahnou, N., Barbotte, L., Wychowski, C., Pallier, C., Brillet, R., et al. (2010) Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. (Силибинин и сопутствующие соединения являются прямыми ингибиторами РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса гепатита С). *Gastroenterology* 138: 1112–1122.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.L. (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. (Инфекционные псевдочастицы вируса гепатита С содержащие функциональные E1-E2 свёрнутые белковые комплексы) *J Exp Med* 197: 633–642.
- Beinhardt, S., Rasoul-Rockenschaub, S., Scherzer, T.M., and Ferenci, P. (2011) Silibinin monotherapy prevents graft infection after orthotopic liver transplantation in a patient with chronic hepatitis C. (Монотерапия силибинином предотвращает инфицирование трансплантата после ортотопической пересадки печени у пациента с хроническим гепатитом С). *J Hepatol* 54: 591–592; author reply 592–593.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. (Вторжение вируса гепатита С зависит от клатрин-опосредованного эндоцитоза). *J Virol* 80: 6964–6972.
- Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J.C., Ubelmann, F., and Kirchhausen, T. (2011) Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. (Динамика актина противостоит напряжению мембраны в ходе клатрин-опосредованного эндоцитоза). *Nat Cell Biol* 13: 1124–1131.
- Boulant, S., Stanifer, M., Kural, C., Cureton, D.K., Massol, R., Nibert, M.L., and Kirchhausen, T. (2013) Similar uptake but different trafficking and escape routes of reovirus virions and ISVPs imaged in polarized MDCK cells. (Сходное поглощение, но разный перенос и пути выхода вирионов реовируса и ISVP в поляризованных клетках MDCK). *Mol Biol Cell* 24: 1196–1207.

- Chandran, K., Farsetta, D.L., and Nibert, M.L. (2002) Strategy for nonenveloped virus entry: a hydrophobic conformer of the reovirus membrane penetration protein micro 1 mediates membrane disruption. (Стратегия вторжения безоболочечного вируса: протеин микро 1 - гидрофобный конформер проникновения реовируса через мембрану - опосредует прорыв мембраны). *J Virol* 76: 9920– 9933.
- Chapel, C., Garcia, C., Bartosch, B., Roingeard, P., Zitzmann, N., Cosset, F.L., et al. (2007) Reduction of the infectivity of hepatitis C virus pseudoparticles by incorporation of misfolded glycoproteins induced by glucosidase inhibitors. (Уменьшение инфективности псевдочастиц вируса гепатита С путём инкорпорирования развёрнутых гликопротеинов, индуцированного ингибиторами глюкозидазы.) *J Gen Virol* 88: 1133–1143.
- Codran, A., Royer, C., Jaeck, D., Bastien-Valle, M., Baumert, T.F., Kieny, M.P., et al. (2006) Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. (Вторжение псевдотипов вируса гепатита С внутрь первичных гепатоцитов путём клатрин-зависимого эндоцитоза). *J Gen Virol* 87: 2583–2593.
- Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R., and Randall, G. (2009) RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. (Анализ РНК интерференции и трекинга единичных частиц эндоцитоза вируса гепатита С). *PLoS Pathog* 5: e1000702.
- Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., and Cory, J.G. (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. (Использование водорастворимой тетразолиум/формазан пробы для анализов клеточного роста в культуре). *Cancer Commun* 3: 207–212.
- Cureton, D.K., Massol, R.H., Saffarian, S., Kirchhausen, T.L., and Whelan, S.P. (2009) Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. (Вирус везикулярного стоматита вторгается в клетки для интернализации через везикулы, неполностью покрытые клатрином, что зависит от актина). *PLoS Pathog* 5: e1000394.
- Cureton, D.K., Harbison, C.E., Cocucci, E., Parrish, C.R., and Kirchhausen, T. (2012) Limited transferrin receptor clustering allows rapid diffusion of canine parvovirus into

