

ВЛИЯНИЕ НОКОДАЗОЛА НА КИНЕТИКУ ДЕПРОТЕИНИЗАЦИИ ВАРИАНТОВ ЭХОВИРУСА 11, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ ARF6-АССОЦИИРОВАННЫЙ И КЛАТРИН-ЗАВИСИМЫЙ ПУТИ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК RD

EFFECTS OF NOCODAZOLE ON THE KINETICS OF ECHOVIRUS 11 VARIANTS UNCOATING AFTER ARF6-ASSOCIATED OR CLATHRIN- DEPENDENT INTERNALIZATION IN RD CELLS

P. Usoltseva
A. Novoselov
A. Rezaykin
A. Sergeev
A. Alimov

Summary. The article presents a comparative study of the uncoating kinetics for the echovirus 11 variants that use different binding receptors (DAF or FcRn) and endocytic pathways (Arf6-associated or clathrin-dependent) to enter human rhabdomyosarcoma (RD) cells. Various effects of nocodazole were revealed by comparing kinetics of the infectious activity in the single cycle growth experiments with echovirus 11 variants. An increased concentration of FcRn in the perinuclear area of the cells was observed by immunofluorescence. A hypothesis of the intracellular convergence for the traffic of the echovirus 11 complex with the binding receptor DAF and the uncoating receptor FcRn in the perinuclear endocytic recycling compartment is discussed.

Keywords: uncoating, echovirus, cell receptors, DAF, FcRn.

Усольцева Полина Сергеевна

Аспирант, ФГБОУ ВО «Уральский государственный
медицинский университет» Минздрава РФ
(г. Екатеринбург); н.с., Екатеринбургский научно-
исследовательский институт вирусных инфекций
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
savina_polina@mail.ru

Новоселов Алексей Владимирович

К.м.н., врач клинической лабораторной
диагностики, ООО Медико-фармацевтический Центр
«Гармония» (г. Екатеринбург)
virus_science@mail.ru

Резайкин Алексей Васильевич

К.м.н., в.н.с., Екатеринбургский научно-
исследовательский институт вирусных инфекций
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
alexrez@yandex.ru

Сергеев Александр Григорьевич

Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Уральский
государственный медицинский университет»
Минздрава РФ (г. Екатеринбург)
aldr131250@yandex.ru

Алимов Александр Викторович

К.м.н., Екатеринбургский научно-исследовательский
институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора
virus@eniivi.ru

Аннотация. В статье представлен сравнительный анализ кинетики депро-
теинизации вариантов эховируса 11 типа, использующих для входа в клетки
рабдомиосаркомы человека (RD) различные связывающие рецепторы (DAF
или FcRn) и пути эндоцитоза (Arf6-ассоциированный или клатрин-зависи-
мый). Выявлено различное влияние нокодазола на кинетику инфекционной
активности вариантов эховируса 11 в экспериментах с одиночным циклом
репродукции. В перинуклеарной зоне клеток иммунофлуоресцентным ме-
тодом выявлена повышенная концентрация FcRn. Обсуждается гипотеза
конвергенции внутриклеточного трафика комплекса эховируса 11 с реце-
птором DAF и депротеинизирующего рецептора FcRn в перинуклеарном эндо-
цитозном рециркулирующем компартменте.

Ключевые слова: депротеинизация, эховирус, клеточные рецепторы, DAF, FcRn.

Введение

Исследования молекулярных механизмов входа вирусов животных в чувствительные клетки не теряют своей актуальности на протяжении последних пяти десятилетий [7]. Ранее нами были подробно рассмотрены пути интернализации и внутриклеточного трафика отдельных представителей вида *Enterovirus B* [2]. Ключевым вопросом в изучении ранних событий цикла репродукции энтеровирусов вида B, в частности — эховирусов, является идентификация внутриклеточного компартмента, в котором происходит депротенинизация и последующая транслокация геномной РНК в цитозоль.

Эховирусы являются удобной моделью для исследования ранних событий в цикле репродукции энтеровирусов вида B, поскольку известен как общий депротенинирующий рецептор для всех типов эховирусов — неонатальный Fc рецептор (FcRn) [1, 12, 20], так и различные связывающие рецепторы, одним из которых является фактор, ускоряющий распад комплекта — DAF (CD55). Вирусы используют пути интернализации и внутриклеточного трафика, функционирующие в незараженных клетках, поэтому маршрутизация вирус-рецепторных комплексов определяется типом клеточного рецептора (рецепторов) и его (их) трафиком. Цитоплазматический сегмент альфа-цепи FcRn у человека, мыши и крысы содержит консервативную сигнальную последовательность, обеспечивающую взаимодействие с адапторным комплексом AP-2 в клатрин-зависимом пути эндоцитоза [15]. Эндоцитоз DAF происходит по Arf6-ассоциированному клатрин-независимому пути, маркером которого является ГТФаза Arf6 [4, 11].

