

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Усольтцева П.С.<sup>1</sup>, Алимов А.В.<sup>1</sup>, Резайкин А.В.<sup>1</sup>, Сергеев А.Г.<sup>1,2</sup>, Новосёлов А.В.<sup>1</sup>

## РОЛЬ НЕОНАТАЛЬНОГО FC РЕЦЕПТОРА В ДЕПРОТЕИНИЗАЦИИ ВИРУСОВ ЕСНО И КОКСАКИ А9

<sup>1</sup> ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, 620030, г. Екатеринбург, Россия;<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, г. Екатеринбург, Россия

**Цель** настоящей работы – определение функции человеческого неонатального рецептора для Fc фрагмента IgG (hFcRn) в качестве общего депротеинизирующего клеточного рецептора для вирусов ЕСНО (эховирусов) и Коксаки А9 при заражении культуры клеток рабдомиосаркомы человека (RD). **Материал и методы.** Исследовали протективный эффект человеческого сывороточного альбумина, очищенного от глобулинов (HSA-GF) и антител к hFcRn, при заражении культур клеток RD штаммами и клонами энтеровирусов вида В с разной рецепторной специфичностью (эховирусы 3, 9, 11, 30-го типов и вирусы Коксаки А9, В4, В5). **Результаты.** Было показано, что HSA-GF при концентрациях 4% и менее защищал клетки RD от инфицирования эховирусами 3, 9, 11-го типов и вирусом Коксаки А9. Аналогичный спектр протективной активности проявляли антитела к hFcRn в концентрациях  $\geq 2,5$  мкг/мл, защищавшие клетки RD от инфицирования эховирусами 3, 9, 11, 30-го типов и вирусом Коксаки А9. Протективный эффект HSA-GF и антител к hFcRn не наблюдался при заражении клеток RD вирусами Коксаки В4 и В5, депротеинизация которых требует участия коксакивирусного-аденовирусного рецептора. **Обсуждение.** Использование ранее охарактеризованных клонов эховируса 11-го типа с разной рецепторной специфичностью позволило определить функцию hFcRn как каньон-связывающего и депротеинизирующего рецептора в культуре клеток RD. Корреляция величины и динамики наблюдавшихся протективных эффектов с рецепторной специфичностью использованных в работе энтеровирусов указывала на двухэтапность взаимодействия DAF-зависимых эховирусов с рецепторами клеток. **Заключение.** Определена роль hFcRn как каньон-связывающего и депротеинизирующего рецептора для эховирусов и вируса Коксаки А9 при репродукции в клетках RD. Подтверждена двухэтапная схема взаимодействия с рецепторами DAF-зависимых эховирусов при входе в клетку: сначала со связывающим рецептором (DAF), затем – с депротеинизирующим (hFcRn).

**Ключевые слова:** эховирус; вирус Коксаки; депротеинизирующий рецептор; FcRn; DAF; альбумин.

**Для цитирования:** Усольтцева П.С., Алимов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г., Новосёлов А.В. Роль неонатального FC рецептора в депротеинизации вирусов ЕСНО и Коксаки А9. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(3): 132-139.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-132-139>Usoltseva P.S.<sup>1</sup>, Alimov A.V.<sup>1</sup>, Rezaykin A.V.<sup>1</sup>, Sergeev A.G.<sup>1,2</sup>, Novoselov A.V.<sup>1</sup>

## THE ROLE OF THE NEONATAL FC RECEPTOR IN THE UNCOATING OF ECHOVIRUSES AND COXSACKIEVIRUS A9

<sup>1</sup> Yekaterinburg Scientific Research Institute of Viral Infections, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation;<sup>2</sup> Urals State Medical University, Yekaterinburg, 620019, Russian Federation

**The aim** of this study was to determine the role of the human neonatal receptor for the Fc fragment of IgG (hFcRn) as a common uncoating cellular receptor for echoviruses and coxsackievirus A9 during infection of human rhabdomyosarcoma (RD) cells. **Material and methods.** The protective effect of the human serum albumin, purified from globulins, (HSA-GF) and antibodies to hFcRn was studied in RD cells infected with several strains and clones of species B enteroviruses possessing different receptor specificity (echoviruses 3, 9, 11, 30 and coxsackieviruses A9, B4, B5). **Results.** It was shown that HSA-GF at concentrations of 4% or less protected RD cells from infection with echoviruses 3, 9, 11 and coxsackievirus A9. The antibodies to hFcRn at concentrations of 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  or less demonstrated the similar spectrum of protective activity in RD cells against infection with echoviruses 3, 9, 11, 30 and coxsackievirus A9. The protective effect of HSA-GF or the antibodies to hFcRn was not observed in RD cells infected with coxsackieviruses B4 and B5 that need coxsackievirus-adenovirus receptor for uncoating. **Discussion.** The usage of the previously characterized echovirus 11 clonal variants with different receptor specificity allowed us to define the function of hFcRn as a canyon-binding uncoating receptor in RD cells. The kinetics and magnitude of the observed protective effects correlated with receptor specificity of the enteroviruses used in this work supporting the two-step interaction of DAF-dependent echoviruses with the cellular receptors. **Conclusions.** In this study, the function of hFcRn was defined in RD cells as a canyon-binding and uncoating receptor for echoviruses and coxsackievirus A9. The two-step interaction of DAF-dependent echoviruses during entry into the cells was confirmed: initially with the binding receptor DAF and subsequently with the uncoating receptor hFcRn.