- clathrin endocytic structures. (Ограниченная кластеризация рецептора трансферрина позволяет быструю диффузию собачьего парвовируса в клатриновые внутриклеточные структуры). *J Virol* 86: 5330–5340.
- Dahari, H., Guedj, J., and Perelson, A.S. (2011) Silibinin mode of action against hepatitis C virus: a controversy yet to be resolved. (Способ действия силибинина против вируса гепатита С: полемика, требующая разрешения) *Hepatology* 54: 749.
- Davis-Searles, P.R., Nakanishi, Y., Kim, N.C., Graf, T.N., Oberlies, N.H., Wani, M.C., et al. (2005) Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. (Расторопша и рак простаты: отличительные воздействия чистых флавонолигнанов из *Silybum marianum* на антипролиферативные конечные точки клеток карциномы простаты человека). *Cancer Res* 65: 4448–4457.
- Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M.L., and Kirchhausen, T. (2004) Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. (Эндоцитоз путём случайной инициации и стабилизации клатрин-покрытых ямок). *Cell* 118: 591–605.
- Esser-Nobis, K., Romero-Brey, I., Ganten, T.M., Gouttenoire, J., et al. (2013) Analysis of hepatitis C virus resistance to silibinin in vitro and in vivo points to a novel mechanism involving nonstructural protein 4B. (Анализ резистентности вируса гепатита С к силибину in vitro и in vivo указывает на новый механизм, включающий неструктурный белок 4B). *Hepatology* 57: 953–963.
- Farnik, H., and Zeuzem, S. (2012) New antiviral therapies in the management of HCV infection. (Новые противовирусные терапии в управлении инфекцией HCV). *Antivir Ther* 17: 771–783.
- Farquhar, M.J., Hu, K., Harris, H.J., Davis, C., Brimacombe, C.L., Fletcher, S.J., et al. (2012) Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. (Вирус гепатита С вызывает CD81 и клаудин-1 эндоцитоз) *J Virol* 86: 4305–4316.
- Ferenci, P., Scherzer, T.M., Kerschner, H., Rutter, K., Beinhardt, S., Hofer, H., et al. (2008) Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not

- responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. (Силибинин является мощным антивирусным агентом у пациентов с хроническим гепатитом С, не отвечающих на терапию пегилированным интерфероном/рибавирином). *Gastroenterology* 135: 1561–1567.
- Furlong, D.B., Nibert, M.L., and Fields, B.N. (1988) Sigma 1 protein of mammalian reoviruses extends from the surfaces of viral particles. (Белок Sigma 1 реовирусов млекопитающих выступает за поверхности вирусных частиц). *J Virol* 62: 246–256.
- Graf, T.N., Wani, M.C., Agarwal, R., Kroll, D.J., and Oberlies, N.H. (2007) Gram-scale purification of flavonolignan diastereoisomers from *Silybum marianum* (Milk Thistle) extract in support of preclinical in vivo studies for prostate cancer chemoprevention. (Выделенные из экстракта *Silybum marianum* (расторопши) очищенные диастереоизомеры флавонолигнанов в граммовом масштабе, в поддержку доклинических in vivo исследований химиопревенции рака простаты). *Planta Med* 73: 1495–1501.
- Haid, S., Pietschmann, T., and Pécheur, E.I. (2009) Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. (Низкое, pH-зависимое слияние вируса гепатита С с мембраной зависит от целостности E2, целевой липидной композиции и плотности вирусных частиц). *J Biol Chem* 284: 17657–17667.
- Hawke, R.L., Schrieber, S.J., Soule, T.A., Wen, Z., Smith, P.C., Reddy, K.R., et al. (2010) Silymarin ascending multiple oral dosing phase I study in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. (Мультиплицированное исследование фазы I возрастающих пероральных доз силимарина для пациентов с хроническим гепатитом С, без цирроза). *J Clin Pharmacol* 50: 434–449.
- Kirchhausen, T. (2002) Clathrin adaptors really adapt. (Клатриновые адапторы на самом деле адаптируют). *Cell* 109: 413–416.
- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.L., Penin, F., and Pécheur, E.I. (2006) Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. (Гликопротеины вируса гепатита С опосредуют низкое pH-зависимое слияние мембраны с липосомами). *J Biol Chem* 281: 3909–3917.

