



УДК 578.2

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ76106>

ВЛИЯНИЕ АМФОТЕРИЦИНА В НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ КЛЕТОК WI-38 VA-13 С НОКАУТОМ ГЕНА *IFITM3*

К.С. Корябина^{1,2}, М.В. Сергеева^{1,3}, А.Б. Комиссаров^{1,3}, Н.В. Ещенко³, Г.А. Степанов³¹ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;² Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), Санкт-Петербург, Россия;³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Как цитировать: Корябина К.С., Сергеева М.В., Комиссаров А.Б., Ещенко Н.В., Степанов Г.А. Влияние амфотерицина В на чувствительность к гриппозной инфекции клеток WI-38 VA-13 с нокаутом гена *IFITM3* // Медицинский академический журнал. 2021. Т. 21. № 3. С. 109–112. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ76106>

Поступила: 16.07.2021

Одобрена: 06.08.2021

Принята: 06.09.2021

Обоснование. Применение системы CRISPR/Cas9 представляется одним из быстро развивающихся направлений в биотехнологии. Данный метод был использован для получения клонов клеточной линии человеческого происхождения с нокаутом одного или нескольких генов семейства *IFITM*, являющихся факторами рестрикции гриппозной инфекции. Ранее было показано, что амфотерицин В способствует увеличению гриппозной инфекции за счет блокировки функции *IFITM3*.

Цель — оценить влияние амфотерицина В на чувствительность клеток с нокаутом генов семейства *IFITM* к инфекции вирусом гриппа А.

Методология. Клетки WI-38 VA-13 и их мутантные клоны с нокаутом гена *IFITM3* (клон F3) или генов *IFITM1*, *IFITM3* (клон E12) заражали вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) в присутствии или отсутствии амфотерицина В. Через 48 ч после заражения отбирали культуральную среду для определения инфекционной активности вируса методом титрования в клеточной культуре MDCK, а также гемагглютинирующей активности вируса. Зараженные клетки окрашивали флуоресцентно меченными антителами против вирусного белка NP и определяли количество инфицированных клеток методом проточной цитометрии.

Результаты. Добавление амфотерицина В повышало гемагглютинирующую и инфекционную активность вируса при его внесении в клеточную культуру WI-38 VA-13, а для клонов с нокаутом генов *IFITM* разница была незначительная. Аналогичное соотношение было получено для доли зараженных клеток.

Заклучение. Мутантные клетки с нокаутом одного или нескольких генов семейства *IFITM* были одинаково чувствительны к гриппозной инфекции вне зависимости от добавления амфотерицина В, что подтверждает решающее значение дефекта в белке *IFITM3* в повышении перmissивности клеток к вирусу гриппа А.

Ключевые слова: нокаут *IFITM3*; вирус гриппа; клеточная культура WI-38 VA-13; амфотерицин В.

AMPHOTERICIN B EFFECT ON THE SENSITIVITY TO INFLUENZA INFECTION OF WI-38 VA-13 CELLS WITH *IFITM3* GENE KNOCKOUT

Kira S. Koryabina^{1,2}, Mariya V. Sergeeva^{1,3}, Andrey B. Komissarov^{1,3}, Nataliya V. Eshchenko³, Grigoriy A. Stepanov³¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia;² St. Petersburg State Institute of Technology, Saint Petersburg, Russia;³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS, Novosibirsk, Russia

To cite this article: Koryabina KS, Sergeeva MV, Komissarov AB, Eshchenko NV, Stepanov GA. Amphotericin B effect on the sensitivity to influenza infection of WI-38 VA-13 cells with *IFITM3* gene knockout. *Medical Academic Journal*. 2021;21(3):109–112. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ76106>

Received: 16.07.2021

Revised: 06.08.2021

Accepted: 06.09.2021

BACKGROUND: The application of CRISPR/Cas9 is one of the most rapidly developing areas in biotechnology. This method was used to obtain clones of a human origin cell line with knockout of one or more genes of the *IFITM* family, representing host restriction factors for influenza infection. Amphotericin B has previously been shown to promote influenza infection by blocking *IFITM3* function.

AIM: The aim of this study was to evaluate the effect of amphotericin B on the sensitivity of *IFITM* knockout cells to influenza A virus infection.