**Keywords:** echovirus; coxsackievirus; uncoating cellular receptor; FcRn; DAF; albumin.

**For citation:** Usoltseva P.S., Alimov A.V., Rezaykin A.V., Sergeev A.G., Novoselov A.V. The role of the neonatal FC receptor in the uncoating of echoviruses and coxsackievirus A9. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2019; 64(3): 132-139. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-132-139>

**For correspondence:** Alexey V. Rezaykin, Laboratory of Enteric Viral Infections, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, Yekaterinburg, 620030, Russian Federation. E-mail: alexrez@yandex.ru

**Для корреспонденции:** Резайкин Алексей Васильевич, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник - заведующий лабораторией энтеральных вирусных инфекций, ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора, 620030, г. Екатеринбург. E-mail: alexrez@yandex.ru

**Information about authors:**Usoltseva P.S., <http://orcid.org/0000-0002-2247-2776>Alimov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-0511-9409>Rezaykin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-8665-5299>Sergeev A.G., <http://orcid.org/0000-0002-5784-8673>Novoselov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-1450-8246>**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 29 July 2019

Accepted 20 August 2019

**Введение**

Согласно современной классификации, все типы вирусов ЕСНО (эховирусов) и вирус Коксаки А9 (CVA9), относятся к виду *Enterovirus B* рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae* порядка *Picornavirales* [1]. Для отдельных представителей рода *Enterovirus* (вирусов Коксаки В3 [2–4] и А21 [5]) экспериментально доказано двухэтапное взаимодействие с различными клеточными рецепторами при входе вируса в клетку. На первом этапе *связывающие рецепторы (рецепторы прикрепления)* обеспечивают взаимодействие вирионов с плазматической мембраной клеток, кластеризацию вирус-рецепторных комплексов, активацию путей трансмембранной передачи сигнала, а в поляризованных клетках – латеральное перемещение вирус-рецепторных комплексов по апикальной поверхности в область плотных межклеточных контактов. На втором этапе происходит взаимодействие эховирусов с *депротеинизирующими рецепторами*, которое вызывает необратимую трансформацию 160S вирионов в 135S А-частицы за счёт потери капсидного белка VP4 и структурной реорганизации капсидного белка VP1 [6]. Сайт связывания депротеинизирующих рецепторов с поверхностью вирионов находится в области *каньона*, который окружает возвышенность на поверхности капсида вблизи каждой из осей симметрии 5-го порядка. Последующее событие депротеинизации (освобождения) вирусной геномной РНК приводит к появлению пустых 80S капсидов. Если депротеинизирующий рецептор экспрессирован на плазматической мембране клеток, он может выполнять функции как связывающего, так и депротеинизирующего рецептора, включая формирование А-частиц.

Эховирусы могут использовать в качестве связывающих клеточных рецепторов фактор, ускоряющий распад комплемента (DAF, UniProt: P08174) [7, 8], протеогликаны гепарансульфата (HSPG, UniProt: P98160) [9–11], интегрин  $\alpha 2\beta 1$  и  $\alpha V\beta 3$  [12, 13]. Описаны варианты эховирусов, взаимодействующие только с рецептором DAF, только с HSPG, с DAF и с HSPG, наряду с вариантами, не использующими ни один из них [9]. Известны субтипичные варианты эховируса 9 (E9) с различным тропизмом к интегрину  $\alpha V\beta 3$  [14]. Изменение тропизма эховирусов к связывающему рецептору DAF или к HSPG может быть обусловлено единичной аминокислотной заменой в капсидном белке [11, 15, 16]. Селекция субтипичных вариантов с изменённым тропизмом к связывающим рецепторам способствует адаптации эховирусов к различным культурам клеток.

Связывающие рецепторы для CVA9 также представлены несколькими типами молекул. Интегрин  $\alpha V\beta 3$  является связывающим рецептором для CVA9 на клетках рабдомиосаркомы человека (RD) и GMK [17]. Описаны варианты CVA9, использующие интегрин  $\alpha V\beta 6$  для свя-

зывания с клетками A549 [18], и варианты, связывающиеся с HSPG на клетках GMK [11]. В культуре клеток SW480 молекулярный шаперон HSPA5 (UniProt: P11021) с участием бета-2-микроглобулина (B2M, UniProt: P61769) обеспечивали независимую от интегрин  $\alpha V\beta 6$  интернализацию CVA9 [19].

Все известные депротеинизирующие рецепторы для представителей рода *Enterovirus* относятся к суперсемейству иммуноглобулинов: 1) полиовирусный рецептор (PVR, UniProt: P15151) – рецептор для 3 типов полиовирусов; 2) коксакивирусный-аденовирусный рецептор (CAR, UniProt: P78310) – рецептор для 6 типов вирусов Коксаки В; 3) молекула межклеточной адгезии типа 1 (ICAM-1, UniProt: P05362) – рецептор для всех типов риновирусов, входящих в мажорную группу вида *Rhinovirus A*, всех типов вида *Rhinovirus B* и 5 типов вирусов Коксаки А: CVA13, CVA15, CVA18, CVA20 и CVA21 [20, 21].

Гликопротеин с молекулярной массой 44 кДа (gp44) был выделен и предварительно охарактеризован в качестве предполагаемого клеточного рецептора для эховирусов [22]. Моноклональные антитела (MAb) к gp44 защищали культуру клеток P2002 от инфицирования практически всеми типами эховирусов и вирусом CVA9 [23]. Однако сообщения о дальнейших исследованиях gp44 в доступных поисковых системах отсутствуют.

T. Ward и соавт. [24] обнаружили защитный эффект MAb к B2M при заражении клеток RD широким спектром типов эховирусов и CAV9. Также было показано, что добавление бычьего (BSA) или человеческого (HSA) сывороточного альбумина в среду поддержания культуры клеток RD ингибировало их инфицирование вирусом E7, подавляло образование А-частиц, но не препятствовало связыванию вируса с клетками [25]. Был установлен механизм инактивации вирусов E7 и E12 с помощью BSA, очищенного от глобулинов и жирных кислот, связанный с трансформацией вирионов в А-частицы в результате извлечения гидрофобного покет-фактора из вирионов [26]. Механизм протективного эффекта HSA, свободного от глобулинов, но не очищенного от жирных кислот, остался неизвестным, хотя предполагалось его блокирующее действие либо на вирионы эховирусов, либо на вторичный по отношению к DAF клеточный рецептор [25].

Человеческий неонатальный рецептор для Fc фрагмента IgG человека (hFcRn) является трансмембранным гетеродимером, состоящим из альфа-цепи FCGRT (UniProt: P55899) и нековалентно связанным с ней B2M [27]. Молекула FCGRT у человека представлена гликопротеином, относящимся к суперсемейству иммуноглобулинов (UniProt: P55899). В клетках человеческого происхождения она имеет молекулярную массу 45 кДа [28], близкую к молекулярной массе gp44, описанного ранее

[22]. На поверхности клеток FcRn выполняет функцию рецептора альбумина, а внутри клеток – функцию рецептора IgG и транспортного белка, обеспечивающего защиту IgG и альбумина от протеолитической деградации в лизосомах за счёт рециркуляции связанного лиганда к плазматической мембране или за счёт трансцитоза лиганда в поляризованных клетках [29].

