

Резайкин А.В., Новоселов А.В., Сергеев А.Г., Фадеев Ф.А.

Роль фенотипического смешивания в формировании структуры популяции клонированного вируса ECHO11 в отношении аффинитета к рецептору DAF (CD55)

ГБОУ ВПО "Уральская государственная медицинская академия" Минздравсоцразвития России; кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии; г. Екатеринбург

Rezaykin A.V., Novoselov A.V., Sergeev A.G., Fadeyev F.A.

The effect of phenotypic mixing on the population structure of Echovirus 11 clone concerning the affinity to DAF (CD55) receptor

Резюме

Целью настоящей работы являлась оценка влияния фенотипического смешивания на структуру популяции клонированного вируса ECHO11 (EV11) в отношении сродства к рецептору DAF (CD55). Методом разделения популяции по фенотипу с помощью обработки эритроцитами человека установлено, что популяция Daf+ клона EV11, полученного в культуре клеток RD, гетерогенна в отношении сродства к рецептору DAF. Преобладающая часть вирионов взаимодействовала с рецептором DAF на эритроцитах, в то время как приблизительно 0,1% инфекционных частиц не взаимодействовали с DAF, то есть имели Daf- фенотип. Прямое секвенирование структурной части вирусного генома, выполненное для субпопуляции вирионов с Daf- фенотипом, а также для пяти клонов, выделенных из этой субпопуляции, не выявило отличий нуклеотидной последовательности по сравнению с исходной популяцией Daf+ клона. С помощью моноклональных антител (BRIC216) к рецептору DAF, была показана одинаковая эффективность ингибирования репродукции как исходного Daf+ клона, так и субпопуляции вирионов с Daf- фенотипом. Полученные результаты позволяют утверждать, что образование фенотипических Daf- вариантов вызвано инкапсидацией daf+ генома в Daf- капсид, белки которого являются продуктом трансляции мутантного daf- генома.

Ключевые слова: Вирус ECHO11, гетерогенность популяции, рецептор DAF (CD55), фенотипическое смешивание

Summary

This work was aimed at evaluation of the effect of phenotypic mixing on the population structure of cloned echovirus 11 (EV11) concerning its affinity to DAF (CD55) receptor. Viral population was separated according to phenotype by treatment with human erythrocytes. It was determined that the population of Daf+ EV11 clone after propagation on RD cell line was heterogeneous in respect to affinity to DAF receptor. The majority of virions were bound by DAF expressed on erythrocytes, whereas approximately 0.1% of the original population did not interact with DAF, i.e. possessed Daf- phenotype. Direct sequencing of the structural part of the viral genome was carried out for the subpopulation with Daf- phenotype and for 5 clones derived from that subpopulation. No difference of the nucleotide sequence was detected in comparison with the original Daf+ clone. The usage of monoclonal antibodies (BRIC216) to DAF demonstrated equal inhibitory effects on the reproduction of the original Daf+ clone and on the reproduction of the subpopulation with Daf- phenotype. Results obtained in this study allow us to speculate that generation of phenotypic Daf- variants was a consequence of daf+ genome incapsidation into Daf- capsid, and the latter being the product of mutant daf- genome translation.

Keywords: echovirus 11, population structure, DAF (CD55) receptor, phenotypic mixing

Введение

Энтеровирус ECHO11 (EV11) является мелким безоболочечным вирусом, относящимся к виду Human enterovirus B, входящему в род Enterovirus семейства Picornaviridae. Икосаэдральный капсид пикорнавирусов имеет диаметр около 30 нм, состоит из 60 копий каждого из четырех структурных белков (VP1 – VP4) и содержит

однонитевую РНК позитивной полярности. Важной морфологической особенностью вирионов энтеровирусов является наличие углубления вокруг осей симметрии 5-го порядка, получившего название «каньон» [1].

Клинические проявления инфекции, вызванной энтеровирусами, характеризуются широким спектром, включающим лихорадочное заболевание, конъюнктивит,

инфекции верхних и нижних дыхательных путей, гастроэнтерит, менингит, энцефалит и энцефаломиелит [2]. Широкий спектр клинических проявлений инфекции подразумевает способность энтеровирусов к репродукции в различных тканях и органах. Ключевой детерминантой тканевого тропизма энтеровирусов является специфичность взаимодействия вирусов с рецепторами чувствительных клеток.

