

# Изменение рецепторной специфичности вируса ЕСНО11 определяет аминокислотная замена в белке VP2

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

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии Уральской государственной медицинской академии Росздрава, г. Екатеринбург

Изучение специфичности взаимодействия вирусов с клеточными рецепторами играет важную роль в понимании молекулярных основ вирусного тропизма и механизмов реализации патогенного потенциала вирусов в организме человека и животных. Традиционно считалось, что каждый представитель рода *Enterovirus* для проникновения в клетку может использовать лишь один строго определенный клеточный рецептор. Вместе с тем было показано, что некоторые энтеровирусы могут приобретать способность взаимодействовать с альтернативным клеточным рецептором. По данным литературы, изменение рецепторной специфичности энтеровирусов обусловлено аминокислотными заменами в участках структурных белков, формирующих антирецептор. Показано, что для полиовируса 1-го типа, адаптированного к лабораторным мышам, способность взаимодействовать с мышинным гомологом PVR (полиовирусный рецептор) была обусловлена аминокислотными заменами Thr22→Ple в белке VP1 и Ser31→Thr в белке VP2 [1]. Прототипный штамм Nancy вируса Коксаки В3, не обладающий сродством к клеточному рецептору DAF, после ряда пассажей на культуре клеток RD (клетки рабдомиосаркомы человека) приобретал способность связываться с этим рецептором. При этом изменение рецепторной специфичности было обусловлено заменой Thr151→Ser в белке VP2 [5].

Большинство вирусов ЕСНО для адсорбции на поверхности чувствительной клетки используют рецептор DAF (CD55) [4]. Ранее нами было показано, что популяция вируса ЕСНО11 гетерогенна по признаку рецепторной специфичности и содержит неаффинные к DAF (DAF<sup>-</sup>) частицы с измененной структурой антирецептора [6]. Доля DAF<sup>-</sup> частиц в популяции DAF<sup>+</sup> клона составила  $3 \times 10^{-5}$ , что соответствовало частоте спонтанных точковых мутаций у РНК-содержащих вирусов ( $10^{-4}$ – $10^{-5}$ ) [2]. Полученные данные позволили высказать предположение, что изменение рецепторной специ-

фичности вируса ЕСНО11 явилось результатом точковой мутации по определенной нуклеотидной позиции, затрагивающей вирусный антирецептор. Для проверки этого предположения было проведено секвенирование структурной части генома исходного DAF<sup>+</sup> вируса, а также выделенного из него DAF<sup>-</sup> мутанта.

Целью работы явилось картирование нуклеотидной замены, приводящей к изменению рецепторной специфичности вируса ЕСНО11 и утрате им способности взаимодействовать с рецептором DAF.

## Материалы и методы

В работе использовали клоны 5.9.11.5 (DAF<sup>+</sup>) и 103 (DAF<sup>-</sup>) полученные из клинического изолята вируса ЕСНО11 и описанные ранее [6]. Выделение вирусной РНК проводили методом сорбции на силикагеле с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва). Для проведения обратной транскрипции использовали набор «РЕВЕРТА-L-100» того же производителя.

Структурную часть генома (около 3 тыс. оснований, кодирующих белки вирусного капсида VP1–VP4) клонировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в виде шести перекрывающихся сегментов с использованием праймеров, представленных в табл. 1.

Для проведения ПЦР готовили смесь, включающую следующие компоненты: 4 ед. ДНК-полимеразы («ДиаТак», ЦНИИ эпидемиологии, Москва), 2 mM смесь dNTP, 10 pM каждого из двух праймеров, реакционный буфер (67 mM Трис-HCl (pH 8,3), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>). ПЦР проводили по следующей схеме: 1 цикл — 95°C — 5 минут; 42 цикла — 95°C — 10 секунд, 48°C — 10 секунд, 72°C — 40 секунд; и заключительный цикл — 72°C — 5 минут.