**Целью** настоящей работы было определение роли hFcRn в качестве депротеинизирующего рецептора для эховирусов и CVA9 в культуре клеток RD. В экспериментальной части работы решались следующие задачи: 1) показать отсутствие вирус-инактивирующего действия человеческого сывороточного альбумина, очищенного от глобулинов, на клонированные варианты вируса E11 с различным тропизмом к рецептору DAF; 2) проверить спектр протективной активности человеческого сывороточного альбумина, очищенного от глобулинов, при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В, имеющими различную рецепторную специфичность; 3) исследовать протективную активность поликлональных антител (РАb) к hFcRn при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В с различной рецепторной специфичностью.

### Материал и методы

**Перевиваемые клеточные культуры.** Перевиваемая линия клеток RD была получена из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» Роспотребнадзора. Для проведения экспериментов клетки RD выращивали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> до образования плотного монослоя в культуральных пластиковых 96-луночных планшетах (Corning, США). В качестве ростовой среды использовали среду Игла MEM («ПанЭко», РФ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция). При пересевах клетки снимали с пластика раствором трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса («ПанЭко», РФ). В качестве среды поддержания при репродукции вирусов использовали среду 199 («ПанЭко», РФ) без добавления сыворотки.

**Вирусы.** Штаммы и клоны энтеровирусов вида В, использованные в работе, представлены в табл. 1. Гемагглютинирующий (Daf+) клон 431-1 вируса E11, использующий DAF в качестве первичного клеточного рецептора, и негемагглютинирующий (Daf-) клон 431-6 вируса E11, использующий другой, не идентифицированный клеточный рецептор, были получены и охарактеризованы ранее [16].

Все остальные штаммы, перечисленные в табл. 1, являлись клиническими изолятами, выделенными на клет-

ках RD в лаборатории энтеральных вирусных инфекций ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора из ликвора больных энтеровирусным менингитом. Генотипирование изолятов проводили по 2 фрагментам структурной части генома энтеровирусов, кодирующим капсидные белки VP1 и VP4-VP2, согласно описанным ранее методикам [30, 31].

**Препараты альбумина и антитела к hFcRn.** В экспериментах по изучению протективного эффекта при заражении клеток энтеровирусами использовали следующие коммерчески доступные реагенты: 1) HSA, очищенный от глобулинов (A8763 – Human serum albumin essentially globulin free, Merck/Sigma-Aldrich, Германия) (HSA-GF), получен в лиофилизированном виде; 2) кроличьи поликлональные антитела класса IgG к гетеродимеру человеческого FCGRT и B2M, (СТ009-T08, Sino Biological, Китай), полученные иммунизацией кроликов рекомбинантным человеческим гетеродимером FCGRT с B2M и очищенные аффинной хроматографией, получены в стерильной жидкой форме, без консерванта (hFcRn-PAb).

**Исследование вирусинактивирующего действия растворов человеческого сывороточного альбумина.** Для исследования вирусинактивирующего действия HSA-GF в растворе, к 100 мкл вирусосодержащей жидкости (ВСЖ), содержащей 200 ТЦД<sub>50</sub> соответствующего вируса, добавляли 100 мкл 8% (вес / объём) раствора альбумина в среде 199 для получения конечной концентрации 4%, перемешивали и инкубировали 60 мин при 37 °С. Контрольные пробы ВСЖ инкубировали в тех же условиях, но к ВСЖ добавляли 100 мкл среды 199 без альбумина. После инкубации остаточные инфекционные титры вирусов определяли методом конечных разведений на клетках RD в 96-луночных планшетах (8 реплик на разведение) и рассчитывали по методу Спирмена-Кербера.

**Исследование протективного эффекта человеческого сывороточного альбумина при заражении культур клеток RD.** В экспериментах по ингибированию репродукции вирусов с помощью HSA-GF использовали культуру клеток RD, выращенную в 96-луночных планшетах. В предварительных экспериментах было установлено, что HSA-GF в конечных концентрациях от 0,25 до 4% (вес / объём) не оказывал цитотоксического действия в течение 5-суточного периода наблюдения. Для обнаружения зависимости протективного эффекта от концентрации альбумина, использовали одинаковые заражающие дозы вирусов (100 ТЦД<sub>50</sub> на лунку) и различные концентрации альбумина, полученные 2-кратными разведениями в среде 199. После удаления среды роста, клеточный монослой однократно промывали средой 199, затем вносили в лунки планшета по 100 мкл среды 199 с различными концентрациями HSA-GF. Инкубировали планшеты 60 мин при 37 °С, затем в лунки вносили по 100 мкл ВСЖ, содержащей 100 ТЦД<sub>50</sub> соответствующего вируса (множественность заражения составляла 0,001 ТЦД<sub>50</sub> на клетку). Для учёта цитопатического эффекта (ЦПЭ) вирусов, в контрольные лунки вместо раствора альбумина вносили 100 мкл среды 199. Для учёта состояния клеточного монослоя в контрольные лунки вместо ВСЖ вносили 200 мкл среды 199. Каждую конечную концентрацию HSA-GF (4, 2, 1, 0,5 и 0,25%) исследовали в 8 репликах в 2 повторах эксперимента с каждым вирусом. В ходе экспериментов ЦПЭ ежедневно визуально оценивали с помощью ин-

Таблица 1

Типы, штаммы и клоны энтеровирусов, использованные в экспериментах

Тип энтеровируса (аббревиатура)	Номер штамма (клона)	Daf фенотип	Идентификатор GenBank
<i>Echovirus 11</i> (E11)	(431-1)	Daf+	JF925116
	(431-6)	Daf-	JF925117
<i>Echovirus 3</i> (E3)	206	Daf+	MK962649, MK962655
<i>Echovirus 9</i> (E9)	8100	Daf-	MK962651, MK962657
<i>Echovirus 30</i> (E30)	7500	Daf-	MK962648, MK962654
<i>Coxsackievirus B4</i> (CVB4)	1000	Daf-	MK962653, MK962659
<i>Coxsackievirus B5</i> (CVB5)	3122	Daf-	MK962652, MK962658
<i>Coxsackievirus A9</i> (CVA9)	3000	Daf-	MK962650, MK962656

вертированного микроскопа, окончательный учет результатов проводили на 5-е сутки после фиксации монослоя 96% раствором этилового спирта и последующей окраски 0,5% раствором кристалвиолета. Степень ЦПЭ оценивали по проценту клеток в монослое с характерными для эховирусов признаками цитопатологии по условной 4-плюсовой шкале: “–” (0%); “1+” (<25%); “2+” (от 25% до <50%), “3+” (от 50% до <75%) и “4+” (от 75% до 100%). Затем вычисляли средние величины со стандартными отклонениями и обрабатывали статистическими методами.

