

КЛЕТОЧНЫЙ ЛАМИНИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК И РЕПЛИКАЦИЯ ВИРУСА ВЕНЕСУЭЛЬСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ЛОШАДЕЙ В КЛЕТКАХ VERO, 293 И 9S2

© М. М. Грдина, Е. В. Протопопова, А. В. Качко, А. В. Иванова,
Е. И. Бондаренко, В. Б. Локтев¹

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская обл.;
¹ электронный адрес: loktev@vector.nsc.ru

Проведено исследование уровня экспрессии ламининсвязывающего белка (ЛСБ) на клеточной мембране трех клеточных линий, в том числе клеток 293, трансформированных плазмидой, содержащей ген ЛСБ человека. Клетки Vero, отличающиеся высоким уровнем экспрессии ЛСБ на своей поверхности, обеспечивали более высокий уровень репликации вируса Венесуэльского энцефаломиелиита лошадей (ВЭЛ). Обработка поверхности клеток Vero моноклональными антителами против ЛСБ человека приводила к ингибированию репликации вируса ВЭЛ более чем в 200 раз. Клетки 293 имели более низкий уровень экспрессии клеточного ЛСБ, однако, трансформированные плазмидой с геном ЛСБ, они обеспечивали повышение уровня экспрессии клеточного ЛСБ. При этом уровень репликации вируса ВЭЛ возрастал в трансформированных клетках (9S2) более чем в 2000 раз в сравнении с исходными клетками 293. Полученные результаты показали принципиально важную роль ЛСБ в проникновении вирионов в чувствительные клетки и в последующей репликации вируса ВЭЛ в клетках млекопитающих. Это дает основание считать, что ЛСБ является ключевым клеточным белком, который может предопределять уровень репликации вируса ВЭЛ в клетке посредством блокирования или усиления проникновения вирусных частиц через мембрану клетки. ЛСБ может служить перспективным клеточным белком-мишенью для разработки нового поколения противовирусных препаратов, способных блокировать (усиливать) репликацию альфавирусов в клетках человека.

Ключевые слова: ламининсвязывающий белок, клеточные линии 293 и Vero, трансформированные клетки, ингибирование репликации, вирус Венесуэльского энцефаломиелиита лошадей.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ВЗН — вирус Западного Нила, ВЭЛ — Венесуэльский энцефаломиелит лошадей, ИФА — иммуноферментный анализ, кИРНК — короткие интерферирующие РНК, ЛСБ — ламининсвязывающий белок, рЛСБ — рекомбинантный ламининсвязывающий белок, МКА — моноклональные антитела, ТЦПД₅₀ — 50%-ная тканевая цитопатическая доза, ЦПД — цитопатическое действие, PrP — прионовый белок.

Вирус Венесуэльского энцефаломиелиита лошадей (ВЭЛ) относится к роду *Alphavirus*, семейство *Togaviridae* (Young, Johnson, 1969; Walton, Grayson, 1988). Вирион содержит одноцепочечную инфекционную (+) РНК и имеет размер около 70 нм в диаметре (Strauss, Strauss, 1994; Fuller et al., 1995). Молекула РНК образует комплекс с 240 копиями капсидного белка С, формируя нуклеокапсид. Нуклеокапсид окружен липидным бислоем, фосфолипидный состав которого обычно имеет сходство с плазматической мембраной клетки хозяина. Гликопротеины E1 и E2 в виде гетеродимеров входят в состав липидной оболочки (Ziemiecki, Garoff, 1978; Rice, Strauss, 1982). Гликопротеин E1 содержит гидрофобный домен (пептид слияния), расположенный в районе от 75 до 97 аминокислотных остатков, который является консервативным среди альфавирусов и определяет слияние мембран вируса и клетки (Pletnev et al., 2001).

Альфавирусы способны инфицировать различные типы клеток, в том числе нейроны и глиальные клетки, поперечнополосатые и гладкие мышечные клетки, клетки

лимфоидного происхождения, синовиальные клетки и адипоциты. Это позволило предположить, что альфавирусы используют один высококонсервативный клеточный рецептор для проникновения в различные типы клеток. Недавно было показано, что некоторые альфа- и флавивирусы используют в качестве клеточного рецептора 67 кДа ламининовый рецептор (Wang et al., 1991; Ludwig et al., 1996; Protopopova et al., 1999; Thepparit, Smith, 2004). Этот белок имеет также другие названия: ламининовый рецептор, 32 кДа/67 кДа ламининовый рецептор, высокоаффинный ламининовый рецептор, неинтегриновый ламининовый рецептор, белок p40 и ламининсвязывающий белок (laminin-binding protein). Ламининсвязывающий белок обладает высокой консервативностью: так, аминокислотные последовательности ЛСБ мыши, человека и быка имеют 98.3 % гомологии, а крысы и человека — 99 % (Leucht et al., 2003). Гены предшественника ЛСБ (37 кДа) были обнаружены у дрожжей, морских червей, гидр, высших растений и дрозофил, а также было выявлено сходство ЛСБ с семейством S2 прокариотических рибосомаль-

ных белков (Ardini et al., 1998). Ламининсвязывающий белок участвует в процессах связывания и проникновения прионовых белков в клетку (Gauczynski et al., 2001; Hundt et al., 2001).