Для анализа продуктов амплификации использовали электрофорез в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Таблица 1. Праймеры для амплификации структурной части генома вируса ECHO11

Пары праймеров	Название	Последовательность	Область амплификации *
1 пара	1S	AGCTATTGGATTGGCCATCC	603 – 1 185
	1A	GCATCAGGAAATTTCCACCA	
2 пара	2S	AAAGACTCTCCGGTTGGTG	1 148 – 1 693
	2A	GCCATTGTA CTGCACACA	
3 пара	3S	CGTCACGGTCGCCCAATGT	1 657 – 2 202
	3A	GACTGCAGACCCACG TCCCA	
4 пара	4S	GGTACGCATGTCGTATGGGA	2 168 – 2 617
	4A	GGACTCTGACCTCGAGTGGT	
5 пара	5S	GGACAATTAACGCAAGCGTATGGT	2 582 – 3 166
	5A	GGGTTGGTTGATGTTGCCAT	
6 пара	6S	AGCACAG TGAGAGTGTA CT	3 131 – 3 422
	6A	CCCTGTTATAATCTCCACA	

Примечание. \* – область амплификации указана по позициям нуклеотидов в геноме вируса ECHO11 (№AY167103 в GenBank)

Секвенирование ДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) с использованием реакционной смеси ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.0 (Applied Biosystems, США) по прямой и обратной последовательностям (праймеры 1S, 2S, 3S, 4S, 5S, 6S для прямой, праймеры 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A — для обратной последовательности).

Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием компьютерной программы MEGA, версия 3.1 [3].

## Результаты и осуждение

Проведено секвенирование структурной части генома (2601 основание) родительского DAF<sup>-</sup> клона 5.9.11.5 и выделенного из него DAF<sup>-</sup> клона 103. Последовательность нуклеотидов структурной части генома клона 5.9.11.5 представлена в табл. 2.

Сравнение нуклеотидных последовательностей показало наличие в геноме мутантного по DAF — признаку клона 103 замены G→A в 746 позиции, что соответствует 162 триплету нуклеотидов, кодирующих белок VP2. Эта мутация приводит к замене аминокислоты глицина (G) на глутаминовую кислоту (E) в белке VP2 (табл. 3).

Замена нейтральной аминокислоты — глицина на гидрофильную глутаминовую кислоту, очевидно, изменяет конформацию вирусного антирецептора в участке, ответственном за связывание с клеточным рецептором DAF. Сохранение способности мутантов к активной репродукции в культуре клеток ФЭЧ (фибробласты эмбриона человека) свидетельствует о том, что

вирионы с модифицированным антирецептором для адсорбции на клеточной мембране используют какой-то иной, нежели DAF, рецептор.

## Выводы

1. Изменение рецепторной специфичности у вирусов ECHO может быть обусловлено одной точечной мутацией в структурной части генома.

2. Утрата способности к взаимодействию с рецептором DAF у вируса ECHO11 связана с мутацией, приводящей к замене глицина на глутаминовую кислоту в 162 позиции белка VP2.

## Литература

- Couderc T., Delpeyroux F., le Blay H. et al. Mouse adaptation determinants of poliovirus type 1 enhance viral uncoating / T. Couderc, F. Delpeyroux, H. le Blay, B. Blondel // J. Virol. — 1996. — V.70, №1. — P. 305–312.
- Domingo E. RNA virus mutations and fitness for survival / Domingo E., Holland J. J. // Annu. Rev. Microbiol. — 1997. — V.51. — P. 151–178.
- Kumar S. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [Text] / S. Kumar, K. Tamura, M. Nei // Briefings in Bioinformatics. — 2004. — V.5. — P. 150–163.
- Powell R. M. Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some hemagglutinating strains use more than one cellular receptor / R. M. Powell, V. Schmitt, T. Ward, I. Goodfellow, D. J. Evans, J. W. Almond // J. of Gen. Virol. — 1998. — V. 79. — P. 1707–1713.
- Schmidtke M. Attachment of Coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1 / M. Schmidtke, II.-C. Selinka, A. Heim, B. Jahn, M. Tonew, R. Kandolf, A. Stelzner, R. Zell // Virology. — 2000. — V.275. — P. 77–88.
- Sergeev A. G. Genetic analysis of echovirus 11 variability in adsorption to human erythrocytes / A. G. Sergeev, A. V. Novoselov, A. V. Bubenchikov // Arch. Virol. — 1994. — V.134, №1–2. — P. 129–139.