*Исследование протективного эффекта hFcRn-PAb в культуре клеток RD.* Эксперименты по ингибированию репродукции вирусов с помощью hFcRn-PAb были выполнены на культуре клеток RD в 96-луночных планшетах. В предварительных экспериментах показано, что hFcRn-PAb в концентрациях от 0,15 до 10 мкг/мл не оказывали цитотоксического действия на клетки в течение 5 сут наблюдения. Для обнаружения протективного эффекта использовали одинаковые заражающие дозы вирусов (100 ТЦД<sub>50</sub> на лунку) и различные концентрации антител в среде 199. После удаления среды роста клеточный монослой однократно промывали средой 199, затем в лунки вносили по 50 мкл растворов антител в различных концентрациях и инкубировали 1 ч при 37 °С. После этого в каждую лунку с раствором антител вносили по 50 мкл ВСЖ, содержащей 100 ТЦД<sub>50</sub> соответствующего вируса (множественность заражения 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл). Каждую конечную концентрацию антител (10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,6 и 0,3 мкг/мл) тестировали в 8 репликах с каждым вирусом в 2 независимых экспериментах. В лунки с положительным контролем ЦПЭ вируса вносили по 50 мкл ВСЖ и 50 мкл среды 199 без антител. Для контроля цитотоксичности антител вместо ВСЖ в лунки с растворами антител вносили 50 мкл среды 199 и 50 мкл раствора антител. Лунки с отрицательным контролем, для мониторинга состояния клеточного монослоя, содержали 100 мкл среды 199. Контроль отсутствия неспецифического вируснетрализующего действия hFcRn-PAb (10,0 мкг/мл) проводили по схеме эксперимента, описанной выше. Методика учёта ЦПЭ описана выше.

*Статистические методы обработки результатов.* Для определения инфекционного титра вирусов использовали формулу Спирмена–Кербера с расчётом суммарной аналитической погрешности [32]. Статистически достоверные различия между экспериментальными группами определяли методами ANOVA [33] или с помощью непараметрического *U*-теста Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

*Отсутствие инактивирующего действия раствора HSA-GF на клоны вируса E11.* Поскольку было известно, что раствор BSA, очищенный от глобулинов и жирных кислот, инактивировал вирусы E7 и E12 [26], проверяли инактивирующее действие раствора HSA очищенного от глобулинов, на клонированные варианты вируса E11. Вирусные пулы (100 ТЦД<sub>50</sub> в 100 мкл) инкубировали в растворе HSA-GF с конечной концентрацией 4% при 37 °С в течение 1 ч, этого времени достаточно для заражения культур клеток RD в экспериментах по исследованию протективного эффекта HSA-GF. Вирусинактивирующее действие раствора HSA-GF отсутствовало. Прединкубация не изменяла инфекционный титр клонов E11 с разной рецепторной специфичностью.

*Исследование протективного эффекта альбумина*

*при заражении культур клеток RD различными типами энтеровирусов вида В.* Зависимость протективного эффекта от концентрации HSA-GF изучали на нескольких интервалах времени после заражения (p.i.) культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой (100 ТЦД<sub>50</sub> на лунку при множественности заражения 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл) эховирусов 3 (E3), 9 (E9), 11 (E11), коксакивирусов A9 (CVA9) и B5 (CVB5). Результаты показаны в табл. 2.

Сравнение протективного эффекта HSA-GF в клетках RD в отношении 2 близкородственных клонов E11 показало более выраженный ингибирующий эффект альбумина в случае заражения культуры клеток RD *daf*<sup>-</sup> клоном 431-6, не взаимодействовавшим с рецептором DAF, по сравнению с DAF-зависимым *daf*<sup>+</sup> клоном 431-1. При отсутствии альбумина в поддерживающей среде, 100% ЦПЭ наблюдался через 48 ч после заражения клеток каждым из клонов. Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 ч после заражения клоном 431-1, была 0,5% (ЦПЭ 81,3±4,1% относительно 100,0% при отсутствии альбумина). Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 ч после заражения клоном 431-6, также составляла 0,5%, но снижение ЦПЭ было более выраженным (40,6±4,6%). Максимальная длительность протективного эффекта в случае *daf*<sup>+</sup> клон 431-1 при 4% концентрации HSA-GF составляла 96 ч p.i. (ЦПЭ 50,0%). В случае *daf*<sup>-</sup> клон 431-6 протективный эффект 4% концентрации HSA-GF наблюдался даже через 120 ч после заражения (ЦПЭ 12,5±4,7%). Кроме того, у клон 431-1 наблюдался более быстрый прирост ЦПЭ по времени при использовании 1 и 2% концентраций HSA-GF в сравнении с клоном 431-6.

Сравнение протективного эффекта HSA-GF в клетках RD, инфицированных E3 и E9, выявило более быструю кинетику нарастания ЦПЭ в случае *Daf*<sup>+</sup> штамма E3 в сравнении с *Daf*<sup>-</sup> штаммом E9. При отсутствии альбумина в поддерживающей среде, 100% ЦПЭ наблюдался через 48 ч p.i. как у вируса E3, так и у E9. Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 ч p.i. у *Daf*<sup>+</sup> штамма E3 (ЦПЭ 37,5±4,7%), составляла 1,0%. Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 p.i. у *Daf*<sup>-</sup> штамма E9 (ЦПЭ 18,8±4,1%), была в 4 раза ниже: 0,25%. Максимальная длительность протективного эффекта в случае *Daf*<sup>+</sup> штамма E3 при использовании 4% концентрации HSA-GF составляла 120 ч (ЦПЭ 62,5±4,7%). Максимальная длительность протективного эффекта в отношении *Daf*<sup>-</sup> штамма E9 также составляла 120 ч, но при использовании 4, 2 и 1% концентраций HSA-GF (в частности, через 120 ч p.i. при 1% концентрации альбумина наблюдался ЦПЭ лишь 6,3±4,1%).