Исследование взаимодействия вируса ВЭЛ с клетками комара C6/36 показало, что вирус ВЭЛ взаимодействует с ламининсвязывающим белком, имеющим мол. массу 32 кДа, на поверхности клеток (Ludwig et al., 1996). Позднее было показано, что вирус ВЭЛ способен использовать ЛСБ клеток человека и обезьяны в качестве клеточного рецептора, а поверхностный гликопротеин E1 обеспечивает взаимодействие с ЛСБ человека (Бондаренко и др., 2003, 2004а). Сходство пространственной и функциональной организации белков E флавириусов и белка E1 альфа-вириусов также косвенно подтверждает возможную роль ЛСБ в качестве универсального клеточного рецептора или корецептора для альфа- и флавириусов (Lescar et al., 2001). Принципиальная важность этого взаимодействия для проникновения вирионов в клетку была подтверждена экспериментами по блокированию поликлональными антителами молекул ЛСБ на мембране клеток Vero, что сделало клетки резистентными к инфицированию вирусом ВЭЛ (Бондаренко и др., 2004в).

Целью настоящей работы было дальнейшее изучение роли ЛСБ в процессе репликации вируса ВЭЛ в клеточных культурах с разным уровнем экспрессии ЛСБ на поверхности клетки, в том числе и на трансформированных клетках с повышенным уровнем экспрессии гена ЛСБ человека.

Материал и методика

Рекомбинантные белки. Аффинно-очищенный рекомбинантный ламининсвязывающий белок (рЛСБ) человека был любезно предоставлен А. В. Сорокиным (ГНЦ ВБ «Вектор»). Получение, очистка и основные свойства рЛСБ описаны ранее (Сорокин и др., 2000).

Плазмиды. Полноразмерная копия гена ЛСБ была вырезана из плазмиды pQE-LBP (Сорокин и др., 2000) по сайтам BamHI/NheI и переклонирована в плазмиду pREP9 в прямой ориентации под контролем цитомегаловирусного промотора. Плаزمиды pREP9-sLBP содержат ген устойчивости к антибиотику G418, что позволило вести отбор стабильно трансформированных клонов эукариотических клеток. Определение нуклеотидной последовательности клонированного гена проводили на автоматическом секвенаторе Beckman CEQ2000XL с использованием наборов фирмы-производителя.

Вирусные препараты. В работе использовали вирус ВЭЛ, штамм ТС-83, который был получен из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор». Вирус культивировали на культуре клеток Vero с использованием среды ДМЕМ, содержащей 2 % сыворотки КРС и 80 мкг/мл сульфата гентамицина. Инфекционную активность вирусных суспензий определяли титрованием в 96-луночных планшетах по развитию ЦПД на культуре клеток Vero (Chanas et al., 1976). Очистку вируса ВЭЛ проводили в градиенте плотности сахарозы согласно известной методике (Enzmann, Weiland, 1979). Полученную вирусную суспензию хранили при -70°C аликвотами. Концентрацию белка определяли при помощи набора «Bio-Rad Protein Assay Kit» согласно инструкции производителя с использованием в качестве стандарта БСА.

Клеточные культуры. Клеточные культуры Vero и 293 были получены из банка культур клеток ГНЦ

ВБ «Вектор» и поддерживались на среде ДМЕМ, содержащей 10 % сыворотки плода коровы и 80 мкг/мл сульфата гентамицина. Плазмиды pREP9-sLBP с клонированным геном ЛСБ была использована для трансфекции клеток 293 с помощью липофектина. Полученные трансфицированные клеточные линии культивировали на селективной среде с антибиотиком G418. В результате была получена стабильная линия 9S2 из клеток 293, способная расти на селективной среде и содержащая плазмиду с геном ЛСБ человека в плюс-ориентации.

МКА к вирусу ВЭЛ и ЛСБ. Мышиные и крысиные моноклональные антитела к гликопротеинам E1 и E2 вируса ВЭЛ были любезно предоставлены И. А. Разумовым. Получение, очистка и основные свойства МКА описаны ранее (Агаров et al., 1994). Коллекция мышиных МКА и ЛСБ человека, использованных в данной работе, описана нами ранее (Бондаренко и др., 2004б).

