

УДК 577.213:578.891:004.942

## ПОДАВЛЕНИЕ РЕПЛИКАЦИИ СУБГЕНОМНОГО РНК РЕПЛИКОНА ВИРУСА ГЕПАТИТА С ИНГИБИТОРОМ NS3 ПРОТЕАЗЫ SCH 503034 В Huh-7 КЛЕТКАХ: СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

© 2012 г. Е.Л. Мищенко<sup>1</sup>, Н.В. Иванисенко<sup>1,2</sup>, И.Р. Акбердин<sup>1</sup>, П.С. Деменков<sup>1</sup>, В.А. Лихошвай<sup>1,2</sup>, Н.А. Колчанов<sup>1,2</sup>, В.А. Иванисенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: elmish@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 14 мая 2012 г. Принята к публикации 6 июня 2012 г.

Вирус гепатита С (ВГС) вызывает опасное заболевание печени, часто сопровождающееся циррозом и гепатоклеточной карциномой. Против ВГС до сих пор нет эффективной терапии. Для предсказания эффективности действия новых потенциальных лекарств, направленных против ВГС, актуально применение математического моделирования. Впервые предложена стохастическая модель репликации субгеномного РНК репликона ВГС в Huh-7 клетках в присутствии ингибитора NS3 протеазы ВГС SCH 503034. Модель описывает экспериментально полученные кинетики подавления вирусной РНК в присутствии разных концентраций SCH 503034 и может применяться для разработки оптимальных стратегий подавления РНК ВГС в Huh-7 клетках.

**Ключевые слова:** вирус гепатита С, субгеномный репликон, математическое моделирование, эффективность лекарств.

### Введение

В настоящее время вирус гепатита С (ВГС) широко распространен в мире, однако до сих пор против него не разработано ни эффективной терапии, ни вакцины (Zoulim *et al.*, 2003). Плюс-цепь РНК генома ВГС (~9,600 нуклеотидов) кодирует полипротеин С-Е1-Е2-р7-NS2-NS3-NS4А-NS4В-NS5А-NS5В, включающий структурные (С, Е1 и Е2) и неструктурные (NS2-NS5В) белки. Пептид р7 занимает промежуточное положение и выполняет роль ионного канала. Кодирующая область генома фланкирована 5'- и 3'-нетранслируемыми районами (5'- и 3'-UTRs) (Tang, Grish, 2009). Процессинг структурной части полипротеина осуществляется клеточной пептидазой. Процессинг неструктурной части включает самовыщепление протеаз NS2/NS3 и NS3 и расщепление NS3 протеазой остального фрагмента с образованием индивидуальных белков NS4А, NS4В,

NS5А, NS5В (Lin *et al.*, 1994). Так как NS3 выполняет критическую роль в процессинге полипротеина, функция этого белка делает его привлекательной мишенью для терапевтического воздействия на вирус.

Репликация РНК генома ВГС осуществляется репликационным комплексом в кластерах мембранных везикул. Везикулы образуются от мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР) в присутствии NS4В (Egger *et al.*, 2002). В этот процесс вовлечены белки клетки-хозяина: PI4К-IIIα (Reiss *et al.*, 2011), hVAP-A/B (Miller, Krijnse-Locker, 2008), Rab5А, EEA1, rabaptin 5, Rab4 (Stone *et al.*, 2007).

Репликационный комплекс состоит из ассоциированных на мембране ЭР всех неструктурных белков ВГС (Moradpour *et al.*, 2003), а также белков клетки-хозяина: PI4К-IIIα (Reiss *et al.*, 2011), VAP-A/B, FKBP8, Hsp90, циклофилина А/В, геранилгеранилированного FBL2 (Moriishi, Matsuura, 2007). Главную роль в работе репли-

казного комплекса выполняет РНК-зависимая РНК-полимераза NS5B. Механизмы как сборки репликационного комплекса, так и формирования везикул остаются до сих пор неизученными. Репликационный комплекс синтезирует на матрице плюс-цепи РНК генома минус-цепь с образованием двуцепочечного РНК интермедиата, минус-цепь которого служит матрицей для синтеза новых плюс-цепей РНК (Targett-Adams *et al.*, 2008). Новые плюс-цепи РНК выходят из везикул в цитоплазму, где они могут транслироваться или вовлекаться в новые везикулы для следующего раунда репликации.