Таким образом, при попарном сравнении был выявлен более выраженный протективный эффект HSA-GF в отношении *daf*<sup>-</sup> клон 431-6 вируса E11 и *Daf*<sup>-</sup> штамма E9 в сравнении с менее выраженным ингибированием ЦПЭ в отношении *daf*<sup>+</sup> клон 431-1 вируса E11 и *Daf*<sup>+</sup> штамма E3.

В отличие от использованных в данной работе эховирусов и вирусов Коксаки В, штамм вируса CVA9 характеризовался замедленной кинетикой развития ЦПЭ: в отсутствие альбумина 100% ЦПЭ наблюдался через 72 ч. Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ (до 43,8±4,1%) через 72 ч p.i., была 0,25%. Протективный эффект через 120 ч p.i.

Таблица 2

**Протективный эффект альбумина HSA-GF в клетках RD, инфицированных различными энтеровирусами вида В (ЦПЭ ± m)<sup>a</sup>**

Тип клон/штамм	Время после заражения, ч	Концентрация альбумина HSA-GF, %					
		0,0	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0
E11 431-1	24	12,5±4,7	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	81,3±4,1*	46,9±3,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	96,9±3,1	81,3±4,1*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	50,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	90,6±4,6
E11 431-6	24	18,8±4,1	18,8±4,1	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	81,3±4,1*	40,6±4,6*	40,6±4,6*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	65,6±4,6*	59,4±4,6*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	81,3±4,1*	6,3±4,1*
E3 206	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	12,5±4,7*
	24	40,6±4,6	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	37,5±4,7*	6,3±4,1*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	43,8±4,1*	0,0±0,0*
E9 8100	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	90,6±4,6	12,5±4,7*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	62,5±4,7*
	24	18,8±4,1	6,3±4,1	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	93,8±4,1	18,8±4,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
CVA9 3000	72	100,0±0,0	100,0±0,0	43,8±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	81,3±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	6,3±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
CVB5 3122	48	37,5±4,7	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	43,8±4,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	65,6±4,6*	31,3±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	65,6±4,6*	9,4±4,6*
CVB4	24	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	87,5±4,7
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
CVB5	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Примечание. <sup>a</sup> – средний процент ЦПЭ по 8 репликам в 2 повторах эксперимента ± стандартная ошибка средней величины; \* – различия средних величин ЦПЭ в ячейке таблицы и ЦПЭ при 0% HSA-GF статистически достоверны (U-тест Манна-Уитни).

наблюдался при использовании HSA-GF в концентрациях 2% (ЦПЭ 65,6±4,6%) и 4% (ЦПЭ 9,4±4,6%).

Штамм CVB5 через 48 ч после заражения клеток RD демонстрировал развитие 100% ЦПЭ как в отсутствие альбумина, так и при всех концентрациях HSA-GF вплоть до 2%. При концентрации 4% HSA-GF снижение ЦПЭ не достигало статистически значимого отличия от контрольных лунок без альбумина.

Исследование протективной активности антител к hFcRn при заражении культур клеток RD различными типами энтеровирусов вида В. В предварительных экспериментах было установлено отсутствие вируснейтрализующего действия hFcRn-PAb в концентрации 10,0 мкг/мл после инкубации в течение 1 ч при 37°C со 100 ТЦД<sub>50</sub> соответствующих вирусов перед заражением клеток RD (данные не показаны). Зависимость протектив-

ного эффекта от концентрации hFcRn-PAb и от времени p.i. в культуре клеток RD вирусами E3, E9, E11, E30, CVA9, CVB4 и CVB5 показана в табл. 3.

Сравнение протективного эффекта hFcRn-PAb в клетках RD в отношении 2 близкородственных клонов вируса E11 (*daf*<sup>+</sup> клон 431-1 и *daf*<sup>-</sup> клон 431-6) выявило одинаковую минимальную концентрацию PAb (2,5 мкг/мл), обеспечившую отсутствие ЦПЭ в течение 120 ч p.i. Однако при меньшей концентрации hFcRn-PAb (1,25 мкг/мл) кинетика нарастания ЦПЭ по времени (через 72, 96 и 120 ч p.i.) была более быстрой (с меньшим протективным эффектом) в случае DAF-зависимого *daf*<sup>+</sup> клон 431-1 по сравнению с *daf*<sup>-</sup> клоном 431-6, не взаимодействовавшим с DAF.

Минимальные концентрации hFcRn-PAb, обеспечившие полное отсутствие ЦПЭ в течение 120 ч при заражении клеток RD штаммами вирусов E3, E9 и E30, составили соответственно 5,0; 2,5 и 1,25 мкг/мл. Более выраженная протективная активность hFcRn-PAb наблюдалась при использовании DAF<sup>-</sup> штаммов E9 и E30 в отличие от DAF<sup>+</sup> штамма вируса E3.

Штамм CVA9 характеризовался замедленным развитием ЦПЭ по сравнению с экховирусами и вирусами Коксаки В, использованными в данной работе. 100% ЦПЭ в отсутствие hFcRn-PAb наблюдался через 72 ч p.i. Минимальная концентрация

PAb, приводившая к полному отсутствию ЦПЭ в течение 120 ч при заражении клеток RD вирусом CVA9 была 0,6 мкг/мл.

Все использованные концентрации hFcRn-PAb, включая 10 мкг/мл, не проявляли защитного эффекта при заражении культуры клеток RD вирусами CVB4 и CVB5.

### Обсуждение

Энтеровирусы вида В характеризуются высокой внутриклеточной вариабельностью взаимодействия со связывающими рецепторами, такими как DAF [2, 34], HSPG [11], интегринны αVβ3 и αVβ6 [18]. Однако взаимодействие с известными депротенинизирующими рецепторами для энтеровирусов, такими как CAR, ICAM-1 и PVR, является высококонсервативным внутри субвидовых групп вирусов, относящихся к роду *Enterovirus*.

