Genetics of Influenza Viruses

Edited by
Peter Palese
and David W. Kingsbury



Springer-Verlag Wien New York

Генетика вирусов гриппа

Под редакцией
П. ПЕЙЛИЗА и Д. У. КИНГСБЕРИ

Перевод с английского
канд. мед. наук Ю. М. БРОДЯНСКОГО,
канд. биол. наук Н. В. ЖЕЛЕЗНОВОЙ,
канд. биол. наук Н. Ю. ПОЛЯНСКОЙ



Москва «Медицина» 1986

УДК 578.832.1:578.53

Генетика вирусов гриппа: Пер. с англ./Под ред. П. ПЕЙЛИЗА, Д. У. КИНГСБЕРИ. — М.: Медицина, 1986, 336 с., ил.

Genetics of Influenza Viruses. Ed. by P. PALESE, D. W. KINGSBURY. Springer—Verlag Wien. New York, 1983.

В монографии рассмотрены генетика и молекулярные основы репродукции вируса гриппа, его эволюция и эпидемиология. Описаны геном вируса гриппа, транскрипция генома и геномные РНК-сегменты. Представлены данные об антигенной вариации и мутантах вирусов гриппа, экспрессии клонированных генов, генетическом базисе вирулентности вируса. Освещены наиболее крупные пандемии XX века.

Для микробиологов, эпидемиологов, вирусологов, генетиков.

Рис. 49. Табл. 37. Список литературы — 1446 назв.

Рекомендовано проф. *Ф. С. Носковым*, проф. *В. И. Аголом*

Г $\frac{4107000000-293}{039(01)-86}$ 91—86

© 1983 by Springer—Verlag/Wien
© Перевод на русский язык. Издательство «Медицина» Москва, 1986

Оглавление

1. **Перспективы развития генетики вируса гриппа.** — *Э. Кильбурн (E. Kilbourne)* 11
I. Введение 11
II. Развитие современной генетики вируса гриппа 12
А. Первые лабораторные доказательства генетической изменчивости 12
Б. Применение традиционных генетических методов для изучения вируса гриппа 13
В. Генетические маркеры 14
Г. Развитие методов бляшек 15
Д. Использование условных летальных мутантов 16
Е. Новые подходы в генетике вируса гриппа 17
1. Биохимическая идентификация продуктов вирусного гена при нечетком определении вирусного потомства . . 17
2. Картирование генома вируса гриппа коррелятивными физико-химическими и биологическими методами . . 18
3. Применение методов молекулярной биологии для изучения вирусных генетических изменений 19
4. Олигонуклеотидное картирование вирусных РНК . . 19
5. Роль секвенирования белка и РНК в генетике вируса гриппа — внутригенное картирование 20
III. Вирусная генетика и понимание вирулентности и патогенности вирусов 20
IV. Взаимосвязь генетики вируса гриппа с эпидемиологией и эволюцией вирусов гриппа (молекулярная эпидемиология) . . 21
А. Генетическое перераспределение в природе и его роль в эволюции новых вирусов 22
Б. Генетика минорной изменчивости 23
В. Вирусы гриппа А, В и С 23
V. Практическое применение генетики вируса гриппа 24
VI. Специальная генетика вирусов с раздробленным геномом в связи с проблемами гриппа 25
VII. Нерешенные проблемы гриппа и генетические подходы к их решению 26
Список литературы 27

2. **Сегменты РНК вируса гриппа и кодированные ими белки.** — *Р. Лемб (R. Lamb)* 31
I. Введение 31
II. Частица вируса гриппа: основная структура 31
III. Структура генома 33
А. Первые доказательства сегментированности генома . . 34
Б. Восемь сегментов РНК вируса гриппа 34

В. Методы определения функций гена 36
Г. Последовательности 5′- и 3′-концов каждого сегмента РНК—общие 37
Д. Синтез двунитчатой ДНК с РНК вируса гриппа, клонирование и определение нуклеотидных последовательностей . 39
IV. Сегменты РНК вируса гриппа 42
А. Сегменты 1, 2 и 3 РНК: свойства белков PB1, PB2 и PA, ассоциированных с транскриптазой 42
Б. Сегмент 4 РНК: структура и функция гемагглютинина . 43
1. Структура сегмента 4 РНК, кодирующего гемагглютинин 44
2. Трехмерная структура гемагглютинина 46
3. Синтез гемагглютинина, котрансляционные и посттрансляционные модификации 47
4. Активация инфекционности кливеджем и слияние in vitro 48
В. Сегмент 5 РНК: структура белка нуклеокапсида . . . 48
Г. Сегмент 6 РНК: структура и свойства нейраминидазы . . 49
Д. Сегмент 7 РНК: структура и синтез мембранного белка (M1) и неструктурного белка (M2) 52
Е. Сегмент 8 РНК: структура и синтез неструктурных белков NS1 и NS2 55
Ж. Перекрывающиеся кодирующие области, использующие различные рамки считывания у вирусов 58
Список литературы 58

3. Транскрипция и репликация вируса гриппа. — *Р. Краг (R. Krug)* 66
I. Введение 66
II. Синтез вирусных мРНК 67
А. Праймирование клеточными кэпированными РНК—открытие 67
Б. Праймирование клеточными кэпированными РНК — механизм 69
В. Роль трех вирусных белков Р на этапах праймирования транскрипции 72
Г. Окончание транскрипции и добавление поли(А) . . . 77
Д. Регуляция синтеза вирусной мРНК в инфицированной клетке 78
Е. Клеточный сайт для синтеза вирусных мРНК 80
Ж. Роль других функций ядер клеток-хозяев в синтезе вирусной мРНК — сплайсирование и метилирование внутренних А-остатков 84
III. Синтез транскриптов во всю длину 90
IV. Синтез вРНК (репликация) 92
Список литературы 93

4. Генетическое родство вирусов гриппа (РНК и белок). — *К. Шолтиссек (C. Scholtissek)* 96
I. Введение 96
II. Генетическое родство вирусных РНК 96
А. Различия в скоростях миграции A_8 сегментов РНК, выявленные методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГЭ) 96
Б. Молекулярная гибридизация 98
1. Прямая РНК-РНК-гибридизация 98
2. Конкурентная гибридизация 101
3. ДНК-РНК-гибридизация 102
4. Анализ двухцепочечных обработанных нуклеазой S1 гибридных молекул методом ПААГЭ 102
В. Метод олигонуклеотидного фингерпринта 103
Г. Секвенирование сегментов РНК 105
1. Секвенирование ^{32}Р-концевых меченых РНК частичным расщеплением нуклеазой 105

2. Секвенирование 3′-конца РНК с использованием дидеокси-метода . . . 105
3. Секвенирование полных сегментов РНК . . . 107
а) Ген гемагглютинина . . . 108
б) Ген нейраминидазы . . . 110
в) Три гена белка Р . . . 110
г) Ген нуклеопротеида . . . 111
д) Ген мембранного белка . . . 111
е) Ген неструктурного белка . . . 113
III. Генетическое родство вирусных белков . . . 114
А. Различия в скоростях миграции вирусных белков при ПААГ . . . 114
Б. Триптическое пептидное картирование . . . 115
В. Прямое секвенирование . . . 116
IV. Заключение . . . 117
Список литературы . . . 118

5. Антигенные вариации среди вирусов гриппа типа А.—*Р. Вебстер, В. Лейвер, Г. Эйр (R. Webster, W. Laver, G. Air)* . . . 123
I. Введение . . . 123
II. Исторические сведения . . . 124
III. Номенклатура . . . 124
IV. Химические и физические свойства антигенов . . . 126
V. Гемагглютинин . . . 128
А. Выделение и антигенные свойства гемагглютинина . . . 129
Б. Изменение структуры и антигенности гемагглютинина при низких значениях pH . . . 131
В. Антигенный дрейф гемагглютинина . . . 132
Г. Использование моноклональных антител в анализе антигенного дрейфа . . . 133
Д. Изменение последовательности гемагглютинина вариантов вируса гриппа, отобранных с моноклональными антителами . . . 133
Е. Расположение антигенных сайтов в 3-D структуре гемагглютинина . . . 136
Ж. Отбор антигенных вариантов секвенированием . . . 138
З. Антигенный дрейф гемагглютинина вируса гриппа типа А низших животных . . . 140
VI. Нейраминидаза . . . 141
А. Антигенные вариации в нейраминидазе . . . 143
Б. Селекция вариантов нейраминидазы с моноклональными антителами . . . 144
В. Антигенный дрейф в нейраминидазах вирусов гриппа типа А низших животных . . . 146
Г. Механизм антигенного дрейфа . . . 147
VII. Антигенный шифт . . . 147
А. Выводы из анализа последовательностей . . . 148
Б. Возможные механизмы шифтов в штаммах вируса гриппа человека . . . 150
В. Антигенный шифт среди вирусов гриппа низших животных . . . 151
VIII. Вариация в нуклеопротеиде . . . 152
IX. Вариация в матриксном белке . . . 153
X. Вариация в неструктурных белках . . . 154
XI. Вариации в белках полимеразы . . . 154
XII. Каково будущее? . . . 155
Список литературы . . . 157

6. Экспрессия клонированных генов вируса гриппа.— *М.-Дж. Гетсинг, Дж. Сэмбрук (M.-J. Gething, J. Sambrook)* . . . 161
I. Введение . . . 161
II. Векторы экспрессии . . . 162
III. Экспрессия генов вируса гриппа в E. coli . . . 162
А. Экспрессия гемагглютинина . . . 163
Б. Экспрессия белка NS1 . . . 166

IV. Экспрессия генов вируса гриппа в клетках эукариотов . . . 166
А. Экспрессия гемагглютинина в клетках обезьян с использованием рекомбинантных SV40 вирусных векторов . . . 166
Б. Приготовление генов гемагглютинина 168
В. Конструирование рекомбинантных геномов 168
Г. Введение рекомбинантных геномов в клетки обезьян и продукция вирусного материала 170
Д. Анализ гемагглютинина экспрессированного из SV40-НА-рекомбинантных векторов 172
Е. Количественная оценка гемагглютинина, экспрессированного из рекомбинантных геномов 174
Ж. Влияние промежуточных последовательностей в транскрипте гемагглютинина рекомбинанта на уровень экспрессии белка гемагглютинина 175
З. Экспрессия матриксного гена в клетках обезьян с использованием SV40-М-рекомбинантного вируса 176
И. Кратковременная экспрессия клонированных генов в клетках COS-1 176
К. Непрерывная экспрессия гемагглютинина из генов, интегрированных в хромосомы клеток эукариотов 177
V. Анализ экспрессии белков мутанта гемагглютинина . . . 179
А. Сигнал-минус гемагглютинина (S⁻HA) — негликозилированный внутриклеточный белок 179
Б. Удаление С-терминальной гидрофобной последовательности превращает гемагглютинин в секретированный белок . . 180
В. Планы на будущее 184
Список литературы 185

7. Мутанты вируса гриппа. — *Б. Мэйхи (B. Mahy)* 186
I. Введение 186
II. Характеристика вирусных мутантов 187
А. Системы вирус гриппа—клетка 188
Б. Природа вирусной популяции 188
В. Скорость естественной мутации 189
Г. Индукция мутантов 190
1. Мутагены 191
Д. Текучесть и реверсия 191
III. Температурочувствительные мутанты 194
А. Генетическое взаимодействие и классификация мутантов 194
Б. Передача ts-повреждений индивидуальным сегментам генома 196
1. Мутанты из Кембриджа 197
2. Мутанты из Нью-Йорка и Токио 198
3. Мутанты из Гессена 198
4. Мутанты из Москвы 199
5. Мутанты из Бетезды 199
6. Заключение 200
В. Фенотипический анализ температурочувствительных мутантов . . . . . .
1. Предназначенность полипептидов относительно сегментов РНК 201
2. Мутанты с ts-повреждениями в сегменте 1 РНК . . . 202
а) Активность транскриптазы вирионной РНК . . . 203
б) Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы экстрактов инфицированных клеток 205
в) Синтез вируспецифической РНК in vivo 206
г) Синтез вируспецифических полипептидов . . . 210
д) Заключение 212
3. Мутанты с повреждениями в сегменте 2 РНК . . . 214
а) Активность вирионной транскриптазы 214
б) Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы в экстрактах инфицированных клеток 215

в) Синтез вирусспецифической РНК in vivo 216
г) Синтез вирусспецифических полипептидов . . . 218
д) Заключение 218
4. Мутанты с повреждениями в сегменте 3 РНК . . . 219
а) Активность транскриптазы вириона 220
б) Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы в экстрактах инфицированных клеток 220
в) Синтез вирусспецифической РНК in vivo 220
г) Синтез вирусспецифических полипептидов . . . 221
д) Заключение 222
5. Мутанты с ts-повреждениями в сегменте 4 РНК . . 223
6. Мутанты с ts-повреждениями в сегментах РНК, кодирующих нуклеопротеид 224
а) Активность транскриптазы РНК 224
б) Синтез вирусспецифической РНК in vivo 225
в) Синтез вирусспецифических полипептидов . . . 226
г) Заключение 226
7. Мутанты с ts-повреждениями в сегменте РНК, кодирующем нейраминидазу 227
8. Мутанты с ts-повреждениями в сегменте 7 РНК . . 228
9. Мутанты с ts-повреждениями в сегменте 8 РНК . . 230
Г. Вакцины, полученные на основе температурочувствительных мутантов 232
IV. Холодоадаптированные мутанты 233
V. Мутанты круга хозяев 235
А. Неусловные мутанты круга хозяев 235
Б. Условные мутанты круга хозяев 237
В. Заключение 238
VI. Мутанты, устойчивые к амантадину 238
VII. Общие заключения 239
Список литературы 241

8. Структура дефектных интерферирующих РНК вируса гриппа и их прогениторных генов.—*Д. Нейяк, Н. Сивасабраманьян (D. Nayak, N. Sivasubramanian)* 249
I. Введение 249
II. Свойства ДИ частиц вируса гриппа 249
III. РНК ДИ частиц вируса гриппа 250
IV. Структура генов и белков полимеразы 252
А. Последовательность нуклеотидов генов полимеразы . . 252
Б. Первичная структура белков PB1 и PB2 253
В. Предсказанные вторичные структуры белков PB1 и PB2 . 255
V. Структура ДИ РНК 258
А. Классы ДИ РНК 258
Б. Полные последовательности нуклеотидов ДИ РНК . . . 260
VI. Генерирование ДИ РНК из прогениторных РНК 261
VII. Транскрипция ДИ частиц вируса гриппа 266
VIII. Интерференция ДИ вирусами гриппа 268
IX. Заключение 269
Список литературы 269

9. Вирусы гриппа В и гриппа С. *Г. Эйр, Р. Компанс (G. Air, R. Compans)* 272
I. Введение 272
II. Вирус гриппа В 272
А. Разновидность РНК вируса гриппа В 272
Б. Белки вируса гриппа В 274
1. Гемагглютинин 276
2. Нейраминидаза 277
3. Матричный белок 279
4. Неструктурные белки 281
5. Белки Р 281

В. Репликация вируса гриппа В 281
Г. Эпидемиология 282
Д. Антигенная изменчивость вирусов гриппа В 283
III. Вирус гриппа С 285
А. Структура вируса 285
1. Морфология вирионов 285
2. Разновидности вирусной РНК 286
3. Вирусные полипептиды 287
4. Активности слияния и гемолиза 289
5. Фермент, разрушающий рецептор 289
Б. Репликация вируса гриппа С 290
В. Генетика и эпидемиология 291
Список литературы 293

10. Различия в патогенезе гриппозной инфекции, зависящие от вируса.—*Дж. Шульман (J. Schulman)* 296
I. Введение 296
II. Методы 297
III. Различия биологических свойств, связанные с гемагглютинином 299
IV. Вирулентность для цыплят 301
V. Нейровирулентность для мышей 303
VI. Вирулентность для других экспериментальных животных . 304
А. Хорьки 304
Б. Крысы 304
В. Мыши 305
VII. Вирусзависимые различия в других системах 307
А. Культуры клеток 307
Б. Выращивание вируса в эмбрионах 307
В. Чувствительность к амантадину 307
VIII. Вирулентность для человека 308
IX. Резюме 310
Список литературы 310

11. Молекулярная эпидемиология вируса гриппа.— *П. Пейлиз, Дж. Юнг (P. Palese, J. Young)* 313
I. Введение 313
II. Вирусы гриппа А, В и С и связанные с ними заболевания . 313
III. Грипп в XX столетии 314
IV. Надзор за вирусами гриппа 316
V. Вирусы H1N1, появившиеся в 1977 г. 317
VI. Молекулярная эпидемиология гриппа у животных . . . 318
VII. Механизмы, влияющие на изменчивость полевых штаммов вирусов гриппа 319
А. Точечные мутации 320
Б. Рекомбинация 323
В. Делеции/вставки 325
Г. Повторное появление старых генов 326
VIII. Перспективы на будущее 326
Список литературы 327
Предметный указатель 329

1

Перспективы развития генетики вируса гриппа

Э. Кильбурн (E. Kilbourne)

I. Введение

На протяжении истории человечества среди людей не раз возникали заболевания в результате мутаций в гемагглютинине вирусов гриппа А. Клинические и эпидемиологические черты прошлых и современных эпидемий очень похожи. Это наводит на мысль что минувшие эпидемии были вызваны антигенно отличающимися вирусами, подобно современным штаммам, изучаемым в настоящее время. Такое предположение подкрепляется серологическими и недавно полученными молекулярно-генетическими доказательствами возвращения, или рециркуляции, вариантов вируса, которые существовали в прошлом. Таким образом, современное изучение генетики вирусов гриппа имеет не только ретроспективное, но и прогностическое значение для оценки этого рециркулирующего вируса.

В то время как варианты других человеческих вирусов в результате эволюции трансформировались в многочисленные разновидности, варианты вирусов гриппа А, известные своей изменчивостью, с трудом сосуществовали в человеческой популяции. Вследствие этого лишь один или два основных варианта вызывали заболевания в отдельные годы, причем такие «подтипы» выживали на протяжении одного-трех десятилетий. Подобная ускоренная эволюция вируса, обреченного на быстрое исчезновение по мере нарастания иммунитета у населения, объясняет исключительность гриппозной инфекции и трудности ее предупреждения. В отличие от других заболеваний генетика вируса гриппа позволяет понять патогенез и эпидемиологию данной инфекции.

Генетика вируса гриппа возникла скорее не как формальная генетическая система, а как попытка определить и понять практические проблемы, касающиеся непрерывного антигенного изменения вируса, способного как к пандемическим «взрывам», так и к «дремлющей» эпидемичности. Предстоит еще объяснить и парадокс меняющейся болезни, вызываемой изменяющимся вирусом [57, 58]. Эта загадка сейчас поддается разрешению посредством определения консервативных последовательностей аминокислот и вариабельных участков в ключевых структурных белках вируса [1, 24, 25, 45].

Поскольку интенсивность изучения вирусов постоянно нарастает благодаря непрерывному совершенствованию биохимических и иммунологических методов, очевидная уникальность антигенной изменчивости вируса гриппа и его кажущаяся гипермутабельность могут быть подвергнуты сомнению. Недавно получены доказательства того, что вирус бешенства [68], полиовирус [86] и другие РНК-содержащие вирусы [39] претерпевают различные антигенные изменения. Тем не менее только при гриппе непрерывное появление мутантов отчетливо влияет на эпидемиологию болезни.

II. Развитие современной генетики вируса гриппа

A. Первые лабораторные доказательства генетической изменчивости

Вскоре после первичного выделения вирусов гриппа А было обнаружено, что последовательные пассажи вируса в организме экспериментальных животных приводят к появлению вирусов, обладающих усиленной вирулентностью для этих лабораторных животных. Такая «адаптация», традиционно применявшаяся в первый период развития вирусологии, когда вирус размножали только в организме интактных животных, очевидно, представляет собой селекцию генетических вариантов вируса, лучше приспособленных для репликации в новом и необычном хозяине. Несколькими годами позже была расшифрована плейотропная природа некоторых таких мутаций: обнаружено, что «адаптированный» вирус взаимодействует с ингибиторами гемагглютинации совсем не так, как оригинальный штамм [12]. И наоборот, было показано, что вирулентность (в отношении легочной ткани мышей) штаммов, никогда ранее не пассировавшихся на мышах, может развиться во время пассажей в аллантоисной полости куриного эмбриона с мукопротеиновым ингибитором. Еще раньше F. Burnet и D. Bull [17] обнаружили при пассаже в куриных эмбрионах появление вируса D (дериватного), способного размножаться в аллантоисной полости. Этот вирус возник в результате изменения оригинальной (O) формы вируса, способного размножаться только в амнионе. В соответствии со своей плейотропностью D-формы вируса более интенсивно поражают легкие мышей и агглютинируют куриные эритроциты.

Ретроспективно можно сказать, что эти ранние наблюдения свидетельствовали о важности взаимодействия гемагглютинина с рецептором при установлении вирулентности и четко демонстрировали генетическую гетерогенность популяции вирусов гриппа, с которой работали в лаборатории. Формальные доказательства этого явления были впервые представлены A. Isaaks и M. Edney [42], которые использовали для клонирования лабораторных штаммов метод предельных разведений. Этот метод, «предназначенный для

получения достоверного статистического доказательства того, что инфекция вызвана единичной вирусной частицей», был чем-то вроде «качающегося краеугольного камня изучения генетики вируса гриппа» [49] вплоть до появления метода бляшек. Первые исследования вирусной изменчивости были проведены на неклонированных вирусах.

Антигенную изменчивость выделенных штаммов вируса распознали уже спустя несколько лет после открытия вируса. Среди ранних штаммов вирусов типа H1 (WS и PR8—классические первые штаммы вируса гриппа А из Старого и Нового Света) были обнаружены штаммы, антигенно отличающиеся, но близкие к свиному вирусу (штамм Shope), выделенному в 1931 г. [41]. Существенные антигенные изменения, имевшие значение для всего земного шара, произошли в 1946—1947 гг., когда появился так называемый штамм А-прим, который в 1977 г. вновь начал циркулировать среди людей.

Б. Применение традиционных генетических методов для изучения вируса гриппа

Примечательно, что в течение 1949—1971 гг., предшествовавших разработке адекватных для вирусов гриппа методов бляшек, были описаны все основные важные явления генетики вируса гриппа. Этот успех в значительной степени был обусловлен, во-первых, успешным культивированием вируса в куриных эмбрионах [15, 115] и, во-вторых, открытием вирусной гемагглютинации [35, 82]. Аллантоисная полость не эквивалентна культуре клеток по обеспечению значительных количеств генетически определенных клеток в системе in vitro. Тем не менее в аллантоисном мешке куриного эмбриона имеется монослой эндотермальных клеток, каждая из которых может продуцировать от 500 до 1400 вирусных частиц [40]. Аллантоисная мембрана восприимчива к большинству вирусов гриппа независимо от того, в какой системе их пассировали ранее. Гемагглютинация представляла собой систему, непригодную для изучения генетики вирусов бактерий; гемагглютинация позволяет определять число вирусных частиц в физических или биологических единицах in vitro. В этой системе могут определяться признаки вирусов, проявление которых не зависит от их репликации. Наиболее подходящие генетические маркеры, использовавшиеся в раннем периоде изучения генетики вируса гриппа, определялись in vitro непосредственно или опосредованно с помощью реакции гемагглютинации.

Однако самым важным по сравнению с этими несколько ограниченными методологическими успехами была интеллектуальная ориентация таких исследователей, как F. Burnet, G. Hirst, W. Henle и F.. Horsfall, которые созпавали инициирующую роль генетики микробов и количественной биологии и стремились найти сравнимые явления для этих вирусов животных. Таким образом, рекомбинация, в настоящее время определяемая более пра-

вильно как генетическая пересортировка (reassortment), была открыта F. Burnet и P. Lind [18] при изучении явлений интерференции, впервые отмеченных у вирусов животных на интактных животных. Спустя 2 года W. Henle и O. Liu [33] описали множественную реактивацию вирусов гриппа A и B как явление, аналогичное множественной реактивации Т-бактериофага (обзор этих материалов см. в работе [120]), при которой происходила комплементация между частично инактивированными вирусными частицами одного штамма. Этот факт, первоначально подвергнутый сомнению, был подтвержден исследованиями с использованием одного цикла заражения [5, 6] или добавлением кортизона [47], которые значительно усилили реактивацию по неясным до сих пор причинам, возможно, связанным с подавлением вирусной аутоинтерференции [48].

B. Генетические маркеры

Неопределенность многих ранних экспериментов по генетике вирусов гриппа (а также некоторых более поздних исследований) можно объяснить вынужденным использованием неполных генетических маркеров. Поскольку вирусология животных возникла на основе ее первоначальной тесной связи с патологией, были все основания надеяться на маркеры, связанные с патогенностью вируса для экспериментальных животных. Полигенная природа таких явлений, как консолидация легочной ткани у мышей, была расшифрована впервые F. Burnet — пионером в этой области. Оказалось, что необходима серия мутаций для адаптации вируса к репликации в легких мышей и последующего развития множественных легочных поражений [20]. Из маркеров вирулентности наиболее пригодным оказался маркер нейровирулентности, выявляемый двумя независимо полученными мутантами оригинального штамма WS—NWS [118] и WS—N [31]. Однако этот маркер также оказался полигенным [49; см. также далее обсуждение проблемы вирулентности].

Все маркеры, выраженность которых зависит от вирусной репликации, включая размеры бляшек и морфологические особенности, представляют собой объект фенотипической изменчивости. Лучшие из маркеров, зависящих от репликации, условны в своей экспрессии и обладают рестрикционными помехами (примерами могут служить температурочувствительные — ts- и холодоадаптированные — ca-мутанты, а также мутанты, зависимые от хозяина).

Как и ряд других вирусов, вирусы гриппа обладают маркерами, хорошо выявляемыми in vitro методами, основанными на определении биологических активностей двух поверхностных гликопротеидов — гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). Более того, антигенность HA — наиболее постоянный и полезный применяемый маркер, несмотря на его вариабельность в естественных условиях. Минимальные антигенные изменения не снижают ценности экспериментов, проведенных с вирусами, обладающими HA раз-

личных подтипов. Сочетание серотипа НА и морфологии вируса (сферической или нитчатой) обеспечило возможность использования оригинального и убедительного маркера генетической рекомбинации [64]. Следует указать, что ранние работы по генетике вируса гриппа критически оценивались «классическими» генетиками, изучающими микроорганизмы. Они не были подготовлены к выявлению высокой частоты рекомбинаций, которая характерна для вирусов с сегментированным геномом, и не питали особой надежды на сложные вирусные маркеры, которые смогли бы заменить широко используемые. Парадоксально, но именно вирусы гриппа были первыми вирусами животных, у которых была выявлена четкая рекомбинация, невзирая на первоначальное отсутствие хороших бляшкообразующих систем и эффективных методов клонирования и селекционирования рекомбинантного потомства. Нет сомнения, что характерная для вируса гриппа высокая частота генетической пересортировки позволила выявить «рекомбинацию» даже при таких условиях. Именно F. Burnet и G. Hirst распознали, что подобная аномальная частота генетического взаимодействия не может быть логически объяснена как реакция кроссинговера и требует нешаблонного объяснения. F. Burnet отнес это явление к «перераспределению генов вирулентности» и к возможности включения геномом «вариабельного количества генетических детерминант» [16]. G. Hirst постулировал «обмен большими частями» (генома) при рекомбинации, происходящий с высокой частотой [36].

Г. Развитие методов бляшек

Разработка метода бляшек для вирусов гриппа в клетках фибробластов куриного эмбриона (CEF) [111; 117] позволила идентифицировать одношаговые мутанты и установить частоту реверсии [117]. Она привела также к подтверждению более ранних исследований по кросс-реактивации вируса, инактивированного УФ-лучами [4, 19, 32, 64], и, что особенно важно, к основанию методов клонирования некоторых бляшкообразующих штаммов вируса [111]. Позднее использование перевиваемых человеческих клеточных линий расширило перечень вирусов, для изучения которых можно было применять метод бляшек и готовить рекомбинанты, различающиеся по типу образующихся бляшек [121, 122]. Только значительно позднее было установлено, что загадочная неспособность вирусов гриппа образовывать бляшки обусловлена главным образом необходимостью обязательного расщепления вирусного НА эндогенными протеазами клетки хозяина, без чего невозможны инфицирование клетки и репликация вируса [67, 76]. Возможность применения только тех нескольких вирусов (в основном WSN и NWS — вариантов оригинального штамма WS), которые образовывали отчетливые бляшки, значительно ограничивала проведение генетических экспериментов. К настоящему времени установлено, что образование бляшек вирусом WSN, по крайней мере

в одной клеточной культуре (МСВК), зависит от NA вируса WSN [108]. Как правило, способность вируса формировать бляшки полигенна и находится под влиянием фенотипических признаков (например, зависит от действия клеточных или экзогенных протеаз). Тем не менее генетика вируса гриппа определенно «достигла совершеннолетия» благодаря развитию метода бляшек.

Д. Использование условных летальных мутантов

Несмотря на высокую частоту рекомбинаций вирусов гриппа, наблюдаемую при смешанной инфекции и в экспериментах по кросс-реактивации, разработка генетической карты генома вируса гриппа сдерживается нехваткой одношаговых мутантов, имеющих хорошо селекционированные маркеры. Успех B. Burge и E. Pfefferkorn [14] с температурочувствительными (ts) мутантами вируса Синдбис побудило R. Simpson и G. Hirst [112] выделить подобные мутанты вируса гриппа для изучения рекомбинации и комплементарности. Ранее F. Fenner обратил внимание на широкие перспективы использования условных летальных мутантов при изучении генетики вирусов животных [29].

Параллельно установлению наличия семи рекомбинационно-комплементарных групп у вирусов гриппа А в различных системах вирус—клетка [37, 112, 116, 123, 125] накапливались физико-химические доказательства сегментированности РНК вирионов гриппа [26, 92]. Возникло не совсем безрассудное предположение, что каждый участок РНК представляет источник моноцистронного сообщения для каждого предполагаемого вирусного белка. В ряде случаев методами генетики и биофизики было показано, что картирование генома при помощи обычного генетического приема — измерения рекомбинационных частот между мутантами — оказывается невозможным для вируса, у которого не выявляются интрацистронные рекомбинации. Было предсказано появление картирования нового типа (см. далее), которое будет способствовать значительному прогрессу в исследованиях вируса гриппа. Нельзя сказать, что такой условный генетический подход не позволил получить в дальнейшем ценной информации. Мутанты, зависящие от хозяина, обеспечили возможность изучения маркеров [124]. Опыты по трехфакторному скрещиванию двух ts-мутантов продемонстрировали отсутствие связи между маркерами и высокой (40—42,5%) частотой рекомбинации [85]. И, что особенно важно, эти эксперименты исключили главенствующую роль неполных гетерозигот в формировании бляшкообразующих единиц и согласовывались с неслучайным механизмом упаковки при сборке вирусных генов. Однако были представлены некоторые доказательства существования частично гетерозиготных вирусов [102]. Генетические доказательства интрацистронной рекомбинации, затрагивающей белок нуклеокапсида, были дополнены данными биохимического анализа [97]. Появились сообщения о внутрисегмент-

ной комплементарности [80], а также об экстрагенной супрессии авирулентности, что подчеркнуло трудности разработки живых вирусных вакцин [83].

Е. Новые подходы в генетике вируса гриппа

1. Биохимическая идентификация продуктов вирусного гена при нечетком определении вирусного потомства

Использование маркеров, экспрессия которых зависит от вирусной репликации (включая морфологию бляшек), во всех генетических исследованиях приводит к получению нечетких результатов, зависящих от условий внешней среды или фенотипических изменений вируса. Вот почему в ранних стадиях изучения генетики вируса гриппа особую надежду возлагали на свойства вируса, выявляемые in vitro, такие как термоустойчивость или (преимущественно) антигенная активность. Возможно, из-за того, что антигенные маркеры обычно определяли при помощи относительно малоспецифичной реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и поскольку не принималось во внимание отсутствие связи между НА и нейраминидазной активностью, антигенный маркер считали единым признаком. Однако G. Hirst и T. Gotlieb [38] выделили устойчивый рекомбинантный вирус X3, кроссреактивный с антисыворотками к обоим родительским вирусам в РТГА и реакции нейтрализации. Независимо друг от друга несколько исследователей [65, 127] получили четкие антигенные гибриды при скрещивании различных родительских вирусов, в том числе вирусов разных подтипов. Один из этих рекомбинантов (X7), идентифицированный в РТГА, как подобный родительскому штамму NWS, тщательно исследовали и при помощи штаммоспецифических комплементационных тестов, уменьшения размеров бляшек и результатов иммунизации мышей было показано, что он содержит антиген вируса RI/5$^+$(H2N2) [44, 62, 65]. Было отмечено, также, что X7 обладает высокой нейраминидазной активностью, характерной для родительского штамма с формулой H2N2. В то время W. Laver опубликовал свои данные по разделению структурных белков вируса гриппа (включая NA) методом электрофореза на ацетате целлюлозы [70], и я привлек его к работе по определению антигенных компонентов вируса H2N2. Нам удалось показать, что вирус X7 действительно содержит НА штамма NWS и NA штамма RI/5$^+$, а методом пептидного картирования мы определили, что NP приобретен от вируса NWS.

Таким образом, даже при помощи этих относительно простых методов и в соответствии со сделанными раннее выводами W. Laver [71] были обнаружены различия во внутренних вирусных белках между вируспыми штаммами [73]. Эти наблюдения крайне важны для четкой идентификации биохимическими методами природы генных продуктов, содержащихся в предположительно рекомбинантном вирусе. По мере совершенствования электрофоре-

тического разделения белков в полиакриламидном геле (ПААГ) стало возможным дифференцировать семь вирионных и (первоначально) один неструктурный белок [60]. Когда при электрофорезе в ПААГ выявили также восемь РНК, оказалось, что каждый сегмент РНК представляет собой ген, с которого транскрибируется одна мРНК для трансляции одного вирусного белка.

2. Картирование генома вируса гриппа коррелятивными физико-химическими и биологическими методами

При сравнении двух человеческих вирусов гриппа А разных подтипов P. Palese и I. Schulman сделали важное открытие, что семь из восьми РНК двух вирусов — A/PR/8/34 (H1N1) и A/Hong Kong/8/68 (H3N2) — мигрируют в ПААГ с разными скоростями [89]. Когда готовили рекомбинанты этих вирусов, то селекция с помощью антисывороток, специфически ингибирующих тот или другой антиген — НА или NA, позволила выделить антигенно соответственные вирусы (PR8-НК и НК-PR8) по их НА и NA. Обработка донора НА УФ-лучами, проведенная до смешанной инфекции, благоприятствовала селекции асимметричных реассортантов, содержащих все гены необлученного родителя, за исключением гена НА. Далее при сравнении электрофореграмм вирусных родителей и антигенно-гибридного потомства вирусов было показано, что только четвертая наибольшая РНК гибрида НК-PR8 отличалась от такого же участка родителя PR8, но соответствовала этому же участку РНК родителя НК. Справедливо и обратное утверждение относительно PR8-НК реассортанта по сравнению с вирусом Hong Kong. Кроме того, молекулярная масса 4-го сегмента РНК согласовывалась с кодирующей емкостью для белка с м.м. от 70 000 до 80 000, что соответствует размерам белка НА. Убедительные доказательства соответствия этого сегмента РНК и антигенно-идентифицированного НА были получены при подобном анализе обратных рекомбинантов, идентичных по серотипу НА и NA родительскому вирусу (т. е. не антигенных гибридов, а переассоциированных с исходными NA). При исследовании этих обратных рекомбинантов, содержащих только два дериватных фрагмента РНК от родителя с идентичным серотипом, можно было установить местонахождение гена NA у каждого вируса.

Эти эксперименты не только имели значение для становления метода, позволяющего проводить картирование других вирусных генов, но и подтвердили действительно перераспределительную природу рекомбинации вируса гриппа, характеризующуюся возможностью асимметричного вклада родительских генов. Более детально это положение было доказано результатами другого исследования [107]: облучение одного из родительских вирусов также приводило к уменьшению генетического вклада этого родителя. Ранее избирательное воздействие инактивации эмпирически использовалось при селекции высокопродуктивных рекомбинантных вирусов с применением селективной антисыворотки [66] или без нее [64].

И еще одно важное положение было выдвинуто P. Palese и J. Schulman — об отсутствии точного соответствия между размером сегмента РНК, оцененным на основании его локализации в геле, и белком, предположительно кодируемым соответствующим сегментом мРНК. Так, 5-й сегмент РНК вируса Hong Kong и 6-й сегмент вируса PR8 были идентифицированы как гены NA. Позднее при разделении генов для изучения внутренних белков, когда предметом исследования была не собственно антигенная идентификация, а определение белков в гелях, исследователи неожиданно столкнулись с другим проявлением отсутствия прямого соответствия РНК и белка. 1-й сегмент РНК был идентифицирован как ген для белка P3 (PB2), в то время как 2-й сегмент РНК представлял собой ген для белка P1 (PB1), а 3-й сегмент РНК — для белка P2 (PA). Картирование генов для белков с неидентифицированной биологической активностью зависело от разработки метода электрофореза в градиентном геле, когда могли быть выявлены характерные вирусспецифические различия в миграции большинства вирусных белков [96]. Ранее были обнаружены штаммоспецифические различия только в миграции белков НА вируса гриппа В при использовании обычных гелей [126].

Для завершения картирования необходимы были выводы, основанные на размере РНК-белка. Однако не было получено подтверждающих данных ни при исследовании трансляции мРНК in vitro [95], ни при олигонуклеотидном картировании изолированных сегментов РНК [138], ни при пептидном картировании белков или при секвенировании РНК (обзор этих материалов см. в работе [132]), когда достаточная консервативность структуры позволяет легко идентифицировать ген или продукт гена как M, NP или NS. Окончательные доказательства были получены только после изучения генного клонирования и экспрессии (см. главу 6).

3. Применение методов молекулярной биологии для изучения вирусных генетических изменений

W. Laver и R. Webster [74] были пионерами в применении пептидного картирования для изучения вирусных гликопротеинов мажорных (шифтовых) и минорных (дрейфовых) антигенных вариантов вирусов гриппа. Действительно, на основании результатов их исследований была подтверждена значительность расхождений, заметных при антигенном анализе, и показаны существенные различия природы дрейфовых и шифтовых антигенных изменений [131]. Более того, подобный подход позволил выявить различия во внутренних белках [132]. Это свидетельствует о том, что изменения не ограничены только поверхностными антигенами вируса гриппа.

4. Олигонуклеотидное картирование вирусных РНК

Подобно пептидному картированию продуктов гена, олигонуклеотидное картирование вирусных генов является удобным методом выявления сходства и различий (мутаций) между вирусами, осо-

бенно если его результаты коррелируют с установленными последовательностями оснований РНК [138]. Этот метод больше всего пригоден для установления различий между близкородственными генами с высокой степенью гомологии пар оснований — более 90%. Данный метод позволяет получить ценные результаты при анализе вирусных изменений и рекомбинаций, происходящих в естественных условиях.

5. Роль секвенирования белка и РНК в генетике вируса гриппа — внутригенное картирование

В таком сжатом и выборочном обзоре можно только упомянуть о несомненно важном вкладе секвенирования (вначале белков, позднее РНК и ДНК) в процесс познания генома вируса гриппа и его продуктов, особенно НА. Эта основополагающая информация позволила провести не только интрацистронное картирование мутантов НА при помощи анализа триптических пептидов [72], но и первоначальную идентификацию антигенных сайтов [72, 78, 113, 134] в связи с селективным использованием моноклональных антител (см. главы 2, 4 и 5).

III. Вирусная генетика и понимание вирулентности и патогенности вирусов

С учетом сегментированности вирусных геномов избирательная пересортировка генов обеспечивает тонкий метод идентификации генов, определяющих такое сложное явление, как вирусная вирулентность, т. е. способность вируса нанести вред хозяину каким-либо образом. Как уже указывалось, самые первые маркеры, использованные для изучения генетики вируса гриппа, включали вирулентность и были в основном полигенными. Неудивительно поэтому, что вирулентность остается каким-то быстро исчезающим явлением, определение которого затруднено даже при использовании доступных сейчас более точных методов идентификации вирусных генов. Проблема генетического выявления вирулентности с помощью перераспределительной генетики — методом «разрезания и склеивания» — включает: 1) возможность появления мутации в пересортированных генах в процессе перераспределения генов или при выделении вируса-реассортанта [21, 27]; 2) приобретение вирусом новых фенотипических признаков вследствие пересортировки генов в другом ключе, т. е. генные констелляции [73, 98]; 3) необходимость точного определения и оценки свидетельств вирулентности, особенно у сложных (интактных) хозяев. Тем не менее были получены существенные результаты, даже несмотря на ограниченные возможности аналитических методов (см. главу 9).

При обсуждении генетического перераспределения как способа изготовления живой аттенуированной вирусной вакцины пред-

сказывалось, что рекомбинантные штаммы из диких (вирулентных) вирусов и лабораторных (авирулентных) штаммов должны быть на основании законов статистики промежуточными по вирулентности между двумя родителями, если предположить, что вирулентность детерминируется несколькими генами и что генетическое перераспределение происходит случайно. В основном это предсказание оказалось справедливым [8, 9, 30, 81, 98, 100, 103, 129], однако при экспериментальном генетическом перераспределении из ненейровирулентных родительских вирусов иногда получали рекомбинанты с высокой нейровирулентностью [104] и, наоборот, непатогенные рекомбинанты возникали из высокопатогенных штаммов [99].

Подобный редукционистический подход привел к идентификации одиночных генов, детерминирующих вирулентность в ограниченных четко установленных лабораторных системах. Однако вирулентность в таких случаях часто определяли на основе бляшкообразования в монослойных культурах [2, 43]. Кроме того, из-за возможных нарушений требования расщепления НА перед инфицированием гемагглютининовые мутанты могут оказаться диаметрально противоположными в том смысле, что они определяют это критическое инициирующее событие как одиночный ген. В свою очередь если природа NA определяет, произойдет ли кливедж, то такой ген может быть ответственным за инициацию вирусной репликации, что приводит к проявлению патогенности [108]. Точечные мутации, присущие двум температурочувствительным мутантам, аттенуируют вирус, заражающий человека [79], а мутация в одном гене свиного вируса гриппа (ген НА) плейотропно влияет на антигенность, способность к репликации в куриных эмбрионах и клетках MDCK и инфекционность для естественного хозяина вируса [55, 63].

IV. Взаимосвязь генетики вируса гриппа с эпидемиологией и эволюцией вирусов гриппа (молекулярная эпидемиология)

Идентификация генов НА и NA как отдельных и способных к пересортировке объектов позволила во время пандемии 1968 г. быстро выяснить, что новый вирус Hong Kong содержит новый гемагглютинин (H3) и нейраминидазу (N2), оставшуюся от предыдущего десятилетия [106]. Рассмотрение этого опыта с точки зрения серологического подтверждения рециркуляции антигенов вируса гриппа послужило поводом для введения термина «молекулярная эпидемиология» [53, 56], основанного на очевидности пересортировки генов поверхностных антигенов вирусов гриппа в естественных условиях. В последнее десятилетие, когда все гены вируса гриппа стали доступными для исследования молекулярными методами, было создано настоящее учение о молекулярной эпидемиологии многих вирусов животных. Наиболее детально были изуче-

ны вирусы герпеса [13] и гриппа [87, 88]. Методом РНК-РНК-гибридизации было показано возможное происхождение не только гена NA, но даже едва ли не гена HA вируса H3N2 от предшествующего человеческого вируса H2N2 [101]; ген HA появился, по-видимому, от животных за счет пересортировки [28, 75, 101, 128].

Появляется все больше свидетельств того, что пересортировка происходит не только у вирусов гриппа животных [24, 131], но также и в организме человека [7, 136]. Не меньший интерес представляют результаты олигонуклеотидного картирования, свидетельствующие, что человеческий вирус H1N1, внезапно появившийся в 1977 г., очень близок к вирусу, который циркулировал в начале 50-х годов [84]. Исследования этого нового, неожиданно появившегося вируса во время его распространения в Китае, — вероятно, он возник в этой стране — навели на мысль о последовательных мутациях в вирусе, причем последние штаммы возникли в результате расходящейся эволюции от общих предков [136].

А. Генетическое перераспределение в природе и его роль в эволюции новых вирусов

Представлялось заманчивым установить связь между необычной эпидемиологией гриппа и поразительной способностью вируса подвергаться генетической пересортировке в лаборатории. Первые предположения, что новые мажорные варианты, ассоциированные с пандемиями, могут появляться в результате рекомбинации вирусов человека и животных [50, 53, 94, 129], в дальнейшем получили существенное подтверждение. R. Webster и соавт. представили экспериментальные доказательства генетического перераспределения у вирусов свиньи, птиц и человека, которое может происходить при наличии соответствующих контактов, имитирующих естественные условия [130]. Кроме того, пестрая смесь антигенов HA и NA, обнаруженная в природе, особенно среди вирусов птиц, вместе с данными об относительно часто случающейся двойной инфекции [34] показывают, что существующие естественные условия подходят для генетического перераспределения. Олигонуклеотидный анализ двух выделяемых от птиц штаммов (Hav6N2 и Hav6Nav4) показал, что они обладают почти идентичными генами M и NA, а другие гены значительно отличаются. Было сделано заключение, что эти вирусы появились, скорее всего, в результате рекомбинации [24].

Вплоть до 1976 г. не наблюдалось совместной циркуляции нескольких подтипов вируса гриппа A у человека. Во время сильной вспышки гриппа в Форт-Дикс (штат Нью-Джерси) в 1976 г. были изолированы оба вируса — H1N1 (свиной) и H3N2, но доказательств перераспределения между этими штаммами методом генотипирования вирусной РНК при электрофорезе в ПААГ получено не было.

Однако длительная совместная циркуляция «русского» H1N1 и H3N2 вирусов у людей в последовавшие годы привела к появлению двойной инфекции [46] и к возникновению вирусов-реассортантов с отчетливой эпидемической потенцией [7, 137].

Б. Генетика минорной изменчивости

Минорная изменчивость вирусов гриппа во время пандемических периодов является результатом последовательных точечных мутаций в вирионной РНК [11, 54, 72, 136], которые приводят к антигенным изменениям в HA и NA [106] и, возможно, к некоторым изменениям во всех вирусных белках [90]. По-видимому, не только антигенная изменчивость необходима для выживания вируса [57]; несомненно, происходит и трансформация вирулентности по отношению к человеку, хотя оценить эти изменения довольно трудно [110].

При олигонуклеотидном картировании геномной РНК было выявлено от двух до четырех нуклеотидных изменений у всех исследованных штаммов в течение 2-месячного периода в пределах локальной эпидемии. У штамма, выделенного в этом же городе годом позже, было отмечено 25 изменений по сравнению с референс-штаммами, описанными в 1976 г. [88]. В течение 10 лет внутрипандемического развития олигонуклеотидное картирование только гена HA пяти штаммов позволило выявить нуклеотидные изменения в 0,96—3,4%, причем со временем частота выявляемых изменений увеличивалась [88]. Изучая кДНК-копии вирионной РНК H3, G. Both и M. Sleigh [10] обнаружили изменения в 36 аминокислотах в пределах четырех вариабельных участков в течение срока, немного превышающего 10 лет после появления этого подтипа.

В. Вирусы гриппа A, B и C

Хотя с самого начала вирусы гриппа A, B и C были классифицированы вместе как вирусы гриппа, или ортомиксовирусы, на основе индуцируемых ими сходных клинических симптомов, сейчас ясно, что различия между этими вирусами выражены в значительно меньшей степени, чем сходства [90]. Все они представляют собой оболочечные вирусы с сегментированным геномом и могут подвергаться генетическому перераспределению [91, 93, 126]. В то же время не обнаружено перераспределений между вирусами различных типов. Тем не менее при сравнении терминальных последовательностей РНК вирусов гриппа A, B и C наблюдается высокая степень гомологии и частичная инвертированная комплементарность последовательностей 5′- и 3′-концов всех генов [25]. В соответствии с эпидемиологическими наблюдениями кДНК-РНК-гибридизационный анализ РНК этих трех типов вируса выявил ослабление степени изменчивости от вирусов гриппа A до вирусов гриппа C [88].

Возможно, в рамках эволюции вирусы гриппа С этих трех типов обладают наиболее облигатной патогенностью для людей. Только недавно было описано заражение животных в естественных условиях [69], а трансмиссия или персистенция вируса у животных не наблюдалась. Не было крупных эпидемий вируса гриппа С среди людей, что связано, вероятно, с относительной авирулентностью этого вируса. Из-за спорадического характера инфекции у детей (без немедленного вовлечения в эпидемический процесс всех детей) вирусы гриппа С могут сохраняться посредством серийных пассажей на восприимчивых лицах без обязательной частой селекции новых антигенных вариантов, требующихся для преодоления гуморального иммунитета, как это имеет место у вирусов гриппа типа А.

V. Практическое применение генетики вируса гриппа

Первым практическим приложением вирусной генетики было конструирование вакцин. Оно последовало за открытием способности лабораторного штамма, адаптированного к продуктивной репродукции на стандартном курином эмбрионе, к генетическому скрещиванию со свежевыделенным плохо растущим вирусом, имеющим необходимые антигенные характеристики, с последующим образованием высокоурожайного реассортанта [64].

Ни ведущие специалисты по проблеме гриппа, ни производители вакцины не смогли сразу принять этот новый подход для быстрого изготовления вакцинных штаммов с помощью генетических манипуляций. Только в 1971 г. штамм X31, рекомбинант PR8 и A/Aichi/68 (H3N2), прошел обширные испытания на добровольцах [22] и в полевых опытах [77], после чего был использован для производства коммерческой вакцины [3]. В последующих экспериментах серологически было доказано, что этот первый генетически сконструированный вакцинный вирус содержал гены гликопротеинов H3N2, а все остальные гены — от исходного штамма PR8 [3], и что все другие высокопродуктивные вакцинные штаммы, генотипированные методом РНК-электрофореза, получили от штамма PR8 по крайней мере ген М.

Исследуя рекомбинанты вирусов PR8 и Hong Kong (HK), J. Schulman и P. Palese [109] обнаружили, что гены белка М и NP от PR8 должны быть связаны с высокой продуктивностью вируса. Фактически все вакцинные вирусы гриппа А готовят сейчас путем генетического перераспределения новых вирусов и вирусов PR8 или X31.

Генетическое перераспределение было также использовано для передачи определенных температурочувствительных (ts) или са-повреждений живым вирусным вакцинным штаммам [119]. В этом случае, конечно, предварительные генетические манипуляции приводили к выделению и изучению соответствующих ts- или са-мутантов.

Высокопродуктивные реассортанты вирусов гриппа, обладающие заданными генами НА и NA, были с успехом использованы для биохимических исследований. Это хорошо видно на примере вируса X31, который использовали в качестве источника получения больших количеств НА и РНК для изучения белкового состава и последовательностей оснований, а совсем недавно — для определения ультраструктуры молекулы НА [135].

Антигенные гибриды оказались полезными, во-первых, для изготовления моноспецифических антисывороток в том случае, когда НА или NA иммунизирующего вируса соответствует только одному или другому антигену исследуемого вируса [61]. Подобные гибриды позволяли также проводить физическое разделение антигенов, что было невозможно при использовании родительского вируса, содержавшего эти антигены в инкорпорированном виде [73].

Антигенные гибриды использовали также для индуцирования специфического по отношению к NA пермиссивного иммунитета у человека, что явилось новым подходом к вакцинации против гриппа [23].

VI. Специальная генетика вирусов с раздробленным геномом в связи с проблемами гриппа

Пять различных групп РНК-содержащих вирусов животных имеют раздробленные, или сегментированные, геномы, включая такие непохожие прототипы, как вирусы Х дрозофил, болезни синего языка, группы Буньямвера и инфекционного некроза поджелудочной железы [59]. Возможно, такие вирусы имели существенное эволюционное и адаптивное преимущество перед другими вирусами, конкурирующими в пределах тех же экосистем. Изменения этих вирусов не лимитировались частотой мутаций; они имели доступный и обширный пул генов, переносимый родственными вирусами, с которыми они могли осуществлять генетическое перераспределение. В отношении вирусов гриппа А таким генетическим резервуаром являются определенные домашние животные и дикие птицы. Из этого огромного фонда могут непрерывно отбираться образцы генных комбинаций, оптимальных по вирулентности, трансмиссивности и антигенному соответствию до такой степени, что время от времени может происходить внутриспецифический перепос вирусов [51, 56].

Генетическое перераспределение при исследовании новых мутантов в различных аспектах обеспечивает механизм, аналогичный половой репродукции. Как уже отмечалось, чем в большей степени выражены изменения в популяции, возникающей в результате неполового размножения, тем меньше вероятность, что такая мутация является частью лучшего генотипа. Половое размножение (или перераспределение) позволяет проверить мутацию по многим генотипам и проводить селекцию согласно ее среднему

вкладу в приспособленность в большей степени, чем по приспособленности генотипа, если он возник [114]. Таким образом, первичный результат генетического перераспределения представляет собой одновременную фиксацию различных благоприятных мутаций в новом вирусе. J. Smith [114] указывал также, что при интенсивной селекции популяции, размножающиеся половым путем (в качестве аналогов можно назвать гетерогенные вирусы-реассортанты), эволюционируют значительно быстрее, чем популяции, не размножающиеся таким путем (имеются в виду неперераспределяющиеся вирусы).

Генетическое перераспределение, конечно, не дает ясного ответа на вопрос о прогрессивных минорных антигенных изменениях вирусов гриппа в природе. Тем не менее оно может обеспечить возрастание de facto частоты мутаций за счет спасения потенциально утраченных мутационных возможностей в неинфекционных частицах путем их инкорпорирования посредством эндогенной рекомбинации и восстановления полицикличной инфекции в вирионах. Таким образом должен быть создан обширный мутационный фонд, который сможет увеличивать благоприятные возможности для селекции полезных мутаций — антигенных или каких-либо иных [52, 59].

Новым аспектом в эволюции являются сохраняемые в лабораторных условиях запасы предположительно вымерших вирусов, исчезнувших в природе. Латентный механизм персистенции вирусов гриппа в природе неизвестен, но изолированные гены, возможно, сохраняют свою инфекционную потенцию вплоть до последующего поиска или включения в пересортированные вирусы. С помощью этой теории трудно объяснить вторичное появление в 1977 г. вируса H1N1, геном которого кажется почти идентичным геному штамма, циркулировавшего в начале 50-х годов [84]. В любом случае, если считать, что сохранение этих штаммов в лабораторных условиях является потенциальной частью общего экологического резервуара вируса, пул генов вируса гриппа простирается на другой период времени, включая все вирусы (и гены), выделенные и сохраняемые с 1901 г. [59], когда впервые был выделен вирус чумы птиц (FPV). Однако многочисленные факторы ограничивают роль лабораторий как источников инфекции [53].

VII. Нерешенные проблемы гриппа и генетические подходы к их решению

Хотя грипп остается одной из нерешенных проблем конца XX века вследствие генетических ресурсов самого вируса, вполне вероятно, что эти ресурсы могут быть использованы для борьбы с гриппом и окончательной ликвидации этой инфекции. Выше уже описано использование генетических манипуляций для производства коммерческих и экспериментальных вакцин. Кроме того, секвениро-

вание генов вируса гриппа обещает накопление большого количества ценной информации о природе и взаимоотношениях вирусов. Независимый синтез препаратов отдельных генов позволит изучить их биологические функции и обеспечит понимание их роли в вирулентности и токсичности. Так, модифицированные НА могут быть иммуногенными, но в то же время лишенными какой-либо токсичности. Иммунногенность можно увеличить за счет стерических или других изменений молекулярной структуры, которые могут быть индуцированы посредством синтеза всего гена или его части.

В конечном счете не исключена также возможность замещения вирулентных вирусов в природе высокотрансмиссивными, но авирулентными штаммами. Безусловно, что при этом необходимо одновременно ограничить их взаимодействие с другими вирусами гриппа, находящимися в естественных резервуарах в организме животных.

Список литературы

1. *Air G.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1981, v. 78, p. 7639—7643.
2. *Almond J.* — Nature, 1977, v. 270, p. 617—618.
3. *Baez M., Palese P., Kilbourne E.* — J. Infect. Dis., 1980, v. 141, p. 362—365.
4. *Baron S., Jensen K.* — J. Exp. Med., 1955, v. 102, p. 677—697.
5. *Barry R.* — J. Immunol., 1950, v. 65, p. 571—583.
6. *Barry R.* — Virology, 1961, v. 14, p. 398—405.
7. *Bean W.* — Nature, 1980, v. 284, p. 638—640.
8. *Bean W., Webster R.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. N. Y.: Academic Press, 1978, p. 685—693.
9. *Beare A., Hall T.* — Lancet, 1971, v. 2, p. 1271—1273.
10. *Both G., Sleigh M.* — J. Virol., 1981, v. 39, p. 663—672.
11. *Both G., Sleigh M., Bender V., Moss B.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus. N. Y.: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 81—89.
12. *Briody B., Cassell W., Medill M.* — J. Immunol., 1955, v. 74, p. 41—45.
13. *Buchmann T., Roizman B., Adams G., Stover B.* — J. Infect. Dis., 1978, v. 138, p. 488—498.
14. *Burge B., Pfefferkorn E.* — Virology, 1966, v. 30, p. 204—213.
15. *Burnet F.* — Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1940, v. 18, p. 353—360.
16. *Burnet F.* — Science, 1956, v. 123, p. 1101—1104.
17. *Burnet F., Bull D.* — Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1943, v. 21, p. 55—69.
18. *Burnet F., Lind P.* — Austral. J. Sci., 1949, v. 12, p. 109—110.
19. *Burnet F., Lind P.* — Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1954, v. 32, p. 133—143.
20. *Burnet F., Lind P.* — Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1954, v. 32, p. 711—720.
21. *Campbell D., Sweet C., Hay A. et al.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 58, p. 387—398.
22. *Couch R., Douglas R., Fedson D., Kasel J.* — J. Infect. Dis., 1971, v. 124, p. 473—480.
23. *Couch R., Kasel J., Gerin J. et al.* — J. Infect. Dis., 1974, v. 129, p. 411—420.
24. *Desselberger U., Racaniello V., Zazra J., Palese P.* — Gene, 1980, v. 8, p. 315—328.

25. *Desselberger U., Zamecnik P., Palese P.* — In: Proc. Int. Workshop on Structure and Variation in Influenza Virus, Thredbo, Australia, N. Y.: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 169—179.
26. *Duesberg P.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1968, v. 59, p. 930—937.
27. *Erickson A., Kilbourne E.* — Virology, 1980, v. 107, p. 320—330.
28. *Fang R., Jou W., Huylebroeck D. et al.* — Cell, 1981, v. 2, p. 315—323.
29. *Fenner F.* — In: Perspectives in Virology IV. N. Y.: Harper a. Row, 1965, p. 34—46.
30. *Florent G., Lobmann M., Beare A., Zygraich N.* — Arch. Virol., 1977, v. 54, p. 19—28.
31. *Francis T., Moore A.* — J. Exp. Med., 1940, v. 72, p. 717—745.
32. *Gottlieb T., Hirst G.* — J. Exp. Med., 1954, v. 99, p. 307—320.
33. *Henle W., Liu O.* — J. Exp. Med., 1951, v. 94, p. 305—322.
34. *Hinshaw V., Bean W., Webster R., Siram G.* — Virology, 1980, v. 102, p. 412—419.
35. *Hirst G.* — Science, 1941, v. 94, p. 22—23.
36. *Hirst G.* — Cold Spring Harbor Symp. on Quant. biol., 1962, v. 27, p. 303—309.
37. *Hirst G.* — Virology, 1973, v. 55, p. 81—93.
38. *Hirst G., Gotlieb T.* — J. Exp. Med., 1953, v. 98, p. 53—70.
39. *Holland J., Spindler K., Horodysky F. et al.* — Science, 1982, v. 215, p. 1577—1585.
40. *Horsfall F.* — J. Exp. Med., 1955, v. 102, p. 441—473.
41. *Hoyle L.* — In: Gard S. et al. (eds.). Virology Monographs. Vol. 4. Wien-N. Y.: Springer, 1968.
42. *Isaacs A., Edney M.* — Brit. J. Exp. Path., 1950, v. 31, p. 209—216.
43. *Israel A.* — J. Gen. Virol., 1980, v. 51, p. 33—44.
44. *Jahiel R., Kilbourne E.* — J. Bacteriol., 1966, v. 92, p. 1521—1534.
45. *Jou W., Verhoeyen M., Debos R. et al.* — Cell, 1980, v. 19, p. 683—696.
46. *Kendal A., Lee D., Parish H. et al.* — Amer. J. Epidemiol., 1979, v. 110, p. 462—468.
47. *Kilbourne E.* — J. Exp. Med., 1955, v. 101, p. 437—450.
48. *Kilbourne E.* — J. Exp. Med., 1957, v. 106, p. 863—881.
49. *Kilbourne E.* — Progr. Med. Virol., 1963, v. 5, p. 79—126.
50. *Kilbourne E.* — Science, 1968, v. 160, p. 75—76.
51. *Kilbourne E.* — J. Infect. Dis., 1973, v. 127, p. 478—487.
52. *Kilbourne E.* — J. Infect. Dis., 1973, v. 128, p. 668—670.
53. *Kilbourne E.* — Science, 1974, v. 184, p. 410—411.
54. *Kilbourne E.* — In: The Influenza Viruses and Influenza (Kilbourne E., ed.). N. Y.: Academic Press, 1975, p. 483—538.
55. *Kilbourne E.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1978, v. 75, p. 6258—6262.
56. *Kilbourne E.* — The Harvey Lectures, 1979, v. 73, p. 225—258.
57. *Kilbourne E.* — Phil. Trans. R. Soc. (Lond.), 1980, v. B288, p. 291—297.
58. *Kilbourne E.* — Yale J. Biol. Med., 1980, v. 53, p. 41—45.
59. *Kilbourne E.* — Perspect. Biol. Med., 1981, v. 25, p. 66—77.
60. *Kilbourne E., Choppin P., Schulze I. et al.* — J. Infect. Dis., 1972, v. 125, p. 447—455.
61. *Kilbourne E., Laver W., Schulman J., Webster R.* — J. Virol., 1968, v. 2, p. 281—288.
62. *Kilbourne E., Lief F., Schulman J. et al.* — Perspect. Virology, 1967, v. 5, p. 87—106.
63. *Kilbourne E., McGregor S., Easterday B.* — Infect. Immun., 1979, v. 26, p. 197—201.
64. *Kilbourne E., Murphy J.* — J. Exp. Med., 1960, v. 111, p. 387—406.
65. *Kilbourne E., Schulman J.* — Trans. Assoc. Am. Physicians, 1965, v. 78, p. 323—333.
66. *Kilbourne E., Schulman J., Schild G. et al.* — J. Infect. Dis., 1971, v. 124, p. 449—462.
67. *Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blodorn J.* — Virology, 1975, v. 68, p. 426—439.

68. *Koprowski H., Gerhard W.* — In: Animal Virus Genetics. N. Y.: Academic Press, 1980, p. 591.
69. *Kuo Y., Fengen J., Min W. et al.* — Kexue Tongbao, 1982, v. 27, p. 1118—1121.
70. *Laver W.* — Virology, 1963, v. 20, p. 251—262.
71. *Laver W.* — J. Mol. Biol., 1964, v. 9, p. 109—124.
72. *Laver W., Air G., Dopheide T., Ward C.* — Nature, 1980, v. 283, p. 454—457.
73. *Laver W., Kilbourne E.* — Virology, 1966, v. 30, p. 493—501.
74. *Laver W., Webster R.* — Virology, 1968, v. 34, p. 193—202.
75. *Laver W., Webster R.* — Virology, 1973, v. 51, p. 383—391.
76. *Lazarowitz S., Choppin P.* — Virology, 1975, v. 68, p. 440—454.
77. *Leibovitz A., Coultrip R., Kilbourne E. et al.* — J. Infect. Dis., 1971, v. 124, p. 481—487.
78. *Lubeck M., Gerhard W.* — Virology, 1981, v. 113, p. 64—72.
79. *Massicot J., Murphy B., Van Wyke K., Huan K.-Y.* — Virology, 1980, v. 106, p. 187—190.
80. *Massicot J., Van Wyke K., Chanock R., Murphy B.* — Virology, 1982, v. 117, p. 496—500.
81. *Mayer V., Schulman J., Kilbourne E.* — J. Virol., 1973, v. 11, p. 272—278.
82. *McClelland A., Hare J.* — Canad. Publ. Hlth J., 1941, v. 32, p. 530—538.
83. *Murphy B., Tolpin M., Massicot J. et al.* — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1980, v. 354, p. 172—182.
84. *Nakajima K., Desselberger U., Palese P.* — Nature, 1978, v. 274, p. 334—339.
85. *Nakajima K., Sugiura A.* — Virology, 1977, v. 81, p. 486—489.
86. *Nottay B., Kew O., Hatch M.* et al. — Virology, 1981, v. 108, p. 405—423.
87. *Palese P., Brand C., Young J. et al.* — Virology, 1981, v. 11, p. 115—127.
88. *Palese P., Elliott R., Baez M.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y.: Academic Press, 1981, p. 127—140.
89. *Palese P., Schulman J.* — J. Virol., 1976, v. 17, p. 876—884.
90. *Palese P., Young J.* — Science, 1982, v. 215, p. 1468—1474.
91. *Perry B., Van Den Ende M., Burnet F.* — Austral. J. Exp. Biol., 1954, v. 32, p. 469—478.
92. *Pons M., Hirst G.* — Virology, 1968, v. 34, p. 385—388.
93. *Racaniello V., Palese P.* — J. Virol., 1979, v. 32, p. 1006—1014.
94. *Rasmussen A.* — In: Newcastle Disease Virus: An evolving pathogen. Madison: University Wisconsin Press, 1964, p. 313—325.
95. *Ritchey M., Palese P.* — Virology, 1976, v. 72, p. 410.
96. *Ritchey M., Palese P., Schulman J.* — Virology, 1977, v. 76, p. 122—128.
97. *Rohde W., Schotlissek C.* — Arch. Virol., 1980, v. 64, p. 213—223.
98. *Rott R., Orlich M., Scholtissek C.* — J. Virol., 1976, v. 19, p. 54—60.
99. *Rott R., Orlich M., Scholtissek C.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 44, p. 471—477.
100. *Rott R., Scholtissek C., Klenk H.-D., Orlich M.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. N. Y.: Academic Press, 1978, p. 652—662.
101. *Scholtissek C., Rohde W., Harms E. et al.* — Virology, 1978, v. 89, p. 506—516.
102. *Scholtissek C., Rohde W., Von Hoyningen V., Rott R.* — Virology, 1978, v. 87, p. 13—20.
103. *Scholtissek C., Rott R., Orlich M. et al.* — Virology, 1977, v. 82, p. 74—80.
104. *Scholtissek C., Vallbracht A., Flehmig B., Rott R.* — Virology, 1979, v. 95, p. 492—500.
105. *Schulman J., Kilbourne E.* — Proc. First Intern. Symp. Aerobiol. University of California Press, 1963, p. 141—146.

106. *Schulman J., Kilbourne E.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1969, v. 63, p. 326—333.
107. *Schulman J., Palese P.* — J. Virol., 1976, v. 20, p. 248—254.
108. *Schulman J., Palese P.* — J. Virol., 1977, v. 24, p. 170—176.
109. *Schulman J., Palese P.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. N. Y.: Academic Press, 1978, p. 663—674.
110. *Semple A.* — Proc. Roy. Soc. Med., 1951, v. 44, p. 794—796.
111. *Simpson R., Hirst G.* — Virology, 1961, v. 15, p. 436—451.
112. *Simpson R., Hirst G.* — Virology, 1968, v. 35, p. 41—49.
113. *Sleigh M., Both G., Uderwood P., Bender V.* — J. Virol., 1981, v. 37, p. 845—853.
114. *Smith J.* — The Evolution of Sex. N. Y.: Cambridge Univ. Press, 1978.
115. *Smith W.* — Brit. J. Exp. Path., 1935, v. 16, p. 508—512.
116. *Spring S., Nusinoff S., Tierney E. et al.,* — Virology, 1975, v. 66, p. 542—550.
117. *Staiger H.* — Virology, 1964, v. 22, p. 419—422.
118. *Stuart-Harris C.* — Lancet, 1939, v. i, p. 497—499.
119. *Stuart-Harris C.* — J. Infect. Dis., 1980, v. 142, p. 784—793.
120. *Sugiura A.* — In: The Influenza Viruses and Influenza. N. Y.: Academic Press, 1975, p. 171—213.
121. *Sugiura A., Kilbourne E.* — Virology, 1965, v. 26, p. 478—488.
122. *Sugiura A., Kilbourne E.* — Virology, 1966, v. 29, p. 84—91.
123. *Sugiura A., Tobita K., Kilbourne E.* — J. Virol., 1972, v. 10, p. 639—647.
124. *Sugiura A., Ueda M.* — J. Virol., 1971, v. 7, p. 499—503.
125. *Sugiura A., Ueda M., Tobita K., Enomoto C.* — Virology, 1975, v. 65, p. 363—373.
126. *Tobita K., Kilbourne E.* — Arch. Virol., 1975, v. 47, p. 367—374.
127. *Tumova B., Pereira H.* — Virology, 1956, v. 27, p. 253—261.
128. *Ward C., Dopheide T.* — Biochem. J., 1981, v. 195, p. 337—340.
129. *Webster R., Campbell C., Granoff A.* — Virology, 1971, v. 44, p. 317—328.
130. *Webster R., Campbell C., Granoff A.* — Virology, 1973, v. 51, p. 149—162.
131. *Webster R., Laver W.* — In: The Influenza Viruses and Influenza. N. Y.: Academic Press, 1975, p. 270—314.
132. *Webster R., Laver W., Air G., Schild G.* — Nature, 1982, v. 296, p. 115—121.
133. *Webster R., Laver W., Granoff A.* — In: Virus Research N. Y.: Academic Press, 1973, p. 513—524.
134. *Wiley D., Wilson I., Skehel J.* — Nature, 1981, v. 289, p. 373—378.
135. *Wilson I., Skehel J., Wiley D.* — Nature, 1981, v. 289, p. 366—373.
136. *Young J., Desseiberger U., Palese P.* — Cell, 1979, v. 18, p. 73—83.
137. *Young J., Palese P.* — Proc. nat Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 6547—6551.
138. *Young J., Taussig R., Aaronson R., Palese P.* — In: Replication of Negative Strand Viruses. N. Y.: Elsevier/North-Holland, 1981, p. 209—215.