MATERIALS AND METHODS: WI-38 VA-13 cells and mutant clones with *IFITM3* knockout (F3 clone) or *IFITM1*, *IFITM3* knockout (clone E12) were infected with influenza virus A/PR/8/34 (H1N1) in the presence or absence of amphotericin B. Forty-four hours after infection, the culture medium was taken to determine the infectious activity of the virus by titration in the MDCK cell culture, as well as the hemagglutinating activity of the virus. The infected cells were stained with fluorescently labeled antibodies against the viral NP protein, and the number of NP-positive cells was determined by flow cytometry.

RESULTS: The addition of amphotericin B increased the hemagglutinating and infectious activity of the virus in WI-38 VA-13 cells, while the difference was insignificant for clones with *IFITM* gene knockout. A similar dependency was obtained for the percent of infected cells.

CONCLUSIONS: Mutant cells with a knockout of one or several genes of the *IFITM* family were equally susceptible to influenza infection regardless of the addition of amphotericin B, which confirms the crucial importance of a defect in the *IFITM3* protein in increasing the permissiveness of cells to influenza A virus.

Keywords: *IFITM3* knockout; influenza virus; WI-38 VA-13 cell line; amphotericin B.

Обоснование

Белок *IFITM3* входит в семейство транс-мембранных интерферон-индуцируемых белков. Как было показано ранее, от 50 до 80 % защитных свойств интерферона обеспечивает именно *IFITM3*, блокируя слияние вирусных частиц и ограничивая таким образом вирусную инфекцию [1]. В свою очередь антимикотический препарат амфотерицин В понижает *IFITM3*-опосредованную рестрикцию, тем самым увеличивая вирусную репликацию [2]. На основе клеточной культуры эмбриональных фибробластов WI-38 VA-13 были получены линии клеток, дефектные по гену *IFITM3*, с помощью метода CRISPR-Cas9, как описано ранее [3]. При транскриптомном анализе клонов было выявлено, что клон F3 характеризовался сниженной экспрессией *IFITM3*, в то же время у клона E12 нокаут также затронул ген *IFITM1*. В предыдущих исследованиях было показано, что клоны E12 и F3 более чувствительны к инфекции вирусом гриппа по сравнению с исходными клетками (неопубликованные данные). С учетом того что амфотерицин В подавляет защитные механизмы *IFITM3*, его добавление в культуральную среду может быть маркером связи нокаута гена *IFITM3* и перmissивности к вирусу гриппа.

Цель данной работы — оценить влияние амфотерицина В на чувствительность клеток с нокаутом генов *IFITM* к инфекции вирусом гриппа А.

Материалы и методы

Клетки WI-38 VA-13 и мутантные клоны E12 (нокаут *IFITM1*, *IFITM3*) и F3 (нокаут *IFITM3*) культивировали в базовой среде DMEM/F-12 (1:1) с добавлением 1 % NEAA (Gibco), 1 % Sodium pyruvate (Gibco), 1 % GlutaMax (Gibco), 1 % антибиотика Pen/Strep (Gibco) и 10 % сыворотки FBS (Gibco) в инкубаторе при 37 °C, 5 % CO₂. Для заражения клеток использовали вирус A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (A/PR8) в дозе 2 ТИД₅₀/клетку (ТИД₅₀ — 50 % тканевой инфекционной дозы). В среду для заражения добавляли (или не добавляли) амфотерицин В в концентрации 0,25 мкг/мл. Через 48 ч после внесения вируса собирали аликвоты культуральной жидкости, в которых

вычисляли количество вирусных частиц методом титрования с определением инфекционной активности в клеточной культуре MDCK или гемагглютинирующей активности с 0,5 % суспензией куриных эритроцитов. Зараженные клетки собирали, фиксировали, пермеабilizировали (BD Cytofix/Cytoperm) и окрашивали флуоресцентно меченными антителами к белку NP вируса гриппа А (ООО «ППДП»). В качестве контроля для окрашивания использовали незараженные клетки. Относительное количество зараженных клеток подсчитывали на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter).

Результаты и обсуждение

В данном исследовании мы оценили влияние амфотерицина В на чувствительность клеток с нокаутом одного или нескольких генов семейства *IFITM* к инфекции, вызванной вирусом гриппа А. Клетки WI-38 VA-13 (исходные и мутантные с нокаутом) заражали вирусом гриппа А/PR8 в присутствии и отсутствие амфотерицина В. На рис. 1 показан результат определения титра вируса, накопленного в клетках в различных условиях.