Таблица 2. Последовательность нуклеотидов структурной части генома клона 5.9.11.5

Белок	Последовательность нуклеотидов																			
VP4	ATG	GGA	GCT	CAA	GTG	TCG	ACA	CAA	AAG	ACT	GGA	GCG	CAT	GAG	ACC	GGT	TTG	AGT	GCC	
	AGC	GGG	AAC	TCA	ATT	ATA	CAT	TAC	ACC	AAC	ATC	AAC	TAC	TAT	AAG	GAT	GCC	GCG	TCA	
	AAC	TCA	GCA	AAC	AGG	CAA	GAC	TTC	TCC	CAA	GAT	CCC	GGG	AAG	TTC	ACA	GAA	CCG	GTG	
	AAA	GAT	ATA	ATG	GTG	AAA	TCA	CTA	CCT	GCT	CTA	AAC								
VP2	TCA	CCA	TCT	GCC	GAG	GAG	TGC	GGT	TAT	AGC	GAC	AGA	GTG	CGT	TCC	ATC	ACA	CTT	GGT	
	AAT	TCC	ACC	ATA	ACA	ACC	CAG	GAG	AGC	GCC	AAC	GTG	GTG	GTG	GCA	TAT	GGC	AGA	TGG	
	CCC	GAG	TAC	TTG	AAG	GAC	GAT	GAG	GCC	ACC	GCC	GAG	GAC	CAA	CCA	ACC	CAG	CCG	GAT	
	GTA	GCT	ACT	TGT	AGG	TTT	TAC	ACA	TTG	GAG	TCA	GTC	ACA	TGG	GAG	AAA	GAC	TCA	CCA	
	GGA	TGG	TGG	TGG	AAG	TTT	CCA	GAC	GCT	CTG	AAG	GAC	ATG	GGC	TTA	TTT	GGG	CAG	AAT	
	ATG	TAC	TAT	CAC	TAC	CTA	GGT	AGG	GCT	GGA	TAC	ACT	ATA	CAC	GTG	CAG	TGC	AAC	GCC	
	TCC	AAA	TTC	CAC	CAG	GGC	TGC	CTG	ATG	GTT	GTC	TGC	GTG	CCA	GAG	GCG	GAA	ATG	GGC	
	TGT	AGT	CAG	ATT	GAT	GGT	ACA	GTA	AAT	GAG	CAC	AGT	CTG	AGT	GAA	GGA	GAG	ACT	GCT	
	AAG	AAA	TTT	GCA	GCC	ACT	TCC	ACT	AAC	GGA	ACA	AAT	ACA	GTC	CAA	TCA	ATC	GTG	ACG	
	AAT	GCA	GGC	ATG	GGA	GTG	GGT	GTG	GGC	AAC	TTA	ACC	ATT	TTC	CCA	CAT	CAA	TGG	ATT	
	AAC	TTG	CGA	ACA	AAC	AAT	TGT	GCC	ACT	ATA	GTG	ATG	CCA	TAC	ATC	AAC	AAT	GTG	CCT	
	ATG	GAC	AAC	ATG	TTT	AGA	CAC	CAC	AAT	TTT	ACA	CTG	ATG	ATC	AAA	CCC	TTT	GTG	CCA	
	TTG	GAT	TAC	TCG	TCA	GAT	TCA	TCT	ACA	TAT	GTA	CCA	GTT	ACA	GTC	ACG	GTG	GCC	CCG	
	ATG	TGC	GCA	GAA	TAC	AAT	GGC	TTG	AGA	TTG	GCG	ACT	TCG	TTG	CAA					
	VP3	GGT	TTG	CCT	GTA	ATG	ATC	ACC	CCA	GGA	AGT	AAC	CAG	TTC	TTG	ACC	TCA	GAC	GAT	TTT
		CAA	TCA	CCA	TCA	GCC	ATG	CCA	CAG	TTT	GAT	GTA	ACA	CCA	GAG	TTG	AAC	ATA	CCT	GGT
GAA		GTG	CAG	AAC	CTC	ATG	GAG	ATT	GCA	GAG	GTC	GAC	TCC	GTG	GTT	CCA	GTA	AAC	AAT	
GTG		GAA	GGG	AAG	CTG	GAC	ACG	ATG	GAT	ATC	TAT	CGA	ATT	CCT	GTA	CAG	AGT	GGC	AAC	
CAC		CAG	AGT	ACA	CAA	GTG	TTT	GGC	TTC	CAG	GTG	CAG	CCA	GGG	TTG	GTA	AAC	AAT	TTT	
AAG		CAC	ACA	TTA	TTG	GGG	GAA	ATA	CTG	AAC	TAC	TAT	GCA	CAC	TGG	TCA	GGG	AGC	ATC	