2

Сегменты РНК вируса гриппа и кодированные ими белки

Р. Лэмб (R. Lamb)

I. Введение

В этой главе дана характеристика структуры генов вируса гриппа и кодированных ими белков. Вирусы гриппа обладают сегментированным геномом однонитчатой РНК, который был назван негативно-нитчатым из-за того, что вирусные мессенджер-РНК транскрибируются с сегментов вирусной РНК. С момента публикации в 1975 г. сборника основных обзорных работ по вирусу гриппа под редакцией E. Kilbourne [117] было получено много новых сведений о вирусах гриппа A, B и C. Была расшифрована полная последовательность 8 сегментов РНК вируса гриппа A, что привело к более углубленному пониманию кодированных полипептидов и изменчивости вируса гриппа. Бо́льшая часть сведений, касающихся изменений в поверхностных гликопротеидах — гемагглютинине (HA) и нейраминидазе (NA), была получена при изучении первичных последовательностей в РНК, взаимодействии вирусных белков с антителами и при сопоставлении этих данных с результатами трехмерного рентгеноструктурного анализа этих белков.

В подразделах главы будут рассмотрены основная структура вируса и методы определения генной структуры с последующим более детальным обзором структуры каждого сегмента РНК и кодированных ими белков.

II. Частица вируса гриппа: основная структура

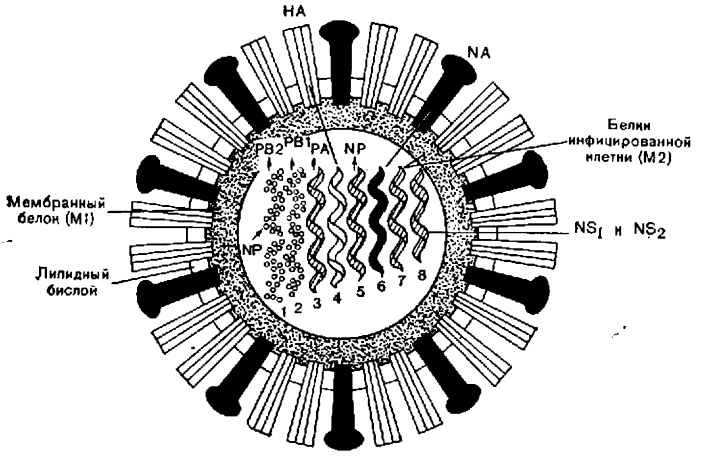
Первоначальная информация о структуре вируса гриппа была получена методом электронной микроскопии. Вирусы гриппа, прошедшие несколько циклов культивирования на хорион-аллантоисной мембране куриного эмбриона, выглядят в электронном микроскопе при негативном контрастировании как регулярные структуры диаметром 80—120 нм. Штаммы же вируса, выделенные от человека или животных и накопленные ограниченной серией пассажей в культуре ткани, демонстрируют более выраженную

гетерогенность и плеоморфизм [102, 104]. Наиболее отличительной чертой вириона является липидная оболочка с поверхностными выступами или шипами, радиально ориентированными наружу. Эти шипы бывают двух видов: стержнеобразные шипы НА и в значительно меньшем количестве грибообразные шипы NA [145]. НА и NA — антигенные гликопротеиды, но НА представляется мажорной антигенной детерминантой вируса. Тем не менее возникающие время от времени эпидемии гриппа связаны с изменениями в антигенной структуре обоих гликопротеидов — и НА, и NA.

Гемагглютинин участвует в прикреплении вируса к клеточным рецепторам, а также в инициации инфекционного процесса. Роль NA менее ясна, но она отщепляет сиаловую кислоту от рецепторов НА на клеточной поверхности и способствует отпочковыванию дочернего вируса от клеточной мембраны. Частицы вируса гриппа формируются в результате процесса почкования в плазматической мембране [13, 55, 122, 179, 182] с липидной мембраной вируса, содержащей поверхностные шипы, которая извлекается из плазматической мембраны инфицированной клетки [119, 120, 121]. Внутри липидной оболочки находится электронно-плотный слой, состоящий из вирусного мембранного белка (М1). Полагают, что этот белок стабилизирует структуру вирусной частицы. М1 может быть также организатором процесса сборки вируса в плазматической мембране перед почкованием и созреванием вирусной частицы.

Внутренняя часть вируса, наблюдаемая при использовании метода тонких срезов или при разрушении частиц, состоит из структур рибонуклеопротеида (РНП), которые содержат 8 различных сегментов однонитчатой РНК. Рибонуклеопротеиды выглядят как гибкие жгутики [204]; оказывается, что в зависимости от концентрации соли в процессе приготовления образца или метода окрашивания гибкость меняется [57, 94, 204]. Нити РНП иногда образуют петли на одном конце, а периодичность перемежающихся глубоких и мелких бороздок наводит на мысль о том, что структура формируется нитью, развернутой назад на себя и затем скрученной в двойную спираль. После обнаружения циркулярных форм был сделан вывод, что концы РНК не обязательно должны быть расположены на конце жгутика [94]. Рибонуклеопротеиды можно разделить по размерам на различные классы [68, 201, 212]; считают, что каждый РНП содержит один сегмент РНК. Большие спиральные структуры, интерпретируемые как результат регулярной агрегации меньших сегментов, наблюдаются иногда в частично разрушенных вирионах [6, 11, 104, 183]. Эти структуры могут представлять упорядоченные комплексы 8 отдельных РНП.

Рибонуклеопротеиды состоят из четырех белковых компонентов и РНК. Нуклеопротеид (NP) — доминирующая белковая субъединица нуклеокапсида; подсчитано, что одна молекула взаимодействует приблизительно с 10 нуклеотидами. Остальные три белка, ассоциированные с РНП, содержатся в меньших количест-



1. Схема структуры вириона гриппа.

Два типа гликопротеидных шипов, которые обладают активностями HA и NA, вставлены в липидный бислой вирусной мембраны. Распределение шипов не отражает значительно большего количества этих белков в вирионе. На внутренней поверхности липидного бислоя расположен мембранный белок (M1), представляющий собой главный структурный белок вирусной мембраны. Внутри оболочки содержится 8 сегментов генома однонитчатой РНК в форме спиральных рибонуклепротеидов. Сегменты 1 и 2 нарисованы так, чтобы показать, что белок NP ассоциирован с РНК, образуя рибонуклеопротеидный комплекс, который вместе с меньшими количествами белков PB1, PB2 и PA обладает РНК-зависимой активностью РНК-полимеразы. Показаны также кодируемые назначения 8 сегментов РНК. Сегменты 7 и 8 РНК кодируют более чем по одному белку, однако M2, NS1 и NS2 обнаружены только в инфицированных клетках и не являются структурными компонентами вируса. Диаграмма дана не в масштабе.

вах и обозначаются как PB1, PB2 и PA. Комплекс РНП обладает РНК-зависимой активностью транскриптазы [25, 53, 112, 200, 221]. Схематически структура вириона представлена на рис. 1.

III. Структура генома

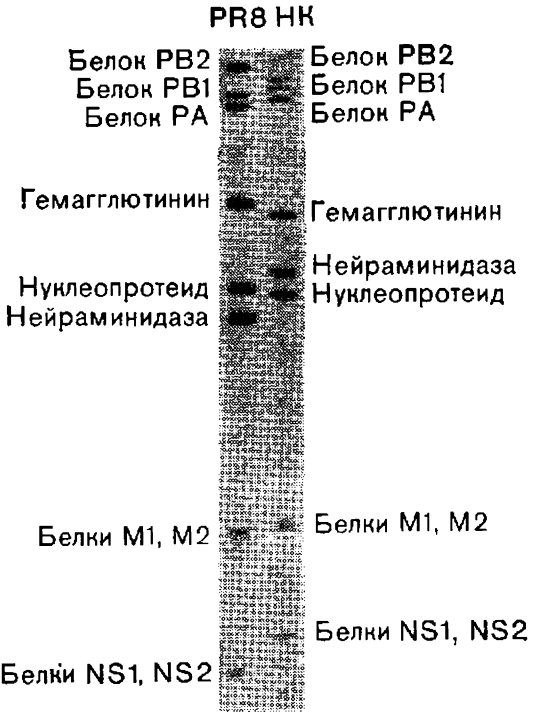
Генетическая информация вируса гриппа зашифрована в 8 сегментах однонитчатой РНК. Они кодируют 7 белков, обнаруженных в вирионе (PB1, PB2, PA, HA, NA, NP и M1), функции которых полностью пока не установлены. РНК вируса неинфекционна, а мРНК, с которых транслируются белки, транскрибируются с вирионной РНК вирусассоциированной РНК-полимеразой (транскриптазой); некоторые из этих мРНК впоследствии перерабатываются в клетке, скорее всего в клеточном ядре. Таким образом, термин «отрицательно-нитчая» был использован для описания РНК вируса гриппа, в то время как по договоренности мРНК считается положительно-нитчатой [16]. Была установлена полная последовательность нуклеотидов вируса гриппа, собрана значительная информация о структуре белков, включая данные рентгеноструктурного анализа кристаллографического строения HA и NA с разрешением 30 нм. Далее будут представлены доказательства, на которых основаны эти заключения.

А. Первые доказательства сегментированности генома

Было обнаружено, что геном вируса гриппа представлен однонитчатой РНК [1, 69]. F. Burnet и P. Lind [41, 42] определили высокую скорость рекомбинации выбранных маркеров между двумя штаммами, а с введением метода бляшек это было подтверждено и для изолятов единичного вируса [253]. Явление множественной реактивации после обработки вируса инактивирующими дозами УФ-облучения привело R. Barry [18] к предположению, что геном состоит примерно из шести независимых генетических единиц. Высокая частота рекомбинации натолкнула G. Hirst [98] на мысль о сегментированном геноме. Позднее были получены косвенные доказательства этого при изучении химической инактивации вируса [240]. Биохимическая характеристика вирионной РНК, полученная при седиментации в градиенте плотности сахарозы, подкрепила идею сегментированности генома [62, 69], а анализ в ПААГ-электрофорезе непосредственно выявил 6 фрагментов РНК [23, 45, 67, 103, 203, 257]. Доказательством независимой репликации сегментов РНК послужили также данные, что все сегменты имеют pppA на 5′-конце и У-ОН на 3′-конце [157, 303]. Последующие генетические свидетельства сегментированного генома были обеспечены выделением температурочувствительных мутантов [9, 83, 157, 161, 176, 254, 270, 273], у которых наблюдалась высокая частота рекомбинации и которые можно было отнести к неповторяющимся комплементационным группам. Необходимо подчеркнуть, что термин «рекомбинация» используют для описания изменения генетической информации вируса гриппа, которое происходит обычно за счет перераспределения отдельных сегментов генома при смешанной инфекции.

Б. Восемь сегментов РНК вируса гриппа

Значительное углубление понимания структуры генома вирусов гриппа было связано с проведением электрофоретического разделения сегментов вирионной РНК в ПААГ, содержащем 6 М мочевины; этот метод был разработан ранее для РНК реовируса [76]. Было обнаружено, что РНК вируса гриппа А можно разделить на 8 отдельных сегментов [19, 173, 192, 193, 202] (рис. 2), которые, как сейчас уже выяснено, колеблются по длине в пределах 890—2341 нуклеотида. Наличие 8 участков РНК было также отчетливо продемонстрировано при помощи двухмерного олигонуклеотидного фингерпринтирования [173]. Сегменты были пронумерованы с 1-го по 8-й по степени уменьшения их электрофоретической подвижности в ПААГ. Представляется вероятным, что каждый сегмент РНК может кодировать один белок, так как примерная кодирующая мощность каждого сегмента РНК, определенная по длине его цепочки, соответствует размерам известных белков вируса гриппа [112, 133, 173, 192, 216]. Сегменты РНК различных штаммов виру-



2. Карта генома вируса гриппа А [216].

РНК вирусов гриппа А/PR/8/34 и А/НК/8/68 (PR8 и НК соответственно) разделяли в 2,6% ПААГ, содержащем 0,15% N, N'-метиленбисакриламида. Миграцию РНК осуществляли сверху вниз. Продукт(ы) гена был(и) определен(ы) для каждого из 8 сегментов РНК вируса гриппа А (см. текст). Миграция РНК при использованных условиях зависела от размера, так же как и от вторичной структуры молекулы.

са гриппа имеют отличающиеся показатели миграции в гелях акриламид/мочевина [192] (см. рис. 2). Эти различия были использованы при определении функций гена в экспериментах по рекомбинации (см. далее). Однако после полной денатурации сегментов РНК глиоксалем [174] подвижности сегментов РНК оказались идентичными для разных штаммов, за исключением сегментов, кодирующих HA и NA, которые варьировали у вирусов гриппа А, принадлежащих к разным подтипам HA и NA [63]. Таким образом, миграционные различия у других сегментов РНК в гелях акриламид/мочевина являются, вероятно, случайными и зависят от вторичной структуры.

РНК вирусов гриппа В и С также исследовали описанными методами. Сейчас известно, что вирус гриппа В содержит 8 сегментов РНК, колеблющихся по длине в пределах приблизительно 1096—2500 нуклеотидов; было обнаружено также, что вирусы гриппа С содержат 7 сегментов РНК, характеризующихся длиной 1000—3000 нуклеотидов [37, 56, 61, 63, 210, 215]. Невозможность обнаружения 8 сегментов РНК у вируса гриппа С может отражать присутствие только одного гликопротеида в этих вирионах, так как у них отсутствует активность NA [116, 175, 188]. Известно, что вирусы гриппа С используют другой рецептор на эритроцитах [97, 116, 175] и содержат сиаловую кислоту на вирусном HA [187].

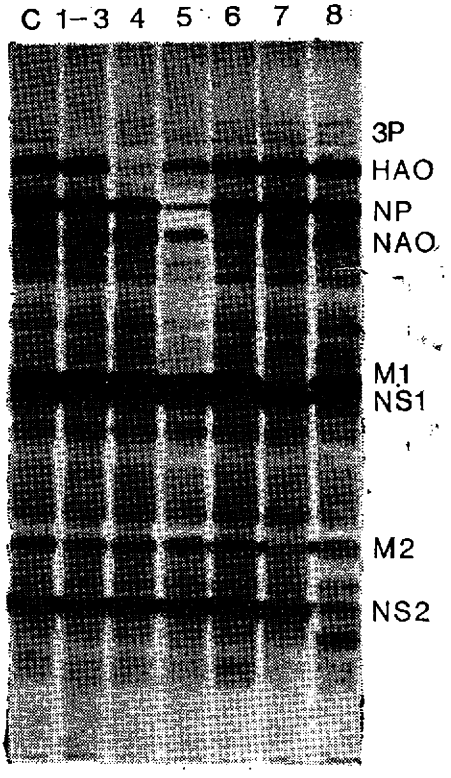
В. Методы определения функций гена

Предназначенность специфических сегментов РНК относительно вирусных полипептидов определялась тремя путями. Первый метод зависел от проявляющихся различий между штаммами в электрофоретических подвижностях сегментов РНК в ПААГ с мочевиной и способности различать белки разных штаммов либо иммунологическими методами для поверхностных гликопротеидов, либо при электрофоретическом разделении полипептидов в геле. Были приготовлены рекомбинанты двух штаммов вируса; провели сравнительное изучение подвижностей сегментов РНК или полипептидов родительских типов и каждого рекомбинанта. Этот анализ позволил установить назначение генов [134, 135, 193, 194, 216, 217, 243]. Подобный подход был также использован для определения функции каждой из комплементационных групп температурочувствительных (ts) мутантов [9, 10, 195].

Второй метод был рассчитан на изучение основной последовательности гомологов у соответствующих сегментов РНК различных штаммов. Основная последовательность гомологов была рассчитана для индивидуальных сегментов РНК штамма A/FPV, способного образовывать бляшки на клетках куриного эмбриона, и для комплементарных сегментов РНК других штаммов вируса гриппа, неспособных образовывать бляшки в этих клетках. Для получения рекомбинантов с бляшконеобразующим штаммом были использованы ts-мутанты вируса A/FPV с известным фенотипическим дефектом. Извлеченные бляшки, образованные рекомбинантом при непермиссивной температуре, были использованы для инфицирования клеток; была выделена комплементарная РНК, которую использовали в опытах молекулярной гибридизации с меченными ^{32}P сегментами вРНК. При сравнении рибонуклеазорезистентных фракций гомологичных гибридов и гетерологичного гибрида можно было определить родительскую принадлежность любого из сегментов [222, 224, 242].

Третий метод — наиболее прямой — основан на возможности транслировать мРНК вируса гриппа in vitro при помощи клеточных экстрактов и на неспособности транслировать гибриды мРНК/вРНК. Из инфицированных клеток были выделены цитоплазматические молекулы мРНК, содержащей поли(А), которые гибридизовали с изолированными сегментами вРНК. После гибридизации общая РНК транслировалась в экстрактах проросшей пшеницы. Каждый сегмент вРНК специфически предотвращал трансляцию того полипептида, который он кодировал [110, 111, 134, 135] (рис. 3).

Детальная интерпретация некоторых из этих экспериментов дополняется тем фактом, что соответствующие сегменты РНК различных штаммов не мигрируют в том же порядке в гель акриламид/мочевина; например, 5-й сегмент кодирует NP у некоторых штаммов и NA — у других [9, 193]. Однако, как уже говорилось,



3. Трансляция in vitro мРНК вируса гриппа после гибридизации мРНК из инфицированных клеток с индивидуальными сегментами геномной РНК [134].

С — контрольная трансляция in vitro мРНК вируса гриппа. Полосы 1—3, 4, 5, 6, 7, 8 — полипептиды, синтезированные после гибридизации соответствующих сегментов вирионной РНК с мРНК. Отмечено, что сегмент 7 РНК ингибирует трансляцию М1 и М2, а сегмент 8 — NS1 и NS2.

после обработки РНК глиоксалем сегменты всех штаммов мигрируют в гель в одинаковом порядке [63]. Было обнаружено также, что соответствующие Р-белки не мигрируют в ПААГ в одинаковом порядке. Например, первоначально определенный белок Р2 одного штамма мог быть функционально эквивалентным первоначально определенному белку Р3 другого штамма [10]. По этой причине номенклатура белков Р, основанная на порядке, в котором они мигрируют в ПААГ, была изменена и отражает в настоящее время сегменты РНК оригинала (см. далее).

Сейчас принято, что нумерация сегментов РНК в соответствии с их миграционным порядком в глиоксалевом геле (который для ряда штаммов такой же, как гели акриламид/мочевина) определяет следующий порядок назначений генов: 1-й сегмент РНК кодирует РВ2, 2-й — РВ1, 3-й — РА, 4-й — НА, 5-й — NP, 6-й — NA, 7-й — М1 и М2, 8-й — NS1 и NS2. Характеристика этих генных назначений представлена в табл. 1.

Г. Последовательности 5′- и 3′-концов каждого сегмента РНК — общие

Конечные нуклеотидные последовательности индивидуальных сегментов РНК вируса гриппа представляют значительный интерес из-за их общего включения в транскрипцию, трансляцию и репликацию. Ограниченное прямое секвенирование 5′- и 3′-концов 8 сегментов РНК вирусов гриппа А выявило присутствие общей последовательности из 13 нуклеотидов на 5′-конце у каждого сегмента и общую последовательность из 12 нуклеотидов на 3′-конце каждого сегмента [64, 218, 258] (для некоторых штаммов обнаружен Ц- или У-остаток в 4-м нуклеотиде на 3′-конце). Кроме того,

Таблица 1. *Сегменты РНК генома вируса гриппа и кодируемые ими продукты*

Сегмент	Длина[1] (нуклеотиды)	Длина мРНК[2,3] (нуклеотиды)	Кодируемые полипептиды[3]	Частая[4] длина полипептида (аминокислоты)	Примерное количество молекул на вирион [34]	Примечания (ссылки см. в тексте)
1	2 341	2 320	PB2	759	30—60	Кэп-связывание РНК клетки-хозяина: компонент транскриптазы РНК
2	2 341	2 320	PB1	757	30—60	Инициация транскрипции: возможно, активность эндонуклеазы: компонент транскриптазы РНК
3	2 233	2 211	PA	716	30—60	Элонгация цепей мРНК(?): компонент транскриптазы РНК
4	1 778	1 757	HA	566	500	Поверхностный гликопротеид, тример: главная антигенная детерминанта
5	1 565	1 540	NP	498	1 000	В ассоциации с сегментами РНК образует рибонуклеопротеид: структурный компонент транскриптазы РНК
6	1 413	1 392	NA	454	100	Поверхностный гликопротеид: активность NA. Тетрамер
7	1 027	1 005	M1	252	3 000	Основной белковый компонент вируса: расположен под липидным бислоем
		316	M2	96		Сплайсированная мРНК, неструктурный белок: функция неизвестна
		276	?	?9		Сплайсированная мРНК, пептид предсказан только по нуклеотидной последовательности
8	890	868	NS1	230		Неструктурный белок: функция неизвестна
		395	NS2	121		Сплайсированная мРНК, неструктурный белок: функция неизвестна
	13 588					

[1] Для штамма A/PR/8/34: ссылки см. в табл. 2.
[2] За исключением цепи поли(A).
[3] Определено биохимическими и генетическими методами (см. текст).
[4] Определено нуклеотидным и белковым секвенированием (см. текст.)

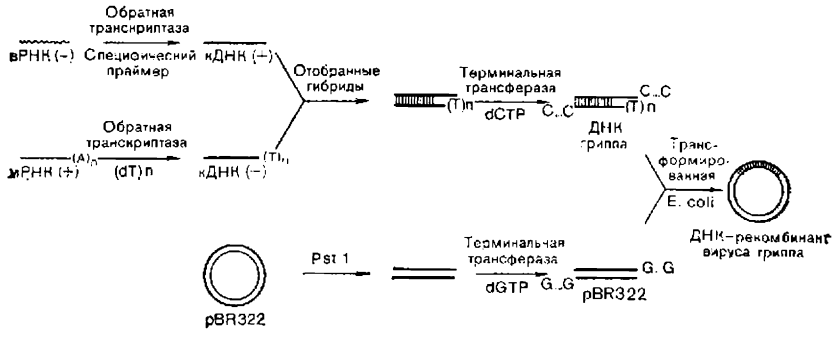
консервативные последовательности на 3′- и 5′-концах свидетельствуют о частичной и перевернутой комплементарности, которая может иметь значение для репликации сегментов РНК [64, 218]. РНК-зависимая полимераза (транскриптаза) может узнавать последовательность 3′-конца вириона с (—)-нитью и из-за перевернутой комплементарности последовательности 5′-конца таких же нитей; полимераза способна далее сшить похожие последовательности в 3′-конец комплементарной (+)-нитчатой РНК в про-

цессе репликации. Третий общий участок 8 сегментов РНК представлен уридиновой областью из 15—21 остатка на 5′-конце геномных сегментов. Сейчас известно, что существует сигнал для инициации полиаденилирования в процессе синтеза мРНК [219] (см. далее). РНК вирусов гриппа В и С также содержит общие 3′- и 5′-концы, которые похожи на такие же концы вирусов гриппа А [64, 258].

Д. Синтез двунитчатой ДНК с РНК вируса гриппа, клонирование и определение нуклеотидных последовательностей

Несмотря на то, что полная нуклеотидная последовательность сегментов РНК вируса гриппа могла быть определена успешным расщеплением рибонуклеазой и гомохроматографией [231], при этом были достигнуты только ограниченные успехи [264] из-за трудоемкости метода. Развитие молекулярного клонирования двунитчатой ДНК, копируемой с однонитчатой РНК, в сочетании с быстрыми методами секвенирования ДНК [168, 232] сделало более доступным секвенирование генома вируса гриппа. Доступность очищенной вирионной РНК (вРНК) делает ее предпочтительным лекалом, с которого копируется кДНК в большей степени, чем мРНК, выделенные из инфицированных клеток (особенно из-за того, что мРНК не полностью копируют сегменты вРНК). Для синтеза копий кДНК с вРНК с обратной транскриптазой необходим инициатор — праймер. Многие исследователи добавляли хвосты поли(А) к 3′-концам сегментов вРНК, пользуясь полиаденилтрансферазой, выделенной из E. coli [255], а затем праймировали обратную транскриптазу либо олиго(dT), либо олиго(dT-dA) (Y-нуклеотид 3′-конца нити вРНК) [32, 36, 43, 71, 81, 206, 262, 279, 293]. Некоторые исследователи делали копии кДНК двунитчатыми (дн) самопраймированием и используя Klenow-фрагмент полимеразы 1 ДНК E. coli или обратную транскриптазу. Неудобство этого метода заключается в том, что для клонирования дцДНК в клонирующий вектор необходимо пользоваться нуклеазой S1 для расщепления; при этом некоторые последовательности утрачиваются молекулой кДНК [81, 206, 279].

Альтернативным подходом к праймированию с применением олиго (dT) явилось использование синтетического олигонуклеотидного додекамера d[А-Г-Ц--А-А-А-А-Г-Ц-А-Г-Г], который комплементарен 3′-концу каждого сегмента вирионной РНК [15, 132, 297]. Другой способ получения дцДНК был основан на процедуре, разработанной для клонирования бактериофага Qβ [272]. Копия (+)кДНК транскрибировалась с вРНК, а копия (—)кДНК была получена с молекул мРНК, выделенных из инфицированных клеток. Копии (+) и (—)кДНК гибридизовали и затем включали в клонирующий вектор [43, 44, 132] (рис. 4). Преимущество этого метода заключается в том, что полные копии кДНК обеих РНК — вРНК и мРНК—получаются значительно быстрее [36, 38, 65, 136,



4. Схема конструирования и клонирования ДНК вируса гриппа.

Готовятся кДНК-копии цепей вРНК и мРНК, которые затем гибридизуются для образования двуцепочатой ДНК. Преимущество метода заключается в том, что клонируются полные копии обеих РНК — вРНК и мРНК ([132] и любезно предоставлено Dr. Ching Juh Lai).

137, 164, 169, 251, 271]. Другая стратегия предусматривала использование додекануклеотидного праймера, комплементарного 3′-концу сегментов вРНК, для синтеза копии (+)кДНК и затем другого синтетического олигонуклеотида, комплементарного 3′-концу копии (+)кДНК, для синтеза второй нити ДНК. Использование двух синтетических праймеров позволило получить полные копии дцДНК с каждого сегмента вРНК [14, 22, 24, 138, 159, 297].

Для внедрения дцДНК в бактерию было предложено много разнообразных клонирующих векторов, включая плазмиду pBR322 и ее лучше скопированную производную pAT153, бактериофаг λ и репликативную форму производных бактериофага M13 (M13mp2 и M13mp7) (табл. 2).

Определение последовательности нуклеотидов проводилось методом частичного химического разрушения [168] или клонированием M13 методом дидеоксизамещения последовательностей на конце цепи [232]. G. Winter и S. Fields [293] были первыми, кто рассчитывал определить последовательности полного генома вируса гриппа с помощью последней методики, основанной на клонировании «пистолетным выстрелом» в M13 рестрикционных расщепленных эндонуклеазой кусочков дцДНК [90]. Такая стратегия была разработана для секвенирования митохондриальной ДНК [233]. Однако стало ясно, что не все последовательности вируса гриппа можно одинаково легко клонировать и пробелы в последовательности нужно заполнять дидеоксисеквенированием, используя в качестве праймеров рестрикционные фрагменты имеющихся клонов M13. Некоторые из этих пробелов в последовательностях можно отнести к сайтам EcoK в 5-м и 7-м сегментах в этих точках [295]. Впоследствии стало также легче клонировать в плазмиду pBR322 полную дцДНК, синтезированную с вРНК, используя два олигонуклеотидных праймера, и затем субклонировать в M13 пе-

Таблица 2. *Компиляция полных нуклеотидных последовательностей сегментов РНК вируса гриппа*

Сегмент[1] РНК	Кодируемый белок	Штамм		Источник
1	PB2	A/PR/8/34		[73]
		A/WSN/33		[114]
2	PB1	A/PR/8/34		[73]
		A/WSN/33		[256]
		A/NT/60/68		[22]
3	PA	A/PR/8/34		[73]
		A/NT/60/68		[24]
4	HA	A/PR/8/34	H1	[296]
		A/WSN/33	H1	[100]
		A/Japan/305/57	H2	[81]
		A/утка/Украина/63	H3	[72]
		A/Aichi/2/68	H3	[279]
		A/NT/60/68	H3	[33]
		A/Memphis/102/72	H3	[263]
		A/Victoria/3/75	H3	[177]
		A/Bangkok/1/79	H3	[34]
		A/FPV/Rostock/34	H7	[206]
		B/Lee/40		[131]
5	NP	A/PR/8/34		[276, 294]
		A/NT/60/68		[107]
6	NA	A/PR/8/34	N1	[74]
		A/WSN/33	N1	[99]
		A/NT/60/68	N2	[20]
		A/Udorn/72	N2	[164]
	NA и NB	B/Lee/40		[251; неопубликованные данные M. Show и R. Lamb]
7	M1 и M2	A/PR/8/34		[5, 293]
		A/Udorn/72		[137]
		A/FPV/Rostock/34		[169]
		B/Lee/40		[38]
8	NS1 и NS2	A/PR/8/34		[15, 297]
		A/Udorn/72		[136]
		A/утка/Alberta/60/76		[14]
		A/FPV/Rostock/34		[205]
		B/Lee/40		[36]

[1] В соответствии с порядком миграции в ПААГ после обработки глиоксалем [63].

ред секвенированием [295, 297]. При помощи такого стратегического подхода была получена полная последовательность штамма A/PR/8/34 (ссылки см. в табл. 2).

Была получена существенная информация, особенно для различных подтипов HA и NA, методом дидеоксирования конца цепи, модифицированным таким образом, что обратная транскриптаза праймировала с олиго(dT$_8$dA)-копий сегмента полиаденилированной вРНК. Сразу после этой процедуры можно проводить нуклеотидное секвенирование в гелях и, следовательно, данный метод самый быстрый. Единственный недостаток этой методики — то, что праймирование происходит только на 3′-конце цепи вРНК, длина

получаемой нуклеотидной последовательности связана с разрешающей способностью ПААГ, используемого для разделения олигонуклеотидов с различающимися размерами [2, 3, 4, 27, 29, 30, 32]. Модификация этой схемы была применена для получения полных последовательностей вариантов НА. Рестрикционные эндонуклеазные фрагменты клонированной ДНК-копии НА были использованы для праймирования вРНК других вирусов [33, 263].

IV. Сегменты РНК вируса гриппа

Была получена полная нуклеотидная последовательность всех 8 сегментов РНК вируса гриппа А (см. табл. 2), а также 4-го, 6-го, 7-го и 8-го сегментов вируса гриппа В. Структура каждого сегмента РНК и свойства кодированных ими полипептидов рассмотрены далее. Пока нет никакой информации относительно нуклеотидной последовательности РНК вируса гриппа С.

А. Сегменты 1, 2 и 3 РНК: свойства белков РВ1, РВ2 и РА, ассоциированных с транскриптазой

В ранних стадиях исследования было обнаружено, что хотя бы один из двух белков Р ассоциирован с рибонуклеопротеидным комплексом вирионов [25, 58, 257, 259]. По мере совершенствования условий электрофореза в ПААГ стало ясно, что вирион содержит три дискретных белка Р [112, 133, 200], которые обозначили Р1, Р2, Р3 по порядку уменьшения их электрофоретической подвижности в ПААГ (выявленная м. м. 95 000—82 000). На основе анализа рекомбинантов штаммов A/PR/8/34 и A/HK/68 определили, что 1-й сегмент РНК кодирует белок Р3, 2-й сегмент РНК — белок Р1 и 3-й сегмент РНК — белок Р2 [194, 217], но у штамма A/FPV/Rostock/34 кодируемые назначения сегментов РНК отличались [242]. Поскольку обозначение Р1—Р3, согласно номенклатуре, основано на подвижности в геле, а не на функциях, белок Р2 одного штамма может быть функционально эквивалентен белку Р3 другого штамма [7].

Более совершенная идентификация белков Р была проведена методом двухмерного электрофореза с изоэлектрическим фокусированием белков в одном направлении и SDS-электрофорезом в присутствии разрушающих агентов во втором направлении [101]. Обнаружено, что два полипептида Р являются относительно основными, а один из полипептидов Р — относительно кислый. Эти данные сделали номенклатуру белков Р более совершенной до момента выяснения всех их функций [101, 274, 295]. Более быстро мигрирующий основной белок Р, кодируемый 1-м сегментом РНК, назвали РВ2, медленно мигрирующий основной белок Р, кодируемый 2-м сегментом РНК, — РВ1, а кислый белок Р, кодируемый 3-м сегментом РНК, — РА (см. табл. 1 и 3).

Таблица 3. *Сегменты 1, 2 и 3 РНК и кодируемые ими полипептиды*[1]

Сегмент	Длина в нуклеотидах	Длина полипептида в аминокислотах	М. м. кодируемого полипептида	Заряд при pH 6,5	Ген PR8[2]	Назначение FPV[3]	Новая[4] номенклатура
1	2341	759	85 900	+28	P3	P2	**PB2**
2	2341	757	86 500	+28	P1	P1	**PB1**
3	2233	716	82 400	—13,5	P2	P3	**PA**

[1] [74, 295]; [2] [194]; [3] [7]; [4] [101, 274, 295].

Была получена полная последовательность 1-го, 2-го и 3-го сегментов РНК [22, 24, 73, 114, 256, 295]. Сегменты 1 и 2 РНК содержат по 2341 нуклеотиду по длине и кодируют белки, состоящие из 759 и 757 аминокислот соответственно. Оба белка являются основными при pH 6,5 с истинным зарядом +28. Из-за того что размеры двух полипептидов PB1 и PB2 очень схожи, возможность разделить их в ПААГ должна зависеть от таких факторов, как дифференциальное связывание SDS. Сегмент 3 РНК содержит 2233 нуклеотида по длине кодирует белок из 716 аминокислот с зарядом —13,5 при pH 6,5. Было высказано предположение, что, поскольку белки P вовлечены в синтез РНК и поскольку они так похожи по размеру, эти молекулы продуцированы одним наследственным полимеразным геном. Однако не было найдено простой гомологии при сравнении их последовательностей [295].

На основании экспериментов с ts-мутантами, дефектными по синтезу РНК, предположили, что PB1 и PB2 вовлечены в синтез мРНК, а PA — в синтез вРНК [130, 195, 239]. Дальнейший анализ реакции транскрипции in vitro показал, что белок PB2 вовлечен в связывание кэп-структуры хозяйской первичной РНК [26, 198, 274, 275], а PB1 — в инициацию транскрипции [275].

Б. Сегмент 4 РНК: структура и функция гемагглютинина.

Гемагглютинин вируса гриппа — интегральный мембранный гликопротеид, ответственный за прикрепление вируса к клеткам. Он был так назван изначала вследствие способности вируса агглютинировать эритроциты [95, 172] за счет присоединения гликопротеидных рецепторов, содержащих специфическую сиаловую кислоту [96]. Гемагглютинин образует большое количество видимых шипов на вирионе. Он является основным антигеном вируса, против которого вырабатываются нейтрализующие антитела [144], и периодические эпидемии гриппа связаны с изменениями его антигенной структуры. В дополнение к роли посредника в проникновении инфекционного вируса в плазматическую мембрану чувствительной клетки хозяина НА отвечает также за инициацию инфекции [124, 149]. В зависимости от штамма вируса, типа хозяйских клеток и условий роста НА (м. м.~77 000) может быть

протеолитически расщеплен на две полипептидные цепи — НА1 (м.м. ~ 50 000) и НА2 (м.м. ~ 27 000) [123, 150, 151, 152, 257], которые соединяются дисульфидными связями [143]. Такое расщепление НА не влияет на его антигенные или рецепторсвязывающие свойства [150, 151, 152, 170] но значительно увеличивает инфекционность вируса [124, 149] и имеет важное значение для патогенности [31, 227] и распространения инфекции в организме [230].

Исследование НА методом электронной микроскопии [89, 145, 299] после его удаления из вириона за счет обработки детергентом или селективного протеолиза [58, 142, 246] показало, что молекула состоит более чем из одной субъединицы. Сейчас известно, что существует тример с нековалентно связанными мономерами [289, 292]. Корреляция полипептидных размеров НА1 и НА2, изолированных обработкой протеазой или солюбилизацией вирионов детергентом, с фактом агрегации, наблюдаемым после удаления детергента из солюбилизированного НА, несмотря на то что освобожденные протеазой шипы были растворимы, привела к предположению, что НА2 размещен в оболочке вируса [35, 58, 145]. Это подтвердилось при изучении аминокислотной последовательности в белке; было выявлено, что НА1 представляет собой N-терминальную часть НА, а НА2 — С-терминальную часть [260]. Таким образом, гидрофобная область молекулы, вставленная в мембрану и удаляемая протеолизом, принадлежит С-терминальному участку НА2.

1. Структура сегмента 4 РНК, кодирующего гемагглютинин

Была получена информация о полной нуклеотидной последовательности 4-го сегмента РНК, кодирующего НА, для антигенных подтипов Н1, Н2, Н3 и Н7 и для нескольких вариантов штаммов Н1 и Н3 (см. табл. 2 и 4). Наиболее полные данные об аминокислотной последовательности белка были получены для штаммов Н2 и Н3 [280, 281, 283]. Полные основные структуры различных типов НА1 оказались очень схожими. Подробные детали изменений аминокислот у антигенно-отличающихся подтипов НА и в пределах подтипа можно найти в обзорах C. Ward [280] и R. Webster [287], а также в настоящем издании. Первичная структура НА может быть рассмотрена на примере штамма A/Aichi/68 (Н3) и изображена схематично на рис. 5.

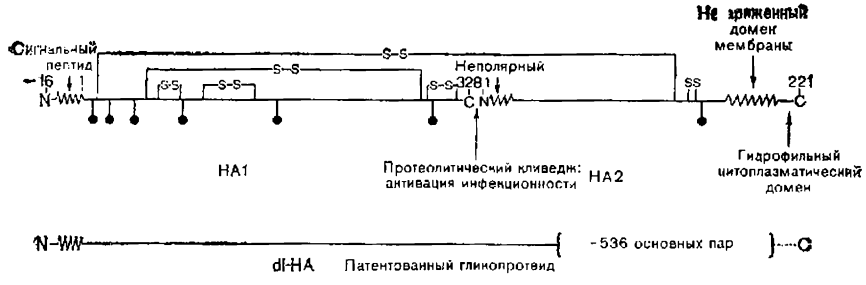
Сегмент РНК, кодирующий НА, содержит 1765 нуклеотидов в длину: 20 нуклеотидов предшествуют сигналу для кодона АУГ, инициирующему трансляцию; транслируемая область выражается более чем 1698 нуклеотидами, соответствующими 566 аминокислотам; перед 3′-концом расположен нетранслируемый участок, состоящий из 35 нуклеотидов. Гидрофобный сигнальный пептид содержит 16 аминокислот; НА1 состоит из 328 аминокислот, а НА2 — из 221 аминокислоты. Сигнальный аргининовый остаток теряется между НА1 и НА2 при протеолитическом кливедже; предполагают, что в активацию НА вовлечены два типа фермен-

Таблица 4. *Различия в последовательности НА вирусов гриппа четырех разных подтипов*

	H1[1]	H2[2]	H3[3]	H7[4]
Нуклеотидная длина	1 778	1 773	1 765	1 742
Кодирующая область (нуклеотиды)	1 698	1 686	1 698	1 689
5′-Нетранслированный участок	32	43	29	21
3′-Нетранслированный участок	48	45	35	32
Кодирующая область (аминокислоты)	566	562	566	563
Сигнальная последовательность (аминокислоты)	17	15	16	18
НА1 (аминокислоты)	326	324	328	319
НА2 (аминокислоты)	222	222	221	221
Аминокислоты, утраченные между НА1 и НА2	1	1	1	5

[1] Для штамма A/PR/8/34 [296, 297]. Для штамма A/WSN/33 — на одну аминокислоту меньше в НА1, а нуклеотидная длина — 1775 [100].
[2] Для штамма A/Jap/305/57 [81]. Существенные белковые последовательности взяты из [283, 284].
[3] Для штамма A/Aichi/2/68 [279]. Были секвенированы также некоторые другие НА подтипа Н3: A/NT/60 [33], A/Victoria/75 [177], A/Bangkok/79 [34], A/Memphis/72 [263]; было проведено интенсивное белковое секвенирование штаммов A/Aichi/2/68 (X31) и A/Memphis/72 [66, 280, 282].
[4] Для штамма A/FPV/Rostock/34 [206].

тов: после инициирующего действия трипсина или трипсиноподобной протеазы аргинин удаляется из места кливеджа при помощи экзопептидазы карбоксипептидазы типа В [66, 79]. N-конец НА2— гидрофобный, ему присуща высокая консервативность для разных штаммов. Его возможная роль во взаимодействии с клеточной



5. Вверху: схема полипептидной последовательности НА A/Aichi/68 (Н3) [292]. Показана N-терминальная сигнальная последовательность, расщепленная в процессе котрансляционного мембранного включения. Указано положение С-терминального незаряженного мембранного якореподобного домена, а также сайт протеолитического кливеджа, приводящего к появлению полипептидных цепей НА1 и НА2 и вызывающего активизацию инфекционности. Показаны дисульфидные связи; сайты прикрепления карбогидратов проиллюстрированы линиями с шариками на конце.

Внизу: схема НА, потерявшего значительную часть С-конца за счет генетических манипуляций с использованием вектора экспрессии SV40-НА (536 основных парных делеций ДНК, кодирующей НА). Синтезированная молекула НА — патентованный гликопротеид [271].

мембраной рассмотрена далее. Возле С-конца НА2 находится промежуток из 24 гидрофобных остатков, которые объединяют липидный бислой и якореподобный конец НА в липидную оболочку. Точное местоположение или функцию сигнала, препятствующего трансляции НА через мембрану («Stop-Transfer-Signal», [27]), еще предстоит определить. Однако эта последовательность должна содержать 178 аминокислот С-конца НА2, поскольку в системе экспрессии эукариот, содержащей клонированную НА-ДНК, у которой стерта эта область, наблюдается синтез растворимой молекулы НА (см. рис. 4) [271].

Структура углеводного компонента НА была изучена многими исследователями [115, 185, 186, 248]. У штамма A/Aichi/68 обнаружено 7 возможных сайтов гликозилирования (аспарагин-Х-серин или аспарагин-Х-треонин). Анализ выявил четыре сложные углеводные цепочки у НА1 и одну — у НА2, состоящие из N-ацетилглюкозамина, маннозы, галактозы и фукозы, а также две простые углеводные цепочки у НА1, состоящие из N-ацетилглюкозамина и маннозы, каждый из которых связан N-гликозидной связью с аспарагиновыми остатками [281, 292]. Терминальные остатки сиаловой кислоты отсутствуют за счет действия вирусной NA [122]. В молекуле НА присутствует шесть дисульфидных связей, из которых четыре — в области НА1, одна — в НА2 и одна связывает НА1 и НА2 [66, 284].

2. Трехмерная структура гемагглютинина

Расщепление НА штамма A/Aichi/68 (H3) с помощью бромелина позволило высвободить интактную — как антиген и как структуру — молекулу, растворимую в воде и утратившую только С-терминальный гидрофобный участок НА2 [35, 75, 260, 283, 289]. Эта молекула была кристаллизована и определена ее трехмерная структура при помощи рентгеновской кристаллографии с разрешением 0,3 нм [292] (см. главу 5, рис. 23). Молекула представляет собой удлиненный цилиндр длиной 13,5 нм, состоящий из: а) длинного волокнистого стержня, вытянутого на 7,6 нм от мембраны и содержащего две антипараллельные α-спирали, которые заканчиваются возле мембраны в компактном пятинитчатом антипараллельном β-полосном сферическом сгибе; б) удаленного от центра сферического участка антипараллельной β-полосной структуры. Последняя сферическая область полностью состоит из остатков НА1 и связана с НА2 волокнистым стержнем только двумя антипараллельными цепями из НА1. С-конец НА1 находится на расстоянии 2,1 нм от N-конца НА2, указывая на значительное переустройство в этой области после активации НА кливеджем. N-конец НА1 очень близок к мембране, и можно предположить, что молекулы способны складываться во время прикрепления к мембране не только гидрофобным С-терминальным участком НА2, но также сигнальной последовательностью на N-конце НА1, который затем удаляется протеолизом. Вариабельные антигенные де-

терминанты расположены на вершине сферической области (см. главу 5, рис. 23). Было высказано предположение о наличии четырех антигенных сайтов [80, 286, 290]. Они были вычислены по аминокислотным изменениям в антигенных вариантах, селекционированных с моноклональными антителами [146] и возникающих в природе вариантах этого вируса [34, 146, 147, 148, 292, 301]. Дальнейшее картирование изменений в аминокислотной последовательности за счет антигенного дрейфа и сопоставление с антигенными сайтами продолжается.

Хотя рентгеноструктура была получена только для подтипа H3, последовательные сравнения с подтипами H1 и H2 указывают на то, что 22% остатков HA1 и 45% остатков HA2 абсолютно консервативны, в том числе шесть дисульфидных мостиков и многие структурно важные остатки, такие как пролин (21 остаток) и глицин (9 остатков). Поэтому предполагают, что трехмерная структура HA вирусных подтипов H1 и H2 очень похожа на структуру подтипа H3.

Гемагглютинин вируса гриппа B также секвенировали с кДНК-копии 4-го сегмента РНК [131]. Ген из 1882 нуклеотидов кодирует 584 аминокислоты. В HA вируса гриппа B также обнаружены основные структурные детали, общие с вирусами A, включая гидрофобный сигнальный пептид, гидрофобные N- и C-концы HA2 и сайт кливеджа HA1/HA2. Что касается длины молекулы, то 24% аминокислот в HA1 и 39% аминокислот в HA2 консервативны у вирусов A и B, что свидетельствует о тесной эволюционной взаимосвязи этих вирусов. Наибольшая область консервативных последовательностей расположена на N-конце HA2, который, как уже упоминалось, играет существенную роль для активации инфекционности кливеджем.

3. Синтез гемагглютинина, котрансляционные и посттрансляционные модификации

Гемагглютинин транслируется как единичная полипептидная цепочка с моноцистронной мРНК, считанной с 4-го сегмента вирионной РНК. Полученные данные говорят о том, что биосинтез HA идет таким же путем, как и у многих клеточных интегральных белков, с котрансляционным включением в эндоплазматический ретикулум после прикрепления возникающей полипептидной цепи в комплексе с рибосомой [27]. Гидрофобный N-терминальный сигнальный пептид удаляется протеолизом [2, 171], и растянутая цепь гликозилируется в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме полости клеток [51, 70, 92, 125, 170]. Последующие модификации гликозилирования происходят в процессе транспорта через плазменную мембрану [52, 228]. Пока нет удовлетворительного объяснения процессов, приводящих к транспорту HA, но, возможно, включаются покрытые решетками везикулы, как это предполагается у гликопротеидов вируса везикулярного стоматита [226]. В инфицированных клетках почки теленка Madin-Darby вирус

гриппа выпочковывается из верхушечной поверхности клетки, хотя вирус везикулярного стоматита отпочковывается от боковой поверхности клетки [59, 223, 225]. Остается нераскрытым механизм сортировки этих гликопротеидов между разновидностями клеточной поверхности.

4. Активация инфекционности кливеджем и слияние in vitro

Наиболее высококонсервативная последовательность в НА разных штаммов расположена на неполярном N-конце НА2, ассоциированном с активностью, благодаря которой вирус проникает в мембрану хозяйской клетки, инициируя инфекцию. Расщепление НА на НА1 и НА2 необходимо для инфекционного проникновения и слияния in vitro [106, 124, 149]; оно происходит в результате значительного изменения конформации НА [261]. Гомологичная расположенной на N-конце НА2 последовательность присутствует в сайте активации кливеджа — сайте белка слияния (F-fusion) вируса Сендай [82, 213, 234, 235, 236]. На важность этой аминокислотной последовательности для процесса слияния указывают данные, что синтетические пептиды, имитирующие соответствующую последовательность либо N-конца НА2, либо N-конца белка F вируса Сендай, ингибируют процесс проникновения вируса [213]. Однако трудно объяснить, каким образом N-конец НА2 непосредственно вовлечен в процесс проникновения в клетку, поскольку он локализован в 10 нм от отдаленной верхушки молекулы НА и в 3,5 нм от мембраны. Возможно, вторичное конформационное изменение после связывания рецептора приближает конец НА2 к клеточной мембране. Гемагглютинин вируса гриппа может вызывать слияние с клеткой in vitro при кислом pH (5,0—5,55) [105, 106, 154, 162, 166, 288]. Предполагают, что активность слияния при кислом pH отражает прохождение вируса через кислотное окружение внутриклеточных везикул, таких как лизосомы.

В. Сегмент 5 РНК: структура белка нуклеокапсида

Нуклеокапсидный белок (NP), или нуклеопротеид, закодирован в 5-м сегменте РНК и является вирусным белком, который взаимодействует с сегментами вирусной РНК, образуя частицы вирусного рибонуклеопротеида (РНП) [57, 204]. Белок NP должен быть мультифункциональным, так как он предположительно взаимодействует не только с самим собой и РНК в РНП, но также с тремя белками P (PB1, PB2 и PA), образуя транскриптазный комплекс. Кроме того, биохимическими методами было показано, что РНП могут взаимодействовать с мембранным белком (M1) [212], подтверждая оригинальную концепцию о том, что РНП взаимодействуют с вирусным мембранным белком в плазматической мембране [48]. NP является типоспецифическим белком вирусов гриппа, что используется для распознавания вирусов A, B и C, хотя наблюдались минорные различия в антигенности NP у вирусов A

[238]. Исследования NP с помощью моноклональных антител позволили установить, что молекула содержит по крайней мере три неперекрывающиеся антигенные зоны и за счет одной из них ингибирует in vitro активность транскриптазы [277]. Однако неясно, происходит ли это ингибирование за счет стерической помехи или за счет интерференции с функцией NP, отличной от его структурной роли в комплексе. NP фосфорилирован до одного серинового остатка на молекулу [113, 199, 209], но неясно, какая часть молекул NP фосфорилирована или какую роль играют фосфатные группы.

Полную последовательность 5-го сегмента РНК получили для двух штаммов — A/PR/8/34 [276, 294 и неопубликованные данные W. Min Jou, 1981] и A/NT/60/68 [107]. Сегмент 5 РНК состоит из 1565 нуклеотидов, включая в случае мРНК некодирующий 5′-участок из 45 нуклеотидов и некодирующий 3′-участок из 26 нуклеотидов. Кодирующая область из 1494 нуклеотидов кодирует 498 аминокислот, которые дают предсказанную м.м. 56 101 для NP, что очень близко по значению к молекулярной массе, рассчитанной по поведению NP в электрофорезе [58, 150, 204, 257]. Белок богат аргинином и имеет положительный заряд +14 при pH 6,5. У него нет групп основных остатков, наличие которых можно было предположить для взаимодействия кислотных фосфатных остатков РНК с молекулами NP, и, следовательно, РНК ассоциирована со многими участками молекулы NP, нейтрализуя заряды. На основании общей длины генома вируса гриппа (13 588 нуклеотидов) и количества молекул NP, ассоциированных с одной вирусной частицей [54], можно рассчитать, что приблизительно 20 нуклеотидов взаимодействуют с одной белковой субъединицей. Можно также предположить, что РНК связана с наружной частью рибонуклеопротеидной структуры, так как она может замещаться поливинилсульфатом [84, 204] и чувствительна к расщеплению рибонуклеазой без разрушения структуры РНП [68, 118, 183, 204].

Г. Сегмент 6 РНК: структура и свойства нейраминидазы

Шестой сегмент РНК кодирует интегральный мембранный гликопротеин — NA. Вирионы гриппа обладают разрушающей рецепторы нейраминидазной активностью, которая вызывает дезагрегацию агглютинированных красных кровяных клеток; клетки, предварительно обработанные вирусом, не могут быть повторно агглютинированы свежим вирусом [96]. Нейраминидаза гидролитически расщепляет гликозидную связь, присоединяя кетогруппу N-ацетилнейраминовой кислоты (сиаловой кислоты) к D-галактозе или D-галактозамину [85].

При электронно-микроскопическом исследовании NA, выделенной из мембраны вирионов при помощи детергента, была обнаружена грибовидная структура с ножкой и головкой [145, 300], состоящая из комплекса четырех молекул NA с общей м.м. 220 000.



6. Схема полипептида NA (подтип N1).

Показаны положение вытянутой сигнальной последовательности и только незаряженный домен в молекуле, способной пронзить липидный бислой. N-терминальный метиониновый остаток, инициирующий белковый синтез, не удален. Сайты прикрепления углеводов обозначены черными кружочками.

Эта модель была подтверждена методом трехмерной рентгенографии [50, 278]. Подробное описание структуры NA с разрешением 0,3 нм см. в главе 5. Индивидуальные полипептидные цепочки (м. м. ~ 56 000) удерживаются вместе за счет дисульфидных связей [153]. Неполные молекулы NA можно изолировать обработкой вирусных частиц протеазой; такие молекулы-«головки» утрачивают свои гидрофобные домены и свои тонкие ножки, хотя сохраняют ферментативные и антигенные свойства [30, 153, 167, 189, 291, 292].

Функция NA в репликации и созревании вируса может заключаться в способствовании отделения созревших вирусных частиц из мембран клетки-хозяина [196]. NA может также вносить изменения в круг хозяев вируса, удаляя сиаловую кислоту и раскрывая HA для кливеджа [244], и благодаря этому механизму NA является фактором вирусной нейровирулентности [269]. NA может также облегчать элюцию вируса с ингибиторных мукопротеидов, присутствующих в респираторной слизистой оболочке, позволяя тем самым вирусу найти путь к мишени — эпителиальным клеткам.

Антитела к NA не защищают от инфекции, но могут ослабить заболевание [229], поскольку они ограничивают количество циклов репликации [245, 285]. Предполагают, что активный сайт NA относительно недоступен для антитела, хотя и наблюдалось ингибирование ферментативной активности антителами в случае применения крупных субстратов, таких как фетуин, но подобного ингибирования не наблюдали при использовании небольшого субстрата — сиалиллактозы [211]. Это означает, что антитело представляет собой стерическое препятствие при приближении крупного субстрата.

Полная нуклеотидная последовательность 6-го сегмента РНК вируса гриппа А, кодирующего NA, была изучена для обоих подтипов — N1 и N2 [20, 74, 99, 164]. Изучая последовательность штамма A/PR/8/34 (N1) [74] (схему см. на рис. 6), обнаружили, что 6-й сегмент РНК содержит 1413 нуклеотидов, в том числе некодирующий 5′-участок из 20 нуклеотидов и некодирующий 3′-участок из 31 нуклеотида. Одна открытая рамка считывания из 1362 нуклеотидов кодирует 453 аминокислоты, что соответствует м.м. NA ~ 50 087 без учета углевода. Имеется 5 сайтов возможного

гликозилирования (Асп-Х-Тр или Асп-Х-Сер), а для штамма Tokyo/67 (N2) доступные данные указывают, что углеводные единицы — и комплекс N-ацетиллактозамин, и типа простого олигоманнозида — прикрепляются к аспарагиновым остаткам при помощи N-гликозидных связей [30].

Естественный гидрофобный участок молекулы NA достаточно вытянут для того, чтобы проткнуть липидный бислой вируса или клетки. Он расположен возле N-конца и состоит из 29 остатков, 18 из которых гидрофобные, а 11 — нейтральные и незаряженные. Только на основании информации о последовательности было сделано оригинальное предположение, что NA вставлена в мембрану своим N-концом [74]; это подтверждено сейчас исследованиями последовательности белка в интактных и расщепленных протеазой молекулах-«головках» [30]. Таким образом, NA ориентировочно похожа на два других гликопротеида — аминопептидазу краевой щеточки кишечника и изомальтазу [39, 165] — по наличию «растянутой сигнальной последовательности» [27, 78], которая не расщепляется и не только переносит белок через мембрану, но и остается в бислое, закрепляя белок. Данные по секвенированию белка указывают также на то, что N-терминальный метионин не удален [30]. Это обстоятельство представляет собой необычное явление.

Была также определена нуклеотидная последовательность 6-го сегмента РНК вируса гриппа В, который кодирует NA [251]; оказалось, что по структуре она похожа на NA вирусов А. Открытая рамка считывания, начинающаяся со второго кодона АУГ на 5′-конце мРНК, кодирует белок из 466 аминокислот. Первый кодон АУГ мРНК большинства эукариот, включая те или иные секвенированные гены вируса гриппа, используется в качестве инициирующего сайта для трансляции, хотя были случаи, когда первый кодон АУГ не использовался [127]. Необычным в последовательности NA вируса гриппа В является то, что за первым кодоном АУГ, отделенным от второго четырьмя нуклеотидами, следует открытая рамка считывания из 100 аминокислот, перекрывая рамку считывания NA [251]. Белковый продукт этой считывающей рамки был недавно обнаружен и в инфицированных клетках, и в результате синтеза in vitro (M. Shaw и R. Lamb, неопубликованные данные). Производная от 6-го сегмента РНК — мРНК — может быть бицистронной, так как оба белка — большой NA и меньший белок NB — синтезируются с мРНК, имеющей, по всей видимости, идентичный размер. Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей для NA вирусов гриппа А и В выявило семь областей обширной гомологии в центре молекулы NA, включая 12 консервативных цистеиновых остатков. Пять других цистеиновых остатков на терминальных участках были также консервативными [251].

Исследование биосинтеза NA оказалось более трудным по сравнению с исследованием биосинтеза HA, в частности, из-за того, что NA многих штаммов вируса мигрируют в ПААГ вместе с белком

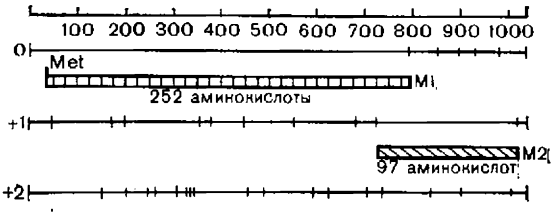
NP; кроме того, NA синтезируется в меньших количествах, чем HA. Негликозилированная NA, синтезированная in vitro, также хорошо выявляется [134, 135]. Была изучена ассоциация частично гликозилированной NA с шероховатым эндоплазматическим ретикулумом и дальнейшее гликозилирование и миграция к гладким мембранам и к плазматической мембране [52, 92, 125, 150]. Более детальный анализ, такой как был сделан для 6-го белка вируса везикулярного стоматита [226], может оказаться очень интересным в свете включения NA в мембрану N-концом.

Д. Сегмент 7 РНК: структура и синтез мембранного белка (M1) и неструктурного белка (M2)

Седьмой сегмент РНК кодирует два белка — M1 и M2, а также, возможно, небольшой пептид (M3). С 7-го сегмента РНК синтезируются три отдельные мРНК, одна из которых представляет собой колинеарный транскрипт сегмента РНК, а две другие — сплайсированные мРНК, содержащие прерывистые участки.

Мембранный (или матричный) белок (M1) — наибольший по массе белок вириона [58, 91, 123, 246, 259]. Электронная микроскопия вирионов выявила электронно-плотный слой под липидным бислоем, состоящим, по-видимому, из белка M1 [11, 13, 55]. Дополнительные доказательства того, что M1 расположен под липидным бислоем, были подтверждены наблюдениями о том, что протеолитическое расщепление вирионов удаляет шипы (HA и NA), но оставляет нетронутым белок M1 [58], а липидная экстракция фиксированных вирионов приводит к появлению лишенной шипов оболочки, наблюдаемой в электронном микроскопе [247]. Йодинизация вирионов в различных условиях показала, что белок M1 расположен хотя и не на поверхности, но снаружи относительно NP [214, 267]. Это было подтверждено опытами по флюоресцентному перемещению [155]. M1 является единственным белком в вирионе, представленным в достаточном количестве для формирования оболочки под липидным бислоем [57, 247]. Кроме обеспечения структурной стабильности оболочки вириона, M1 может также узнавать вирионные гликопротеиды и образовывать домен на внутренней поверхности плазматической мембраны, который впоследствии обеспечивает сайт связывания для сегментов РНП в процессе ассамблирования вируса [57]. При повторной сборке липида и очищенного белка M1 было обнаружено, что M1 может взаимодействовать с липидом [40, 87, 88]. M1 влияет также на чувствительность вируса к антивирусному препарату — амантадину [93, 160]. M1 является типоспецифическим антигеном для вирусов A и не имеет перекрестов с белком M вирусов B [190, 237].

Полная последовательность 7-го сегмента РНК вируса гриппа A была расшифрована для трех штаммов: PR/8/34 [5, 293], Udorn/72 [137] и FPV/Rostock/34 [169]. Сегмент РНК состоит из 1027 нуклеотидов и имеет некодирующие 5′-участок из 25 нуклеотидов и 3′-участок из 23 нуклеотидов. Белок M1 содержит 252 ами-

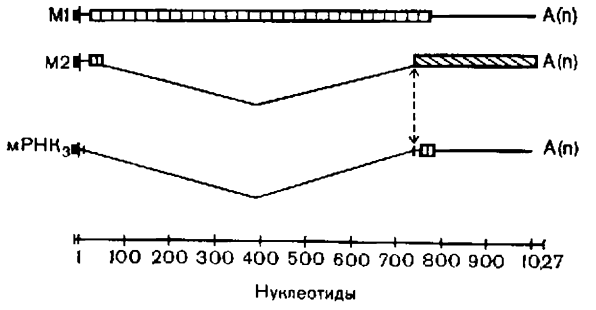


7. Схема сегмента 7 РНК вируса гриппа [137].

Терминирующие кодоны во всех трех рамках считывания показаны вертикальными линиями. Две длинные открытые рамки считывания обозначены заштрихованными в разных направлениях прямоугольниками.

нокислоты (м.м. 27 861), а предсказанная аминокислотная последовательность согласуется с расшифрованной композицией аминокислот и частичными аминокислотными последовательностями [32, 220]. Белок богат аргинином и метионином и проявляет гидрофобность, вследствие чего он растворим в хлороформ/метаноле [86]. Имеется один участок из 37 аминокислот в середине молекулы, включающей 16 гидрофобных аминокислот и только две заряженные аминокислоты. Эта область может принимать участие в гидрофобных взаимодействиях с белком или липидом.

Участок, кодирующий М1-белок, занимает только 75% длины 7-го сегмента РНК. Однако на 5′-конце сегмента вРНК расположена вторая рамка считывания, которая может кодировать 97 аминокислот и перекрывает первую рамку считывания белка М1 по 68 нуклеотидам (рис. 7) [5, 137, 293]. Белковый продукт, производимый этой рамкой считывания (М2 с м.м. 15 000), был идентифицирован в клетках, инфицированных вирусом гриппа; он кодируется 7-м сегментом РНК, как было показано в экспериментах по гибридно-сдерживаемой трансляции и анализом различных рекомбинантов [135, 197]. Полиаденилированные мРНК, выделенные из инфицированных вирусом клеток, были разделены в градиентах плотности сахарозы, и каждая фракция транслировалась in vitro с использованием экстракта пророщенной пшеницы. Было обнаружено, что белок М2 транслируется с отдельной небольшой мРНК [135]. Методом картирования при помощи нуклеазы S1 и нуклеотидным секвенированием мРНК было показано, что мРНК белка М2 содержит прерывающийся участок из 689 нуклеотидов [140]. 51 вирусспецифический нуклеотид, включающий 5′-терминальную ведущую последовательность мРНК белка М2, был таким же, как и в случае 5′-конца колинеарной мРНК белка М1. Вслед за ведущей последовательностью идет участок из 271 нуклеотида, соответствующий 3′-концу мРНК белка М1. Из-за того что последовательности 5′-концов мРНК белков М1 и М2 одинаковы и различаются только ближайшим к 5′-концу инициирующим кодоном для синтеза белка, предполагается, что первые девять аминокислот будут одинаковыми у белков М1 и М2, а идущие после них последовательности различаются. Участок мРНК белка М2 из 271 нуклеотида может быть транслирован в рамке считывания +1, а последовательность указывает на то, что белки М1 и М2 соответствуют друг другу по 14 аминокислотам [140] (рис. 8). Пока нет сведений о функции белка М2, но ясно, что эти белковые остатки присутствуют только в инфицированных клетках и отсутствуют в



8. Модель устройства мРНК для белков М1 и М2 и мРНК$_3$ для белка М и их кодирующих участков [140].

Тонкие линии на 5′- и 3′-концах мРНК представляют некодирующие участки. В области 740—1004 мРНК для белка М2 транслируется с рамки считывания, отличной от той, что используется для белка М1. Все еще не получены доказательства трансляции мРНК$_3$ для белка М. V-образными линиями обозначены прерывающиеся участки. Черные квадратики перед 1-м нуклеотидом на 5′-концах представляют гетерогенные нуклеотиды, полученные от клеточных мРНК и ковалентно связанные с вирусными последовательностями.

вирусных частицах и представляют, таким образом, узаконенный «неструктурный» белок [135]. Была обнаружена также вторая прерывающаяся мРНК (мРНК$_3$ белка М), производная от 7-го сегмента РНК [108, 140]. мРНК$_3$ белка М имеет ведущую последовательность из 11 вирусспецифических нуклеотидов, которая подобна последовательностям 5′-концов мРНК для белков М1 и М2. Далее следует участок из 271 нуклеотида, соответствующий такому же участку мРНК для белка М2. Кодирующая мощность мРНК$_3$ для белка М — около 9 аминокислот, и они должны быть идентичны С-терминальному участку мембранного белка М1 (см. рис. 8) [140]. Доказательств существования такого пептида пока нет.

Нуклеотиды в 5′- и 3′-узлах прерывающихся мРНК для белка М2 и мРНК$_3$ для белка М похожи на такие же нуклеотиды из последовательностей, присущих сплайсированным мРНК эукариот [156, 158, 181, 249]. Это свидетельствует в пользу того, что прерывающиеся мРНК, возможно, продуцируются сплайсингом колинеарной мРНК для белка М1. Доказательство возможности сплайсирования мРНК для белка М1 обеспечивается фактом использования идентичных узлов сплайсинга, когда мРНК транскрибируется с клонированной копии ДНК с 7-го сегмента РНК с применением промотора SV40 и клеточных ферментов [138].

Была определена нуклеотидная последовательность 7-го сегмента РНК вируса гриппа В; она оказалась похожей по структуре на такую же последовательность для вирусов гриппа А. 7-й сегмент РНК содержит 1191 нуклеотид, включая открытую рамку считывания из 777 нуклеотидов, кодирующих белок М1 из 248 аминокислот. Вторая кодирующая область перекрывает таковую для белка М по 86 аминокислотам в рамке считывания +2 и может кодировать максимум 195 аминокислот, но размер белкового

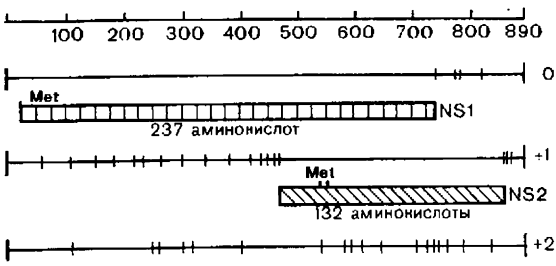
продукта зависит от того, содержит или не содержит мРНК прерывистый участок. Возможно, этот участок кодирует белок, аналогичный белку М2 вируса гриппа А, но подобный белок не был идентифицирован. Сравнение аминокислотных последовательностей белка М1 вирусов гриппа А и В выявило 63 консервативные аминокислоты. Внутренний гидрофобный домен, включающий три цистеиновых остатка в идентичном положении, также консервативен; позднее были получены доказательства его функциональной значимости [38].

Белок М1 синтезируется на свободных рибосомах [51, 92] и, поскольку у него отсутствует сигнальный пептид, его путь к плазматической мембране должен отличаться от прохождения НА и NA. Несмотря на то, что М1 был идентифицирован в различных субклеточных фракциях [51, 92, 125, 150], нет данных о том, что он мигрирует между клеточными отделами. Следовательно, его извлечение из этих клеточных фракций может оказаться артефактом.

Е. Сегмент 8 РНК: структура и синтез неструктурных белков NS1 и NS2

Самый маленький сегмент РНК вируса гриппа кодирует два белка, обнаруживаемых только в инфицированных клетках, — неструктурные белки NS1 (м.м. ~ 26 000) и NS2 (м.м. ~ 14 000). NS1 синтезируется в больших количествах в инфицированных клетках [150, 257], где скорее всего ассоциирован с полисомами, а также в ядрышке [51, 128, 129, 150]. Функция NS1 до сих пор неясна: предполагают, что он участвует в выключении синтеза белков хозяйской клетки и синтеза вирионной РНК [51, 126, 150, 298]. NS1 является фосфопротеидом; фосфат присоединен к одному или двум треониновым остаткам на молекулу [8, 207, 208, 209]. В последних стадиях инфекции для некоторых штаммов вируса гриппа NS1 образует электронно-плотную кристаллическую массу (включения) [180, 250], которая содержит также смесь разновидностей клеточных РНК [302]. Эти включения могут иметь функциональное значение, но представляется более вероятным, что они образуются исключительно из-за большого обилия белка NS1 в гибнущей клетке.