Долгое время не было экспериментальной клеточной системы для изучения ВГС. В 1999 г. был получен субгеномный РНК репликон ВГС (кодирующий только неструктурные белки), способный автономно реплицироваться в Huh-7 клетках (Lohmann *et al.*, 1999). Репликон и вирусные белки выходят на стационарные концентрации в клетках уже через 2–3 дня после трансфекции: плюс-цепь РНК ~ 1000 молекул/клетка; отношение плюс-цепь РНК/минус-цепь РНК ~ 10 : 1; белки ~ 10<sup>6</sup> молекул/клетка (Quinkert *et al.*, 2005). Стационарные концентрации вирусных РНК и белков могут поддерживаться в течение нескольких лет культивирования клеток, поэтому репликационная клеточная система незаменима для изучения репликации генома ВГС и доклинической оценки эффективности новых потенциальных анти-ВГС лекарств (Quinkert *et al.*, 2005; Malcolm *et al.*, 2006).

Для РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5B характерна высокая частота ошибок. Мутации, вводимые NS5B в вирусный РНК геном на каждом раунде репликации, приводят к гетерогенным РНК вариантам, которые могут быть источником устойчивости вируса к потенциальным лекарствам (Castro *et al.*, 2005). Недавно было установлено, что РНК варианты, устойчивые к специфическому лекарству, могут существовать как в культуре клеток, так и плазме пациентов еще до начала введения лекарств (Kieffer *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2011).

Применение математического моделирования актуально для оценки эффективности действия новых потенциальных лекарств. Математическая детерминистическая модель репликации субгеномного ВГС репликона в Huh-7 клетках была впервые представлена в

работе Н. Dahari с соавт. (Dahari *et al.*, 2007). На основе этой модели была получена модель полного внутриклеточного процесса репликации ВГС (Nakabayashi, 2012), однако обе модели не включали описания механизмов действия лекарств и были не способны предсказывать эффективность их действия в репликационных клетках. В 2007 г. нами была предложена детерминистическая модель репликации субгеномного ВГС репликона в Huh-7 клетках, специально построенная для оценки эффективности действия лекарств на репликацию РНК ВГС (Mishchenko *et al.*, 2007). Модель хорошо описывала динамику падения РНК в присутствии ингибиторов NS3 протеазы на начальном временном интервале, но не давала хорошего согласия с экспериментальными данными при действии ингибиторов более 3 суток.

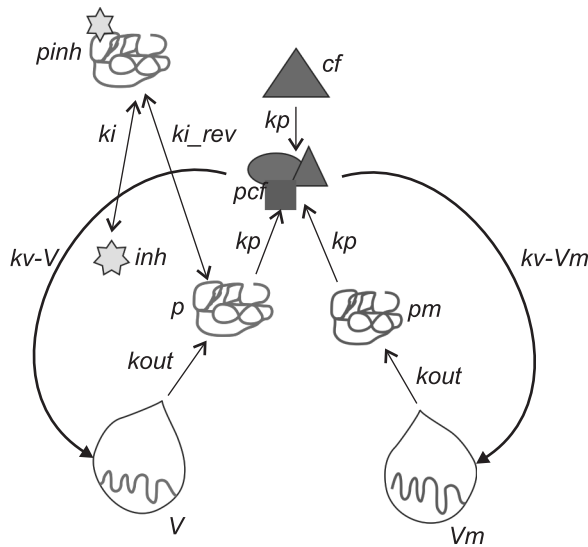
Целью данной работы было построение минимальной базовой модели, описывающей динамику подавления вирусной РНК ингибитором NS3 протеазы SCH 503034 в Huh-7 клетках (Malcolm *et al.*, 2006) на всем временном интервале экспериментально определенной динамики вирусной РНК. Одной из важных особенностей модели был учет лекарственно-устойчивых форм вирусной РНК в клетках. Мы предположили, что устойчивые к ингибитору мутантные формы вирусной РНК предсуществуют в клетках на основании экспериментального определения лекарственно-устойчивых вирусных РНК в репликационных клетках до введения ингибиторов (Robinson *et al.*, 2011). Для построения модели был предложен стохастический подход. Построенная модель хорошо предсказывала экспериментальные зависимости подавления вирусной РНК в присутствии SCH 503034.

## Результаты и их обсуждение

### Описание моделируемых процессов

Схема процессов, включенных в минимальную модель репликации субгеномного РНК репликона ВГС в Huh-7 клетках в присутствии ингибиторов NS3 протеазы, показана на рис. 1.

В модель были включены следующие биологические сущности: вирусный полипротеин *p* (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B); вирусный мутантный полипротеин



**Рис. 1.** Схема процессов, включенных в минимальную модель репликации субгеномного РНК репликона ВГС в Nuh-7 клетках в присутствии потенциальных лекарств — ингибиторов NS3 протеазы.