Stuart et al. было показано [17], что в культуре клеток RD интернализация Daf+ варианта эховируса 11 типа (E11), использовавшего связывающий рецептор DAF, происходила по клатрин-независимому пути (учитывая тип рецептора и спектр чувствительности к фармакологическим ингибиторам — Arf6-ассоциированному). Также было показано, что Daf- вариант E11, не взаимодействовавший с DAF, проявлял слабую чувствительность к хлорпромазину — ингибитору клатрин-зависимого пути эндоцитоза FcRn. Нокодазол — ингибитор зависимо от микротрубочек транспорта везикул — блокировал репродукцию Daf+ варианта E11, предотвращая его депротенинизацию, в то время как Daf- вариант E11 был нечувствителен к действию нокодазола.

Внутриклеточный трафик вирус-рецепторных комплексов в составе транспортных везикул происходит от периферической зоны цитоплазмы к ядру клеток с использованием микротрубочек и требует времени. Так как взаимодействие с общим депротенинирую-

щим рецептором FcRn у Daf- вариантов E11 происходит на плазматической мембране клеток RD, а у Daf+ вариантов — внутри клеток, то различие путей интернализации и трафика должно отражаться на тайминге (сроках наступления и продолжительности) ранних событий цикла репродукции Daf+ и Daf- вариантов. Сравнение кинетики депротенинизации Daf+ и Daf- вариантов E11 в одиночном цикле репродукции (ОЦР) позволяет оценить тайминг и интенсивность ранних событий в цикле репродукции эховирусов, использующих различные пути входа в клетки RD.

Целью настоящей работы было изучение в культуре клеток RD эффектов нокодазола на кинетику инфекционной активности в ОЦР полученных и охарактеризованных нами ранее *daf+* и *daf-* клонов E11 [14]. Представляло интерес решение следующих задач: 1) сравнение тайминга депротенинизации *daf+* и *daf-* клонов E11 в экспериментах с ОЦР без нокодазола; 2) выявление изменений тайминга депротенинизации *daf+* и *daf-* клонов E11 при воздействии нокодазола; 3) выяснение локализации FcRn в незараженных клетках RD с помощью непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии.

Материалы и методы

Перевиваемая клеточная линия RD (клетки рабдомиосаркомы человека) была получена из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» Роспотребнадзора. Для проведения экспериментов клетки выращивали в культуральных пластиковых флаконах и 96-луночных планшетах (Corning, США) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ до образования плотного монослоя. В качестве ростовой среды использовали среду Игла MEM (ПанЭко, РФ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция). В качестве среды поддержания использовали среду 199 (ПанЭко, РФ) без добавления сыворотки.

Гемагглютинирующий (Daf+) клон 431-1 E11, использующий DAF в качестве первичного клеточного рецептора, и негемагглютинирующий (Daf-) клон 431-6 E11, использующий клеточный рецептор FcRn, были получены и охарактеризованы ранее [14].

Схема эксперимента по ОЦР клонов E11 предусматривала следующие этапы. Для синхронизации начала инфекционного цикла, после замены среды роста на среду поддержания, флаконы с монослоем клеток RD охлаждали 20 минут при температуре 4°C. После удаления среды поддержания, во флаконы вносили по 400 мкл вирусосодержащей среды из расчета множественности заражения 10 БОЕ на клетку. Флаконы инкубировали 45 минут при 4°C на платформе покачивателя, затем клетки трехкратно отмывали от несвязавшегося вируса

Таблица 1. Результаты определения инфекционной активности клонов 431–1 и 431–6 в одиночном цикле репродукции в присутствии нокодазола и без него.

Время ¹ (минуты)	Инфекционная активность $Ig(TCD_{50})/мл (M \pm s)^2$			
	Клон 431–1		Клон 431–6	
	без нокодазола	с нокодазолом	без нокодазола	с нокодазолом
0	6,8±0,24	6,9±0,21	6,6±0,21	5,6±0,15 *
30	5,9±0,23	6,5±0,15 *	6,5±0,15	5,2±0,17 *
60	5,4±0,24	6,6±0,01 *	6,2±0,23	4,8±0,01 *
120	5,1±0,17	6,2±0,15 *	5,9±0,23	5,0±0,15 *
180	6,6±0,21	6,6±0,27	6,5±0,15	5,1±0,15 *
210	6,8±0,15	7,8±0,01 *	6,9±0,17	5,2±0,17 *
240	8,9±0,15	8,0±0,23 *	8,1±0,17	5,9±0,15 *
300	9,0±0,15	8,9±0,23	8,3±0,15	7,2±0,21 *
420	9,0±0,21	9,2±0,23	9,0±0,21	7,7±0,23 *

Примечания.