Несколько раз в инфицированных клетках наблюдали пептидно-расщепленный NS2 [77, 128, 178, 257, 268]; позднее на основании его пептидного строения и штаммоспецифических различий при миграции в ПААГ было показано, что NS2 представляет собой вирускодируемый уникальный полипептид. Эти наблюдения привели к предположению, что один сегмент вирионной РНК кодирует два белка [139]. NS2 транслируется с отдельной маленькой мРНК [111, 134], а эксперименты по гибридно-остановленной трансляции и анализ рекомбинантов определенного геномного строения выявили, что NS2 закодирован 8-м сегментом РНК [111, 134]. На основании оценок размера 8-го сегмента РНК, размеров двух



9. Схема сегмента 8 РНК вируса гриппа.

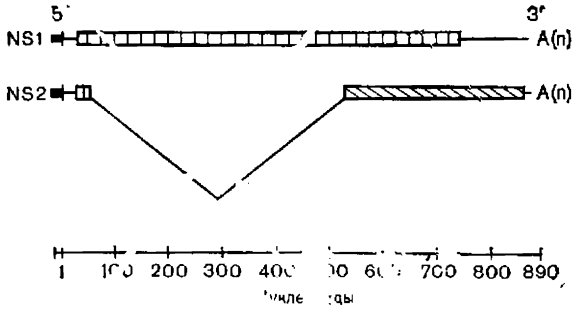
Терминирующие кодоны во всех трех рамках считывания показаны вертикальными линиями. Две длинные открытые рамки считывания обозначены заштрихованными в разных направлениях прямоугольниками.

отдельных белков NS1 и NS2, а также на основании картины задержки трансляции рестрикционными фрагментами ДНК с 8-го сегмента клонированной РНК было определено, что NS1 и NS2 могут кодироваться перекрывающимися рамками считывания [111, 134, 141]. NS2 появляется в поздних стадиях инфекции и локализуется в цитоплазме инфицированных клеток [136, 139, 163], но его функция еще неизвестна.

Полная нуклеотидная последовательность 8-го сегмента РНК была определена для нескольких штаммов [14, 15, 136, 205, 297].

Восьмой сегмент состоит из 890 нуклеотидов; после некодирующей области 5′ нуклеотидов расположена открытая рамка считывания, кодирующая белок NS1, состоящий из 230—237 аминокислот в зависимости от штамма вируса. Предсказанная последовательность аминокислот хорошо согласуется с аминокислотной структурой NS1 [250], и триптические пептиды NS1 коррелируют с предсказанной последовательностью [134, 139]. Вторая открытая рамка считывания [132] аминокислот, обнаруженная на 5′-конце 8-го сегмента вирионной РНК, была предсказана в результате экспериментов по картированию с помощью NS1, опытов по окрашенной гибридизации и по гибридной задержке трансляции с использованием клонированной ДНК 8-го сегмента РНК (рис. 9) [109, 141]. Нуклеотидное секвенирование мРНК для NS2 показало, что она содержит прерывистый участок из 473 нуклеотидов. Первые 56 вирусспецифических нуклеотидов на 5′-конце мРНК для NS2 такие же, как и в случае 5′-конца мРНК для NS1. Ведущая последовательность NS2 мРНК содержит инициирующий кодон для синтеза белка и кодирующую информацию для 9 аминокислот, которые должны быть общими для NS1 и NS2. Участок NS2 мРНК из 340 нуклеотидов может транслироваться в рамке считывания +1, а последовательность указывает, что NS1 и NS2 совпадают по 70 аминокислотам, которые транслируются с различных рамок считывания (рис. 10).

Нуклеотиды 5′- и 3′-узлов прерывистой NS2 мРНК похожи на последовательности 5′- и 3′-концов сплайсированных мРНК эукариот [156, 158, 181, 249]. Это указывает на то, что NS2 мРНК, возможно, появляются в результате сплайсинга колинеарных NS1 мРНК. Идентичный узел сплайсинга обнаружен при транскрипции мРНК с клонированной ДНК 8-го сегмента РНК, когда ис-



10. Схема устройства NS1 мРНК и NS2 мРНК [136].

Тонкие линии на 5'- и 3'-концах NS1 мРНК и NS2 мРНК представляют некодирующие участки. Заштрихованные в разных направлениях прямоугольники — кодирующие участки двух мРНК. В области 529—861 NS2 мРНК транслируется в рамке считывания, отличной от той, что используется для NS1. V-образная линия означает прерывистую последовательность в NS2 мРНК. Короткая вертикальная линия и черные квадратики перед 1-м нуклеотидом на 5'-конце представляют гетерогенные нуклеотиды, приобретенные NS1 и NS2 от производных клеточных мРНК.

пользовали промотор SV40 и клеточные ферменты [R. Lamb и C-J. Lai, в печати], что служит доказательством сплайсинга в этих нуклеотидных последовательностях.

Нуклеотидная последовательность 8-го сегмента РНК вируса гриппа В представлена 1096 нуклеотидами [36]. Она также кодирует два белка — NS1 и NS2 [37] с полным структурным сходством с такими же белками вирусов гриппа А. Белок NS1 имеет 281 аминокислоту, а NS2 обладает таким же N-концом из 10 аминокислот, что и NS1 перед узлом сплайсинга в мРНК; последующая трансляция идет с использованием рамки считывания +1. Белок NS1 вируса гриппа В имеет предположительно м.м. 32 026, но в ПААГ он мигрирует аномально с кажущейся м.м. 40 000 [37, 210]. NS1 содержит 122 аминокислоты, на одну больше, чем в случае вируса гриппа А, и 52 аминокислоты, частично совпадающие у NS1 и NS2.

Представляет интерес вопрос о том, как протекала эволюция перекрывающихся генов NS1 и NS2. G. Winter и соавт. [297] предположили, что гены NS1 и NS2 первоначально были колинеарными в вРНК, но не перекрывающимися; считывание терминатора на конце NS1 позволило затем белку NS1 стать длиннее и использовать бо́льшую из возможных рамок считывания. В подтверждение этой концепции было обнаружено следующее: 1) длина белка NS1 изменяется в зависимости от штамма вируса; 2) мутантный вирус синтезирует укороченный белок NS1 (ts47 [10]), однако кажется, что он реплицируется нормально при непермиссивной температуре; 3) сравнение нуклеотидных изменений в различных штаммах вируса приводит к выводу, что в области совпадения у NS1 и NS2 аминокислотная последовательность NS2 консервативна за счет NS1 [15, 136]. Эти данные свидетельствуют о том, что С-терминальный участок NS1 несущественен для его функции.

Изучение нуклеотидной последовательности 8-го сегмента РНК вирусов A/PR/8/34, A/Udorn/72 и A/FPV/Rostock/34 показало, что негативная (в смысле вириона) нить имеет инициирующий кодон в положении 98 на 5′-конце и открытую рамку считывания, простирающуюся на 167 или 216 аминокислот [15]. Предполагают, что такая рамка считывания, которая статистически должна существовать с крайне малой вероятностью, может транслироваться [15]. Однако 8-е сегменты РНК вирусов A/утка/Alberta/60/76 [14] и B/Lee/40 [36] не содержали открытой рамки считывания и, следовательно, непохоже, что они кодируют необходимые вирусные белки.

Ж. Перекрывающиеся кодирующие области, использующие различные рамки считывания у вирусов

Бо́льшая часть полипептида NS2 вируса гриппа транслируется с рамки считывания, отличающейся от той, что используется для трансляции NS1. У вирусов гриппа A NS2 совпадает с NS1 по 70 аминокислотам, а у вирусов B — по 52 аминокислотам [36, 136]. Бо́льшая часть полипептида M2 также транслируется с рамки считывания, отличной от той, что используется для M1; M1 и M2 совпадают по 14 аминокислотам [140]. Ранее было обнаружено использование перекрывающихся рамок считывания у похожих бактериофагов ØX174 и G4 [17, 252], у бактериофага Qβ [12, 21], у большого и среднего T-антигенов вируса полиомы [266] и в VP2,3 и VP1 вируса SV40 и вируса полиомы [60, 265]. Пока неизвестно, имеет ли место столь эффективное использование геномов только у бактериофагов и вирусов с небольшими геномами или также у эукариот.

Список литературы

1. *Ada G., Perry B.* — Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1954, v. 32, p. 453—468.
2. *Air G.* — Virology, 1979, v. 97, p. 468—472.
3. *Air G.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 7639—7643.
4. *Air G., Hackett J.* — Virology, 1980, v. 103, p. 291—298.
5. *Allen H., McCauley J., Waterfield M., Gething M.* — Virology, 1980, v. 107, p. 548—551.
6. *Almeida J., Brand C.* — J. Gen. Virol., 1975, v. 27, p. 313—318.
7. *Almond J., Barry R.* — Virology, 1979, v. 92, p. 407—415.
8. *Almond J., Felsenreich V.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 60, p. 295—305.
9. *Almond J., McGeoch D., Barry R.* — Virology, 1977, v. 81, p. 62—73.
10. *Almond J., McGeoch D., Barry R.* — Virology, 1979, v. 92, p. 416—427.
11. *Apostolov K., Felwett T.* — Virology, 1965, v. 26, p. 506—508.
12. *Atkins J., Steitz J., Anderson C., Model P.* — Cell, 1979, v. 18, p. 247—256.
13. *Bachi T., Gerhard W., Lindermann J., Muhlethaler K.* — J. Virol., 1969, v. 4, p. 769—776.
14. *Baez M., Zazra J., Ellictt R. et al.* — Virology, 1981, v. 113, p. 397—402.

15. *Baez M., Tausstg R., Zazra J. et al.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 5845—5858.
16. *Baltimore D.* — Bacteriol. Rev., 1971, v. 35, p. 235—241.
17. *Barrell B., Air G., Hutchinson C.* — Nature, 1976, v. 264, p. 34—41.
18. *Barry R.* — Virology, 1961, v. 14, p. 398—405.
19. *Bean W., Simpson R.* — J. Virol., 1976, v. 18, p. 365—369.
20. *Bently D., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 5033—5042.
21. *Beremand M., Blumenthal T.* — Cell, 1979, v. 18, p. 257—266.
22. *Bishop D., Hudaleston J., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 1335—1343.
23. *Bishop D., Obijeski J., Simpson R.* — J. Virol., 1971, v. 8, p. 74—80.
24. *Bishop D., Jones K., Huddleston J., Brownlee G.* — Virology, 1982, v. 120, p. 481—489.
25. *Bishop D., Roy P., Bean W., Simpson R.* — J. Virol., 1972, v. 10, p. 689—697.
26. *Blass D., Patzelt E., Keuchler E.* — Virology, 1982, v. 116, p. 339—348.
27. *Blobel G.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 1496—1500.
28. *Blok J., Air G.* — Virology, 1980, v. 107, p. 50—60.
29. *Blok J., Air G.* — Virology, 1982, v. 121, p. 211—229.
30. *Blok J., Air G., Laver W. et al.* — Virology, 1982, v. 119, p. 109—121.
31. *Bosch F., Orlich M., Klenk H.-D., Rott R.* — Virology, 1979, v. 95, p. 197—207.
32. *Both G., Air G.* — Eur. J. Biochem., 1979, v. 96, p. 363—372.
33. *Both G., Sleigh M.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 2561—2575.
34. *Both G., Sleigh M.* — J. Virol., 1981, v. 39, p. 663—672.
35. *Brand C., Skehel J.* — Nature New Biol., 1972, v. 238, p. 145—147.
36. *Briedis D., Lamb R.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 186—193.
37. *Briedis D., Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1981, v. 112, p. 417—425.
38. *Briedis D., Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1982, v. 116, p. 581—588.
39. *Brunner J., Hauser H., Braun H. et al.* — J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 1821—1828.
40. *Bucher D., Kharitonenkow L., Zakomiridin J. et al.* — J. Virol., 1980, v. 36, p. 586—590.
41. *Burnett F., Lind P.* — J. Gen. Microbiol., 1951, v. 5, p. 59—66.
42. *Burnett F., Lind P.* — Nature, 1954, v. 173, p. 627—630.
43. *Caton A., Robertson J.* — Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, p. 1445—1456.
44. *Caton A., Robertson J.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 2591—2603.
45. *Choppin P., Pons M.* — Virology, 1970, v. 42, p. 603—610.
46. *Choppin P., Murphy J., Stoeckenius J.* — Virology, 1961, v. 13, p. 549—550.
47. *Choppin P., Murphy J., Tamm I.* — J. Exp. Med., 1960, v. 112, p. 945—952.
48. *Choppin P., Compans R., Scheid A. et al.* — In: Membrane Research. N. Y.: Academic Press, 1972, p. 163—179.
49. *Chow N., Simpson R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, p. 752—756.
50. *Colman P., Tulloch P., Laver W.* — In: Structure and Variation in Influenza Viruses. N. Y.: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 351—356.
51. *Compans R.* — Virology, 1973, v. 51, p. 56—70.
52. *Compans R.* — Virology, 1973, v. 55, p. 541—545.
53. *Compans R., Caliguiri L.* — J. Virol., 1973, v. 11, p. 441—448.
54. *Compans R., Choppin P.* — In: Comprehensive Virology, Vol. IV. N. Y.: Plenum Press, 1975, p. 179—252.
55. *Compans R., Dimmock N.* — Virology, 1960, v. 39, p. 499—515.
56. *Compans R., Bishop D., Meier-Ewert H.* — J. Virol., 1977, v. 21, p. 658—665.
57. *Compans R., Content J., Deusberg P.* — J. Virol., 1972, v. 10, p. 795—800.
58. *Compans R., Klenk H., Caliguiri L., Choppin P.* — Virology, 1970, v. 42, p. 880—889.

59. *Compans R., Roth M., Alonso F.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y.: Academic Press, 1981, p. 213—231.
60. *Contreras R., Rogiers R., Van De Voorde A., Fiers W.* — Cell, 1977, v. 12, p. 529—538.
61. *Cox N., Kendal A.* — Virology, 1976, v. 74, p. 239—241.
62. *Davis P., Barry R.* — Nature, 1966, v. 211, p. 384—387.
63. *Desselberger U., Palese P.* — Virology, 1978, v. 88, p. 394—399.
64. *Desselberger U., Racaniello V., Zazra J., Palese P.* — Gene, 1980, v. 8, p. 315—328.
65. *Dhar R., Chanock R., Lai C.-J.* — Cell, 1980, v. 21, p. 495—500.
66. *Dopheide T., Ward C.* — Eur. J. Biochem., 1978, v. 85, p. 393—398.
67. *Duesberg P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1968, v. 59, p. 930—937.
68. *Duesberg P.* — J. Mol. Biol., 1969, v. 42, p. 485—499.
69. *Duesberg P., Robinson W.* — J. Mol. Biol., 1967, v. 25, p. 383—405.
70. *Elder K., Bye J., Skehel J. et al.* — Virology, 1979, v. 95, p. 343—350.
71. *Emtage J., Catlin G., Carey N.* — Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 1221—1239.
72. *Fang R., Min Jou W., Huylebroeck D. et al.* — Cell, 1981, v. 25, p. 315—323.
73. *Fields, Winter G.* — Cell, 1982, v. 28, p. 303—313.
74. *Fields S., Winter G., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 290, p. 213—217.
75. *Flanagan M., Skehel J.* — FEBS Lett., 1977, v. 80, p. 57—60.
76. *Floyd R., Stone M., Joklik W.* — Analyt. Biochem., 1974, v. 59, p. 599—609.
77. *Follett E., Pringle C., Wunner W., Skehel J.* — J. Virol., 1974, v. 13, p. 394—399.
78. *Frank G., Brunner J., Hauser H. et al.* — FEBS Lett., 1978, v. 96, p. 183—188.
79. *Garten W., Bosch F., Linder D. et al.* — Virology, 1981, v. 115, p. 361—374.
80. *Gerhard W., Yewdell J., Frankel M.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus. N. Y.: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 273—280.
81. *Gething M., Bye J., Skehel J., Waterfield M.* — Nature, 1980, v. 287, p. 301—306.
82. *Gething M., White J., Waterfield M.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 2737—2740.
83. *Ghendon Y., Markushin S., Marchenko A.* et al. (Гендон Ю., Маркушин С., Марченко А. и др.). — Virology, 1973, v. 66, p. 454—463.
84. *Goldstein E., Pons M.* — Virology, 1970, v. 41, p. 382—384.
85. *Gottschalk A.* — Biochim. Biophys. Acta, 1957, v. 23, p. 645—646.
86. *Gregoriades A.* — Virology, 1973, v. 54, p. 369—383.
87. *Gregoriades A.* — J. Virol., 1980, v. 36, p. 470—479.
88. *Gregoriades A., Frangione B.* — J. Virol., 1981, v. 40, p. 323—328.
89. *Griffith I.* — In: Negative Strand Viruses. Vol. 1, London: Academic Press, 1975, p. 121—132.
90. *Glonenborn E., Messing J.* — Nature, 1978, v. 272, p. 375—377.
91. *Haslam E., Hampson A., Radiskevics I., White D.* — Virology, 1970, v. 42, p. 555—565.
92. *Hay A.* — Virology, 1974, v. 60, p. 398—418.
93. *Hay A., Kennedy N., Skehel J., Appleyard G.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 42, p. 189—191.
94. *Heggeness M., Smith P., Ulmanen I. et al.* — Virology, 1982, v. 118, p. 466—470.
95. *Hirst G.* — Science, 1941, v. 94, p. 22—23.
96. *Hirst G.* — J. Exp. Med., 1942, v. 75, p. 47—64.
97. *Hirst G.* — J. Exp. Med., 1950, v. 91, p. 177—184.
98. *Hirst G.* — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1962, v. 27, p. 303—309.
99. *Hiti A., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 41, p. 730—734.
100. *Hiti A., Davis A., Nayak D.* — Virology, 1981, v. 3, p. 113—124.
101. *Hornsberger M.* — Virology, 1980, v. 107, p. 302—305.

102. *Horne R., Waterson A., Wildy P., Farnham A.* — Virology, 1960, v. 11, p. 79—98.
103. *Horst J., Content J., Mandeles S. et al.* — J. Mol. Biol., 1972, v. 69, p. 209—215.
104. *Hoyle L., Horne R., Waterson A.* — Virology, 1961, v. 13, p. 448—459.
105. *Huang R., Rott R., Klenk H.-D.* — Virology, 1981, v. 110, p. 243—247.
106. *Huang R., Wahn K., Klenk H.-D., Rott R.* — Virology, 1980, v. 104, p. 294—302.
107. *Huddleston J., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 1029—1038.
108. *Inglis S., Brown C.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 9, p. 2727—2740.
109. *Inglis S., Gething M.-J., Brown C.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 3575—3589.
110. *Inglis S., McGeoch D., Mahy B.* — Virology, 1977, v. 78, p. 522—536.
111. *Inglis S., Barret T., Brown C., Almond J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 3790—3794.
112. *Inglis S., Carroll A., Lamb R., Mahy B.* — Virology, 1976, v. 74, p. 489—503.
113. *Kamata T., Wantanabe Y.* — Nature, 1977, v. 267, p. 460—462.
114. *Kaptein J., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 55—63.
115. *Keil W., Klenk H.-D., Schwarz R.* — J. Virol., 1979, v. 31, p. 253—256.
116. *Kendal A.* — Virology, 1975, v. 65, p. 87—99.
117. *Kilbourne E.* (ed.) The influenza viruses and influenza. N. Y.: Academic Press, 1975.
118. *Kingsbury D., Webster R.* — J. Virol., 1969, v. 4, p. 219—225.
119. *Klenk H.-D., Choppin P.* — Virology, 1969, v. 38, p. 255—268.
120. *Klenk H.-D., Choppin P.* — Virology, 1970, v. 40, p. 939—947.
121. *Klenk H.-D., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 66, p. 57—64.
122. *Klenk H.-D., Compans R, Choppin P.* — Virology, 1970, v. 42, p. 1158—1162.
123. *Klenk H.-D., Scholtissek C., Rott R.* — Virology, 1972, v. 49, p. 723—734.
124. *Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Biodorn J.* — Virology, 1975, v. 68, p. 426—439.
125. *Klenk H.-D., Wollert W., Rott R., Scholtissek C.* — Virology, 1974, v. 57, p. 28—41.
126. *Koennecke I., Boschek C., Scholtissek C.* — Virology, 1981, v. 110, p. 16—25.
127. *Kozak M.* — In: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 93, p. 81—123. Berlin — Heidelberg — N. Y.: Springer, 1981.
128. *Krug R., Etkind P.* — Virology, 1973, v. 56, p. 334—348.
129. *Krug R., Soeiro R.* — Virology, 1975, v. 64, p. 378—387.
130. *Krug R., Ueda M., Palese P.* — J. Virol., 1975, v. 16, p. 790—796.
131. *Krystal M., Elliott R., Benz E. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 4800—4804.
132. *Lai C.-J., Markoff L., Zimmerman S. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 210—214.
133. *Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1976, v. 74, p. 504—519.
134. *Lamb R., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 4908—4912.
135. *Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1981, v. 112, p. 729—737.
136. *Lamb R., Lai C.-J.* — Cell, 1980, v. 21, p. 475—485.
137. *Lamb R., Lai C.-J.* — Virology, 1981, v. 112, p. 746—751.
138. *Lamb R., Lai C.-J.* — Virology, 1982, v. 123, p. 237—256.
139. *Lamb R., Etkind P., Choppin P.* — Virology, 1978, v. 91, p. 60—78.
140. *Lamb R., Lai C.-J., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 4170—4174.
141. *Lamb R., Choppin P., Chanock R., Lai C.-J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 1857—1861.
142. *Laver W.* — J. Mol. Biol., 1964, v. 9, p. 109—124.

143. *Laver W.* — Virology, 1971, v. 45, p. 275—288.
144. *Laver W., Kilbourne E.* — Virology, 1966, v. 30, p. 493—501.
145. *Laver W., Valentine R.* — Virology, 1969, v. 38, p. 105—119.
146. *Laver W., Air G., Webster R.* — J. Mol. Biol., 1981, v. 145, p. 339—361.
147. *Laver W., Air G., Dopheide T., Ward C.* — Nature, 1980, v. 283, p. 454—457.
148. *Laver W., Gerhard W., Webster R. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 1425—1429.
149. *Lazarowitz S., Choppin P.* — Virology, 1975, v. 68, p. 440—454.
150. *Lazarowitz S., Compans R., Choppin P.* — Virology, 1971, v. 46, p. 830—843.
151. *Lazarowitz S., Compans R., Choppin P.* — Virology, 1973, v. 52, p. 199—212.
152. *Lazarowitz S., Goldberg A., Choppin P.* — Virology, 1973, v. 56, p. 172—180.
153. *Lazdins I., Haslam E., White D.* — Virology, 1972, v. 49, p. 758—765.
154. *Lenard J., Miller D.* — Virology, 1981, v. 110, p. 479—482.
155. *Lenard J., Wong C., Compans R.* — Biochim. Biophys. Acta, 1974, v. 332, p. 341—349.
156. *Lerner M., Boyle J., Mount S. et al.* — Nature, 1980, v. 283, p. 220—224.
157. *Lewandowski L., Content J., Leppla S.* — J. Virol., 1971, v. 8, p. 701—710.
158. *Lewin B.* — Cell, 1980, v. 22, p. 324—326.
159. *Lin B.-C., Lai C.-J.* — J. Virol., 1982, v. 45, p. 434—438.
160. *Lubeck M., Schulman J., Palese P.* — J. Virol., 1978, v. 28, p. 710—716.
161. *Mackenzie J.* — J. Gen. Virol., 1970, v. 6, p. 63—75.
162. *Maeda T., Kawasaki K., Ohnishi S.-I.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 4133—4137.
163. *Mahy B., Barrett T., Briedis D. et al.* — Phil. Trans. R. Soc., 1980, v. B288, p. 349—357.
164. *Markoff L., Lai C.-J.* — Virology, 1982, v. 119, p. 288—297.
165. *Maroux S., Louvard D.* — Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 419, p. 189—195.
166. *Matlin K., Reggio H., Helenius A., Simons K.* — J. Cell. Biol., 1981, v. 91, p. 601—613.
167. *Mayron L., Robert B., Winzler R., Rafelson M.* — Arch. Biochem. Biophys., 1961, v. 92, p. 475—483.
168. *Maxam A., Gilbert W.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 560—564.
169. *McCauley J., Mahy B., Inglis S.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 58, p. 211—215.
170. *McCauley J., Skekel J., Elder K. et al.* — In: Structure and Variation in Influenza Viruses. N. Y.: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 97—104.
171. *McCauley J., Bye J., Elder K. et al.* — FEBS Lett., 1979, v. 108, p. 422—428.
172. *McClelland L., Hare R.* — Can. J. Public Hlth, 1941, v. 32, p. 530—538.
173. *McGeoch D., Fellner P., Newton C.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 3045—3049.
174. *McMaster G., Carmichael G.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 4835—4838.
175. *Meier-Ewert H., Compans R., Bishop D., Herrler G.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. London: Academic Press, 1978, p. 127—133.
176. *Mills J., Chanock R.* — J. Infect. Dis., 1971, v. 123, p. 145—157.
177. *Min Jou W., Carey N., Emtage S.* — Cell, 1980, v. 19, p. 683—696.
178. *Minor P., Dimmock N.* — Virology, 1975, v. 67, p. 114—123.
179. *Morgan C., Hsu K., Rifkind R. et al.* — J. Exp. Med., 1961, v. 114, p. 825—837.
180. *Morrongiello M., Dales S.* — Intervirology, 1977, v. 8, p. 281—293.
181. *Mount S.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 459—472.

182. *Murphy J., Bang F.* — J. Exp. Med., 1952, v. 95, p. 259—271.
183. *Murti K., Bean W., Webster R.* — Virology, 1980, v. 104, p. 224—229.
184. *Nakajima S., Sugiura A.* — Virology, 1980, v. 101, p. 450—457.
185. *Nakamura K., Compans R.* — Virology, 1978, v. 86, p. 432—442.
186. *Nakamura K., Compans R.* — Virology, 1979, v. 95, p. 8—23.
187. *Nakamura K., Herrler G., Petri T. et al.* — J. Virol., 1979, v. 29, p. 997—1005.
188. *Nerome K., Ishida M.* — J. Gen. Virol., 1978, v. 39, p. 179—181.
189. *Noll H., Aoyagi T., Orlando J.* — Virology, 1962, v. 18, p. 154—157.
190. *Oxford J., Schild G.* — Virology, 1976, v. 74, p. 394—402.
191. *Palese P., Schulman J.* — Virology, 1974, v. 57, p. 227—237.
192. *Palese P., Schulman J.* — J. Virol., 1976, v. 17, p. 876—884.
193. *Palese P., Schulman J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 2142—2146.
194. *Palese P., Ritchey M., Schulman J.* — Virology, 1977, v. 76, p. 114—121.
195. *Palese P., Ritchey M., Schulman J.* — J. Virol., 1977, v. 21, p. 1187—1195.
196. *Palese P., Tohita K., Ueda M., Compans R.* — Virology, 1974, v. 61, p. 397—410.
197. *Palese P., Elliott R., Baez M. et al.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y.: Academic Press, 1981, p. 127—140.
198. *Penn C., Blass D., Kuechler E., Mahy B.* — J. Gen. Virol., v. 62, p. 177—180.
199. *Petri T., Dimmock N.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 57, p. 185—190.
200. *Plotch S., Bouloy M., Ulmanen I., Krug R.* — Cell, 1981, v. 23, p. 847—858.
201. *Pons M.* — Virology, 1971, v. 46, p. 149—160.
202. *Pons M.* — Virology, 1976, v. 69, p. 789—792.
203. *Pons M., Hirst G.* — Virology, 1968 , v. 34, p. 385—388.
204. *Pons M., Schultze I., Hirst G.* — Virology, 1969, v. 39, p. 250—259.
205. *Porter A., Smith J., Emtage J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 5074—5078.
206. *Porter A., Barber C., Carey N. et al.* — Nature, 1979, v. 282, p. 471—477.
207. *Privalsky M., Penhoet E.* — J. Virol., 1977, v. 24, p. 401—405.
208. *Privalsky M., Penhoet E.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 3625—3629.
209. *Privalsky M., Penhoet E.* — J. Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 5368—5376.
210. *Rancaniello V., Palese P.* — J. Virol., 1979, v. 29, p. 361—373.
211. *Rafelson M., Schneir M., Wilson V.* — Arch. Biochem. Biophys., 1963, v. 103, p. 424—430.
212. *Rees P., Dimmock N.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 53, p. 125—132.
213. *Richardson C., Scheid A., Choppin P.* — Virology, 1980, v. 105, p. 205—222.
214. *Rifkin D., Compans R., Reich E.* — J. Biol. Chem., 1972, v. 247, p. 6432—6437.
215. *Ritchey M., Palese P., Kilbourne E.* — J. Virol., 1976, v. 18, p. 738—744.
216. *Ritchey M., Palese P., Schulman J.* — J. Virol., 1976, v. 20, p. 307—313.
217. *Ritchey M., Palese P., Schulman J.* — Virology, 1977, v. 76, p. 122—128.
218. *Robertson J.* — Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 3745—3757.
219. *Robertson J., Schubert M., Lazzarini R.* — J. Virol., 1981, v. 38, p. 157—163.
220. *Robertson B., Bhown A., Compans R., Bennett J.* — J. Virol., 1979, v. 30, p. 759—766.
221. *Rochovansky O.* — Virology, 1976, v. 73, p. 327—338.
222. *Rohde W., Harms E., Scholtissek C.* — Virology, 1977, v. 79, p. 393—404.
223. *Rodriguez-Boulan E., Sabatini E.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 5071—5075.
224. *Rohde W., Harms E., Scholtissek C.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. London: Academic Press, 1978, p. 11—17.

225. *Roth M., Fitzpatrick J., Compans R.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1979, v. 76, p. 6430.
226. *Rothman J., Fries E., Danphy W., Urbani L.* — Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. Vol. XLVI, 1982, p. 797—805.
227. *Rott R.* — Arch. Virol., 1979, v. 59, p. 285—298.
228. *Rott R., Klenk H.-D.* — In: Virus infection and the cell surface. Cell surface news. Vol. 2. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1977, p. 47—81.
229. *Rott R., Becht H., Orlich M.* — J. Gen. Virol., 1974, v. 22, p. 35—41.
230. *Rott R., Reinacher M., Orlich M., Klenk H.-D.* — Arch. Virol., 1980, v. 65, p. 123—133.
231. *Sanger F., Brownlee G., Barrell B.* — J. Mol. Biol., 1965, v. 13, p. 373—398.
232. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5463—5467.
233. *Sanger F., Coulson A., Barrell B. et al.,* — J. Mol. Biol., 1980, v. 143, p. 161—178.
234. *Scheid A., Choppin P.* — Virology, 1974, v. 57, p. 475—490.
235. *Scheid A., Choppin P.* — Virology, 1977, v. 80, p. 54—66.
236. *Scheid A., Graves M., Silver S., Choppin P.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. London: Academic Press, 1978, p. 181—193.
237. *Schild G.* — J. Gen. Virol., 1972, v. 15, p. 99—103.
238. *Schild G., Oxford J., Newman R.* — Virology, 1979, v. 93, p. 569—573.
239. *Scholtissek C., Bowles A.* — Virology, 1975, v. 67, p. 576—587.
240. *Scholtissek C., Rott R.* — Virology, 1964, v. 22, p. 169—179.
241. *Scholtissek C., Kruczinna R., Rott R., Klenk H.-D.* — Virology, 1974, v. 58, p. 317—322.
242. *Scholtissek C., Harms E., Rohde W. et al.,* — Virology, 1976, v. 74, p. 332—344.
243. *Schulman J., Palese P.* — J. Virol., 1976, v. 20, p. 248—254.
244. *Schulman J., Palese P.* — J. Virol., 1977, v. 24, p. 170—176.
245. *Schulman J., Kharpour M., Kilbourne E.* — J. Virol., 1968, v. 2, p. 778—786.
246. *Schultze I.* — Virology, 1970, v. 42, p. 890—904.
247. *Schultze I.* — Virology, 1972, v. 47, p. 181—196.
248. *Schwarz R., Schmidt M., Anwer U., Klenk H.-D.* — J. Virol., 1977, v. 23, p. 217—226.
249. *Seif I., Khoury G., Dhar R.* — Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 3387—3398.
250. *Shaw M., Compans R.* — J. Virol., 1978, v. 25, p. 605—615.
251. *Shaw M., Lamb R., Erickson B. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 6817—6871.
252. *Shaw D., Walker J., Northrop F. et al.* — Nature, 1978, v. 272, p. 510—515.
253. *Simpson R., Hirst G.* — Virology, 1961, v. 15, p. 436—451.
254. *Simpson R., Hirst G.* — Virology, 1968, v. 35, p. 41—49.
255. *Sippel A.* — Eur. J. Biochem., 1973, v. 37, p. 31—40.
256. *Sivasubramanian N., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 44, p. 321—329.
257. *Skehel J.* — Virology, 1972, v. 49, p. 23—36.
258. *Skehel J., Hay A.* — Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 1207—1219.
259. *Skehel J., Schild G.* — Virology, 1971, v. 44, p. 396—408.
260. *Skehel J., Waterfield M.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 93—97.
261. *Skehel J., Bayley P., Brown E. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 968—972.
262. *Sleigh M., Both G., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 1309—1321.
263. *Sleigh M., Both G., Brownlee G. et al.* — In: Structure and variation in Influenza Viruses. N. Y.: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 69—79.
264. *Smith J., Carey N., Fellner P. et al.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. London: Academic Press, 1978, p. 37—46.

265. *Soeda E., Arrand J., Griffin B.* — J. Virol., 1980, v. 33, p. 619—630.
266. *Soeda E., Arrand J., Smolar N., Griffin B.* — Cell, 1979, v. 17, p. 357—370.
267. *Stanley P., Haslam E.* — Virology, 1971, v. 46, p. 764—773.
268. *Stephenson J., Hay A., Skehel J.* — J. Gen. Virol., 1977, v. 36, p. 237—248.
269. *Sugiura A., Ueda M.* — Virology, 1980, v. 101, p. 440—449.
270. *Sugiura A., Tobita K., Kilbourne E.* — J. Virol., 1972, v. 10, p. 639—647.
271. *Sveda M., Markoff L., Lai C.-J.* — Cell, 1982, v. 30, p. 649—656.
272. *Taniguchi T., Palmieri M., Weissmann C.* — Nature, 1978, v. 274, p. 223—228.
273. *Ueda M.* — Arch. ges. Virusforsch., 1972, v. 39, p. 360—368.
274. *Ulmanen I., Broni B., Krug R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v 78, p. 7355—7359.
275. *Ulmanen I., Broni B., Krug R.* — J. Virol., 1983, v. 45, p. 27—35.
276. *Van Rompay L., Min Jou W., Huylebroeck D. et al.* — Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, p. 347—353.
277. *Van Wyke K., Hinshaw V., Bean W., Webster R.* — J. Virol., 1980, v. 35, p. 24—30.
278. *Varghese J., Laver W., Colman P.* — Nature, 1983, v. 303, p. 35—40.
279. *Verhoeyen M., Fang R., Min Jou W. et al.* — Nature, 1980, v. 286, p. 771—776.
280. *Ward C.* — In: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 95/95. Berlin — Heidelberg — N. Y.: Springer, 1981, p. 1—74.
281. *Ward C., Dopheide T.* — Brit. Med. Bull., 1979, v. 35, p. 51—56.
282. *Ward C., Dopheide T.* — Biochem. J., 1981, v. 193, p. 953—962.
283. *Waterfield M., Espelie K., Elder K., Skehel J.* — Brit. Med. Bull., 1979, v. 35, p. 57—63.
284. *Waterfield M., Gething M.-J., Scrace G., Skehel J.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus. N.. Y.: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 11—20.
285. *Webster R., Laver W.* — J. Immunol., 1967, v. 99, p. 49—55.
286. *Webster R., Laver W.* — Virology, 1980, v. 104, p. 139—148.
287. *Webster R., Laver W., Air G., Schild G.* — Nature, 1982, v. 296, p. 115—121.
288. *White J., Kartenbeck J., Helenius A.* — EMBO Journal, 1982, v. 1, p. 217—222.
289. *Wiley D., Skehel J., Waterfield M.* — Virology, 1977, v. 79, p. 446—448.
290. *Wiley D., Wilson I., Skehel J.* — Nature, 1981, v. 298, p. 373—378.
291. *Wilson V., Rafelson M.* — Biochem. Prep., 1963, v. 10, p. 113—117.
292. *Wilson I., Skehel J., Wiley D.* — Nature, 1981, v. 289, p. 366—373.
293. *Winter. G., Fields S.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 1965—1974.
294. *Winter G., Fields S.* — Virology, 1981, v. 114, p. 423—428.
295. *Winter G., Fields S.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 2135—2143.
296. *Winter G., Fields S., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 292, p. 72—75.
297. *Winter G., Fields S., Gait M., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, p. 237—245.
298. *Wolstenholme A., Barrett T., Nichol S., Mahy B.* — J. Virol., 1980, v. 35, p. 1—7.
299. *Wrigley N., Laver W., Downie J.* — J. Mol. Biol., 1977, v. 109, p. 405—421.
300. *Wrigley N., Skehel J., Charlwood P., Brand C.* — Virology, 1973, v. 51, p. 525—529.
301. *Yewdell J., Webster R., Gerhard W.* — Nature, 1979, v. 279, p. 246—248.
302. *Yoshida T., Shaw M., Young J., Compans R.* — Virology, 1981, v. 110, p. 87—97.
303. *Young R., Content J.* — Nature New Biol., 1971, v. 230, p. 140—142.
304. *Young J., Desselberg U., Graves P. et al.* — In: The Origin of Pandemic Viruses. N. Y.: Elsevier/North-Holland, 1983.

3

Транскрипция и репликация вируса гриппа

Р. Краг (R. Krug)

I. Введение

Известно, что сегментированный РНК-геном вируса гриппа имеет отрицательную полярность, т. е. вирусная мессенджер-РНК (мРНК) комплементарна геномной (вирионной) РНК (вРНК), а вирион имеет систему ферментов, которая транскрибирует вРНК в вирусную мРНК [75]. В процессе синтеза мРНК вируса гриппа происходит ее уникальное взаимодействие с транскрибирующим механизмом клетки-хозяина в ядре инфицированной клетки. В первую очередь это взаимодействие необходимо для инициации синтеза цепей вирусных мРНК. Вирусная эндонуклеаза отщепляет 5′-терминальные фрагменты от только что синтезированных кэппированных (m^7 GpppNm-содержащих) клеточных РНК в ядре. Вероятнее всего, это гетерогенные ядерные РНК (гяРНК) — предшественники клеточных мРНК [33, 42, 77]. Указанные фрагменты кэппированных ядерных РНК клетки-хозяина являются праймерами инициации синтеза вирусных мРНК. Взаимодействие с функциями ядер клетки-хозяина, очевидно, продолжается и после синтеза вирусных мРНК. Вирусные мРНК, подобно другим мРНК (вирусным и клеточным), синтезируются в ядре [81], содержат внутренние N6-метил-аденозин (m^6A) остатки [43, 46]. Некоторые вирусные мРНК появляются в результате сплайсирования, подобно тому, как это происходит в процессе образования клеточных мРНК из гяРНК [5]. Более вероятно, что внутреннее метилирование и сплайсирование мРНК вируса гриппа осуществляется в ядре ферментами, которые управляют клеточной РНК.

Поскольку вирусные мРНК на своих 5′концах несут последовательности клеточного происхождения и не имеют комплементарных последовательностей к последним 17—22 нуклеотидам на 5′-концах сегментов вРНК [29, 31, 42], вирусные мРНК не являются подходящими матрицами для синтеза вРНК (т. е. репликации). Предполагаемые матрицы для репликации вРНК — транскрипты во всю длину сегментов вРНК. Эти транскрипты, в которых отсутствовали 3′-терминальные полиаденилатные последовательности — поли(А), содержали только 5% синтезированных в инфицированных клетках вирусных транскриптов [29]. Синтез транскриптов во

всю длину сегментов вРНК требует синтеза одного или более вирускодированных белков. Инициация таких транскриптов происходит без праймера [32]. Кроме того, окончание транскрипции, которая осуществляется во время синтеза 17—22 нуклеотидов вирусной мРНК от 5′-конца вРНК, должно быть предотвращено. Очень мало известно о синтезе вРНК, управляемом такими транскриптами во всю длину сегментов вРНК.

В данной главе представлены современные данные о синтезе трех типов вируспецифических РНК — вирусной мРНК, транскриптов во всю длину сегментов вРНК и вирусной РНК — и обсуждены многие из оставшихся необъясненными вопросов.

II. Синтез вирусных мРНК

A. Праймирование клеточными кэппированными РНК — открытие

Известные в настоящий момент собранные за многие годы данные подтверждают положение о том, что вирус гриппа является уникальным среди неонкогенных РНК-содержащих вирусов, поскольку он требует функционирования ядерной РНК-полимеразы II клетки-хозяина, т. е. фермента, который синтезирует предшественников клеточных мРНК [5, 52, 64, 85, 95]. Наиболее определенное доказательство по этому поводу представляет тот факт, что α-аманитин — специфический ингибитор РНК-полимеразы II — ингибирует репликацию вируса и что в мутантных клетках, содержащих α-аманитинустойчивую РНК-полимеразу II, репликация вируса также не ингибируется этим химическим веществом [52, 85, 95]. Было показано, что активность РНК-полимеразы II необходима для транскрипции вирусной РНК даже при первичной транскрипции, так как при добавлении в начале инфекции α-аманитин ингибирует всю обнаруживаемую транскрипцию вирусной РНК [67].

На основе изучения транскрипции, катализируемой in vitro вирионассоциированной транскриптазой, было дано объяснение факту необходимости РНК-полимеразы II. Обнаружено, что вирионная транскриптаза не может эффективно инициировать синтез РНК без добавления праймера. В первых экспериментах установлено, что специфические динуклеозидмонофосфаты (АрГ или ГрГ) при относительно высоких концентрациях (около 0,2 мМ) работают как праймеры применительно к инициации синтеза цепей [68, 78]. Транскрипция весьма существенно стимулируется (в 100 раз) АрГ или ГрГ [68, 78], и конечные транскрипты вирусной РНК содержат поли(А) и работают как вирусные мРНК в свободных от клеток системах [11, 78]. С помощью этих динуклеотидов транскрипция инициируется прямо на УЦ последовательности на 3′-концах сегментов вРНК [80, 93]. Было показано также, что комплекс вирионассоциированной транскриптазы не содержит ферментов, способных кэппировать 5′-концы транскриптов вирусной РНК, даже когда эти транскрипты содержат ди- или трифосфори-

лированные 5′-концы с ppApГ или pppApГ праймером соответственно [80]. Однако известно, что, подобно большинству мРНК эукариотов [3, 91], вирусные мРНК, выделенные из инфицированных клеток, содержат 5′-терминальные метилированные структуры кэпов [46]. На основе этих данных было высказано предположение, что для синтеза вирусных мРНК in vivo также необходим праймер — не динуклеотид, а РНК, синтезированная РНК-полимеразой II, и что 5′-кэп получают из этого РНК-праймера [78—80].

Прямое доказательство этой гипотезы сначала было получено при использовании системы вирионассоциированной транскриптазы. Первоначально было показано, что добавление очищенной β-глобин-мРНК к вирусассоциированной транскриптазе стимулирует транскрипцию вирусной РНК in vitro приблизительно в 80 раз [11]. β-Глобин-мРНК была приблизительно в 1000 раз более эффективным праймером, чем ApГ. Впоследствии установили, что все испытанные РНК, которые содержали структуры 5′-терминального метилированного кэпа, были эффективными праймерами для синтеза вирусных мРНК [11, 19, 76]. Присутствие структуры 5′-терминального метилированного кэпа (кэп1, $m^7GpppNm$) необходимо для проявления активности праймера [76]. Кэп должен содержать метильные группы, поскольку 5′-GpppГ-терминальные РНК как праймеры неактивны [10]. Действительно, каждая метильная группа в кэпе, 2′-О-метил на предпоследнем основании (так же как 7-метил на Г-конце), сильно влияет на активность праймера [12]. Как предполагалось на основании первоначальной гипотезы, кэп РНК праймера переносится к вирусной мРНК во время транскрипции [10, 76]. Для демонстрации этого была приготовлена глобиновая мРНК, содержащая только ^{32}P в своем кэпе [76]. После транскрипции in vitro в присутствии этого РНК-праймера и немеченых нуклеозидтрифосфатов в конечных вирусных мРНК обнаруживали структуры ^{32}P-меченного кэпа. Кроме того, около 10—15 5′-терминальных нуклеотидов РНК-праймера также переносились к вирусным мРНК. Первоначально это было показано двумя способами: 1) методом гель-электрофореза, с помощью которого было установлено, что глобиновые мРНК-праймированные вирусные мРНК на 10—15 нуклеотидов больше, чем ApГ-праймированные вирусные мРНК [76]; 2) с использованием ^{125}I-меченной β-глобин-мРНК в качестве праймера, было показано, что вирусные мРНК содержат на своих 5′-концах либо первые 12—13, либо 14 5′-терминальные нуклеотиды β-глобин-мРНК [82].

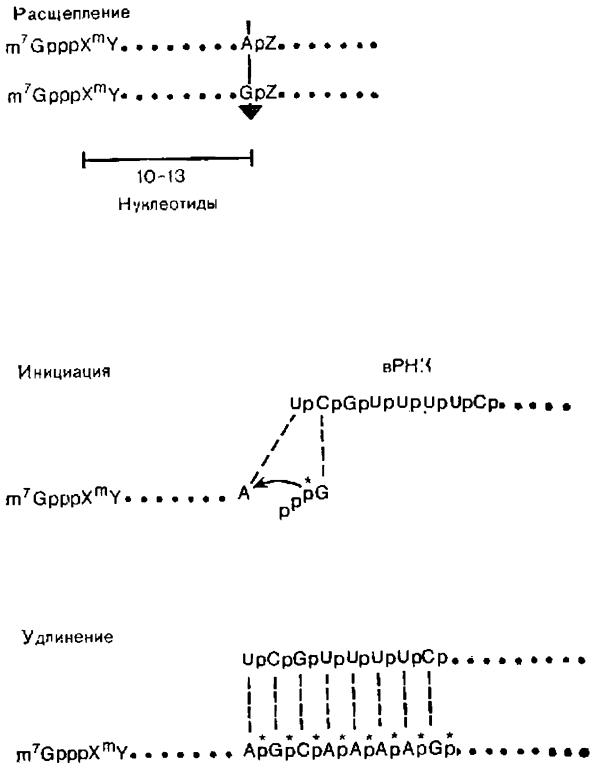
Впоследствии установили, что транскрипция вирусной РНК в инфицированной клетке также праймируется кэппированными клеточными РНК. Полученные данные указывают на то, что синтезированные в инфицированной клетке вирусные мРНК имеют короткий отрезок нуклеотидов на 5′-концах, включая кэп, которые не кодируются вирусом. Во-первых, методом гель-электрофореза было обнаружено, что in vivo вирусные мРНК на 10—15 нуклеотидов длиннее на своих 5′-концах, чем ApГ-праймированные in vitro вирусные мРНК [43]. Во-вторых, когда ^3H-метилмеченные

in vivo вирусные мРНК гибридизовали с вРНК, структура 5′-терминального кэпа мРНК не была защищена от высвобождения из гибридов расщеплением панкреатической или Т1 рибонуклеазой (РНКазой) [43]. В заключение опыты по клонированию прямо продемонстрировали существование невирусных нуклеотидов на 5′-концах in vivo вирусных мРНК. В тех же экспериментах, где процедура клонирования включала синтез комплементарной ДНК-копии особых вирусных мРНК, у самих клонированных ДНК обнаруживали короткий отрезок невирусных нуклеотидов на конце, который соответствовал 5′-концу вирусной мРНК [6, 17, 22]. Кроме того, используя соответствующие рестрикционные фрагменты из клонированных ДНК в качестве праймеров для обратного катализируемого транскриптазой считывания in vivo 5′-концов нескольких вирусных мРНК (удлинение праймера), было показано, что эти вирусные мРНК содержат 5′-терминальные последовательности, которые были гетерогенными и не кодировались вРНК [6, 17, 57, 60].

Б. Праймирование клеточными кэппированными РНК — механизм

Основной механизм реакции праймирования был раскрыт в опытах in vivo с использованием вирионассоциированной транскриптазы [77]. Механизм этого процесса схематически представлен на рис. 11. Первая стадия реакции — эндонуклеотическое расщепление кэппированного РНК-праймера на пуриновом остатке 10—13 нуклеотидов от кэпа. Для демонстрации активности эндонуклеазы несколько кэппированных РНК, содержащих ^{32}P метку только на структуре 5′-терминированного метилированного кэпа, инкубировали с обработанным детергентом вирусом или с очищенными вирусными нуклеокапсидами (корами) в отсутствие рибонуклеозидтрифосфатов [77]. Например, с сегментом 4 РНК вируса мозаики брома (BMV) как субстратом происходили два специфических расщепления (рис. 12, полоса 2): на нуклеотиде Г12 (m^7ГрррГmУ АУУ ААУ ААУГ) и на нуклеотиде А10. Расщепление по У11 не происходило, что подтверждает значительное предпочтение для расщепления на пуринах. Продукты этого расщепления содержат 3′-гидроксильную группу, как и предполагалось для молекул праймера. Эндонуклеаза требует присутствия структуры 5′-терминированного кэпа. Таким образом, например, РНК 4 BMV с 5′-ГрррГ-концом не расщеплялась (см. рис. 12, полоса 3).

Вторая стадия реакции — инициация транскрипции посредством включения Г-остатка на 3′-конце фрагмента кэппированного праймера, вырабатываемого эндонуклеазой (см. рис. 11). Этот промежуточный этап в реакции транскрипции может быть определен инкубированием немеченого РНК-праймера с комплексом вирионной транскриптазы в присутствии (α-^{32}P)-ГТФ как единственного рибонуклеозидтрифосфата [77]. Из фрагментов праймера, вырабатываемых эндонуклеазой, те, которые содержали 3′-терми-

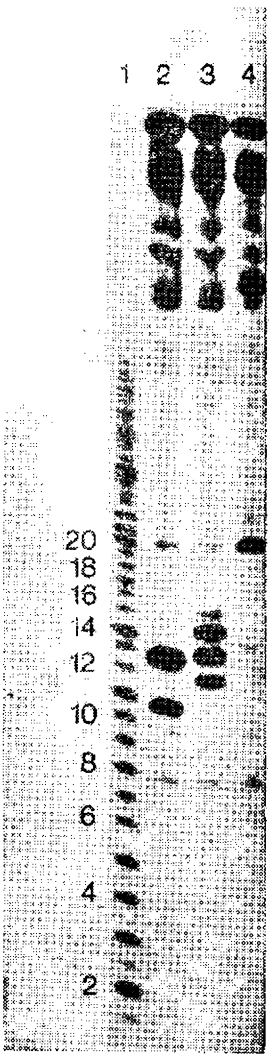


11. Механизм праймирования синтеза мРНК вируса гриппа кэппированными РНК. Объяснения в тексте. Из [42].

нальный А-остаток, значительно преобладали на этапе инициации над содержавшими 3′-терминальный Г-остаток. Таким образом, с РНК 4 BMV А10-фрагмент значительно преобладал над Г12-фрагментом. Когда немеченый РНК 4 BMV-фрагмент инкубировали с обработанным детергентом вирусом в присутствии (α-^{32}P)-ГТФ, определяли единственный фрагмент праймера — продукт расщепления А10, связанный с одним или более Г-остатками. Утилизация А10-фрагмента может быть также продемонстрирована при использовании ^{32}P-кэп-меченного фрагмента РНК 4 BMV как праймера в присутствии немеченного ГТФ (см. рис. 12, полоса 3): А10-фрагмент исчезал и был замещен тремя более медленно мигрирующими полосами, которые представляли собой А10-фрагмент с 1, 2 или 3 дополнительными Г-остатками. Г12-фрагмент, генерируемый эндонуклеазой, прямо как праймер не использовали, а сначала переводили его в форму А10-фрагмента. Предпочтение для А-терминированных фрагментов также распространялось на различные кэппированные виды РНК. А-терминированные фрагменты РНК 4 BMV и альфа-вируса мозаики (A1MV) РНК 4 более

12. Специфическое расщепление РНК 4 BMV эндонуклеазой вируса гриппа.

РНК 4 BMV, содержащую либо структуру ^{32}P-меченного метилированного кэпа $m^7Г^*pppГm$ (полосы 2 и 3) либо ^{32}P-меченную неметилированную структуру кэпа $Г^*pppГ$ (полоса 4), инкубировали с обработанным детергентом вирусом в отсутствие рибонуклеозидтрифосфатов (полосы 2 и 4) или в присутствии 25 мкМ немеченого ГТФ (полоса 3). После инкубации экстрагированную фенолом РНК анализировали путем электрофореза в 20% акриламидном геле в 7М мочевине. Полоса 1 — продукт частичного спиртового расщепления РНК 4 BMV, содержащий $m^7Г^*pppГm$ кэп. Числа в левом столбце означают длину цепи этих продуктов, считая Гm-остаток первым основанием. Из [77].



эффективно использовали для инициации (Г-добавка), чем Г-терминированный фрагмент β-глобин-мРНК.

Первоначально включение Г почти определенно управляется предпоследним Ц-остатком на 3′-конце каждой матрицы вРНК (3′ УЦГ...). Таким образом, А-терминированные фрагменты праймера в реакциях транскриптазы могут быть связаны только с Г-остатком, содержащим один рибонуклеозидтрифосфат [77]. В одиночных реакциях трифосфатов не происходило включения А, У или Ц. Включенный после начального Г-Ц-остаток, вероятнее всего, получен из Г в 3-м положении от 3′-конца вРНК. Даже хотя 3′-терминальный У вРНК, очевидно, не может управлять включением А-остатка, предпочтительное использование фрагментов А-терминированного праймера приводило к присутствию А-остатка в вирусных мРНК в положении, противоположном 3′-терминальному У вРНК. После инициации Г-остатков следует удлинение цепи (см. рис. 11).

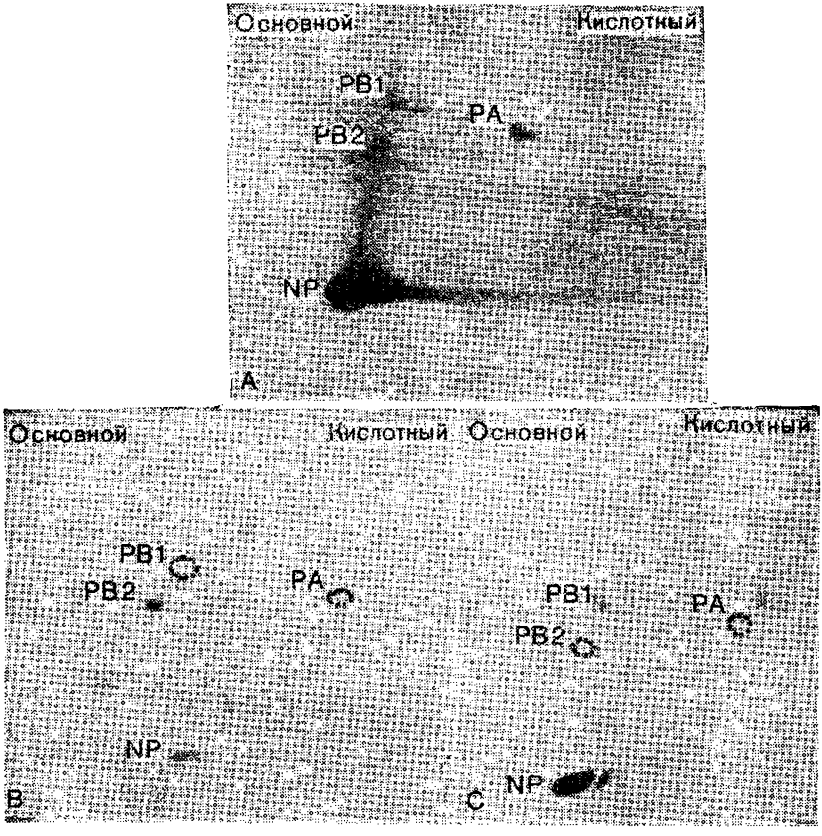
Было установлено, что стимуляция инициации транскрипции кэпированными РНК не требует водородной связи между кэпированной РНК и 3′-концом матриц вРНК. Кэпированные 5′-терминальные фрагменты β-глобин-мРНК и РНК 4 A1MV, по длине соответствующие 14—23 нуклеотидам, кэпированные рибополимеры, такие, как кэпированный поли(А) и кэпированный поли(АУ) (1 : 1), лишенные комплементарных последовательностей к общей 3′-терминальной последовательности матриц вРНК, являются эффективными праймерами [42, 44, 47]. Далее стимуляция инициации транскрипции должна произойти в результате специфического взаимодействия между кэпированной РНК и

одним или более протеинами в комплексе транскриптазы. Это взаимодействие требует узнавания структуры 5′-терминального метилированного кэпа РПК-праймера.

Механизм инициации транскрипции вирусной РНК в инфицированной клетке во многом подобен известному механизму транскрипции in vivo. В клонированных ДНК, содержащих копию последовательности праймера клеточного происхождения, 3′-терминальный У вРНК не всегда бывает представлен А-остатком, в то время как остальная последовательность вРНК представлена правильно [6, 17, 22, 42]. Таким образом можно заключить, что остаток, противоположный 3′-терминальному У вРНК, не кодируется вирусом, но происходит от праймера клетки-хозяина, и что транскрипция in vivo, подобно транскрипции in vitro, инициируется Г-остатком, управляемым предпоследним Ц вРНК [6, 60]. С другой стороны, обратное, катализируемое транскриптазой копирование 5′-концов всей популяции, содержит почти исключительно А напротив 3′-терминального У вРНК. Это свидетельствует о том, что клонированные ДНК, содержащие другой, а не А-остаток в этом положении, представляют минорные виды, и что А-терминальные клеточные кэппированные фрагменты предпочтительно или даже исключительно используются как праймеры in vivo и в отдельных случаях in vitro. Клеточно-обусловленная последовательность гетерогенна на большой своей длине, но вместе с тем неожиданно было обнаружено, что она содержит в основном 3′ предпоследний Ц-остаток [6, 60]. Таким образом, о присутствии Г-остатка на 5′-конце этого Ц было получено менее очевидное доказательство. Это свидетельствует о том, что специфический пул А-терминированных кэппированных фрагментов, которые содержат (Г)ЦА на своих 3′-концах, предпочтительнее используются как праймеры in vivo. Ранее в экспериментах in vitro подобного предпочтительного использования (Г)ЦА-терминированных кэппированных фрагментов не наблюдали, поскольку ни одна из кэппированных РНК, использованных в этих экспериментах, не содержала (Г)ЦА-последовательность 10—13 нуклеотидов кэпа. В настоящее время причины такого предпочтительного использования (Г)ЦА-терминированных клеточных кэппированных фрагментов in vivo неизвестны. Нет объяснения и тому, состоит ли эта популяция праймеров клеток-хозяев из большого или относительно малого числа различных видов.

В. Роль трех вирусных белков Р на этапах праймирования транскрипции

Весь процесс транскрипции, праймированной кэппированными РНК, катализируется очищенными вирусными корами [77, 99], которые содержат сегменты вРНК и 4 известных вирусспецифических белка: белок NP и 3 белка Р [36, 77, 99]. NP-белок, который составляет основную массу (около 92%) белка вирусных кóров, по всей вероятности, играет главным образом структурную роль,



13. Двухмерный гель-электрофорез ^{35}S-метионин-меченных белков вирусных ко́ров (А), поперечно-связанного ^{32}P-меченного кап 1-распознающего белка кора (Б) и поперечно-связанного ^{32}P-меченного белка кора, который, вероятно, катализирует инициацию транскрипции.

Для Б: очищенные коры вируса инкубировали в течение 30 мин при 31 °С с ^{32}P-меченной по кэпу РНК 4 A1MV в отсутствие рибонуклеозидтрифосфатов. Для С: очищенные коры вируса инкубировали в течение 30 мин при 31 °С с кэпированной глобиновой мРНК в присутствии (α-^{32}P)-ГТФ как единственного меченого рибонуклеозидтрифосфата. Реакции в случаях В и С проводили при УФ-облучении. Эти две реакционные смеси, а также ^{35}S-метионин-меченные коры вируса (А) расщепляли панкреатической и Т1 РНКазами и анализировали методом двухмерного гель-электрофореза по Ulmanen и соавт. [99]. Ожидаемые места расположения белков PB1 и PA отмечены в Б, белков PA и PB2 — в С [99].

так как он расположен вдоль вРНК цепей с интервалом приблизительно в 20 нуклеотидов [20]. Белки Р — предполагаемые субъединицы транскриптазы — разделяются при двухмерном электрофорезе в геле на два вида в основной форме — PB1 (больший из двух основных белков Р) и PB2 (меньший из двух основных белков Р) и белок PA (кислая форма) [34, 99] (рис. 13, А). Для выяснения роли каждого из белков Р на отдельных этапах синтеза мРНК были поставлены следующие эксперименты.

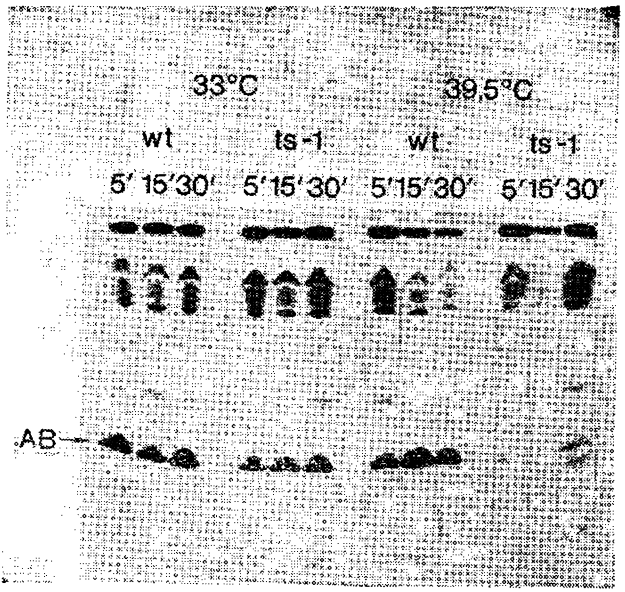
Для идентификации белка Р, тесно связанного со структурами

кэпа, а следовательно, и возможного кэп-распознающего белка, использовали эксперименты с поперечным связыванием. В одной серии исследований сам кэппированный РНК-праймер, меченный ^{32}P только в структуре кэпа, использовали как радиоактивный зонд для кэп-распознающего белка [99]. Эндонуклеазные реакции, осуществляемые вирусными корами с использованием этого меченного по кэпу РНК-праймера (A1MV РНК 4) в отсутствие рибонуклеозидтрифосфатов, проводили при УФ-облучении. После расщепления нуклеазой меченый кэп был поперечно связан с белком, подвижность которого была одинаковой с подвижностью белка PB2 в двухмерном гель-электрофорезе (см. рис. 13, В). Поперечно-связанный белок и непрореагировавший белок PB2 незначительно различались по подвижности, возможно, потому, что первый содержал несколько ковалентно-связанных нуклеотидов. Специфичность поперечного связывания PB2 с меченым кэпом РНК-праймера была показана в экспериментах по конкурентной гибридизации, в которых только немеченые РНК со структурой кэпа 1 блокировали поперечное связывание. При другом подходе дериват m^7ГТФ, фотореактивный при 320 нм, использовали как аффинную метку [8]. Один из вирусных белков P оказывался поперечно-связанным с этим зондом, и это поперечное связывание было конкурирующим, так как оно специфически ингибировалось аналогами кэпа. Первоначально идентичность поперечно-связанного белка P не была явно определена, так как вирусные белки анализировали только методом одномерного электрофореза в ПААГ [8]. Последовательные эксперименты с использованием двухмерного электрофореза в ПААГ показали, что поперечно-связанный белок P в действительности — PB2 [9]. Это, таким образом, подтвердило результаты, полученные с меченным по кэпу РНК-праймером и УФ-поперечным связыванием [99]. Эти эксперименты с поперечным связыванием продемонстрировали топографическую взаимосвязь между PB2 и структурой кэпа 1. Однако они четко не показали, что белок PB2 действительно функционирует в процессе распознавания кэпа во время транскрипции вирусной РНК. Такое четкое доказательство функции белка PB2 в распознавании кэпа было представлено в последней работе по изучению температурной чувствительности реакции транскрипции in vitro, катализируемой мутантами вируса с температурочувствительным (ts) дефектом в сегменте геномной РНК, кодирующим белок PB2 [100]. Два изученных мутанта WSN (ts1 и ts6) вели себя как ts-мутанты транскрипции in vivo [49]. Для получения интерпретируемых результатов о температурной чувствительности процесса транскрипции in vitro, катализируемого этими мутантами, было необходимо преодолеть главную трудность, с которой сталкивались в предыдущих экспериментах: явную температурную чувствительность активности транскриптазы дикого типа (wt) вируса in vitro. При непермиссивных для ts-мутантов вируса in vitro температурах (боле 39 °С) транскриптаза обработанных детергентом wt вирионов in vitro проявляла только около 10% ак-

тивности, наблюдаемой в оптимальных условиях in vitro при температуре 30—33 °С [72, 74]. Затем исследователи пытались определить, меньше ли 10% оптимальной активности на этих высоких температурах (выше 39 °С) представляет связанная с данным ts-мутантом транскриптазная активность. По этой причине результаты авторов и их интерпретация не были столь убедительными [71, 72, 74]. Эта трудность была преодолена за счет использования очищенных ко́ров вируса вместо обработанных детергентом вирионов для катализирования процесса транскрипции [100]. Обработанные детергентом вирионы обладали определенной дестабилизирующей и/или ингибирующей активностью, которая усиливается при действии высоких температур. Эти активности очень существенно (если не полностью) удаляются при очистке вирусных ко́ров. С использованием очищенных ко́ров вируса было показано, что скорость эндонуклеотического расщепления кэппированных РНК-праймеров и полной транскрипции одинакова при 39,5 и 33 °С — непермиссивной и пермиссивной in vivo температурах соответственно для ts-мутантов вируса WSN.

Таким образом, в тестах с эндонуклеазой с использованием меченной по кэпу РНК 4 A1MV wt коры вируса генерировали приблизительно одинаковое количество продукта специфического расщепления A13 в каждый момент времени и при 33 °С, и при 39,5 °С (рис. 14). Наоборот, ts1-вирусные коры, активность которых была подобна активности wt при 33 °С, очень незначительно катализировали специфическое расщепление при 39,5 °С [100]. ts6-вирусные коры обладали также ts, кэп-зависимой эндонуклеазой. Было показано, что этапы транскрипции после эндонуклеотического расщепления кэппированного РНК-праймера обладают весьма существенной температурной чувствительностью. Это указывает на то, что мутации в белке PB2, обнаруженные в ts1- и ts6-вирионах, влияют только на стадию действия эндонуклеазы. ts-дефект, вероятно, заключается в распознавании структуры 5′-термального кэпа 1, которое происходит как необходимая первая стадия реакции эндонуклеазы: кэп-зависимое связывание специфического кэппированного фрагмента праймера (A13-фрагмент РНК 4 A1MV) с ts1-корами вируса является температурочувствительным в условиях, в которых на связывание с wt-корами вируса не влияло увеличение температуры от 33 до 39,5 °С [100]. Эти результаты подтверждают, таким образом, положение о том, что вирусный белок PB2 действительно функционирует в процессе распознавания кэпа в эндонуклеазной реакции.

Эксперименты с УФ-поперечным связыванием использовали для идентификации того вирусного белка (белков) P, который катализирует инициацию транскрипции и того белка, который, возможно, катализирует удлинение цепи (см. рис. 11). Для идентификации белка P, который катализирует инициацию транскрипции посредством включения Г-остатка на конце фрагментов праймера, вирусные коры инкубировали с немеченым РНК-праймером (т. е. глобин-мРНК) и (α-^{32}P)-ГТФ как единственным рибонуклеозид-



14. Влияние температуры на эндонуклеазную реакцию, катализируемую очищенными корами вирусов wt и ts1.

Вирусные коры из wt или ts1 вируса инкубировали с ^{32}P-меченной по кэпу РПК 4 A1MV в указанное время при 33 или 39,5 °С в условиях постановки опыта с эндонуклеазой (в отсутствие рибонуклеозидтрифосфатов). Меченые продукты расщепления анализировали на 20% гелях акриламида с 7М мочевиной. Положение фрагмента A13 указано на рисунке. Меченые РНК, мигрирующие между интактной РНК 4 A1MV (которая оставалась в первоначальной позиции) и продуктом расщепления A13, были продуктами частичного распада РНК 4 A1MV, присутствующей в непрореагировавшем ^{32}P-меченном РНК 4 A1MV образце. Эти РНК являлись также субстратами для эндонуклеазы, поскольку они расщеплялись отдельно от РНК 4 A1MV по всей длине сегмента, когда в реакции использовали избыток wt вирусных кóров [100].