Таблица 3

**Протективное действие поликлональных антител к hFcRn в клетках RD, инфицированных различными энтеровирусами вида В (ЦПЭ ± m)<sup>a</sup>**

Тип клон/штамм	Время после заражения, ч	Концентрация поликлональных антител, мкг/мл					
		0,0	0,6	1,25	2,5	5,0	10,0
E11 431-1	24	25,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	25,0±0,0*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	75,0±0,0*	46,9±3,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	87,5±4,7	50,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*-	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	62,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
E11 431-6	24	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	18,8±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	78,1±3,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	75,0±0,0*	25,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	59,4±4,6*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
E3 206	24	50,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	25,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	68,8±4,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	75,0±0,0*	21,9±3,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	75,0±0,0*	25,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
E9 8100	24	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	96,9±3,1	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	43,8±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	68,8±4,1*	25,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	46,9±3,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
E30 7500	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	21,9±3,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
CVA9 3000	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	40,6±4,6	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
CVB4 1000	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
CVB5 3122	24	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Примечание. <sup>a</sup> – средний процент ЦПЭ по 8 репликам в 2 повторах эксперимента ± стандартная ошибка средней величины; \* – различия средних величин ЦПЭ в ячейке таблицы и ЦПЭ при концентрации поликлональных антител 0,0 мкг/мл статистически достоверны (*U*-тест Манна-Уитни).

В настоящей работе показано, что HSA-GF в физиологических концентрациях защищал культуру клеток RD при заражении несколькими типами эховирусов (E3, E9, E11) с различной рецепторной специфичностью и виру-

сом CVA9, независимо от используемых ими связывающих рецепторов. Кроме того, HSA-GF не ингибировал инфекцию клеток RD вирусом CVB5, который используется в качестве депротенинизирующего рецептора CAR. Аналогичный спектр протективной активности был показан при использовании hFcRn-PAb, которые защищали клетки RD от инфицирования эховирусами (E3, E9, E11, E30) и CVA9, но не вирусами CVB4 и CVB5. Поскольку связывание альбумина является физиологической функцией hFcRn, то общий механизм протективного эффекта, наблюдавшегося при использовании альбумина и PAb к hFcRn, был обусловлен их связыванием с hFcRn, которое нарушало взаимодействие hFcRn с эховирусами и CVA9.

Спектр протективной активности HSA-GF и hFcRn-PAb, наблюдавшийся в культуре клеток RD, соответствовал спектру протективной активности описанных ранее MAб к gp44 в культуре клеток человеческого происхождения P2002 [23]. Поскольку MAб к gp44 ингибировали репродукцию практически всех типов эховирусов, а gp44 идентичен FCGRT (альфа-цепи hFcRn), полученные нами результаты можно экстраполировать на всю группу эховирусов.

Роль hFcRn в качестве первичного («primary») пан-эховирусного («pan-echovirus») рецептора была показана другими методами и на других культурах клеток в недавно опубликованной работе [35]. Методом копреципитации *in vitro* с последующим иммуноблоттингом было продемонстрировано прямое взаимодействие рекомбинантной молекулы гFcRn-B2M (состоявшей из внеклеточного домена hFcRn и B2M) с вирионами E11 и E30. Кроме того, было показано вируснейтрализующее действие гFcRn-B2M.

Ранее нами были картированы аминокислотные заме-

ны в области каньона E11, связанные с адаптацией клонированного вируса E11, полученного в культуре клеток RD, к культурам клеток обезьяньего (BGM) и человеческого (HEp-2 и J-41/КД84) происхождения [15]. Затем были селекционированы 2 близкородственных клон E11 (*daf*<sup>+</sup> клон 431-1 *daf*<sup>-</sup> клон 431-6), отличавшиеся единственной аминокислотной заменой в сайте связывания вириона с DAF и имевшие одинаковую структуру капсидных белков в области каньона [16]. Клон 431-1 был DAF-зависимым, так как его репродукция эффективно подавлялась MAb к DAF в культуре клеток RD, а клон 431-6 не взаимодействовал с DAF. Репродукция обоих клонов в культуре клеток RD ингибировалась MAb к B2M [16]. Полученные данные указывали на существование общего каньон-связывающего рецептора для 2 клонов, функциональность которого зависела от B2M. Поскольку B2M является субъединицей hFcRn и в настоящей работе был обнаружен протективный эффект HSA-GF и hFcRn-PAb при заражении культуры клеток RD как *daf*<sup>+</sup> клоном 431-1, так и *daf*<sup>-</sup> клоном 431-6, то общий каньон-связывающий рецептор для 2 клонов может быть идентифицирован как hFcRn. Кроме того, DAF-зависимый клон 431-1 демонстрировал двухэтапное взаимодействие с клетками RD, так как первый этап взаимодействия мог быть блокирован с помощью MAb к связывающему рецептору DAF, а второй этап мог быть блокирован с помощью MAb к B2M, HSA-GF или hFcRn-PAb.

Отличительным свойством депротенизирующих рецепторов является их способность трансформировать зрелые 160S вирионы энтеровирусов в 135S А-частицы. Объединение доказательств прямого взаимодействия рекомбинантной молекулы rFcRn-B2M с вирионами E11, приводившего к снижению их инфекционной активности [35], с данными о снижении продукции 135S А-частиц и блокировании депротенизации E11 в культуре клеток RD с помощью MAb к B2M [36], и с результатами наших исследований по картированию сайта связывания альтернативного по отношению к DAF клеточного рецептора на поверхности вириона E11 позволяет сделать вывод о роли hFcRn в качестве каньон-связывающего депротенизирующего рецептора для вируса E11 в культуре клеток RD.

Учитывая обнаруженный нами протективный эффект HSA-GF и hFcRn-PAb при заражении клеток RD вирусом CVA9, наблюдавшийся ранее в культуре клеток RD протективный эффект MAb 1350 к B2M [24], а также протективный эффект MAb к gp44 [23] при заражении вирусом CVA9 культуры клеток P2002, можно сделать вывод о сходстве функции hFcRn при репродукции эховирусов и CVA9 в этих видах клеток. О. Heikkilä и соавт. [37] было показано, что сайленсинг B2M методом РНК-интерференции не только эффективно подавлял репродукцию CVA9 в культуре клеток A549, но и приводил к накоплению CVA9 на поверхности клеток. Эти данные подразумевают участие B2M-содержащих молекул (включая hFcRn) в интернализации CVA9 в клетки A549. Следовательно, функциональная активность hFcRn является необходимым условием для заражения клеток RD вирусом CVA9, так же, как для заражения эховирусами.