Наиболее изученным клеточным рецептором для EV11 является DAF (CD55) – гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный гликопротеин с молекулярной массой 70 кД. Он является первичным клеточным рецептором для гемагглютинирующих (ГА) вариантов EV11 [3, 4, 5]. Вирусы ECHO, имеющие Daf⁺ фенотип, взаимодействуют с рецептором DAF на эритроцитах человека *in vitro*, вызывая феномен гемагглютинации [6].

Известно, что любая популяция EV11, полученная на первичных и перевиваемых клеточных культурах, гетерогенна по признаку взаимодействия с DAF, то есть может содержать как варианты с Daf⁺ фенотипом, так и варианты, имеющие Daf⁻ фенотип, то есть не взаимодействующие с рецептором DAF [7, 5]. Установлено, что причиной появления Daf⁻ вариантов могут быть генетические изменения (точечные мутации) в части генома, кодирующей белки рецептор-связывающей области для DAF [8, 9]. Однако нельзя исключить и модификационные (ненаследуемые) изменения вирусных частиц, приводящие к появлению Daf⁻ фенотипа.

Исследование гетерогенности популяции EV11 в отношении сродства к рецептору DAF может помочь в объяснении множественного тканевого тропизма энтеровирусов, их способности к преодолению тканевых барьеров и разнообразия клинических проявлений энтеровирусной инфекции.

Целью настоящей работы был анализ степени гетерогенности популяции EV11 в отношении сродства (аффинитета) к DAF, а также оценка характера изменчивости вирусных частиц, приводящих к этому.

Материалы и методы

Вирусные штаммы и культуры клеток

Клон 111/RD (*daf*⁺) был выделен в культуре клеток рабдомиосаркомы человека (RD) из клинического изолята EV11 (штамм 7611), как описано ранее [7, 8]. Близкородственные клоны, отличающиеся по признаку аффинности к рецептору DAF, 431-1 (*daf*⁺) и 431-6 (*daf*⁻) были получены в результате адаптации клона 111/RD к культуре клеток L41KD и последующей реадaptации к культуре клеток RD (неопубликованные данные).

Перевиваемая культура клеток RD была получена из ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области».

Для культивирования клеток RD использовали смесь среды RPMI 1640 и среды Игла DMEM в соотношении объемов 1:1. В среду роста добавляли 10% эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США), пенициллин 100 ЕД/мл и гентамицин 50 мкг/мл. В качестве поддерживающей среды при репродукции вируса использовали среду Игла DMEM.

Оценка инфекционной и гемагглютинирующей активности

Для определения инфекционного титра вирусов методом конечных разведений использовали формулу Spearman-Kärber с расчетом суммарной аналитической погрешности [10]. Методика постановки реакции бляшкообразования была описана ранее [7]. Для оценки достоверности различия инфекционных титров использовали F-критерий Фишера.

Гемагглютинирующую активность вирусов с эритроцитами человека определяли микрометодом [11] в модификации, описанной нами ранее [7].

Адсорбция вируса на эритроцитах человека

Для обработки вирусного пула эритроцитами человека, использовали кровь донора группы 0(I), взятую непосредственно перед экспериментом. Осадок эритроцитов получали с помощью 3-х кратного ресуспендирования в солевом растворе Эрла (1:5 об./об.) и центрифугирования (1000g в течение 10 мин).

Клеточный детрит удаляли из вирусосодержащей жидкости центрифугированием (3000g 15 минут) и обрабатывали супернатант хлороформом (1:1 по объему). Следы хлороформа удаляли с помощью барботирования потоком стерильного воздуха.

Осадок эритроцитов смешивали с вирусосодержащей жидкостью в соотношении 0,01 БОЕ/эритроцит (объемное соотношение 1:2), инкубировали 60 минут при 4°C, медленно инвертируя пробирку. По окончании инкубации эритроциты осаждали центрифугированием (1000g 10 мин), затем супернатант повторно центрифугировали (1000g 10 мин). Полученный супернатант обрабатывали эритроцитами согласно вышеописанной процедуре еще два раза.

Секвенирование структурной части вирусного генома

Вирусную РНК выделяли из 100 мкл культуральной жидкости методом сорбции на силикагелевом носителе с помощью набора реагентов "РИБО-сорб" (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), согласно инструкции производителя.

Для проведения реакции обратной транскрипции использовали ревертазу M-MLV и гексануклеотидные праймеры со случайной последовательностью нуклеотидов ("РЕВЕРТА-L-100", ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Аmplификацию структурной части генома (около 3 тысяч оснований, кодирующих белки вирусного капсида VP1 – VP4) проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в виде шести перекрывающихся сегментов. Последовательности праймеров были разработаны нами с учетом высококонсервативных участков генома EV11 и опубликованы ранее [8]. Синтез праймеров выполнен в ЗАО "Синтол" (Россия).