трифосфатом. Реакционные смеси подвергали УФ-облучению [99]. После обработки нуклеазой было обнаружено, что Г-остаток оказался поперечно-связанным с белком, подвижность которого была одинакова с подвижностью белка PB1 в двухмерном гель-электрофорезе (см. рис. 13, С). Так же как и в случае белка PB2, было обнаружено лишь незначительное различие между подвижностью поперечно-связанного белка PB1 и подвижностью непрореагировавшего белка PB1. Это согласовывалось с присутствием нескольких ковалентно-связанных нуклеотидов после поперечного связывания и расщепления нуклеазой. Условия транскриптазной реакции, необходимые для тесной связи белка PB1 с меченым Г-остатком с таким расчетом, чтобы могло произойти поперечное связывание, были аналогичны тем, которые нужны для образования ковалентной связи между Г-остатком и полученным в результате действия эндонуклеазы фрагментом праймера. Эти данные позволяют предположить, что тесная связь меченого Г-остатка с белком PB1 происходит одновременно с включением Г во фрагмент праймера, и что белок PB1 катализирует этап инициации транскрип-

ции [99]. Осуществленные в лаборатории авторами эксперименты с импульсовой меткой показали, что вскоре после удлинения цепи белок PB1 уже не связан с инициирующим Г-остатком [Braam, Ulmanen, Krug, неопубликованные данные]. Удлинение также может быть катализировано, по крайней мере частично, белком PB1. В первых экспериментах, где удлинение цепи прерывалось для синтеза цепей различной длины, было обнаружено, что последний остаток, добавляемый к растущим цепям вирусных мРНК, может быть поперечно связан и, таким образом, прочно соединен с вирусным белком PB1 [Braam, Ulmanen, Krug, неопубликованные данные].

На основе этих результатов можно предположить соответствующую модель для описания действий индивидуальных вирусных белков P во время синтеза вирусных мРНК. Несколько важных вопросов, однако, остаются по-прежнему невыясненными. Например, неизвестно до сих пор, какие вирусные белки P катализируют расщепление кэппированной РНК на пуриновом остатке 10—13 нуклеотидов кэпа. Действительно ли белок PB2 не только распознает структуру 5′-терминального кэпа РНК-праймера, но и отщепляет эти 10—13 нуклеотидов РНК от кэпа или катализируется это действительное расщепление белком PB1? Если выяснено, что белок PB1 удлиняет цепи вирусных мРНК при движении вниз по матрице вРНК, происходит ли рециклирование белка PB1 для удлинения цепей вирусных мРНК на той же самой или другой нуклеокапсидной матрице вРНК? Дальнейшее выяснение функций и поведения трех белков P при синтезе вирусных мРНК полезно для уточнения некоторых неясных моментов в вопросе регуляции процесса синтеза вирусных мРНК и механизма переключения от синтеза вирусных мРНК к синтезу полных по длине транскриптов (см. ниже).

Г. Окончание транскрипции и добавление поли(А)

Вирусные мРНК in vivo и in vitro содержат 3′-терминальные поли(А) последовательности, которые короче и более гомогенны по длине в случае in vivo, чем in vitro [78]. В экспериментах по использованию гибридов между сегментами вРНК и поли(А)-содержащими вирусными мРНК, которые расщепляли однонитчатыми специфическими нуклеазами, было установлено отсутствие в вирусных мРНК участков, комплементарных 5′-терминальным 20—30 нуклеотидам вРНК [29, 79]. При этом у каждого из 8 сегментов вРНК (17—20 нуклеотидов 5′-конца) есть специфический У-остаток из 5—7 нуклеотидов [83, 93]. Было установлено, что этот короткий У-участок является сайтом добавки поли(А) [84]. Для демонстрации этого положения индивидуальный сегмент вРНК расщепляли Т1 РНКазой и полученные олигонуклеотиды после введения 5′-метки отжигали с вирусной мРНК. После расщепления Т1 и панкреатической РНКазой методом (олиго dt)-целлюлозной хроматографии был выделен меченный вРНК Т1 олигонуклеотид с парными основаниями к олигонуклеотиду

поли(А)-содержащей мРНК. Выделенный этим методом из вРНК Т1 олигонуклеотид содержал участок У, расположенный на 17—22 нуклеотидах от 5′-конца вРНК.

Добавка поли(А) по этому сайту может происходить двумя путями: 1) эндонуклеотическим расщеплением большего транскрипта (т. е. содержащего копию 5′-терминальных 17—22 нуклеотидов вРНК) с последующим полиаденилированием; 2) «запиманием» или повторяющимся копированием короткого 5—7 У-участка вРНК. Эндонуклеотическое расщепление большего транскрипта было расценено как механизм поли(А) добавки для некоторых единиц транскрипции РНК полимеразы II [73], в то время как, по последним данным, для других единиц транскрипции полимеразы II определенную роль может играть факт окончания транскрипции [66]. Повторяющееся копирование У-участка и окончание транскрипции имеют для транскрипции РНК вируса гриппа большее значение, чем эндонуклеотическое расщепление большего транскрипта. Данных о транскрипции 5′-терминальных последовательностей вРНК во время синтеза in vitro вирусной мРНК (катализируемой вирионассоциированной транскриптазой) получено не было. Известно, какие характеристики матрицы могут дать сигнал к добавке поли (А) и к последующему окончанию транскрипции. Два других вируса с минус-цепью РНК — вирус везикулярного стоматита (VSV) и вирус Сендай — имеют согласованный тетрануклеотид АУАЦ и АУУЦ соответственно, который быстро достигает У-участка, где происходит поли(А) добавка. Этот тетрануклеотид считают сигналом для поли(А) добавки [26, 90]. Наоборот, сегменты вРНК вируса гриппа не содержат общей последовательности, достигающей У-участка [83, 93]. Была высказана альтернатива, что частичная комплементарность последовательности между 5′- и 3′-концами каждого индивидуального сегмента вРНК может приводить к образованию дуплексной структуры «шпильки» вплоть до У-участка. При этом блокируется транскрипция 5′-терминальных вРНК нуклеотидов и осуществляется повторяющееся копирование У-участка [84].

Д. Регуляция синтеза вирусной мРНК в инфицированной клетке

Синтез мРНК вируса гриппа во время инфекции контролируется по учету относительного количества каждой синтезированной мРНК и времени, за которое синтезируется наибольшее количество каждой мРНК. Наиболее интенсивно эта регуляция изучена в системе фибробластов куриных эмбрионов, инфицированных вирусом чумы птиц [29]. Непосредственно после инфекции при этом регистрировали одинаковые количества всех восьми вирусных мРНК. В следующий период времени, названный ранней фазой, преобладал синтез двух вирусных мРНК, кодирующих белок NP и неструктурный белок NS1. Впоследствии скорость синтеза NS1 мРНК снижалась по сравнению со скоростью синтеза NP мРНК,

а скорость синтеза мРНК, кодирующей М, НА и NA, значительно возрастала. Эта фаза получила название поздней фазы синтеза вирусных мРНК. Во все моменты, за исключением периода сразу же после инфицирования, скорость синтеза мРНК, кодирующих три белка Р, была относительно низкой по сравнению со скоростью синтеза других вирусных мРНК. Такова основная общая картина процесса, возможно, с некоторыми вариациями, которые имеют место при других продуктивных вирусных инфекциях.

Наиболее яркой характеристикой процесса регуляции синтеза вирусной мРНК следует считать шифт в относительных скоростях синтеза мРНК, кодирующих белки NS1 и М; шифт — от преобладания синтеза мРНК, кодирующей белок NS1 (ранняя фаза), к преобладанию синтеза мРНК, кодирующей белок М (поздняя фаза). Относительные скорости синтеза различных вирусных мРНК в разное время после инфекции хорошо коррелируют с относительными скоростями синтеза белков, кодируемых этими мРНК [29, 37, 51, 69], что указывает на активную регуляцию экспрессии вирусного генома на уровне транскрипции.

Механизм регуляции синтеза вирусных мРНК во время инфекции неясен. Первичная транскрипция, катализируемая введением вирусного материала, не регулируется: одинаковые относительные количества различных вирусных мРНК синтезируются сразу же после начала инфекции и также в клетках, инфицированных вирусом в присутствии циклогексимида [4, 29]. Кроме этого, связанная с вирионом транскриптаза не проявляет регуляторных свойств во время инфекции. Более того, в реакции in vitro меньшие по молекулярной массе мРНК, кодирующие белки NS1 и М, синтезируются в большем количестве, а мРНК, бо́льшие по молекулярной массе, синтезируются в меньшем количестве [79]. Возможно, это только отражает тот факт, что реакция in vitro не оптимизирована для удлинения цепи, поэтому меньшие по размеру цепи производятся в большем количестве. Последние данные свидетельствуют, что цепи различных вирусных мРНК инициируются с одинаковыми скоростями [Braam, Krug, неопубликованные данные]. Вследствие этого регуляция синтеза вирусных мРНК, вероятно, осуществляется посредством вируспецифических продуктов, синтезированных после инфекции. Возможно, что в этой регуляции играет роль белок NS. Было показано, что шифт от ранней к поздней схеме синтеза вирусного белка (а следовательно, и синтез вирусной мРНК) ингибировался в инфицированных клетках при непермиссивной температуре ts-вирусными мутантами с дефектом в сегменте генома, кодирующем белки NS [39, 104]. До настоящего времени неясно, каким образом белок NS может регулировать переключение с ранней на позднюю схему транскрипции. Кроме того, так как ранняя регуляция синтеза вирусной мРНК происходит при непермиссивной температуре, ее в большей степени следует отнести к кодируемому вирусом компоненту, чем к белку (белкам) NS. Синтез вРНК для двух NS ts-мутантов вируса также ингибировался при непермиссивной температуре [104]. Это

доказывает возможность блокирования шифта от ранней к поздней фазе синтеза вирусных мРНК как следствия блокирования синтеза вРНК. Полученные в последнее время данные показывают, что регуляция синтеза мРНК, по крайней мере частично, может происходить на уровне синтеза вРНК [94]. На основе установленного факта хорошей корреляции между относительными скоростями синтеза различных сегментов вРНК и их кодируемых мРНК было сформулировано положение о том, что вирусная мРНК сама не регулируется, а относительное количество синтезированной определенной вирусной мРНК в любой момент пропорционально количеству синтезированной в это время вРНК. В соответствии с этой гипотезой данная матрица вРНК не будет транскрибироваться за короткое время в мРНК или в действительности данная вРНК может только один раз транскрибироваться в мРНК. Трудность этой теории состоит в том, что синтез вирусных мРНК, очевидно, не зависит от протекания синтеза вРНК. Когда синтез вРНК блокирован ингибитором синтеза белка (циклогексимидом), синтез вирусных мРНК продолжается, но часто с повышенной скоростью [25, 51, 67]. Возможным ответом на это послужило предположение, что ингибирующий синтез белка каким-то образом «разобщает» синтез вирусных мРНК и синтез вРНК [93].

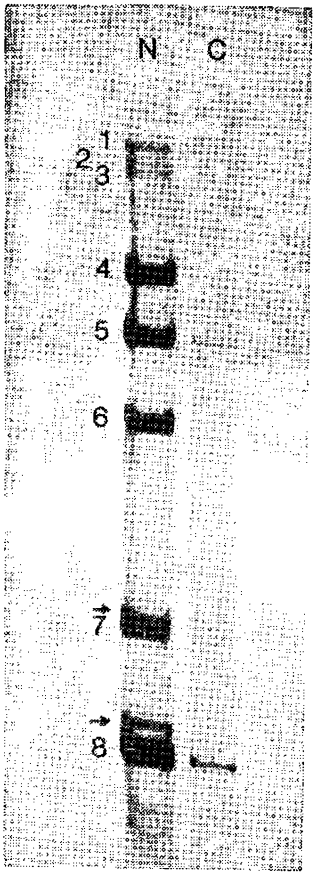
Е. Клеточный сайт для синтеза вирусных мРНК

На протяжении ряда лет делались попытки установить, где происходит синтез мРНК вируса гриппа — в ядре или цитоплазме инфицированных клеток. Первые полученные данные были неубедительными и противоречивыми. Часть результатов свидетельствовала в пользу ядерного сайта клеток, например присутствие внутренних m^6A остатков в вирусных мРНК и вероятное генерирование нескольких вирусных мРНК сплайсированием [43, 46, 50]. Однако изучение вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразной активности (синтезирующей РНК, комплементарную вРНК) в инфицированных клетках дало неопределенные результаты. В некоторых экспериментах подобную активность выявляли в изолированных ядрах [27, 65], но в основной части опытов активность обнаруживали в цитоплазматической фракции инфицированных клеток [15, 19, 63, 65, 88, 92]. Однако оставалось неясным, является ли любая из этих активностей действительно ответственной за транскрипцию вирусной РНК in vivo. Казалось маловероятным, что цитоплазматическая активность действует in vivo, так как бо́льшую часть этой активности выявляли в поздние сроки инфекции [19, 63], уже после того как была полностью закончена транскрипция большей части вирусных РНК в клетке [4, 29, 67, 89, 98]. Цитоплазматическая активность может быть связана с потомками нуклеокапсидов, которые должны быть упакованы в вирионы. Другие исследования также не дали ясного ответа. Эксперименты по измерению уровней равновесия транскриптов вирусных РНК показали, что эти транскрипты в основном аккумулируются в ци-

топлазме [4, 67, 98]. Однако результаты этих экспериментов не позволяли точно определить сайт синтеза транскриптов, аккумулированных в цитоплазме. Тем не менее на основании полученных данных было сделано одно важное предположение: первичная транскрипция, по-видимому, происходит в ядре. И наконец, группа исследователей провела ряд опытов с пульсовой меткой, в результате которых было показано, что цитоплазма является сайтом транскрипции вирусных РНК. Используя ^{3}H-уридин-пульсы по 5—30 мин, А. Нау и соавт. [29] обнаружили бо́льшую часть пульс-меченых транскриптов вирусной РНК в цитоплазме инфицированных фибробластов куриных эмбрионов (CEF_s).

Сайт синтеза вирусных мРНК был определен в последней работе [33]. Для измерения пульс-меченых транскриптов вирусной РНК пульс-меченые РНК инфицированных клеток гибридизовали с вРНК, ковалентно-связанной с бумажными фильтровальными дисками. Методы фракционирования клеток в водной и неводной фазах использовали для двух различных типов клеток — CEF_s и ВНК-21, инфицированных вирусом для окончательного подтверждения, что расположение транскриптов пульс-меченых вирусных РНК после фракционирования клеток точно отражает локализацию этих молекул в интактных клетках. Распределение двух клеточных РНК, 45S рибосомального предшественника РНК (ядерная РНК) и родительской 18S рибосомальной РНК (цитоплазматическая РНК) были использованы для контроля за чистотой ядерной и цитоплазматической фракций. Эти опыты подтвердили, что транскрипция вирусных РНК происходит в ядрах инфицированных клеток. Сложность проблемы неожиданно возросла из-за того, что транскрипты РНК вируса гриппа (размером 12—18S) «вытекали» из ядра CEF_s во время фракционирования в водной фазе, в то время как бо́льшая по размеру РНК (45S рибосомальный предшественник РНК), используемая как маркер высвобождения из ядра, оставалась в ядре. Для CEF_s существенно большее количество транскриптов пульс(6 мин)-меченой вирусной РНК обнаруживали в ядрах после фракционирования в неводной фазе (55—59%). Это было существенно больше того, что имело место после фракционирования в водной фазе. Указанные факты подтверждают результаты А. Нау и соавт. [29], которые использовали фракционирование в водной фазе клеток CEF_s и обнаружили пульс-меченые транскрипты вирусной РНК в основном в цитоплазматической фракции.

В отличие от системы CEF_s пульс-меченые транскрипты вирусной РНК задерживались в ядре ВНК-21 клеток во время фракционирования в водной и неводной фазах [33]. При использовании пульсовой метки ^{3}H-уридином на $1^1/_2$ ч после инфекции ВНК-21 клеток 78—90% меченых транскриптов вирусной РНК обнаруживали в ядерной фракции. После этого в другой серии экспериментов было получено доказательство того, что транскрипция вирусных РНК происходит в ядре [38]. Пульс-меченные ^{3}H-уридином в течение $2^1/_2$ мин транскрипты вирусной РНК связаны с субъядер-



15. Новые синтезированные (пульс-меченые) сегменты плюс-цепи РНК вируса гриппа (мРНК и транскрипты во всю длину) в ядре (N) и цитоплазме (C) инфицированных клеток ВНК-21.

Через 1½ ч после инфекции клетки ВНК-21 метили ^{3}H-уридином за 6 мин и фракционировали в неводной фазе. Ядерные и цитоплазматические РНК отжигали с избытком немеченой вРНК. После обработки Т2 РНКазой полученные гибриды разделяли методом гель-электрофореза. Восемь РНК: гибриды ^{3}H-меченной вирусной мРНК указаны в левой части рисунка. Стрелками показаны гибриды вРНК: ^{3}H-меченные транскрипты во всю длину [33].

ной структурой, терминируемой как ядерная клетка. При этом явно обнаруживается сайт для только что синтезированных транскриптов клеточной РНК.

Таким образом, транскрипция вирусной РНК, вероятнее всего, происходит в ядре на протяжении всего цикла инфекции. Бо́льшая часть процесса транскрипции вирусных РНК осуществляется в первые $2^1/_2$—3 ч после инфицирования [4, 29, 67, 89, 98], и пульс-меченые транскрипты вирусной РНК преобладают в ядре через $1^1/_2$ и $2^1/_2$ ч после инфицирования во время максимальной транскрипции вирусной РНК [33]. Пульс-меченые транскрипты вирусных РНК преобладали в ядре также в условиях, при которых происходит обычно только первичная транскрипция, т. е. при ингибиции синтеза белка. Было показано, что пульс-меченые транскрипты вирусной РНК в ядре состоят первоначально из 8 фрагментов вирусных мРНК [33] (рис. 15). Поскольку вирусные мРНК функционируют в цитоплазме клетки, было важно показать, что только что синтезированные вирусные мРНК, обнаруживаемые в ядре клетки, действительно переносятся в цитоплазму. Для доказательства этого была проведена серия экспериментов с пульсовой меткой ^{3}H-уридином с использованием глюкозамина для истощения пула уридина [33]. Используемые в этих экспериментах для клеток ВНК-21 условия метки не были оптимальными для прекращения включения ^{3}H-уридина, однако изменение ядерно-цитоплазматического распределения транскриптов меченых вирусных РНК за время метки указывает на вероятный перенос большей части этих транскриптов в цитоплазму. Обнаруживаемая в ядре часть транскриптов меченых вирусных РНК количественно уменьшалась от 91% после 4 мин пульса ^{3}H-уридином (на $1^1/_2$ ч после инфицирования) до 31% после 60 мин пульса.

Синтезированные в ядре вирусные мРНК должны быть праймированы кэппированными ядерными РНК клетки-хозяина. Это было экспериментально установлено с использованием ^{3}H-метилметиониновой метки для новых синтезированных структур кэп 1-мРНК вируса гриппа: основную часть пульс-меченых кэпов обнаруживали в ядре [33]. Вместе с тем используемые для синтеза вирусных мРНК клеточные праймеры получают из гяРНК. Неизвестно, расщепляются ли концы клеточных гяРНК вирусной эндонуклеазой с целью выработки фрагментов праймера, когда цепи гяРНК зарождаются, завершаются или частично и/или полностью прошли процессинг. Могут быть использованы и образующиеся цепи гяРНК, поскольку структура 5′-терминального кэпа, необходимая для вирусной эндонуклеазы, добавляется к образующимся цепям гяРНК сразу же после инициации [86]. Использование гяРНК в качестве праймеров объясняет, почему только кэппированные РНК, синтезируемые после инфекции, используются как праймеры и далее почему α-аманитин, добавляемый в начале инфекции, полностью ингибирует транскрипцию вирусной РНК [67]. Было получено прямое доказательство использования только новых синтезированных кэппированных клеточных РНК как праймеров: 5′-метилированные кэпы на вирусных мРНК были мечены ^{3}H-метилметионином при экспонировании с ним клеток после инфекции [33]. Наблюдаемое ингибирование транскрипции вирусных РНК при добавлении α-аманитина после инфекции [67] может служить дополнением к вопросу о необходимости продолжения синтеза РНК-полимеразой II гяРНК праймеров. Непрерывный синтез может быть необходим, так как: 1) гяРНК быстро истощаются не только в результате нормального обновления и переноса в цитоплазму, но и из-за постоянного их использования как праймеров для синтеза мРНК; 2) только зарождающиеся гяРНК используются для генерирования праймеров. Неизвестно, какая фракция новых синтезированных гяРНК в инфицированных клетках используется для производства праймеров для синтеза вирусных мРНК.

Установление ядерного сайта для синтеза вирусных мРНК дает объяснение ранним наблюдениям о переносе вирусных белков NP и P к ядру [13, 30, 45, 61, 97], где их и обнаруживали в форме вирусных NP, содержащих вРНК [40, 41]. Эти NP остаются в ядре и не являются предшественниками вирусных NP в цитоплазме, которые инкорпорированы в вирусные частицы [41]. Временно́й цикл появления ядерных (ядерно-плазматических) вирусных NP подобен временно́му циклу синтеза вирусных мРНК [41]. Таким образом, вероятно, что эти ядерно-плазматические вирусные NP являются транскриптазными комплексами, ответственными за синтез вирусных мРНК в инфицированной клетке. Действительно, последние эксперименты авторов в лабораторных условиях выявили в препаратах ядер инфицированных клеток в ранних стадиях инфекции (2 ч) активность, которая катализирует синтез поли(А)-содержащих вирусспецифических транскриптов с той же

электрофоретической подвижностью, что и у 8 основных вирусных мРНК [A. Beaton, R. Krug, неопубликованные данные]. В отличие от вирионассоциированной транскриптазы ядерная транскриптаза проявляет существенную активность в отсутствие добавленного праймера кэппированной РНК. Это указывает на то, что цепи вирусных мРНК, уже инициированные in vivo, удлиняются in vitro и/или что клеточные кэппированные РНК, которые аккумулированы в ядре in vivo, праймируют реакцию in vitro. Ядерная транскриптаза также способна инициировать цепи вирусной мРНК in vitro, так как добавка кэппированных РНК стимулирует синтез вирусной мРНК в 2—5 раз, и 5′-конец добавленной кэппированной РНК включается в конечные вирусные мРНК.

Помимо белков NP и P, другой кодируемый вирусом белок — NS1 — аккумулируется в ядре [30, 45, 48, 61, 97]. Он обнаружен и в нуклеолярной, и в нуклеоплазматической фракциях [45, 48]. Результаты последних экспериментов показывают, что распределение белка NS1 между ядрами и нуклеоплазмой варьирует для различных штаммов вируса и разных типов клеток [J. Young, P. Palese, неопубликованные данные]. Действие белка NS1 в ядре неизвестно.

Ж. Роль других функций ядер клеток-хозяев в синтезе вирусной мРНК — сплайсирование и метилирование внутренних А-остатков

Вирус гриппа использует и другие функции ядер клеток-хозяев во время синтеза вирусных мРНК. Вирусные мРНК, подобно другим синтезированным в ядре мРНК, содержат внутренние m^6A-остатки [44, 46]. По всей вероятности, это метилирование катализируется ферментами клеточных ядер. Кроме этого, было получено яркое свидетельство в пользу того, что две из вирусных мРНК, которые кодируют белки M и NS1, сами сплайсированы для образования меньших мРНК [50]. Вследствие того что точки сплайсирования в этих мРНК подобны тем, которые обнаружены в транскриптах, катализируемых РНК-полимеразой II, для сплайсирования этих вирусных мРНК, вероятно, используются клеточные ферменты. Если этот факт подтвердится, он будет единственным примером сплайсирования транскриптов РНК на уровне ядра, которые не управляются ДНК и синтезируются РНК-полимеразой II.

Открытие явления сплайсирования берет свое начало из идентификации в инфицированных вирусом гриппа типа А клетках второго неструктурного белка, NS2, с м.м. 11 000, для которого профиль триптического пептида отличался от такового для других 8 продуктов вирусного гена. Это означает, что один из 8 сегментов вРНК (генома) должен кодировать два белка [56]. Восьмой сегмент (наименьший сегмент вРНК), как было установлено, кодирует не только белок NS1, но и белок NS2. Это было показано в экспериментах с рекомбинантными вирусами, в которых белки NS1 и NS2 были пересортированы вместе [35, 53]. Две различные

мРНК кодируют белки NS1 и NS2, и трансляция обеих этих мРНК in vitro специфически блокировалась гибридизацией 8-го сегмента генома вирусной мРНК, используемой для трансляции in vivo. Методом картирования с использованием SI нуклеазы, которая расщепляет только одноцепочечные участки ДНК, было показано, что масса NS1 мРНК распределена на карте на 0,05—0,95 ед клонированной NS ДНК, а основная масса NS2 мРНК — на 0,59—0,95 ед. [55]. Это свидетельствует о том, что две мРНК 3′-котерминальны. Для того чтобы точно определить, какая последовательность нуклеотидов сегмента NS генома представлена в NS2 мРНК, определяли последовательность 5′-конца этой мРНК методом удлинения праймера с использованием ДНК-праймера из основного участка NS2 мРНК [57]. Результаты экспериментов показали, что NS1 и NS2, кодирующие мРНК, имеют общие 5′-концы, включая последовательность праймера клеточного происхождения и около 56 кодируемых вирусом нуклеотидов. Эта главная последовательность содержит инициирующий кодон для синтеза белка и кодируемую информацию для 9 аминокислот, которые оказались общими для белков NS1 и NS2. За этой главной последовательностью в кодирующей белок NS2 мРНК имеется прерываемый участок из 473 нуклеотидов, и главная последовательность ковалентно связана с основной массой NS2 мРНК на 526—529 нуклеотидах (система нумерации относительно РНК генома). Тот нуклеотид, в котором точно происходит присоединение, не может быть определен из-за повторов последовательности ЦАГГ в положениях 54—57 и 526—529 (см. ниже). Это соединение продолжает участок кодирования белка NS2 и мРНК, но основная масса этой мРНК (340 нуклеотидов) будет транслироваться в +1 рамке считывания по отношению к NS1 мРНК. Схематически изображение такой аранжировки кодирующих белки NS1 и NS2 мРНК вируса гриппа типа А представлено в главе 2 на рис. 9. Впоследствии было показано, что 8-й сегмент генома вирусов гриппа типа В также кодирует две мРНК [14], а NS2 мРНК содержит прерванный участок, в данном случае длиной в 655 нуклеотидов.

Сегмент 7-й генома вирусов гриппа типа А кодирует в данном случае три мРНК, и две из них содержат прерванные участки. Было установлено, что сегмент этого генома кодирует белок М — структурный белок вируса [75]. При определении последовательности клонированных ДНК 7-го сегмента генома для различных штаммов вируса гриппа типа А было замечено, что этот сегмент содержит вторую открытую рамку считывания для трансляции [1, 58, 103]. Это привело к открытию неструктурного белка с м.м. около 15 000, названного белком М2, который кодировался отдельной мРНК [54]. Трансляция in vitro этой мРНК, так же, как и кодирующей М (новое обозначение М1) мРНК, была блокирована гибридизацей 7-го сегмента генома ко всей in vivo вирусной мРНК, используемой для трансляции. Это указывает на то, что кодирующие белки М1 и М2 мРНК транскрибируются из 7-го сегмента генома [60]. Кроме того, была выявлена третья потенциальная

мРНК, кодируемая 7-м сегментом [60]. Она является мРНК$_3$ в большей степени, чем М3 мРНК, так как полипептид М3 не был еще идентифицирован. Эти мРНК$_3$ обнаруживали при определении 5′-последовательностей фракций малых по размеру in vivo мРНК методом удлинения праймера с использованием ДНК праймера из основной массы М2 мРНК: наблюдали два продукта удлинения, один из которых соответствовал М2 мРНК, а другой — мРНК$_3$. Анализ последовательности продуктов удлинения М2 мРНК указывает на то, что эта мРНК имеет тот же 5′-конец, что и М1 мРНК, включая последовательность праймера клеточного происхождения, и около 51 кодируемого вирусом нуклеотида. Прерванный участок состоит из 689 нуклеотидов, основная последовательность связана с основной массой М2 мРНК на 740 или 741 нуклеотиде. Основной участок М2 мРНК может быть транслирован в +1 рамке считывания по отношению к участку М1 мРНК. мРНК$_3$ имеет менее короткую 5′-последовательность лидера, содержащую только 11 вирусспецифических нуклеотидов (плюс кодируемые клеткой-хозяином последовательности праймера), и эта последовательность-лидер соединена с той же последовательностью основной массы, что и М2 мРНК. Кодирующий потенциал мРНК$_3$ только для 9 аминокислот, идентичных аминокислотам карбокси-конца белка М1. Схематическое изображение аранжировки М1 и М2 мРНК, а также мРНК$_3$ представлено в главе 2 на рис. 7.

Существует несколько возможных механизмов генерирования этих вирусных мРНК, содержащих прерванные участки: 1) сплайсирование, подобное тому, которое происходит с ДНК-управляемыми РНК-транскриптами; 2) транскрипционное «перескакивание» во время синтеза мРНК; 3) транскрипция дефектных интерферирующих (ДИ) вРНК, содержащих внутренние делеции. Полученные данные больше соответствуют первому механизму, т. е. сплайсированию. Все виды ДИ вРНК, охарактеризованные до сих пор, были получены из трех наибольших сегментов генома, кодирующих три белка Р [21], и не были выявлены ДИ вРНК, полученные из 7-го и 8-го сегментов. Еще одно свидетельство в пользу второго механизма было получено при анализе последовательностей в местах соединения между сохраняемым и отбрасываемым участками мРНК [14, 57, 60], хотя вполне определенные нуклеотиды, в которых происходит соединение лидирующей и основной последовательностей NS2 и М2 мРНК, а также мРНК$_3$, не могут быть выявлены из-за повторов коротких последовательностей (см. ранее). Четко видно, что последовательности в местах соединения между сохраняемым и отбрасываемым участками подобны согласованной последовательности, обнаруживаемой на обеих сторонах взаимодействующих участков в сплайсированных мРНК эукариотов [70] (табл. 5). Все интроны начинаются с ГТ и кончаются АГ, что подтверждается строением всех мест соединения в мРНК вируса гриппа. Что касается других нуклеотидов в согласованной последовательности, то они варьируют в местах сплайсирования мРНК эукариотов. Многие, но не все, из этих

Таблица 5. *Сравнение согласованных мест сплайсирования с последовательностями в местах соединения сохраненного (эксон) и отбрасываемого (интрон) участков M и NS мРНК вируса гриппа*

	Донор (5′)[3]	Акцептор (3′)[3]
Согласование[1] мРНК[2] вируса гриппа:	$\begin{matrix}Ц\\A\end{matrix}$ АГ | ГТ $\begin{matrix}A\\Г\end{matrix}$ ГТ	$\begin{matrix}Т\\Ц_{п}\end{matrix}$ N $\begin{matrix}Ц\\Т\end{matrix}$ АГ | Г
NS (штамм А)	ЦАГ | ГТАГАГ	$\begin{matrix}Т\\Ц_{9}\end{matrix}$ ЦЦАГ | Г
NS (штамм В)	ГАГ | ГТГГГТ	ГАТЦГГАЦАГ | Т
M (штамм А):		
M2	ААЦ | ГТАТГТ	
мРНК$_3$	ЦАГ | ГТАГАТ	$\begin{matrix}Т\\Ц_{7}\end{matrix}$ Г $(А)_4(Т)_3$ГЦАГ | Г

[1] Из [70].
[2] Последовательности места соединения мРНК вируса гриппа из [14, 57, 60].
[3] Две последовательности, выделенные подужирным, ГТ и АГ, обнаружены во всех сплайсированных местах соединения в мРНК эукариотов.

последовательных нуклеотидов обнаруживаются в местах соединения мРНК вируса гриппа. Например, акцепторная последовательность в NS (NS2) мРНК вируса гриппа типа А составляет исключительную пару с растущей согласованной акцепторной последовательностью. С другой стороны, акцепторные последовательности в NS (NS2) мРНК вируса гриппа В и в M2 мРНК, а также мРНК$_3$ вируса гриппа типа А не имеют пиримидинового участка, прилегающего к 3′-терминальному АГ интрона. Два нуклеотида в местах соединения мРНК вируса гриппа — Ц на 3′-конце последовательности-лидера (5′-эксон) M2 мРНК и Т на 5′-конце 3′-эксона в NS (NS2) мРНК вируса гриппа типа В — встречаются очень редко в этих положениях в местах соединения РНК эукариотов. В целом, однако, можно говорить о хорошем совпадении мест соединения вирусных мРНК с местами соединения последовательного сплайсирования.

Для установления факта использования мест соединения мРНК вируса гриппа клеточными сплайсирующими ферментами R. Lamb и C.-J. Lai [59] клонировали мДНК (двухцепочечная копия фрагмента 7 генома) в вектор вируса SV40 с использованием позднего промотора SV40. мРНК, содержащая непрерывные M-последовательности вируса гриппа и также обе 5′ и 3′ SV40 последовательности, была синтезирована с образованием истинного M1-белка. Кроме этого, была синтезирована мРНК, содержащая прерванную M-последовательность вируса гриппа. Последовательности нуклеотидов, обнаруженные в местах соединения прерванных мРНК, оказываются идентичными последовательностям мРНК$_3$, синтезированным в инфицированных вирусом гриппа

клетках. В последних экспериментах авторам удалось клонировать NS ДНК в тот же вектор SV40:NS1 мРНК с непрерывной последовательностью и NS2 мРНК с прерванной последовательностью были получены и транслированы в белки NS1 и NS2 [R. Lamb, C.-J. Lai, неопубликованные данные]. Далее, когда последовательности вируса гриппа транскрибируются на ДНК-матрице РНК-полимеразой II, они узнаются и используются клеточными ферментами сплайсирования. Однако это еще не доказывает, что клеточные ферменты в ядре сплайсируют мРНК вируса гриппа при их транскрипции из матрицы РНК (вРНК) вирусной транскриптазой. Следует отметить, что общая картина для мРНК с прерванной и непрерванной последовательностями, наблюдаемая при экспрессии M и NS ДНК в вектор SV40, отличается по некоторым параметрам от той, которую обнаруживали в инфицированных вирусом гриппа клетках. Во-первых, M2 мРНК не образуется в системе SV40 [59], что свидетельствует о неиспользовании M2 сайта донора с необычным нуклеотидом — Ц-остатком на 3′-конце последовательности-лидера или 5′-эксона (см. табл. 5). Авторами эксперимента было высказано предположение, что неудача в использовании этого сайта донора может быть каким-либо образом вызвана 5′- или 3′-последовательностями SV40 в предшественнике M1 мРНК. В этом плане было бы интересно определить, продуцируется ли M2 мРНК в тот момент, когда бо́льшая часть этих 5′- и 3′-последовательностей SV40 удаляется или когда удаляется мРНК$_3$ сайта донора, или когда экспрессия M ДНК происходит в другом векторе. Кроме того, количественно в равновесном состоянии существенно отличаются относительные множества прерванных или непрерванных мРНК в системе SV40 и в инфицированных вирусом гриппа клетках. В системе SV40 количества продуцированных прерванных мРНК (мРНК$_3$ или NS2 мРНК) и непрерванных мРНК (M1 или NS1 мРНК) были одинаковыми [59], в то время как в инфицированных вирусом гриппа клетках количество прерванных мРНК составляло только 5% от соответствующей величины для непрерванной мРНК [55, 60]. Это различие некоторым образом дополняло влияние 5′- и 3′-последовательностей SV40 в M1 мРНК предшественника на эффективность сплайсирования [59]. Неизвестно, однако, каким образом контролируется продукция прерванной вирусной мРНК на низком уровне в инфицированных вирусом гриппа клетках. Неизвестно также, почему продукция NS2 мРНК (и, возможно, другой прерванной вирусной мРНК) требует раннего синтеза белка [56]. Одна из возможных причин в том, что фракция ядерных M1 и NS1 вирусных мРНК должна быть каким-либо образом модифицирована кодируемым вирусом белком для того, чтобы подготовить эти мРНК как подходящие субстраты для сплайсирования.

Клеточные ферменты ядра участвуют также в другой основной модификации РНК вируса гриппа — метилировании их внутренних А-остатков. В общей популяции вирусных мРНК имеются приблизительно два m^6А-остатка на цепь в кодируемом вирусом

участке (т. е. после удаления последовательностей праймера клеточного происхождения) [43]. Никакой активности, способной метилировать внутренние А-остатки вирусных мРНК, обнаружено не было [A. Beaton, S. Plotch, R. Krug, неопубликованные данные]. Если это действительно справедливо, то m^6A-остатки в кодируемом вирусом участке вирусных мРНК должны быть в тех же последовательностях (ГАЦ и ААЦ), что и в транскриптах ДНК-зависимой РНК-полимеразы II [23, 46, 87, 101, 102]. Последние эксперименты свидетельствуют, что m^6A-остатки в кодируемом вирусом участке вирусных мРНК действительно находятся в ГАЦ и ААЦ последовательностях [A. Beaton, R. Krug, неопубликованные данные].

Роль внутренних m^6A-остатков неизвестна. Однако было высказано предположение, что эти остатки, имеющиеся в специфическом пуле соответствующих последовательностей ГАЦ и ААЦ в нескольких ДНК-зависимых транскриптах [2, 7, 16], составляют часть сайтов распознавания для сплайсирования или по крайней мере влияют на реакцию сплайсирования. Существует несколько путей доказательства подобной роли внутренних m^6A-остатков: 1) внутреннее метилирование первоначальных РНК транскриптов позднего промотора аденовируса происходит вскоре после их синтеза и перед сплайсированием [18]; 2) m^6A-содержащие последовательности первоначальных транскриптов из поздних транскриптов аденовируса полностью или почти полностью сохраняются в стабильных мРНК в цитоплазме [18]; 3) ингибиция внутреннего метилирования (а также 2′-0 метилирование 5′ предпоследнего основания) РНК ретровируса циклолейкином ингибирует сплайсирование этой РНК [96]. Если m^6A-остатки играют роль в сплайсировании мРНК вируса гриппа, то в простейшем случае только вирусные мРНК, которые подвергаются сплайсированию (M1 и NS1 мРНК), будут содержать m^6A-остатки в кодируемом вирусом участке. Однако в последних экспериментах было показано, что все 8 главных вирусных мРНК содержат m^6A-остатки в кодируемом вирусом участке [A. Beaton, R. Krug, неопубликованные данные]. До сих пор неизвестно, содержат ли M1 и NS1 мРНК больше m^6A-остатков на одну цепь, чем другие вирусные мРНК, а также все или только некоторые m^6A-остатки в M1 и NS1 мРНК расположены стратегически правильно по отношению к предполагаемым местам соединения сплайсирования.

Было получено свидетельство и в пользу того, что последовательности кодируемого клеткой праймера также содержат m^6A-остаток. ^3H-метил-меченная in vivo вирусная мРНК была очищена так, что всю метку обнаруживали в молекулах вирусной мРНК. Этот образец РНК гибридизовали с вРНК и расщепляли панкреатической или Т1 РНКазой: вместе со структурой 5′-метилированного кэпа один из этих трех m^6A-остатков, приходящихся на цепь вирусной мРНК, не был защищен [43]. Для того чтобы можно было утверждать, что незащищенный m^6A в действительности присутствует в интактных РНК клетки-хозяина в малых количе-

ствах в образцах вирусных мРНК, необходимо проверить этот результат с использованием новых методов очистки вирусных мРНК, т. е. селекции с клонированием вирусных ДНК. Если это будет доказано, следует определить, присутствует ли m^6A в участке праймера клеточного происхождения в ГАЦ или ААЦ последовательностях, метилированных клеточными ферментами. В клонированных ДНК, содержащих копию праймера клеточного происхождения, не были обнаружены ни ГАЦ, ни ААЦ последовательности [42], но, как было обсуждено ранее, эти последовательности клеточного происхождения могут и не быть представителями всей популяции в целом. Функция m^6A-остатка, явно присутствующего в последовательности праймера, неизвестна. Этот остаток не требуется для праймирования, поскольку мРНК без m^6A (т. е. РНК 4 A1MV) являются эффективными праймерами in vitro [42]. Тем не менее m^6A может быть распознан вирусной эндонуклеазой и/или инициирующим белком, что увеличивает, таким образом, эффективность праймирования. m^6A в участке клеточного происхождения может присутствовать уже в клеточных кэппированных РНК, которые используются как праймеры; другой вариант — метилирование может происходить во время или после переноса последовательностей клеточного праймера к молекулам вирусной мРНК. Если последнее имеет место в действительности, вирусные ферменты должны использовать специфический пул клеточных транскриптов, который содержит m^6A-остаток в первых 10—13 нуклеотидах на 5′-конце.

III. Синтез транскриптов во всю длину

Комплементарные во всю длину копии вРНК сегментов были идентифицированы в экспериментах по гибридизации ^3H-уридинмеченной инфекционной клеточной РНК к вРНК; полученные гибриды обрабатывали S1 нуклеазой и анализировали методом гель-электрофореза [29]. Было замечено, что гибриды, содержащие неполиаденилированные — поли(А) (—) — транскрипты, мигрировали медленнее, чем соответствующие гибриды, содержащие полиаденилированные транскрипты (т. е. вирусные мРНК), и что скорость миграции гибридов, содержащих поли(А) (—) транскрипты, не изменялась после обработки S1 нуклеазой. Как свидетельствуют эти результаты, поли(А) (—) транскрипты представляют собой полные копии сегментов вРНК, что было подтверждено рядом исследований [28, 31]. Действительно, прямое определение последовательностей 3′-концов поли(А) (—) транскриптов показало, что 13 нуклеотидов на 3′-концах комплементарны последовательности 13 нуклеотидов, обнаруженной на 5′-концах каждого из 8 вРНК сегментов [32]. Следовательно, окончание транскрипции, которое имеет место при синтезе вирусной мРНК по сайту 17—22 нуклеотидов от 5′-концов матриц вРНК, не происходит во время синтеза поли(А) (—) транскриптов во всю длину.

В дополнение к этому полученные результаты показывают, что инициация транскриптов во всю длину происходит без праймера на 3′-терминальном У вРНК [32], а не на предпоследнем Ц, как происходит при синтезе вирусной мРНК [77]. Эти транскрипты имеют pppA 5′-конец, их 5′-последовательности комплементарны 3′-терминальным последовательностям матриц вРНК [32].

Поскольку это полные копии сегментов вРНК (и в них отсутствуют происходящие из клеток последовательности праймера), указанные транскрипты, вероятнее всего, функционируют как матрицы для синтеза вРНК (репликации). В соответствии с этой ролью транскрипты во всю длину не связаны с полирибосомами, но, очевидно, находятся в форме NP [29]. Так как комплементы 5′-концов сегментов вРНК присутствуют в транскриптах во всю длину, 5′- и 3′-концы этих транскриптов обладают способностью образовывать дуплексные структуры — «шпильки», подобные структурам, образуемым вРНК. Эта структура дуплекса, вероятно, служит сигналом распознавания для полимеразы, которая синтезирует и вРНК, и транскрипты во всю длину, что препятствует, таким образом, копированию вирусных мРНК [28]. Однако автор считает более вероятным, что эти «шпильки» служат сигналом распознавания для NP для образования его специфических структур и что только эти РНК, т. е. транскрипты во всю длину вРНК, которые образуют такие специфические структуры нуклеотидов, могут связываться и впоследствии копироваться белками полимеразы (более вероятно, белками P).

В отличие от синтеза мРНК синтез транскриптов во всю длину регулируется: приблизительно эквимолярные количества каждого из 8 транскриптов во всю длину синтезируются в процессе инфекции [29]. Транскрипты во всю длину содержат только около 5% транскриптов вирусной РНК, синтезируемых в инфицированной клетке. Их синтез ингибируется циклогексимидом [4, 29], что свидетельствует о необходимости синтеза одного или более белков, вероятно, вируспецифических, для модифицирования комплекса транскриптазы так, что он инициирует транскрипцию без праймера и продолжает ее, минуя сайт терминации, используемый при синтезе вирусной мРНК.

Транскрипты во всю длину, вероятно, синтезируются в ядре, где происходит синтез и вирусных мРНК [33]. Доказательство этому было получено в том же опыте, который показал, что 8 вирусных мРНК синтезируются в ядре (см. рис. 23). В этом опыте фракции ^{3}H-уридин-пульс-меченных РНК из ядра и цитоплазмы инфицированных клеток были порознь подвергнуты отжигу с избытком вРНК, и получившиеся гибриды после расщепления T2 РНКазой анализировали методом гель-электрофореза. ^{3}H-меченные гибриды с подвижностью транскриптов во всю длину обнаруживали преимущественно в образцах ядер (см. стрелки на рис. 23). Однако остается неизвестным, находятся ли эти транскрипты во всю длину и далее в ядре для управления синтезом вРНК, или, подобно вирусным мРНК, они первыми переносятся в цитоплазму.

Механизм запуска синтеза от мРНК к транскриптам во всю длину неизвестен. Поскольку кэппированные РНК праймеры не используются для инициации синтеза транскриптов во всю длину, не следует ожидать, что вирусный белок PB2, кэп-распознающий белок, будет участвовать в этой инициации. Однако не следует исключать такую возможность, что белок PB1, который катализирует инициацию транскрипции во время синтеза вирусной мРНК, модифицируется таким образом, что он также инициирует транскрипцию транскриптов во всю длину, т. е. инициирует транскрипцию без праймера в большей степени на терминальном У, чем на предпоследнем Ц в матрицах вРНК. Такая модификация белка PB1 может произойти вследствие действия кодируемого вирусом белка (белков), синтез которого необходим для синтеза во всю длину. Идентичность этого предполагаемого кодируемого вирусом белка неизвестна. Доступное доказательство спорно: является ли этот белок (белки) белком (белками) NS: два ts-мутанта с дефектом в сегменте генома NS были дефектны в синтезе во всю длину при непермиссивной температуре [104]. Другое изменение в синтезе вирусной мРНК (отсутствие терминации транскрипции на сайте 17—22 нуклеотидов от 5′-концов матриц вРНК) предполагает, что структуры дуплекса «шпильки», образованные между 5′- и 3′-концами матриц вРНК, раскрываются во время синтеза транскриптов во всю длину. Однако пока неизвестно, как это реально может происходить.

IV. Синтез вРНК (репликация)

Известные данные о синтезе вРНК вируса гриппа недостаточны и в некотором отношении спорны. Различные пути синтеза вРНК во времени были описаны разными группами исследователей. Получены результаты, указывающие на то, что: 1) максимальные скорости синтеза вРНК имеют место в ранних стадиях (около $2^1/_2$ ч после инфекции), и они существенно совпадают с максимальными скоростями синтеза вирусной мРНК [32] или 2) бо́льшая часть синтеза вРНК происходит после пика синтеза вирусной мРНК [4, 67, 89, 98]. Следует ожидать, что это противоречие может быть разрешено при использовании лучших доступных методов измерения синтеза вРНК. Одной из групп исследователей было обнаружено, что синтез вРНК регулируется, т. е. различные относительные количества каждого из 8 фрагментов вРНК продуцируются в разное время после инфекции [32]. В ранних стадиях преимущественно синтезируются NP и NS вРНК. Впоследствии скорости синтеза других вРНК увеличиваются, и скорость синтеза NS вРНК уменьшается по отношению к скорости синтеза M (и других) вРНК. Поскольку подобная картина синтеза вРНК аналогична картине синтеза различных вирусных мРНК во время инфекции по относительным скоростям синтеза, было высказано предположение, что регуляция синтеза вирусной мРНК происходит на

уровне синтеза вРНК (см. раздел «Регуляция синтеза вирусной мРНК в инфицированной клетке»). Одно только исключение из этого подобия между синтезом вРНК и вирусной мРНК было связано с тремя Р-сегментами: скорость синтеза Р вРНК была всегда почти в 10 раз выше скорости синтеза Р мРНК. Так как предполагаемые матрицы для синтеза вРНК — поли (А) (—) транскрипты во всю длину — вырабатываются приблизительно в равных количествах во время инфекции [29, 32], было сделано заключение, что селективное копирование различных матриц происходит в разное время после инфекции.

Не больше сведений известно о синтезе вРНК. Эксперименты с температурным шифтом, осуществленные in vivo с ts-вирусными мутантами, показали вовлечение в синтез вРНК по крайней мере двух белков Р [62], но точная роль этих белков Р и, возможно, других кодируемых вирусом белков в процессе катализа синтеза вРНК неизвестна. Клеточный сайт (ядро или цитоплазма) синтеза вРНК также еще неизвестен. Кроме того, нет данных о том, каковы хотя бы приблизительно эквимолярные количества разных вРНК сегментов, запакованных в вирионы.

Список литературы

1. *Allen H., McCauley J., Waterfield M., Gething M.* — Virology, 1980, v. 107, p. 548—551.
2. *Aloni Y., Dhar R., Khoury G.* — J. Virol., 1979, v. 32, p. 52—60.
3. *Bannerjee A.* — Microbiol. Rev., 1980, v. 44, p. 175—205.
4. *Barrett T., Wolstenholme A., Mahy B.* — Virology, 1979, v. 98, p. 211—225.
5. *Barry R., Ives D., Cruickshank J.* — Nature, 1962, v. 194, p. 1139—1140.
6. *Beaton A., Krug R.* — Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, p. 4423—4436.
7. *Beemon K., Keith J.* — J. Mol. Biol., 1977, v. 113, p. 165—179.
8. *Blaas D., Patzelt E., Kuechler E.* — Virology, 1982, v. 116, p. 339—348.
9. *Blaas D., Patzelt E., Keuchler E.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 4803—4812.
10. *Bouloy M., Morgan M., Shatkin A., Krug R.* — J. Virol., 1979, v. 32, p. 895—904.
11. *Bouloy M., Plotch S., Krug R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 4886—4890.
12. *Bouloy M., Plotch S., Krug R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 3952—3956.
13. *Briedis D., Conti G., Munn E., Mahy B.* — Virology, 1981, v. 111, p. 154—164.
14. *Briedis D., Lamb R.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 186—193.
15. *Caliguiri L., Compans R.* — J. Virol., 1974, v. 14, p. 191—197.
16. *Canaani D., Kahana C., Lavi S., Groner Y.* — Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 2879—2899.
17. *Caton A., Robertson J.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 2591—2603.
18. *Chen-Kiang S., Nevins J., Darnell J.* — J. Mol. Biol., 1979, v. 135, p. 733—752.
19. *Compans R., Caliguiri L.* — J. Virol., 1973, v. 11, p. 441—448.
20. *Compans R., Content J., Duesberg P.* — J. Virol., 1972, v. 10, p. 795—800.
21. *Davis A., Hiti A., Nayak D.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 215—219.

22. *Dhar R., Chanock R., Lai C.-J.* — Cell, 1980, v. 21, p. 495—500.
23. *Dimock K., Stoltzjus C.* — Biochemistry, 1977, v. 16, p. 471—478.
24. *Etkind P., Krug R.* — Virology, 1974, v. 62, p. 38—45.
25. *Etkind P., Krug R.* — J. Virol., 1975, v. 16, p. 1464—1475.
26. *Gupta K., Kingsbury D.* — Virology, 1982, v. 120, p. 518—523.
27. *Hastie N., Mahy B.* — J. Virol., 1973, v. 12, p. 951—961.
28. *Hay A., Abraham G., Skehel J. et al.* — Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, p. 4179—4209.
29. *Hay A., Lomniczi B., Bellamy A., Skehel J.* — Virology, 1977, v. 83, p. 337—355.
30. *Hay A., Skehel J.* — In: Negative Strand Viruses. N. Y.: Academic Press, 1975, v. 2, p. 635—655.
31. *Hay A., Skehel J. McCauley J.* — Phil. Trans. R. Soc., 1980, v. B288, p. 341—348.
32. *Hay A., Skehel J., McCauley J.* — Virology, 1982, v. 116, p. 517—522.
33. *Herz C., Stavnezer E., Krug R., Gurney T.* — Cell, 1981, v. 26, p. 391—400.
34. *Horisberger M.* — Virology, 1980, v. 107, p. 302—305.
35. *Inglis S., Barrett T., Brown C., Almond J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 3790—3794.
36. *Inglis S., Carroll A., Lamb R., Mahy B.* — Virology, 1976, v. 74, p. 489—503.
37. *Inglis S., Mahy B.* — Virology, 1979, v. 95, p. 154—164.
38. *Jackson D., Caton A., McCready S., Cook P.* — Nature, 1982, v. 296, p. 366—368.
39. *Koennecke I., Boschek C., Scholtissek C.* — Virology, 1981, v. 110, p. 16—25.
40. *Krug R.* — Virology, 1971, v. 44, p. 125—136.
41. *Krug R.* — Virology, 1972, v. 50, p. 103—113.
42. *Krug R.* — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1981, v. 93, p. 125—150.
43. *Krug R., Broni B., Bouloy M.* — Cell, 1979, v. 18, p. 329—334.
44. *Krug R., Broni B., LaFiandra A. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 5874—5878.
45. *Krug R., Etkind P.* — Virology, 1973, v. 56, p. 334—348.
46. *Krug R., Morgan M., Skatkin A.* — J. Virol., 1976, v. 20, p. 45—53.
47. *Krug R., Plotch S., Ulmanen I. et al.* — In: The Replication of Negative-Strand Viruses. Elsevier/North-Holland, 1981, p. 291—302.
48. *Krug R., Soeiro R.* — Virology, 1975, v. 64, p. 378—387.
49. *Krug R., Ueda M., Palese P.* — J. Virol., 1975, v. 16, p. 790—796.
50. *Lamb R., Briedis D., Lai C.-J., Choppin P.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. Academic Press, 1981, p. 141—158.
51. *Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1976, v. 74, p. 504—519.
52. *Lamb R., Choppin P.* — J. Virol., 1977, v. 23, p. 816—819.
53. *Lamb R., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 4908—4912.
54. *Lamb R., Choppin P.* — J. Virol., 1981, v. 112, p. 729—737.
55. *Lamb R., Choppin P., Chanock R., Lai C.-J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA 1980, v. 77, p. 1857—1861.
56. *Lamb R., Etkind P., Choppin P.* — Virology, 1978, v. 91, p. 60—78.
57. *Lamb R., Lai C.-J.* — Cell, 1980, v. 21, p. 475—485.
58. *Lamb R., Lai C.-J.* — Virology, 1981, v. 112, p. 746—751.
59. *Lamb R., Lai C.-J.* — Virology, 1982, v. 123, p. 237—256.
60. *Lamb R., Lai C.-J., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 4170—4174.
61. *Lazarowitz S., Compans R., Choppin P.* — Virology, 1971, v. 46, p. 830—843.
62. *Mahy B., Barrett T., Nichol S. et al.* — In: The Replication of Negative Strand Viruses — Developments in Cell Biology. Elsevier/North-Holland, 1981, v. 7, p. 379—387.
63. *Mahy B., Bromley P.* — J. Virol., 1970, v. 6, p. 259—268.

64. *Mahy B., Hastie N., Armstrong S.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, p. 1421—1424.
65. *Mahy B., Hastie N., Raper R. et al.* — In: Negative Strand Viruses. N. Y.: Academic Press, 1975, p. 445—467.
66. *Manley J., Sharp P., Gefter M.* — J. Mol. Biol., 1982, v. 159, p. 581—599.
67. *Mark G., Taylor J., Broni B., Krug R.* — J. Virol., 1979, v. 29, p. 744—752.
68. *McGeoch D., Kitron N.* — J. Virol., 1975, v. 15, p. 685—695.
69. *Meier-Ewert H., Compans R.* — J. Virol., 1974, v. 14, p. 1083—1091.
70. *Mount S.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 459—472.
71. *Mowshowitz S.* — Virology, 1978, v. 91, p. 493—495.
72. *Mowshowitz S., Ueda M.* — Arch. Virol., 1976, v. 52, p. 135—141.
73. *Nevins J., Darnell J.* — Cell, 1978, v. 15, p. 1477—1493.
74. *Nichol T., Penn C., Mahy B.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 57, p. 407—413.
75. *Palese P.* — Cell, 1977, v. 10, p. 1—10.
76. *Plotch S., Bouloy M., Krug R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 1618—1622.
77. *Plotch S., Bouloy M., Ulmanen I., Krug R.* — Cell, 1981, v. 23, p. 847—858.
78. *Plotch S., Krug R.* — J. Virol., 1977, v. 21, p. 24—34.
79. *Plotch S., Krug R.* — J. Virol., 1978, v. 25, p. 579—586.
80. *Plotch S., Tomasz J., Krug R.* — J. Virol., 1978, v. 28, p. 75—83.
81. *Revel M., Groner Y.* — Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, p. 1079—1126.
82. *Robertson H., Dickson E., Plotch S., Krug R.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 925—942.
83. *Robertson J.* — Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 3745—3757.
84. *Robertson J., Schubert M., Lazzarini R.* — J. Virol., 1981, v. 38, p. 157—163.
85. *Rott R., Scholtissek C.* — Nature, 1970, v. 228, p. 56.
86. *Salditt-Georgieff M., Harpold M., Chen-Kiang S., Darnell J.* — Cell, 1981, v. 19, p. 69—78.
87. *Schibler U., Kelly D., Perry R.* — J. Mol. Biol., 1977, v. 115, p. 695—714.
88. *Scholtissek C., Rott R.* — J. Gen. Virol., 1969, v. 4, p. 125—137.
89. *Scholtissek C., Rott R.* — Virology, 1970, v. 40, p. 989—996.
90. *Schubert M., Keene J., Herman R., Lazzarini R.* — J. Virol., 1980, v. 34, p. 550—559.
91. *Shatkin A.* — Cell, 1976, v. 9, p. 645—653.
92. *Skehel J., Burke D.* — J. Virol., 1969, v. 3, p. 429—438.
93. *Skehel J., Hay A.* — Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 1207—1219.
94. *Smith G., Hay A.* — Virology, 1982, v. 118, p. 96—108.
95. *Spooner L., Barry R.* — Nature, 1977, v. 268, p. 650—652.
96. *Stoltzfus C., Dane R.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 918—931.
97. *Taylor J., Hampson A., White D.* — Virology, 1969, v. 39, p. 419—425.
98. *Taylor J., Illmensee R., Litwin S.* et al. — J. Virol., 1977, v. 21, p. 530—540.
99. *Ulmanen I., Bront B., Krug R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 7355—7359.
100. *Ulmanen I., Broni B., Krug R.* — J. Virol., 1983, v. 45, p. 27—35.
101. *Wei C.-M., Gershowitz A., Moss B.* — Biochemistry, 1976, v. 15, p. 397—401.
102. *Wei C.-M., Moss B.* — Biochemistry, 1977, v. 16, p. 1672—1676.
103. *Winter G., Fields S.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 1965—1974.
104. *Wolstenholme A., Barrett T., Nichol S., Mahy B.* — J. Virol., 1980, v. 35, p. 1—7.

4

Генетическое родство вирусов гриппа (РНК и белок)

К. Шолтиссек (C. Scholtissek)

I. Введение

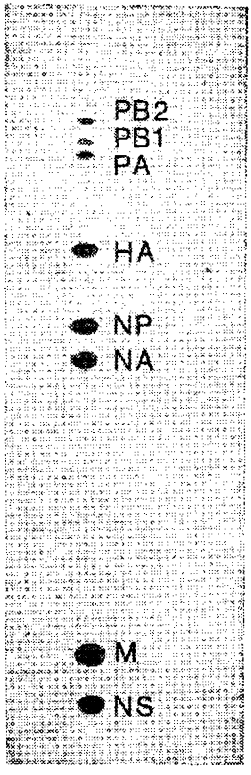
Геномы вирусов гриппа типов А и В состоят из 8 одноцепочечных сегментов РНК различной молекулярной массы, в то время как геном вируса гриппа типа С содержит только 7 сегментов (для обзора см. [91, 92, 93, 103, 104]. Вследствие такой необычной структуры генома вируса гриппа определенный интерес представляет генетическое сравнение различных изолятов вируса, поскольку при двойной инфекции хозяина двумя различными штаммами одного и того же типа каждый сегмент РНК ведет себя как хромосома и возможно свободное перераспределение сегментов с образованием новых штаммов. Поэтому при сравнении двух штаммов каждая пара аллельных сегментов РНК должна быть исследована отдельно.

Для изучения генетического родства вирусов гриппа были разработаны и использованы различные аналитические методы, каждый из которых имеет свою специфическую ценность и область применения. Одни методы относительно просты и могут быть использованы для быстрого анализа большого количества вновь выделенных штаммов, другие более трудоемки по времени и по затрачиваемым для их постановки материалам, но дают более точные ответы. В этой главе будут описаны различные методические приемы и обсуждены их достоинства и недостатки. Поскольку большинство из сравнительных данных о генетическом родстве вирусов гриппа типа А доступно, далее будут рассмотрены и обсуждены различные подтипы этих вирусов.

II. Генетическое родство вирусных РНК

A. Различия в скоростях миграции A_3 сегментов РНК, выявленные методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГЭ)

Сегменты РНК вирусов гриппа (вРНК) могут быть мечены in vivo и in vitro, а затем разделены в ПААГЭ в присутствии 6 М мочевины в соответствии с их различиями в размерах и вторичной



16. ПААГЭ штамма A/FPV/Rostock/34 (H7N1) вируса гриппа.

Из очищенного ^{32}P-меченного вируса выделяли РНК. Сегменты РНК разделяли методом «Slab»-ПААГЭ в присутствии 6 М мочевины. РНК наблюдали при экспозиции пленки с гелем γ-лучами [111]. Сегменты РНК пронумерованы в соответствии со скоростями их миграции. Сегмент Pol1 (PB2)—самый медленно движущийся. PB2 (=Pol 1=P3) — КЭП-распознающий белок; PB1 (=Ptra=P1) — инициирующий белок; PA (=Pol 2=P2) — удлиняющий белок [56, 57, 63]. Назначение белков P3 и P1 отличается от данных C. Scholtissek [103, 104, 105]. Скорости миграции сегментов 1 и 2 вРНК штамма PR8, который ранее использовали для сравнительного распределения, отличаются по данным разных лабораторий вследствие незначительных изменений в условиях разделения (концентрации мочевины в буфере при ПААГЭ). HA — гемагглютинин; NP — нуклеопротеид; NA — нейраминидаза; M — матриксный или мембранный белок; NS — неструктурный белок [данные любезно предоставлены V. von Hoyningen].

структуре. Скорости миграции аллельных генов (т. е. сегментов РНК) штаммов различных подтипов или штаммов, относящихся к одному и тому же подтипу, могут существенно различаться.

Анализ электрофореграмм вирусной РНК позволил дать ответы при решении следующих задач.

1. Различия в скоростях миграции сегментов РНК в ПААГЭ в ограничивающих денатурирующих условиях — достаточно специфические для штаммов различного прототипа. Они могут коррелировать с различиями в скоростях миграции соответствующих вирусных белков. Конструируя специфические рекомбинанты, в особенности используя температурочувствительные мутанты, можно добиться установления соответствия между различными сегментами РНК и соответствующими определенными белками и/или функциями [6, 48, 50, 89, 90, 91, 97, 103, 104]. Подобное распределение сегментов РНК вируса гриппа птиц типа А штамм А/чума птиц/Rostock/34 (FPV, H7N1) и соответствующих генных продуктов показано на рис. 16. В настоящее время этот метод широко используется для установления источника происхождения сегментов РНК в рекомбинантах, полученных в лабораторных условиях.

2. При сравнении скоростей миграции сегментов РНК родительских и дочерних вирионов было показано, что генетическая пересортировка между вирусами гриппа типа А происходит в пищеварительном тракте естественно и лабораторно инфицированных уток [52].

3. Сравнение мигрирующих в ПААГЭ образцов РНК в присутствии мочевины используется как эпидемиологический метод идентификации независимых изолятов вируса гриппа типа А [51, 92]. Так были определены различия в скоростях миграции сегментов РНК при ПААГЭ последних изолятов вируса гриппа типа В [59].

Следует, однако, отметить, что некоторые точечные мутации могут вызывать изменение вторичной структуры РНК и существенно влиять на скорость миграции фрагментов в ПААГЭ [115].

Если вторичная структура РНК сильно изменяется при обработке глиоксалем, гены P, NP, M и NS одного штамма вируса гриппа имеют неразличающиеся от подобных генов других штаммов картины характеристики миграции в ПААГЭ. В этих денатурирующих условиях только сегменты РНК, кодирующие гликопротеиды — HA и NA, проявляют существенные различия в скоростях миграции, что указывает на действительные различия в молекулярных массах между штаммами вируса [24].

Б. Молекулярная гибридизация

1. Прямая РНК-РНК гибридизация

Двухцепочечная РНК относительно устойчива к обработке панкреатической РНК-азой или T1 РНКазой в присутствии 2xSSC (0,3 M NaCl, 0,03 M цитрат натрия), в то время как одноцепочечная РНК полностью расщепляется до кислоторастворимых олигонуклеотидов. Специфическая РНК-полимераза вируса гриппа, полученная из инфицированных клеток, синтезирует in vitro РНК, которая полностью комплементарна вРНК [102]. Эта кРНК может быть радиоактивно мечена, если синтез происходит в присутствии меченых нуклеозидтрифосфатов. Продукт реакции может быть затем превращен в двухцепочечную РНК методом гибридизации с избытком немеченой вРНК того же штамма. Если для гибридизации используется вРНК другого штамма, двухцепочечная структура этих РНК проявляет значительную непарность оснований. Эти участки с непарными основаниями не обладают устойчивостью к действию РНКазы и расщепляются до кислоторастворимого материала. Таким образом, гибридизацией с последующей обработкой РНКазой можно получить данные об относительной гомологичности последовательности оснований между двумя генетически родственными штаммами. С помощью такой техники было показано, что разные штаммы вируса гриппа типа А существенно различаются по последовательностям оснований их РНК [108].

Когда вРНК разных штаммов вируса гриппа метили при их выращивании в присутствии ^{32}P-ортофосфата, методом ПААГЭ можно выделить индивидуальные сегменты РНК. Эти меченые сегменты затем использовали для гибридизации с избытком немеченой кРНК, выделенной из микросомальной фракции инфицированных куриных эмбрионов. С помощью такой техники 8 сегментов РНК разных штаммов вируса гриппа типа А можно разделить на две группы: те, которые значительно сохранились, и те, которые сохранились в меньшей степени при сравнении различных подтипов. Сегменты вРНК, кодирующие два гликопротеида — HA и NA, меньше сохранились, в то время как сегменты, кодирующие три белка P, белки NP и M, сохранились в большей степени [48,

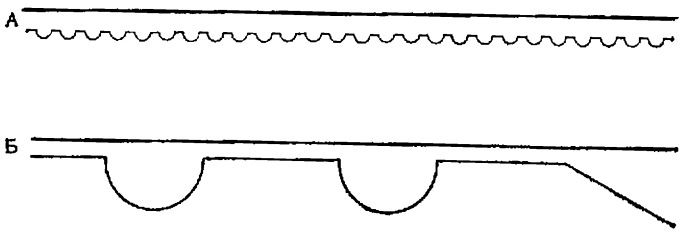
99, 111, 112]. Что же касается последовательности оснований наименьшего сегмента вРНК, кодирующего белки NS, вирусы гриппа типа А могут быть четко разделены на две группы [110].

Техника прямой РНК-РНК-гибридизации оказалась весьма полезной при установлении новой номенклатуры для вирусов гриппа типа А [131]. По результатам защиты от РНКазы НА штаммов, ранее классифицированные как Н0, Н1 и Hsw1, считают принадлежащими к одному подтипу (теперь Н1) [112]. Подобно этому НА ранее обозначенных подтипов Н3, Heq2 и Hav7 теперь объединены в подтип Н3. Ген НА штамма А/утка/Украина/1/63 (Hav7Neq2) обнаруживал наибольшую защиту от РНКазы (92%) при гибридизации с РНК штамма A/Hong Kong/1/68 (H3N2) вируса гриппа человека. Интересен тот факт, что штамм А/утка/Украина/1/63 был выделен до появления первого прототипа Н3 в человеческой популяции [114]. Гены НА последних изолятов Hav7 от птиц (А/цапля/Хабаровск/700/73, А/утка/Хабаровск/1610/72, А/утка/Хабаровск/698/73) имели 100% защиту от РНКазы с последующей гибридизацией к РНК штамма A/Hong Kong/1/68 (H3N2). В этих случаях, однако, нельзя исключить тот факт, что НА исходного штамма Н3 человека вернулся обратно в резервуар животных. Однако следует помнить, что три изолята штамма Хабаровск не идентичны Н3 штаммам вируса гриппа человека, поскольку их 8 сегментов РНК имеют только 40% защиту от РНКазы при гибридизации с сегментами РНК штаммов вируса гриппа типа А [110]. Эти последние результаты позволяют предположить наличие пересортировки генов из штаммов вируса гриппа человека и животных. Защита от действия РНКазы гибридных молекул между сегментами 4 РНК штаммов Heg1 и Hav1 составила более 60%, что указывает на принадлежность этих штаммов к одному подтипу (в настоящее время Н7).

В отношении генов NA на основе серологических данных было высказано предположение, что подтипы Nav2, Nav3 и Nav6 составляют одну группу [130]. Данные гибридизации показали, что гены NA изученных штаммов Nav2 и Nav3 (по новой номенклатуре N3) действительно близкородственны (80% и бóльшая защита от РНКазы), в то время как защита генов NA штаммов Nav2 и Nav3 с РНК Nav6 штаммов была только на 20% [116]. Это свидетельствует о принадлежности генов NA последних штаммов к отдельной подгруппе (N9 по новой номенклатуре).

Различные уровни защиты от действия РНКазы были обнаружены также и для представителей различных подтипов НА. Например, в то время как показатель этой защиты между генами НА большей части изученных подтипов составил 30%, для представителей подтипов Н3 (Гонконг) и Н7 (FPV) штаммов эта величина была равна 43% [111]. Это согласуется с эволюционным деревом различных НА вируса гриппа типа А, что было установлено при прямом секвенировании РНК (см. ниже, рис. 18).

Техника прямой гибридизации удобна для выяснения происхождения различных сегментов РНК в искусственных рекомби-



17. Альтернативные схемы случайного (А) и по трем кластерам (Б) распределения 50% неспарности оснований. Для обсуждения см. текст.