Согласно полученным данным в исходных клетках с полноценным белком *IFITM3* вирус гриппа А накапливался в большем титре при добавлении амфотерицина В, чем без добавления (разница в 10 раз). В клетках F3 и E12 амфотерицин В практически не влиял на титры выделяющегося вируса.

На рис. 2 представлена разница в заражаемости клеток WI-38 VA-13с нокаутом *IFITM3* и без него. Мутантные E12 и F3 не характеризовались значительным изменением количества зараженных клеток в зависимости от наличия амфотерицина В в среде. В свою очередь, число зараженных клеток без нокаута *IFITM3* при добавлении амфотерицина В возрастало почти на 30 %.

Исходя из полученных результатов можно заключить, что повышенная чувствительность клонов F3 и E12 к гриппозной инфекции объясняется главным образом нокаутом гена *IFITM3*, а не случайными эффектами офф-таргет. Мутантные клетки с нокаутом

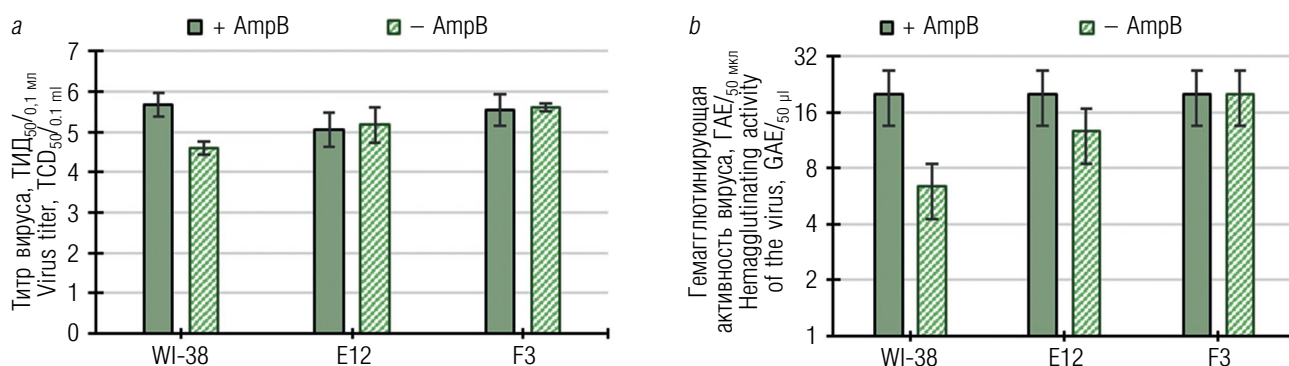


Рис. 1. Количество вируса A/PR8, накапливающегося в культуральной среде, при заражении исходных клеток WI-38 VA-13 и мутантных клонов E12 и F3: *a* — инфекционная активность вируса; *b* — гемагглютинирующая активность. AmpB — амфотерицин В

Fig. 1. The yield of the A/PR8 virus in the infected original WI-38 VA-13 cells and mutant clones E12 and F3: *a* — viral infectious activity; *b* — viral hemagglutinating activity. AmpB — amphotericin B

одного или нескольких генов семейства IFITM были одинаково чувствительны к гриппозной инфекции вне зависимости от добавления амфотерицина В, что подтверждает решающее значение дефекта в белке IFITM3 в повышении перmissивности клеток к вирусу гриппа А. Можно отметить, что амфотерицин В повышает восприимчивость клеток к вирусу гриппа за счет воздействия на механизм рН-опосредованного эндоцитоза, и, возможно, данный эффект будет проявляться и для других вирусов, использующих указанный механизм для проникновения в клетки.

Закключение

Таким образом, полученные результаты могут иметь значение для применения антимикотика Амфотерицин В и подобных ему препаратов при терапии вирусных инфекций.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 18-75-10069.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность научному сотруднику НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева канд. биол. наук К.А. Васильеву за анализ образцов на проточном цитометре.