Обозначения:  $V$ ,  $Vm$  — везикулы, содержащие вирусную РНК дикого типа и мутантные формы вирусной РНК соответственно;  $p$ ,  $pm$  — полипротеины, транслированные с РНК дикого типа и мутантных форм РНК соответственно;  $cf$  — интегральный клеточный фактор;  $pcf$  — комплекс интегрального клеточного фактора и вирусных неструктурных белков (репликаза);  $pinh$  — комплекс ингибитор-полипротеин; **стрелки** — процессы;  $kout$  — константа скорости образования вирусного полипротеина;  $kv$  — константа скорости образования мембранных везикул, в которых идет репликация плюс- и минус-цепей вирусной РНК;  $kp$  — константа скорости образования вирусной репликазы — комплекса клеточного фактора и вирусных белков;  $ki$  — константа скорости взаимодействия ингибитора с полипротеином,  $ki_{rev}$  — константа скорости диссоциации комплекса ингибитор-полипротеин.

$pm$  (NS2-NS3\*-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B); интегральный клеточный фактор  $cf$ ; комплекс вирусных неструктурных и клеточных белков (репликаза)  $pcf$  и два типа мембранных везикул: везикулы  $V$ , продуцирующие в цитоплазму клетки вирусную плюс-цепь РНК дикого типа (кодирующую NS3 протеазу, способную взаимодействовать с ингибиторами), и везикулы  $Vm$ , продуцирующие в цитоплазму вирусные мутантные плюс-цепи РНК, кодирующие лекарственно-устойчивые формы NS3 протеазы. Предполагалось, что скорости образования полипротеинов дикого  $p$  и мутантного  $pm$  типов определяются количеством везикул  $V$  и  $Vm$  соот-

ветственно и константой скорости  $kout$ . Описание стадий наработки внутри везикул вирусной РНК, ее выход в цитоплазму и трансляцию на рибосомах были опущены. NS3 протеаза в составе полипротеина дикого типа  $p$  обратимо взаимодействует с ингибитором  $inh$  с образованием комплекса  $pinh$  (константы скоростей  $ki$  и  $ki_{rev}$  для прямого и обратного процессов соответственно), в то время как NS3 протеаза в составе мутантного полипротеина  $pm$  лекарственно-устойчива и не взаимодействует с ингибиторами. Было предположено, что комплекс неструктурных вирусных и клеточных белков  $pcf$  образуется при взаимодействии полипротеинов  $p$  и  $pm$  с интегральным клеточным фактором  $cf$  с константой скорости  $kp$ . Процессинг  $p$  и  $pm$  является промежуточной стадией образования комплекса  $pcf$  и в модели не рассматривался. В свою очередь, комплекс  $pcf$  вовлечен в образование новых везикул  $V$  и  $Vm$ . Комплекс  $pcf$  включает репликазу, которая может связываться с плюс-цепью РНК в цитоплазме. Связывание  $pcf$  с плюс-цепями РНК дикого и мутантного типов приводит к формированию везикул  $V$  и  $Vm$  соответственно. Этот процесс был описан через взаимодействие  $pcf$  с  $V$  и  $Vm$  с константой скорости  $kv$ , опуская промежуточные стадии синтеза РНК в везикулах, ее выход в цитоплазму и связывание с  $pcf$ . Было учтено, что основной вклад во фракцию мутантной вирусной РНК дает предсуществующая мутантная РНК до введения ингибиторов в клетку, так как количество мутантной РНК, появившейся в присутствии ингибиторов, незначительно (Robinson *et al.*, 2011). В модели также учтена скорость деградации вирусных белков и везикул с константами скоростей  $mp$  и  $mv$  соответственно. Предполагалось, что комплекс  $pcf$  деградирует также с константой скорости  $mp$ . Клеточный фактор  $cf$  лимитирует неограниченный рост репликазы и, следовательно, вирусной РНК в клетках аналогично ранее предложенной модели (Mishchenko *et al.*, 2007).