нантах, составленных in vitro [112, 113]. Этот метод оказался полезным и при идентификации нового пандемического штамма 1977 г. (A/СССР/90/77/H1N1), который генетически был идентичен изолятам 1950 г. (A/Fort Warren 1/50/H1N1) [114, 115]. И, наконец, эта техника помогла при определении генетического дрейфа среди различных штаммов вируса гриппа [106].

При сравнительном изучении генов НА различных патогенных и непатогенных штаммов вируса гриппа птиц подтипа Н7 было обнаружено, что несколько штаммов с расщепляемым НА были генетически относительно далеки друг от друга, в то время как некоторые штаммы подтипа Н7 с расщепляемыми НА были очень близки генам штаммов с нерасщепленным НА. Это говорит о том, что эволюция большей части последовательностей в пределах генов Н7 НА не зависит от эволюции сайта расщепления [17].

Однако существуют ограничения для использования метода прямой гибридизации: 1) если различия в последовательностях оснований двух РНК становятся значительными, и они широко распространены в пределах молекул, гибриды нестабильны и могут расщепляться РНКазой. Например, если имеет место 50% гомология последовательности оснований для двух РНК, распределение изменений может быть, как показано на рис. 17: в верхней части (А) неспарность оснований одинаково распределена по всей длине молекулы. В этом случае защита от действия РНКазы будет незначительной. В нижней части (Б) гомологичные последовательности сгруппированы в нескольких полностью сохранившихся областях. В этом случае защита будет действительно равной 50%. Ситуация, подобная последней модели, правильна для сегментов РНК, кодирующих НА и NA. Остаточная защита от действия РНКазы для гибридных молекул между подтипами — около 30 и 20% соответственно — существует вследствие наличия высококонсервативных областей, как было показано по профилям плавления. Таким образом, мутации, приводящие к заменам аминокислот, летальны в этих областях, в то время как в изменчивых областях допустимы многие мутации [105]. В большинстве случаев, когда защита от РНКазы гибридов РНК относительно низкая, техника дает результаты, которые не дооценивают

гомологию последовательности оснований РНК (см. ниже); 2) одноточечные мутации не могут быть выявлены с помощью этой техники гибридизации. Даже если РНКаза расщепляет молекулу гетерологичной двухцепочечной РНК в месте точечной мутации, материал вместе с тем будет кислотонерастворим. Однако метод может стать очень чувствительным и может быть использован для отличия близкородственных генов, если до обработки РНКазой гибридные молекулы нагревали в присутствии 1% формальдегида. В этом случае непарность оснований вследствие точечной мутации вызывает изменение точки плавления, вследствие чего и образуются одноцепочечные участки, которые фиксируются формальдегидом. Этот метод был прокалиброван за счет введения случайных точечных мутаций с использованием азотистой кислоты и измерения профилей плавления гибридных РНК по отношению к числу мутаций. Так, в молекуле РНК по длине гена НА определяется 10 точечных мутаций [106].

2. Конкурентная гибридизация

Для конкурентной гибридизации молекулы гомологичных двухцепочечных РНК были получены путем отжига фрагментов ^{125}I-меченных вРНК [9] с немеченой кРНК. Меченую двухцепочечную РНК затем плавили и отжигали в присутствии возрастающих количеств сегмента немеченой аллельной вРНК генетически родственного штамма. Если немеченая вРНК содержала последовательность РНК, идентичную или частично гомологичную последовательности ^{125}I-меченной вРНК, немеченая вРНК будет конкурировать за сайты отжига на кРНК и предотвращать полностью или частично обратный отжиг меченой вРНК. Затем эта меченая вРНК может расщепляться РНКазой. Если графически выразить зависимость устойчивости к РНКазе и количества различных конкурирующих РНК, конечное плато позволяет идентифицировать генетическое родство генов вируса гриппа [10]. Ограничения этого метода подобны тем, которые описаны для прямой РНК-РНК-гибридизации [121]. Его преимущество состоит в том, что для гибридизации требуется очень незначительное количество материала. Однако количество образцов, необходимых для достижения этого плато, относительно высоко, особенно когда сегменты двух аллельных РНК далеки друг от друга [9, 10].

Пользуясь указанным методом, удалось обнаружить большое генетическое разнообразие среди одновременно циркулирующих штаммов подтипа Hav7Neq2 (H3N8) у птиц одной географической области. Это было сравнимо с разнообразием, выявленным среди выделенных 9 лет назад человеческих штаммов подтипа H3N2 [121]. Более того, при использовании этой техники выявлены естественно возникающие рекомбинанты между последними одновременно циркулирующими пандемическими штаммами подтипов H1N1 и H3N2 [10]. Вирус гриппа типа А, выделенный от обыкно-

венного тюленя, был генетически охарактеризован с помощью техники конкурентной гибридизации. Все сегменты РНК этого вируса были более родственны соответствующим сегментам различных штаммов вируса гриппа птиц, чем сегментам других штаммов вируса гриппа млекопитающих. Этот факт может свидетельствовать о том, что новые вирусы млекопитающих могут появляться за счет пересортировки штаммов вируса гриппа птиц [11, 128].

3. ДНК-РНК-гибридизация

Относительно стабильная проба ^{3}H-меченной ДНК для гибридизации может быть приготовлена транскрибированием индивидуальных сегментов вРНК с использованием обратной транскриптазы в присутствии актиномицина D и ^{3}H-d НТФ. Одноцепочечная комплементарная ДНК (кДНК) может быть далее гибридизована с немеченой вРНК гомологичных или гетерологичных штаммов. При гетерологичной гибридизации участки одноцепочечной РНК расщепляются нуклеазой S1 [94]. С помощью этого метода было обнаружено, что геномы нескольких штаммов вируса типа А более вариабельны, чем геномы штаммов типа В, и что геномы штаммов типа В сильнее варьируют, чем геномы штаммов типа С [94]. Кроме того, было изучено генетическое родство 8-го сегмента (ген NS) различных штаммов. Как было показано прямой РНК-РНК-гибридизацией, можно выделить по крайней мере две различные группы генов NS вируса гриппа типа А.

Степень гомологии, оцененная этим способом, несколько ниже, чем величины, полученные при прямой РНК-РНК-гибридизации. Однако преимущество техники ДНК-ДНК-гибридизации заключается в том, что один раз приготовленная партия меченой ДНК может быть использована в течение длительного времени.

4. Анализ двухцепочечных обработанных нуклеазой S1 гибридных молекул методом ПААГЭ

Преимущество этого метода заключается в том, что после инфекции в присутствии циклогексимида синтезируется кРНК [109], которая может быть мечена ^{3}H-уридином [49]. Эта меченая кРНК может быть далее гибридизована с избытком немеченой гомологичной или гетерологичной вРНК. После обработки нуклеазой S1 двухцепочечные молекулы анализируют методом ПААГЭ. Интенсивное расщепление нуклеазой S1 разрушает всю одноцепочечную РНК и оставляет интактными только сегменты гомологичной двухцепочечной РНК. Эта техника достаточно проста и может быть использована для анализа рекомбинантов, полученных in vitro из штаммов различных подтипов [44, 45, 49]. Ограниченная обработка нуклеазой S1 приводит к отделению только одноцепочечных хвостов от молекул гибридов и предотвращает вытеснение частично двухцепочечных молекул гелем. Эта обработка не разрушает гетерологичные гибриды генетически высокородственных штам-

мов, однако эти молекулы гибридов мигрируют более медленно в ПААГЭ, чем соответствующие РНК-РНК-гибриды. Настоящая техника используется для сравнения хронологически близкородственных вирусов гриппа человека. Были выявлены различия между изолятами H3N2, A/Port Chalmers/73 и A/Scotland/74, в сегментах 1, 2, 4, 6, 7 РНК [49]. Подобные исследования были проведены с более близкородственными вирусами, выделенными во время одной эпидемии [46, 61].

Достоинство этого метода состоит в том, что используется стабильная проба ^{3}H-кРНК. Метод чувствителен и относительно прост. Недостаток метода связан с тем, что он не дает каких-либо количественных результатов. Хотя эта техника чувствительна, она не позволяет определять точечные мутации в РНК. Более того, чувствительность метода может мешать правильной идентификации сегментов РНК в рекомбинантах, в которых один из родителей был частично инактивирован или обработан мутагенами, хотя безмолвные мутации при использовании этого метода могут быть выявлены [49].

В. Метод олигонуклеотидного фингерпринта

РНК может быть: расщеплена эндонуклеазами, которые отщепляют ее после специфического основания, что приводит к образованию смеси нуклеотидов и олигонуклеотидов различной длины. Продукты расщепления можно разделить методом двухмерного гель-электрофореза [27] или гомохроматографией после электрофореза. Если вирусная РНК мечена in vivo при выращивании вируса в присутствии ^{32}P, должны быть использованы большие количества ^{32}P-фосфата. Более чувствительный метод заключается в том, чтобы сначала расщепить немеченую РНК и затем пометить олигонуклеотиды на 5′-концах с использованием γ^{32}P-АТФ или полинуклеотидкиназы для проведения двухмерного гель-электрофореза [40]. Поскольку рибонуклеаза Т1 отщепляет после гуанидиновых остатков, образуются 3′-ГМФ и оканчивающиеся на Г олигонуклеотиды. Представляют интерес большие олигонуклеотиды, так как они могут быть уникальны для каждой РНК. При сравнении больших олигонуклеотидов двух генетически родственных штаммов выявляют только процентное содержание каждого генома, поэтому при таком сравнении могут выпасть из поля зрения многие точечные мутации. Более того, олигонуклеотиды, одинаковые по длине и составу оснований, но имеющие различные последовательности, неразличимы в большинстве разделяющих систем. Другое ограничение анализа методом олигонуклеотидного картирования состоит в том, что, если гомология общей последовательности оснований двух РНК менее 90%, олигонуклеотидные карты будут иметь лишь несколько общих или вообще не будут иметь уникальных олигонуклеотидов [1].

Метод олигонуклеотидного фингерпринта был использован с

целью демонстрации факта, что 8 сегментов РНК вирусов гриппа типа А являются уникальными продуктами, а не образуются в результате распада из большой молекулы [80]. Кроме того, было показано, что гены белка М двух штаммов вируса чумы птиц отличаются по трем уникальным олигонуклеотидам [49]. Подобным же образом с использованием этой техники была изучена генетическая вариабельность штамма Hong Kong вируса гриппа [87]. Методом олигонуклеотидного картирования было показано, что все сегменты РНК изолятов подтипа H1N1, которые вызвали пандемию в 1977 г., были близки сегментам РНК штаммов 1950 г. Это свидетельствует, что штамм 1950 г. находился в дремлющем состоянии в течение многих лет [83]. В последних экспериментах по олигонуклеотидному фингерпринту авторами было показано, что 7 сегментов РНК штамма A/СССР/90/77 были близки изоляту A/Fort Warren/1 [50]. Только гены белка М (7-й сегмент РНК) этих двух штаммов были менее близки. В другом эксперименте с использованием того же метода олигонуклеотидного картирования было установлено, что некоторые вирусы подтипа H1N1, выделенные после 1977 г., являлись рекомбинантами между вирусами одновременно циркулирующих подтипов H1N1 и H3N3 [139].

Метод олигонуклеотидного фингерпринта и частичное секвенирование РНК штаммов H1N1 вируса гриппа человека, которые были выделены в 1977 г., показали дивергентный характер эволюции этих штаммов от общего прародителя. Этот штамм-прародитель был родствен штаммам, циркулировавшим в 50-х годах [140].

Геномы вирусов гриппа утки типа А, выделенных в естественных условиях Северной Франции в 1976 г., подвергли анализу с помощью того же метода. Из двух сравненных штаммов только гены, которые кодировали НА и белок М, были близкородственны, в то время как другие гены демонстрировали большую вариабельность. Это послужило дальнейшим свидетельством в пользу того, что рекомбинация вирусов гриппа животных происходит в естественных условиях [25].

Сравнительный анализ методом олигонуклеотидного фингерпринта РНК последних выделенных штаммов вируса гриппа типа А человека и свиньи показал, что РНК этих вирусов очень близки. Этот факт свидетельствует о том, что штаммы вируса гриппа подтипа H3N2 свиньи, выделенные в Восточной Азии, произошли из современных штаммов вируса гриппа человека [86].

Результаты анализа последних штаммов подтипа H2N2 и ранних штаммов подтипа H3N2, выделенных в 1967/68 гг., позволяют предположить, что в результате пересортировки 7 генов штамма вируса гриппа типа H2N2, циркулирующего во время или непосредственно перед первым появлением штамма подтипа H3N2, были заимствованы этим последним штаммом подтипа H3N2 [84].

Подобное изучение вирусов гриппа типа С, выделенных между 1949 и 1979 г., показало их выраженную генетическую стабильность в течение длительного времени [81].

Г. Секвенирование сегментов РНК

1. Секвенирование ^{32}P-концевых меченых РНК частичным расщеплением нуклеазой

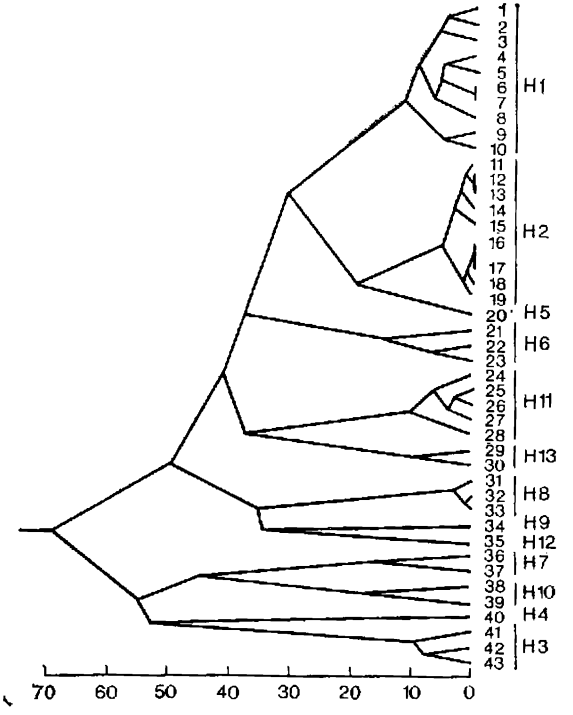
Первые сравнительные последовательности 5′- и 3′-концов РНК вирусов гриппа типов А и В были получены с использованием метода секвенирования по H. Donis-Keller и соавт. [29]. Вирусную РНК обрабатывали щелочной фосфатазой для отделения 5′-терминального фосфата. Далее РНК инкубировали с ^{32}P-АТФ и полинуклеотидкиназой. Аликвоты меченных по концу РНК частично расщепляли РНКазами, различающимися по своим специфическим свойствам, и полученные смеси меченых олигонуклеотидов разделяли методом ПААГЭ. Было обнаружено, что на 5′-концах РНК вируса чумы птиц последовательность первых 13 нуклеотидов была одинаковой во всех 8 сегментах. Более того, скопление 5—7 остатков У наблюдали в 17—23 положениях. На 3′-конце последовательность первых 12 нуклеотидов также была одинаковой для всех 8 сегментов. При сравнении различных штаммов было обнаружено, что последовательности всех терминальных нуклеотидов были высококонсервативны, включая и последовательности РНК вирусов гриппа типов В и С [26, 93, 98, 118].

Описанная техника не использовалась широко для определения последовательности сегментов РНК вируса гриппа, поскольку были разработаны более простые и достоверные методы.

2. Секвенирование 3′-конца РНК с использованием дидеокси-метода

Дидеокси-метод, первоначально предложенный F. Sanger и соавт. [101], был применен для секвенирования сегментов РНК вирусов гриппа [2, 47]. Сегменты вирусной РНК были полиаденилированы рибоаденилаттрансферазой E. coli. Затем с использованием p(dT8dA) в качестве праймера была синтезирована вирусспецифическая кДНК, или, альтернативно, синтетический додекамер, специфический для общей 3′-терминальной последовательности, был использован для праймирования, исключая добавление поли(А). Реакционная смесь также содержала один из четырех 2′, 3′-дидеоксинуклеозидтрифосфатов. В этих условиях 2′, 3′-дидеоксинуклеотид случайно включен вместо соответствующего деоксинуклеотида так, что происходит завершение цепи. Смеси меченых олигодезоксинуклеотидов разделяли методом ПААГЭ. Получающаяся картина давала возможность определить происхождение последовательности нуклеотидов.

Сравнение 3′-терминальных последовательностей 220 оснований 7-го сегмента (гена матриксного белка М) и 230 оснований 8-го сегмента (гена неструктурного белка NS) штаммов вируса гриппа человека, выделенных между 1934 и 1977 г., показало, что эти сегменты сохранились в процессе эволюции H3N2 из H1N1.



18. Дендрограмма, свидетельствующая о родстве N-терминальных последовательностей аминокислот HA1, полученных из геномных последовательностей вирусов, представляющих 13 известных подтипов [129].

Последовательности были построены с использованием аминокислот, невариабельных в определенных положениях всех последовательностей (положение аминокислот от N-конца большей части подтипов: Цис 4, Гли 6, Тре 18, Вал 26, Цис 42, Цис 55, Гли 63, Про 65, Цис 67, Глу 81). Для расчета дендрограммы использовали различия последовательности аминокислот в процентах всех попарных сравнений для построенных последовательностей, начинающихся с N-терминального Асп или соответствующей аминокислоты. Таким образом, места расположения каждого разветвления в дендрограмме показывают, что основное различие последовательности для всех последовательностей связано через эту точку. Для анализа использовали последовательности: 1 — A/NWS/33 (H1N1); 2 — A/PR/8/34 (H1N1); 3 — A/BH/35 (H1N1); 4 — A/Bel/42 (H1N1); 5 — A/Loyang/4/51 (H1N1); 6 — A/СССР/90/77 (H1N1); 7 — A/Fort Warren/1/50 (H1N1); 8 — A/утка/Alberta/35/76 (H1N1); 9 — A/свинья/Wisconsin/15/30 (H1N1); 10 — A/New Jersey/11/76 (H1N1); 11 — A/R1/57 (H2N2); 12 — A/Tokyo/3/67 (H2N2); 13 — A/Berkeley/68 (H2N2); 14 — A/Netherlands/68 (H2N2); 15 — A/утка/GDR/72 (H2N9); 16 — A/утка/New York/6750/78 (H2N2); 17 — A/утка/Ontario/77 (H2N1); 18 — A/утка/Alberta/77/77 (H2N3); 19 — A/шилохвост/Alberta/293/77 (H2N9); 20 — A/буревестник/Australia/75 (H5N3); 21 — A/буревестник/Australia/72 (H6N5); 22 — A/утка/Alberta/1298/79 (H6N5); 23 — A/утка/Alberta/1297/79 (H6N9); 24 — A/крачка/Australia/75 (H11N9); 25 — A/утка/Украина/1/60 (H1N9); 26 — A/утка/England/56 (H11N6); 27 — A/утка/New York/12/78 (H11N6); 28 — A/утка/Memphis/576/76 (H11N9; 29 — A/чайка/Mass/26/80 (H13N6); 30 — A/чайка/Md/704/77 (H13N6); 31 — A/индюк/Ontrio/3118/68 (H8N4); 32 — A/утка/Alberta/827/78 (H8N4); 33 — A/утка/Alberta/283/77 (H8N4); 34 — A/индюк/Wisconsin/1/66 (H9N2); 35 — A/утка/Alberta/60/76 (H12N5); 36 — A/индюк/Oregon/71 (H7N3); 37 — A/лошадь/Prague/1/56 (H7N7); 38 — A/утка/Manitoba/53 (H10N7); 39 — A/куропатка/Italy/1117/65 (H10N8); 40 — A/утка/Alberta/28/76 (H4N6); 41 — A/утка черная/Australia/702/78 (H3N8); 42 — A/Memphis/1/71 (H3N2); 43 — A/утка/Украина/1/63 (H3N8).

При сравнении изолятов 1934 и 1977 гг. были обнаружены 13 замен оснований в последовательности 220 оснований генов M и 22 замены в первых 230 основаниях генов NS. Однако бо́льшая часть этих перестановок не приводила к изменениям в последовательности аминокислот. Таким образом, хотя эти гены и высококонсервативны, в них также может быть отмечен генетический дрейф [47]. Не было обнаружено существенно значимой гомологии последовательности оснований между 8-ми сегментами РНК вирусов гриппа типов А и В [4].

Подробное изучение родства в последовательности для генов НА 43 штаммов вируса гриппа 13 известных подтипов было независимо проведено разными группами авторов [3, 53, 128]. Для этого определяли последовательности 300 нуклеотидов на 3′-конце 4-го сегмента РНК, кодирующего НА. На рис. 18 представлена дендрограмма, построенная по методу расчета «различий» в выведенных последовательностях аминокислот. При определении полной последовательности генов НА1 и НА2 было показано, что они высокородственны [55]. Однако различий для разных подтипов оказывается больше, чем для генов в пределах одного подтипа. Некоторые аминокислоты, в особенности остатки цистеина, полностью сохраняются у НА различных подтипов, что указывает на происхождение этих генов от одного прародителя [3].

Подобное исследование было осуществлено с геном NA [13]. Авторы сравнивали последовательности 200 3′-терминальных нуклеотидов 6 генов N1 и 5 генов N2 вируса гриппа типа А. В пределах подтипов замены оснований составили 10%, а между подтипами только 100 и 200 нуклеотидов были идентичны. Только на N-конце обнаруживали высококонсервативный участок из 11—12 аминокислот. В некоторых подтипах N1 выявляли блокирующие делеции из 33—48 нуклеотидов. Это коррелировало с различиями в подвижности 6-х сегментов РНК различных подтипов при ПААГЭ [14].

Преимущество дидеокси-метода в данном случае — в возможности легкого сравнения генов многих штаммов. Недостатком метода является то, что анализу подвергается только 20% каждого гена. Экстраполяция же полученных результатов ко всей молекуле может быть неправильной для генов, в которых чередуются высококонсервативные и вариабельные области. Это относится в особенности к генам, в которых наблюдаются блокирующие делеции [14].

3. Секвенирование полных сегментов РНК

Наиболее точная информация о генетическом родстве генов различных вирусов гриппа может быть получена при сравнении полных последовательностей оснований сегментов аллельной РНК. Однако определение полных последовательностей различных молекул РНК остается и в настоящее время сложной и трудоемкой процедурой.

Традиционные методы получения полных последовательностей РНК заключаются в следующем. Цельная вРНК или отдельные сегменты вРНК полиаденилируют на их 3′-концах и обратно транскрибируют с использованием олиго(dT) праймера. Далее полные копии во всю длину двухцепочечных ДНК (днДНК) очищают ПААГЭ. Молекулы днДНК обрабатывают нуклеазой S1 и вшивают (после определенных модификаций на их концах) в соответствующую плазмиду. После трансформации E. coli отбирают клоны с плазмидами, содержащими вставки из полных по длине ДНК, и вируспецифическую ДНК вируса гриппа отделяют рестрикционными ферментами. Далее по методу A. Maxam и W. Gilbert [77] определяют последовательность каждого рестрикционного фрагмента. Эта стандартная методика широко использовалась для секвенирования генов вируса гриппа [36, 82, 95]. Далее она была модифицирована за счет введения специфического додекамера — праймера, комплементарного 3′-концу сегментов РНК [7, 55], и за счет использования второго синтетического праймера, комплементарного 3′-концу первой нити кДНК для синтеза второй нити ДНК [7, 137]. Секвенирование генов вируса гриппа может быть осуществлено при сочетании последней методики со следующим «ударным» подходом: днДНК сегментов РНК вируса гриппа расщепляют рестрикционными ферментами и полученные фрагменты пришивают к репликативной форме (RF) ДНК бактериофага M13 mp2. Одноцепочечную матричную ДНК получают из рекомбинантных фагов и секвенируют с использованием дидеоксиметода с праймером, укрепляющим сайт включения [134]. Используя эти методики, можно определить последовательность многих сегментов РНК различных штаммов вируса гриппа (см. главу 2).

а) Ген гемагглютинина

Первая полная последовательность сегмента РНК вируса гриппа была получена из гена НА вируса чумы птиц (A/FPV/Rostock/34 [95]). Позднее были определены последовательности нескольких генов НА четырех различных подтипов [18, 43, 82, 120, 123]. Последовательности можно прямо сравнивать, выстраивая в ряд сохраненные цистеиновый, триптофановый и пролиновый остатки полученных белков. В этом случае можно разделить делеции и/или вставки.

Выведенные последовательности аминокислот различных молекул НА имели гидрофобные сигнальные пептиды длиной в 15—18 аминокислот, которые значительно варьируют у разных подтипов вирусов. Даже в пределах подтипов вариация в этом участке исключительно велика. Кроме того, существует два других участка гидрофобных аминокислот в НА: первый расположен на аминоконце субъединицы НА2 и высококонсервативен для первых 14 аминокислот; другой, менее консервативный у разных подтипов, расположен близко к карбоксильному концу субъединицы НА2.

Хотя цистеиновые остатки высококонсервативны в генах НА

всех подтипов, места расположения карбогидратных боковых цепей варьируют у различных штаммов. Что касается замены аминокислот в общем, то в генах НА имеются области, которые высококонсервативны у разных подтипов. Вариации в пределах субъединицы НА1 выше, чем для субъединицы НА2. Некоторые подтипы более близки, чем другие. Например, гены НА подтипов Н1 и Н2 сохраняют выведенные аминокислоты и нуклеотиды соответственно на 67% и 65%, в то время как НА подтипов Н1 и Н3— только на 42% и 50%. Но Н3 более тесно связан с НА Н7 (49% и 50%) по сравнению с НА Н1 (42% и 50%) [43, 55]. Эти результаты совпадают с данными дендрограммы на рис. 18. Однако ясно, что различия в пределах одного и того же подтипа будут меньше, чем для разных подтипов. Таким образом, может быть определено четкое различие между генетическим (и антигенным) шифтом и дрейфом [43].

При сравнении последовательности генов НА одного и того же подтипа вклады оснований, приводящие к заменам аминокислот, накапливаются в соответствии с хронологическим порядком выделения штаммов. Когда сайты замены локализованы в пределах трехмерной структуры молекулы НА [132, 133], они концентрируются в четырех различных областях. Эти сайты, вероятно, представляют собой биологически родственные антигенные участки молекул НА на поверхности вириона [18, 19, 20, 37, 120, 123, 129, 132]. В условиях селективного иммунопресса системы хозяина могут быть отобраны мутанты, которые имели изменения в антигенных сайтах поверхностных гликопротеидов, что в свою очередь приводит к изменениям иммунологических свойств вируса (антигенный дрейф).

При использовании других методов было показано, что шифт в 1957 г. от подтипа H1N1 к подтипу H2N2 сопровождался заменой в новом подтипе четырех сегментов РНК, которые были получены из циркулирующих в это время в человеческой популяции вирусов. Что касается подтипа H3N2, то в нем был заменен только ген НА, а другие 7 сегментов РНК были заимствованы из подтипа H2N2 [84, 114, 115]. Далее возникал вопрос: откуда появились новые сегменты РНК? В последнем случае на основе серологических данных [70] и тестов гибридизации [114, 115] было высказано предположение, что ген НА вируса гриппа утки (А/утка/Украина/63, H3N8) может быть ближайшим прародителем нового штамма H3N2 вируса гриппа человека. При сравнении гена НА штамма Aichi вируса гриппа 1968 г. и гена НА штамма A/Victoria/3/75 с геном НА вируса гриппа А/утка/Украина/63 была подтверждена тесная взаимосвязь. Изолят вируса гриппа утки был более тесно связан со штаммом Aichi, чем штамм Aichi со штаммом Victoria, который был получен из последнего в результате дрейфа. На основе аккумуляции безмолвных изменений основаны в этих генах был постулирован общий прародитель НА. Было высказано предположение, что такой вирус-прародитель циркулировал около 1950 г. в резервуаре животных [37].

б) Ген нейраминидазы

Для NA — второго поверхностного гликопротеида вируса гриппа — были изучены только три полные последовательности [39, 54, 76]. РНК NA штамма A/PR/8/34 (H1N1) и A/WSN/34 (H1N1) вирусов кодируют полипептиды из 453 и 454 аминокислот соответственно. РНК штамма A/Udorn/72 определяет синтез полипептида из 469 аминокислот. 65 изменений оснований и 32 изменения аминокислот были обнаружены в генах NA штаммов PR8 и WSN. Кроме того, имеется участок из 6 аминокислот, начинающийся с 58-го положения от N-конца, который полностью различается для этих двух штаммов. Другое важное отличие состоит в том, что штамм WSN содержит только три потенциальных сайта гликозилирования по сравнению с 5 кодируемыми в гене NA штамма PR8. Пока еще неизвестно, какое из этих отличий в молекулах NA ответственно за различия в нейровирулентности и круге хозяев. Штамм PR8 и прародитель (WS) штамма WSN были выделены в 1934 и 1933 гг. соответственно. К сожалению, эти штаммы настолько многократно пассировались в различных лабораториях и в разных условиях, что многие из наблюдаемых изменений могли произойти и в лабораторных условиях. Поэтому истинное родство этих двух генов NA могло быть значительно выше. При сравнении с 1-ми сегментами РНК этих штаммов видно, что число замен аминокислот в генах NA существенно выше. Это, возможно, отражает высокую способность функции NA к переживанию мутации.

Наличие незначительной гомологии последовательности генов NA подтипов N1 и N2 подтверждается данными гибридизации [111]. Однако участки гомологии определялись в том случае, если цистеиновые остатки выведенных белков NA штаммов PR8 и Udorn были выстроены в ряд. На N-конце находится сохраненная последовательность из 12 аминокислот, за которой располагается 79 аминокислот без какой-либо гомологии, включая делецию из 15 аминокислот. Относительно короткие участки гомологии разбросаны по остальной части молекулы. На отрезке от 7-го до 34-го положения аминокислот находится гидрофобный участок, которым молекула NA, вероятно, включается в двойной липидный слой вирусной оболочки (см. также [15]). Низкий уровень гомологии между генами N1 и N2 в сравнении с высокой гомологией между несколькими соответствующими генами штаммов H1N1 и H2N2 (см. ниже) позволяет предположить, что антигенный шифт 1957 г., вероятно, явился результатом пересортировки между штаммами вируса гриппа животных и человека. Это подтверждает полученные ранее результаты применения тестов гибридизации [114, 115].

в) Три гена белка P

В настоящее время известны полные последовательности сегментов 1, 2 и 3 РНК, кодирующих три белка P вируса PR8, однако существенной гомологии этих последовательностей не обнаружено [38, 136]. Последовательность 3-го сегмента РНК других штаммов

еще не была определена. Известна полная последовательность 1-го сегмента РНК другого штамма вируса гриппа типа А человека (A/WSN/33/H1N1) [60]. Штаммы PR8 и WSN принадлежат к одному подтипу и были изолированы приблизительно в одно и то же время, поэтому они могли быть близкородственны. Оба кодируют полипептиды РВ2 длиной в 759 аминокислот. Имеется несколько донорских и акцепторных сайтов сплайсирования в этих последовательностях. Поэтому неизвестно в настоящее время, кодируются ли добавочные меньшие мРНК 1-м сегментом РНК. Согласно установленной последовательности аминокислот, белок РВ2, кодируемый 1-м сегментом РНК, представляет собой основной белок. В последовательностях двух штаммов были обнаружены 22 изменения аминокислот. Как обсуждалось выше, эти различия могут быть частично обусловлены разными условиями пассирования этих двух штаммов.

Была определена и проанализирована последовательность 2-х сегментов РНК штаммов A/PR8/34 (H1N1) и A/NT/60/68 (H3N2). Обе РНК кодируют белки РВ1. Штамм A/NT/60/68 [12] был выделен через 34 года после штамма PR8 и, таким образом, следовало ожидать значительных различий в последовательностях двух РНК этих штаммов. Среди многих безмолвных мутаций только 21 замена аминокислот была распределена по всей длине молекулы, кодирующей полипептид из 757 аминокислот. На участке от 583 до 669 остатков нуклеотидов располагается 15 основных аминокислот. Хотя в этом участке сосредоточены три замены аминокислот, изменений в общем заряде молекулы нет.

г) Ген нуклеопротеида

Известны последовательности двух генов нуклеопротеидов (NP), принадлежащих штаммам двух различных подтипов (A/PR/8/34/H1N1 и A/NT/60/68/H3N2). Последовательность 5-го сегмента гена NP штамма A/PR/8/34 была определена независимо двумя группами авторов [122, 135]. Несовпадение между двумя предложенными авторами структурами может быть вследствие того, что L. van Rompuy и соавт. [122] пропустили маленький фрагмент Hinf1 при секвенировании. В дальнейшем эта ошибка была им же исправлена. Для сравнения будут использованы результаты G. Winter и S. Fields [135]. Число нуклеотидов (1565) и выведенных аминокислот (498) генов NP двух подтипов то же самое. Белки были высокоосно́вны, что и ожидалось для белка, который связан с нуклеиновыми кислотами. Несмотря на то что два вируса были выделены независимо друг от друга 34 года назад, в гене NP произошло только 29 замен аминокислот. Это свидетельствует о том, что этот ген был перенесен во время двух антигенных шифтов [58, 135].

д) Ген мембранного белка

Определены последовательности генов мембранного (М) белка двух штаммов вируса гриппа типа А человека (PR8, H1N1 и A/Udorn/72, H3N2) и одного штамма вируса гриппа ти-

па А птиц (A/FPV/Rostock/34/H7N1) [5, 66, 79, 134]. В кРНК всех трех штаммов имеются две открытые рамки считывания, которые приводят при правильном их транслировании во всех трех случаях к двум белкам из 252 (м.м. 27 000) и 96 (м.м. 11 000) аминокислот соответственно. Из инфицированных клеток были выделены соответствующие полипептиды: мембранный белок (М1) и другой неструктурный белок (М2), функция которого еще неизвестна [65]. Структура гена М детально обсуждается в главе, написанной R. A. Lamb.

Безмолвные мутации, которые не приводят к изменениям в аминокислотах, разбросаны по всей длине 7-го сегмента РНК, за исключением участка перекрывания рамок считывания (68 нуклеотидов), что указывает на отсутствие горячих точек мутации. Последовательность гена белка М высококонсервативна по сравнению с последовательностью других сегментов РНК, в особенности с генами, которые кодируют поверхностные гликопротеиды. Сравнивая гены М штаммов PR8 (H1N1) и штамма Udorn (H3N2), обнаружили, что только 7 аминокислот из 252 заменены в белке М1. Что касается белков М2, то были замещены только 11 аминокислот из 96. Это свидетельствует о том, что белки М2 менее консервативны, чем белки М1. При сравнении с геном белка М штамма FPV установлено, что ген белка М штамма PR8 более тесно связан с геном белка М штамма FPV, чем с геном белка М штамма Udorn.

В последовательности гена белка М имеется несколько участков из 10 или более незаряженных остатков, в особенности на участке от 115 до 151 остатка, где имеются только две заряженные аминокислоты, но 16 гидрофобных аминокислот. Можно сконструировать трехмерную структуру белка М с высокогидрофобной областью, которая может быть погружена в липидную мембрану, и более гидрофильной областью, взаимодействующей, вероятно, с NP. В пределах этих областей не было обнаружено каких-либо существенных замен аминокислот.

Однако следует обратить особое внимание на одно наблюдение: последовательность гена белка М штамма PR8 была определена двумя различными группами авторов [5, 134]. При этом было обнаружено шесть различий в нуклеотидах в этих последовательностях, одно из которых приводило к замене аминокислоты. Эти изменения могут либо представлять изменения в вирусном геноме при пассировании вируса в различных лабораториях, проводимом после первого выделения вируса в 1934 г., либо иметь место вследствие ошибок при секвенировании.

Недавно была определена последовательность 7-го сегмента вируса гриппа типа В (штамм B/Lee/40) [22], в которой также обнаружили две открытые рамки считывания. Одна может кодировать белок (М1) из 248 аминокислот, другая — полипептид из 195 аминокислот в +2 рамке считывания.

При сравнении белков М1 штаммов B/Lee и A/Udorn/72 были выявлены гомологичные последовательности оснований. 63 из

248 аминокислот были сохранены, включая и внутренние гидрофобные области с тремя цистеиновыми остатками в соответствующих положениях. Этот факт подтверждает данные сравнительной гибридизации генов М вируса гриппа типа А (штамм FPV) птиц и другого вируса гриппа типа В, хотя в некоторой степени эти данные оказались выше ожидаемых [113]. Не было выявлено какой-либо значительной гомологии аминокислот в выведенных последовательностях аминокислот белков М2 штаммов B/Lee и A/Udorn.

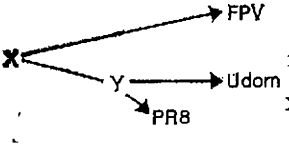
е) Ген неструктурного белка

Полная последовательность нуклеотидов 8-го сегмента РНК (ген NS) была определена для четырех различных подтипов вируса гриппа типа А [7, 66, 96, 137, 138] и для одного вируса гриппа типа В [21]. У трех подтипов вируса гриппа типа А гены NS полностью сохранены, что соответствует результатам гибридизации [110, 111], а ген NS штамма А/утка/Alberta/60/76 (H12N5) существенно отличается, что совпадает с результатами прямой РНК-РНК-гибридизации.

На всех 8-сегментах вРНК, включая и сегменты РНК вируса гриппа типа В, синтезируются две различные по типу мРНК: одна нормальной длины со «стоп»-кодоном на сайте, транслирующем около 80% мРНК, ведущая к белку NS1; другая получена сплайсированием, продолжается в +1 рамке считывания и приводит к белку NS2. Структура гена NS обсуждалась детально в главе 2.

Безмолвные мутации разбросаны по всей длине молекул РНК, а ее горячие точки для замен аминокислот в штаммах вируса гриппа отсутствуют даже на перекрывающихся рамках считывания.

При сравнении белков NS1 штаммов PR8, A/FPV/Rostock/34 и A/Udorn/72 [137, 138] были обнаружены 24 замены аминокислот для штамма FPV по сравнению со штаммом PR8. В 16 из этих положений аминокислоты в белках NS1 штаммов PR8 и Udorn были идентичными. С другой стороны, при сравнении белков NS1 штаммов PR8 и Udorn было обнаружено 26 замен аминокислот и в 18 из этих положений аминокислоты в белках NS1 штаммов PR8 и FPV были также идентичны. В других 8 положениях имели место замены между штаммами PR8 и Udorn, в то время как аминокислоты в соответствующих положениях в белке NS1 штамма Udorn были идентичны аминокислотам штамма FPV. С другой стороны, при сравнении белков NS1 штаммов FPV и Udorn обнаружено 36 замен аминокислот. Эти наблюдения, возможно, указывают на то, что: 1) в белках NS1 имеет место явление типа генетического дрейфа, подобное тому, которое имеется в белках HA и NA; 2) белки NS1 штаммов PR8 и FPV могут иметь общего прародителя, в то время как белок NS1 штамма Udorn может быть продуктом дрейфа (близкого прародителя) гена PR8 (рис. 19) — гипотеза, которая согласуется с результатами частичного секвенирования R. Hall и G. Air [47]. Подобная, но менее убедительная связь обнаружена для белков NS2.



19. Схема эволюционного дерева с использованием изменений аминокислот в белках NS1 штаммов A/FPV/Rostock/34, A/PR/8/34 и A/Udorn/72 вируса гриппа.
X — рассматривается как общий прародитель FPV и Y; Y — прародитель штаммов PR8 и Udorn.

Сегмент 8 РНК штамма PR8 был секвенирован в двух различных лабораториях [7, 137, 138]. В выведенной последовательности белка NS1 выявляется разница в одной аминокислоте и в белке NS2 — разница в двух аминокислотах, возможно, вследствие разной истории пассирования вируса в двух лабораториях.

Сравнение последовательностей нуклеотидов и выведенных последовательностей аминокислот генов NS штаммов PR8 (H1N1) и A/утка/Alberta/60/76 (H12N5) показало существенную дивергенцию последовательности [8]. Общее различие в последовательности нуклеотидов составило 27,3%; для генов NS1 других трех штаммов вируса гриппа типа А эти различия составили только 8—11%. Полипептиды NS1 штаммов PR8 и A/утка/Alberta/60/76 были сохранены в меньшей степени (33% различий) по сравнению с полипептидами NS2 тех же штаммов (18,2% различий). Такой высокий уровень вариации в белках NS1 наблюдали по всей длине молекулы, включая и участок перекрывания двух рамок считывания.

Точное сравнение последовательностей нуклеотидов или аминокислот вирусов гриппа типов А и В для белков NS1 и NS2 осложняется разными размерами генов. Однако в первом приближении здесь лишь незначительная или полностью отсутствующая гомология последовательности [21].

III. Генетическое родство вирусных белков

А. Различия в скоростях миграции вирусных белков при ПААГЭ

При анализе белков различных штаммов вируса гриппа методом ПААГЭ обнаруживаются заметные различия в скоростях миграции соответствующих белков. Эти вариации происходят вследствие различий в молекулярной массе, заряде или (для гликопротеидов) числе и типе олигосахаридных боковых цепей. Выявленные различия в скоростях миграции соответствующих белков позволяют установить происхождение белков в рекомбинантных вирусах. Эта информация в сочетании с анализом РНК рекомбинантов была использована для построения генетической карты вирусов гриппа (для обзора см. [89]). Подробный анализ результатов сравнения различных белков подтипов вируса гриппа типа А птиц был опубликован F. Bosch и соавт. [16].

Сравнительное изучение белков различных вирусов гриппа типов А и В был проведен J. Oxford и соавт. [88], а также A. Hugentobler и соавт. [59]. Из общего числа 17 изолятов подтипа H1N1

1934—1953 гг. для 16 были получены различные электрофореграммы для белка NP при ПААГЭ. Семь изолятов имели различия в скоростях миграции белка NS1 и НА. Подобные вариации наблюдали при сравнении штаммов H3N2 1968—1979 гг. выделения. Штаммы H1N1, выделенные в короткие периоды (зима 1977/78 или 1978/79 гг.), давали меньшую вариацию. Однако различия обнаруживали даже среди изолятов, полученных при выделении у больных во время одной вспышки в школе или в городе [88]. Различия в белке наблюдали также у 38 вирусов гриппа типа В, выделенных во время эпидемии 1978—1980 гг. [59].

Поскольку эти изоляты не были позднее охарактеризованы методом фингерпринта или секвенированием, нельзя провести их четкое генетическое сравнение. Вероятно, обнаруженные различия в скоростях миграции происходят в каждом случае вследствие нескольких точечных мутаций.

Б. Триптическое пептидное картирование

Трипсин расщепляет белок после аргинина и лизина, что приводит к образованию смеси пептидов, заканчивающихся этими аминокислотами. Пептиды могут быть разделены одномерно при ПААГЭ и двухмерно хроматографией. Используя этот метод W. Laver в 1964 г. провел сравнение двух штаммов (BEL и MEL) подтипа H1 [67]. Автором было установлено, что НА показывают бóльшие различия, чем NP. В другом эксперименте НА штаммов вируса гриппа человека, выделенные непосредственно перед появлением штамма Hong Kong в 1968 г., сравнивали с НА штаммов, выделенных после 1968 г. Пептидные карты НА ранних изолятов были подобны так же, как и последних штаммов, однако некоторые общие черты обнаруживали для пептидных карт НА раннего и позднего штаммов. Это наблюдение было подтверждением того, что вирус Hong Kong был образован в результате пересортировки [69]. НА (в особенности субъединицы НА2) штаммов утка/Украина, Equine 2 и Hong Kong показали высокий уровень подобия в своих пептидных картах, что указывает на наличие общего прародителя генов НА этих штаммов [70] (см. также выше).

При выращивании двух штаммов H1 (свиньи и BEL) в присутствии антител низкой авидности были выделены антигенные мутанты. Пептидные карты таких мутантов показали различия в положении по крайней мере одного полипептида в сравнении со штаммом дикого типа [68]. При освоении метода моноклональных антител были отобраны антигенные варианты из штаммов PR8 (H1N1) и A/Mem/1/71 (H3N2). Эти варианты должны были иметь только одно или несколько изменений аминокислот. Специфические замены аминокислот наблюдали в субъединицах НА1 у 10 изолятов и не обнаруживали подобных изменений в субъединицах НА2. Четыре независимых варианта, отобранных с тем же моноклональным антителом, имели ту же замену аминокислоты (аспарагин на лизин) [71]. Восемь из 10 вариантов штамма PR8 имели одно изменение пептида. В этих проанализированных слу-

чаях серин в НА штамма дикого типа был заменен на лейцин [72]. Однако следует помнить, что в этой ранней работе анализировали только $^1/_3$ пептидов — тех, которые могли быть солюбилизированы. Позднее, когда была определена полная последовательность НА штамма Н3, места локализации изменений последовательности НА штамма Н3 могли быть точно определены. У 10 вариантов штамма H3N2, отобранного с использованием моноклональных антител, остатки пролина в 143-м положении в НА1 заменены на серин, треонин, лейцин или гистидин соответственно. В других вариантах аспарагин в 133-м положении заменен на лизин, глицин в 144-м положении — на аспарагиновую кислоту или серин в 145-м положении — на лизин [75]. Остатки в 142—146-м положениях также изменены в полевых штаммах вируса гриппа подтипа H3N2, выделенных между 1968 и 1977 г. Однако были обнаружены и другие замены [73, 74]. Эти данные предполагают, что один из важных антигенных сайтов молекулы НА расположен в 142—146-м положениях. Однако нельзя исключать, что замены аминокислот в этих положениях могут изменить конфигурацию полипептида так, что могут стать доступными новые антигенные сайты, которые раньше были замаскированы. С другой стороны, было показано, что эти аминокислоты расположены в достаточно доступном положении [132, 133].

Метод пептидного картирования был также использован для сравнения белков NP и M у 16 штаммов вируса гриппа типа А человека и трех штаммов вируса гриппа типа А низших позвоночных. Применяя разделенные пептиды как таксономический критерий, все нуклеопротеиды можно сгруппировать в одну из двух основных моделей, хотя некоторое дополнительное различие пептидов существовало в каждой группе NP. Не было обнаружено корреляции между группами NP и подтипами НА. Эти данные можно интерпретировать в пользу того, что произошла пересортировка среди различных штаммов вируса гриппа [28].

Пять изолятов вируса гриппа типа В 1940, 197С, 1973, 1976 и 1977 гг. анализировали методом одномерного пептидного картирования после расщепления протеазой V8 Staphylococcus aureus. Образцы мембранных белков были идентичными, в то время как образец NP изолята вируса 1940 г. отличался от такового для последних штаммов. Наиболее варьируемым белком был НА, причем НА1 варьировал сильнее, чем НА2. В NA также при этом методе анализа были выявлены штаммоспецифические различия [85].

В. Прямое секвенирование

Прямое секвенирование аминокислот более утомительно и неэкономично по сравнению с определением последовательности РНК. Однако при незнании N-терминальной и С-терминальной последовательности белка всегда имеется неопределенность относительно того, действительно ли первый стартовый кодон мРНК используется для инициации синтеза этого белка или первый «стоп»-

кодон в открытой рамке считывания дает действительно сигнал к окончанию синтеза этого белка. Более того, определение последовательности аминокислот помогает идентифицировать любую посттрансляционную модификацию вирусных белков.

До настоящего времени только два гликопротеида — HA и NA — были изучены прямым секвенированием аминокислот. Для HA было обнаружено, что его синтез начинается с лидер-последовательности, поскольку первые 15—18 аминокислот, ожидаемые после первого стартового кодона мРНК, не присутствуют на N-конце HA1. Дальнейшие характеристики молекулы HA, обнаруженные методом прямого секвенирования, обсуждены выше [117].

Сайты расщепления HA трех различных подтипов (H1, H3 и H10) были изучены с использованием расщепления in vivo или расщепления трипсином или другими протезами. После обработки трипсином высокоочищенных вирусов в субъединицах HA1 отсутствует С-терминальный аргинин. Возможно, вирус, а не система хозяина, снабжает экзопептидазой карбоксипептидазы типа В, которая заканчивает это вырезание [41]. На сайте расщепления HA1/HA2 у HA вируса чумы птиц удалена промежуточная последовательность 6 аминокислот (пять основных) [42]. Это коррелировало с патогенными свойствами вируса и его способностью размножаться во многих различных типах клеток-хозяев [16].

Единственный белок вируса гриппа, практически полностью проанализированный прямым аминокислотным секвенированием, — HA штамма A/Memphis/102/72 (H3N2) [30, 31, 32, 33, 34, 35, 124, 125]. На сайте расщепления между карбоксильным концом HA1 и аминоконцом HA2 аргининовый остаток отделяется при расщеплении in vivo. Частичное секвенирование HA других штаммов вируса гриппа было проведено соответствующими методами [23, 41, 42, 73, 74, 78, 117, 126, 127, 119]. Сравнение установленных последовательностей аминокислот на N-конце HA1 и HA2 штамма Hong Kong (H3N2) и штамма утка/Украина (H3N2) показало их близкую связь [126], что соответствовало данным гибридизации [114, 115] и секвенирования их РНК [37].

Эксперименты по частичному секвенированию аминокислот четырех подтипов показали, что в протеине отсутствует сигнальный пептид, и что он погружен в вирусную мембрану гидрофобной областью на N-конце. N-конец NA не модифицирован в результате ее синтеза [15]. В этом плане NA отличается от других белков вирусного шипа, таких, как HA (см. выше) или белок G VSV [100].

IV. Заключение

Поскольку вирусы гриппа имеют сегментированный геном, каждый сегмент РНК может функционировать независимо, что и было показано последовательной химической инактивацией [107]. Поэтому новые штаммы вируса гриппа могут создаваться в результате

пересортировки либо в естественных условиях, либо в клеточной культуре. Это означает, что при генетическом сравнении двух различных вирусов гриппа некоторые сегменты РНК (или белки соответственно) могут быть (за исключением новых мутаций) идентичными, в то время как в остальных обнаружена относительно низкая гомология. Именно это и было установлено. Пересортировка, особенно для генов, кодирующих поверхностные гликопротеиды НА и NA, является механизмом создания новых пандемических штаммов (антигенный шифт).

Сегменты РНК, кодирующие внутренние белки (P, NP, M), относительно хорошо сохраняются, в то время как сегменты РНК, кодирующие гликопротеиды (HA, NA), проявляют высокую вариабельность. Некоторые из варьирующих областей генов НА могут коррелировать с антигенными сайтами продуктов гена. Скорость мутации одинакова для различных сегментов РНК и даже в пределах сегментов, что определялось распределением безмолвных мутаций вдоль молекул РНК. Поэтому увеличение числа замен аминокислот, образующих вариабельные участки, может происходить вследствие мутации и селекции иммунной системы хозяина. Это, однако, означает, что данные вариабельные области не так важны для функционирования продуктов гена, т. е. сайта прикрепления клетки или энзиматической активности соответственно.

Другой тип вариации обнаружен у генов, кодирующих гликопротеиды. В то время как другие белки имеют практически идентичные молекулярные массы, при сравнении различных подтипов гликопротеиды их могут варьировать по размеру. Растянутые делеции и/или включения были выявлены особенно для NA.

Тринадцать различных подтипов НА и 9 подтипов NA вирусов гриппа типа А могут быть различены. В пределах каждого подтипа имеет место определенная вариация, однако она не превосходит вариации между различными подтипами, хотя одни подтипы более тесно связаны друг с другом, чем другие [129] (см. рис. 18). Сравнение сохраненных участков НА и NA предполагает, что все различные подтипы происходят из общей молекулы прародителя. Пока не установлено, почему развивается только ограниченное число подтипов.

В терминах генетического родства неструктурных белков вирусы гриппа типа А могут быть разделены на две группы. Происхождение этих двух групп и их выделенное значение еще не объяснены. Генетический дрейф у этих генов также был обнаружен, однако принцип селекции, если она имеет место, еще неизвестен.

Список литературы

1. *Aaronson P., Young J., Palese P.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 237—246.
2. *Air G.* — Virology, 1979, v. 97, p. 468—472.
3. *Air G.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 7639—7643.

4. *Air G., Hackett J.* — Virology, 1980, v. 103, p. 291—298.
5. *Allen H., McCauley J., Waterfield M., Gething M.-J.* — Virology, 1980, v. 107, p. 543—551.
6. *Almond J., Barry R.* — Virology, 1979, v. 92, p. 407—415.
7. *Baez M., Taussig R., Zazra J. et al.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 5845—5858.
8. *Baez M., Zazra J., Elliott R. et al.* — Virology, 1981, v. 113, p. 397—402.
9. *Bean W., Sriram G., Webster R.* — Analyt. Biochem., 1980, v. 102, p. 228—232.
10. *Bean W., Cox N., Kendal A.* — Nature, 1980, v. 284, p. 638—640.
11. *Bean W., Hinshaw V., Webster R.* — In: The Replication of Negative Strand Viruses. N. Y.—Amsterdam—Oxford: Elsevier/North-Holland, 1981, p. 363—367.
12. *Bishop D., Huddleston J., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 1335—1343.
13. *Blok J., Air G.* — Virology, 1980, v. 107, p. 50—60.
14. *Blok J., Air G.* — Virology, 1982, v. 118, p. 229—234.
15. *Blok J., Air G., Laver W. et al.*—Virology, 1982, v. 119, p. 109—121.
16. *Bosch F., Orlich M., Klenk H.-D., Rott R.* — Virology, 1979, v. 95, p. 197—207.
17. *Bosch F., von Hoyningen-Huene V., Scholtissek C., Rott R.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 61, p. 101—104.
18. *Both G., Sleigh M.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 2561—2575.
19. *Both G., Sleigh M.* — J. Virol., 1981, v. 39, p. 663—672.
20. *Both G., Sleigh M., Bender V., Moss B.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus. N. Y. — Amsterdam—Oxford: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 81—89.
21. *Briedis D., Lamb R.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 186—193.
22. *Briedis D., Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1982, v. 116, p. 581—588.
23. *Bucher D., Li S., Kehoe J., Kilbourne E.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 78, p. 238—242.
24. *Desselberger U., Palese P.* — Virology, 1978, v. 88, p. 394—399.
25. *Desselberger U., Nakajima K., Alfino P. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 3341—3345.
26. *Desselberger U., Racaniello V., Zazra J., Palese P.* — Gene, 1980, v. 8, p. 315—328.
27. *De Wachter R., Fiers W.* — Analyt. Biochem., 1972, v. 49, p. 184—197.
28. *Dimmock N., Carver A., Webster R.* — Virology, 1980, v. 103, p. 350—356.
29. *Donis-Keller H., Maxam A., Gilbert W.* — Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, p. 2527—2538.
30. *Dopheide T., Ward C.* — In: Topics in Infectious Diseases. Vol. 3. Wien — N. Y.: Springer, 1978, p. 193—201.
31. *Dopheide T., Ward C.* — Eur. J. Biochem., 1978, v. 85, p. 393—398.
32. *Dopheide T., Ward C.* — Virology, 1979, v. 92, p. 230—235.
33. *Dopheide T., Ward C.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus. N. Y. — Amsterdam—Oxford: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 21—26.
34. *Dopheide T., Ward C.* — J. Gen. Virol., 1980, v. 50, p. 329—335.
35. *Dopheide T., Ward C.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 52, p. 362—370.
36. *Emtage J., Catlin G., Carey N.*—Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 1221—1239.
37. *Fang R., Min Jou W., Huylebroeck D. et al.* — Cell, 1981, v. 25, p. 315—323.
38. *Fields S., Winter G.* — Cell, 1982, v. 28, p. 303—313.
39. *Fields S., Winter G., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 290, p. 213—217.
40. *Frisby D.* — Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, p. 2975—2996.
41. *Garten W., Bosch F., Linder D. et al.* — Virology, 1981, v. 115, p. 361—374.
42. *Garten W., Linder D., Rott R., Klenk H.-D.* — Virology, 1982, v. 121, p. 186—190.

43. *Gething M.-J., Bye J., Skehel J., Waterfield M.* — Nature, 1980, v. 287, p. 301—306.
44. *Ghendon Y., Klimov A., Blagoveshenskaya O., Genkina D. (Гендон Ю., Климов А., Благовещенская О., Генкина Д.)* — J. Gen. Virol., 1979, v. 43, p. 183—191.
45. *Ghendon Y., Klimov A., Alexandrova G., Polezhaev F. (Гендон Ю., Климов А., Александрова Г., Полежаев Ф.)* — J. Gen. Virol., 1981, v. 53, p. 215—224.
46. *Ghendon Y., Klimov A., Gorodkova N., Döhner L. (Гендон Ю., Климов А., Городкова Н.)* — J. Gen. Virol., 1981, v. 56, p. 303—313.
47. *Hall R., Air G.* — J. Virol., 1981, v. 38, p. 1—7.
48. *Harms E., Rohde W., Bosch F., Scholtissek C.* — Virology, 1978, v. 86, p. 413—422.
49. *Hay A., Bellamy A., Abraham G. et al.* — Dev. Biol. Stand., 1979, v. 39, p. 15—24.
50. *Heller E., Scholtissek C.* — J. Gen. Virol., 1980, v. 49, p. 133—139.
51. *Hinshaw V., Bean W., Webster R., Easterday B.* — Virology, 1978, v. 84, p. 51—62.
52. *Hinshaw V., Bean W., Webster R., Sriram G.* — Virology, 1980, v. 102, p. 412—419.
53. *Hinshaw V., Air G., Gibbs A. et al.,* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 865—872.
54. *Hiti A., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 41, p. 730—734.
55. *Hiti A., Davis A., Nayak D.* — Virology, 1981, v. 111, p. 113—124.
56. *Horisberger M.* — Virology, 1980, v. 107, p. 302—305.
57. *Horisberger M.* — Virology. 1982, v. 120, p. 279—286.
58. *Huddlestone J., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 1029—1038.
59. *Hugentobler A., Schild G., Oxford J.* — Arch. Virol., 1981, v. 69, p. 197—207.
60. *Kaptein J., Noyak D.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 55—63.
61. *Klimov A., Ghendon Y. (Климов А., Гендон Ю.)* — Arch. Virol., 1981, v. 70, p. 225—232.
62. *Kozlov J., Gorbulev V., Kurmanova A. et al. (Козлов Ю., Горбулев В., Курманова А. и др.)* — J. Gen. Virol., 1981, v. 56, p. 437—440.
63. *Krug R.* — In: The Origin of Pandemic Influenza Viruses. N. Y. — Amsterdam — Oxford: Elsevier/North-Holland, 1983 (in press).
64. *Lamb R., Lai C.-J.* — Cell, 1980, v. 21, p. 475—485.
65. *Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1981, v. 112, p. 729—737.
66. *Lamb R., Lai C.-J.* — Virology, 1981, v. 112. p. 746—751.
67. *Laver W.* — J. Mol. Biol., 1964, v. 9, p. 109—124.
68. *Laver W., Webster R.* — Virology, 1968, v. 34, p. 193—202.
69. *Laver W., Webster R.* — Virology, 1972, v. 48, p. 445—455.
70. *Laver W., Webster R.* — Virology, 1973, v. 51, p. 383—391.
71. *Laver W., Air G., Webster R. et al.* — Virology, 1979, v. 98, p. 226—237.
72. *Laver W., Gerhard W., Webster R. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 1425—1429.
73. *Laver W., Air G., Dopheide T., Ward C.* — Nature, 1980, v. 283, p. 454—457.
74. *Laver W., Air G., Webster R. et al.* — Phil. Trans. R. Soc. (Lond.), 1980, v. B288, p. 313—326.
75. *Laver W., Air G., Webster R.* — J. Mol. Biol., 1981, v. 145, p. 339—361.
76. *Markoff L., Lai C.-J.* — Virology, 1982, v. 119, p. 288—297.
77. *Maxam A., Gilbert W.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 560—564.
78. *McCauley J., Skehel J., Waterfield M.* — In: Topics in Infectious Diseases. Vol. 3. Wien — New York: Springer, 1978, p. 181—192.
79. *McCauley J., Mahy B., Inglis S.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 58, p. 211—215.
80. *McGeoch D., Fellner P., Newton C.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 3045—3049.

81. *Meier-Ewert H., Petri T., Bishop D.* — Arch. Virol., 1981, v. 67, p. 141—147.
82. *Min Jou W., Verhoeyen M., Devos R. et al.* — Cell, 1980, v. 19, p. 683—696.
83. *Nakajima K., Desselberger U., Palese P.* — Nature, 1978, v. 274, p. 334—339.
84. *Nakajima K., Nakajima S., Sugiura A.* — Virology, 1982, v. 120, p. 504—509.
85. *Nakamura K., Kitame F., Homma M.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 56, p. 315—323.
86. *Nerome K., Ishida M., Kakayama M. et al.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 56, p. 441—445.
87. *Ortin J., Najera R., Lopez C. et al.* — Gene, 1980, v. 11, p. 319—331.
88. *Oxford J., Corcoran T., Schild G.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 56, p. 431—436.
89. *Palese P.* — Cell, 1977, v. 10, p. 1—10.
90. *Palese P., Schulman J.* — Proc. nat Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 2142—2146.
91. *Palese P., Ritchey M., Schulman J.* — Virology, 1977, v. 76, p. 114—121.
92. *Palese P., Ritchey M.* — Dev. Biol. Stand., 1977, v. 39, p. 411—415.
93. *Palese P., Racaniello V., Desselberger U. et al.* — Phil. Reans. R. Soc. (Lond.), 1980, v. B288, p. 299—305.
94. *Palese P., Elliott R., Baez M. et al.* — In: Genetic Variation among Influenza Viruses. N. Y. — London — Toronto — Sydney — San Francisco: Academic Press, 1981, v. XXI, p. 127—140.
95. *Porter A., Barber C., Carey N.* — Nature, 1979, v. 282, p. 471—477.
96. *Porter A., Smith J., Emtage J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 5074—5078.
97. *Ritchey M., Palese P., Schulman J.* — J. Virol., 1976, v. 20, p. 307—313.
98. *Robertson J.* — Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 3745—3757.
99. *Rohde W., Harms E., Scholtissek C.* — Virology, 1977, v. 79, p. 393—404.
100. *Rose J., Gallione C.* — J. Virol., 1981, v. 39, p. 519—528.
101. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5463—5467.
102. *Scholtissek C.* — Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 179, p. 389—397.
103. *Scholtissek C.* — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1978, v. 80, p. 139—169.
104. *Scholtissek C.* — Adv. Genetics, 1979, v. 20, p. 1—36.
105. *Scholtissek C.* — Virology, 1979, v. 93, p. 594—597.
106. *Scholtissek C.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus. N. Y.— Amsterdam — Oxford: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 191—199.
107. *Scholtissek C., Rott R.* — Virology, 1964, v. 22, p. 169—176.
108. *Scholtissek C., Rott R.* — Virology, 1969, v. 39, p. 400—407.
109. *Scholtissek C., Rott R.* — Virology, 1970, v. 40, p. 989—996.
110. *Scholtissek C., von Hoyningen-Huene V.* — Virology, 1980, v. 102, p. 13—20.
111. *Scholtissek C., Harms E., Rohde W. et al.* — Virology, 1976, v. 74, p. 332—344.
112. *Scholtissek C., Rohde W., Harms E., Rott R.* — Virology, 1977, v. 79, p. 330—336.
113. *Scholtissek C., Rohde W., Harms E.* — J. Gen. Virol., 1977, v. 37, p. 243—247.
114. *Scholtissek C., Rohde W., von Hoyningen V., Rott R.* — Virology, 1978, v. 87, p. 13—20.
115. *Scholtissek C., von Hoyningen V., Rott R.* — Virology, 1978, v. 89, p. 613—617.
116. *Scholtissek C., Rott R., Lvov D., Myasnikova I.* — Arch. Virol., 1980, v. 65, p. 325—328.
117. *Skehel J., Waterfield M.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 93—97.
118. *Skehel J., Hay A.* — Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 1207—1219.

119. *Skehel J., Waterfield M., McCauley J. et al.* — Phil. Trans. R. Soc. (Lond.), 1980, v. B288, p. 335—339.
120. *Sleigh M., Both G., Underwood P., Bender V.* — J. Virol., 1981, v. 37, p. 845—853.
121. *Sriram G., Bean W., Hinshaw V., Webster R.* — Virology, 1980. v. 105, p. 592—599.
122. *Van Rompay L., Min Jou W., Huylebroeck D. et al.* — Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, p. 347—353. Ibid., 1982, v. 126, p. 645.
123. *Verhoeyen M., Fang R., Min Jou W. et al.* — Nature, 1980, v. 286, p. 771—776.
124. *Ward C., Dopheide T.* — Virology, 1979, v. 95, p. 107—118.
125. *Ward C., Dopheide T.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus. N. Y. — Amsterdam — Oxford: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 27—38.
126. *Ward C., Webster R., Inglis A., Dopheide T.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 53, p. 163—168.
127. *Waterfield M., Skehel J., Nakashima Y. et al.* — In: Topics in Infectious Diseases. Vol. 3. Wien — N. Y.: Springer, 1978, p. 167—179.
128. *Webster R., Hinshaw V., Bean W. et al.* — Virology, 1981, v. 113, p. 712—724.
129. *Webster R., Laver W., Air G., Schild G.* — Nature, 1982, v. 296, p. 115—131.
130. *WHO-Bulletin* (1979). — Bull. Wld Hlth Org., 1979, v. 57, p. 227—233.
131. *WHO-Bulletin* (1980). — Bull. Wld Hlth Org., 1980, v. 58, p. 585—591.
132. *Wiley D., Wilson I., Skehel J.* — Nature, 1981, v. 289, p. 373—378.
133. *Wilson I., Skehel J., Wiley D.* — Nature, 1981, v. 289, p. 366—373.
134. *Winter G., Fields S. et al.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 1965—1974.
135. *Winter G., Fields S.* — Virology, 1981, v. 114, p. 423—428.
136. *Winter G., Fields S.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 2135—2143.
137. *Winter G., Fields S., Gait M., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, p. 237—245.
138. *Winter G., Fields S., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 292, p. 72—75.
139. *Young J., Palese P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 6547—6551.
140. *Young J., Desselberger U., Palese P.* — Cell, 1979, v. 18, p. 73—83.

Антигенные вариации среди вирусов гриппа типа А

Р. Вебстер, В. Лейвер, Г. Эйр (R. Webster, W. Laver, G. Air)

I. Введение

Грипп представляет собой широко распространенное заболевание, которое периодически вызывает эпидемии среди людей, свиней, птиц и изредка среди других видов животных, например тюленей. Отличительной чертой вируса гриппа является его вариабельность, которая способна изменять его антигенную структуру столь значительно, что установившийся в ответ на инфекцию определенным штаммом специфический иммунитет может дать незначительную защиту или почти совсем ее не обеспечить по отношению к вирусам, которые появляются впоследствии. Антигенные вариации являются результатом молекулярных изменений в поверхностных белках вирусов гриппа, т. е. в гемагглютинине (HA) и нейраминидазе (NA), которые отражают изменения в нуклеотидных последовательностях соответствующих генов. Существует два типа изменений, которые происходят с HA и NA: они протекают по разным механизмам и известны в литературе как антигенный «дрейф» и антигенный «шифт». Антигенный дрейф происходит в пределах подтипа и заключает в себе серию минорных изменений на уровне гена (обычно точечные мутации) с образованием вариантов, каждый из которых слабо отличается от своего предшественника. С другой стороны, антигенный шифт вызывается более радикальным изменением в HA и/или NA. В этом случае в популяции появляются вирусы гриппа с поверхностными антигенами, не похожими на антигены непосредственно предшествующих им вирусов. Происхождение этих новых вирусов еще неясно; некоторые могут образовываться в результате генетической пересортировки между штаммами вируса гриппа человека и животных; другие могут находиться в дремлющем состоянии в течение длительных периодов времени перед повторным их появлением.

Вследствие антигенных вариаций по существу невозможен эффективный контроль гриппозной инфекции с помощью вакцинации. На распространение и тяжесть эпидемий гриппа влияют также вариации в вирулентности, круге хозяев и трансмиссибельности вируса. В настоящем обзоре суммированы последние данные о путях варьирования генов вируса гриппа, их продукта, а также о влиянии этих изменений на биологическую активность вирусов.

II. Исторические сведения

Высококонтагиозное острое респираторное заболевание, известное как инфлуэнца, причиняло страдание человечеству с давних времен. Внезапное появление эпидемий респираторных заболеваний, которые персистировали в течение нескольких недель и так же неожиданно исчезали, было достаточно характерной чертой для возможного определения числа главных эпидемий в давнем прошлом. Одна из таких эпидемий была упомянута Гиппократом в 412 до н. э. Многочисленные эпизоды такого рода были описаны еще в средние века. A. Hirsch [44] и N. Webster [108] суммировали исторические материалы по этому вопросу, начиная с 1500 г. до последних лет XIX века. Эти сведения были изложены G. Noble [76]. Можно отметить следующие особенности.

1. Эпидемии возникали относительно часто, но спорадически, и болезнь внезапно исчезала на неопределенные периоды времени.

2. Эпидемии варьировали по своей силе, но обычно вызывали смертность среди пожилых людей.

3. Некоторые эпидемии, как, например, эпидемии 1781 и 1830 гг., распространились из Азии по всей России.

В известных в настоящее время данных по эпидемиологии гриппа существует несколько общих черт. Эпидемии последних лет возникали в Китае и обычно сильнее всего поражали пожилых людей. До сих пор нет каких-либо примет того, что грипп исчезает из человеческой популяции, но в последние годы он стал относительно слабее и вызывает меньшую, чем обычно, смертность.

По данным ретроспективной сероэпидемиологии можно предположить, что эпидемия гриппа среди людей в 1889—1890 гг. была вызвана вирусом, антигенно подобным «азиатским» штаммам (H2N?) [71]. Эпидемия 1900 г. могла быть вызвана штаммом типа Hong Kong, но с NA, подобной NA штамма A/лошадь/Miami/1/63 вируса гриппа. Подобный свиному вирус гриппа (H1N1) вызвал катастрофическую пандемию в 1918—1919 гг., которая унесла более 20 млн. человеческих жизней [19, 20, 61]. Штаммы вируса гриппа человека рециркулируют, подтверждением чему служит повторное появление штамма H1N1 в 1977 г.