- McClure, J., Lovelace, E.S., Elahi, S., Maurice, N.J., Wagoner, J., Dragavon, J., et al. (2012) Silibinin inhibits HIV-1 infection by reducing cellular activation and proliferation. (Силибинин ингибирует ВИЧ-1 инфекцию путём уменьшения клеточной активации и пролиферации). PLoS ONE 7: e41832.
- Maillard, P., Walic, M., Meuleman, P., Roohvand, F., Huby, T., Le Goff, W., et al. (2011) Lipoprotein lipase inhibits hepatitis C virus (HCV) infection by blocking virus cell entry. (Липопротеинлипаза ингибирует инфекцию вируса гепатита С (HCV) путём блокирования вторжения вируса в клетку). PLoS ONE 6: e26637.
- Martinez, C.G., Guinea, R., Benavente, J., and Carrasco, L. (1996) The entry of reovirus into L cells is dependent on vacuolar proton-ATPase activity. (Вторжение реовируса внутрь L клеток зависит от активности вакуолярной протон-АТФазы) J Virol 70: 576–579.
- Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006) Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. (Вторжение вируса гепатита С требует критической постинтернализационной стадии и доставки к ранним эндосомам через клатрин-покрытые везикулы). J Virol 80: 11571–11578.
- Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A. (2010) Virus entry by endocytosis. (Вторжение вирусов с помощью эндоцитоза). Annu Rev Biochem 79: 803–833.
- Middleton, J.K., Severson, T.F., Chandran, K., Gillian, A.L., Yin, J., and Nibert, M.L. (2002) Thermostability of reovirus disassembly intermediates (ISVPs) correlates with genetic, biochemical, and thermodynamic properties of major surface protein mu1. (Термостабильность интермедиаторов разборки реовируса (ISVPs) коррелирует с генетическими, биохимическими и термодинамическими свойствами главного поверхностного белка mu1) J Virol 76: 1051–1061.
- Mukherjee, S., and Sorrell, M.F. (2008) Controversies in liver transplantation for hepatitis C. (Дискуссии о трансплантации печени при гепатите С). Gastroenterology 134: 1777–1788.

- Pichard, L., Raulet, E., Fabre, G., Ferrini, J.B., Ourlin, J.C., and Maurel, P. (2006) Human hepatocyte culture. (Культура человеческих гепатоцитов). *Methods Mol Biol* 320: 283–293.
- Pohjala, L., Utt, A., Varjak, M., Lulla, A., Merits, A., Ahola, T., and Tammela, P. (2011) Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. (Ингибиторы вторжения и репликации альфавируса идентифицированы со стабильной клеточной линией репликона Chikungunya и пробах, основанных на вирусе). *PLoS ONE* 6: e28923.
- Polyak, S.J., Morishima, C., Shuhart, M.C., Wang, C.C., Liu, Y., and Lee, D.Y. (2007) Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF- κ B signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. (Ингибирование стандартизированным Силимарином воспалительных цитокинов Т-клеток, NF- κ B сигнализации гепатоцитов и инфицирования HCV). *Gastroenterology* 132: 1925–1936.
- Polyak, S.J., Morishima, C., Lohmann, V., Pal, S., Lee, D.Y., Liu, Y., et al. (2010) Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. (Идентификация гепатопротекторных флавонолигнанов из силимарина). *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 5995–5999.
- Polyak, S.J., Oberlies, N.H., Pécheur, E.I., Ferenci, P., and Pawlotsky, J. (2013) Silymarin for HCV infection. (Силимарин для HCV инфекции). *Antivir Ther* 18: 141–147.
- Rust, M.J., Lakadamyali, M., Zhang, F., and Zhuang, X. (2004) Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. (Сборка внутриклеточной машинерии вокруг индивидуальных вирусов гриппа в ходе вирусного вторжения). *Nat Struct Mol Biol* 11: 567–573.
- Rutter, K., Scherzer, T.M., Beinhardt, S., Kerschner, H., Stattermayer, A.F., Hofer, H., et al. (2011) Intravenous silybinin as ‘rescue treatment’ for on-treatment non-responders to pegylated interferon/ribavirin combination therapy. (Внутривенный силибинин, как “спасительное лекарство” для не-ответчиков в ходе терапии пегилированным интерфероном/рибавирином). *Antivir Ther* 16: 1327–1333.