### Математическая стохастическая модель

Стохастический подход особенно важен при моделировании процессов, протекающих при малых концентрациях их участников (Srivastava *et al.*, 2001). Именно такая ситуация

наблюдается при продолжительном действии ингибиторов на вирусную мишень. Согласно экспериментальным данным, концентрация вирусной РНК может уменьшиться почти на 2 порядка уже на третьи сутки действия ингибитора SCH 503034 (Malcolm *et al.*, 2006). Все моделируемые процессы (рис. 1) рассматривали как случайные события. Моделирование проводили с использованием алгоритма Гиллеспи (Gillespie, 1976), который представляет собой разновидность методов Монте-Карло. Согласно алгоритму, каждый тип взаимодействия в системе является «химическим  $\mu$  каналом реакций». При этом под реакцией подразумевается конкретное биохимическое событие (например, образование комплекса интегрального клеточного фактора с вирусными белками). Также предполагается, что общее количество таких  $\mu$  каналов равно  $M$ . В данном алгоритме обновление состояния системы определяется: 1) временем, когда должна произойти следующая реакция; 2) какая именно реакция произойдет в этот момент времени.

Момент времени для реализации следующей реакции определяется генерацией случайного числа в соответствии с распределением Пуассона относительно промежутков времени  $\Delta t$ , проходящих между реакциями:

$$P(\tau) = \sum_{\mu} a_{\mu} \cdot \exp[-\tau \sum_{\mu} a_{\mu}], \quad (a)$$

где  $\tau$  – время, когда должна произойти следующая реакция;  $a_{\mu}$  – величина, характеризующая вероятность протекания биохимической реакции в единицу времени в канале  $\mu$ . В свою очередь,  $a_{\mu}$  определяется как  $a_{\mu} = c_{\mu} h_{\mu}$ , где  $c_{\mu}$  – по сути, константа скорости реакции,  $h_{\mu}$  – число различных комбинаций молекулярных реагентов, доступных в текущем состоянии системы в канале  $\mu$ . Значение  $h_{\mu}$  определяется кинетикой реакции. Вероятность того, что в момент времени  $\tau$  произойдет реакция канала  $\mu$ , можно рассчитать согласно дискретному распределению:

$$P(\mu = \mu') = \frac{a_{\mu'}}{\sum_{\mu} a_{\mu}}. \quad (б)$$

Таким образом, алгоритм состоит из следующих шагов:

1. Задать константы реакций  $c_{\mu}$  в момент времени  $t = 0$ .

2. Рассчитать значения  $a_{\mu} = c_{\mu} h_{\mu}$ ,  $\mu = 1, \dots, M$ .

3. Сгенерировать два случайных числа  $u_1, u_2 \in [0, 1)$ , которые удовлетворяют равномерному распределению. Первое число определяет момент времени для реализации ближайшей реакции  $\Delta t$ , а второе – канал  $\mu$ , в котором будет протекать реакция в следующий момент  $\Delta t$ .

4. Рассчитать время  $\tau$ , через которое произойдет следующая реакция, согласно распределению (а):

$$\tau = \frac{-(\ln u_1)}{\sum_{\mu} a_{\mu}}.$$

5. Найти канал  $\mu$  следующей реакции согласно распределению (б),  $\mu$  определяется из

$$\text{условия } \sum_{v=1}^{\mu-1} \frac{a_v}{a_0} < u_2 < \sum_{v=1}^{\mu} \frac{a_v}{a_0}, \text{ где } a_0 = \sum_{v=1}^M a_v.$$

6. Увеличить время  $t$  на  $\tau$  и обновить вектор состояния системы. Перейти к шагу 2.

В табл. 1 представлены значения величины  $a_{\mu}$ , характеризующей вероятность протекания конкретной реакции (рис. 1) в единицу времени в канале  $\mu$ .

Условие на концентрацию свободного клеточного фактора  $cf$ , не входящего в состав вирусных репликативных комплексов в везикулах, дано с учетом того, что суммарная концентрация сущностей, содержащих клеточный фактор, постоянна:  $cf + pcf + k_1 V + k_2 Vm = ch_0$ . Тогда концентрация  $cf$  определяется разностью между  $ch_0$  и концентрациями клеточного фактора, входящего в состав везикул ( $k_1 V + k_2 Vm$ ), а также в состав комплекса  $pcf$ .

Алгоритм был реализован на языке C++. Компьютерные эксперименты расчета подавления вирусной РНК в клетке повторяли до тех пор, пока средние значения РНК в каждой точке оставались практически неизменными.

### Начальные условия модели

При расчете кинетики достижения концентрации РНК репликона ВГС стационарного значения после момента трансфекции (в отсутствие ингибитора) предполагали, что в начальный момент времени в клетке находятся 10 везикул  $V$ , количество везикул  $Vm$  было принято равным нулю. Начальные значения остальных трех переменных ( $p, pm, pcf$ ) были также заданы равными нулю.