¹ Время от начала ОЦР с момента переноса флаконов с культурой клеток после адсорбции вируса в CO₂-инкубатор (для нагрева до 37°C).

² M — средняя величина инфекционной активности; s — стандартная ошибка.

* Статистически достоверное ($p < 0,05$) различие инфекционной активности в экспериментах с нокодазолом и без него.

охлажденной до 4°C средой 199. Далее в каждый флакон добавляли по 5 мл среды 199 комнатной температуры и переносили флаконы в инкубатор для нагрева до 37°C. Через определенные интервалы времени репродукцию вируса прерывали методом лизиса клеток с помощью трехкратного замораживания (при -70°C) и оттаивания (при 37°C).

Нокодазол (Sigma-Aldrich/Merck, Германия, кат. № M1404–2MG) разводили в среде 199 до конечной концентрации 1,8 мкг/мл. Цитотоксический эффект нокодазола определяли с помощью двукратного разведения раствора, начиная с 3,6 мкг/мл до 0,45 мкг/мл, жизнеспособность клеток оценивали методом прижизненного окрашивания трипановым синим через 72 часа. После удаления ростовой среды, в культуральные флаконы с монослоем клеток RD вносили по 10 мл среды 199, содержащей нокодазол, затем инкубировали флаконы 40 минут при 37°C и 20 минут при 4°C. Далее эксперимент с ОЦР вирусов проводили по описанной выше схеме, но на всех этапах использовали среду 199 с добавлением нокодазола.

Инфекционную активность вирусосодержащих жидкостей определяли методом конечных разведений на культуре клеток RD, выращенной в 96-луночных культуральных планшетах (Corning, США). Состояние монослоя учитывали с помощью инвертированного микроскопа ежедневно, окончательный учет результатов проводили на 5-е сутки после фиксации монослоя 96% раствором этилового спирта и последующей окраски 0,5% раствором кристалвиолета. Для каждого разведения исполь-

зовали не менее 8 реплик. Инфекционную активность, выраженную в десятичных логарифмах величины 50% тканевой цитопатогенной дозы в 1 мл ($IgTCD_{50}/мл$), определяли по формуле Spearman-Kärber с расчетом суммарной аналитической погрешности [8]. Для статистического сравнительного анализа использовали стандартные методы вариационной статистики. Различия между величинами считали статистически достоверными при условии, что вероятность ошибки первого рода не превышала 0,05.

Определение локализации FcRn в клетках RD проводили с помощью непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии. Все этапы окраски, а также анализ флуоресценции проводили на клетках, выращенных в 48-луночных планшетах (Corning, США). Клетки фиксировали ледяным ацетоном 30 мин при 4 °C и пермеабелизовали 15 минут при 22 °C в фосфатном буфере (PBS) (ПанЭко, РФ) с добавлением 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich/Merck, Германия) и 1% BCA (Sigma-Aldrich/Merck, Германия). Затем клетки отмывали 3 раза PBS с 0,5% BCA и инкубировали с первичными антителами в течение 18 часов при 4 °C. В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела класса IgG к гетеродимеру человеческого FCGRT и B2M, (Sino Biological, Китай, кат. № СТ009-T08) в концентрации 10 мкг/мл. По окончании инкубации с первичными антителами, клетки трижды отмывали PBS с 0,5% BCA (с временем выдержки 5, 15 и 25 минут), затем инкубировали 1 час при 22°C без доступа света со вторичными Alexa Fluor® 647-конъюгированными анти-кроличьими антителами (Abcam, Великобритания, кат. № ab150075) в концентрации 2 мкг/мл.

В качестве негативного контроля для целевого антигена при непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии клеток RD использовали культуру клеток MDCK (эпителиоподобная клеточная линия почки собаки), в которой отсутствовал человеческий FcRn. Так как ядра клеток не окрашивали, то, для локализации специфической флуоресценции в клетках, изображения, полученные с помощью световой микроскопии, конвертировали в полупрозрачные слои, которые позиционировали над фоновыми изображениями, полученными при флуоресцентной микроскопии того же самого поля зрения.

Результаты

Влияние нокодазола на кинетику изменения инфекционной активности *daf*⁺ и *daf*⁻ клонов экзовируса 11 в одиночном цикле репродукции

Кинетика изменения инфекционной активности *daf*⁺ и *daf*⁻ клонов E11 в ОЦР в культуре клеток RD представлена в таблице 1.