До первого выделения вируса гриппа человека в 1933 г. было невозможно определенно сказать, какие именно пандемии острых респираторных заболеваний были вызваны вирусами гриппа. Начиная с 1933 г. основные антигенные шифты произошли в 1957 г., когда подтип H1N1 сменился подтипом H2N2 (азиатский грипп), в 1968 г., при появлении Hong Kong (H3N2), и в 1977 г. при повторном появлении подтипа H1N1 вируса гриппа.

III. Номенклатура

Вирусы гриппа делятся на типы A, B и C в соответствии с различиями между антигенами их нуклеопротеида и матриксного белка. Вирусы гриппа типа A далее подразделяются на подтипы, и

Таблица 6. *Подтипы НА и NA вирусов гриппа типа, А, выделенных от людей, низших млекопитающих и птиц*

Подтип	Источник выделения[3]			
	люди	свиньи	лошади	птицы
Гемагглютинин				
H1[1] (H0, H1, Hsw1)[2]	PR/8/34	Свинья/Ia/15/30	—	Утка/Alb/35/76
H2 (H2)	Sing/1/57	—	—	Утка/Ger/1215/73
H3 (H3, Hav7, Heq2)	НК/1/68	Свинья/Taiwan/70	Лошадь/Miami/1/63	Утка/Украина/1/63
H4 (Hav4)		—	—	Утка/Cz/56
H5 (Hav5)	—	—	—	Крачка/S.A./61
H6 (Hav6)	—	—	—	Индюк/Mass/3740/65
H7 (Heq1, Hav1)	—	—	Лошадь/Praque/1/56	FPV/Dutch/27
H8 (Hav8)	—	—	—	Индюк/Ont/6118/68
H9 (Hav9)	—	—	—	Индюк/Wis/1/66
H10 (Hav2)	—	—	—	Курица/Ger/N/49
H11 (Hav3)	—	—	—	Утка/Eng/56
H12 (Hav10)	—	—	—	Утка/Alb/60/76
H13	—	—	—	Чайка/Md/704/77
N1 (N1)	—	Свинья/Ia/15/30	—	Курица/Scot/59
N2 (N2)	PR/8/34	Свинья/Taiwan/70	—	Индюк/Mass/3740/65
N3 (Nav2—3)	Sing/1/57	—	—	Крачка/S.A./61
N4 (Nav4)	—	—	—	Индюк/Ont/6118/68
N5 (Nav5)	—	—	—	Буревестник/Austral/1/72
N6 (Nav1)	—	—	—	Утка/Cz/56
N7 (Neq1)	—	—	Лошадь/Praque/1/56	FPV/Dutch/27
N8 (Neq2)	—	—	Лошадь/Miami/1/63	Утка/Украина/1/63
N9 (Nav6)	—	—	—	Утка/Mem/546/74
	—			
	—			

[1] Современное обозначение подтипа (WHO, 1980).
[2] Принятое ранее обозначение подтипа (WHO, 1971).
[3] Представлены референс-штаммы вирусов гриппа или первые изоляты из этих видов.

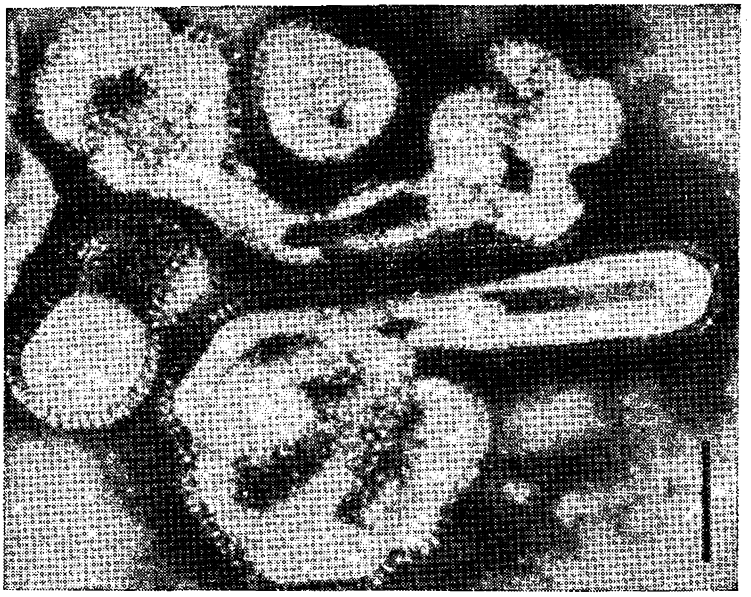
номенклатурная система [119] включает источник выделения вируса, географическое место выделения, номер штамма и год выделения (табл. 6). Антигенное описание HA и NA дано в скобках, например A/свинья/Iowa/15/30 (H1N1). По традиции источник выделения штаммов вируса гриппа человека не указывается, например A/PR/8/34 (H1N1). Данные иммунологического анализа, тестов гибридизации и секвенирования показали, что несколько подтипов предыдущей номенклатуры [118] настолько близки, что они могут быть теперь объединены. Так, H0, H1 и Hsw1 обозначаются как H1 (см. табл. 6). Принятые ранее обозначения, указывающие виды источников выделения антигенов HA и NA, теперь опускаются.

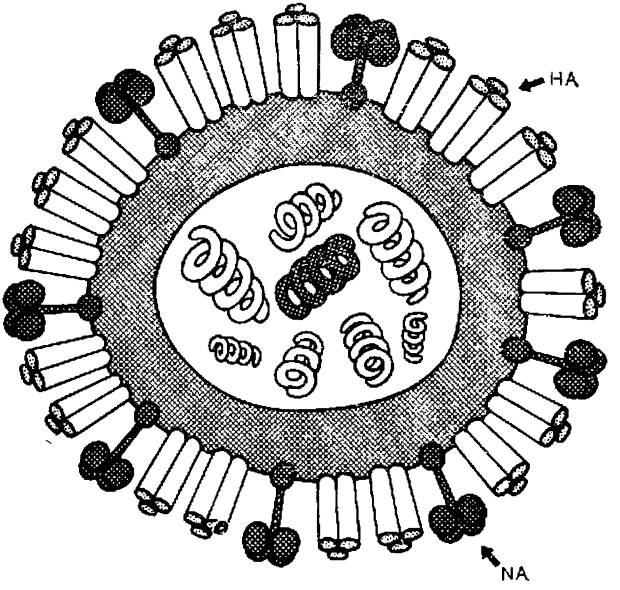
Интенсивные исследования вирусов гриппа животных, начиная с 1971 г., дали несколько дополнительных данных к числу подтипов HA и NA. Эти дополнения включают три штамма птиц с новыми HA (H9, H12 и H13 [42]) и два штамма птиц с новыми подтипами NA (N5 и N9). Дальнейшие эксперименты не выявили больше подтипов, что предполагает наличие в природе конечного числа определенных вирусов гриппа типа A, а также то, что представители каждого из этих подтипов продолжают циркулировать главным образом в низших животных.

IV. Химические и физические свойства антигенов

Частицы вируса гриппа типа A покрыты слоем шипов, которые представляют собой два поверхностных антигена вируса, HA и NA (рис. 20). HA — трехмерная стержневидной формы молекула, NA — тетрамер, состоящий из квадратной, похожей на коробочку головки на длинной тонкой «ножке». Оба антигена являются гликопротеидами и прикрепляются к липидной оболочке вируса последовательностями гидрофобных аминокислот, которые располагаются на основании тримера HA и «ножки» NA. HA и NA составляют соответственно около 25% и 5% общего белка вириона.

В липидной оболочке вириона находится белок M (мембранный, или матриксный), который является основным белковым компонентом вируса и, как полагают, структурным по своей функции. Внутри мембранной оболочки заключено восемь одноцепочечных молекул РНК (минус-цепь, т. е. вирионная РНК комплементарна мессенджер РНК), связанных с белком нуклеокапсида, и тремя большими белками P1, P2 и P3, ответственными за репликацию и транскрипцию РНК. По крайней мере три кодируемых вирусом неструктурных белка (NS1, NS2 и M2) обнаруживаются в инфицированных клетках, но их функции неизвестны. В главе 2 представлены современные данные о восьми генах вируса гриппа и молекулярных массах кодируемых ими белков.





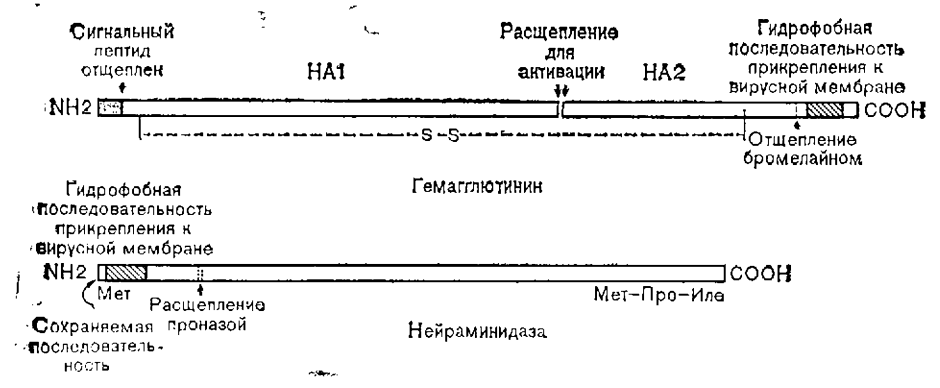
20. Структура частиц вируса гриппа типа А при электронно-микроскопическом исследовании (вверху) и в виде схемы.

Длина шипов НА около 16 нм. Спиралевидные структуры внутри вируса представляют собой 8 сегментов РНК, каждый из которых кодирует один (в некоторых случаях два, использул перекрывающиеся рамки считывания) вирусный белок.

V. Гемагглютинин

НА составляет около 25% вирусного белка. Он ответствен за прикрепление вируса к клеткам и за проникновение вируса в клетку в начальных стадиях инфекции. Антитела к НА нейтрализуют инфекционную активность вируса, и вариация в гликопротеиде НА в основном ответственна за постоянно возникающие вспышки гриппа и за неспособность контроля над ними посредством вакцинации.

Мономер НА кодируется четвертым наибольшим сегментом РНК и синтезируется как одна полипептидная цепь, которая проходит посттрансляционное расщепление по крайней мере в трех местах (рис. 21). N-терминальная сигнальная последовательность удаляется и в зависимости от клетки-хозяина и штамма вируса молекула расщепляется с отделением одного или более остатков и с образованием двух цепей полипептида, которые обозначаются как НА1 и НА2 и имеют м.м. 36 000 и 27 000 соответственно (см. главу 2). НА1 и НА2 остаются связанными единственным дисульфидным мостиком, и каждый шип НА содержит три из этих НА1



21. Схема определенных свойств полипептидов НА и NA.

1. Гемагглютинин. НА синтезируется как один полипептид. Затем отщепляется N-терминальный сигнальный пептид и молекула расщепляется на НА1 и НА2 с отделением одной или более расположенных между аминокислот. Это последнее расщепление необходимо для проявления инфекционности вируса. НА1 и НА2 остаются связанными одной дисульфидной связью и каждый шип НА содержит три из этих димеров. Последовательность гидрофобных аминокислот на С-конце НА2 служит для погружения НА в липидную оболочку вирусной мембраны. Обработка бромелайном приводит к отделению этого гидрофобного участка без повреждения остальной части молекулы, которая в отдельных случаях может быть кристаллизована. 2. Нейраминидаза. NA расположена в вирусной мембране иначе, чем НА. Не происходит ни посттрансляционного расщепления полипептида NA, ни отщепления сигнального пептида, и даже остается инициирующий процесс метионин. Не происходит каких-либо процессов и на С-конце молекулы NA. С-терминальная последовательность — Мет-Про-Иле — предсказанная из последовательности гена, интактна в молекулах NA, выделенных из вируса, и в отщепленных проназой головках NA. За последовательностью шести полярных аминокислот на N-конце полипептида NA, которая полностью сохраняется по крайней мере в восьми различных подтипах NA, следует последовательность гидрофобных аминокислот, которые, вероятно, представляют собой участок ножки NA, ответственный за прикрепление к мембране. Эта последовательность не сохраняется для подтипов (в отличие от сохранения гидрофобности). Проназа отщепляет полипептид в указанных положениях, отделяя ножку и отщепляя активную энзиматически и антигенно головку NA, которая в отдельных случаях может быть кристаллизирована.

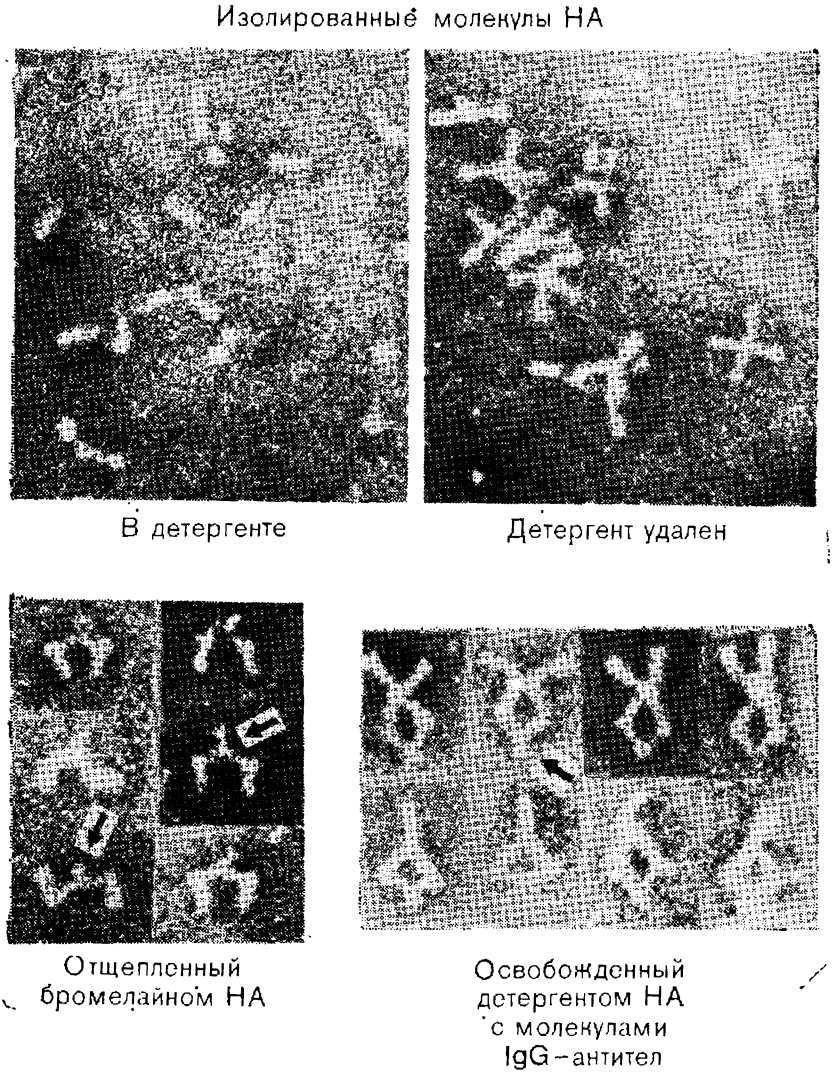
и HA2 цепей. Расщепление полипептида HA на HA1 и HA2 необходимо для того, чтобы вирусные частицы обладали инфекционностью. Размножение вируса в клетках при отсутствии фермента расщепления приводит к уменьшению инфекционной активности вируса, что, однако, можно восстановить, обработав вирус трипсином. Последовательность 25—32 гидрофобных аминокислот около С-конца HA2 служит для погружения в вирусную мембрану.

А. Выделение и антигенные свойства гемагглютинина

Интактные шипы HA могут быть выделены из некоторых штаммов вируса гриппа путем разрушения вирусных частиц детергентом, например додецилсульфатом натрия (SDS). После удаления детергента из очищенных образцов HA молекулы HA агрегируются своими гидрофобными концами с образованием розеток (рис. 22). При смешивании этих розеток с очищенными IgG-антителами к HA молекулы антител связываются с гидрофильным концом HA сразу же за верхушкой шипа HA (см. рис. 22).

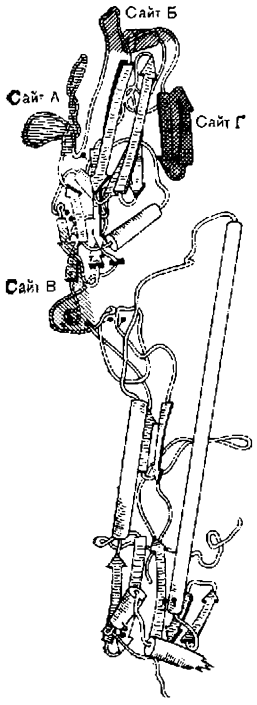
Неполные молекулы HA могут быть выделены из некоторых штаммов вируса гриппа расщеплением вирусной частицы протеолитическими ферментами, например бромелайном или проназой. В вирусе Hong Kong (H3N2) бромелайн расщепляет молекулу HA между 175 и 176 остатками в HA2, отделяя гидрофобную последовательность прикрепления к мембране и высвобождая гидрофильный конец HA. При электронной микроскопии видно, что молекулы антител связываются с расщепленным бромелайном HA около одного из его концов (см. рис. 22), но в этом случае нельзя сказать, какой конец молекулы где находится.

Расщепленный бромелайном HA некоторых штаммов вируса гриппа Hong Kong (H3N2) может быть кристаллизован, и трехмерная структура HA штамма Hong Kong (H3N2) была определена по результатам дифракции γ-лучей [121, 125]. Сохранение структурных характеристик, таких, как дисульфидные связи, свидетельствует о том, что молекулы HA других подтипов имеют подобные структуры. Гликопротеид HA вируса гриппа представляет собой тример, построенный из двух различных по структуре участков: трехнитчатой закрученной в спираль конструкции из α-спиралей, отстоящей на 7,6 нм от мембраны, и глобулярного участка антипараллельной β-поверхности, которая содержит сайт связывания рецептора. Вариабельные антигенные детерминанты локализованы в верхней области. Каждая субъединица необычной петлеобразной топологии: она начинается на мембране, отстоит от нее на 13,5 нм и замыкается обратно на мембрану (рис. 23). Ранние эксперименты показали, что в молекуле HA присутствуют две группы антигенных детерминант: штаммоспецифические и общие (перекрестно реагирующие — «cross-reactive»). При использовании электронной микроскопии было показано, что они, очевидно, располагаются на стороне шипа HA около его верхушки. Никакой дальнейший анализ антигенной структуры HA с использованием поликлональных антисывороток был невозможен.



22. Электронные микрофотографии изолированных молекул НА.

На верхней фотографии — НА, выделенный после разрушения вируса додецилсульфатом натрия (SDS). НА в присутствии детергента (левая фотография) существует как индивидуальные молекулы, которые агрегируют своими гидрофобными концами (они служат для прикрепления ПА к липидному слою вирусной оболочки) при удалении детергента (правая фотография). На нижних фотографиях показано прикрепление молекул IgG антител к НА. Левая нижняя фотография — отщепленный бромелайном ПА, который лишен своего гидрофобного участка, прикрепления к мембране и существует как индивидуальные молекулы в отсутствие детергента. Правая нижняя фотография — агрегированный, освобожденный детергентом интактный НА. Видны молекулы анти-НА IgG антител (указаны стрелкой), которые прикреплены к молекулам НА. Антитела, вероятно, связывают НА непосредственно за верхушкой шипа НА [электронные микрофотографии выполнены P. Valentine и N. Wrigley].



23. Мономер НА штамма Hong Kong.

На рисунке, выполненном Hidde Pleogh, показано соединение полипептидов НА1 и НА2 в молекуле [120, 121]. Четыре заштрихованных участка (сайты А—Г) показывают возможные места локализации независимых антигенных областей. В шипе НА, который состоит из трех мономеров, сайт Г спрятан и может не быть вовлечен в связывание антител.

Кроме вируспецифических антигенных сайтов, на НА располагаются клеточно-специфические антигенные сайты, которые по своей природе являются углеводами [105]. НА штамма A/Mem/72 (H3N2) имеет семь олигосахаридных боковых цепей, три из которых (в положениях Асн8 и Асн22 в НА1 и в положении Асн154 в НА2) антигенно родственны антигену хозяина куриного эмбриона. НА штамма Jap/305/57 (H2N2) имеет пять олигосахаридных боковых цепей, из которых только локализованные в положении Асн11 в НА1 и Асн159 в НА2 родственны антигену хозяина.

Б. Изменение структуры и антигенности гемагглютинина при низких значениях pH

Изучение аминокислот в последовательности N-конца НА2 нескольких вирусов гриппа типа А человека и птиц показало наличие высококонсервативного участка из 100 аминокислотных остатков [88, 96]. Эта последовательность гомологична N-концу расщепленного активированного гликопротеида слияния (F) парамиксовируса — вируса Сендай. Белок F является посредником процесса слияния оболочки вируса Сендай с плазматической мембраной клетки-хозяина, который важен для инфекционной активности вируса. Таким образом было высказано предположение, что инфекционная активность вируса зависит от функции слияния НА, аналогичной функции белка слияния вируса Сендай. Хотя трехмерная структура НА вируса гриппа показывает, что N-конец НА2 запрятан в молекуле НА, недавно было установлено, что после инкубации в условиях, благоприятных для слияния мембраны, т. е. при pH 5,0, происходит структурное изменение в гликопротеиде НА [97]. Молекула приобретает способность лизировать эритроциты [47, 66]; и отщепленный бромелайном НА может быть связан с липидными везикулами. Изменение в структуре сопровождается изменением в антигенности. Моноклональные антитела к обработанному при pH 5,0 НА выявляют новые антигенные детерминан-

ты при этом значении pH, а антигенные сайты Б и Г (см. рис. 23), расположенные на молекуле НА при нейтральном значении pH, теряются или модифицируются при pH 5,0 [117].

В. Антигенный дрейф гемагглютинина

Антигенный дрейф происходит в НА вируса гриппа типа А вслед за появлением нового подтипа. Это было хорошо продемонстрировано документально в ряде вирусов гриппа типа Hong Kong.

Таблица 7. *Антигенный дрейф вирусов H3N2 между 1968 и 1977 гг., по данным перекрестных реакций в тестах ингибиции гемагглютинации [81]*

Вирус	Антисыворотки хорька							
	A/HK/1/68	A/E/42/72	A/PC/1/73	A/Sc/840/74	A/Vic/1/75	A/Tok/1/75	A/E/864/75	A/Tex/1/77
A/Hong Kong/1/68	2560	2560	320	80	20	<20	20	20
A/England/42/72	40	1280	320	160	40	<20	40	20
A/Port Chalmers/1/73	20	640	640	160	40	<20	40	20
A/Victoria/1/75	<20	<20	<20	20	1280	80	160	20
A/Tokyo/1/75	<20	<20	<20	<20	320	1280	40	40
A/England/864/75	<20	80	80	20	320	<20	5120	640
A/Texas/1/77	<20	40	80	20	160	<20	5120	1280

Антигенный дрейф в НА происходит в результате последовательных мутаций в гене, приводящих к аккумуляции изменений последовательности аминокислот, которая так изменяет антигенные сайты, что они не узнаются больше иммунной системой хозяина. Доказательство именно такого механизма получают при анализе последовательности естественно возникающих «дрейфовых» вирусов, в основном вирусы типа Hong Kong (H3N2) (см. табл. 7) и вариантов, селекционированных в лаборатории в присутствии антител. Бо́льшая часть изменений последовательности, происходящих в НА штамма Hong Kong 1968—1979 гг., была локализована на отрезке НА1 молекулы НА, и только три изменения были обнаружены в НА2 [15]. Изменения последовательности в молекуле НА1 распределены по всей последовательности НА1; на трехмерной структуре НА многие из них сгруппированы в четырех участках (см. рис. 23), которые, как предполагают, и являются основными сайтами НА. Изменения последовательности в определенном положении в НА1 не происходят. Обнаружено несколько очевидных реверсий, но так как нет оснований считать, что изученные вирусы связаны между собой прямой генеалогической родословной, в тех случаях, когда имеются очевидные реверсии аминокислот, реальным объяснением является то, что в первом

положении остаток никогда не меняется (см. рис. 24). Подобным образом в одном случае, где есть очевидное изменение последовательности в аминокислоте (аспарагиновый остаток в 137-м положении изменяется на серин в Vic/75 и затем на тирозин в Bangkok/1/79), происшедшие изменения нуклеотидной последовательности указывают на то, что штамм A/Vic/75 не был прямым прародителем штамма A/Bangkok/1/79.

Некоторые участки HA1 полностью сохранялись за период 1968—1979 гг. Наибольший из этих сохранившихся участков расположен между остатками 84—121 и 279—328. Последний сохраняется в двух штаммах H3 вируса гриппа птиц, секвенированных до настоящего времени [25, 107]. За исключением одного изменения валина на изолейцин в 309-м положении, 279—328 остатки образуют часть «ножки» HA, где для сохранения структурных напряжений необходима их высокая консервативность.

Изменения последовательности участка HA1 для HA антигенных вариантов Hong Kong (полевые штаммы), выделенных между 1968 и 1979 гг., показаны на рис. 32. Неизвестно, однако, какие из этих изменений ответственны за изменения в антигенности, которые произошли за этот период в HA, и какие из изменений представляют «случайный дрейф», не влияющий на антигенные свойства HA.

Г. Использование моноклональных антител в анализе антигенного дрейфа

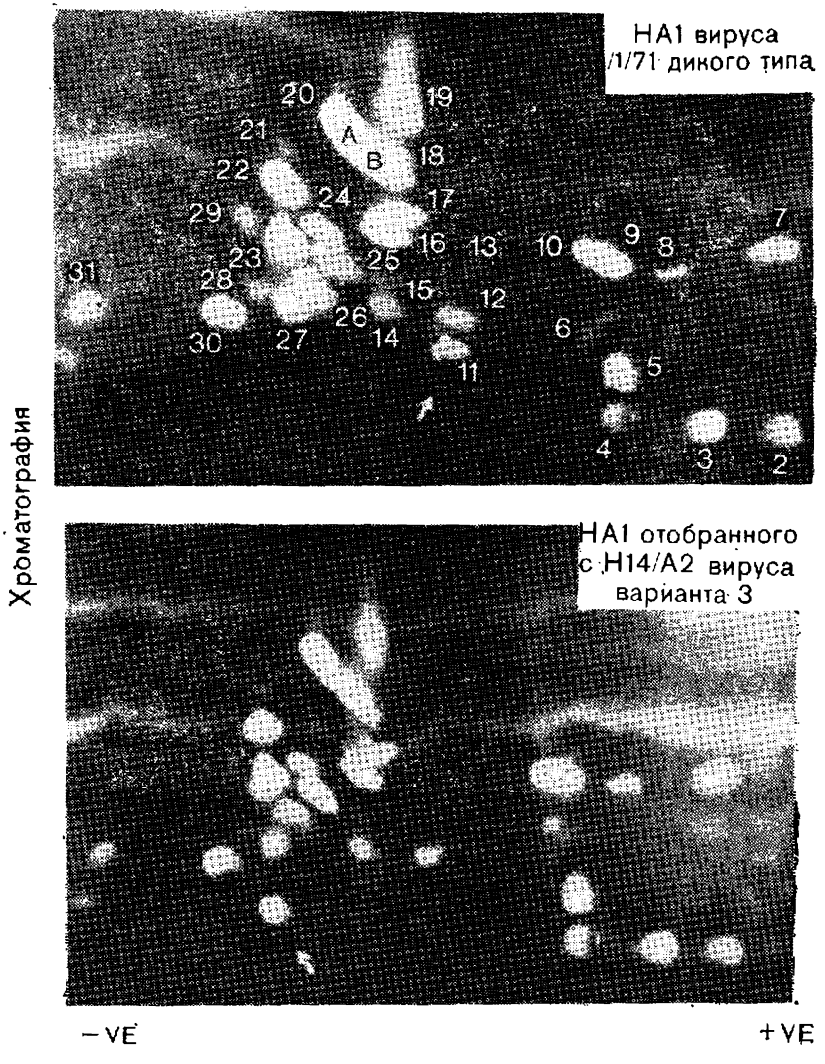
Антигенные варианты HA отбирали путем выращивания вируса в присутствии моноклонального антитела к HA. Частота вариантов в вирусном материале составляла $\sim 10^{-5}$, и они вообще не связывались с антителом, которое использовали для их селекции. Эти варианты при сравнительном антигенном анализе мутантных вирусов с моноклональными антителами использовали для конструирования экспериментальной антигенной карты молекулы HA.

Анализ вариантов A/PR/8/34 (H1N1) методом радиоиммунотеста (RIA) выявил четыре антигенных сайта на молекуле HA [30]. Два из них преимущественно штаммоспецифические, обозначенные Sa и Sb, и два — перекрестно реагирующие, обозначенные Ca и Cb [87]. При дальнейшем анализе участок Ca был подразделен на два участка — Ca1 и Ca2, различить которые можно с использованием определенных моноклональных антител.

Анализ вариантов A/Mem/1/71 (H3N2) с использованием тестов ингибиции гемагглютинации показал наличие по крайней мере трех неперекрывающихся антигенных участков [111].

Д. Изменение последовательности гемагглютинина вариантов вируса гриппа, отобранных с моноклональными антителами

Изменение последовательности HA вариантов вируса гриппа, отобранных с моноклональными антителами, определяли следующим образом. Из разрушенного SDS родительского вируса выделяли



24. Карты триптических пептидов (растворимых при pH 6.5) из S-карбоксиметилированного HA1 вируса Mem/71 дикого типа и одного из четырех вариантов, отобранных с продуцируемым гибридомой моноклональным антителом H14/A2.

Карты окрашивали флюорескамином. На картах видны различия в одном пептиде, пептиде 11 (показано стрелкой). Пептид 11 состоит из остатков 51—57 (-Иле-Лиз-Асн-Асн-Про-Гис-Арг-) в HA1 вируса Mem/71 дикого типа. Остаток аспарагина в положении 53 был заменен на лизин в варианте вируса. Ни в одном из других пептидов различий обнаружено не было.

НА и затем разделяли НА1 и НА2, S-карбоксиметилировали и расщепляли трипсином. Триптические пептиды разделяли методом двухмерного электрофореза и хроматографией и каждый анализировали для определения состава аминокислот (рис. 24). Данные композиционного состава свидетельствовали о локализации пептидов в последовательностях НА1 и НА2, и последовательность каждого могла быть выведена данным способом. Однако не все триптические пептиды могли быть проанализированы. Например, не могли быть изучены два нерастворимых триптических пептида в НА1 и несколько пептидов в НА2. Последовательности этих участков были определены секвенированием генома РНК вариантов вирусов [Newton, Air, неопубликованные данные]. В случае отдельных вариантов один или другой триптический пептид показывал совершенно неожиданное различие или в электрофоретической, или в хроматографической подвижности (см. рис. 24). В данном случае указанный пептид из родительского вируса содержит: Иле(1), Асп(2) КМ-Цис(1) Про(1) Гис(1) Арг(1) и в пептиде НА варианта, отобранного с H14/A2 моноклональным антителом, Асп заменен на Лиз.

Этот пептид в родительском вирусе занимает положения 51—57 в НА1 и имеет последовательность Иле-Цис-Асн-Асн-Про-Гис-Арг, однако, по данным его состава нельзя было сказать, какой именно из аспарагиновых остатков заменен на лизин. Поэтому был секвенирован участок сегмента РНК в варианте, кодирующем этот пеп-

Таблица 8. *Изменения последовательности в полипептиде НА1 антигенных вариантов A/Memphis/1/71 вируса, селекционированных с указанными в таблице моноклональными антителами*

Моноклональное антитело	Вариант	Изменение последовательности[1]
H14/A2	V1	Аспарагин (53) → Лизин
	V2	Аспарагин (53) → Лизин
	V3	Аспарагин (53) → Лизин
	V4	Аспарагин (53) → Лизин
H14/A21	V1	Серин (205) → Тирозин
H14/A20	V1	Аспарагин (133) → Лизин
	V2	Пролин (143) → Серин
	V3	Пролин (143) → Лейцин
	V4	Серин (145) → Лизин
Mem/212/1	V1	Пролин (143) → Серин
	V2	Пролин (143) → Треонин
	V3	Пролин (143) → Лейцин
	V7	Пролин (143) → Гистидин
Mem/27/2	V5	Пролин (143) → Серин
	V9	Пролин (143) → Треонин
Mem/123/4	V1	Пролин (143) → Гистидин
	V3	Пролин (143) → Гистидин
	V10	Глицин (144) → Аспарагиновая кислота
HK/30/2	V10	Аспарагин (188) → Аспарагиновая кислота

[1] Числа в скобках означают положение аминокислоты в НА1.

тид, и было определено, что Асн в 53-м положении заменен на Лиз (близость КМ-Цис остатка, очевидно, предотвращала триптическое расщепление на новом остатке Лиз). Составы других пептидов в НА1 и НА2 были одинаковы в родительском и вариантном вирусах.

Подобный анализ ПА из большого числа вариантов вируса A/Mem/1/71, отобранных с различными моноклональными антителами, показал, что в каждом случае происходит одно изменение в последовательности аминокислот НА1 (табл. 8). В НА2 изменения не обнаружены.

Поскольку эти изменения последовательности полностью предотвращали связывание антител, которое нейтрализовало инфекционную активность родительского вируса, очевидно, что они возникали в участках НА, ответственных за антигенность молекулы.

Е. Расположение антигенных сайтов в 3-D структуре гемагглютинина

Многие изменения последовательности в НА1 естественных изолятов (полевые штаммы) вируса гриппа Hong Kong (H3N2), выделенных в период между 1968 и 1979 гг., приходятся на четыре различающихся участка, где линейный полипептид НА1 упакован в трехмерную структуру (см. рис. 23).

Изменения в НА1 вариантов, селекционированных с моноклональными антителами, также приходятся на эти четыре участка. Это точно указывает на наличие четырех неперекрывающихся антигенных сайтов, описанных с помощью моноклональных антител. Большинство антигенных вариантов Mem/1/71 (H3N2), отобранных с моноклональными антителами, нельзя отличить от родительского вируса с использованием антисывороток хорьков. Поэтому они, скорее всего, не имеют эпидемиологической перспективы [111]. Различия незначительного числа вариантов, отобранных с моноклональными антителами к A/Mem/1/71 (H3N2), A/СССР/90/77 (H1N1) и B/Hong Kong/1/73, могут быть выявлены с использованием антисывороток хорьков [53, 112]. Предполагают, что аминокислотные составляющие этих вариантов вызывали изменения в антигенности молекулы НА. Эпидемиологически потенциальные «моноклональные» варианты A/Mem/1/71 (H3N2) могли быть репродуктивно селекционированы насыщением одного антигенного участка (сайт А на рис. 23) мутациями перед селекционированием вариантов во втором участке [114]. Ни одна из обнаруженных мутаций в первом антигенном участке не продуцировала вариант, который можно было бы отличить от родительского вируса при анализе с антисывороткой хорька, но все варианты, последовательно селекционированные с моноклональными антителами к другому антигенному участку, существенно различались при испытании с антисыворотками хорьков.

A. Caton и соавт. [16] секвенировали участок, кодирующий НА1 в генах НА 46 вариантов PR8, селекционированных с моноклo-

Таблица 9. *Изменения аминокислот, обнаруживаемых в HA1 вариантов PR/8/34, селекционированных с моноклональными антителами пяти реактивных групп*

Sa				Sb				Ca1				Ca2				Cb			
вирус	аминокислота			вирус	аминокислота			вирус	аминокислота			вирус	аминокислота			вирус	аминокислота		
	мут[n]	положение			мут[n]	положение			мут[n]	положение			мут[n]	положение			мут[n]	положение	
		H1	H3			H1	H3			H1	H3			H1	H3			H1	H3
CV1	K-E	161	165	B/1	[illegible]	152	156	SV3	G-R	236	240	DV4	S-P	136	140	AV1	R-G	74	82
2	P-L	138	162	2	Q-E	1[illegible]2	196	3	S-T	270	273	5	R-I	220	224	LV1	R-G	74	82
5	P-S	124	128	6	G-D	155	159	6	G-R	236	240	NV2	G-R	139	143	4	R-G	74	82
6	N-K	162	166	11	Q-L	188	192					7	S-A	141	145	7	S-P	75	83
JV1	S-F	163	167	12	N-S	187	193	WV8	I-M	178	182	TV1	G-R	139	143	MV4	L-P	71	79
2	K-E	161	165	13	N-K	189	193	8	S-L	203	207	26	D-G	221	225	5	S-P	75	83
3	S-Y	163	167	EV2	Q-R	188	192	10	V-A	165	169					9	V-E	73	81
9	S-F	163	167	6	Q-R	188	192									RV6	E-K	115	122
18	S-F	163	167	8	E-G	194	198	11	G-R	169	173					7	L-P	70	78
18	+K	161	165					15	G-E	236	240								
KV2	K-T	159	163					ZV1	G-V	169	173								
4	N-K	125	129																
PV9	S-L	156	160																
11	S-L	156	160																
12	N-Y	125	129																
20	E-V	154	158																

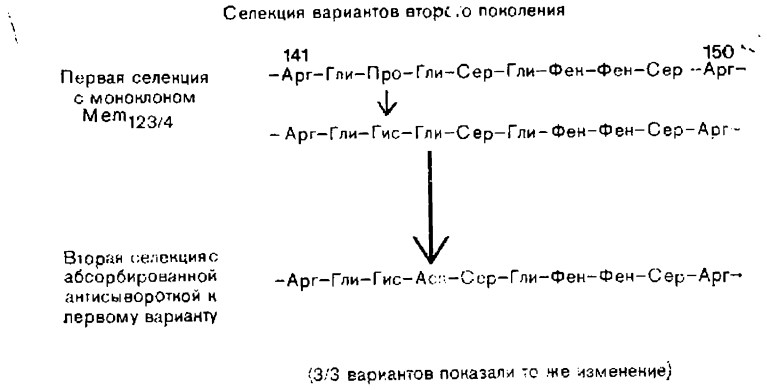
Примечание. Данные A. Caton и соавт. [16].
Система нумерации H1 из G. Winter и соавт. [125].
Система нумерации H3 из G. Ward и T. Dopheide [104], а также M. Verhoeyen и соавт. [103].

нальными антителами к каждой из пяти обладающих реакционной способностью групп. Обнаруженные замены аминокислот приведены в табл. 9. В двух вариантах были дополнительные безмолвные изменения нуклеотидов и более одного изменения в аминокислоте обнаруживали в двух вариантах (JV18 и WV8).

Трехмерная структура НА штамма PR8 неизвестна, но если нанести на рисунок трехмерной структуры цепи полипептида мономера НА Hong Kong (H3) точки, соответствующие положениям изменения аминокислот [120, 121], то видны «кластеры» этих измененных аминокислот, которые в основном соответствуют антигенным группировкам. Нет вариантов PR8, которые были бы нанесены на карту на тех же остатках, что и сайт B НА Hong Kong, хотя сайт Cb PR8 расположен близко, в то время как сайт Б НА Hong Kong становится двумя сайтами в PR8. Эти изменения могут отражать различия в трехмерной структуре между НА штаммов PR8 и Hong Kong. Сайт Ca1 PR8 особенно интересен для нанесения на карту H3, поскольку изменения происходят по трем лучам, каждый близко к 180°, в β-структуре; в каждом случае маленькая боковая цепь аминокислоты заменяется на большую (Гли 173 на Арг или Вал, Сер 207 на Лей, Гли 240 на Арг или Глу). В естественных условиях сайты Sa и Sb претерпевали больший дрейф между 1933 и 1957 гг., чем сайты Ca или Cb [30]. Антитела к сайту Cb обладали приблизительно в 10 раз меньшей вируснейтрализующей активностью, чем антитела к сайтам Sa, Sb или Ca, что, возможно, объясняет отсутствие естественного дрейфа в участке Cb, но не дает разъяснения, почему сайт Ca относительно стабилен в естественных условиях [30]. Возможно, варианты в месте расположения сайта Ca имеют измененные и неблагоприятные структурные изменения в НА.

Ж. Отбор антигенных вариантов секвенированием

Антигенные варианты, селекционированные с моноклональными антителами, очевидно, утратили антигенный сайт на НА, так как в каждом случае моноклональное антитело (которое связывается очень эффективно с НА дикого типа) совершенно неспособно связываться с антигенным вариантом. Были проведены эксперименты для ответа на вопрос, появляется ли новый антигенный сайт на молекуле НА вариантов при потере первоначального сайта. Гипериммунные антисыворотки к молекулам вариантов абсорбировали с очищенным концентрированным вирусом дикого типа до тех пор, пока титры антисывороток для вируса дикого типа в реакции ингибиции гемагглютинации не обнаруживались. Абсорбированные сыворотки затем испытывали с вариантами вирусов. Когда сыворотки против вариантов, отобранных с моноклональными антителами H14/A2 и H14/A21, для которых изменения последовательности заключались в замене аспарагина 53 на лизин и серина 205 на тирозин соответственно [62], абсорбировали с вирусом Mem/71 дикого типа, не оставалось активности ингибиции



25. Изменения последовательности при селекционировании антигенных вариантов вируса гриппа Mem/71 секвенированием.

В первом варианте, селекционированном в присутствии продуцируемого мышиной гибридной моноклонального антитела к НА Mem/71, пролин в положении 143 в НА1 заменен на гистидин. При второй селекции исходный вариант продуцировался в присутствии антитела к новому антигенному сайту на этом варианте, образованном изменением в последовательности пролина в положении 143 на гистидин. Это антитело получали абсорбцией с вирусом Mem/71 дикого типа; гипериммунные кроличьи антисыворотки получали к НА варианта.

гемагглютинации по отношению к вариантам [R. Webster, W. Laver, неопубликованные данные]. Это говорило о том, что в этих вариантах не образовывались новые иммуногенные сайты. Тот же результат получали при использовании кроличьих или мышиных антисывороток.

С другой стороны, когда сыворотку против варианта Mem/123/4 (Про 143→Гис, см. табл. 8) абсорбировали с вирусом Mem/71 дикого типа, высокие уровни ингибирующей активности к варианту оставались после того, как вся ингибирующая активность к вирусу была удалена. Это антитело к варианту не было отделено после повторной абсорбции сывороток с вирусом дикого типа и, таким образом, должно быть направлено против единственного нового антигенного сайта на НА варианта. В этом отношении он ведет себя как «моноклональное» антитело. Подобные результаты были получены, когда антитело к НА варианта, который показал изменение в 143-м положении НА1 с пролина на треонин (см. табл. 8), абсорбировали с вирусом дикого типа.

Антитело против нового антигенного сайта на молекуле НА вариантных вирусов использовали для селекции вариантов второго поколения от исходных вариантов. Когда первое изменение последовательности варианта было Про (143) на Гис, изменение последовательности при второй селекции было Гли (144) на Асп (рис. 25). Когда же первое изменение последовательности варианта было Про (143) на Тре, при второй селекции новый Тре в 143-м положении превращался обратно в Про и вирус вновь приобретал антигенные свойства вируса дикого типа.

3. Антигенный дрейф гемагглютинина вируса гриппа типа А низших животных

Антигенные различия были выявлены в пределах подтипов, которые включали вирусы гриппа свиньи, лошади и птиц, но имеются данные в пользу одновременной циркуляции различных вариантов в большей степени, чем в пользу постепенного антигенного дрейфа определенного вируса. Эксперименты с вирусами гриппа свиньи (H1N1) показывают, что антигенные вариации происходили с момента первого выделения вируса в 1930 г. и что одновременно циркулировали антигенно различаемые вирусы [52]. Что касается вирусов гриппа свиньи, то для них есть доказательство истинного антигенного дрейфа с появлением и исчезновением штаммов. Анализ вирусов гриппа лошади (H3N8) с антисыворотками хорька и с моноклональными антителами к НА показывает, что происходит ограниченная антигенная вариация [80]. Продолжают циркулировать по крайней мере два антигенно различимых вируса лошади типа 2 [42]. Штамм A/Eq/Kentucky/1/81 (H3N8), который в настоящее время вызвал новые проблемы, связанные с заболеванием лошадей, антигенно подобен вирусу, выделенному 18 лет назад [A/Eq/Uruguay/1/63 (H3N8)], в то время как A/Eq/Switz/2225/79 (H3N8) подобен A/Eq/Miami/1/63 (H3N8) (табл. 10). Антигенный анализ НА вирусов гриппа птиц с анти-

Таблица 10. *Антигенное сравнение между вирусами гриппа (H3N8) лошади 1963—1981 гг. выделения*

Вирус	Титры в реакции ингибиции гемагглютинации[1] с антисыворотками хорьков к:					
	Eq/Miami/1/63	Eq/Uruguay/1/63	Eq/Ky/1/76	Eq/Fontainebleu/1/79	Eq/Switz/2225/79	Eq/Ky/1/81
Eq/Miami/1/63	160	80	20	20	40	20
Eq/Urugauay/1/63	40	160	160	80	20	160
Eq/Ky/1/76	20	80	160	80	<20	40
Eq/Fontainebleu/1/79	40	160	320	160	20	80
Eq/Switz/2225/79	40	<20	<20	<20	80	<20
Eq/Ky/1/81	20	80	320	80	<20	160

[1] Н1 титр-обратная величина разведения сывороток, ингибирующего 4 гемагглютинирующие дозы вируса.

сыворотками хорька [39] или с моноклональными антителами [41] показывает, что многие различные штаммы циркулируют одновременно, но происходит только ограниченный антигенный дрейф. Серологический анализ вирусов гриппа животных и птиц показывает, таким образом, что антигенная вариация среди них менее об-

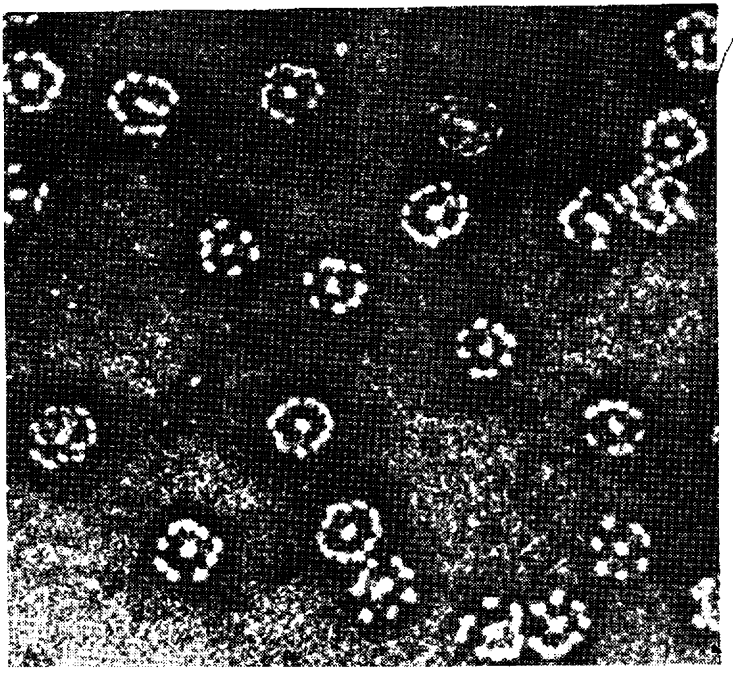
шире, чем среди штаммов вируса гриппа человека, и что множество вариантов может циркулировать одновременно.

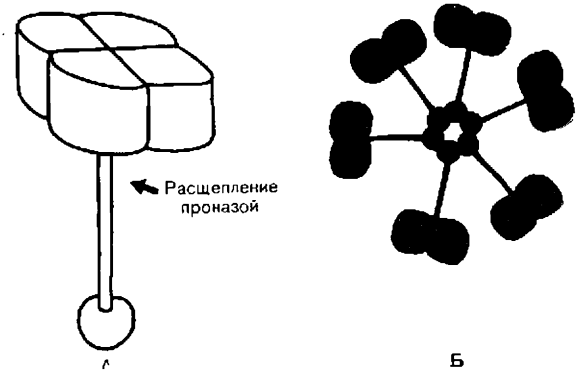
Сравнение последовательностей РНК НА вируса гриппа типа А указывает на то, что различия в пределах одного подтипа штаммов вируса гриппа человека и не имеющих отношения к человеку штаммов в общем <10% (см. рис. 28) [1]. Это предполагает, что степень мутаций в штаммах человека и животных одинакова. Почему же тогда штаммы вируса гриппа лошадей и птиц явно обнаруживают меньшую антигенную вариацию в серологических опытах? Причина может быть в том, что до настоящего времени были изучены только антигенно различающиеся одновременно циркулирующие штаммы. Ограниченная степень антигенной вариации, обнаруженная среди штаммов лошадей и птиц, и одновременная циркуляция множества вариантов подтипа — именно те черты, которые отличают эти вирусы от штаммов человека. Одно из возможных объяснений состоит в том, что имеется незначительный иммунопресс для селекции вариантов птиц и лошадей. Последние эксперименты на лошадях, проведенные G. Schild и соавт. (личное сообщение), указывают на то, что иммунный ответ у лошадей относительно кратковремен; циркулирующие антитела исчезают в течение нескольких месяцев. Среди различных видов птиц гуморальный иммунный ответ на инфекцию также непродолжителен [54], и каждую весну становится более доступной большая, не встречавшаяся ранее с инфекцией популяция восприимчивых животных. Остается загадкой факт сохранения множества штаммов подтипа вируса гриппа в период между ежегодными вспышками у птиц. Устанавливаются ли они в результате циркуляции в популяции, или они сохраняются в замороженном состоянии в воде в прудах, или же они интегрированы каким-то образом в систему хозяина? Независимо от механизма это явление имеет место в действительности, так как множество вариантов устанавливается на многие годы.

VI. Нейраминидаза

Молекула NA содержит одну цепь полипептида. Она существует в виде грибовидного шипа на поверхности вириона (см. рис. 20) и может играть кооперативную роль с НА, способствуя слиянию вирусной оболочки и клеточной мембраны в ранних стадиях инфекции [47]. Она имеет коробочкообразную головку из четырех копланарных и грубосферических субъединиц и прикрепленную по центру «ножку» с гидрофобным участком, которым она погружена в вирусную мембрану (рис. 26) [59, 126, 127]. Выступающая трехмерная кристаллическая структура [17] показывает, что NA представляет собой тетрамер.

Нейраминидаза погружена в вирусную мембрану своим N-концом, противоположно С-концевому прикреплению НА (см. рис. 21). Не происходит никакого посттрансляционного расщепле-





26. Электронная микрофотография и схема, показывающая молекулы освобожденной детергентом NA, из которых был удален детергент.

Молекулы NA агрегируют гидрофобным участком у конца «ножки», которая служит для прикрепления NA к липидному слою вирусной оболочки. Обработка вирусных частиц проназой освобождает головку NA, которая несет на себе энзиматические и антигенные свойства молекулы и в отдельных случаях может быть кристаллизована [электронная микрофотография выполнена N. Wrigley].

ная полипептида NA; не отщепляется сигнальный пептид и даже остается инициирующий метионин. Не происходит никаких процессов и на С-конце. С-терминальная последовательность — Мет-Про-Иле, предсказанная из последовательности гена, обнаруживается в интактных молекулах NA, выделенных из вируса, и в отщепленных проназой головках NA. За последовательностью шести полярных аминокислот на N-конце полипептида NA, которая полностью сохраняется по крайней мере у восьми различных подтипов NA, следует последовательность гидрофобных аминокислот, которая, возможно, представляет собой трансмембранный участок «ножки» NA. Эта последовательность неконсервативна для подтипов (в отличие от сохранения гидрофобности). Проназа отщепляет полипептид в указанных положениях (см. рис. 21, 26), отделяя «ножку» и освобождая энзиматически и антигенно активную головку NA, которая в ряде случаев может быть кристаллизована (см. рис. 27).

А. Антигенные вариации в нейраминидазе

В NA также имеют место антигенный шифт и антигенный дрейф: среди вирусов гриппа человека антигенный шифт происходил в 1957 г. с появлением подтипа H2N2 и заменой N1 на N2. Антигенный дрейф NA вирусов гриппа [18, 79, 89] коррелировал с различиями в последовательностях аминокислот [51, 61].

Частичные последовательности из 340 нуклеотидов 3′-конца гена NA были получены для представителей вирусов восьми из девяти подтипов NA [12]. Эти последовательности соответствовали участку, кодирующему N-терминальную часть NA, так как анализ триптических пептидов показал, что трансляция начинается с первого кодона АУГ, и что сигнальный пептид не отщепляется от N-конца [12]. Первые шесть аминокислот сохраняются во всех вирусах всех изученных подтипов и следующие шесть сохраняются в большинстве подтипов. Далее нуклеотид и предсказанные последовательности аминокислот восьми подтипов NA весьма существенно отличаются по гидрофобной последовательности включения в мембрану и по выступающей структуре «ножки». Делеции и/или включения коротких участков нуклеотидов в ген NA наблюдаются в пределах подтипов [13].

Были получены последовательности гена (и выведенные последовательности аминокислот) NA четырех штаммов N2 (Udorn/72, NT/60/68, UK/75 и RI/5+/57) и двух штаммов N1 (PR/8/34 и WSN). Общая гомология между последовательностями аминокислот N1 и N2 составила 39%.

Расщепленные проназой головки NA шести штаммов вируса гриппа типа А (подтипов H2N2 и H3N2), выделенные в 1957—1975 гг., были изучены с целью выявления изменений в последовательности аминокислот. 19 изменений, которые произошли за этот период, были локализованы в 469 остатках. Два участка молекулы NA не были изучены: остатки 188—210, которые были не-

растворимы, и остатки 1—73 (или 76), которые образовывали часть «ножки» NA и были отделены при расщеплении проназой.

Изменения последовательности были довольно ровно распределены по полипептиду NA, по все-таки при этом видны два четких кластера. Остатки в этих областях могут быть вовлечены в антигенные сайты на NA.

Б. Селекция вариантов нейраминидазы с моноклональными антителами

Антигенные варианты NA вируса гриппа A/Tokyo/3/67 (H2N2) были селекционированы при проведении одного пассажа вируса в куриных эмбрионах в присутствии моноклональных антител к NA. Варианты были отобраны с частотой $\sim 10^{-5}$ из клонированного вируса [116]. Частота выделения вариантов NA подобна частоте выделения вариантов HA [128]. Был селекционирован ряд вариантов и использован для построения экспериментальной карты молекулы NA методом сравнительного антигенного анализа мутантных вирусов с моноклональными антителами в ELISA и в тесте ингибиции нейраминидазной активности. Эти эксперименты подтвер-

Таблица 11. *Замещения аминокислоты в вариантах A/Tokyo/3/67 (H2N2) и их антигенная группировка*

Моноклональное антитело к N2 из:		Антигенные варианты		Антигенные группировки в соответствии с:		
	Реп	№ варианта	замещение аминокислоты	NI из ELISA	ингибиция активности фермента на нейраминил лактозе	конкурентный[3] радиоиммунотест
Tokyo/3/67	25/4	V1	Арг⟶Иле 344	Ia	+	1
	s 25/3	V1	Арг⟶Иле 344	Ia	+	1
	s 32/3	V1	Арг⟶Иле 344	Ia	+	1
	23/9	V2	Не определяли	Ib	+	1
	16/8	V1	» »	Ib	—	Не определяли
	s 10/1	V1	Лиз⟶Глу 368	Ia	—	2
Japan/305/57	113/2	V1	Не определяли	II	+	3
Texas/1/77	18/1	V1	Асн⟶Гис 221	III	Не определяли	Не определяли
	67/1	V1	Не определяли	III	» »	« «

Антигенные варианты селекционировали с моноклональными антителами [115] и замещения аминокислот были определены, как описано W. Laver и соавт. [64].

[2] Реакционная способность в тестах ингибиции активности NA в ELISA по R. Webster и соавт. [15].

[3] Реакционная способность по D. Jackson, R. Webster [50].

дили наличие по крайней мере трех неперекрывающихся антигенных сайтов на молекуле NA. Дальнейший анализ с использованием конкурентного радиоиммунотеста и ингибиции активности фермента различными отобранными по размеру субстратами показал, что антигенные сайты перекрываются [50], и что один антигенный сайт может быть подразделен на два участка, образуя, таким образом, общую область из четырех участков на молекуле NA (табл. 11). Все моноклональные антитела подавляли катализованный ферментом гидролиз сиаловой кислоты из фетуина (м.м. 50 000), но только моноклональные антитела в подгруппе 1 ингибировали ферментативную активность на N-ацетилнейраминиллактозе (м.м. 600).

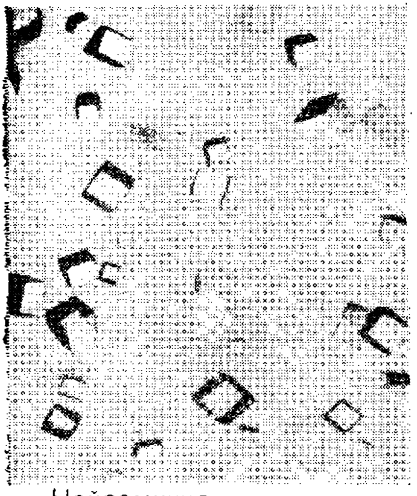
Головки NA семи таких вариантов штамма A/Tokyo/3/67, селекционированные с различными моноклональными антителами к NA, изучены с целью выявления изменений аминокислотных последовательностей. У четырех из них было обнаружено одно изменение последовательности (аргинин в положении 344 на изолейцин), в другом варианте остаток аспарагина в положении 221 заменился на гистидин, а в третьем лизин в положении 368 — на глутаминовую кислоту. Это последнее изменение произошло также в полевых штаммах, выделенных в 1972 и 1975 гг. В седьмом моноклональном варианте изменения не было обнаружено; оно могло быть расположено в нерастворимом участке.

Четыре моноклональных варианта с изменением в 344 остатке и вариант с изменением в 368 остатке были экспериментально сгруппированы в один антигенный участок. Кристаллографический анализ с использованием γ-лучей должен определить, располагаются ли эти участки молекулы близко друг от друга в трехмерной структуре.

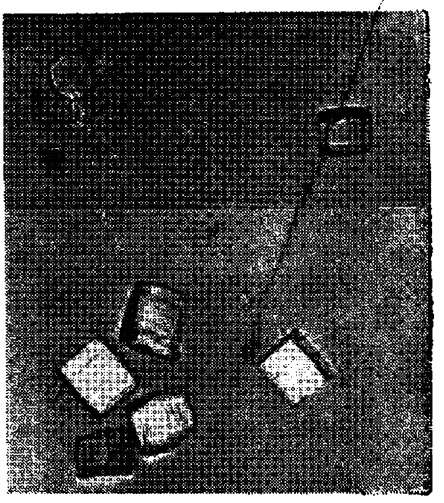
Нейраминидаза Tokyo/67 была кристаллизована и рассчитана карта ее электронной плотности при 0,31 нм. Изображение показало, что бо́льшие части молекулы располагаются в β-поверхностной структуре. Изображение полной цепи недавно было получено P. Colman (личное сообщение).

Fab — фрагмент моноклонального антитела к NA Tokyo/67 (S 10/1) — также был кристаллизован (рис. 27) и сейчас проводится анализ его структуры. S 10/1 Fab — кристаллы трехгранны, пространственная группа $P3_121$ с размерами ячейки a = 13,23 нм, c = 7,38 нм. Этот кристаллизованный фрагмент Fab образует комплекс с NA (м.м. 406 000 ± 20 000). Это свидетельствует, что четыре фрагмента Fab прикреплены к тетрамеру NA.

Для одного из вариантов, селекционированных с моноклональным антителом (S 10/1), было обнаружено изменение последовательности в положении 368: лизин был заменен глутаминовой кислотой (то же изменение произошло и в полевых штаммах 1972 г.). Головки NA этого варианта образуют изоморфные кристаллы по сравнению с кристаллами NA дикого типа (A/Tokyo/3/67). Результаты дифракционного анализа с использованием γ-лучей для кристаллов варианта были собраны и проанализированы P. Col-



Нейраминидаза
вируса Токио '3/67



Фрагмент Fab из моноклонального антитела (S 10/1)

27. Кристаллы для дифракционного анализа с использованием γ-лучевой головок NA вируса Tokyo/67 и фрагмента Fab моноклонального антитела (S10/1), которое связывается с NA.

Молекулы NA вариантного вируса, селекционированного в присутствии S10/1 моноклонального антитела с изменением последовательности в положении 368 лизина на глутаминовую кислоту также были кристаллизованы. NA варианта не связывается с антителом S10/1 и дифракционный анализ показывает, как изменение последовательности влияет на форму антигенного сайта [фотография кристаллов Fab любезно предоставлена P. Colman].

man (личное сообщение). Кристаллизация антигена и фрагмента Fab впервые представляет возможность построить карту комплементарных поверхностей комплекса антиген—антитело.

B. Антигенный дрейф в пейраминидазах вирусов гриппа типа А низших животных.

Относительно мала информация об антигенном дрейфе в NA вирусов гриппа животных и птиц. Известен антигенный дрейф среди вирусов гриппа свиней [52]. Анализ вирусов гриппа птиц с нейраминидазой N2 с использованием набора моноклональных антител к N2 человека показал, что все штаммы птиц были родственны штамму A/Japan/305/57 человека [116]. Некоторые антигенные вариации были различимы в штаммах N2 птиц, выделенных в 1965—1981 гг., но не было постепенного антигенного дрейфа, подобного тому, что обнаружено у штаммов вирусов гриппа человека. Результаты указывают на то, что множество различных штаммов того же подтипа существуют одновременно и персистируют в популяции птиц. Последовательности первых 200—300 нуклеотидов 5′-концов кДНК, транскрибированных с генов NA 20 вирусов птиц восьми из девяти подтипов NA, также не обнару-

жили заметного дрейфа во времени в пределах подтипов [14]. Это положение соответствует ситуации с НА в штаммах птиц в том плане, что одновременная циркуляция антигенно различающихся вариантов данного подтипа существенно затрудняет идентификацию антигенного дрейфа.

Г. Механизм антигенного дрейфа

Антигенный дрейф четко происходит при накоплении серий точечных мутаций, но поскольку изменения одной аминокислоты, обнаруженные в антигенных вариантах, отобранных с моноклональными антителами, в большинстве случаев незначительно влияют на антигенные свойства НА и NA при испытании с поликлональными антисыворотками, можно задать вопрос: как возникают в природе эпидемически потенциальные варианты? Антигенный анализ многих полевых изолятов H3N2 1969—1972 гг. выделения и 1979—1982 гг. выделения с моноклональными антителами к НА показывает, что циркулирующие в природе вирусы гетерогенны (неопубликованные данные). Много различных одновременно циркулирующих вариантов может быть определено в год эпидемии при использовании моноклонального антитела к НА [110]. Несколько полевых изолятов 1979—1982 гг. реагировали с набором моноклональных антител к НА штамма A/Bangkok/1/79 так же, как и селекционированные в лаборатории моноклональные варианты. Последние, а также полевые изоляты не различались со штаммом A/Bangkok/1/79 с постинфекционными антисыворотками хорьков.

Очевидно, что полевые изоляты с минорными антигенными изменениями циркулируют и вызывают заболевание, и что требуется изменение в каждом из четырех антигенных участков вирусов H3N2 [120] для получения эпидемически актуального вируса. Оказывается, что изменение в одном антигенном участке может быть достаточным для вируса, чтобы избежать нейтрализации и вызывать заболевание.

VII. Антигенный шифт

С момента выделения в 1933 г. первого вируса гриппа человека антигенные шифты вирусов гриппа типа А происходили в 1957 г., когда подтип H2N2 (азиатский грипп) заменил подтип H1N1, в 1968 г., когда появился вирус Hong Kong (H3N2), и в 1977 г., когда вновь появился вирус H1N1. Все эти основные антигенные шифты в вирусе происходили в Китае, и различные слухи подтверждают, что ранние эпидемии также начинались в этой стране. Антигенные шифты не были обнаружены у вирусов гриппа типа В.

А. Выводы из анализа последовательностей

Хотя мы до сих пор не знаем, каким образом новые подтипы возникают или появляются вновь в человеческой популяции, несколько соображений возникло из массы информации по последним данным секвенирования.

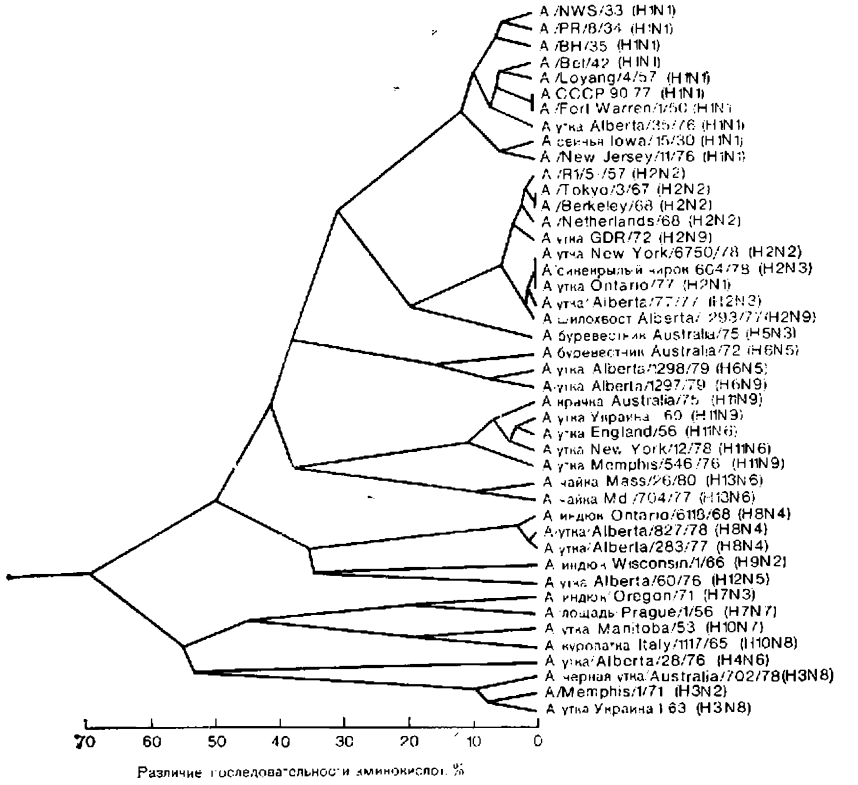
Полные последовательности аминокислот НА1 и НА2 были выведены из последовательностей копий клонированной ДНК генов для штаммов — представителей четырех различных подтипов НА вируса гриппа типа А: вируса чумы птиц (H7N7) [84], азиатского вируса (H2N2) [32], вируса PR8 и WSN (H1N1) [45, 124] и ряда штаммов подтипа H3N2 вируса Hong Kong [15, 103]. Последовательности НА двух штаммов А/утка/Украина/63 (H3N8) также были определены: одна — по данным секвенирования гена [25], другая — по данным прямого секвенирования белка [107]. Анализ полной последовательности белка известен только для штамма Н3 [23, 104, 105], хотя имеются достаточные данные по белку для штамма Н2, чтобы показать, где определяется сигнальный пептид, и где молекула расщепляется на НА1 и НА2. Результаты показывают также места расположения одной дисульфидной связи между НА1 и НА2. Бо́льшая часть потенциальных сайтов гликозилирования в НА имеет прикрепленный углевод.

Были определены последовательности 350 нуклеотидов от 3′-конца гена НА и предсказанных последовательностей аминокислот 32 вирусов гриппа типа А, включая и представителей каждого из 13 известных подтипов НА [1, 42]. Остатки цистеина и другие определенные аминокислоты сохраняются во всех последовательностях. Это указывает, что 13 подтипов НА происходят от общего прародителя, и что они имеют общую основную структуру. При парном сравнении частичных аминокислотных последовательностей наиболее удаленными друг от друга подтипами оказались Н1 и Н3 (25% гомология). Другие подтипы были похожи друг на друга: наибольшая гомология была обнаружена между Н2 и Н5 (80%). Связь между частичными последовательностями показана на дендрограмме (рис. 28).

Для штаммов в пределах одного подтипа различия в выведенной последовательности аминокислот в общем $<10\%$ [1], хотя различия в N-терминальном участке НА1 двух штаммов каждого из Н7 и Н10 вирусов близки к 20% — величине, практически равной различию между последовательностями аминокислот двух ближайших подтипов (Н2 и Н5).

Результаты секвенирования для различных подтипов NA также могут быть суммированы. Из копий кДНК гена, клонированного в E. coli, получали полные последовательности для N1 штаммов PR/8/34 [26] и WSN/33 [46] и N2 штаммов A/Udorn/72 [68], NT/60/68 [82] и R1/5′/57 [C. Ward, личное сообщение].

Для других подтипов NA имеются данные только о первых 200—300 нуклеотидах с 5′-конца кДНК [12]. Предсказанные по-



28. Дендрограмма, показывающая связь между N-терминальными последовательностями аминокислот HA1, выведенными из геномных последовательностей вирусов, представляющих 13 известных подтипов.

Последовательности были выстроены в ряд с использованием аминокислот, которые не изменяются в определенных положениях для всех последовательностей (положение аминокислоты от N-конца большинства подтипов: Цис 4, Гли 6, Тре 18, Вал 26, Цис 42, Цис 55, Гли 63, Про 65, Цис 67, Глу 81). Различия последовательности всех попарных сравнений выстроенных последовательностей в процентах, начиная с N-терминального Асп или соответствующей аминокислоты, были использованы для расчета дендрограммы. Таким образом, места расположения каждого разветвления в дендрограмме указывают основное различие последовательности для связанных через эту точку последовательностей.