**Таблица 1**

Значения  $a_\mu$ , использованные в алгоритме расчета стохастической модели подавления репликации субгеномного РНК репликона ВГС ингибитором NS3 протеазы SCH 503034

Реакция	$a_\mu$	Изменения состояния системы в канале $\mu$	Реакция	$a_\mu$	Изменения состояния системы в канале $\mu$
Образование $V$	$kv \cdot V \cdot pcf$	$V \rightarrow V + 1$ $pcf \rightarrow pcf - 1$	Образование $p$	$kout \cdot V$	$p \rightarrow p + 1$
Деградация $V$	$mv \cdot V$	$V \rightarrow V - 1$	Образование $pinh$	$ki \cdot p \cdot inh$	$p \rightarrow p - 1$ $pinh \rightarrow pinh$
Образование $Vm$	$kv \cdot Vm \cdot pcf$	$Vm \rightarrow Vm + 1$ $pcf \rightarrow pcf - 1$	Диссоциация $pinh$	$ki\_rev \cdot pinh$	$p \rightarrow p + 1$ $pinh \rightarrow pinh$
Деградация $Vm$	$mv \cdot Vm$	$Vm \rightarrow Vm - 1$	Деградация $p$	$pm \cdot p$	$p \rightarrow p - 1$
Образование $pcf$	$kp \cdot p \cdot cf$	$pcf \rightarrow pcf + 1$ $p \rightarrow p - 1$	Деградация $pinh$	$pm \cdot pinh$	$pinh \rightarrow pinh$
Образование $pcf$	$kp \cdot pm \cdot cf$	$pcf \rightarrow pcf + 1$ $pm \rightarrow pm - 1$	Образование $pm$	$kout \cdot Vm$	$p \rightarrow p + 1$
Деградация $pcf$	$mp \cdot pcf$	$pcf \rightarrow pcf - 1$	Деградация $pm$	$mp \cdot pm$	$pm \rightarrow pm$

Начальными условиями при расчете кинетик подавления вирусной РНК в присутствии ингибитора NS3 протеазы являлись значения переменных, которые были получены после выхода РНК на стационар ( $V = 100, p = 395, pcf = 0$ ). Количество везикул  $V$  и  $Vm$  задавали следующим образом. На основе литературных данных о предсуществовании мутантных лекарственно устойчивых вирусных РНК в репликоновых клетках до введения ингибитора (Robinson *et al.*, 2011) мы учитывали, что стационарное значение количества везикул  $V_0$  является суммой  $V$  и  $Vm$ . Доля  $Vm$  по отношению к  $V_0$  в начальный момент времени действия ингибитора задавалась как свободный параметр, зависящий от концентрации ингибитора. Таким образом, в начальный момент времени количество везикул  $V$  и  $Vm$  в одной клетке выражали как  $Vm = \alpha \cdot V_0$  и  $V = (1 - \alpha) \cdot V_0$  соответственно.

Концентрацию мутантного полипротеина  $pm$  в момент введения ингибитора в клетку задавали аналогично:  $pm = \alpha \cdot p_0, p = (1 - \alpha) \cdot p_0$ , где  $p_0$  – стационарная концентрация полипротеина в клетке.

### Оценка параметров модели

Стохастическая модель имеет 8 параметров (табл. 2). Оценку параметров  $\alpha, kv, mv, kp, kout$  производили с учетом соответствия расчета

концентрации вирусной РНК опубликованным экспериментальным данным в присутствии и отсутствии ингибитора. В отсутствие ингибитора стационарные концентрации плюс- и минус-цепей РНК в клетке оценены  $\sim 1000$  молекул/клетка и  $\sim 100$  молекул/клетка соответственно; время достижения стационара – 2–3 дня с момента трансфекции (Quinkert *et al.*, 2005). Также определены кинетики подавления РНК в присутствии разных концентраций SCH 503034 (Malcolm *et al.*, 2006). При адаптации модели использовали те значения параметров, которые давали минимальное среднеквадратичное отклонение теоретически рассчитанных значений концентрации РНК от экспериментальных значений.