Сравнение инфекционной активности *daf*⁺ клона 431-1 и *daf*⁻ клона 431-6 E11 в начале ОЦР (0 минут) не выявило статистически достоверного различия ($p > 0.05$). При условиях одинаковой множественности заражения (10 БОЕ/клетку) и предварительной инкубации охлажденных до 4 °С клеток с вирусами, полученный результат указывал на приблизительно одинаковый уровень связывания двух клонов с клетками. Данное наблюдение позволяет предположить отсутствие существенного различия экспрессии рецепторов DAF и FcRn в условиях охлаждения клеток RD до 4 °С.

На интервале от 30 до 120 минут инкубации при 37 °С инфекционная активность *daf*⁺ клона 431-1 постепенно снижалась почти на 2 порядка величины, в то время как снижение инфекционной активности *daf*⁻ клона 431-6 было менее выраженным, достигавшим статистически достоверного различия по сравнению с точкой 0 лишь через 120 минут. На данном интервале скорость депротеинизации РНК у *daf*⁺ клона 431-1 существенно превышала скорость депротеинизации РНК у *daf*⁻ клона 431-6. При сопоставимом уровне связывания двух клонов с клетками, полученный результат указывал на более высокую пропускную способность Arf6-ассоциированного пути интернализации комплекса E11 с рецептором DAF по сравнению с пропускной способностью клатрин-зависимого пути интернализации комплекса E11 с рецептором FcRn.

Через 180 и 210 минут инкубации при 37 °С у обоих клонов наблюдалось увеличение инфекционной активности приблизительно до одинакового уровня. Синхронность увеличения инфекционной активности через 180 и 210 минут указывала на то, что различная пропуск-

ная способность Arf6-ассоциированного и клатрин-зависимого путей интернализации вирус-рецепторного комплекса не влияла на срок начала инкапсидации геномной РНК.

Дальнейшее нарастание инфекционной активности имело различную кинетику: у *daf*⁺ клона 431-1 инфекционная активность достигала максимума через 240 мин, у *daf*⁻ клона 431-6 — через 420 мин инкубации при 37 °С. Более высокая скорость инкапсидации у *daf*⁺ клона 431-1, вероятно, обусловлена более короткой продолжительностью и более высокой интенсивностью предшествующих инкапсидации событий цикла репродукции вируса.

Воздействие нокодазола не повлияло на начальный уровень связывания *daf*⁺ клона 431-1 с клетками, что предполагает отсутствие снижения экспрессии рецептора DAF в присутствии нокодазола. Наблюдалось статистически достоверное ($p < 0.05$) снижение скорости депротеинизации *daf*⁺ клона на интервале от 30 до 120 минут, что соответствует результатам, полученным Stuart et al. [17] методом иммунофлуоресцентной микроскопии. Выявлена задержка выхода графика ОЦР на максимальную инфекционную активность — через 300 минут с нокодазолом по сравнению с 240 минутами без нокодазола, что при одинаковом уровне максимальной инфекционной активности указывает на увеличение продолжительности событий цикла репродукции, предшествующих инкапсидации.

Добавление нокодазола в экспериментальную систему при репродукции *daf*⁻ клона 431-6 вызвало статистически достоверное снижение ($p < 0.05$) начального уровня связывания вируса с клетками, что, вероятно, отражало снижение экспрессии рецептора FcRn на плазматической мембране по причине нарушения его рециркуляции. Инфекционная активность *daf*⁻ клона 431-6 в присутствии нокодазола на всех интервалах времени имела величины приблизительно на порядок меньшие по сравнению с величинами в отсутствие нокодазола.

Иммунофлуоресцентная локализация FcRn в клетках RD

Наибольшая интенсивность флуоресценции наблюдалась в перинуклеарной области клеток RD по сравнению с менее интенсивной диффузной флуоресценцией периферической зоны цитоплазмы. Перинуклеарная локализация FcRn проявлялась в виде асимметричного светящегося пятна в околоядерной зоне: либо с одной стороны от ядра клеток (юкстануклеарно), либо в виде яркой флуоресценции по периметру ядра (рисунки 1). В отрицательном контроле на клетках MDCK специфического свечения не наблюдалось.