- Saffarian, S., Cocucci, E., and Kirchhausen, T. (2009) Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. (Отчётливая динамика эндоцитозных клатрин-покрытых ямок и покрытых бляшек). PLoS Biol 7: e1000191.
- van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., and Smit, J.M. (2008) Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. (Секционирование пути клеточного вторжения вируса лихорадки денге путём трекинга отдельных частиц в живых клетках). PLoS Pathog 4: e1000244.
- Schulz, W.L., Haj, A.K., and Schiff, L.A. (2012) Reovirus uses multiple endocytic pathways for cell entry. (Реовирус использует множественные эндоцитозные пути для вторжения в клетку). J Virol 86: 12665–12675.
- Tamayo, C., and Diamond, S. (2007) Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.). (Обзор клинических испытаний безопасности и эффективности расторопши (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) Integr Cancer Ther 6: 146–157.
- Teissier, E., Zandomenighi, G., Loquet, A., Lavillette, D., Lavergne, J.P., Montserret, R., et al. (2011) Mechanism of inhibition of enveloped virus membrane fusion by the anti-viral drug arbidol. (Механизм ингибирования мембранного слияния оболочечного вируса антивирусным препаратом арбидол). PLoS ONE 6: e15874.
- Tscherne, D.M., Jones, C.T., Evans, M.J., Lindenbach, B.D., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. (Активация вируса гепатита С, в зависимости от времени и температуры, для вторжения, триггерованного низким pH). J Virol 80: 1734–1741.
- Wagoner, J., Negash, A., Kane, O.J., Martinez, L.E., Nahmias, Y., Bourne, N., et al. (2010) Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. (Множественные влияния силимарина на жизненный цикл гепатита С). Hepatology 51: 1912–1921.
- Wagoner, J., Morishima, C., Graf, T.N., Oberlies, N.H., Teissier, E., Pécheur, E.I., et al. (2011) Differential in vitro effects of intravenous versus oral formulations of silibinin

on the HCV life cycle and inflammation. (Дифференциальные *in vitro* влияния внутривенного против перорального приёма силибинина на жизненный цикл HCV и воспаление). PLoS ONE 6: e16464.

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., et al. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. (Производство инфекционного вируса гепатита С в тканевой культуре из клонированного вирусного генома). Nat Med 11: 791–796.

Yim, Y.I., Sun, T., Wu, L.G., Raimondi, A., De Camilli, P., Eisenberg, E., and Greene, L.E. (2010) Endocytosis and clathrin-uncoating defects at synapses of auxilin knockout mice. (Эндоцитоз и дефекты клатрин-раскрытия синапсов у мышей с выбитым аукселином). Proc Natl Acad Sci USA 107: 4412–4417.

Поддерживающая информация

На веб-сайте издателя можно найти Дополнительную Поддерживающую Информацию в онлайн-версии этой статьи:

Видео S1. Временная серия интернализации R18-меченых HCVpp (красным) в eGFP-CCP (зелёным) в отсутствие силибинина, промониторенная с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии живых клеток с вращающимся диском. Видео 2D, временные серии получены через последовательные RFP/eGFP экспозиции на 200–400 мс каждые 800 мс. Линейка 1 μm .

Видео S2. Похоже на Видео S1, в присутствии 80 μM силибинина. Линейка 1 μm .

Видео S3. Временные серии переноса R18-меченых HCVpp (красным) в eGFP-Rab5-положительные эндосомы (зелёным) в отсутствие силибинина, промониторенные как описано для Видео S1. Линейка 1 μm .

Видео S4. Похоже на Видео S3, в присутствии 80 μM силибинина. Линейка 1 μm .

Видео S5, S6 и S7. Влияние силибинина на динамику образования CCV. Временные серии, сравнивающие динамику образования CCV в клетках BSC1 в

отсутствии и присутствии силибинина. Клетки BSC1 были модельно обработаны или SbN-обработаны в течение разных промежутков времени. Видео S5, S6 и S7, клетки модельно обработаны, предварительно обработаны силибинином 10 минут и 25 минут соответственно. Видео 2D, временные серии выполнены для

100 рамок на 2-секундных интервалах, получены с помощью конфокальной микроскопии с вращающимся диском и с использованием времени экспозиции 50 мс.