Параметры  $mv, mp, ki, ki\_rev, cf_0$  были оценены на основе литературных данных. Зная времена полужизни неструктурных белков (10–16 ч (Pietschmann *et al.*, 2001)), начальные значения  $mv$  и  $mp$  задавали  $0,1 \text{ ч}^{-1}$ . В результате коррекции модели для  $mv$  и  $mp$  были получены значения  $0,0555 \text{ ч}^{-1}$  и  $0,25 \text{ ч}^{-1}$  соответственно. Константу  $ki\_rev$  оценили, зная время полужизни комплекса  $pinh$  ( $\sim 23 \text{ ч}$  (Malcolm *et al.*, 2006)); константу  $ki$  определяли из значений  $K_i$  и  $ki\_rev$ , где  $K_i = \frac{ki\_rev}{ki}$ . Количество  $cf_0$  было оценено

Таблица 2

Оценки значений параметров стохастической модели репликации субгеномного репликона ВГС в Huh-7 клетках в присутствии ингибитора NS3 протеазы SCH 503034

Параметр	Значение	Ссылка
$kv$	1,0 молекула <sup>-1</sup> ч <sup>-1</sup>	адаптация модели
$mv$	0,0555 ч <sup>-1</sup>	Pietschmann <i>et al.</i> , 2001
$kp$	0,00048 молекула <sup>-1</sup> ч <sup>-1</sup>	адаптация модели
$kout$	1,04 ч <sup>-1</sup>	адаптация модели
$\alpha$	0,01* 0,001**	адаптация модели
$ki$	1,0 молекула <sup>-1</sup> ч <sup>-1</sup>	Malcolm <i>et al.</i> , 2006
$ki_{rev}$	1,0 ч <sup>-1</sup>	Malcolm <i>et al.</i> , 2006
$mp$	0,25 ч <sup>-1</sup>	Pietschmann <i>et al.</i> , 2001
$cf0$	130 молекул	Quinkert <i>et al.</i> , 2005

\* При концентрации 0,5  $\mu\text{M}$  ( $1,2 \times IC_{90}$ ) SCH503034; \*\* при концентрации 2,5  $\mu\text{M}$  ( $6 \times IC_{90}$ ) SCH503034.

сопоставимым с количеством минус-цепей РНК в стационаре и задано равным 130. Параметры  $k_1$  и  $k_2$  задали равными 1 в предположении, что в одной везикуле находится один репликационный комплекс (в состав которого входят 1000 белков NS5B). Оценки параметра  $\alpha$  для разных концентраций SCH503034 были в области значений 0,1–1 %, что близко к экспериментальной оценке (~1,5 % (Robinson *et al.*, 2011)). Значения параметров приведены в табл. 2.

#### Анализ модели

Первым этапом анализа модели было исследование динамики наработки вирусных плюс- и минус-цепей РНК в клетках после трансфекции в условиях отсутствия ингибитора. Концентрации плюс- и минус-цепей РНК в клетке рассчитывали из количества везикул в клетке. Мы предполагали, что каждая везикула,  $V$  или  $Vm$ , содержит одну минус-цепь РНК (количество везикул, содержащих большее количество минус-цепей РНК, пренебрежимо мало по статистическим оценкам количеств везикул и минус-цепей РНК в клетке) и учли, что в стационаре клетки содержат ~100 минус-цепей РНК на клетку (Quinkert *et al.*, 2005). Тогда оценка максимального количества везикул, содержащих минус-цепь РНК, соответствует 100

везикулам на клетку. Оценка отношения стационарных концентраций плюс-цепь РНК : минус-цепь РНК в клетке ~ 10 : 1 (Quinkert *et al.*, 2005). Таким образом, количеству везикул в клетке соответствует равное количество минус-цепей РНК и в 10 раз большее количество плюс-цепей РНК. Расчет кинетик образования везикул показал, что стационарное значение количества везикул (100 везикул на клетку) достигалось за 2,5 дня после трансфекции. Отсюда значения стационарных концентраций плюс- и минус-цепей РНК в клетке были 1000 и 100 молекул на клетку соответственно, что хорошо согласуется с литературными данными (Quinkert *et al.*, 2005); расчетное время выхода цепей РНК на стационарные концентрации (2,5 дня) также хорошо согласуется с литературными данными (Quinkert *et al.*, 2005) (не показано). Дальнейший анализ модели проводили сравнением расчетов кинетики подавления плюс-цепи вирусной РНК в присутствии SCH 503034 с экспериментальными данными (Malcolm *et al.*, 2006). Модель с хорошей точностью описывала кинетику подавления плюс-цепи РНК в присутствии SCH 503034 на всем временном интервале экспериментальных измерений (рис. 2, а).

Важным шагом исследования было применение модели для описания экспериментальной

зависимости степени подавления вирусной РНК от возрастающих концентраций SCH 503034. Оказалось, что модель хорошо описывала такую зависимость (рис. 2, б), хотя мы не использовали ее для адаптации модели. Полученное соответствие расчетов с экспериментальными данными (Malcolm *et al.*, 2006) указывает на хорошую предсказательную способность модели.