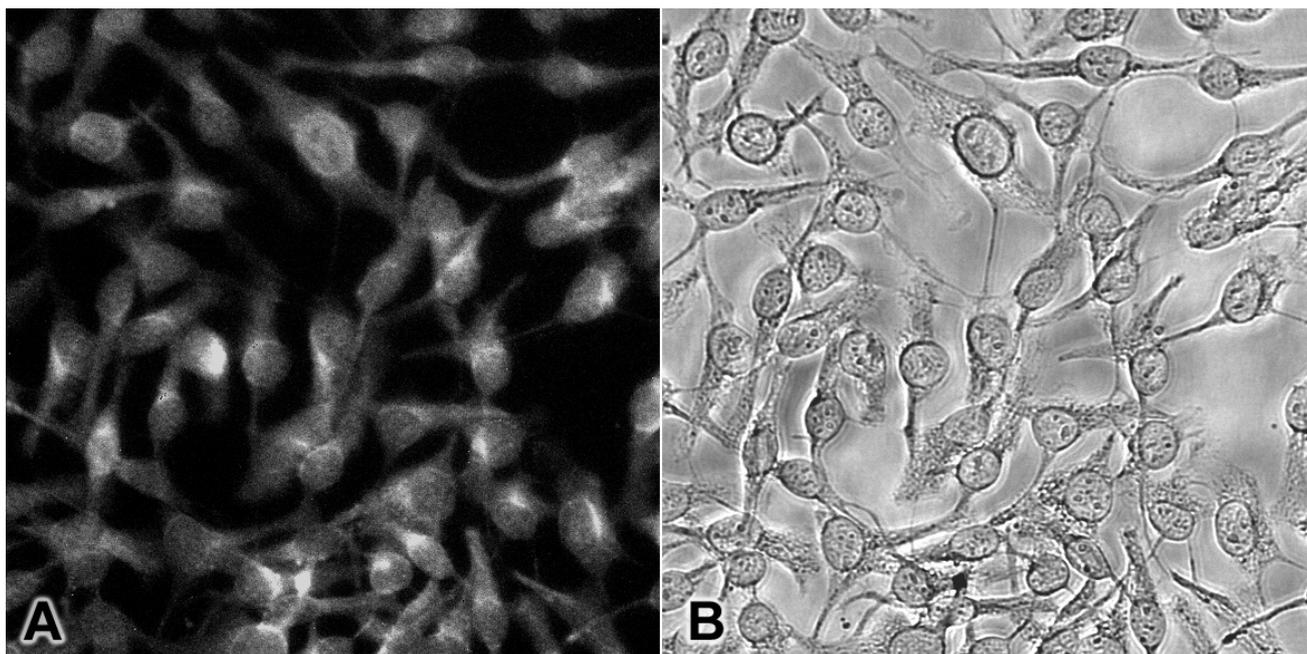


Рис. 1. Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия культуры клеток RD. Увеличение x400. (A) Клетки RD, обработанные поликлональными антителами к FcRn (10 мкг/мл) и вторичными антителами (2 мкг/мл), конъюгированными с флуорохромом. (B) Тот же кадр в световой микроскопии.

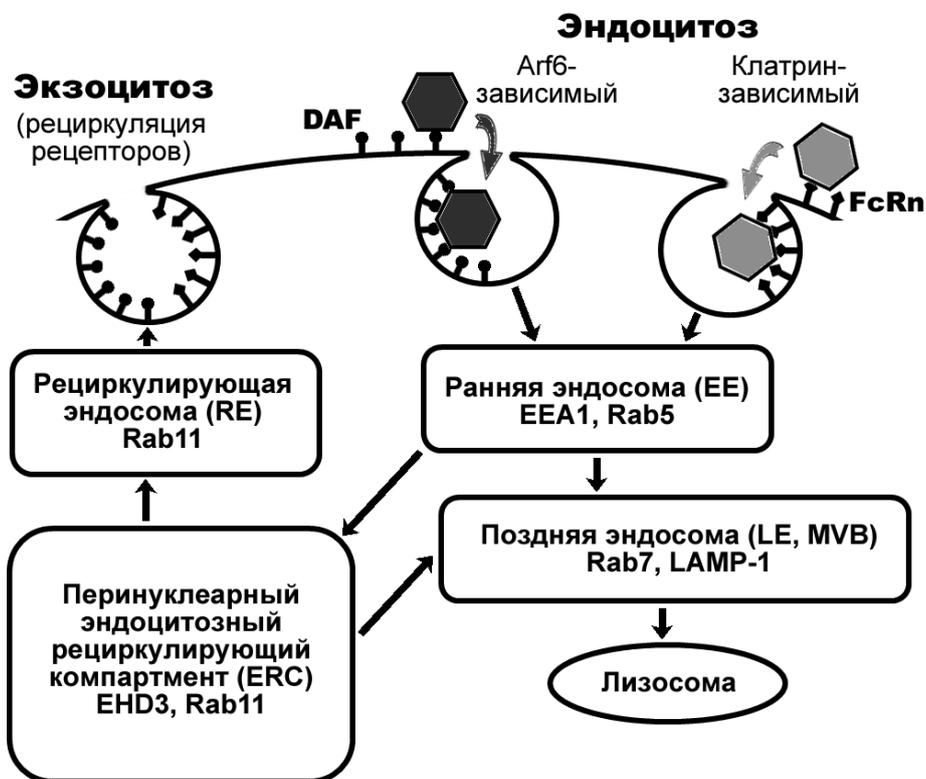


Рис. 2. Сокращенная схема внутриклеточного трафика транспортных везикул, участвующих в эндоцитозе лигандов, связанных с DAF и FcRn (по [4]).