Иммуноферментный анализ. Для проведения ИФА клетки культивировали в 96-луночном полистироловом планшете. Монослой (приблизительно 10^5 клеток в лунке) клеток промывали 3 раза средой Дулбекко и фиксировали 70%-ным раствором охлажденного этанола в течение 20 мин при -20°C . После промывки места неспецифического связывания блокировали добавлением 0.5%-ного раствора казеина в забуференном физиологическом растворе. После этого добавляли очищенные МКА против рЛСБ в различных разведениях. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли с помощью антивидового пероксидазного конъюгата, учет результатов проводили по регистрации оптической плотности на спектрофотометре (Multiscan, Финляндия) при 492 нм.

Ингибирование репликации вируса ВЭЛ при помощи антител против рЛСБ. Блокирование ЛСБ на поверхности клеток Vero проводили путем предварительной инкубации монослоя клеток ($5 \cdot 10^4$ клеток на лунку) с очищенными мышиными МКА против рЛСБ в 96-луночных планшетах. Антитела добавляли в 100 мкл среды ДМЕМ с 2 % фетальной сыворотки. После 1-часовой инкубации при 37°C в лунки вносили по 50 мкл вирусной суспензии в различных разведениях, инкубировали в течение 1 ч, трижды промывали и добавляли поддерживающую среду ДМЕМ с 2 % эмбриональной сыворотки. Уровень репликации вируса ВЭЛ оценивали по развитию ЦПД в лунках планшета и(или) при помощи прямого определения уровня синтеза вирусного белка E2 в ИФА с использованием МКА против этого белка, как описано нами ранее (Бондаренко и др., 2004а).

Использовали следующие материалы и реактивы: неполный и полный адьювант Фрейнда, трис-(оксиметил)-аминометан, диметилсульфоксид, маркеры молекулярных масс белков, 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорид, биотин, этилендиаминтетрауксусную кислоту, глицерин, трипановый синий, каприловую кислоту, сахарозу, глицин, твин-20, азид натрия, липофектин и антибиотик G-418 (Sigma, США); ПЭГ-2000 (Merck, США) набор для определения концентрации белка «Bio-Rad Protein Assay Kit», акриламид, бисакриламид, додецилсульфат натрия, тетраметилэтилендиамин, 2-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий и Кумасси G-250 (Bio-Rad, США); гипоксантин, аминоптерин, тимидин, орто-фенилендиамин, казеин, бычий сывороточный альбумин, пероксидазные конъюгаты антител против IgG мыши и крысы, конъюгаты пероксидазы со стрептовидином (ICN, США); эмбриональную сыворотку плодов коровы (Gibco, Англия); пластиковую культуральную посуду (Costar, США);

Т а б л и ц а 1

Взаимодействие МКА с клеточным ЛСБ в ИФА

МКА	Класс Ig	Титр МКА против ЛСБ (обратные величины)			
		рЛСБ ^a	Vero	293	9S2
9D8	IgG2b	218700	6400	3200	6400
3E6	IgG2b	72900	<100	<100	<100
8E4	IgG1	72900	8100	3200	6400
10E4	IgM	72900	24300	800	6400
4F6	IgG2a	72900	8100	1600	6400
2H9	IgM	72900	8100	800	3200
HMC		<100	<100	<100	<100

^a рЛСБ был использован в концентрации 200 нг на лунку.

планшеты для иммуноферментного анализа фирмы «СПЛ-групп» (Новосибирск, Россия); ферментные препараты эндонуклеаз рестрикции и ферментов модификации (СибЭнзим, Новосибирск, Россия); плазмиду pREP9 (Invitrogen, США). Все остальные реактивы были отечественного производства и имели квалификацию не ниже «хч».

Результаты и обсуждение

Оценка относительного уровня экспрессии ЛСБ на поверхности клеток при помощи МКА. Для изучения уровня экспрессии ЛСБ на поверхности различных эукариотических линий клеток было использовано 6 типов МКА и ЛСБ человека, описанных нами ранее (Бондаренко и др., 2004б). Были исследованы 3 клеточные линии: клетки почки зеленой мартышки (Vero), клетки почки эмбриона человека (293) и трансформированные плазмидой, содержащей ген ЛСБ, клетки 9S2 (табл. 1). Все типы исследованных МКА, кроме 3E6, лучше всего взаимодействовали с клетками Vero, а хуже всего — с клетками 293. Это позволило предположить, что относительный уровень экспрессии ЛСБ, оцениваемый как титр МКА против ЛСБ, на клетках Vero выше, чем на остальных исследованных клетках. Относительное сравнение концентраций ЛСБ, нормированное при помощи МКА 10E4, показывало, что концентрация молекул ЛСБ на поверхности исследованных клеток может различаться приблизительно в 30 раз и тем самым влиять на чувствительность этих клеток к вирусу ВЭЛ. Однако возможные различия в пространственной организации ЛСБ на разных типах клеток могут существенно влиять на приведенные оценки уровня экспрессии ЛСБ, так же как и на взаимодействие этой молекулы с вирусными частицами. Только в случае клеток 293 и их трансформированного аналога 9S2 эти различия можно считать минимальными, так как эти клетки максимально схожи между собой. При сравнении клеток 293 и 9S2 видно, что относительный уровень экспрессии ЛСБ на поверхности клеток 9S2 выше в 2—8 раз, чем у исходных клеток 293, но при этом он не достигает уровня экспрессии ЛСБ, характерного для клеток Vero.