С учётом возможности двухэтапного взаимодействия некоторых вариантов эховирусов со связывающим и с депротенизирующим рецептором, роль hFcRn в качестве связывающего рецептора не может считаться

универсальной, поскольку существуют и другие связывающие рецепторы. Если связывание вирусов с клеткой происходит на плазматической мембране, то слабая экспрессия (или отсутствие экспрессии) депротенизирующего рецептора на поверхности клеток в сочетании с низкой множественностью заражения может обеспечить клеткам невосприимчивость к вирусам, имеющим монорецепторный тропизм к hFcRn. У вирусов, имеющих мультирецепторный тропизм, слабая экспрессия (или отсутствие экспрессии) депротенизирующего рецептора компенсируется их взаимодействием с каким-либо связывающим рецептором. Двухэтапная схема взаимодействий объясняет, каким образом блокирование связывающих рецепторов защищало клетки от инфицирования DAF-зависимыми и SHPG-зависимыми вариантами эховирусов. В соответствии с двухэтапной схемой, мы наблюдали меньшую выраженность протективного эффекта альбумина и PAb к hFcRn в отношении эховирусов, взаимодействующих с DAF, при условиях неполного блокирования hFcRn, имитирующих его сниженную экспрессию.

Идентификация hFcRn в качестве общего депротенизирующего рецептора для эховирусов и CVA9 открывает новые возможности для изучения взаимосвязи экспрессии hFcRn в различных видах клеток и тканей с патогенезом заболеваний, вызываемых эховирусами и CVA9 у человека. Установление ключевой роли hFcRn в репродукции эховирусов и CVA9 позволяет использовать трансгенных мышей, экспрессирующих hFcRn [38, 39], для экспериментальных исследований патогенеза эховирусных инфекций на мышах [35] и, следовательно, для доклинических испытаний противовирусных лекарственных средств. Специфичность протективного действия человеческого сывороточного альбумина HSA-GF и hFcRn-PAb в культуре клеток RD позволяет использовать эти реагенты для субвидовой классификации малоизученных и новых энтеровирусов.

### Выводы

1. В настоящей работе определена роль hFcRn в качестве каньон-связывающего и депротенизирующего рецептора для вируса E11 при репродукции в культуре клеток RD.

2. Кинетика и величина протективных эффектов, наблюдавшихся при использовании альбумина HSA-GF и антител к hFcRn, были менее выраженными у эховирусов, способных к связыванию с DAF, по сравнению с эховирусами, не взаимодействовавшими с DAF, при условиях неполного блокирования hFcRn. Данное наблюдение подтверждает двухэтапную схему взаимодействия DAF-зависимых эховирусов с рецепторами при входе в клетку: сначала со связывающим рецептором (DAF), затем – с депротенизирующим (hFcRn).

3. Протективные эффекты альбумина HSA-GF и антител к hFcRn могут быть объяснены блокированием функции hFcRn при связывании, интернализации или депротенизации эховирусов и CVA9.

**Благодарности.** Авторы выражают признательность Т.Э. Снитковской за предоставление культуры клеток RD, а также благодарят Justin N. Yeager, PhD, PsyD, за стилистическую правку рукописи на английском языке.

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Усольцева П.С., Резайкин А.В., Новосёлов А.В., Алимов А.В.; сбор и обработка материала – Усольцева П.С., Резайкин А.В.; статистическая обработка – Усоль-

цева П.С., Резайкин А.В.; написание текста – Новосёлов А.В., Усольцева П.С., Резайкин А.В.; редактирование – Сергеев А.Г., Алимов А.В.; утверждение окончательного варианта статьи - Сергеев А.Г., Алимов А.В., Новосёлов А.В.; ответственность за целостность всех частей статьи - Сергеев А.Г., Алимов А.В., Новосёлов А.В.