Обсуждение

Сокращенная схема внутриклеточного трафика транспортных везикул, участвующих в эндоцитозе лигандов, связанных с DAF и FcRn, представлена на рисунке 2, согласно [4]. Конвергенция путей Arf6-ассоциированного эндоцитоза DAF и клатрин-зависимого эндоцитоза FcRn может происходить либо в ранних (сортирующих) эндосомах (EE/SE), несущих маркеры EEA1 и Rab5, либо в перинуклеарном эндоцитозном рециркулирующем компартменте (ERC), несущем маркеры Rab11 и EHD3. Возможен дальнейший трафик рецепторов из ERC через позднюю (мультивезикулярную) эндосому (LE/MVB) по деградационному пути в лизосому.

FcRn является рециркулирующим рецептором, осуществляющим возврат к плазматической мембране и экзоцитоз IgG и альбумина после их захвата в ранних эндосомах [15]. Трафик FcRn из ранних эндосом по рециркуляторному пути [5] происходит либо в составе транспортных везикул с маркером Rab4 в перинуклеарный ERC и далее из ERC — в транспортных везикулах с маркером Rab11a к плазматической мембране (медленная рециркуляция), либо из ранней эндосомы непосредственно к плазматической мембране — в транспортных везикулах, несущих маркер Rab11 (быстрая рециркуляция).

Рассматривая раннюю эндосому в качестве места конвергенции путей Arf6-ассоциированного эндоцитоза DAF и клатрин-зависимого эндоцитоза FcRn, необходимо учитывать, что в клетках RD эти пути не синхронизированы, так как имеют различный тайминг и пропускную способность. Arf6-ассоциированный эндоцитоз DAF является постоянно функционирующим (конститутивным) и обеспечивает более высокую пропускную способность, исходя из наблюдавшейся скорости депротенинизации *daf+* клона 431-1. Клатрин-зависимый эндоцитоз FcRn является индуцированным, в частном случае — эховирусом, и имеет более низкую пропускную способность, исходя из наблюдавшейся скорости депротенинизации *daf-* клона 431-6. Кроме того, было установлено [19], что в клетках HeLa эндосомы, исходно образующиеся в результате клатрин-зависимого и клатрин-независимого эндоцитоза, хотя и сливаются с ранними эндосомами, однако трафик интернализованных рецепторов из ранних эндосом в ERC (по рециркуляторному пути) осуществляется различными транспортными везикулами. Везикулярные эндосомы, несущие маркер Rab11a, транспортируют рецепторы (трансферрина, ЛПНП), интернализованные по клатрин-зависимому пути, а тубулярные рециркулирующие эндосомы, несущие маркер MICAL-L1, транспортируют молекулы, интернализованные по клатрин-независимому пути (CD59, CD98, β 1-интегрин и другие). Таким образом, ранние эн-

досомы едва ли являются подходящим местом для конвергенции путей трафика комплекса E11 с DAF и трафика депротенинизирующего рецептора FcRn.

Stuart et al. было показано [17], что предварительная инкубация клеток RD с нокодазолом не препятствовала интернализации *Daf+* варианта E11, но через 60 минут вирус обнаруживался в везикулярных структурах, рассеянных по цитоплазме клеток, в отличие от перинуклеарной локализации таких везикул в интактных клетках. Подавление репродукции *Daf+* варианта E11 нокодазолом было обусловлено тем, что для депротенинизации и(или) транслокации РНК *Daf+* варианта необходим трафик в более поздний компартмент.