МКА 3E6 не взаимодействовало с ЛСБ на поверхности всех исследованных клеточных линий. Отсутствие

взаимодействия МКА 3E6 с ЛСБ на поверхности клеток можно объяснить тем, что оно распознает эпитоп ЛСБ, который недоступен для взаимодействия с МКА при нахождении ЛСБ в составе мембраны клеток. Другая гипотеза состоит в том, что эпитоп изменяется в процессе формирования димерной молекулы 67 кДа ЛСБ из белка-предшественника 37 кДа.

Исследование ингибирования репликации вируса ВЭЛ посредством блокирования клеточного рецептора моноклональными антителами против ЛСБ. Для блокирования репликации вируса ВЭЛ были использованы очищенные мышинные МКА 8E4, 10E4 и 4F6 к ЛСБ и клетки Vero. Предварительная однократная обработка монослоя клеток Vero смесью этих моноклональных антител против рЛСБ и последующее инфицирование клеток вирусом ВЭЛ при 4 °С показали выраженное ингибирование развития ЦПД. Через 24 ч развития ЦПД не наблюдали даже при высокой множественности инфицирования клеток вирусом ВЭЛ. В отрицательном контроле (клетки, обработанные очищенными нормальными мышинными IgG) наблюдали выраженное цитопатическое действие вируса ВЭЛ (табл. 2). При дальнейшем наблюдении эффект сохранялся, но его значение несколько уменьшалось. Видимо, во временных условиях, позволяющих реализоваться нескольким последовательным циклам репликации вируса, и при 37 °С эффект блокирования клеточных рецепторов ослабевал или было возможно инфицирование клеток посредством прямых межклеточных контактов. Однако даже через 96 ч и более индекс ингибирования составлял 2.5 порядка.

Все виды антител против ЛСБ не взаимодействовали с вирионами вируса ВЭЛ в ИФА (данные не приводятся), и, следовательно, наблюдаемое блокирование репликации вируса ВЭЛ не может быть объяснено способностью антител взаимодействовать с вирионами вируса ВЭЛ. МКА против рЛСБ в концентрациях, используемых в экспериментах, не вызывали какого-либо токсического действия на исследованные клеточные культуры и не приводили к видимым заметным нарушениям жизнедеятельности клеток.

Время одиночного цикла репликации для вируса ВЭЛ составляет 9—12 ч (Nikiforova et al., 2002), поэтому отсутствие заметного ЦПД через 24 ч в пробе, обработанной смесью МКА, позволяет говорить о том, что наблюдается практически полное ингибирование проник-

Т а б л и ц а 2

**Ингибирование репликации вируса ВЭЛ в культуре клеток Vero
средством блокирования мышинными моноклональными антителами к рЛСБ**

Антитела	Время инкубирования, ч	Титр вируса, lgТЦПД ₅₀ /мл	Индекс ингибирования, lgТЦПД ₅₀ /мл
Смесь МКА 8Е4, 10Е4 и 4F6	24	0	3.15 ± 0.28
Контроль с IgG мыши		3.15 ± 0.75	
Смесь МКА 8Е4, 10Е4 и 4F6	48	5.65 ± 0.37	1.75 ± 0.72
Контроль с IgG мыши		7.40 ± 0.37	
Смесь МКА 8Е4, 10Е4 и 4F6	96	6.82 ± 0.86	2.33 ± 0.57
Контроль с IgG мыши		9.15 ± 0.37	
МКА 10Е4	96	8.13 ± 0.43	1.33 ± 0.34
Контроль с IgG мыши		9.46 ± 0.32	
МКА 4F6	96	8.55 ± 0.51	0.91 ± 0.48
Контроль с IgG мыши		9.46 ± 0.32	
МКА 8Е4	96	8.58 ± 0.55	0.88 ± 0.41
Контроль с IgG мыши		9.46 ± 0.32	

Примечание. Клетки обрабатывали очищенными мышинными моноклональными антителами против рЛСБ в концентрации 7 мкг на 100 мкл и затем инфицировали десятикратными разведениями вируса ВЭЛ; далее культуры трехкратно промывали культуральной средой для удаления избытка вируса и антител. В поддерживающую среду вносили МКА до концентрации в лунке 1 мкг на 100 мкл. Индекс ингибирования репликации вируса ВЭЛ оценивали как разность логарифмов титров вируса в опыте и контроле. Данные статистически обработаны с построением доверительных интервалов с вероятностью P = 0.955.

новения вируса в чувствительную клетку. Постепенное развитие ЦПД после нескольких циклов репликации вирусных частиц может быть объяснено несколькими причинами: неполным блокированием антителами ЛСБ клетки, возможностью существования второго клеточного рецептора, наличием альтернативных возможностей проникновения вируса в клетку, связанных с прямым слиянием вирусной и клеточных мембран, возможностью распространения вирусов путем межклеточных контактов.