AAA		CTC	ACG	TTC	GTC	TTT	TGC	GGT	TCA	GCC	ATG	GCC	ACC	GGG	AAG	TTC	CTA	CTT	GCG	
TAT		GCA	CCA	CCA	GGG	GCG	AAT	GCC	CCG	AAG	AGC	AGG	AAG	GAT	GCA	ATG	CTG	GGC	ACG	
CAC		ATC	ATC	TGG	GAT	GTG	GGG	TTG	CAG	TCA	TCA	TGC	GTC	TTG	TGT	ATA	CCT	TGG	ATT	
AGT		CAG	ACG	CAC	TAT	AGA	CTA	GTG	CAA	CAA	GAT	GAG	TAC	ACC	AGT	GCA	GGA	AAT	GTG	
ACT		TGT	TGG	TAT	CAG	ACA	GGG	ATT	GTG	GTT	CCA	GCA	GGC	ACT	CCA	ACA	TCG	TGC	TCC	
ATC		ATG	TGT	TTT	GTT	TCA	GCA	TTC	GAT	GAC	TTT	TCG	GTG	CGC	TTG	CTA	AAA	GAT	ACA	
CCA		TTT	ATA	GAG	CAA	ACT	GCC	CTC	CTG	CAA										
VP1		GGT	GAT	GTG	GTG	GAG	GCA	GTC	GAA	AAT	GCC	GTT	GCA	CGC	GTG	GCA	GAC	ACC	ATT	AGC
	AGT	GGG	CCA	TCA	AAT	TCA	CAA	GCT	GTG	CCT	GCT	CTG	ACC	GCT	GTG	GAG	ACG	GGG	CAC	
	ACG	TCT	CAA	GTA	ACC	CCC	AGT	GAC	ATC	ATA	CAG	ACC	AGG	CAC	GTG	CAC	AAC	TAC	CAC	
	TCT	AGA	TCA	GAA	TCC	AGT	ATT	GAG	AAC	TTT	CTT	TGT	AGG	TCG	GCA	TGC	GTC	TAC	ATG	
	GGA	GAA	TAC	CAC	ACA	ACC	AAT	ACC	GAT	GCC	TCC	AAG	TTG	TTT	GCG	TCA	TGG	ACC	ATC	
	AAC	GCA	CGG	CGT	ATG	GTA	CAA	ATG	AGG	CGC	AAA	CTC	GAG	ATG	TTC	ACG	TAC	GTT	AGG	
	TTT	GAC	GTG	GAA	GTG	ACA	TTT	GTG	ATT	ACC	AGT	AAA	CAA	GAT	CAA	GGG	ACC	AAA	CTG	
	GGC	CAA	GAT	ATG	CCA	CCA	CTG	ACA	CAC	CAA	ATT	ATG	TAT	ATA	CCA	CCA	GGG	GGC	CCT	
	ATA	CGG	AAG	TCA	GTA	ACG	GAC	TAC	ACG	TGG	CAA	ACA	TCC	ACC	AAC	CCG	AGT	ATC	TTT	
	TGG	ACT	GAG	GGA	ATC	GCA	CCA	CCC	AGG	ATG	TCC	ATC	CCT	TTC	ATT	AGT	ATT	GGC	AAT	
	GCC	TAC	AGT	AAT	TTT	TAT	GAC	GGC	TGG	TCA	CAT	TTC	TCT	CAA	AAT	GGT	GTG	TAC	GGT	
	TAC	AAT	ACG	CTC	AAT	CGT	ATG	GGC	CAA	ATT	TAC	GTC	AGG	CAC	GTG	AAC	GGA	TCC	TCA	
	CCA	CTA	CCT	ATG	ACA	AGC	ACA	GTT	AGG	ATG	TAC	TTC	AAG	CCA	AAG	CAC	GTG	AAA	GTG	
	TGG	GTC	CCA	CGC	CCG	CCT	AGG	TTG	TGC	CAG	TAC	GTG	AAT	GCA	TCA	ACT	GTC	ACA	TTT	
	AAA	CCC	ACC	AAC	ACT	ACT	GAG	AAG	AGA	ACA	AGC	ATT	AAC	TAC	ATA	CCA	GAG	AAC	GTC	
	AAA	CCT	GAT	GTT	TCA	ACA	TAC													

Таблица 3. Последовательность аминокислот в участке белка VP2 у DAF<sup>+</sup> и DAF<sup>-</sup> клонов вируса ECHO11

Название клона	Последовательность аминокислот (с 154 по 183)
5.9.11.5 (DAF <sup>+</sup> )	KFAATSTN : T NTVQSIIVTNA GMGVGVGNLT
103 (DAF <sup>-</sup> )	KFAATSTN : T NTVQSIIVTNA GMGVGVGNLT