Известно, что молекулы ГКГ класса I (MHC-I) в дендритных клетках накапливаются в концентрированных пулах в перинуклеарном ERC, в компартментах, несущих маркер Rab11a, образуя резерв MHC-I для доставки в фагосомы [13]. Обработка дендритных клеток нокодазолом приводила к рассредоточению перинуклеарного ERC с рассеиванием резервуара MHC-I на мелкие пулы в периферической зоне клеток. Так как молекула FcRn относится к MHC-I, то, допуская наличие аналогичного резервуара MHC-I в клетках RD, можно предположить, что ингибирующее действие нокодазола на репродукцию *Daf+* варианта E11 в клетках RD связано с блокированием трафика вируса в перинуклеарный ERC. Полученные нами результаты иммунофлуоресцентной микроскопии незараженных клеток RD с антителами к рецептору FcRn выявили его перинуклеарную локализацию, что позволяет предположить наличие пула FcRn в перинуклеарном ERC в клетках RD. В пользу предположения о конвергенции внутриклеточного трафика DAF и FcRn в перинуклеарном ERC свидетельствует отсутствие закисления внутренней среды эндосом, в которых обнаруживались эховирусы 1 и 7 типа [9, 10].

Анализ изображений иммунофлуоресценции капсидного белка VP3 E11, представленных в работе [17], показал, что в культуре клеток RD у *Daf+* варианта E11 отсутствовала флуоресценция белка VP3 через 2 часа после заражения (p.i.), в то время как через 4 часа p.i. оба варианта E11 (*Daf+* и *Daf-*) имели одинаково высокий уровень флуоресценции с яркой зернистостью в перинуклеарной зоне. Наблюдавшееся отсутствие флуоресценции VP3 у *Daf+* варианта E11 через 2 часа p.i. согласуется с относительно большей скоростью депротенинизации использованного в нашей работе *daf+* клона 431-1 по сравнению с *daf-* клоном 431-6. Sobo et al. [16] наблюдали яркие очаги иммунофлуоресценции в поляризованных клетках Caco-2 также в перинуклеарной зоне у обоих вариантов E11 (*Daf+* и *Daf-*) через 30 минут p.i., несмотря на различные пути их интернализации.

На модели липосом, декорированных FcRn, Zhao et al. было показано [20], что для депротенинизации эховируса 6 после взаимодействия с FcRn требуется закисление среды до pH 5,5. Если такое требование является универсальным для депротенинизации всех эховирусов, то следует предположить трафик вирус-рецепторных комплексов из ERC в позднюю (мультивезикулярную) эндосому, имеющую pH внутренней среды приблизительно 5,5 [3], где будет происходить депротенинизация и(или) транслокация РНК эховирусов. Вместе с тем, блокирование нокодазолом трафика, зависящего от микротрубочек, не предотвращало закисление внутренней среды транспортных везикул в клетках HeLa до pH 5,5, так как нокодазол не препятствовал депротенинизации риновируса RV-A2 [3].

Наблюдавшееся в наших экспериментах снижение инфекционной активности *daf*⁻ клона 431-6 на всех интервалах времени в присутствии нокодазола можно интерпретировать как нарушение функции репликативных комплексов E11, для формирования которых необходимы COPI везикулы [6], перемещающиеся внутри клеток с участием микротрубочек, разрушаемых нокодазолом [18].

Выводы

1. Исследование кинетики изменения инфекционной активности в одиночном цикле репродукции клонированного *daf*⁻ варианта эховируса 11, использующего рецептор FcRn и клатрин-зависимый путь

входа в клетку, выявило следующие эффекты нокодазола: 1) снижение начального уровня связывания вируса с клетками; 2) равномерное снижение продукции вирусного потомства на всех временных интервалах цикла.