Полученные данные подтвердили результаты ингибирования рецепторного пути проникновения вируса ВЭЛ в клетку за счет блокирования молекул ЛСБ на поверхности клеток поликлональной кроличьей сывороткой против рЛСБ (Бондаренко и др., 2004в). Более того, они показали, что для ингибирования активности ЛСБ в качестве вирусного рецептора необходимо блокирование определенных эпитопов ЛСБ. При этом МКА против ЛСБ ингибируют развитие вирусной инфекции так же эффективно, как и в случае с поликлональными антителами против ЛСБ.

Усиление репликации вируса ВЭЛ в трансформированных клетках 9S2. Взаимодействие различных типов МКА против рЛСБ с ламининсвязывающим белком на поверхности клеток в иммуноферментном анализе показало, что разные клеточные линии имеют разное количество ЛСБ на поверхности клеток. Клетки Vero представляют значительно больше ЛСБ на мембране клеток, чем клетки 293, причем разная картина взаимодействия МКА и ЛСБ на поверхности клетки дает основание предположить, что разные эпитопы ЛСБ не одинаково доступны для МКА на поверхности различных типов клеток (табл. 3).

Клетки Vero и 293 имеют достаточно высокую чувствительность к вирусу ВЭЛ, и через 48 ч после их инфицирования наблюдается выраженный лизис зараженных клеток. Однако для клеток Vero частичный лизис наблюдается уже через 22 ч, тогда как лизис клеток 293 развивается через 48 ч после инфекции при одинаковой множественности инфицирования. Определение методом ИФА

Т а б л и ц а 3

**Сравнение уровней репликации вируса ВЭЛ на клетках 293 и 9S2 через 30 ч
после инфицирования**

Множественность инфицирования, ТЦПД ₅₀ на 1 клетку	Титр вируса, lgТЦПД ₅₀ /мл		Разница lgТЦПД ₅₀ /мл
	клетки 9S2	клетки 293	
1.0	9.46 ± 0.86	6.71 ± 0.75	2.75 ± 0.65
0.1	8.77 ± 0.37	6.27 ± 0.37	2.50 ± 0.61
0.01	6.96 ± 0.86	4.39 ± 0.37	2.57 ± 0.37
0.001	5.52 ± 0.37	2.21 ± 0.69	3.31 ± 0.37

Примечание. Разницу уровня репликации вируса ВЭЛ оценивали как разности логарифмов титров вирусной суспензии в опыте и контроле. Данные статистически обработаны с построением доверительных интервалов с вероятностью P = 0.955.

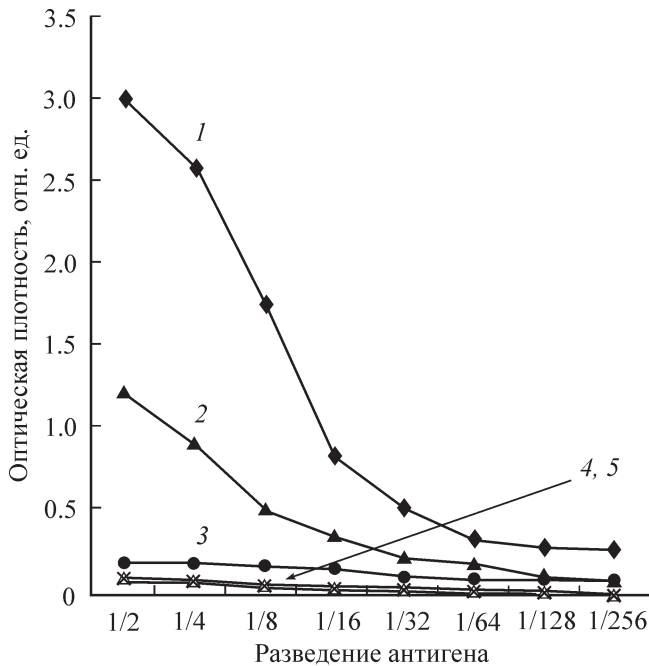


Рис. 1. Оценка синтеза вирусного белка E2 вируса ВЭЛ в клетках 293 и Vero в иммуноферментном анализе через 24 ч после инфицирования.

1, 2 — уровень репликации вируса ВЭЛ на клетках Vero; 3, 4 — уровень репликации вируса ВЭЛ на клетках 293; 5 — отрицательный контроль со средой ДМЕМ, содержащей 2 % эмбриональной сыворотки. Для заражения клеток использовали вирусную суспензию в концентрации $10^{5.31}$ ТЦПД₅₀/мл (1, 3) и $10^{4.31}$ ТЦПД₅₀/мл (2, 4). Иммуные комплексы выявляли с помощью антивидового пероксидазного конъюгата, регистрируя оптическую плотность при 492 нм.