Секвенирование кДНК проводили в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems Inc., США) и набора реагентов ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.0 (Applied Biosystems Inc., США) по прямой и обратной последовательности в соответствии с рекомендациями производителя. Для определения прямой и обратной последовательности использовали праймеры, описанные ранее [8].

Для разработки праймеров, сопоставления сегментов, выравнивания и сравнения последовательностей нуклеотидов и аминокислот использовали компьютерную программу MEGA v.3.1 [12].

Ингибирование репликации вирусов моноклональными антителами

Для ингибирования репликации вирусов в работе использовали моноклональные антитела (мАТ) BRIC216 (Meridian Life Science, Inc., США), взаимодействующие с SCR3 доменом DAF. Оценку протективного эффекта мАТ проводили методом серийных разведений на монослойных культурах клеток RD, выращенных в 96-луночных планшетах (Corning Life Sciences, Inc., США), не менее 4-х серий в каждом эксперименте.

Для обнаружения протективного эффекта использовали постоянные концентрации мАТ и 10-кратные разведения вирусных клонов. После удаления среды роста клеточный монослой однократно промывали средой Игла, затем вносили в лунки по 50 мкл среды Игла с фиксированной концентрацией мАТ BRIC216 40 мкг/мл. Культуры клеток инкубировали с мАТ 1 час при 37°C. Затем в лунки добавляли по 50 мкл среды Игла и по 100 мкл последовательных 10-кратных разведений (от 10^{-1} до 10^{-9}) каждого клона в среде Игла. В лунки, использованные для контроля инфекционного титра клонов, вносили 100 мкл среды Игла и 100 мкл 10-кратного разведения вируса. Для контроля цитотоксичности мАТ вместо разведений вируса в лунки вносили по 100 мкл среды Игла. В контрольные лунки без мАТ и без вируса вносили по 200 мкл среды Игла.

Результаты и обсуждение

Изучение гетерогенности популяции Daf+ клонов EV11 проводили с помощью экспериментов, основанных на определении разности концентрации вирусных частиц клона 111/RD до и после взаимодействия с эритроцитами человека. С помощью реакции бляшкообразования (РБО) определяли инфекционную активность исходного вируса и остаточную инфекционную активность вируса, не связавшегося с эритроцитами, после каждой обработки эритроцитами.

Исходная инфекционная активность клона 111/RD составляла $(2,9 \pm 0,2) \times 10^9$ БОЕ/мл (рис.1). После проведения первой адсорбции инфекционная активность уменьшилась в 1000 раз, до значения $(2,5 \pm 0,2) \times 10^6$ БОЕ/мл. После второй и третьей обработки вируса эритроцитами статистически достоверного снижения инфекционной активности не наблюдалось $(2,3 \pm 0,3) \times 10^6$ БОЕ/мл и $(1,7 \pm 0,3) \times 10^6$ БОЕ/мл, соответственно).

Гемагглютинирующая активность, составлявшая 1024 ГАЕ у исходного клона 111/RD, после первой обработки эритроцитами снизилась до нуля и отсутствовала после второй и третьей обработки эритроцитами.

При определении инфекционной активности исходного клона и каждой из трёх фракций, полученных после обработки вируса эритроцитами, в РБО на культуре RD наблюдались однородные бляшки размером 5-7 мм.

Отсутствие статистически достоверного снижения доли не связавшегося с эритроцитами вируса при увеличении кратности обработки эритроцитами свидетельствовало о



Рисунок.1. Изменение инфекционной активности EV11 (клон 111/RD) в зависимости от кратности обработки эритроцитами человека.

том, что популяция исходного Daf+ клона EV11 содержит помимо преобладающего (мажорного) компонента, представленного вирусными частицами, имеющими Daf+ фенотип, приблизительно 0,1% инфекционных для культуры RD вирионов, не способных взаимодействовать с рецептором DAF, то есть имеющих Daf- фенотип.

Для изучения свойств минорной субпопуляции (фракции) вирусных частиц, имеющих Daf- фенотип, из неё было выделено 20 клонов методом бляшек под агаровым покрытием. После первого пассажа на клетках RD (полная деструкция монослоя наступала через 24 – 48 часов) у всех выделенных клонов определяли инфекционный титр и гемагглютинирующую активность.

Все исследованные клоны обладали выраженной гемагглютинирующей активностью (256-512 ГАЕ) и имели высокий инфекционный титр (10^6 - 10^9 ТЦД₅₀). Полученные результаты указывали на то, что потомство вирусных частиц, не способных к адсорбции на эритроцитах, имеет Daf+ фенотип.