### Заключение

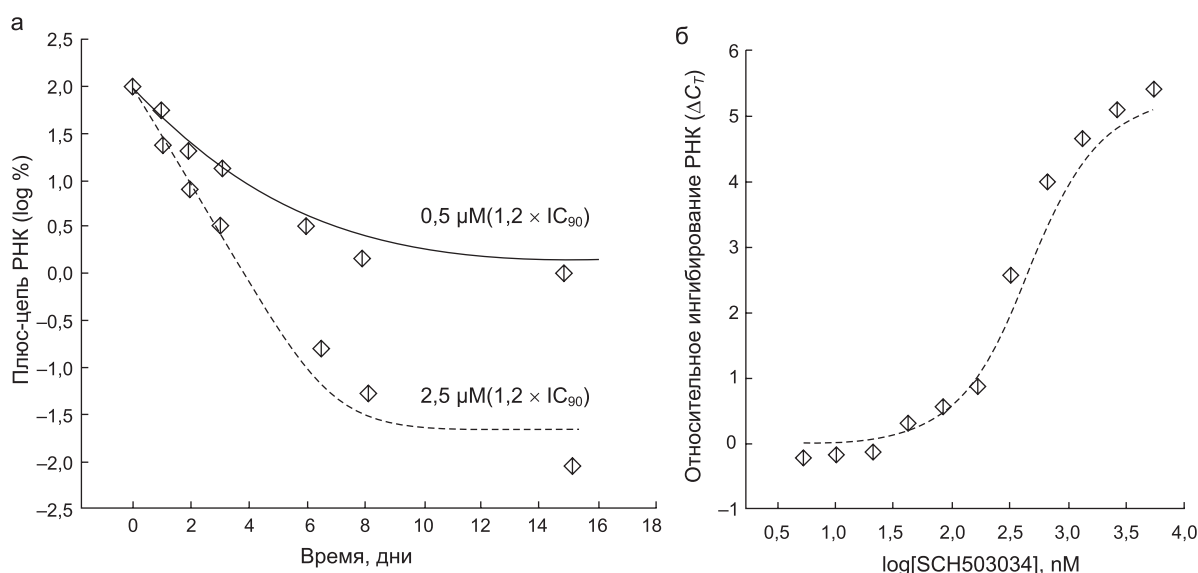
В настоящей работе на основе упрощенной схемы процессов репликации РНК репликона ВГС в присутствии ингибитора NS3 протеазы SCH 503034 (рис. 1) впервые построена минимальная базовая модель, адекватно описывающая динамику подавления репликона ВГС в присутствии SCH 503034 на всем временном интервале экспериментальных наблюдений. Модель построена с привлечением минимального количества параметров, с учетом стохастичности процессов репликации и деградации РНК и присутствия лекарственно устойчивых мутантных вирусных РНК. Учет стохастичности и устойчивых мутантных форм вирусной РНК может быть

полезен для описания экспериментальных кинетик подавления вирусной РНК при действии ингибиторов, направленных также и на другие мишени. В дальнейшем мы планируем развить предложенную базовую минимальную модель для предсказания эффективности как индивидуальных ингибиторов, так и их комбинаций на различные мишени.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Н.Л. Подколдному, С.В. Николаеву и И.И. Титову за всестороннее обсуждение и сделанные ценные замечания.

Работа была поддержана грантом EU-FP7 SYSPATHO № 260429, Госконтрактом Минобрнауки РФ № 11.519.11.6041. Программой РАН «Биологическое разнообразие» Проект 29 «Биоинформатика генетической изменчивости: исследование влияния мутаций на молекулярно-генетические системы организмов»; Программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Научной школой» академика РАН Н.А. Колчанова НШ-5278.2012.4.



**Рис. 2.** Моделирование подавления плюс-цепи вирусной РНК в Huh-7 клетке в присутствии ингибитора NS3 протеазы SCH 503034 ( $K_i = 14$  nM).

а – кинетики подавления стационарной концентрации РНК: при концентрации SCH 503034 0,5 μM – сплошная линия; при концентрации SCH 503034 – 2,5 μM, пунктирная линия; ромбы экспериментальные данные (Malcolm *et al.*, 2006); б – зависимость степени подавления РНК при возрастающих концентрациях SCH 503034 в течение 72 ч. Пунктирная линия – расчет модели; ромбы – экспериментальные данные (Malcolm *et al.*, 2006). Каждому ΔC<sub>T</sub> (ось y) соответствует уменьшение уровня РНК в 2 раза.