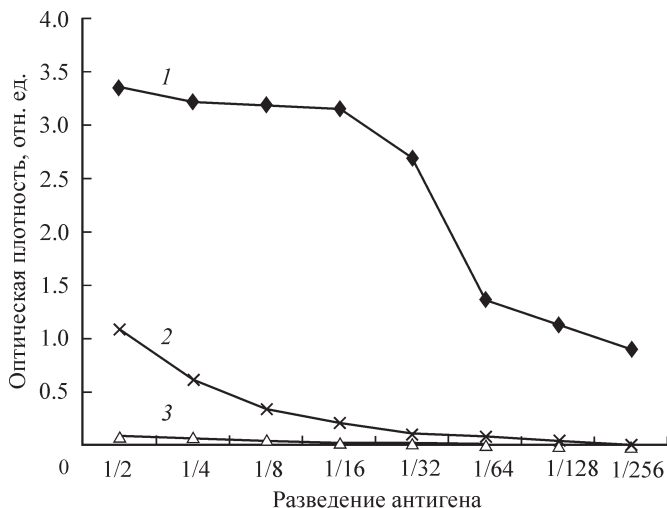


Рис. 2. Сравнение уровней синтеза вирусного белка E2 вируса ВЭЛ на клетках 293 и 9S2 через 30 ч после инфицирования в ИФА.

1 — уровень репликации вируса ВЭЛ на клетках 9S2; 2 — уровень репликации вируса ВЭЛ на клетках 293; 3 — отрицательный контроль со средой ДМЕМ, содержащей 2 % эмбриональной сыворотки. Для заражения клеток использовали вирусную суспензию в концентрации $10^{4.31}$ ТЦПД₅₀/мл.

уровня синтеза вирусного белка с помощью биотинилированных МКА 1F3 против вирусного гликопротеина E2 вируса ВЭЛ (рис. 1) показало, что синтез вирусного белка в инфицированных клетках Vero быстро увеличивался за 24 ч. Однако к этому сроку значительного уровня синтеза белка E2 в клетках 293 не было обнаружено. Через 30 ч после инфицирования вирусный белок E2 появлялся в инфицированных клетках 293 (рис. 2). Видимо, уровень чувствительности ИФА был недостаточен для выявления синтеза вирусного белка в инфицированных клетках 293 через 24 ч.

Полученные результаты показывали, что исследованные клетки имели на своей поверхности разное количество молекул ЛСБ. Это позволило сделать предположение о том, что клетки 293 и Vero имеют разное количество молекул ЛСБ на мембране клеток и что это может коррелировать с уровнем репликации вируса ВЭЛ. Вполне очевидно, что эти клетки различаются между собой по множеству признаков, в том числе и по видовому происхождению. Для получения более строгих доказательств взаимосвязи ЛСБ с уровнем репликации вируса ВЭЛ была исследована репликация этого вируса в трансформированных (9S2) и исходных клетках 293. Была проведена оценка динамики накопления инфекционных вирусных частиц вируса ВЭЛ и синтеза вирусных белков. Уже через 24 ч наблюдался частичный лизис клеток 9S2, зараженных максимальной множественностью, тогда как лизис клеток 293 не наблюдался. Уровень репликации вируса ВЭЛ был определен через 30 ч после инфицирования (рис. 2). Было обнаружено, что продукция вируса ВЭЛ в клетках 9S2 значительно превышает таковую в исходных клетках 293. При множественности инфицирования в 0.001 ТЦПД₅₀ на 1 клетку разница в уровне репликации достигала приблизительно 2000 раз (табл. 3). Данные по определению уровня синтеза вирусного белка E2 также подтверждают эти результаты (рис. 2). Аналогичные результаты были получены для вируса Синдбис, которые показали, что увеличение числа молекул ЛСБ на поверхности клеток может приводить к увеличению чувствительности клеток (Wang et al., 1992).

Ранее мы попытались оценить возможности блокирования репликации вируса Западного Нила (ВЗН) в клетках Vero при помощи коротких интерферирующих РНК к ЛСБ (Качко и др., 2006). Эксперименты по трансфекции киРНК в клетки Vero показали, что введение коротких интерферирующих РНК, полученных к гену ЛСБ человека, снижает уровень синтеза вирусных белков приблизительно в 2 раза при низкой множественности заражения, в то время как киРНК к клеточному гену спермидин/спермин N1-ацетилтрансферазы не влияли на репликацию ВЗН. Этот ген также может быть принципиально важен для репликации альфа- и флавивирусов (Nikiforova et al., 2002). Эксперименты с киРНК к гену ЛСБ дополнительно подтверждают важную роль ламининсвязывающего белка на ранних этапах репликации альфа- и флавивирусов. Относительно невысокий эффект киРНК к гену ЛСБ на репликацию вируса, видимо, связан с особенностями экспрессии гена ЛСБ в клетке. Одновременное использование киРНК к вирусному гену NS3 блокировало репликацию вируса приблизительно в 100 раз, что подтвердило эффективность трансфекции и использованной методологии получения киРНК.