С помощью прямого секвенирования, были определены последовательности нуклеотидов структурной части вирусного генома для исходной популяции клона 111/RD, для фракции, полученной после трёхкратной обработки эритроцитами, а также для пяти клонов, полученных из этой фракции.

Сравнение нуклеотидных последовательностей структурной части генома исходного клона 111/RD и минорной субпопуляции (фракция) вируса, не связавшейся с эритроцитами, показало их полную идентичность *daf+* генотипу. У трех из пяти исследованных клонов нуклеотидная последовательность структурной части генома не отличалась от исходной, а у двух было обнаружено по одной синонимичной замене нуклеотидов в участках, кодирующих белки VP1 (T579→C) и VP2 (C345→T).

Таким образом, результаты генетического анализа показали, что минорная субпопуляция (фракция) вируса, не взаимодействовавшая с эритроцитами, и потомство выделенных из неё клонов имели *daf+* генотип. Полученные данные являются доказательством того, что в популяции *daf+* клона EV11 присутствует некоторое количество фенотипических Daf- вариантов, имеющих *daf+* генотип.

Таблица. Влияние моноклональных антител, блокирующих рецептор DAF, на репродукцию EV11 в культуре клеток RD

Исследуемые клоны	Инфекционный титр ($-\log_{10}$ ТЦД ₅₀ / 0,1 мл)	
	Без мАТ	в присутствии мАТ BRIC216 (40 мкг/мл)
Фракция фенотипических Daf ⁻ вариантов клона 111/RD	6.00±0.20	4.25±0.27*
431-1 (daf ⁺)	7.75±0.20	5.75±0.27*
431-6 (daf ⁻)	5.75±0.22	5.75±0.27

* - изменение инфекционного титра статистически достоверно

Подтверждение этому было получено в эксперименте по ингибированию репродукции фенотипических Daf⁻ вариантов с помощью мАТ (BRIC216) к рецептору DAF. Для сравнения полученного ингибирующего эффекта мАТ на репродукцию фенотипических Daf⁻ вариантов EV11 в параллельном эксперименте определяли ингибирующий эффект мАТ в отношении близкородственных клонов 431-1 (daf⁺) и 431-6 (daf⁻).

Результаты оценки протективного эффекта мАТ при репродукции фенотипических Daf⁻ вариантов, а также daf⁺ клона 431-1 и daf⁻ клона 431-6 в культуре клеток RD представлены в Таблице.

Из представленных в таблице данных видно, что мАТ BRIC216, взаимодействующие с SCR3 доменом DAF, в концентрации 40 мкг/мл снижали инфекционный титр daf⁺ клона приблизительно в 100 раз, но не влияли на инфекционный титр daf⁻ клона EV11. Ингибирующий эффект мАТ BRIC216 при репродукции фенотипических Daf⁻ вариантов имел такую же степень выраженности, как и при репродукции daf⁺ клона EV11. Полученный результат согласуется с наблюдавшимся Daf⁺ фенотипом у нескольких клонов, выделенных из субпопуляции (фракции) фенотипических Daf⁻ вариантов.

Высокая степень изменчивости таких фенотипических признаков энтеровирусов как тканевой/клеточный тропизм и вирулентность, обычно объясняется с позиции высокого потенциала генетической изменчивости РНК-содержащих вирусов [13]. Вместе с тем, в доступной литературе нами не обнаружено данных о возможной роли «химерных» вирионов энтеровирусов, представленных сочетанием РНК, имеющей консенсусную нуклеотидную последовательность мажорной субпопуляции, и капсида, являющегося продуктом трансляции мутантного генома, содержащего значимую для проявления конкретного фенотипа мутацию. Одним из возможных объяснений наблюдавшегося явления может быть модификационная (ненаследуемая) изменчивость за счёт внутриклеточной транскрипции. Проведенные нами ранее расчеты скорости накопления мутантов в клонированной популяции EV11 [14] и имеющиеся данные литературы о скорости накопления внутриклеточного пула РНК у энтеровирусов [15] позволяют с достаточным основанием утверждать, что образование «химерных» вирионов в инфицированной клетке является результатом одновременной трансляции консенсусного и мутантного генома с последующей инкапсидацией daf⁺ РНК в Daf⁻ капсид. Альтернативным объяснением существования фенотипических Daf⁻ вариантов, несущих daf⁺

геном, может быть блокирование сайта связывания с DAF на поверхности вириона рецептором DAF, содержащимся в вирусосодержащей жидкости в результате разрушения клеток RD в процессе получения вируса.