Список литературы

1. Feeley E.M., Sims J.S., John S.P. et al. IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry // *PLoS Pathog.* 2011. Vol. 7, No. 10. P. e1002337. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002337

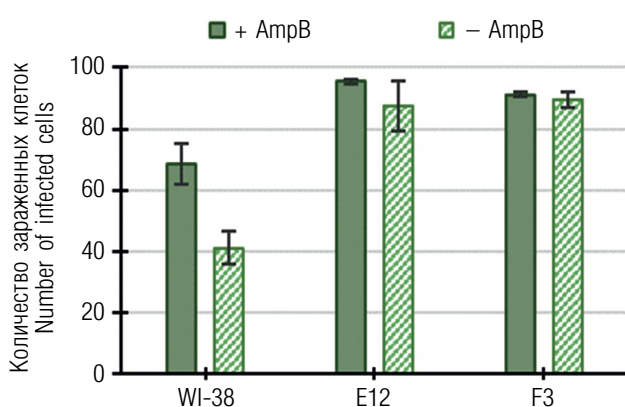


Рис. 2. Количество инфицированных мутантных и исходных клеток через 48 ч после заражения вирусом гриппа A/PR8 по результатам окрашивания на вирусный нуклеопротеин. AmpB — амфотерицин В

Fig. 2. The number of infected mutant and original cells 48 hours after infection with A/PR8 virus as determined by staining for viral nucleoprotein. AmpB — amphotericin B

2. Lin T.Yu., Chin C.R., Everitt A.R. et al. Amphotericin B increases influenza A virus infection by preventing IFITM3-mediated restriction // *Cell. Rep.* 2013. Vol. 5, No. 4. P. 895–908. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.10.033
3. Степанов Г.А., Сергеева М.В., Можаяева А.Е. и др. Создание и изучение клеточных линий с CRISPR/Cas9-направленным нокаутом индивидуальных генов для повышенной продукции вируса гриппа // Материалы Всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология — медицине будущего», Новосибирск, 29 июня — 02 июля 2019 г. Новосибирск, 2019. С. 215.

References

1. Feeley EM, Sims JS, John SP, et al. IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *PLoS Pathog.* 2011;7(10):e1002337. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002337
2. Lin TYu, Chin CR, Everitt AR, et al. Amphotericin B increases influenza A virus infection by preventing

IFITM3-mediated restriction. *Cell Rep.* 2013;5(4):895–908. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.10.033

3. Stepanov GA, Sergeeva MV, Mozhaeva AE, et al. Sozdanie i izuchenie kletochnykh linii s CRISPR/Cas9-napravlenym nokautom individual'nykh genov dlya povyshennoi

produksii virusa grippa. Proceedings of The Vserossiiskaya mul'tikonferentsiya s mezhdunarodnym uchastiem "Biotehnologiya – meditsine budushchego"; 2019 2 June – 2 July; Novosibirsk. Novosibirsk; 2019. P. 215. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Кира Сергеевна Корябина — студент. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт», Санкт-Петербург, Россия. E-mail: kira336@yandex.ru

Мария Валерьевна Сергеева — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин. ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0411-9896>; eLibrary SPIN: 9720-5812; e-mail: mari.v.sergeeva@gmail.com

Андрей Борисович Комиссаров — канд. биол. наук, заведующий лабораторией молекулярной вирусологии. ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1733-1255>; eLibrary SPIN: 3792-8290; e-mail: a.b.komissarov@gmail.com

Наталья Вячеславовна Ещенко — младший научный сотрудник лаборатории геномного редактирования. Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия. E-mail: eschenko96@gmail.com

Григорий Александрович Степанов — канд. хим. наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией геномного редактирования. ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, Новосибирск, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3393-3192>; eLibrary SPIN: 8587-2044; e-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru

Kira S. Koryabina — student. St. Petersburg State Institute of Technology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: kira336@yandex.ru

Mariya V. Sergeeva — PhD (Biol.), Leading Researcher at the Laboratory of Vector Vaccines. Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0411-9896>; eLibrary SPIN: 9720-5812; e-mail: mari.v.sergeeva@gmail.com

Andrey B. Komissarov — PhD (Biol.), Head of the Laboratory of Molecular Virology. Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1733-1255>; eLibrary SPIN: 3792-8290; e-mail: a.b.komissarov@gmail.com

Nataliya V. Eshchenko — Researcher at the Laboratory of Genomic Editing. Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS, Novosibirsk, Russia. E-mail: eschenko96@gmail.com

Grigoriy A. Stepanov — PhD (Chem.), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Genomic Editing. Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS, Novosibirsk, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3393-3192>; eLibrary SPIN: 8587-2044; e-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Кира Сергеевна Корябина / Kira S. Koryabina
E-mail: kira336@yandex.ru