Таким образом, нам удалось показать возможность ингибирования репликации вируса ВЭЛ путем блокирования ЛСБ на поверхности клеток моноклональными ан-

тителами против ЛСБ человека, а с другой стороны, было обнаружено усиление репликации вируса ВЭЛ в трансформированных клетках 9S2, которые имели более высокий уровень экспрессии ЛСБ на мембране клеток, причем разница между крайними значениями ингибирования и усиления репликации составила чуть меньше 6 порядков. Это позволяет говорить о том, что ЛСБ играет принципиально важную роль в ранних этапах репликации вируса ВЭЛ в клетке и может служить перспективной мишенью для разработки нового поколения противовирусных средств против альфа- и флавивирусов, которые будут способны блокировать начальные этапы проникновения вирусов в клетку и тем самым направленно регулировать развитие вирусной инфекции в клетке.

Авторы выражают глубокую благодарность А. В. Сорокину за предоставление препаратов рекомбинантного ЛСБ и И. А. Разумову за предоставление препаратов МКА против вируса ВЭЛ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ-2087), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48431) и Федеральной целевой научно-технической программы Министерства промышленности, науки и технологий РФ.

Список литературы

- Бондаренко Е. И., Протопопова Е. В., Коновалова С. Н., Сорокин А. В., Качко А. В., Суровцев И. В., Локтев В. Б. 2003. Ламининсвязывающий белок (ЛСБ) как клеточный рецептор для вируса Венесуэльского энцефаломиелиита лошадей (ВЭЛ). Сообщение 1. Исследование взаимодействия вирионов вируса ВЭЛ с рекомбинантным ЛСБ человека. Молекуляр. генет. микробиол. вирусол. 4: 36—39.
- Бондаренко Е. И., Протопопова Е. В., Коновалова С. Н., Суровцев И. В., Мальцев В. П., Локтев В. Б. 2004а. Ламининсвязывающий белок (ЛСБ) как клеточный рецептор для вируса Венесуэльского энцефаломиелиита лошадей (ВЭЛ). Сообщение 2. Ингибирование репликации вируса ВЭЛ путем блокирования ЛСБ на поверхности клеток Vero. Молекуляр. генет. микробиол. вирусол. 1: 36—40.
- Бондаренко Е. И., Протопопова Е. В., Некрасов В. М., Локтев В. Б. 2004б. Моноклональные антитела к рекомбинантному ламининсвязывающему белку человека. Получение и иммунохимическая характеристика. Вестн. РАМН. 8: 31—35.
- Бондаренко Е. И., Протопопова Е. В., Суровцев И. В., Швалов А. Н., Локтев В. Б. 2004в. Ингибирование репликации вируса Венесуэльского энцефаломиелиита лошадей поликлональными антителами к ламининсвязывающему белку. Вопр. вирусол. 49 (5): 32—37.
- Качко А. В., Иванова А. В., Протопопова Е. В., Немец С. В., Локтев В. Б. 2006. Ингибирование репликации вируса Западного Нила короткими интерферирующими РНК. Докл. РАН. 410 (1): 120—123.
- Сорокин А. В., Михайлов А. М., Качко А. В., Протопопова Е. В., Коновалова С. П., Фидрианова М. Е., Немец С. В., Корнев А. Н., Локтев В. Б. 2000. Рекомбинантный ламининсвязывающий белок человека: выделение, очистка и кристаллизация. Биохимия. 65 (5): 644—652.
- Agarov E. V., Razumov I. A., Frolov I. V., Kolykhalov A. A., Netesov S. V., Loktev V. B. 1994. Localization of four antigenic sites involved in Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus protection. Arch. Virol. 139: 173—181.
- Ardini E., Pesole G., Tagliabue E., Magnifico A., Castronovo V., Sobel M. E., Colnaghi M. I., Me'nard S. 1998. The 67-kDa laminin receptor originated from a ribosomal protein that acquired a dual function during evolution. Mol. Biol. Evol. 15: 1017—1025.
- Chanas A. C., Johnson B. K., Simpson D. I. 1976. Antigenic relationships of alphaviruses by a simple micro-culture cross-neutralization method. J. Gen. Virol. 32: 295—300.
- Enzmann P. J., Weiland F. 1979. Studies on the morphology of alphaviruses. Virology. 95: 501—510.
- Fuller S. D., Berriman J. A., Butcher S. J., Gowen B. E. 1995. Low pH induces swiveling of the glycoprotein heterodimers in the Semliki Forest virus spike complex. Cell. 81: 715—725.
- Gauczynski S., Peyrin J. M., Haik S., Leucht C., Hundt C., Rieger R., Krasemann S., Deslys J. P., Dormont D., Lasmezas C. I., Weiss S. 2001. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. EMBO J. 20: 5863—5875.
- Hundt C., Peyrin J. M., Haik S., Gauczynski S., Leucht C., Rieger R., Riley M. L., Deslys J. P., Dormont D., Lasmezas C. I., Weiss S. 2001. Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. EMBO J. 20: 5876—5886.
- Lescar J., Roussel A., Wien M. W., Navaza J., Fuller S. D., Wengler G., Rey F. A. 2001. The fusion glycoprotein shell of semliki forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. Cell. 105: 137—148.
- Leucht C., Simoneau S., Rey C., Vana K., Rieger R., Lasmezas C. I., Weiss S. 2003. The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrPSc propagation in scrapie-infected neuronal cells. EMBO Rep. 4: 290—295.
- Ludwig G. V., Konding J. P., Smith J. F. 1996. A putative receptor for Venezuelan equine encephalitis virus from mosquito cells. Virology. 70: 5592—5599.
- Nikiforova N. N., Velikodvorskaja T. V., Kachko A. V., Nikolaev L. G., Monastyrskaya G. S., Lukyanov S. A., Konvalova S. N., Protopopova E. V., Svyatchenko V. A., Kiselev N. N., Loktev V. B., Sverdlov E. D. 2002. Induction of alternatively spliced spermidine/spermine n(1)-acetyltransferase mRNA in the human kidney cells infected by Venezuelan equine encephalitis and tick-borne encephalitis viruses. Virology. 297: 163—171.
- Pletnev S. V., Zhang W., Mukhopadhyay S., Fisher B. R., Hernandez R., Brown D. T., Baker T. S., Rossmann M. G., Kuhn R. J. 2001. Locations of carbohydrate sites on alphavirus glycoproteins show that E1 forms an icosahedral scaffold. Cell. 105: 127—136.
- Protopopova E., Sorokin A., Konvalova S., Kachko A., Netesov S., Loktev V. 1999. Human laminin binding protein as a candidate in cell receptor for the Tick-borne encephalitis virus. Zentr. b1. Bacteriol. 289: 632—638.
- Rice C. M., Strauss J. H. 1982. Association of Sindbis virion glycoproteins and their precursors. J. Mol. Biol. 154: 325—348.
- Strauss J. H., Strauss E. G. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. Microbiol. Rev. 58: 491—562.
- Thepparit C., Smith D. R. 2004. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. J. Virol. 78: 12 647—12 656.
- Walton T. E., Grayson M. A. 1988. Venezuelan equine encephalomyelitis. In: The arboviruses: epidemiology and ecology. Boca Raton, Fla: CRS Press. IV: 203—231.
- Wang K. S., Kuhn R. J., Strauss E. G., Ou S., Strauss J. H. 1992. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. J. Virol. 66: 4992—5001.
- Wang K. S., Schmaljohn A. L., Kuhn R. J., Strauss J. H. 1991. Antidiagnostic antibodies as probes for the Sindbis virus receptor. Virology. 181: 694—702.
- Young N. A., Johnson K. M. 1969. Antigenic variants of Venezuelan equine encephalitis virus: their geographic distribution and epidemiologic significance. Amer. Epidemiol. 89: 286—307.
- Ziemiński A., Garoff H. 1978. Subunit composition of the membrane glycoprotein complex of Semliki Forest virus. J. Mol. Biol. 122: 259—269.