**Финансирование.** Данное исследование не имело финансовой поддержки.

**Конфликты интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., Hovi T., King A.M.Q., Knowles N.J., et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(10): 2421-2. Doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
- Carson S.D., Chapman N.M., Hafenstein S., Tracy S. Variations of coxsackievirus B3 capsid primary structure, ligands, and stability are selected for in a coxsackievirus and adenovirus receptor-limited environment. *J. Virol.* 2011; 85(7): 3306-14. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01827-10>
- Delorme-Axford E., Sadvovsky Y., Coyne C.B. Lipid raft- and SRC family kinase-dependent entry of coxsackievirus B into human placental trophoblasts. *J. Virol.* 2013; 87(15): 8569-81. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00708-13>
- Shieh J.T., Bergelson J.M. Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *J. Virol.* 2002; 76(18): 9474-80. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.76.18.9474-9480.2002>
- Shafren D.R., Dorahy D.J., Ingham R.A., Burns G.F., Barry R.D. Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.* 1997; 71(6): 4736-43.
- Bergelson J.M., Coyne C.B. Picornavirus entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 790: 24-41. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1_2)
- Kim C., Bergelson J.M. Echovirus 7 entry into polarized intestinal epithelial cells requires clathrin and Rab7. *MBio.* 2012; 3(2): e00304-11. Doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.00304-11>
- Sobo K., Rubbia-Brandt L., Brown T.D.K., Stuart A.D., McKee T.A. Decay-accelerating factor binding determines the entry route of echovirus 11 in polarized epithelial cells. *J. Virol.* 2011; 85(23): 12376-86. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00016-11>
- Goodfellow I.G., Sioofy A.B., Powell R.M., Evans D.J. Echoviruses bind heparan sulfate at the cell surface. *J. Virol.* 2001; 75(10): 4918-21. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4918-4921.2001>
- Israelsson S., Gullberg M., Jonsson N., Roivainen M., Edman K., Lindberg A.M. Studies of echovirus 5 interactions with the cell surface: heparan sulfate mediates attachment to the host cell. *Virus Res.* 2010; 151(2): 170-6. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.05.001>
- McLeish N.J., Williams C.H., Kaloudas D., Roivainen M.M., Stanway G. Symmetry-related clustering of positive charges is a common mechanism for heparan sulfate binding in enteroviruses. *J. Virol.* 2012; 86(20): 11163-70. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00640-12>
- Jokinen J., White D.J., Salmela M., Huhtala M., Kapyla J., Sipilä K., et al. Molecular mechanism of alpha2beta1 integrin interaction with human echovirus 1. *EMBO J.* 2010; 29(1): 196-208. Doi: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.326>
- Ylipaasto P., Eskelinen M., Salmela K., Hovi T., Roivainen M. Vitronectin receptors, alpha v integrins, are recognized by several non-RGD-containing echoviruses in a continuous laboratory cell line and also in primary human Langerhans' islets and endothelial cells. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt. 1): 155-65. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.012450-0>
- Nelsen-Salz B., Eggers H.J., Zimmermann H. Integrin alpha(v)beta3 (vitronectin receptor) is a candidate receptor for the virulent echovirus 9 strain Barty. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 9): 2311-3. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-9-2311>
- 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. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.004>
- Novoselov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G., Fadeyev F.A., Grigoryeva J.V., Sokolova Z.I. A single amino acid substitution controls DAF-dependent phenotype of echovirus 11 in rhabdomyosarcoma cells. *Virus Res.* 2012; 166(1-2): 87-96. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.03.007>
- Triantafyllou M., Triantafyllou K., Wilson K.M., Takada Y., Fernandez N., Stanway G. Involvement of beta2-microglobulin and integrin alphaVbeta3 molecules in the coxsackievirus A9 infectious cycle. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 10): 2591-600. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2591>
- Heikkila O., Susi P., Stanway G., Hyypia T. Integrin alphaVbeta6 is a high-affinity receptor for coxsackievirus A9. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 1): 197-204. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.004838-0>
- Heikkila O., Merilahti P., Hakanen M., Karelehto E., Alanko J., Sukki M., et al. Integrins are not essential for entry of coxsackievirus A9 into SW480 human colon adenocarcinoma cells. *Virol J.* 2016; 13(1): 171. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0619-y>
- Basnet S., Palmenberg A.C., Gern J.E. Rhinoviruses and their receptors. *Chest.* 2019; 155(5): 1018-1025. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.12.012>
- Newcombe N.G., Andersson P., Johansson E.S., Au G.G., Lindberg A.M., Barry R.D., et al. Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses. *J. Gen. Virol.* 2003; 84(11): 3041-50. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.19329-0>
- Mbida A.D., Pozzetto B., Gaudin O.G., Grattard F., Le Bihan J.C., Akono Y., et al. A 44,000 glycoprotein is involved in the attachment of Echovirus-11 onto susceptible cells. *Virology.* 1992; 189(1): 350-3. Doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90714-z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90714-z)
- Mbida A.D., Gaudin O.G., Sabido O., Pozzetto B., Le Bihan J.C. Monoclonal antibody specific for the cellular receptor of echoviruses. *Intervirology.* 1992; 33(1): 17-22. Doi: <https://doi.org/10.1159/000150226>
- Ward T., Powell R.M., Pipkin P.A., Evans D.J., Minor P.D., Almond J.W. Role for beta2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J. Virol.* 1998; 72(7): 5360-5.
- Ward T., Powell R.M., Evans D.J., Almond J.W. Serum albumin inhibits echovirus 7 uncoating. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 2): 283-90. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-283>
- Ward T., Powell R.M., Chaudhry Y., Meredith J., Almond J.W., Kraus W., et al. Fatty acid-depleted albumin induces the formation of echovirus A particles. *J. Virol.* 2000; 74(7): 3410-2. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3410-3412.2000>
- Pyzik M., Rath T., Lencer W.I., Baker K., Blumberg R.S. FcRn: The architect behind the immune and nonimmune functions of IgG and albumin. *J. Immunol.* 2015; 194(10): 4595-603. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403014>
- Zhu X., Peng J., Raychowdhury R., Nakajima A., Lencer W.I., Blumberg R.S. The heavy chain of neonatal Fc receptor for IgG is sequestered in endoplasmic reticulum by forming oligomers in the absence of beta2-microglobulin association. *Biochem. J.* 2002; 367(3): 703-14. Doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20020200>
- Sockolovsky J.T., Szoka F.C. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015; 91: 109-24. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.005>
- Arola A., Santti J., Ruuskanen O., Halonen P., Hyypia T. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(2): 313-8.
- Palacios G., Casas I., Tenorio A., Freire C. Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(1): 182-92. Doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.1.182-192.2002>
- Husson-van Vliet J., Roussel P. Pipetting errors in viral titrations: a useful approach. *J. Virol. Methods.* 1988; 22(2-3): 183-90. Doi: [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(88\)90101-2](https://doi.org/10.1016/0166-0934(88)90101-2)
- Wulff N.H., Tzatzaris M., Young P.J. Monte Carlo simulation of the Spearman-Kaerber TCID50. *J. Clin. Bioinforma.* 2012; 2(1): 5. Doi: <https://doi.org/10.1186/2043-9113-2-5>
- Schmidtke M., Selinka H.C., Heim A., Jahn B., Tonew M., Kandolf R., et al. Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. *Virology.* 2000; 275(1): 77-88. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0485>
- Morosky S., Wells A.I., Lemon K., Evans A.S., Schamus S., Bakkenist C.J., et al. The neonatal Fc receptor is a pan-echovirus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019; 116(9): 3758-63. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1817341116>
- Chevaliez S., Balanant J., Maillard P., Lone Y.C., Lemonnier F.A., Delpyroux F. Role of class I human leukocyte antigen molecules in early steps of echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *Virology.* 2008; 381(2): 203-14. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.006>
- Heikkila O., Susi P., Tevaltuot T., Harma H., Marjomaki V., Hyypia T., et al. Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by beta2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin. *J. Virol.* 2010; 84(7): 3666-81. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01340-09>
- Avery L.B., Wang M., Kavosi M.S., Joyce A., Kurz J.C., Fan Y.Y., et al. Utility of a human FcRn transgenic mouse model in drug discovery for early assessment and prediction of human pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *MAbs.* 2016; 8(6): 1064-78. Doi: <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1193660>
- Roopenian D.C., Christianson G.J., Proetz G., Sproule T.J. Human FcRn transgenic mice for pharmacokinetic evaluation of therapeutic antibodies. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1438: 103-14. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3661-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3661-8_6)

Поступила 29.07.19

Принята в печать 20.08.19