Таким образом, полученные нами данные могут свидетельствовать в пользу участия в патогенезе энтеровирусной инфекции особой субпопуляции энтеровирусов, образующейся в результате эффекта транскрипции или «фенотипического смешивания» за счет своеобразной маскировки рецепторной специфичности, позволяющей вирусной популяции преодолевать тканевые барьеры.

Выводы

1. Популяция клонированного вируса EV11 при культивировании в культуре клеток RD является гетерогенной по признаку рецепторной специфичности. Преобладающая часть вирионов (мажорный компонент популяции) использует для проникновения в клетку рецептор DAF, в то время как приблизительно 0,1% популяции (минорный компонент) инфицирует клетки RD по DAF-независимому механизму.

2. В составе минорного компонента вирусной популяции, не взаимодействующего с эритроцитами, кроме мутантов, у которых Daf⁻ фенотип сохраняется в потомстве, существует фракция вирионов, у которых Daf⁻ признак не наследуется (фенотипические Daf⁻ варианты).

3. Образование фенотипических Daf⁻ вариантов может быть результатом инкапсидации daf⁺ генома в Daf⁻ капсид, белки которого являются продуктом трансляции мутантного daf⁻ генома. ■

Резайкин А.В. – ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г.Екатеринбург; *Новоселов А.В.* – к.м.н., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г.Екатеринбург; *Сергеев А.Г.* – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г.Екатеринбург; *Фадеев Ф.А.* – к.б.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г.Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Резайкин Алексей Васильевич, 620109, г.Екатеринбург, ул.Ключевская 17, тел.(343)214-86-85, e-mail: alexrez@yandex.ru

Литература:

1. Rossmann M.G., Arnold E., Erickson J.W. et al. Structure of human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature (London)* 1985; 317: 145 - 9.
2. Rotbart H.A., Hayden F.G. Picornavirus infections: a primer for the practitioner. *Arch Fam Med* 2000; 9: 913 - 8.
3. Bergelson J.M., Chan M., Solomon K.R., St John N.F., Lin H., Finberg R.W. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6245 - 4.
4. Stuart A.D., Eustace H.E., McKee T.A., Brown T.D. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. *J Virol* 2002; 76 (18): 9307 - 16.
5. Stuart A.D., McKee T.A., Williams P.A. et al. Determination of the structure of a decay accelerating factor-binding clinical isolate of echovirus 11 allows mapping of mutants with altered receptor requirements for infection. *J Virol* 2002; 76 (15): 7694 - 11.
6. Powell R.M., Schmitt V., Ward T., Goodfellow I., Evans D.J., Almond J. W. Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some haemagglutinating strains use more than one cellular receptor. *J Gen Virol* 1998; 79: 1707 - 7.
7. Sergeev A.G., Novoselov A.V., Bubenschikov A.V., Kondrashova Z.N. Genetic analysis of echovirus 11 variability in adsorption to human erythrocytes. *Arch Virol* 1994; 134 (2): 129 - 11.
8. Резайкин А.В., Новоселов А.В., Фадеев Ф.А., Сергеев А.Г., Лебедев С.В. Картирование точечных мутаций, приводящих к утрате сродства вируса ECHO11 к рецептору DAF (CD55). *Вопросы вирусологии* 2009; 54 (1): 41 - 4.
9. Rezaikin A.V., Novoselov A.V., Sergeev A.G., Fadeyev F.A., Lebedev S.V. Two clusters of mutations map distinct receptor-binding sites of echovirus 11 for the decay-accelerating factor (CD55) and for canyon-binding receptors. *Virus Res* 2009; 145(1): 74 - 9.
10. Husson-van Vliet J., Roussel P. Pipetting errors in viral titrations: a useful approach. *J Virol Methods* 1988; 22(2-3): 183 - 8.
11. Cova L., Aymard M. Isolation and characterization of non-haemagglutinating echovirus 11. *J Gen Virol* 1980; 51: 219 - 4.
12. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004; 79: 1707 - 7.
13. Domingo E. Mechanisms of viral emergence. *Vet Res* 2010; 41(6): 38. Review.
14. Novoselov A.V., Lozhnikov A.B., Chereshev V.A. et al. Mathematical modelling of mutant accumulation kinetics in a cloned viral population. *Russ J Numer Anal Math Modelling* 2004; 19 (4): 293 - 12.
15. Лурия С., Дарнелл Дж., Балтимор Б., Кэмпбелл Э. *Общая вирусология*. М: Мир; 1981.