CELLULAR LAMININ-BINDING PROTEIN AND VENEZUELAN EQUINE
ENCEPHALOMYELITIS VIRUS REPLICATION IN VERO, 293 AND 9S2 CELLS

M. M. Gridina, E. V. Protopopova, A. V. Kachko, A. V. Ivanova, E. I. Bondarenko, V. B. Loktev¹

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, 630559,
¹e-mail: loktev@vector.nsc.ru

The level of laminin-binding protein (LBP) expression on cellular membranes was studied in three cell lines including 293 cells transformed by plasmide with human LBP gene. Vero cells show a high level of LBP on the cell surfaces and demonstrate a high level of the Venezuelan equine encephalomyelitis (VEE) virus replication. The inhibition of VEE virus replication was more than 200 times as much after treatment of Vero cell surfaces with monoclonal antibodies to human LBP. 293 cells have more low level of LBP on their surfaces but being transformed by plasmide with LBP human gene these cells showed an increase in the level of cellular LBP. The VEE virus replication in transformed cells (9S2) was more than 2000 times higher compared to 293 cells. The results obtained demonstrate a principal role of cellular LBP in VEE virus entry into mammalian cells. It can be proposed that LBP is a key cellular protein at the early stage of VEE virus replication in cells. So, LBP might be a target protein for development of some new generation of antiviral drugs that would be able to inhibit (enhance) the alphavirus replication in human cells.

Key words: laminin-binding protein, 293 and Vero cell lines, transformed cells, inhibition of replication, Venezuelan equine encephalomyelitis virus.