следовательности аминокислот показывают, что N-терминальные последовательности шести аминокислот NA сохраняются по крайней мере в восьми подтипах. Следующие шесть сохраняются в большинстве подтипов. Далее в последовательностях включения в участке «ножки» обнаруживаются неожиданные вариации и гомологии между подтипами не выявляется. В участке «головки» штаммов N1 и N2 обнаруживается значительная гомология. Это предполагает, что имеется некая общая структура, как и в случае с HA. Для выяснения связи между подтипами NA требуются данные по участкам «головки» других подтипов.

Б. Возможные механизмы шифтов в штаммах вируса гриппа человека

Признавая возможным, что вирусы H2 могли со временем мутировать в H5, быстрое их изменение в H3 должно было происходить более резким образом. Как же именно могло произойти, что H3 заменил H2 в человеческой популяции в 1968 г.? Этот «новый» вирус гриппа мог произойти из вирусов гриппа животных или птиц в результате генетической пересортировки. Есть достаточное свидетельство в пользу генетической пересортировки между вирусами гриппа типа А человека и низших животных in vivo [109], и последние опыты W. Bean, J. Young и P. Palese [6, 129] доказывают существование пересортировки среди штаммов вируса гриппа человека. Штамм Hong Kong (H3N2) вируса гриппа человека является реассортантом [60, 93]. Этот вирус содержит NA (и все другие гены) из азиатского штамма (H2N2) вируса гриппа человека и HA, который антигенно родствен HA штаммов A/утка/Украина/63 (H3N8) и A/лошадь/2/Miami/63 (H3N8) [25, 106]. Гомология последовательности аминокислот между HA штаммов A/утка/Украина/63 и A/Aichi/2/68 (оба подтипа H3) составила 96%. Неизвестно, от какого вируса гриппа — животных или птиц — был заимствован ген HA во время рекомбинации, которая привела к образованию штамма Hong Kong. Вирус, от которого был заимствован HA, мог быть вирусом, содержавшим HA штамма Hong Kong, который в свою очередь персистировал неизменённым после эпидемии 1900 г. Возможно, что вирусы, подобные вирусам лошадей (H3N8) и утка/Украина (H3N8), эволюционировали от эпидемического штамма 1900 г.

Во-вторых, «новый» вирус мог вызвать эпидемию среди людей намного раньше и мог оставаться замаскированным и неизменённым в некотором резервуаре до настоящего времени. Это было доказано следующим. Штамм «русского гриппа» (H1N1), который появился вновь в провинции Аньшань (Северный Китай) в мае 1977 г. и впоследствии распространился на остальную часть света, казалось, был идентичен по всем генам вирусу, который вызвал эпидемию гриппа в 1950 г. [73, 93]. Где находился этот вирус в течение 27 лет?

В качестве возможных вариантов объяснений может быть и сохранение вируса либо в замороженном состоянии, либо в резервуаре животных или сохранение в интегрированной, но еще неопределенной форме, в генетическом материале человека или низших животных. Первый из этих вариантов был молча принят некоторыми исследователями в основном из-за отсутствия убедительной альтернативы. Вариант резервуара животных представляет возможность для вирусов H3N2, поскольку они были обнаружены среди свиней через много лет после их исчезновения среди людей [95]. Трудность этого варианта в том, что РНК вирусов гриппа свиней и птиц очень гетерогенны [38, 77]. Это делает маловероятным тот факт, что штамм человека мог сохраниться по всем

генам в течение многих лет. Отсутствие антигенного дрейфа в течение ряда лет также было трудно объяснить. Нет доказательства в пользу интеграции генетического материала вируса гриппа в геном хозяина, хотя в исключительных обстоятельствах совместной инфекции вирусом с обратной транскриптазой это может произойти.

Третий путь возможного появления вирусов в популяции людей осуществим, если вирус животных или птиц становится инфекционным для человека. Это может произойти путем мутации, но число требуемых мутаций и генов, в которых это должно произойти, неизвестно. Периодическая трансмиссия вирусов гриппа свиньи людям, очевидно, происходит. Свидетельство тому — вспышка гриппа среди солдат в Форт-Дикс и выделение действительно идентичных вирусов от свиней и людей на одной и той же ферме в Висконсине [38]. Бóльшая часть этих трансмиссий представляет собой «тупик» в том плане, что вирусы имеют незначительную или не обладают совсем способностью передаваться при контакте между людьми и вызывать эпидемию. Однако гибельный пандемический вирус 1918—1919 гг. обладал этим свойством.

Возможно, каждый из этих механизмов действовал в какое-нибудь время и вызывал «главный шифт» вирусов гриппа, инфицирующих людей. Неизвестно еще, как возникают различные подтипы вируса гриппа типа А, но есть основание полагать, что все время происходит «перемещение» генов между вирусами гриппа типа А, причем чаще всего у птиц [39, 40], но и у млекопитающих, включая человека [6, 129].

В. Антигенный шифт среди вирусов гриппа низших животных

Тюлени. Хотя появление вируса гриппа среди тюленей, возможно, произошло вследствие вариации круга хозяев, этот факт имел важное биологическое значение, поскольку он показывает, как могут появиться новые пандемические штаммы. В 1979—1980 гг. около 20% популяции обыкновенных тюленей (Phoca vitulina) Северного побережья США погибло от острой респираторной инфекции, сопровождаемой уплотнением легких, типичным для первичной вирусной пневмонии [29]. Частицы вируса гриппа обнаруживали в высоких концентрациях в легких и мозге мертвых тюленей. Антигенный анализ показал, что этот вирус был близкородствен вирусу чумы птиц (A/FPV/Dutch/27) (H7N7), высоколетальному вирусу гриппа кур, ранее не обнаруживаемому у млекопитающих [114]. Анализ РНК вируса тюленей методом конкурентной РНК-РНК-гибридизации показал, что все гены были очень близки соответствующим генам различных штаммов вируса гриппа птиц. Неизвестно, однако, возник ли этот вирус при трансмиссии от птиц или просто ранее никогда не обнаруживали грипп у тюленей. Серологическая и биологическая информация говорит в пользу последнего объяснения: не было получено серологического

доказательства существования гриппа тюленей, за исключением перенесших грипп животных на побережье Новой Англии, и с 1980 г. не было более сообщений о выделении этого вируса от тюленей [J. Geraci, личное сообщение].

Штамм А/тюлень/Mass/1/80 (H7N7) вируса гриппа служит первым доказательством того, что изолят, заимствовавший все свои гены от одного или более вирусов гриппа птиц, может быть связан с тяжелым заболеванием в популяции млекопитающих в природе. Остается выяснить, представляет ли это нарушение специфичности видов уникальное событие в эволюции вируса гриппа, но сам факт возможности такого события вызывает в свою очередь представление о возможности прямого происхождения вирусов гриппа человека и животных из штаммов птиц. Если это произойдет среди людей вместо тюленей, возникшая пандемия может быть подобна пандемии 1918—1919 гг.

Другие животные. Поскольку представители каждого из известных подтипов вирусов гриппа типа А циркулируют одновременно среди птичьих видов (см. табл. 6), антигенный шифт там не может быть выявлен. Без сомнения, генетическая пересортировка между вирусами гриппа типа А представляет собой обычное явление для штаммов птиц [22, 39], и почти все изоляты данного подтипа генетически различны [98].

Хотя два разных подтипа вирусов гриппа циркулируют одновременно среди лошадей (см. табл. 6), доказательства в пользу генетической пересортировки между этими вирусами нет. Среди свиней, где персистируют вирусы гриппа свиней (H1N1) и либо персистируют, либо периодически вводятся людьми вирусы гриппа типа H3N2, недавно были обнаружены в Японии реассортанты с H1N2 (Hsw1N2) [99]. Выделение вирусов показывает, что антигенный шифт может происходить в вирусе гриппа в свиньях, но в настоящее время нет доказательства, что этот вирус стал эпидемическим штаммом.

VIII. Вариация в нуклеопротеиде

Нуклеопротеид (NP) — один из группоспецифических антигенов вируса гриппа, который отличается для вирусов гриппа типов А, В и С. Он, возможно, составляет основу спирального внутреннего комплекса, который связан с сегментами РНК и тремя различными полимеразами.

Ген NP штамма A/PR/8/34 длиной в 1565 нуклеотидов способен кодировать белок из 498 остатков аминокислот (м.м. 56 106), богатых аргинином [123]. Тесты с двойной иммунодиффузией выявили антигенные различия между NP штаммов H1N1 и H3N2 [91]. Опыты с моноклональными антителами к NP вирусов A/WSN/33 (H1N1) показали, что антигенная вариация происходит именно в этой молекуле [101]. Молекула NP имеет по крайней мере три неперекрывающихся антигенных участка, один из кото-

рых одинаков во всех изученных штаммах. Моноклональные антитела к этой сохраненной области ингибируют транскрипцию in vitro вирусной РНК, предполагая, таким образом, что этот участок NP вовлечен в транскрипцию РНК [102].

Генетический анализ большого числа штаммов вируса гриппа методом конкурентной РНК-РНК-гибридизации обнаружил, что гены NP каждого из этих вирусов могут быть помещены в одну из пяти различных группировок NP [W. Bean, личное сообщение]. Все штаммы птиц попадают в две группы, штаммы лошадей образуют две другие группы, и одна группа содержит все штаммы вирусов гриппа человека и свиньи. Это ограничение групп генов, генетически родственных NP для вирусов, инфицирующих определенные виды, предполагает, что этот белок может играть роль в определении видовой специфичности.

IX. Вариация в матриксном белке

Были определены полная последовательность сегмента 7 (M) РНК двух штаммов — A/PR/8/34 (H1N1) [2, 122] и A/Udorn/72 (H3N2) [57], а также частичные последовательности ряда штаммов [35]. Вслед за первым кодоном АУГ в плюс-цепи кодируется белок 252 остатка, гидрофобный и богатый аргинином. Структуры триптических пептидов из очищенного белка M штамма PR8 [35] хорошо соответствовали ожидаемым из последовательности аминокислот, предсказанной по последовательности гена.

Как показало сравнение последовательностей сегмента 7 РНК штаммов подтипа H3N2 (Udorn) и H1N1 (PR8), последовательности, кодирующие белки M этих вирусов, выделенных 38 лет назад, высококонсервативны [57], что совпадало с результатами антигенных опытов [90]. Сравнение 230 нуклеотидов сегмента 7 РНК из пяти штаммов H1N1, H2N2 и H3N2 человека, выделенных за 43-летний период, предполагает, что тот же сегмент 7 был сохранен в процессе антигенных шифтов типов HA и NA (H1N1 к H2N2, к H3N2) [35]. Кроме того, полные последовательности содержат вторую открытую рамку считывания, которая перекрывает последовательность белка M 68 нуклеотидами.

Были выделены три мРНК, транскрибируемые с сегмента 7 РНК. Одна (M1 мРНК) состоит из непрерванной практически полной по длине копии сегмента 7 РНК и ответственна за продукцию белка M. Белок M2 вырабатывается из сплайсированного продукта M1 мРНК таким образом, что за нуклеотидами, кодирующими девять N-терминальных аминокислот, около 600 нуклеотидов сплайсированы, и рамка считывания меняется; белковый продукт, соответствующий этой рамке считывания был идентифицирован в инфицированных клетках [56]. Кроме того, была обнаружена третья мРНК, которая может кодировать только пептид 8-го остатка, идентичный C-концу M1 [58]. Такой продукт еще не был выделен.

Эксперименты с набором моноклональных антител к белку M1 штамма A/WSN/33 (H1N1) указывают на то, что на этой молекуле имеются четыре антигенных сайта [K. Van Wyke, личное сообщение], и что антигенные различия могут быть выявлены как в пределах подтипа, так и между подтипами.

X. Вариация в неструктурных белках

Последние опыты показали, что сегмент 8 РНК кодирует по крайней мере два неструктурных полипептида — NS1 и NS2, которые транслируются с отдельных мРНК [48, 55, 85]. Картирование и секвенирование показали, что NS1 и NS2 перекрываются 70 аминокислотами, которые транслируются с различных рамок считывания. Полипептиды NS1 и NS2 разделяют между собой девять аминокислот на их N-концах, но после этой последовательности мРНК для NS2 имеет делецию из 423 нуклеотидов. Затем остальная мРНК вновь объединяется в +1 рамке считывания. Функция NS1 или NS2 еще не установлена. NS1 производится в больших количествах и накапливается в ядре [65]; NS2 производится в последней стадии инфекции и обнаруживается в основном в цитоплазме [55, 67].

Поскольку NS1 и NS2 — внутренние белки инфицированных клеток и поэтому менее доступны для антител, следовало ожидать, что у них выявится меньшая вариация последовательностей, чем у поверхностных гликопротеидов (HA и NA). Соответственно сравнение последовательностей генов NS вируса чумы птиц [85] и двух штаммов вируса гриппа человека — A/Udorn/72 (H3N2) и A/PR/8/34 — показало только 8—11% различий [3, 55, 124]. Открытая рамка считывания, потенциально кодирующая полипептид, была замечена в некодирующей вирионной РНК генов NS штаммов A/PR/8/34, Udorn/72 и FPV, но не обнаруживается в гене NS штамма утка/Alberta/60/76 [4]. Протеин, соответствующий этому экстра-«гену», не был еще идентифицирован.

Было обнаружено, что белок NS1 очень гетерогенен в отношении заряда и фосфорилирования [82]. Степень фосфорилирования является характеристикой определенных подтипов. Антигенный анализ продуктов NS1 различных подтипов с использованием поликлональных антисывороток показал значительную кроссреактивность между всеми вирусами гриппа типа A, но постепенный антигенный дрейф был выявлен в конкурентном радиоиммунотесте [94].

XI. Вариации в белках полимеразы

Три наибольших белка вириона (PB1, PB2, PA) с м.м. 96 000, 87 000 и 85 000 соответственно связаны с NP и вирионной РНК и обладают транскриптазной активностью [9], которая транскриби-

рует вторгающуюся вирусную РНК [5]. Белки PB1 и PB2, вероятно, необходимы для синтеза комплементарной РНК, а PA и NP — для синтеза вирионной РНК [78]. На сегодня нет известных данных об антигенной вариации в белках Р.

Транскрипция сегментов вирусной РНК вскоре после инфекции заканчивается 40 нуклеотидами, не доходя до 5′-конца с образованием мРНК [36]; эти мРНК несут структуру кэпа и гетерогенную последовательность 10—13 нуклеотидов, полученных из клеточных мРНК на их 5′-конце [83]. Поздние транскрипты имеют полную длину и действуют как матрицы для синтеза генов потомства вируса. Были определены полные последовательности нуклеотидов трех генов полимеразы штамма A/PR/8/34 [27] и по крайней мере две — для генов Р штамма A/NT/60/68 [10]. Степень вариации в генах полимеразы неизвестна, хотя они могут играть важную роль в круге хозяев и вирулентности.

Дефектные интерферирующие частицы (ДИ) вируса гриппа генерируются пассажами с высокой множественностью заражения в пермиссивных клетках. Эти частицы интересны тем, что они облегчают установление персистентной инфекции в культурах клеток и могут, таким образом, вызывать латентность. Они содержат молекулы маленьких РНК, которые отсутствуют в инфекционном вирусе и генерируются предпочтительнее массовой внутренней делецией из трех генов Р [74, 75], хотя клонированная ДНК одной малой РНК оказывается составленной из нескольких сегментов по крайней мере двух генов полимеразы [27, 70].

XII. Каково будущее?

Последние данные изучения структуры генов и генных продуктов вирусов гриппа, а также информация, полученная при использовании моноклональных антител, позволили получить несколько важных сведений о поведении этого вируса. Например, ясно, что антигенный шифт не происходит вследствие прямой мутации одного подтипа в другой, в то время как антигенный дрейф осуществляется в результате точечных мутаций в генах. Однако частота мутаций поверхностных белков не превышает существенно соответствующую величину для внутренних белков. НА имеет по крайней мере четыре различающихся антигенных сайта, которые могут варьировать независимо, с патогенностью, зависящей частично от последовательности в НА, где происходит расщепление. Некоторые сегменты РНК имеют перекрывающиеся гены, использующие две рамки считывания. Результаты секвенирования подтверждают антигенную классификацию подтипов НА и NA.

Однако остается много и неразрешенных вопросов. Шифты могут происходить в результате появления вирусов, которые раньше вызывали эпидемии и остались неизменными, как бы замороженными в течение многих лет. Однако, где эти вирусы скрывались и что побудило их появиться вновь, остается неизвестным.

Шифты могут также происходить вследствие генетической пересортировки вирусов гриппа человека и животных или вследствие такой мутации вирусов животных или птиц, что он становится способным инфицировать людей. Большинство подтипов вируса гриппа типа А обнаруживают у птиц, но их роль в возникновении (или повторном появлении) новых подтипов у человека неясна; не выяснено также, почему шифты практически всегда происходят в Китае, или почему старые подтипы обычно исчезают в популяции людей, как только начинается пандемия, вызванная новым вирусом. С другой стороны, подтип Hong Kong не исчез, когда начался «русский грипп», и мы не знаем, почему это произошло.

Без ответа остались также вопросы о происхождении новых пандемических штаммов вируса гриппа и о молекулярных основах антигенной вариации [116]. Почему антигенный дрейф происходит среди вирусов гриппа, а, например, не среди парамиксовирусов, таких, как вирус кори, где антигенные варианты могут быть селекционированы in vitro с моноклональными антителами с той же частотой, как и для вируса гриппа [8, 86]? Почему однажды наблюдается явление «первородного антигенного греха» [28], при котором вирус предпочтительнее может вызывать выработку антител против предыдущего штамма, который с тех пор исчез? Наряду с антигенной вариацией вариация в круге хозяев, вирулентности и трансмиссибельности сильно влияет на тяжесть заболевания и распространение эпидемий. Возможно, появится новый вирус, который вызовет тот же уровень смертности, что и эпидемия, вызванная свиным вирусом гриппа в 1918 г. Что влияет на распространение вируса гриппа, и почему эпидемии обычно возникают зимой, колеблясь, таким образом, между северным и южным полушариями? Неясно также, почему эпидемии самоограничивающие даже в условиях достаточного числа доступных хозяев.

Сейчас, однако, лучше решена проблема контроля над гриппом. Эффективные и безвредные живые вакцины в будущем могут быть приготовлены с использованием современных методов генной инженерии. Возможно и применение синтетических вакцин там, где антигены достаточно хорошо очищены и пригодны для приготовления вакцин и их введения в достаточно больших дозах, чтобы быть эффективными, и сконструированных таким образом, что они не индуцируют «первородный антигенный грех». Реально создание универсальной вакцины, которая защищает от всех представителей подтипа вируса или даже перекрестно от представителей другого подтипа. Заслуживает внимания и поиск путей усиления клеточного и гуморального иммунного ответа.

Благодаря наличию информации об известной трехмерной структуре по крайней мере одной молекулы НА и об экспериментально определенных сайтах связывания антигена и рецептора открывается путь синтеза вакцин, содержащих ключевые сегменты молекул НА. Антигенные детерминанты НА могут быть определены в E. coli, трансформированной с плазмидой, несущей клонированный ген НА [21, 24, 37], и значительные количества НА

появляются на поверхностях клеток эукариотов, инфицированных вектором вируса обезьян (SV40), содержащего ген НА [33, 100]. Эти эксперименты открывают дорогу использованию направленного сайтом мутагенеза для приготовления НА удачной синтетической и, возможно, универсальной вакцины.

Знание структуры молекулы НА делает возможным химический синтез пептидов для их использования в качестве вакцин [34, 49, 72]. Многие пептиды антигенны при связывании с белками-носителями, но, как известно на сегодня, эти синтетические пептиды не индуцируют достаточной защиты против вируса гриппа при разрешении in vivo. Потенциальные возможности таких вакцин явно существуют, так как клеточно-опосредованные эксперименты указывают на существование перекрестно реагирующих детерминант между подтипами вируса гриппа типа А.

Каковы же планы на ближайшее будущее? Мы не знаем, надвигается ли новый антигенный шифт. И если вдруг появится новый вирус, можно ли по данным о структуре вируса определить место его возникновения? Новый вирус может и не обладать способностью вызывать летальные исходы у людей до такой же степени, до какой последний вирус гриппа тюленей вызывал у тюленей летальные исходы, но если он будет способен на это, маловероятно, что мы сможем остановить массовое опустошение в мировом масштабе, вызванное этим вирусом. Если же шифт не происходит, что произойдет с циркулирующими в настоящее время штаммами H3N2 и H1N1? Будут ли они продолжать дрейфовать или они достигли своих границ? Нет сомнения в том, что лучшее понимание молекулярной биологии и генетики вируса гриппа внесет существенный вклад в обобщение имеющихся данных для разрешения проблемы гриппа.

Список литературы

1. *Air G.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 7639—7643.
2. *Allen H., McCauley J., Waterfield M., Gething M.* — Virology, 1980, v. 107, p. 548—551.
3. *Baez M., Taussig R., Zazra J. et al.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 5845—5858.
4. *Baez M., Zazra J., Elliott R. et al.* — Virology, 1981, v. 113, p. 397—402.
5. *Bean W., Simpson R.* — Virology, 1973, v. 56, p. 646—651.
6. *Bean W., Cox N., Kendal A.* — Nature, 1980, v. 284, p. 638—640.
7. *Bentley D., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 5033—5042.
8. *Birrer M., Udem S., Nathenson S., Bloom B.* — Nature, 1981, v. 293, p. 67—69.
9. *Bishop D., Roy P., Bean W., Simpson R.* — J. Virol., 1972, v. 10, p. 689—697.
10. *Bishop D., Huddleston J., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 1335—1343.
11. *Blok J.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y.: Academic Press, 1981, p. 45—54.
12. *Blok J., Air G.* — Biochemistry, 1982, v. 21, p. 4001—4007.
13. *Blok J., Air G.* — Virology, 1982, v. 118, p. 229—234.

14. *Blok J., Air H.* — Virology, 1982, v. 121, p. 211—229.
15. *Both G., Sleigh M.* — J. Virol., 1981, v. 39, p. 663—672.
16. *Caton A., Brownlee G., Yewdell J., Gerhard W.* — Cell, 1982, v. 31, p. 417—427.
17. *Colman P., Laver W.* — In: Proc., 17th Conf. Structural Aspects of Recognition and Assembly in Biological Macromolecules. Jerusalem, 1981, p. 869—872.
18. *Curry R., Brown J., Baker F., Hobson D.* — J. Hyg., 1974, v. 72, p. 197—204.
19. *Davenport F., Hennessy A., Francis T.* — J. Exp. Med., 1953, v. 98, p. 641—656.
20. *Davenport F., Hennessy A., Drescher J., Webster R.* — In: Ciba Symp. on Cellular Asp. of Myxovirus Infect., 1964, p. 272—287.
21. *Davis A., Nayak D., Ueda M. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci., USA, 1981, v. 78, p. 5376—5380.
22. *Desselberger U., Nakajima K., Alfino P. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 3343—3345.
23. *Dopheide T., Ward C.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus. North-Holland/Elsevier, 1980, p. 21—26.
24. *Emtage J., Tacon W., Catlin G. et al.*—Nature, 1980, v. 283, p. 171—174.
25. *Fang R., Min Jou W., Huylebroeck D., Devos R., Fiers W.* — Cell, 1981, v. 25, p. 315—323.
26. *Fields S., Winter C., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 290, p. 213—217.
27. *Fields S., Winter G.* — Cell, 1982, v. 28, p. 303—313.
28. *Francis T.* — Proc. Am. Phil. Soc., 1960, v. 104, p. 572.
29. *Geraci J., St. Aubin D., Barker I. et al.* Science, 1982, v. 215, p. 1129—1131.
30. *Gerhard W., Yewdell J., Frankel M., Webster R.* — Nature, 1981, v. 290, p. 713—717.
31. *Gething M., White J., Waterfield M.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 2737—2740.
32. *Gething M., Bye J., Skehel J., Wakefield M.* — Nature, 1980, v. 287, p. 301—306.
33. *Gething M., Sambrook J.* — Nature, 1981, v. 293, p. 620—625.
34. *Green N., Alexander H., Olson A. et al.* — Cell, 1982, v. 28, p. 477—487.
35. *Hall R., Air G.* — J. Virol., 1981, v. 38, p. 1—7.
36. *Hay A., Skehel J.* — In: Basic and Applied Influenza Research. CRC Press, 1982, p. 105—118.
37. *Heiland I., Gething M.* — Nature, 1981, v. 292, p. 851—852.
38. *Hinshaw V., Bean W., Webster R., Easterday B.* — Virology, 1978, v. 84, p. 51—62.
39. *Hinshaw V., Bean W., Webster R., Sriram G.* — Virology, 1980, v. 102, p. 412—419.
40. *Hinshaw V., Webster R., Turner B.* — Can. J. Micro., 1980, v. 26, p. 622—629.
41. *Hinshaw V., Webster R., Bean W., Sriram G.* — Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 1981, v. 3, p. 155—164.
42. *Hinshaw V., Air G., Gibbs A. et al.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 865—872.
43. *Hinshaw V., Naeve C., Webster R. et al.* — Bull. Wld Hlth Org., 1983, v. 61, p. 153—158.
44. *Hirsch A.* — Handbook of Geographical and Historical Pathology. Vol. 1, 7. London, 1883.
45. *Hiti A., Davis A., Nayak D.* — Virology, 1981, v. 111, p. 113—124.
46. *Hiti A., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 41, p. 730—734.
47. *Huang R., Rott R., Klenk H.* — Virology, 1981, v. 110, p. 243—247.
48. *Inglis S., Barrett T., Brown C., Almond J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 3790—3794.
49. *Jackson D., Murray J., White D. et al.* — Virology, 1982, v. 120, p. 273—276.
50. *Jackson D., Webster R.* — Virology, 1982, v. 123, p. 69—77.

51. *Kendal A., Kiley M.* — J. Virol., 1973, v. 12, p. 1482—1490.
52. *Kendal A., Noble G., Dowdle W.* — Virology, 1977, v. 82, p. 111—121.
53. *Kendal A., Cox N., Nakajima S. et al.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y., 1981, v. XXI, p. 489—504.
54. *Kida H., Yanagawa R., Matsuoka Y.* — Infect. Immun., 1980, v. 30, p. 547—553.
55. *Lamb R., Lai C.* — Cell, 1980, v. 21, p. 475—485.
56. *Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1981, v. 112, p. 729—737.
57. *Lamb R., Lai C.* — Virology, 1981, v. 112, p. 746—751.
58. *Lamb R., Lai C., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 4170—4174.
59. *Laver W., Valentine R* — Virology, 1969, v. 38, p. 105—110.
60. *Laver W., Webster R.* — Virology, 1973, v. 51, p. 383—391.
61. *Laver W.* — Virology, 1978, v. 86, p. 78—87.
62. *Laver W., Air G., Webster R. et al.* — Virology, 1979, v. 98, p. 226—237.
63. *Laver W., Air G., Webster R.* — J. Mol. Biol., 1981, v. 145, p. 339—361.
64. *Laver W., Air G., Webster R., Markoff L.* — Virology, 1982, v. 112, p. 450—460.
65. *Lazarowitz S., Compans R., Choppin P.* — Virology, 1971, v. 46, p. 830—843.
66. *Maeda T., Ohnoshi S.* — FEBS Lett, 1980, v. 122, p. 283—287.
67. *Mahy B. Barrett T., Briedis D. et al.* — Phil. Trans. R. Soc., 1980, v. 288, p. 349—357.
68. *Markoff L, Lai C.-J.* — Virology, 1982, v. 119, p. 288—297.
69. *Masurel N.* — Nature, 1968, v. 218, p. 100—101.
70. *Moss B., Brownlee G.* — Nucl, Acids Res., 1981, v. 9, p. 1941—1947.
71. *Mulder J., Masurel N.* — Lancet, 1958, v. 1, p. 810—814.
72. *Müller G., Shapira M., Arnon R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 569—573.
73. *Nakajima K., Desselberger U., Palese P.* — Nature, 1978, v. 274, p. 334—339.
74. *Nakajima K., Ueda M., Sugiura A.* — J. Virol., 1979, v. 29, p. 1142—1148.
75. *Nayak D.* — Ann. Rev. Microbiol., 1980, v. 34, p. 619—644.
76. *Noble G.* — In: Basic and Applied Influenza Research. CRC Press, 1982, p. 11—50.
77. *Palese P., Ritchey M.* — Develop. Biol. Stand., 1977, v. 39, p. 411—414.
78. *Palese P., Ritchey M.* — Virology, 1977, v. 78, p. 183—191.
79. *Paniker C.* — J. Gen. Virol., 1968, v. 2, p. 385—394.
80. *Pereira H.* — Progr. Med. Virol., 1969, v. 11, p. 46—79.
81. *Pereira M.* — Brit. Med. Bull., 1979, v. 35, p. 9—14.
82. *Petri T., Patterson S., Dimmock N.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 61, p. 217—231.
83. *Plotch S., Bouloy M., Krug R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 1618—1622.
84. *Porter A., Berber C., Carey N. et al.* — Nature, 1979, v. 282, p. 471—477.
85. *Porter A., Smith J., Emtage J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 5074—5078.
86. *Portner A., Webster R., Bean W.* — Virology, 1980, v. 104, p. 235—238.
87. *Russ G., Gerhard W., Laver W.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y.: Academic Press, 1981, v. XXI, p. 297—307.
88. *Scheid A., Choppin P.* — Virology, 1977, v. 80, p. 54—66.
89. *Schild G., Newman R.* — Bull. Wld Hlth Org., 1969, v. 41, p. 437—445.
90. *Schild G.* — J. Gen. Virol., 1972, v. 15, p. 99—103.
91. *Schild G., Oxford J., Newman R.* — Virology, 1979, v. 93, p. 569—573.
92. *Scholtissek C., Ronde W., Harms E., Rott R.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. London, 1978, p. 19—25.
93. *Scholtissek C., van Hoyningen V., Rott R.* — Virology, 1978, v. 89, p. 613.
94. *Shaw M., Lamon E., Compans R.* — J. Exp. Med., 1982, v. 156, p. 243—254.
95. *Shortridge K., Webster R., Butterfield W., Campbell C.* — Science, 1977, v. 196, p. 1454—1455.

96. *Skehel J., Waterfield M.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 93—97.
97. *Skehel J., Bayley P., Brown E. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 968—972.
98. *Sriam G., Bean W., Hinshaw V. et al.* — Virology, 1980, v. 105, p. 592—599.
99. *Sugimura T., Yonemochi H., Tanaka Y. et al.* — Arch. Virol., 1980, v. 66, p. 271—274.
100. *Sveda M., Lai C.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 5488—5492.
101. *Van Wyke K., Hinshaw V., Bean W., Webster R.* — J. Virol., 1980, v. 35, p. 24—30.
102. *Van Wyke K., Bean W., Webster R.* — J. Virol., 1981, v. 39, p. 313—317.
103. *Verhoeyen M., Fang R., Min Jou W. et al.* — Nature, 1980, v. 286, p. 771—776.
104. *Ward C., Dopheide T.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus. North-Holland/Elsevier, 1980, p. 27—38.
105. *Ward C.* — Curr. Topics Microbiol. Immunol., 1981, v. 94/95, p. 1—74.
106. *Ward C., Dopheide T.* — Biochem. J., 1981, v. 193, p. 953—962.
107. *Ward C., Dopheide T.* — In: Genetic Variation among Influenza Viruses. V. XXI. N. Y.: Academic Press, 1982, p. 323—340.
108. *Webster N.* — A Brief History of Epidemic and Pestilental Diseases. Vol. 2, Sec. 12, 39. London, 1800.
109. *Webster R., Campbell C., Granoff A.* — Virology, 1971, v. 44, p. 317—328.
110. *Webster R., Kendal P., Gerhard W.* — Virology, 1979, v. 96, p. 258—264.
111. *Webster R., Laver W.* — Virology, 1980, v. 104, p. 139—148.
112. *Webster R., Berton M.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 54, p. 243—251.
113. *Webster R., Hinshaw V., Bean W. et al.* — Virology, 1981, v. 113, p. 712—724.
114. *Webster R., Hinshaw V., Berton M. et al.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. V. XXI. N. Y.: Academic Press, 1981, p. 309—322.
115. *Webster R., Hinshaw V., Laver W.* — Virology, 1982, v. 117, p. 93—104.
116. *Webster R., Laver W., Air G., Schild G.* — Nature, 1982, v. 296, p. 115—121.
117. *Webster R., Brown L., Jackson D.* — Virology, 1983, v. 126 (in press).
118. *WHO Memorandum* — Bull. Wld Hlth Org., 1971, v. 45, p. 112—124.
119. *WHO Memorandum* — Bull. Wld Hlth Org., 1980, v. 58, p. 585—591.
120. *Wiley D., Wilson I., Skehel J.* — Nature, 1981, v. 289, p. 373—378.
121. *Wilson I., Skehel J., Wiley D.* — Nature, 1981, v. 289, p. 366—373.
122. *Winter G., Fields S.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 1965—1974.
123. *Winter G., Fields S.* — Virology, 1981, v. 114, p. 423—428.
124. *Winter G., Fields S., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 292, p. 72—75.
125. *Winter G., Fields S., Gait M.* — Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, p. 237—245.
126. *Wrigley N., Skehel J., Charlwood P., Brand C.* — Virology, 1973, v. 51, p. 525—529.
127. *Wrigley N.* — Brit. Med. Bull., 1979, v. 35, p. 35—38.
128. *Yewdell J., Webster R., Gerhard W.* — Nature, 1979, v. 279, p. 246—248.
129. *Young J., Palese P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 6547—6551.

Экспрессия клонированных генов вируса гриппа

М.-Дж. Гетсинг, Дж. Сэмбрук
(M.-J. Gething, J. Sambrook)

I. Введение

Клонирование в бактериальных плазмидах копий двухцепочечных ДНК различных сегментов РНК генома вируса гриппа дало возможность значительно расширить наше представление о белках вируса. Анализ последовательности ДНК клонированных генов в дополнение к известным из ранних классических экспериментов по химии белка данным позволил выяснить последовательности аминокислот всех известных кодируемых вирусом белков и обнаружить неизвестные до настоящего времени полипептиды; сравнение первичных структур белков, кодируемых вирусами различных подтипов, углубили наше представление о механизмах антигенного дрейфа и шифта. Более того, знание последовательности аминокислот существенно упростило расшифровку трехмерных структур внешних областей гликопротеидов гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) и позволило точно картировать антигенные сайты в структуре HA.

Техника рекомбинантной ДНК открыла еще одну возможность в освоении пути экспрессии клонированных генов вируса гриппа в прокариотах и эукариотах. Эти исследования имели две основные цели: 1) получение больших количеств чистых поверхностных антигенов (HA и NA) применительно к проблеме их дальнейшего использования в качестве вакцин; 2) изучение в клетках прокариотов и эукариотов биосинтеза, структуры и функции индивидуальных белков вируса гриппа дикого типа или мутантов. Поскольку эти белки в естественных условиях кодируются геномом минус-цепочечной РНК, ранее было невозможно управлять их первичными структурами путем направленных изменений кодирующих их последовательностей нуклеотидов.

В то время как в большей части исследований по экспрессии в бактериальных клетках и клетках млекопитающих использовались клонированные копии гена вирусного HA, недавно были экспрессированы гены матриксного (M) и неструктурного (NS) белков, и нет сомнения, что подобные эксперименты с другими вирусными генами будут продолжены в ближайшее время. Таким образом, мы можем ожидать углубления знаний о биологических свойствах каждого белка и о его роли в жизненном цикле вируса.

II. Векторы экспрессии

В настоящее время известны многие системы векторов для экспрессии генов эукариотов в клетках бактерий или млекопитающих [для обзора см. 9.17]. Векторы, которые использовались для экспрессии клонированных генов вируса гриппа, содержали в дополнение к последовательностям ДНК, необходимых для их репликации в клетках-хозяевах, контролирующие элементы, которые стимулировали эффективную транскрипцию экзогенных генов и трансляцию образующихся мРНК.

Экспрессия HA и NS в E. coli была достигнута путем вставки копий кДНК генов во множество плазмидных векторов. Эти плазмиды — двухцепочечные замкнутые в кольцо молекулы ДНК (длиной 3—5 kb), которые реплицируются независимо — как внехромосомные генетические элементы — в E. coli. Плазмиды, используемые для экспериментов по экспрессии, сконструированы таким образом, что чужеродные гены могут быть вставлены за мощными промоторами прокариотов для экспрессии гибридных мРНК, которые несут подходящие сайты связывания с бактериальной рибосомой. После трансформации этими рекомбинантными плазмидами выделяются штаммы бактерий, которые выражают последовательности вируса гриппа либо индуцированно, либо конститутивно в зависимости от определенного выбранного промотора.

Синтез HA и белка M в клетках млекопитающих был осуществлен с использованием векторов из обезьяньего вируса 40 (SV40). В культуре клеток SV40 претерпевает последовательный цикл репликации, в котором за экспрессией ранних вирусных генов (большого и малого T-антигенов) следуют репликация вирусной ДНК, синтез поздних вирусных белков и, наконец, сборка потомства вирусных частиц [27]. Геном представляет собой замкнутую в кольцо двухцепочечную молекулу длиной около 5,2 kb. Заменяя кодирующие последовательности либо ранних, либо поздних генов SV40 на соответствующие гены HA или белка M, удавалось генерировать рекомбинанты, синтезирующие большие количества белков вируса гриппа. Так как эти рекомбинанты дефектны, их литический рост зависит от комплементации соответствующими генными продуктами дикого типа. Система далее может быть адаптирована для обеспечения кратковременной экспрессии вслед за трансфекцией клеток млекопитающих с химерными молекулами ДНК SV40-вирус гриппа или непрерывной экспрессии на низком уровне из хромосомного интегрированного гена.

Характеристики каждой системы вектора и результаты экспериментов по экспрессии описаны далее.

III. Экспрессия генов вируса гриппа в E. coli

Основные требования для эффективной экспрессии клонированного гена эукариотов в E. coli были обобщены T. Maniatis и соавт. [17]. Кратко они заключаются в следующем.

1. Кодирующий участок гена не должен прерываться промежуточными последовательностями.

2. Ген должен находиться под контролем промотора E. coli с тем, чтобы он мог быть узнан РНК-полимеразой E. coli. Желательно, чтобы был выбран промотор с регулируемой активностью, поскольку существенный синтез больших количеств генных продуктов рекомбинанта может быть токсичен для клеток E. coli (см. далее). Такими промоторами с регулируемыми активностями являются lac uv 5, trp, pL и ompF.

3. Химерные мРНК должны эффективно транслироваться. Обычно это достигается за счет обеспечения рекомбинантной мРНК сильным сайтом связывания бактериальной рибосомы (который, как известно, включает инициирующий кодон АУГ и «Shine-Dalgarno» последовательность длиной в 3—9 нуклеотидов, расположенную на расстоянии 3—11 нуклеотидов вверх от инициирующего кодона). Во время конструирования плазмиды экспрессии чужеродный ген может быть расположен так, что: а) его собственный АУГ находится на предопределенном или экспериментально установленном оптимальном расстоянии от бактериальной последовательности Shine-Dalgarno; б) он слит в правильной рамке считывания с АУГ, присутствующим на векторе; в) он слит в рамке с 5′-кодирующими последовательностями бактериального гена. В первых 2 случаях чужеродный ген будет выражен как нативный, неслитый белок, в то время как в последнем случае будет получен белок слияния. Все три альтернативы были использованы при экспрессии генов вируса гриппа (табл. 12).

4. Чужеродный белок, продуцированный в E. coli, будет стабильным и не будет быстро разлагаться под действием бактериальных протеаз. Если нативный белок в бактериях нестабилен, экспрессия генного продукта как части белка слияния может улучшить выход. Альтернативно некоторые белки могут быть стабилизированы синтезом в больших количествах, возможно, из-за образования нерастворимых белковых преципитатов, которые устойчивы к действию протеаз.

Некоторым авторам удалось экспрессировать клонированные гены НА различных штаммов вируса гриппа в бактериях с использованием плазмид, содержащих либо lac-, либо trp-промоторы [2, 3, 12]. Совсем недавно гены NS также были экспрессированы из промотора pL бактериофага ламбда [31]. Результаты этих экспериментов суммированы в табл. 12.

А. Экспрессия гемагглютинина

Уровни экспрессии НА в E. coli сильно варьируют (от менее 100 до 70 000 молекул на одну клетку). Эта вариация является красноречивым свидетельством того, что до сих пор не расшифрованы до конца правила, по которым происходит регуляция существенной экспрессии белков эукариотов в бактериях. Различные количества белков, синтезируемых разными моделями, могут являться

Таблица 12. *Экспрессия генов вируса гриппа в E. coli — резюме*

Ген	Бактериальный промотор	Сайт связывания рибосомы	Дополнительная N-терминальная последовательность	Последовательность НА (аминокислот)	Индукция	Уровень экспрессии % общего белка; молекулы/клетка
НА (FPV)[1]	trp	trpE	7 аминокислот trpE плюс 14 аминокислот связки и нетранслированные последовательности	18—547	—	0,75%; ~7 500
					IAA[5]	2—3%; ~25 000
НА (A/Japan/305)[2]	lacUV5		7 аминокислот β-галактозидазы	10—547	—	Не определяли; ~3000
НА (A/WSN/33)[3]	trp	trpL	—	1—396	—	—; <100
				1—565	—	—; <100
	trp	trpL	trpLE белок	1—396	—	Низкий; не определяли
	lac	lac	—	1—396	—	—; <100
				1—565	—	—; <100
	lac	lac	1006 аминокислот β-галактозидазы	1—396	—	1—2%; 10—20 000
					IPTG[6]	5—7%; 50—70 000
				59—211	—	1—2%; 10—20 000
					IPTG[6]	5—7%; 50—70 000
NS (A/PR/8/34)[4]	λpL	cII	—	1—230	42°	10—20%; 100—200 000

[1] Emtage и соавт. (1980).
[2] Heiland, Gething (1981).
[3] Davis и соавт. (1981).
[4] Young и соавт. (1983).
[5] 3-Индолилуксусная кислота.
[6] Изопропил-β-D-тиогалактозид.

отражением относительных эффективностей различных промоторов и сайтов связывания рибосомы или следствием структурной стабильности каждой индивидуальной гибридной мРНК или белка. Несмотря на эту вариацию, ясно, что в некоторых обстоятельствах НА может синтезироваться в очень больших количествах в E. coli. Концентрация 50 000 молекул на 1 клетку эквивалентна (до очистки) выходу приблизительно 6 мг из 1 л культуры, содержащей 10^9 бактерий в 1 мл. Во всех рассмотренных ранее экспериментах белок НА был синтезирован и аккумулирован в бактериальной клетке. В большинстве случаев НА был экспрессирован как белок слияния, лишенный своей сигнальной последовательности, но имеющий дополнительные N-терминальные последовательности бактериального происхождения, связанные с полипептидом зрелого НА или с сокращенной молекулой НА. Дополнительными последовательностями могут быть просто несколько остатков (т. е. 7 аминокислот β-галактозидазы) или значительная часть бактериального белка (см. табл. 12). В то время как этот факт может служить гарантией, что химерные молекулы мРНК эффективно транслируются и могут также защищать НА от протеолиза, наличие дополнительных чужеродных последовательностей выдвигает определенные проблемы, учитывая, что продукт рекомбинанта должен быть использован как иммуноген. Помимо этого, присутствие N-терминального участка на появляющейся молекуле НА будет, вероятно, устранять активность сигнальной последовательности НА. Этот факт может иметь определенное значение, так как присутствие функциональной сигнальной последовательности может облегчить эффективное выделение рекомбинантного НА через бактериальную мембрану и разрешить, таким образом, проблему чувствительности протеазы и упростить очистку белка. Процесс выделения будет требовать либо, чтобы естественный сигнал НА, который работает в клетках эукариотов, работал бы и в бактериях, либо, чтобы бактериальный сигнал был слит с N-концом зрелого НА. Предварительные результаты указывают на то, что экспрессия белка НА, содержащего функциональную гидрофобную сигнальную последовательность и С-терминальный гидрофобный пептид погружения, может быть токсичной для роста бактерий [12]. Однако, вероятно, подобная токсичность является следствием аккумуляции в бактериальной мембране больших количеств чужеродного белка. Данная проблема может быть разрешена либо за счет делеции последовательности ДНК, кодирующей этот белок погружения, либо за счет размножения и увеличения рекомбинантных плазмид в бактериях в условиях угнетения промотора [M. Gething, неопубликованные данные]. Экспрессия НА может быть осуществлена после добавления соответствующего индуктора.

В то время как некоторые интересные научные проблемы (например, эффективность сигнальных последовательностей эукариотов в бактериях) могут быть разрешены экспериментами по экспрессии у эукариотов, основная цель этой работы была направлена

на обсуждение того, что продукция антигенов в бактериях может быть использована в качестве вакцин. Хотя ни один из НА, которые были экспрессированы в бактериях, по своему происхождению не принадлежит штаммам вирусов гриппа, недавно вызвавшим заболевание, полученные до настоящего времени результаты обнадеживают. Однако остаются нерешенными несколько проблем для доказательства полезности НА, продуцируемого в бактериях. Белок обычно получают в нерастворимой или труднообрабатываемой форме, которая усложняет его очистку в естественной конфигурации. Это может в какой-то степени служить объяснением плохой иммуногенности рекомбинантного НА в сравнении с вирусным белком [D. Nayak, личное сообщение]. Отсутствие гликозилирования бактерией-хозяином может также влиять на стабильность и иммуногенность белка. Хотя рекомбинантный НА может быть распознан и преципитирован полиспецифической анти-НА антисывороткой, остается уточнить, все ли антигенные сайты молекулы НА выявляются на этом белке. Если бóльшая часть антигенных эпитопов не может быть экспрессирована в бактериях, планы на успешное производство вакцины существенно снижаются, поскольку все эти сайты претерпевают изменение во время антигенного дрейфа или шифта. Несмотря на эти сложности, остается особенно привлекательным план использования технологии рекомбинантной ДНК для быстрого следования за современным развитием последовательности НА и для продукции дешевых вакцин.

Б. Экспрессия белка NS1

Ген NS из штамма A/PR/8/34 вируса гриппа был экспрессирован на очень высоком уровне в E. coli с использованием pL-промотора бактериофага ламбда [31]. Результирующий белок NS1 был очищен и использован для получения антисыворотки, распознающей белок, синтезированный в клетках эукариотов. Достаточная иммуногенность этого белка может отражать тот факт, что в противоположность НА белок NS1 не является гликопротеидом, и продуцируемый в бактериях белок может поэтому более походить на молекулу NS, синтезированную в клетках эукариотов.

IV. Экспрессия генов вируса гриппа в клетках эукариотов

А. Экспрессия гемагглютинина в клетках обезьян с использованием рекомбинантных SV40 вирусных векторов

Гены НА трех различных подтипов вируса гриппа (A/WSN/33, H0N1 [11], A/Japan/305/57, H2N2 [5], A/Udorn/72, H3N2 [24]) были встроены в вирусные векторы, полученные из SV40, и экспресси-

рованы в клетках обезьян. Далее представлено описание конструкции рекомбинантных геномов, их введения в клетки эукариотов и характеристики экспрессированных белков НА.

Поскольку ген НА естественно представлен в форме минус-цепочечной РНК, копия клонированной ДНК не содержит ни одного из контролирующих элементов, таких, как промоторы и усилители, которые требуются для эффективной транскрипции обычных генов ДНК. Таким образом, векторы SV40 были сконструированы так, что участок, кодирующий НА, контролируется либо ранним SV40 промотором/усилителем, либо поздним (поздними) промотором (промоторами) SV40. Нетранслированный 3′-участок гена НА содержит последовательность, которая тесно связана с согласованным сигналом полиаденилирования для генов эукариотов и которая, как кажется наиболее вероятным, функционирует как такого рода сигнал при естественных гриппозных инфекциях. Первоначально, однако, не было ясно, что этот сигнал будет правильно работать в форме двухцепочечной ДНК. Поэтому для уверенности в том, что транскрипты гена НА будут эффективно терминированы, последовательности НА всегда включались раньше поли(А)-добавочного сигнала в последовательности SV40. Более того, в то время, когда производились эти эксперименты, были получены сведения от других авторов, что чужеродные гены, включенные в рекомбинантные векторы SV40, экспрессируются более эффективно, когда доноры/акцепторы сплайсирования присутствуют в первичном транскрипте [10, 20]. В результате было сконструировано несколько таких векторов, в которых либо естественные сигналы сплайсирования SV40 были сохранены в 5′-некодирующих последовательностях гибридного транскрипта, либо экзогенная последовательность интрона была включена в 3′-некодирующую последовательность рекомбинантной мРНК. Эффективность таких сигналов обсуждается далее.

Рекомбинантный вирус SV40 будет эффективно реплицироваться в клетках эукариотов, если: 1) клетки хозяина пермиссивны для синтеза вирусной ДНК; 2) вектор имеет функциональную природу репликации; 3) имеется запас большого Т-антигена, достаточный для инициации полноценных циклов синтеза ДНК SV40; 4) запас белков VP1, VP2 и VP3 капсиды SV40 доступен для продукции инфекционных вирионов, содержащих рекомбинантный геном [8, 27]. Так как рекомбинанты поздней замены имеют функциональное происхождение репликации ДНК и интактный набор ранних генов SV40, их геномы будут эффективно реплицироваться в пермиссивных клетках обезьян. Однако поздние гены SV40 были утрачены и для продукции инфекционных вирусных частиц, содержащих рекомбинантный геном, было необходимо дополнить белки капсиды SV40 добавочным вирусом-помощником, например мутантом SV40 с дефектом в раннем участке вирусного генома. С другой стороны, рекомбинанты ранней замены содержат интактный набор поздних генов, но не имеют ранних генов SV40, так что их геномы не могут реплициро-

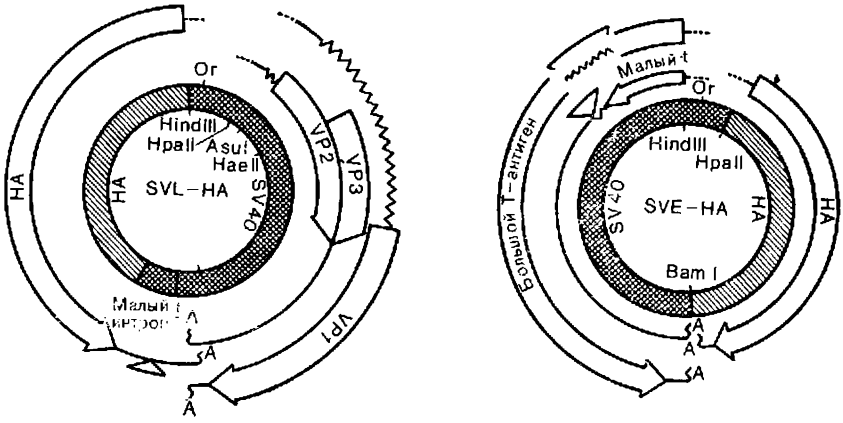
ваться в клетках обезьян, если не добавлен функциональный Т-антиген. Это может быть сделано с использованием в качестве пермиссивного хозяина трансформированных SV40 клеток линии COS-1 обезьян, которые несут эндогенно-экспрессированную копию гена Т-антигена SV40 [8]. Наконец, эффективная упаковка рекомбинантных геномов в капсиды SV40 требует, чтобы размер генома оставался в пределах 70—105% от размера генома дикого типа [27]. Это ограничение может быть выдержано за счет выбора сайтов, между которыми может быть вставлен чужеродный ген, и за счет использования жизнеспособных мутантов делеции вируса SV40, которые обеспечивают дополнительную емкость упаковки.

Б. Приготовление генов гемагглютинина

Когда различные гены НА были первоначально клонированы в плазмиды, перед кодирующими последовательностями были расположены 40 нуклеотидов нетранслированной последовательности, а также гомополимерные хвосты dГ : dЦ и/или dA : dT, которые были использованы при клонировании [1, 4, 14]. Эти 5′-последовательности были выделены из генов штаммов Japan и WSN обработкой двухцепочечной эндонуклеазой Bal31. В случае с геном штамма Japan были проанализированы последовательности ДНК удаленных клонов и в результате выбран один клон, в котором первый нуклеотид последовательности НА был А из инициирующего АУГ [5]. Хотя Bal31-обработанные клоны НА штамма WSN не были секвенированы, анализ с использованием рестрикционной эндонуклеазы был применен для идентификации клонов, которые, как оказалось, потеряли гомополимерные хвосты и нетранслированные последовательности [11]. Наоборот, ген НА штамма Udorn, который был включен в поздний участок SV40, по-прежнему содержал хвосты dГ : dЦ и нетранслированные нуклеотиды [24].

В. Конструирование рекомбинантных геномов

1. Векторы, в которых последовательность, кодирующая НА, заменяет ранние гены SV40. Как было отмечено, клонированный НА штамма Japan был реконструирован так, что А-остаток, следующий непосредственно за Hind111-связкой, начинал инициацию АУГ белка. Это позволяло включать ген в ранний участок генома SV40 (между сайтом Hind111 на нуклеотиде 5171 и сайтом Bcl1 на нуклеотиде 2770), так что этот инициирующий кодон оказывается точно в положении, обычно занимаемом инициирующим кодоном большого и малого Т-антигенов SV40 [5]. Кодирующие последовательности гена НА расположены выше сайта полиаденилирования ранних транскриптов SV40 в положении нуклеотида 2587. Ген НА должен, таким образом, транскрибироваться под контролем расположенного выше промотора/усилителя SV40 для выхода мРНК,



29. SV40-HA-рекомбинантные векторы, сконструированные для экспрессии HA в клетках обезьян.

Затемненные области представляют собой двухцепочные кольцевые ДНК геномы рекомбинантных вирусов. Кодирующие белок последовательности указаны блокированными стрелками. Нетранслированные части мРНК показаны сплошными линиями; пунктирные линии указывают приблизительно на точное положение 5′-конца мРНК, зигзагообразные — на сплайсированные сегменты; волнистая линия с A иллюстрирует 3′-терминальный поли(A) путь.

которая: а) инициирует в обычном сайте; б) содержит 5′-нетранслированный участок, который, за исключением последних пяти нуклеотидов, идентичен участку обычных ранних мРНК SV40; в) несет кодирующий участок, придающий особый характер молекуле HA, который идентичен участку молекулы естественной формы; г) заканчивается либо на сайте поли(A)-добавки в гене HA, либо ниже сайта SV40. Однако рекомбинантная мРНК HA не содержит каких-либо сигналов сплайсирования. Для выяснения, будет ли обеспечение донорскими и акцепторными сайтами сплайсирования увеличивать эффективность экспрессии гена HA, был сконструирован второй рекомбинантный геном, который имел ниже последовательностей HA сегмент ДНК, содержащий интрон гена SV40, кодирующий малый t-антиген. Этот рекомбинант изображен на рис. 29.

2. Векторы, в которых кодирующие HA последовательности заменяют поздние гены SV40. Промотор (промоторы) транскрипции позднего участка SV40 не были определены. Различные рекомбинанты поздней замены были сконструированы так, что гены HA включены либо в нетранслированный 5′-участок SV40 поздних мРНК, либо в кодирующую последовательность VP2. Во всех случаях кодирующие HA последовательности включены раньше сигнала полиаденилирования для поздних транскриптов (нуклеотид 2674). Разные конструкции различаются снабжением сигналов сплайсирования в гибридном транскрипте.

Для локализации кодирующих НА штамма Japan последовательностей под контролем позднего SV40 промотора (промоторов) ген был включен в поздний участок генома SV40 между сайтом HpaII на нуклеотиде 346 и сайтом BamH1 на нуклеотиде 2533 (см. рис. 29). Кодирующие НА последовательности объединены с некодирующими последовательностями так, что могут быть нормально транскрибированы в нетранслированный 5′-участок мРНК SV40 [5]. В поздние периоды литической инфекции пермиссивных клеток обезьян этот рекомбинантный геном должен экспрессировать несплайсированную гибридную мРНК, состоящую из нетранслированных последовательностей SV40 на их 5′-конце и интактной группы кодирующих НА последовательностей. Полиаденилирование может происходить либо на сайте в пределах 3′-нетранслированных последовательностей гена НА, либо на нормальном сайте для поздних мРНК SV40 на нуклеотиде 2674. Трансляция этой РНК должна начаться на первом АУГ, который расположен в начале кодирующих НА последовательностей.

Очень похожий рекомбинант, отличающийся только добавлением BamH1 связки на сайте HpaII SV40, был сконструирован для экспрессии гена НА WSN [11]. Этот ген также был экспрессирован от другого рекомбинанта, в котором последовательности, кодирующие НА, были включены за сайтом Asu1, который расположен на нуклеотиде 557 в последовательности SV40 и следует сразу же за инициирующим кодоном для VP2. Гибридный поздний транскрипт, экспрессированный из этого рекомбинантного генома, имеет те же донорские и акцепторные сайты в своих 5′-нетранслированных последовательностях, которые используются при созревании естественной 19S поздней мРНК SV40. Итак, инициирующий кодон НА — первый АУГ в мРНК.

Все ранее описанные рекомбинанты имеют гены НА, включенные в некодирующие участки SV40. Другой вектор поздней замены содержит кодирующие последовательности НА штамма Udorn, включенные в геном SV40 между сайтом HaeII на нуклеотиде 832 и сайтом BamH1 на нуклеотиде 2533 [24]. Это локализует АУГ НА в последовательности ДНК, кодирующей белок VP2 так, что он не является первым АУГ в гибридном транскрипте. Подобная ситуация обнаружена в SV40 дикого типа, где АУГ белка VP3 расположен в пределах последовательностей, кодирующих белок VP2. SV40-НА-гибридный транскрипт имеет те же 5′-нетранслированные последовательности и донорские акцепторные сайты сплайсирования, что и описанная выше конструкция WSN.

Г. Введение рекомбинантных геномов в клетки обезьян и продукция вирусного материала

Конструирование НА-SV40-рекомбинантов было осуществлено в различных бактериальных плазмидах. Japan НА-SV40-рекомбинантные геномы были также выращены в бактериальных плазми-

дах до того, как их структуры были подтверждены расщеплением рестрикционной эндонуклеазой и анализом последовательности ДНК в местах соединения генов SV40 и НА [5]. Гибридные геномы затем были вырезаны из плазмид (расщеплением с BamH1), очищены методом гель-электрофореза и сшиты при низких концентрациях ДНК с целью генерирования замкнутых кольцевых молекул, которые затем были введены в соответствующие клетки-хозяева с использованием ДЕАЕ-декстрана для облегчения процесса [18]. Рекомбинанты ранней замены были введены в клетки линии COS-1 в отсутствие ДНК-помощника; рекомбинант поздней замены был введен в клетки CV-1 вместе с равным количеством ДНК раннего делеционного мутанта dl1055 SV40 [22].

В противоположность этому, с другой стороны, фрагменты ДНК, используемые в конструировании рекомбинантов поздней замены, содержащих гены НА штаммов WSN или Udorn, были очищены отдельно, а затем сшиты вместе in vitro [11, 24]. Эти смеси были подвергнуты трансфекции прямо в клетках AGMK без предварительного анализа или клонирования рекомбинантных генов. Культуры были впоследствии суперинфицированы дополняющими вирусами-помощниками ts A28 или pSVL5, и рекомбинантные вирусы обнаруживали либо как смешанный вирусный материал, либо в виде индивидуальных бляшек.

Только малая часть культивируемых клеток млекопитающих способна в любой момент времени так поглощать ДНК, что очень немного клеток из популяции оказываются первоначально инфицированными. Однако в течение нескольких следующих дней каждая из этих клеток поддерживает литическую инфекцию и продуцирует более 1 млн. вирусных частиц, которые способны внедряться в соседние клетки и инфицировать их с высокой эффективностью. Обычно лизат, полученный из одного набора инфицированных клеток, должен быть пассирован 1 или 2 раза для получения вирусного материала в высоком титре. В случае рекомбинантов ранней замены этот вирусный материал состоял исключительно из рекомбинантных геномов, инкапсидированных в белки оболочки SV40; в случае рекомбинантов поздней замены он включает приблизительно равные количества частиц вируса-помощника и рекомбинантов. Оба типа вирусного материала могут быть использованы для инфицирования пермиссивных клеток с высокой эффективностью и для индуцирования литических циклов размножения вируса. Во время таких инфекций вирусные геномы транспортируются к ядру, где они высвобождаются из капсидов. Ранний промотор вскоре становится активным и под его контролем экспрессируются гены. К 12 ч после инфекции происходит репликация вирусной ДНК и начинают экспрессироваться с высокой эффективностью гены позднего промотора. К 36—48 ч инфекции вновь синтезированные вирусные геномы начинают собираться в потомство вирусных частиц — процесс, который продолжается в течение следующих 24 ч, когда клетки отделяются от своего субстрата и погибают.

Д. Анализ гемагглютинина, экспрессированного из SV40-НА-рекомбинантных векторов

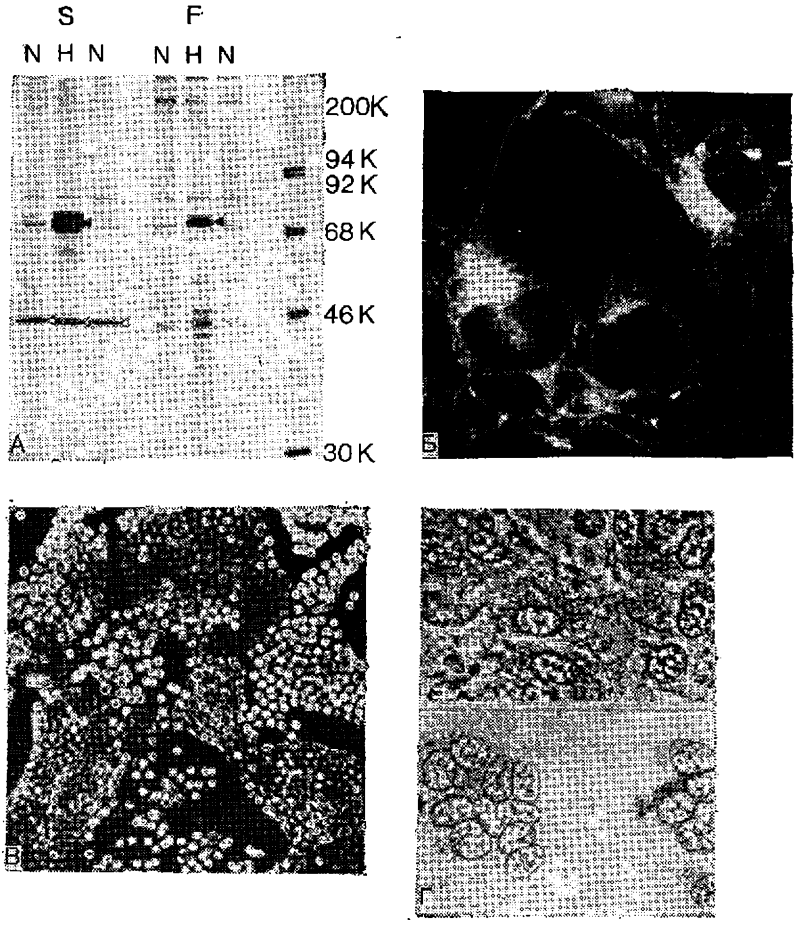
Все описанные выше рекомбинантные векторы экспрессируют гликопротеид НА, который не различается во всех изученных отношениях от НА, синтезированного во время естественной гриппозной инфекции. Для установления этого положения, т. е. того факта, что синтезированное образование — подлинный по своей структуре, антигенности и биологическим активностям гликопротеид НА, были проведены серии экспериментов в клетках, инфицированных различными рекомбинантами, включающие иммунопреципитацию, иммунофлюоресценцию, гемагглютинацию и тесты слияния клеток (рис. 30). Эти эксперименты были детально описаны ранее [5, 11, 24, 28] и очень коротко будут обсуждены здесь.

Иммунопреципитация: экстракты инфицированных рекомбинантными вирусами клеток содержали белок, который можно было пометить либо ^{35}S-метионином, либо радиоактивными предшественниками сахаров и который был специфически преципитирован анти-НА сывороткой. Белок не отличался по размеру от подлинного гликозилированного НА, преципитированного из экстрактов инфицированных клеток с вирусом гриппа. Клетки, инфицированные SVEHA3-рекомбинантным вирусным материалом, содержали так много этого белка, что не было необходимости использовать иммунопреципитацию для его определения; НА можно было распознать либо как неокрашенную Кумасси синим полосу после того, как экстракты инфицированных клеток были подвергнуты анализу методом SDS-гель-электрофореза или как известные радиоактивные виды, когда экстракты были приготовлены из инфицированных клеток, меченных ^{35}S-метионином. Обработка инфицированных клеток туникамицином приводила к продукции малого негликозилированного белка, который был идентичен по размеру негликозилированному подлинному НА.

Иммунофлюоресценция: клетки, инфицированные SV40-НА-рекомбинантами, показывали яркую цитоплазматическую флюоресценцию с особенно интенсивным окрашиванием аппарата Гольджи. Поверхность клеток также специфически окрашена, характеризуясь однородным флюоресцентным свечением. Распределение флюоресценции в клетках, инфицированных вирусом гриппа, было подобно распределению, характеризующему клетки, инфицированные рекомбинантами, но с более низкой интенсивностью.

Гемагглютинация и связывание эритроцитов с инфицированными клетками: эритроциты морской свинки могут быть агглютинированы экстрактами клеток, инфицированных рекомбинантными вирусами. Интактные монослои инфицированных клеток адсорбировали плотный ковер эритроцитов на своей поверхности.

Слияние клетки с клеткой: CV-1 клетки, инфицированные SVEHA3-рекомбинантом, могли сливаться с образованием



30. Анализ НА, экспрессированного из SV40-НА-рекомбинантных векторов. Детали протоколов экспериментов были описаны ранее [5, 28].

А — иммунопреципитация с использованием кроличьей анти-НА (НА) (Н) или неиммунной (N) сыворотки, экстрактов CV-1 клеток, инфицированных SVEHA3(S) или вирусом гриппа (F). Б — окрашивание иммунофлюоресцирующих антител к НА в клетках CV-1, инфицированных SVLHA 8. В — адсорбция эритроцитов морской свинки на монослое клеток CV-1, инфицированных SVEHA 3. Г — индуцированное низким значением pH слияние монослоя, инфицированного SVEHA 3; слияние происходит после кратковременной инкубации при pH 5,0 (обе фотографии), когда инфицированные клетки предварительно обрабатывали трипсином (только нижняя фотография) для протеолитической активации поверхностного клеточного НА.

гигантских полиэнергидных ядер, если монослои сначала обрабатывали низкими концентрациями трипсина для расщепления НА0 на НА1 и НА2 и затем подвергали кратковременной экспозиции низким значениям pH [28]. Пороговое значение pH, при котором происходит слияние, идентично наблюдаемому для индуцированного при низком значении pH слияния клеток, инфицированных штаммом Japan вируса гриппа.

Е. Количественная оценка гемагглютинина, экспрессированного из рекомбинантных геномов

Количества НА штамма Japan, экспрессированного из рекомбинантов ранней и поздней замены, были определены с использованием радиоиммунотеста в твердой фазе [5]. Было показано, что количество обнаруживаемого НА увеличивается по ходу течения инфекции. К 62 ч, когда литическая инфекция находится в своей завершающей фазе, клетки, инфицированные рекомбинантом поздней замены SVEHA3, содержат приблизительно 6×10^8 молекул НА на 1 клетку, что соответствует продукции около 200 мкг НА на 10-сантиметровую чашку с клетками. Для сравнения клетка обезьян в поздней стадии во время инфекции вирусом гриппа будет содержать около 5×10^7 молекул НА на 1 клетку. Клетки, инфицированные интрон — рекомбинантом ранней замены — SVLHA10, также продуцируют НА с высокой эффективностью (табл. 13).

Таблица 13. *Оценка экспрессии НА в экстрактах клеток обезьян, инфицированных SV40-HA-рекомбинантными вирусами. Монослои CV-1 или COS-1 клеток были инфицированы, как описано ранее. Спустя 6 ч после инфекции были приготовлены экстракты клеток и оценено количество НА методом радиоиммунотеста в твердой фазе [6, 7]*

Рекомбинантный вирус	НА на 10^6 клеток, мкг	Среднее число молекул на 1 клетку	% инфицированных клеток	Число молекул НА на инфицированную клетку
SVEHA3	57,0	$5,7\times10^8$	95	6×10^8
SVLHA8 (интрон$^-$)	0,08	8×10^5	5	$1,6\times10^6$
SVLHA10 (интрон$^+$)	14,0	$1,4\times10^8$	95	$1,5\times10^8$

Эти результаты показывают, что клонированный ген НА может быть экспрессирован на очень высоких уровнях, когда он связан либо с ранним, либо с поздним SV40 промотором. Однако SVLHA8 (интрон$^+$)-инфицированные клетки продуцируют значительно меньшие количества антигена НА (см. табл. 13). Причина этой уменьшенной продукции НА будет обсуждена в следующем разделе.