2. Исследование кинетики инфекционной активности в одиночном цикле репродукции клонированного *daf*⁺ варианта эховируса 11, использующего связывающий рецептор DAF с Arf6-ассоциированным путем эндоцитоза и внутриклеточный депротенинирующий рецептор FcRn, выявило следующие эффекты нокодазола: 1) отсутствие изменения начального уровня связывания вируса с клетками; 2) снижение скорости депротенинизации вирусной РНК на интервале 30–120 минут от начала цикла; 3) задержка выхода на максимальную инфекционную активность.
3. Наиболее интенсивная иммунофлуоресценция FcRn наблюдалась в перинуклеарной зоне клеток RD по сравнению с менее интенсивной диффузной флуоресценцией периферической цитоплазмы.
4. Учитывая различия путей эндоцитоза рецепторов DAF и FcRn в тайминге, пропускной способности и чувствительности к нокодазолу в клетках RD, а также рециркуляторную функцию рецептора FcRn и его перинуклеарную локализацию в интактных клетках, вероятным местом конвергенции внутриклеточного трафика комплекса эховируса 11 с рецептором DAF и депротенинирующего рецептора FcRn является перинуклеарный эндоцитозный рециркулирующий компартмент.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усольцева П.С., Алимов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г., Новоселов А. В. Роль неонатального Fc рецептора в депротенинизации вирусов ЕСНО и Коксаки А9. // Вопросы вирусологии. 2019. Т. 64, № 3. С. 132–139.
2. Усольцева П.С., Новоселов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г., Алимов А. В. Механизмы интернализации энтеровирусов вида В. // Вестник уральской медицинской академической науки. 2018. Т. 15, № 3. С. 455–469.
3. Bayer N., Schober D., Prchla E., Murphy R. F., Blaas D., Fuchs R. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. // J. Virol. 1998. V.72, N.12. P. 9645–9655.
4. Eyster C.A., Higginson J. D., Huebner R., Porat-Shliom N., Weigert R., Wu W. W., Shen R.-F., Donaldson J. G. Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. // Traffic. 2009. V.10, N.5. P. 590–599.
5. Gan Z., Ram S., Ober R. J., Ward E. S. Using multifocal plane microscopy to reveal novel trafficking processes in the recycling pathway. // J. Cell Sci. 2013. V.126, Pt.5. P. 1176–1188.
6. Gazina E.V., Mackenzie J. M., Gorrell R. J. Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of Picornaviridae. // J. Virol. 2002. V.76, N.21. P. 11113–11122.
7. Helenius A. Virus entry: looking back and moving forward. // J. Mol. Biol. 2018. V.430. P. 1853–1862.
8. Husson-van Vliet J., Roussel P. Pipetting errors in viral titrations: a useful approach. // J. Virol. Methods. 1988. V.22, N.2–3. P. 183–190.
9. Karjalainen M., Rintanen N., Lehtonen M., Kallio K., Maki A., Hellstrom K., Siljamaki V., Upla P., Marjomaki V. Echovirus 1 infection depends on biogenesis of novel multivesicular bodies. // Cell Microbiol. 2011. V.13, N.12. P. 1975–1995.
10. Kim C., Bergelson J. M. Echovirus 7 entry into polarized intestinal epithelial cells requires clathrin and Rab7. // mBio. 2012. V.3, N.2. e304–11.
11. Mayor S., Parton R. G., Donaldson J. G. Clathrin-independent pathways of endocytosis. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2014. V.6, N.6. pii: a016758.
12. Morosky S., Wells A. I., Lemon K., Evans A. S., Schamus S., Bakkenist C. J., Coyne C. B. The neonatal Fc receptor is a pan-echovirus receptor. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2019. V.116, N.9. P. 3758–3763.

13. Nair-Gupta P, Baccarini A., Tung N., Seyffer F., Florey O., Huang Y., Banerjee M., Overholtzer M., Roche P. A., Tampe R., Brown B. D., Amsen D., Whiteheart S. W., Blander J. M. TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. // *Cell*. 2014. V.158, N.3. P. 506–521.
14. Novoselov A.V., Rezakyn 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. V.166, N.1–2. P. 87–96.
15. Sand K.M.K., Bern M., Nilsen J., Noordzij H. T., Sandlie I., Andersen J. T. Unraveling the interaction between FcRn and albumin: opportunities for design of albumin-based therapeutics. // *Front. Immunol*. 2015. V.5. P. 682.
16. 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. V.85, N.23. P. 12376–12386.
17. Stuart A.D., Eustace H. E., McKee T.A., Brown T. D. K. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. // *J. Virol*. 2002. V.76, N.18. P. 9307–9322.
18. Tomas M., Martinez-Alonso E., Ballesta J., Martinez-Menarguez J. A. Regulation of ER-Golgi intermediate compartment tubulation and mobility by COPI coats, motor proteins and microtubules. // *Traffic*. 2010. V.11, N.5. P. 616–625.
19. Xie S., Bahl K., Reinecke J. B., Hammond G. R., Naslavsky N., Caplan S. The endocytic recycling compartment maintains cargo segregation acquired upon exit from the sorting endosome. // *Mol. Biol. Cell*. 2016. V.27, N.1. P. 108–126.
20. Zhao X., Zhang G., Liu S., Chen X., Peng R., Dai L., Qu X., Li S., Song H., Gao Z., Yuan P., Liu Z., Li C., Shang Z., Li Y., Zhang M., Qi J., Wang H., Du N., Wu Y., Bi Y., Gao S., Shi Y., Yan J., Zhang Y., Xie Z., Wei W., Gao G. F. Human neonatal Fc receptor is the cellular uncoating receptor for Enterovirus B. // *Cell*. 2019. V.177, N.6. P. 1553–1565.e16.

© Усольцева Полина Сергеевна (savina_polina@mail.ru), Новоселов Алексей Владимирович (virus_science@mail.ru),
 Резайкин Алексей Васильевич (alexrez@yandex.ru),
 Сергеев Александр Григорьевич (aldr131250@yandex.ru), Алимов Александр Викторович (virus@eniivi.ru).
 Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Уральский государственный медицинский университет