## Литература

- Castro C., Arnold J.J., Cameron C.E. Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective // *Virus Res.* 2005. V. 107. P. 141–149.
- Dahari H., Ribeiro R.M., Rice C.M., Perelson A.S. Mathematical modeling of subgenomic hepatitis C viral replication in Huh-7 cells // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 750–760.
- Egger D., Wölk B., Gosert R. *et al.* Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 5974–5984.
- Gillespie D.T. General method for numerically simulating stochastic time evolution of coupled chemical reactions // *J. Comput. Phys.* 1976. V. 22. P. 403–434.
- Kieffer T.L., Sarrazin C., Miller J.S. *et al.* Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients // *Hepatology.* 2007. V. 46. P. 631–639.
- Lin C., Pragai B.M., Grakoui A. *et al.* Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics // *J. Virol.* 1994. V. 68. P. 8147–8157.
- Lohmann V., Korner F., Koch J. *et al.* Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line // *Science.* 1999. V. 285. P. 110–113.
- Malcolm B.A., Liu R., Lahser F. *et al.* SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2006. V. 50. P. 1013–1020.
- Miller S., Krijnse-Locker J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 363–374.
- Mishchenko E.L., Bezmaternykh K.D., Likhoshvai V.A. *et al.* Mathematical model for suppression of subgenomic hepatitis C virus RNA replication in cell culture // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007. V. 5. P. 593–609.
- Moradpour D., Gosert R., Egger D. *et al.* Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex // *Antiviral Res.* 2003. V. 60. P. 103–109.
- Moriishi K., Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus // *Rev. Med. Virol.* 2007. V. 17. P. 343–354.
- Nakabayashi J. A compartmentalization model of hepatitis C virus replication: An appropriate distribution of HCV RNA for the effective replication // *J. Theor. Biol.* 2012. V. 300. P. 110–117.
- Pietschmann T., Lohmann V., Rutter G. *et al.* Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs // *J. Virol.* 2001. V. 75. P. 1252–1264.
- Quinkert D., Bartenschlager R., Lohmann V. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 13594–13605.
- Reiss S., Rebhan I., Backes P. *et al.* Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment // *Cell Host Microbe.* 2011. V. 9. P. 32–45.
- Robinson M., Tian Y., Delaney W.E. 4th, Greenstein A.E. Pre-existing drug-resistance mutations reveal unique barriers to resistance for distinct antivirals // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 10290–10295.
- Srivastava R., Peterson M.S., Bentley W.E. Stochastic kinetic analysis of the *Escherichia coli* stress circuit using  $\sigma^{32}$ -targeted antisense // *Biotechnol. Bioengineer.* 2001, V. 75. P. 120–129.
- Stone M., Jia S., Heo W.D. *et al.* Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 4551–4563.
- Tang H., Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis // *Clin. Sci. (Lond.)* 2009. V. 117. P. 49–65.
- Targett-Adams P., Boulant S., McLauchlan J. Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 2182–2195.
- Zoulim F., Chevallier M., Maynard M., Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection // *Rev. Med. Virol.* 2003. V. 13. P. 57–68.



---

**SUPPRESSION OF SUBGENOMIC HEPATITIS C VIRUS RNA REPLICON REPLICATION IN HUH-7 CELLS BY THE NS3 PROTEASE INHIBITOR SCH5030334: A STOCHASTIC MATHEMATICAL MODEL**

**E.L. Mishchenko<sup>1</sup>, N.V. Ivanisenko<sup>1,2</sup>, I.R. Akberdin<sup>1</sup>, P.S. Demenkov<sup>1</sup>, V.A. Likhoshvai<sup>1,2</sup>,  
N.A. Kolchanov<sup>1,2</sup>, V.A. Ivanisenko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: elmish@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

### Summary

Hepatitis C virus (HCV) causes a severe liver disease frequently associated with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. No effective anti-HCV therapy is available so far. Thus, it is pertinent to apply mathematical modeling to prediction of the efficiency of new candidate pharmaceuticals. A stochastic mathematical model for subgenomic HCV replicon replication in Huh-7 cells with the presence of the HCV NS3 protease inhibitor SCH 503034 is proposed. The model describes the experimental kinetic curves of viral RNA suppression at various SCH 503034 concentrations. It is applicable to the development of approaches to HCV RNA suppression in Huh-7 cells.

**Key words:** hepatitis C virus, subgenomic replicon, mathematical modeling, effectiveness of drugs.