Ж. Влияние промежуточных последовательностей в транскрипте гемагглютинина рекомбинанта на уровень экспрессии белка гемагглютинина

Влияние наличия сигналов сплайсирования в рекомбинантном транскрипте на экспрессию НА и стабильность генома показана в табл. 14. В результате исследований было установлено, что для экспрессии гена НА из рекомбинантов ранней либо поздней замены

Таблица 14. *Корреляция между присутствием сигналов сплайсирования, экспрессией НА и стабильностью SV-НА-рекомбинантных геномов*

Рекомбинант	Ген НА	Интрон	Перестройка генома	Уровень экспрессии
Поздние				
SVEHA3	Japan	—	—	+++
SVHA1	WSN	—	?	+
SVHA2	WSN	+	?	+
SVHA3	WSN	+	?	+
HA-SV40-8	Udorn	+	+	+
Ранние				
SVEHA10	Japan	—	—	+++
SVEHA8	Japan	+	++	+

не требуется сплайсирование мРНК. Возможная корреляция между присутствием интрона и нестабильностью наилучшим образом проиллюстрирована сравнением двух рекомбинантов ранней замены, которые полностью идентичны, за исключением добавленного сегмента ДНК, содержащего интрон малого t-антигена SV40 между кодирующими НА-последовательностями и сайтом поли (А)-добавки [6]. Когда было проведено сравнение двух рекомбинантов по их способности экспрессировать НА, обнаружено, что в то время как 95% клеток, инфицированных интрон$^-$-вирусом, экспрессируют НА, только 5% этих инфицированных интрон$^+$-вирусом клеток экспрессировали НА. Анализ рекомбинантных ДНК молекул, выделенных из клеток, инфицированных последовательными пассажами интрон$^+$-вируса, показал быстрое увеличение доли перестроенных геномов. К 4-му и 5-му пассажам вирусный материал был неинфекционен и содержал значительно большее количество коротких молекул по сравнению с молекулами исходной конструкции. Клонирование и секвенирование части измененных молекул показало, что произошли многие различные по форме перестройки, включая простые делеции в пределах гена НА и через обе границы SV40-НА, и также делеции последовательностей НА одновременно с включениями или инверсиями ДНК SV40. Хотя геном интрон$^+$-рекомбинанта кажется практически неуязвимым к таким перестройкам, интрон$^-$-геном полностью стабилен, как и рекомбинант SVEHA3 поздней замены, у которого также отсутствует любой из сигналов сплайсирования в транскрипте НА. Можно, однако, было бы попытаться оспорить то, что присутствие интрона действительно отрицательно влияет на экспрессию мРНК НА. Однако быстрая аккумуляция перестроек в геноме рекомбинанта предполагает, что отрицательное действие интрона сказывается больше на уровне ДНК, чем на уровне РНК. Вопрос о том, почему геномная нестабильность будет коррелировать с присутствием интрона, остается пока невыясненным.

3. Экспрессия матриксного гена в клетках обезьян с использованием SV40-M-рекомбинантного вируса

Клонированная копия сегмента 7 вирионной РНК вируса гриппа, который кодирует вирусные белки M, была включена в поздний участок SV40 между сайтом HpaII и нуклеотидом 346 (который ранее был превращен в сайт BamH1) и сайт BamH1 на нуклеотиде 2533 [16]. Ген рекомбинанта SV40-M был введен в клетки AGMK с использованием ДЕАЕ-декстрана вместе с SV40 tsA28 вирусом-помощником и клонированный рекомбинантный вирусный материал был приготовлен в клетках CV-1. Анализ M-специфических РНК, которые продуцировались в клетках, инфицированных этим вирусным материалом, показал, что были синтезированы оба сплайсированные и несплайсированные гибридные мРНК, имеющие 5′- и 3′-некодирующие последовательности из SV40. Сайты сплайсирования, использованные для образования РНК, были идентичны сайтам, использованным для образования мРНК$_3$ во время транскрипции вируса гриппа in vivo [15]. Однако не был обнаружен сплайсированный продукт, эквивалентный подлинной мРНК$_2$, и относительное множество видов прерванных и колинеарных РНК варьировало в клетках, инфицированных вирусом гриппа или рекомбинантом SV40-M. Причиной этих различий может быть влияние последовательностей SV40 на 5′- и 3′-концах транскрипта. Иммунопреципитация полипептидов, синтезированных в инфицированных рекомбинантным вирусом SV40-M клетках со специфической антисывороткой к вирусу гриппа и триптическое пептидное картирование показали наличие полипептида с той же подвижностью и строением пептида, что и белок M1 вируса гриппа. Такой пептид мог быть транслирован с несплайсированной гибридной РНК, содержащей полную кодирующую последовательность белка M1.

И. Кратковременная экспрессия клонированных генов в клетках COS-1

Описанные ранее эксперименты включали продукцию и использование вирусного материала, содержащего рекомбинантные геномы. Такой вирусный материал имеет большое значение, когда требуется эффективная инфекция клеток для высокого уровня экспрессии белковых продуктов. Однако до установления высоких титров вирусного материала нужно провести несколько пассажей на клеточной культуре и необходима более быстрая скрининг-процедура, когда для экспрессии должно быть проверено большое количество рекомбинантов, например во время анализа фенотипов мутированных генов. К счастью, можно изучить, используя клетки COS-1, кратковременную продукцию РНК и белка рекомбинантных геномов, репликация которых происходит из SV40 [8, 19]. Когда такие молекулы ДНК подвергаются трансфекции в клетках COS-1

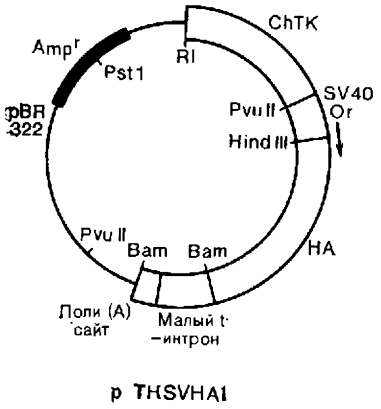
(которые содержат эндогенную копию гена большого Т антигена SV40), они увеличиваются до нескольких тысяч копий на одну клетку, что делает невозможным анализ экспрессии генома.

Ген НА штамма Japan в рекомбинантных геномах SV40 может быть экспрессирован кратковременно, когда он подвергнут трансфекции в клетках COS-1 с использованием ДЕАЕ-декстрана. Через 48 ч после трансфекции от 5 до 20% клеток экспрессируют НА, о чем свидетельствуют данные тестов иммунофлюоресценции или связывания эритроцитов, и выход НА, измеренный по радиоиммунотесту, составляет 1—5% того количества, которое получают при традиционном способе инфицирования рекомбинантным вирусным материалом всех клеток в культуре [M. Gething, неопубликованные данные].

К. Непрерывная экспрессия гемагглютинина из генов, интегрированных в хромосомы клеток эукариотов

Описанные ранее системы клеток эукариотов обеспечивают только кратковременную экспрессию генов-спутников (passenger genes) либо потому, что клетки-хозяева погибают вследствие литической инфекции, либо потому, что химерные геномы только кратковременно присутствуют в клетках. Линии клеток, которые непрерывно экспрессируют индивидуальные клонированные гены вируса гриппа, могут обеспечивать более удобный источник белка. Более того, используя активность слияния НА, они могут привести к развитию систем для доставки экзогенных генов и белков к клеткам. И наконец, они открывают путь исследованиям в области регуляции цитотоксических Т-клеточных ответов на вирусспецифические поверхностные антигены.

Когда монослои клеток эукариотов обработаны ДНК, копреципитированной фосфатом кальция [30], малая часть клеток поглощает ДНК и интегрирует ее в свои хромосомы. Поскольку это событие очень редкое, интересующая нас ДНК обычно вводится в клетки вместе с геном, который будет давать селективное преимущество тем клеткам, которые его получают. Например, ген тимидинкиназы (tk) будет передавать устойчивость к НАТ среде tk^--реципиентным клеткам. Первоначально ген НА штамма Japan был введен в мышиные клетки LMtk в рекомбинантную плазмиду, содержащую: 1) ген β-лактамазы; 2) ген tk кур [23]; 3) ген НА, включенный между ранним промотором вируса SV40 и ранними последовательностями SV40, содержащими сигналы процессинга РНК (рис. 31). Последующие эксперименты заключались в проведении контрасформации клеток двумя отдельными плазмидами; одна (либо pSVEHA8, либо pSVLHA10 — см. рис. 29) содержала ген НА под контролем раннего промотора SV40, в то время как другая содержала ген tk кур (p0D3) [D. Hanahan, неопубликованные данные]. Либо мышиные клетки $LMtk^-$, либо человеческие



31. Рекомбинантная плазмида, сконструированная для устанавливающей экспрессии НА в перевиваемых линиях клеток мыши и человека.

клетки 143tk$^-$ были использованы как реципиенты в этих исследованиях [M. Gething, J. Sambrook, неопубликованные данные]. Во всех случаях клоны tk$^+$ были селекционированы в HAT среде, выращены в объеме массовой культуры и проанализированы: 1) на присутствие интегрированной ДНК НА методом Southern-блоттинга; 2) на присутствие мРНК НА методом Nothern-переноса; 3) на обнаружение белка НА радиоиммунотестом. В то время как все изученные клоны tk$^+$ имели интактные интегрированные гены НА и некоторые содержали мРНК, соответствующие по длине подлинной мРНК НА инфицированных вирусом гриппа клеток, уровни экспрессии мРНК широко варьировали. Продукция белка НА коррелировала с уровнями мРНК и колебалась от 5000 до 100 000 молекул на клетку. Эти высокопродуктивные линии продолжали экспрессировать НА на протяжении нескольких субклонирований в постоянной культуре клеток в течение 8 мес. Хотя не наблюдали агглютинацию эритроцитов с этими линиями, с помощью H2-ограниченного лизиса клеток Japan НА-специфическими цитотоксическими Т-клетками [T. Braciale, личное сообщение], было получено доказательство того, что НА экспрессируется на поверхности мышиных клеток. Эти результаты показывают, что можно получить постоянные линии клеток, которые будут существенно синтезировать НА. Однако количества НА при этом относительно низкие, возможно, вследствие малого числа интегрированных копий гена НА (1—2 копии на клетку). Кроме того, возможно, что аккумуляция больших количеств НА на его поверхности вредна для клетки, так что существует постоянное давление отбора в сторону «непроизводителей». Для распознавания этих возможностей и для выделения постоянных линий клеток, которые продуцируют большие количества НА, необходимо: 1) увеличивать число генов НА в клетке; 2) уменьшать потенциальные вредные эффекты клеточно-ассоциированного НА введением гена А$^-$-мутанта НА (см. далее), который секретируется клеткой.

V. Анализ экспрессии белков мутанта гемагглютинина

Из проведенных исследований становится ясным, что могут быть сконструированы рекомбинантные вирусы, экспрессирующие из клонированных генов НА большие количества белков НА, которые оказываются нормальными во всех отношениях: их молекулярные массы не отличаются от молекулярной массы подлинного белка, и они проявляются на поверхности инфицированной клетки в гликозилированной форме, антигенно и биологически активной. Таким образом, белок, который кодируется геномной РНК с минус-цепью, может быть экспрессирован в обильных количествах, когда копии двухцепочечных ДНК кодирующих их последовательностей соединены с сильными SV40 промоторами. Таким образом можно начать думать об использовании сайт-направленного мутагенеза для анализа тех частей молекулы НА, которые важны для его структуры, функции и биосинтеза и которые до настоящего времени не удавалось анализировать генетически.

Первый набор мутантов НА, которые были проанализированы экспрессией в рекомбинантах SV40-НА, имел делеции в последовательностях, кодирующих N- и С-терминальные гидрофобные участки белка. Эти участки играют решающую роль в транспорте НА в пределах инфицированной клетки. N-терминальная сигнальная последовательность требуется для векторного переноса образующегося полипептида через мембрану эндоплазматического ретикулума: завершенный белок погружен своей С-терминальной гидрофобной последовательностью в липидный двойной слой клеточной мембраны или вирусной оболочки.

А. Сигнал-минус гемагглютинин (S^-НА) — негликозилированный внутриклеточный белок

Для приготовления делеционного по сигналу (S^-) мутанта гена НА штамма Japan использовали плазмиду pJHB29, из которой были удалены с помощью Bal31 эндонуклеазы все 5′-нуклеотиды, кодирующие сигнал. Этот сокращенный ген НА использовали для замены гена НА штамма Japan дикого типа в векторе поздней экспрессии, так что инициирующий кодон НА был слит в фазе с кодоном для первой аминокислоты зрелого полипептида НА [7]. Остальные кодирующие НА последовательности не были изменены.

Когда клетки обезьян инфицировали вирусным материалом, содержащим мутантный рекомбинант, вариантный негликозилированный белок НА определяли методом иммунопреципитации. Свойства этого мутантного белка НА суммированы в табл. 15. Его молекулярная масса (61 000) была идентична молекулярной массе НА в негликозилированной форме, синтезированного или in vivo в присутствии туникамицина, или in vitro трансляцией в лизате ретикулоцитов. Этот результат согласуется с синтезом S^-НА как

Таблица 15. *Сравнение свойств НА дикого типа и мутанта, продуцируемого из векторов SV40-НА*

	SVEHA3 дикий тип	SVEHA0-A— погружение-минус	SVEHA7-S— сигнал-минус
Локализация	Поверхность клетки	Секретирован в среду	Внутриклеточный
M_r (субъединица)	75К	72К	63К
Структура	Тример	Тример	?
Гликозилирование	+	+	—
Связывание эритроцитов с инфицированными клетками	+	—	—
Молекулы на клетку (60 ч после инфекции)	6×10^8	1×10^9	1×10^6
Количество, продуцированное на 10 см чашку (60 ч после инфекции)	Экстракт 200 мкг Среда 0	28 мкг 300 »	0.5 мкг 0

цитоплазматического белка на свободных полирибосомах. При отсутствии сигнальной последовательности образующийся полипептид не может быть перемещен через мембрану эндоплазматического ретикулума и поэтому никогда не подвергается действию гликозилирующих ферментов, которые находятся на относящейся к просвету потока стороне мембраны. В противоположность НА дикого типа, который экспрессируется очень эффективно из рекомбинанта SVEHA3 (6×10^8 молекул на клетку), S^--мутант экспрессируется на относительно низком уровне (10^6 молекул на клетку). Контрольные эксперименты показали, что причиной этого низкого выхода не является ни неспособность мутантного вируса инфицировать клетки CV-1, ни отсутствие репликации генома вирусного рекомбинанта. Скорее всего, эту причину следует искать в комбинации факторов, включая нестабильность и мутантной мРНК, и вариантного белка. Эти результаты ярко свидетельствуют в пользу того, что сигнальная последовательность необходима для правильного транспорта образующегося полипептида. Дальнейшие эксперименты с использованием мутантов с изменениями в одном нуклеотиде в последовательности ДНК, кодирующей гидрофобный пептид, должны прояснить роль определенных аминокислот в функции сигнала и определить влияние последовательности нуклеотидов в этом участке на стабильность и эффективность трансляции мРНК НА.

Б. Удаление С-терминальной гидрофобной последовательности превращает гемагглютинин в секретированный белок

В обычном состоянии НА погружен в оболочку инфицированной клетки или в оболочку вириона вируса гриппа на длину порядка 24—27 аминокислот, которые кодируются наружными последова-

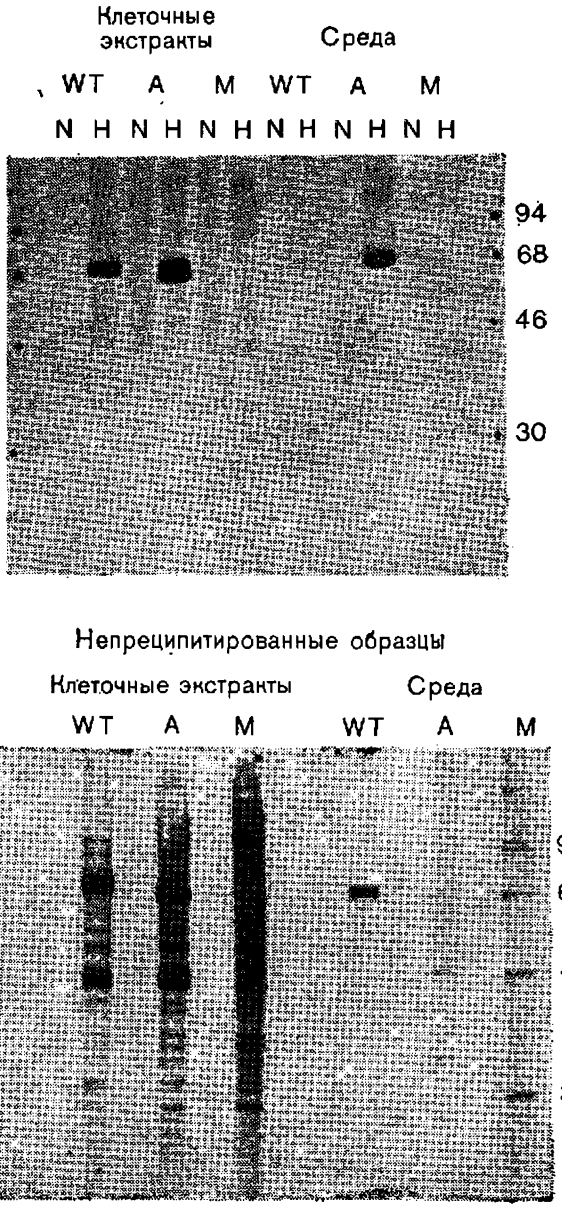
тельностями гена НА [4]. Эти последовательности были выделены из генов НА штаммов Japan [7] и Udorn [25] и был проведен анализ экспрессии этих делеционных мутантов из векторов SV40-НА.

В конструкции А⁻-мутанта штамма Japan использовали плазмиду p2G10, которая была первоначально клонирована без последовательностей, соответствующих С-терминальному погружению [4]. Этот сокращенный ген заменил ген НА полной длины в рекомбинанте поздней замены для создания нового рекомбинанта, который отличается от своего родителя только в одном существенном отношении — кодирует белок, в котором отсутствуют 38 аминокислот, обычно обнаруживаемые в С-конце НА. Их заменяет отрезок из 11 аминокислот, более полярных по природе, которые кодируются гомополимерным хвостом dГ : dЦ, синтетической связкой BamH1 и короткой последовательностью ДНК SV40 [7].

Делеционные мутанты Udorn были сконструированы путем линеаризации генома рекомбинанта поздней замены BamH1 для отрезания последовательности НА штамма Udorn непосредственно перед нуклеотидами, кодирующими гидрофобный С-конец. После обработки нуклеазой S1 для отделения липких концов линейные молекулы были подвернуты трансфекции в клетки обезьян и был получен вирусный материал, содержащий геномы с делецией. Размеры делеций варьировали от 40 до 172 аминокислот. Эти остатки были заменены короткими отрезками из 6—25 аминокислот, полученными из ранее некодирующих последовательностей НА или SV40 [25].

Эти А⁻-мутанты НА синтезируются с такой же эффективностью из рекомбинантных геномов, что и белки дикого типа. Однако вместо того, чтобы быть полностью клеточно-ассоциированными (в аппарате Гольджи или на поверхности клетки), мутантные НА эффективно секретируются в среду (рис. 32). Наиболее простое объяснение свойств мутантов состоит в том, что отделение С-терминальных гидрофобных последовательностей приводит к потере функции погружения, так что образующийся полипептид вместо того, чтобы остаться прикрепленным к относящейся к просвету потока стороне грубого эндоплазматического ретикулума, полностью проходит через мембрану. Как только этот полипептид оказывается свободным в просвете потока, клетка обращается с мутантным НА как с подлинным секреторным белком, и он выделяется в среду.

Экспрессия Japan-мутанта была оценена количественно с помощью радиоиммунотеста, и результаты представлены в табл. 15 вместе с обобщенными данными об его свойствах [7]. Мутантный НА полностью гликозилирован и, подобно белку штамма дикого типа [29], собран из субъединиц НА как тример. Уменьшение приблизительно на 3000 в его молекулярной массе согласуется со степенью делеции в его гене. Инфицированные мутантом клетки не проявляют функции связывания эритроцитов или pH-зависимого слияния клеток, так как А⁻НА не может образовывать необходимый мостик между двойным липидным слоем инфицированной



32. Сравнение экспрессии генов НА дикого типа и А⁻-мутанта.

Монослои клеток CV-1 инфицировали вирусами SVEHA 3 (WT) или SVEHA 20-A– (A–), как было описано ранее; через 48 ч клетки метили в течение 1 ч ^{35}S-метионином, а затем отбирали среду над клетками и готовили клеточные экстракты [5]. Аликвоты этих образцов были иммунопреципитированы с использованием кроличьей анти-НА сыворотки (H) или нормальной кроличьей сыворотки (N). Преципитированные белки (верхняя фотография) вместе с непреципитированными образцами (нижняя фотография) были разделены в SDS-ПААГЭ и авторадиографированы.

клетки и эритроцитом или соседней клеткой. И наконец, секретируемый НА не обладает гемагглютинирующей активностью, так как, не имея С-терминального гидрофобного участка, белок не может образовывать многовалентные комплексы.

Аккумуляция больших количеств секретируемого в среду НА над инфицированными клетками очень сильно облегчает очистку белка. К 20 ч после инфицирования, когда инфекция достаточно хорошо разовьется, для непрерывной продукции и секреции НА уже больше не требуется содержащая сыворотку среда. Таким образом, на 60-м часу после начала инфекции и на 40-м часу после перехода к свободной от сыворотки среде можно получить около 300 мкг чистого НА штамма Japan из одной чашки размером 100 мм с клетками, инфицированными A^--мутантом. Впервые было возможно легко провести очистку больших количеств шипа НА в нерасщепленной форме. Проводятся дальнейшие эксперименты для кристаллизации этого материала с целью разъяснения трехмерной структуры молекулы предшественника НА [D. Wiley, личное сообщение]. Кроме того, появляется возможность использования продуцируемого в культуре ткани НА как иммуногена для производства вакцин.

Секретированная форма НА оказывается отличной от белка связывания мембраны дикого типа только в одном отношении — в скорости его гликозилирования. Добавка углевода к белкам происходит в две стадии. Как только образующийся белок появляется на открытой просвету потока стороне грубого эндоплазматического ретикулума, преформированные богатые сахарозой олигосахариды переносятся от липидного носителя к определенным аспарагиновым остаткам [13, 21]. Это первоначальное котрансляционное гликозилирование кора является только первым шагом в тщательно разработанной программе реакций, которые происходят в грубом эндоплазматическом ретикулуме и позднее в аппарате Гольджи, где сахара упорядочены и добавлены к образующемуся белку [13, 26]. Во время биосинтеза НА переход от гликозилированной по кору молекулы к полной молекуле можно наблюдать при анализе методом SDS-гель-электрофореза белка, меченного ^{35}S-метионином, или меченных тритием предшественников сахаров в экспериментах с пульсовой меткой. Конечный состав олигосахаридных боковых цепей на завершенных белках штамма дикого типа и A^--белках оказывается одинаковым. Однако в противоположность белку связывания мембраны дикого типа, который быстро и относительно синхронно гликозилирован, популяция секреторных молекул становится терминально-гликозилированной через очень длительный период. Возможно, это различие в некоторой степени отражает относительную эффективность, с которой белки связывания мембраны и относящиеся к просвету потока белки изолируются в транспортные везикулы, перемещаемые от грубого эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи.

Несколько отличное заключение о том, что делеция С-терминального гидрофобного участка изменяет состав олигосахаридных

боковых цепей на молекуле НА, было сделано в результате анализа одного из сокращенных мутантов штамма Udorn [25]. Однако этот мутант потерял не только гидрофобный участок, но и другие 110 из 221 аминокислоты НА2, включая сайт гликозилирования, дисульфидную связь, связывавшую области НА1 и НА2, и длинную α-спираль, которая стабилизировала структуру НА2 и образовывала контакты с другими субъединицами в тримере НА. Таким образом, на биосинтез и гликозилирование этого мутантного НА могут действительно влиять большие изменения в структуре молекулы.

Результаты, полученные с A^--мутантами, приводят к следующим выводам.

1. Гидрофобная последовательность аминокислот на С-конце НА требуется для погружения белка в наружную мембрану клетки. Отделение этой последовательности превращает НА из интегрального мембранного белка в секреторный белок. Из этого следует, что, за исключением сигнальных последовательностей, не существует уникальной области аминокислот, общей для всех секреторных белков, которая автоматически придает им способность секретироваться.

2. Низкая скорость гликозилирования A^-НА согласуется с общей моделью, в которой секреторные белки подвержены процессингу более медленно, чем цельные мембранные белки. Это различие может сказываться на уровне транспорта в аппарат Гольджи или прохождения через него.

3. Сигналы управления моделью гликозилирования НА не могут располагаться в 38 аминокислотах, которые обычно включены в С-конец молекулы.

В. Планы на будущее

Описанные в данной главе эксперименты свидетельствуют в пользу использования in vitro мутагенеза клонированных генов НА для изучения функции гидрофобных областей белка. Существуют многочисленные возможности распространения этой технологии на другие участки молекулы, включая пептид слияния, антигенные сайты, сайт связывания рецептора и точки прикрепления углевода. Точный анализ роли индивидуальных аминокислот в структуре и функции белка может быть проведен при введении изменений в одном основании в определенных сайтах в гене НА с использованием олигонуклеотидуправляемого мутагенеза [32]. Хотя подобные эксперименты будут особенно уместны для нашего анализа молекулы НА, эти дополнительные результаты весьма ценны для понимания структуры и функции цельных мембранных белков в общем смысле. Не говоря об особенных свойствах, связанных с антигенностью и биологическим значением, структура молекулы НА характерна для основного класса клеточных мембранных белков. Более того, поскольку биосинтез НА включает ферменты клетки хозяина и процессы во время трансляции, мембранного транспорта, гликозилирования и созревания, НА представляет собой полезную модель для изучения мембранных белков и органелл.

Наконец, благодаря доступности копий клонированных ДНК нескольких различных мембран и секреторных белков в настоящее время осуществимо конструирование генов, кодирующих химерные белки, в которых различные области одного белка заменены на другие области из другого белка. В этом направлении можно проанализировать, например, будут ли сигнальные последовательности и/или последовательности погружения функционально взаимозаменяемы между различными мембранными белками и находятся ли последовательности, которые направляют разные гликопротеиды к различным мембранам клеток эукариотов, в цитоплазматическом хвосте, гидрофобной области погружения или в наружном шипе молекул гликопротеида.

Список литературы

1. *Davis A., Hiti A., Nayak D.* — Gene, 1980, v. 10, p. 205—218.
2. *Davis A. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1981, v. 78, p. 5376—5381.
3. *Emtage J., Tacon W., Catlin G et al* — Nature, 1980, v. 283, p. 171—174.
4. *Gething M., Bye J., Skehel J., Waterfield M.* — Nature, 1980, v. 287, p. 301.
5. *Gething M., Sambrook J.* — Nature, 1981, v. 293, p. 620—625.
6. *Gething M., Sambrook J.* — In: Eukaryotic Viral Vectors. Cold Spring Harbor Lab., 1982, p. 29—33.
7. *Gething M., Sambrook J.* — Nature, 1982, v. 300, p. 598—603.
8. *Gluzman Y.* — Cell, 1981, v. 23, p. 175—182.
9. *Gluzman Y. (ed.)* — Eukaryotic Viral Vectors. Cold Spring Harbor Lab., 1982.
10. *Hamer D., Leder P.* — Cell, 1979, v. 18, p. 1299—1302.
11. *Hartman J., Nayak D., Fareed G.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1982, v. 79, p. 233—237.
12. *Heiland I., Gething M.* — Nature, 1981, v. 292, p. 851—852.
13. *Hubbard S., Robbins R.* — J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 4568—4576.
14. *Lai C., Markoff L., Zimmerman S. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1980, v. 77, p. 210—214.
15. *Lamb R., Lai C., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1981, v. 78, p. 4170.
16. *Lamb R., Lai C.* — Virology, 1982, v. 123, p. 237—256.
17. *Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.* — Molecular Cloning—A Laboratory Manual. N. Y.: Colg Spring Harbor Lab., 1982.
18. *McCutchan J., Pagano J.* — J. Natl. Cancer Inst., 1968, v. 41, p. 351—357.
19. *Mellon P., Parker V., Gluzman Y.* — Cell., 1981, v. 27. p. 279—288.
20. *Mulligan R., Howard H., Berg P.* — Nature, 1979, v. 277, p. 108—114.
21. *Neuberger A., Gottschalk A., Marshall R., Spiro R.* — The Glycoproteins. Amsterdam: Elsevier, 1972, p. 450—490.
22. *Pipas J., Adler S., Peden K., Nathans D.* — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1979, v. 44, p. 285—291.
23. *Perucho M., Nanahan D., Lipsich L., Wigler M.* — Nature, 1980, v. 285.
24. *Sveda M., Lai C.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 5288—5292.
25. *Sveda M., Markoff L., Lai C.* — Cell, 1982, v. 30, p. 649—656.
26. *Tabas I., Kornfeld I.* — J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 11655—11663.
27. *Tooze J. (ed.)* — DNA Tumor Viruses. N. Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1980.
28. *White J., Helenius A., Gething M.* — Nature, 1982, v. 300, p. 658—659.
29. *Wiley D., Skehel J., Waterfield M.* — Virology, 1977, v. 79, p. 446—448.
30. *Wigler M., Pellicer A., Silverstein S. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1979.
31. *Young J et al.* — In: The Origin of Pandemic Influenza Viruses. N. Y.: Elsevier/North-Holland, 1983 (in press).
32. *Zoller M., Smith M.* — Methods in Enzymology, 1983 (in press).

7

Мутанты вируса гриппа

Б. Мэйхи (B. Mahy)

Как загадочны все эти изменения!

Льюис Кэролл
«Алиса в Стране Чудес» (глава 5)

I. Введение

Вирус гриппа был первым из вирусов животных, у которого была выявлена генетическая рекомбинация. F. Burnet и P. Lind [33], используя природную изменчивость вируса, обнаружили рекомбинацию в мозге мышей между нейротропным штаммом NWS и ненейротропным штаммом WSN. Дальнейшие многочисленные исследования F. Burnet и соавт. в Австралии, а также G. Hirst и T. Gotlieb в США позволили установить, что рекомбинация между любыми двумя штаммами вируса гриппа может происходить с высокой частотой: около 35—40% [34, 95]. Причина такой высокой частоты рекомбинации (генной пересортировки) оставалась неясной вплоть до 1961 г., когда R. Barry [17] продемонстрировал явление множественной реактивации УФ-инактивированного вируса гриппа и предположил, что вирусный геном может быть выражен «шестью независимыми чувствительными к облучению единицами». G. Hirst [93] пришел к аналогичному выводу на основании экспериментов, в которых бляшкообразующая способность УФ-инактивированного штамма WSN восстанавливалась за счет множества бляшконеобразующих штаммов [274]. Изучение генома вируса гриппа, инактивированного химическими методами, также подтвердило мнение о существовании нескольких независимых генетических единиц [229]. Результаты проведенного в то же время физического анализа генома вируса гриппа соответствовали идее об его фрагментированности, так как невозможно было получить из вириона сегменты РНК бо́льшие, чем порядка 18—20 S [47, 54, 192]. Но прошло еще 10 лет, прежде чем была установлена истинная структура генома вируса гриппа, состоящего из 8 сегментов однонитчатой РНК [18, 178, глава 2 настоящего издания].

В то же время F. Fenner и J. Sambrook [55], занимаясь проблемами генетики вирусов животных, обратили внимание на важную роль условно-летальных мутантов при изучении физиологии вирусной репликации. В том же (1964) году появилось первое сообщение о выделении температурочувствительных (ts) мутантов вируса животных (Синдбис) [32]. Использовав эти результаты, а также доступность бляшкообразующего вирусного штамма (WSN),

R. Simpson и G. Hirst в 1968 г. выделили и охарактеризовали первые ts-мутанты вируса гриппа, обеспечив тем самым базу для дальнейшей работы в данной области. Они продемонстрировали высокую частоту рекомбинации при парном скрещивании у некоторых ts-мутантов, которые можно было разделить на пять групп, а также установили, что, используя подобный подход, можно определить число сегментов геномной РНК и найти соответствие между определенными функциями и отдельными фрагментами генома при помощи биохимического анализа. Основные исследования, проведенные в этом направлении, рассматриваются в настоящем обзоре; работы по генетике раннего периода уже были суммированы E. Kilbourne [120], L. Hoyle [101] и A. Sugiura [260] и не будут здесь обсуждаться.

II. Характеристика вирусных мутантов

Мутации в вирусном геноме распознаются обычно через изменение фенотипа относительно вируса дикого типа. Фенотипические изменения могут в свою очередь влиять на основные свойства вируса, такие, как размер бляшек и морфология (скорость роста), лекарственная резистентность, круг хозяев и патогенность. Однако использование подобных маркеров имеет ограниченную экспериментальную ценность, поскольку они определены одним или двумя генами, затрагивающими частные фенотипические проявления. Наиболее полезным классом мутантов для изучения физиологии репликации являются условно-летальные мутанты, у которых поврежденный вирусный белок функционирует нормально при оптимальных условиях, но неспособен функционировать при непермиссивных условиях. Теоретически подобные мутации могут происходить во всех вирусных генах, что делает такие мутанты особенно ценными для картирования. Условно-летальные мутанты, неспособные к репликации при температуре, превышающей оптимальное значение (ts-мутанты), имели огромное значение для генетических исследований вирусов животных. Другой тип условно-летальных мутантов, так называемые супрессорчувствительные мутанты, широко использовался при изучении бактериофагов [78, 83]. Эти мутанты неспособны расти в большинстве типов клеток хозяина (что контролируется ростом вируса дикого типа) из-за бессмысленных (нонсенс) мутаций, задерживающих синтез неотъемлемых полипептидов. Однако некоторые клеточные штаммы являются пермиссивными для репродукции таких вирусных мутантов, поскольку они содержат супрессорные тРНК, допускающие сквозное считывание бессмысленной мутации. Супрессорные тРНК пока не обнаружены в клетках животных. Некоторые мутанты вирусов животных с супрессорчувствительной терминационной мутацией были определены и изучены in vitro при помощи супрессорных тРНК дрожжей [45].

Обязательным условием генетических исследований является тщательная селекция подходящих систем вирус — клетка хозяина и выделение мутантов из однократно клонированного потомства вируса дикого типа [55]. В случае вируса гриппа эти требования нелегко удовлетворить по следующим причинам: а) несмотря на то что множество различных типов клеток может функционировать в качестве хозяина для вируса гриппа, большинство комбинаций вирус — клетка приводит к усилению цикла абортивной репликации, и вирус не образует бляшек; б) высокие скорости мутабильности и генетической изменчивости генома вируса гриппа поднимают особые вопросы по определению природы популяции вируса дикого типа.

А. Системы вирус гриппа — клетка

Для проведения полноценных генетических экспериментов необходимо, чтобы вирус был способен к бляшкообразованию на используемых клетках хозяина. Это требование в значительной степени ограничило изучение ts-мутантов вируса гриппа использованием штамма WSN при инфицировании фибробластов куриного эмбриона [94, 141, 142, 248] или клеток MDBK [260, 261]; рекомбинанта X-3311 (на основе штамма NWS-A1, репродуцированного на хорион-аллантоисной мембране), образующего бляшки в клеточной линии человеческой конъюнктивы 1-5C-4 [271]; птичьего вируса гриппа А (FPV), репродуцированного в фибробластах куриного эмбриона [9, 150, 222]; некоторых человеческих вирусов — кандидатов в вакцинные штаммы, выращенных на первичных клетках почки цыпленка, обезьяны или быка [137, 159]. Совсем недавно в качестве хозяина для выращивания человеческих вакцинных штаммов были использованы также клетки MDCK [117, 243, 244, 245].

Поскольку в настоящее время уже выяснено, что неспособность многих штаммов вируса гриппа образовывать бляшки в клеточных культурах некоторых хозяев может быть преодолена путем добавления трипсина [14, 122], в будущем можно ожидать расширения круга систем вирус — клетка, используемых для генетических исследований.

Б. Природа вирусной популяции

Любой препарат вируса гриппа представляет собой смесь инфекционных и неинфекционных частиц, общее количество которых можно легко определить либо в РГА, либо в электронном микроскопе. Предварительные подсчеты [53] показали, что 10 вирусных частиц эквивалентны одной инфекционной дозе, определенной путем инокуляции в куриный эмбрион, что является наиболее эффективным из доступных методов.

Определенное недавно Ю. З. Гендоном и соавт. [70, 72] для вируса FPV количество частиц (10 частиц на EID_{50}) почти идентично полученным в 1955 г. данным A. Isaaks и H. Donald [111]. При идеальных условиях препараты FPV, например, могут быть полу-

чены, когда одна бляшкообразующая единица на фибробластах куриного эмбриона эквивалентна одной EID_{50} [37]; однако обычно способность к бляшкообразованию менее выражена, чем инфекционность для куриных эмбрионов. Имеется тем не менее существенное доказательство генетического взаимодействия бляшконеобразующих частиц, и при определенных обстоятельствах эти частицы могут комплементировать. Предполагают, что бляшконеобразующие частицы состоят из физически поврежденных (например, термически инактивированных) частиц, а также из частиц, имеющих неполный набор сегментов геномной РНК. Присутствие более чем одной такой частицы, введенной в клетку, может вызвать комплементацию; подобное явление было продемонстрировано много лет назад в экспериментах с УФ-инактивированным вирусом и отнесено на счет множественной реактивации [17, 91]. Агрегация, или слипание, вирусных частиц увеличивает возможность комплементации между неинфекционными частицами [46, 96]. Биологическая активность таких неинфекционных частиц отмечалась также при изучении фон-магнуссовского неполного вируса гриппа, дающего субпопуляцию дефектных вирионов, которые не реплицируются и не интерферируют в процессе роста стандартного вируса, но способны транскрибировать мРНК (дефектные неинтерферирующие частицы) [38].

Дефектные вирионы гриппа, которые могут интерферировать с ростом нормального вируса [275; см. главу 8 настоящего издания], также вносят свой вклад в большинство популяций вируса гриппа, так как они хорошо сохраняются и накапливаются при множественной инфекции. О вирусной популяции, содержащей такие частицы, говорят, что она неполная; вирусная популяция без подобных дефектных вирионов считается стандартным вирусом. Неполные вирионы характеризуются нарушениями в структуре генома, которые заключаются в утрате или внутренних делециях в трех наибольших сегментах РНК [38, 167, 195]. Недавно было доказано, что делеции и перестройки последовательностей могут происходить внутри любого сегмента РНК [данные P. Jennings, J. Finch, G. Winter, J. Robertson]. Высокая множественность инфицирования клеток в культуре ткани даже в случае стандартного вируса, не содержащего неполных вирионов, порождает специфическое уменьшение сегментов 1—3 РНК в течение первого цикла размножения [38]. Пока неясен механизм возникновения подобных аберрантных форм. Возможное взаимодействие всех компонентов вирусной популяции необходимо учитывать при анализе дефектов в мутантах вируса гриппа, особенно в случае использования высокой множественности заражения.

В. Скорость естественной мутации

Последние достижения генетической техники и метод нуклеотидного секвенирования позволили более детально охарактеризовать скорости мутации в геномах РНК-содержащих вирусов. Эти иссле-

дования показали, что геномам РНК-содержащих вирусов присущи скорости мутации, в миллион раз превышающие скорость мутации хозяйской ДНК-содержащей хромосомы [97]. Этим объясняется относительная легкость выделения спонтанных мутантов из популяций РНК-содержащих вирусов. Температурочувствительные мутанты вируса гриппа, спонтанно возникающие при лабораторных пассажах, впервые были использованы R. Simpson и G. Hirst в 1968 г. [248]; другие мутанты были выделены в более поздних исследованиях [9, 94]. Имеется также несколько сообщений, описывающих выделение естественных ts-мутантов из человеческой популяции [40, 174, 288]. Однако ts-фенотип составляет лишь небольшую часть общего количества мутантов в вирусной популяции, а истинная скорость естественного мутационного процесса может быть значительно выше. C. Brand и P. Palese [28] идентифицировали мутанты вируса гриппа А олигонуклеотидным картированием; после 12 пассажей с бляшки на бляшку все восемь изученных вирусных клонов имели изменения оснований в своих РНК. Однако этот метод не позволяет установить точную скорость ошибки, так как только около 10% генома анализируется Т1-рибонуклеазным картированием [187].

В качестве альтернативного подхода к измерению скоростей мутации A. Portner и соавт. [198] использовали моноклональные антитела и сравнили скорости мутации в отношении к резистентности антител к вирусам гриппа, везикулярного стоматита и Синдбис. Для всех трех вирусов скорости мутации составили около $10^{-4,5}$ на репликацию, тогда как скорость ошибки репликации ДНК E. coli оценивалась как 10^{-8}—10^{-10} [63].

Недавно генетическую вариабельность РНК вируса гриппа PR8 исследовали путем анализа более чем 200 клонов, приготовленных в дериватах бактериофага M13 [59]. Гетерогенность последовательности в клонированной ДНК была представлена одним нуклеотидным различием на 3700 нуклеотидов (3×10^{-4}), но основные ошибки, обусловленные ферментами репликации ДНК, необходимыми для изготовления кДНК, возможно, были столь велики, что затеняли естественную изменчивость в популяции РНК-содержащих вирусов [79, 156].

Г. Индукция мутантов

Большинство выделенных ts-мутантов было производными намеренного мутагенеза [58, 248]. Эта процедура может давать большое число мутаций для каждого мутанта вируса гриппа. Вероятность многократных мутаций впоследствии возрастает за счет пассажей с бляшки на бляшку, проводимых в процессе приготовления пулов мутантов [254]; селекция мутантов с низкой бляшкообразующей способностью при непермиссивной температуре будет также способствовать селекции многократных мутантов [248]. Поэтому велика вероятность появления безмолвных мутаций в дополнение к ts-повреждениям в процессе исследования, и об этом необходимо

помнить при изучении определенных ts-фенотипов. Документировано несколько случаев, когда подобные безмолвные мутации обнаруживались при определенных экспериментальных условиях [117, 165, 265, 267].

1. Мутагены

Для индукции вирусных мутантов используют набор разнообразных мутагенов (табл. 16). Чаще всего вирус выращивают в присутствии 5-фторурацила (5-ФУ). Эффективным является включение 5-ФУ вместо У (до 50% основного замещения); при этом другие основания остаются неизмененными [80]. При репликации 5-ФУ-содержащей РНК происходят переходы А⟶Г и У⟶Ц из-за того, что уменьшается способность 5-ФУ таутомеризовать до енольной формы; в результате в базовом спаривании вместо А участвует Г [64].

Пулы вируса дикого типа обрабатывали либо азотной кислотой, в результате чего происходила дезаминация таким образом, что Ц превращался в У, а А — в гипоксантин [238], либо гидроксиламином, который превращал Ц в дериват, спаривающийся с А [65]. Для приготовления мутантов вируса гриппа использовали также добавку N-метил-N-нитрозомочевины (NTM) в процессе роста или обрабатывали вирус N-метил-N′-нитро-N-нитрозогуанидином (NTG). Эти алкилирующие агенты действовали главным образом на гуанин; вероятно, их мутагенная активность проявляется в О—6-метилировании гуанина [135], что сказывается и на замещениях, и на трансверсиях в процессе репликации нуклеиновой кислоты. Использованные в последнее время для выделения мутантов вируса гриппа другие мутагены [243] представляют собой производные акридина, ICR191, индуцирующего сдвиги рамки считывания в ДНК за счет вставок [10], и УФ-облучение, вызывающее множество переходов и трансверсий в ДНК и способное вносить делеции [239].

Д. Текучесть и реверсия

Текучесть и реверсия представляют собой основные проблемы при работе с ts-мутантами и могут серьезно влиять на интерпретацию фенотипического анализа. Обычно ts-мутанты отбирают таким образом, чтобы они росли при пермиссивной температуре (которая колеблется для различных пулов мутантов вируса гриппа между 31 и 36 °С) и соответственно имели ограниченный рост при непермиссивной температуре (38—42 °С). Предполагают, что молекулярной основой подобной температурной чувствительности служит единственная аминокислотная (mis-sense) замена в белке, что приводит к изменению его скрученности или стабильности, в результате чего белок становится неактивным при непермиссивной температуре. Для большей ясности следует сказать, что у ts-мутантов будут идентифицированы только функции, существенные для

Таблица 16. *Температурочувствительные мутанты вируса гриппа*

Штамм дикого типа	Клетки, используемые для выращивания/метода бляшек	Температура, °С пермиссивная/непермиссивная	Количество мутантов	Мутаген	Количество комплементационных или рекомбинационных групп	Ссылки
WSN(H1N1)	CEF/CEF	39/39,5	56	5-ФУ (23) NTG (23) HNO_2 (3) Спонтанно (21)	8Р	[94, 248]
WSN(H1N1)	CEF/CEF или AOS	33/39	16	5-ФУ (11) НА (5)	5Р	[141, 142]
WSN(H1N1) A2 (H2N2)	МДВК/МДВК	34/39,5	34	5-ФУ (31) НА (3)	7Р	[261, 262]
	ВК/ВК	32/38	2	5-ФУ (2)	—	[159]
Рекомбинант X3311	1-5С-4/1-5С-4	31/38	6	5-ФУ (6)	—	[271]
FPV/Weybridge (H7N7)	CEF/CEF	36/42	15	НА (8) 5-ФУ (4) HNO_2 (1) NTM (1)	5К	[68, 76, 150]
FPV/Rostock (H7N1)	CEF/CEF	33/40	30	5-ФУ (30)	7Р	[123, 222, 226]
Hong Kong (H3N2)	CEF/BK/RMK	33/39	9	5-ФУ (9)	7К	[255, 256]
FPV/Rostock (H7N1)	CEF/CEF	34/40,5	49	5-ФУ (7) NTG (36) Спонтанно (6)	6Р	[4, 9]
FPV/Dobson (H7N7)	CEF/CEF	34/40,5	5	Спонтанно (5)	—	[4, 7, 8]
A/Udorn/72 (H3N2)	BK/RMK	34/40	83	ICR191 HNO_2 УФ Спонтанно	13К 8Р	[243, 244]

размножения вируса, которые могут не затрагивать остальные белковые функции. Текучесть проявляется за счет остаточной активности ts-белка при непермиссивной температуре. Текучесть может быть определена для любого ts-мутанта как отношение количества бляшкообразующих единиц/мл при непермиссивной температуре по сравнению с пермиссивной температурой. Вирусу, размноженному при непермиссивной температуре, конечно, свойственна чувствительность к температуре. Строгим температурным контролем можно свести текучесть до минимума, и это достигается в биохимических экспериментах с ts-мутантами путем погружения сосудов с клеточной культурой в водяную баню для поддержания непермиссивной температуры [74, 262, 285]. В опытах с ts-мутантами вируса FPV/Rostock мы обнаружили, что инкубаторы с подачей подогретого воздуха не обеспечивают адекватного температурного контроля. Необходимо принимать во внимание скорость текучести индивидуальных ts-мутантов, а для биохимических исследований нужно отбирать мутанты, наиболее выраженные по чувствительности к температуре («узкие» мутанты). Текучесть представляет собой немаловажную проблему при получении генетической характеристики в том случае, если мутанты анализируются методом комплементации.

Реверсия влияет на урожай вируса после заражения при непермиссивной температуре, но в этом случае потомство имеет фенотип дикого типа. Дополнительно к обратной мутации в исходном сайте (реверсионная мутация) мутация в другом сайте генома может случайно привести к утрате ts-фенотипа (супрессорная мутация). Супрессорная мутация может происходить в том же самом, что несет ts-повреждение, или в ином гене. Скорость реверсии колеблется, но обычные частоты для мутантов вируса гриппа составляют 10^{-5}—10^{-4}, что значительно превышает те меры предосторожности, которые необходимы при пассировании пулов мутантов без частых проверок сохранения ts-фенотипа. C. Scholtissek и S. Spring [234] изучали скорость реверсии ts-мутантов с повреждениями в различных сегментах РНК. Авторы обнаружили, что скорости реверсии для сегментов 1, 2, 3 и 5 (гены, кодирующие три белка P и NP) превышают скорости реверсии для сегментов 4 и 6, кодирующих гликопротеиды HA и NA соответственно. Сравнительное изучение других групп ts-мутантов не проводилось.

J. Almond [4] выделял мутанты FPV методом увеличения бляшек или спонтанно (Sp-серии), выращиванием с 5-ФУ (mF-серии), обработкой вируса дикого типа 100 мкг/мл NTG (mN-серии) или 50 мкг/мл NTG (без обозначения). Он выделил также 5-ФУ-индуцированные мутанты путем сбора и исследования каждой бляшки (US-серии). Его результаты исследования 49 мутантов сводятся к следующему:

а) стабильность мутантов не связана с методом их выделения;

б) расширенным методом бляшек получены стабильные нетекучие мутанты;

в) два из трех исследованных мутантов US характеризовались абсолютной текучестью;

г) скорости реверсии мутантов варьируют независимо от текучести.

Конечно, здесь не содержится твердых и быстрых правил получения узких мутантов с низкими реверсионными скоростями, но лучше всего, если каждый мутант будут подвергать тщательному анализу, прежде чем он будет использован в экспериментах.

III. Температурочувствительные мутанты

Основной целью выделения и изучения ts-мутантов является исследование механизма репликации вирусного генома. Основные группы ts-мутантов вируса гриппа перечислены в табл. 16. Из-за того что несколько групп включает мутанты, производные от одного и того же вирусного штамма, в номенклатуре мутантов появился некоторый беспорядок. Желательно было бы разработать такую идентификационную систему, чтобы, например, вирус FPV/Rostock, ts3, выделенный группой из Гессена, можно было четко отличить от ts3-мутанта того же вирусного штамма, выделенного в Кембридже. Табл. 17 отражает предлагаемую номенклатуру, на основании которой построен настоящий обзор и которая может найти более широкое приложение.

Таблица 17. *Обозначение вирусных мутантов по месту их выделения*

Штамм	Исследователи	Место выделения	Кодовое обозначение*	Пример
FPV	C. Маркушин и Ю. Гендон [150]	Москва	M	tsM43
	C. Scholtissek, A. Bowles [222]	Гессен	G	tsG3
	J. Almond и соавт. [9]	Кембридж	C	tsC3
WSN	R. Simpson и G. Hirst [248]	Нью-Йорк	NY	tsNY3
	J. Mackenzie [141, 142]	Канберра	CAN	tsCAN3
	A. Sugiura и соавт. [261, 262]	Нью-Йорк и Токио	NYT	tsNYT3
Hong Kong	S. Spring и соавт. [256]	Бетезда	B	tsB315
Udorn	K. Shimizu и соавт. [243, 244]	Бетезда	BU	tsBU1299

A. Генетическое взаимодействие и классификация мутантов

Использование эффективных парных скрещиваний для генетического анализа ts-мутантов, предложенное R. Simpson и G. Hirst в 1968 г. [248], обеспечивает надежный метод группирования, полностью учитывающий сегментированную природу генома. За одним возможным исключением [215, 228] истинно рекомбинаци-

онное событие внутри сегмента РНК все еще не было продемонстрировано для вируса гриппа, хотя такое явление было обнаружено в геноме однонитчатой РНК пикорнавируса [121]. Свободная пересортировка всех сегментов в течение двойной инфекции между двумя ts-мутантами при непермиссивной температуре дает, таким образом, высокие частоты рекомбинации (строже — пересортировки), если мутации имеются в различных сегментах, и незначительные уровни рекомбинации, если повреждения содержатся в одном и том же сегменте. Частота рекомбинации определяется инфицированием двумя ts-родителями (a и b) клеток при пермиссивной температуре и высевом из чашки урожая вируса при пермиссивных (ab^P) и непермиссивных (ab^{NP}) температурах. Для проверки реверсии должны быть проведены одиночные заражения обоими родителями при непермиссивной температуре и отмечены их урожаи (a^{NP} и b^{NP}). Частота рекомбинации (% ts^+[дикого типа] — потомства) может быть рассчитана по формуле:

$$\% \; ts^+ = \frac{ab^{NP} - a^{NP} - b^{NP}}{ab^P} \cdot 100.$$

Несколько групп исследователей, использовавших различные штаммы вирусов, подтвердили, что такое рекомбинационное событие дает стабильное потомство дикого типа, из которого элиминирован ts-фенотип [4, 150, 248, 262].

R. Simpson и G. Hirst [248] продемонстрировали также комплементацию между определенными парами ts-мутантов, когда при смешанных заражениях, проведенных при непермиссивной температуре, получали урожай, в 100 раз больший, чем при одиночных заражениях. В этом случае дочерний вирус состоит из смеси ts-вирусов и ts^+-рекомбинантов. Хотя пары ts-мутантов могут быть отобраны быстрее за счет комплементации, чем рекомбинации, сейчас ясно, что комплементация может происходить между мутантами, имеющими повреждения внутри одного и того же сегмента РНК или даже внутри одного и того же гена. Подобная внутригенная комплементация была обнаружена у мутантов tsG18 и tsG236 вируса FPV/Rostock, которые имели ts-повреждения в сегменте 2 РНК [90], с двумя рекомбинантными вирусами H3N2, также имеющими повреждения в сегменте 2 РНК [154], с сегментами 5 и 6 серии мутантов A/Hong Kong/68 [266] и с сегментами 2, 3, 6 и 8 серии мутантов A/Udorn/72 [H3N2] [242].

Дополнительная трудность комплементационного анализа возникает из-за супрессии ts-фенотипа другим сегментом, предположительно кодирующим белок, который дополняет функциональный дефект в сегменте, несущем ts-повреждение. Подобная экстрагенная супрессия впервые была замечена у ts-мутантов реовируса [201]; сейчас имеется несколько примеров и с мутантами вируса гриппа. M. Tolpin и соавт. [267] обнаружили, что мутация в гене PA рекомбинантного штамма вируса гриппа человека подавляет экспрессию ts-фенотипа гена PB2. Этот пример «супрессорной

мутации» аналогичен данным R. Ramig и B. Fields [201]. Однако в рекомбинационных опытах с FRV/вирус N рекомбинантом 19N, несущим ts-повреждение в сегменте 8 РНК, C. Scholtissek и S. Spring [234, 235] обнаружили, что ts^+-рекомбинанты, образованные с другими штаммами вируса гриппа, имеют замещенные сегменты 1 или 2, но не сегмент 8. На основании этого можно предположить, что продукт(ы) гена сегмента 8 (неструктурные белки) должны в процессе репродукции взаимодействовать с продуктами сегментов 1 и 2 (полимеразные белки). Такие рекомбинанты C. Scholtissek и S. Spring [233, 234] назвали супрессорными рекомбинантами. Похожая экстрагенная супрессия была выявлена при сравнении двух групп мутантов вируса FPV, выделенных в Москве (штамм Weybridge) и в Кембридже (штамм Rostock). При скрещивании двух мутантов, имеющих ts-повреждения в сегменте 1 РНК — tsM29 и tsC44, появлялись рекомбинанты с высокой частотой. Эти ts^+-рекомбинанты сохранили ген, несущий ts-мутацию. Последующий анализ показал, что сегмент 2 штамма Weybridge подавил действие ts-повреждения в сегменте 1 штамма Rostock [72].

Существование внутригенной супрессии определенно будет влиять на результаты комплементационных исследований групп мутантов, хотя и не скажется в такой же степени на рекомбинационном анализе. Тем не менее, исследуя ts-мутанты методом рекомбинации, необходимо помнить о возможности экстрагенной супрессии, поскольку это явление может серьезно затруднить интерпретацию результатов [57, 72].

Два других сообщения о факторах, воздействующих на генетический анализ, касаются независимого отделения ts-роста от ts-активности полимеразы, обнаруженного при изучении холодоадаптированного мутанта A/Ann Arbor/6/60 [117], и доказательства увеличения скорости мутации генома вируса везикулярного стоматита [200]. Однако последнее явление пока не наблюдалось у вирусов гриппа.

Б. Передача ts-повреждений индивидуальным сегментам генома

В 1976 г. независимо во многих лабораториях при помощи электрофореза высокого разрешения в ПААГ в присутствии мочевины было показано, что геном вируса гриппа может быть фракционирован на 8 сегментов [21, 157, 184, 194, 204, 224]. На примере вируса FPV было продемонстрировано, что эти сегменты отличаются друг от друга — вначале методом Т1-олигонуклеотидного фингерпринта [157], затем прямым анализом терминальных последовательностей [208]. Была отмечена тесная связь между количеством сегментов генома и числом наблюдаемых у ts-мутантов рекомбинационных групп. В нескольких лабораториях были разработаны методы передачи ts-мутаций индивидуальным сегментам геномной

РНК. Большинство этих методов использует факт миграционных различий вирусспецифических РНК и полипептидов различных штаммов вируса гриппа при электрофорезе в ПААГ [8, 22, 184, 206].

1. Мутанты из Кембриджа

J. Almond и соавт. [8] использовали мутанты двух штаммов вируса FPV: Rostock (H7N1) и Dobson (H7N7) для получения ts^+-рекомбинантов путем смешанной инфекции при пермиссивной температуре. Рекомбинанты в урожае обнаруживали методом бляшек при непермиссивной температуре, а затем анализировали в ПААГ для определения родительской природы сегментов РНК и внутриклеточных индуцированных полипептидов. Если предположить, что родительские вирусы Dobson и Rostock имеют ts-повреждения в различных сегментах, то с высокой частотой должно будет развиваться ts^+-потомство, содержащее Dobson-РНК-сегмент, соответствующий дефектному Rostock-гену, и наоборот. Остальные шесть сегментов не являются предметом селекции, поэтому данная процедура дает 2^6, или 64, композиционных класса РНК ts^+-потомства [8]. Для того чтобы устранить необходимость анализа огромного количества рекомбинантов, одного родителя (в данном случае ts-Dobson-вирус) подвергали воздействию УФ-лучей до такой степени, чтобы остался один генетически компетентный сегмент РНК на частицу. В результате появлялось ts^+-потомство, имеющее обычно только одну замену ts-сегмента вируса Rostock на сегмент вируса Dobson [7, 8]. При помощи этого метода удалось провести картирование всех шести рекомбинационных групп ts-мутантов вируса FPV/Rostock по индивидуальным сегментам геномной РНК (табл. 18).

Таблица 18. *Результаты картирования групп ts-мутантов вируса гриппа в индивидуальных сегментах РНК*

Сегмент геномной РНК	Комплементационно-рекомбинационная группа					
	FRV (Rostock)		FPV (Weybridge) Москва[3]	WSN Нью-Йорк и Токио[4]	Hong Kong Бетезда[5]	Udorn Бетезда[6]
	Кембридж[1]	Гессен[2]				
1	III	I	C	1	1	A
2	II	III	D	III	5	B
3	V	II	B	II	6	C
4	VI	V	—	VI	—	—
5	I	VI	—	V	4	—
6	—	IV	E	IV	2, 3, 7	F
7	—	—	F	VII	—	—
8	IV	VIII	—	—	—	H

[1] [9]; [2] [222]; [3] [150]; [4] [261; 262]; [5] [255, 256]; [6] [243, 244].

2. Мутанты из Нью-Йорка и Токио

P. Palese и соавт. [183] разработали также метод передачи ts-повреждения, использовав разницу миграции в геле сегментов РНК штаммов вируса гриппа PR8 и Hong Kong [178, 184, 185, 204, 205]. Применив этот метод для ts-мутантов штамма WSN (H1N1), выделенных A. Sugiura и соавт. [261, 262], P. Palese и соавт. [183] получили ts^+-рекомбинанты путем смешанного заражения монослоев клеток МДСК ts-мутантом вируса WSN и ts^+-вирусом Hong Kong при непермиссивной температуре в присутствии трипсина. Рекомбинантное потомство анализировали методом бляшек при непермиссивной температуре в клетках MDBK, в которых не реплицировался вирус Hong Kong [236]. Таким способом комплементационно-рекомбинационные группы пяти ts-мутантов Sugiura (I, II, III, V и VII) были переданы сегментам РНК (см. табл. 18) [183, 203]. Предварительное изучение функциональных дефектов в комплементационно-рекомбинационных группах IV и VI позволило прокартировать их на сегменте 6 (NA) и 4 (HA) соответственно [178, 186, 272]. Мутант tsNYT60S, принадлежащий, по-видимому, к восьмой комплементационно-рекомбинационной группе, изучали K. Nakajima и A. Sugiura [166], но последующий анализ показал, что эта передача была проведена некорректно [A. Sugiura, личное сообщение].

3. Мутанты из Гессена

Для анализа ts-мутантов вируса FPV/Rostock (H7N1), выделенных в Гессене, были приготовлены рекомбинанты при смешанной инфекции фибробластов куриного эмбриона с относительно высокой множественностью ts-мутантом (40 PFU на клетку) и человеческим ts^+-штаммом вируса гриппа (10 PFU на клетку). Использовали данные, что большинство человеческих штаммов не образует бляшек в фибробластах куриного эмбриона, поэтому все бляшки, образованные при непермиссивной температуре (кроме случайных ревертантов ts-мутантов), должны быть рекомбинантами. Это потомство затем трижды пассировали методом бляшек при непермиссивной температуре. Для анализа состава генов этих рекомбинантов использовали метод гибридизации, в котором сегменты меченной ^{32}P РНК родительского вируса FPV/Rostock гибридизировали с насыщающими количествами немеченой комплементарной РНК (кРНК) ts^+-рекомбинанта. кРНК готовили путем инкубации микросомального препарата, очищенного из клеток через 5 ч после заражения рекомбинантом, со всеми четырьмя нуклеозидтрифосфатами и кофакторами [231]. После 20 мин взаимодействия микросомы осаждали при 40 000 g; экстрагированная из надосадочной жидкости РНК представляла собой в основном кРНК [232]. Путем определения рибонуклеазной чувствительности было показано, что для большинства сегментов геномной РНК степень гибридизации между меченной ^{32}P РНК вируса FPV и

кРНК человеческого штамма вируса гриппа не превышает 80%; в случае же гомологичного взаимодействия она составляет 100%. Однако чувствительность метода может быть значительно увеличена, если после гибридизации и до обработки рибонуклеазой прогреть образцы в течение 10 мин при 75 °С в присутствии 1% формальдегида, чтобы расплавить частичные гибридные структуры. Последняя процедура имеет важное значение, особенно для высококонсервативных сегментов, таких, как 7 и 8, но может давать больший разброс в результатах, чем без использования формальдегидного расплавления [224]. При помощи этого метода молекулярной гибридизации можно определить родительскую принадлежность различных сегментов РНК ts^+-рекомбинантов, что позволяет идентифицировать сегмент, несущий ts-дефект (см. табл. 18). Позднее группа ученых из Гессена попыталась сравнить белки, индуцированные родительскими и рекомбинантными вирусами, методом триптического пептидного картирования, который позволил получить полные генетические карты вируса FPV/Rostock и вируса N [82, 212, 213].

4. Мутанты из Москвы

Мутанты вируса гриппа FPV/Weybridge (H7N7), выделенные впервые С. Маркушиным и Ю. Гендоном [150], недавно были изучены с помощью метода, разработанного А. Нау и соавт. [85] для анализа РНК рекомбинантных вирусов. Были приготовлены рекомбинанты между ts-мутантами и человеческим штаммом А/Краснодар/101/59 (H2N2) [67]. Их использовали для инфицирования фибробластов куриного эмбриона в присутствии циклогексимида, ингибирующего синтез вРНК [85, 87]. Затем в присутствии циклогексимида вирусспецифическую кРНК метили ^{3}Н-уридином через 1—4 ч после заражения и после экстракции гибридизировали с немеченой вирионной РНК (кРНК) любого родительского типа. Полученные таким образом двунитчатые РНК после обработки нуклеазой S1 исследовали методом электрофореза в 4% ПААГ. В том случае, когда сегменты вРНК были гомологичны, двунитчатые РНК выдерживали обработку нуклеазой S1; в противном случае частичные гибриды разрушались. На основании этих данных легко можно было определить природу сегментов РНК рекомбинантного вируса [68, 70] (см. табл. 18). Передача некоторых из этих ts-повреждений была также подтверждена рекомбинационным анализом с мутантами вируса FPV/Rostock из Кембриджа [73].

5. Мутанты из Бетезды

Ts-мутанты вируса гриппа A/Hong Kong/68 (H3N2), выделенные S. Spring и соавт. [256], недавно были исследованы в рекомбинации при пермиссивной температуре с вирусом гриппа A/WSN. Ts-рекомбинанты селекционировали благодаря инкубированию урожая с гипериммунной анти-Н3-антисывороткой до образования бляшек

на монослоях клеток MDCK в присутствии трипсина [266]. О геномном составе ts-рекомбинантов судили на основании различающейся миграции в геле родительских штаммов по методу P. Palese и J. Schulman [184], дополненному визуализацией полосок РНК окрашиванием бромидом этидия в УФ-свете. Эти методы позволили установить, что к IV и III комплементационным группам мутантов вируса Hong Kong относятся варианты с мутациями в 5-м (NA) и 6-м (нуклеопротеин) сегментах РНК соответственно [266]. Однако мутанты обеих этих комплементационных групп могли вступать в комплементацию с tsNYT-мутантами вируса гриппа WSN, несущими повреждения в тех же сегментах генома. Сделано заключение, что подобное явление происходит за счет внутрицистронной комплементации [266].

Затем F. Thierry и S. Spring [265] использовали PR/8/34 (H1N1) в качестве ts^+-родителя для производства последующих серий ts-рекомбинантов с ts-мутантами вируса Hong Kong. После выявления сегментов, несущих ts-дефекты, было определено, что VI комплементационная группа вируса Hong Kong связана с сегментом 3 РНК, а комплементационные группы II и VII (дополнительно к группе III) — с сегментом 6 РНК [266]. Наличие трех комплементационных групп, несущих повреждения в сегменте 6, кодирующем нуклеопротеин, было использовано для установления мультифункциональности полипептида NP [265]. Эти результаты совместно с полученными ранее данными генетического и биохимического картирования [152, 181] позволили определить связь ts-мутантов Hong Kong с пятью сегментами РНК (см. табл. 18).

Другая часть полученных в Бетезде ts-мутантов, производных от штамма A/Udorn/72 (H3N2), была сгруппирована в восемь рекомбинационных групп и частично определена локализация мутаций в индивидуальных сегментах их геномной РНК методом комплементационной рекомбинации с мутантами WSN (NYT), повреждения которых уже были картированы. Сейчас установлены мутанты A/Udorn с повреждениями в сегментах 2, 3, 6 и 8, кодирующих полипептиды P1, P2, NP и NS соответственно [244].

6. Заключение

Весь набор разнообразных методов, использованных для передачи ts-мутационных групп индивидуальным сегментам РНК, отражает главным образом техническую изощренность различных лабораторий, работающих с этими мутантами. После проведенного недавно анализа мутантов из Бетезды стало ясно, что можно сделать короткие вырезки в генном назначении, особенно сейчас, когда доступны такие хорошо охарактеризованные мутанты, как, например, мутанты WSN. Возможно, окажется полезным сравнение московских мутантов FPV с мутантами, полученными в Кембридже. Однако, как четко установила группа ученых из Бетезды [244, 266], существует много ловушек при сравнении ts-мутантов, особенно при изучении комплементации. Различные биохимические и гене-

тические взаимодействия, способные привести к внутрисегментной комплементации, наблюдались ранее и подробно обсуждались [244]; о них необходимо помнить всегда при передаче ts-повреждений отдельным сегментам геномной РНК методом рекомбинации.

В. Фенотипический анализ температурочувствительных мутантов

Выделение и изучение ts-мутантов вирусов животных служит главным образом для понимания функциональной организации вирусного генома. После того как в 1976 г. впервые были охарактеризованы 8 сегментов генома вируса гриппа, сразу же был проведен успешный анализ последовательностей РНК и ДНК, что в свою очередь привело G. Winter и соавт. к определению полной первичной структуры (13 588 нуклеотидов) генома штамма A/PR/8/34 (H1N1) [60, 61, 62, 279, 280, 281, 282, 283]. Были секвенированы также сегменты геномов еще нескольких штаммов вируса гриппа A: например, для вируса A/FPV/Rostock (H7N1) определили первичную последовательность сегментов 5 и 8 [155, 196, 197; J. S. Robertson, I. Roditi, в печати]. Плохо изучены пока в этом отношении сегменты 2, 5 и 6. Использование ts-мутантов послужило, таким образом, прекрасной структурной основой для изучения функциональных взаимодействий генных продуктов.

Две серии мутантов штамма WSN, полученных в Канберре [141] и в Нью-Йорке [94, 248], а также мутанты X3311, выделенные в Токио [271], не предназначались для изучения геномных сегментов РНК. Поэтому, несмотря на то, что был проведен фенотипический анализ этих мутантов, представляется затруднительным скорелировать функцию и структуру, и эти ранние работы не рассматриваются в нашем обзоре. Превосходное обобщение фенотипических характеристик этих трех серий мутантов было сделано L. Hightower и M. Bratt [92].

1. Предназначенность полипептидов относительно сегментов РНК

В табл. 19 суммированы данные о геномной структуре вируса PR8 и указаны кодируемые назначения для разных штаммов, на основании которых были получены серии мутантов. Несмотря на то что в разных лабораториях наблюдали отличия в электрофоретической миграции некоторых гриппозных вирусспецифических полипептидов, особенно полипептидов P, видно, что миграция сегментов вирусной РНК в денатурирующих условиях колеблется в значительно меньшей степени. Так, сравнения последовательностей свидетельствуют о том, что сегменты 1 и 3 вируса FPV/Rostock [208] соответствуют сегментам 1 и 3 вируса A/PR/8/34 по ограниченным терминальным последовательностям [50]. Полные последовательности генов 1, 2 и 3 штамма PR8, пронумерованные не по порядку миграции в геле, а по сравнению с терминальными последователь-

Таблица 19. *Сегменты РНК генома вируса гриппа и их кодирующие назначения*

Сегмент	Длина[1] (нуклеотиды)	Длина[2] мРНК (нуклеотиды)	Предсказанная длина[1] полипептида (аминокислотные остатки)	Кодированные полипептиды					
				PR8[3]	WSN[3]	FPV[4] (Rostock)	FRV[5] (Weybridge)	Hong Kong[3]	Udorn[3]
1	2341	2320	759	PB2[6]	PB2	PB2	PB2?	PB2	PB2
2	2341	2320	757	PB1	PB1	PB1	PB1?	PB1	PB1
3	2233	2210	716	PA	PA	PA	PA?	PA	PA
4	1778	1756	566	HA	HA	HA	HA	HA	HA
5	1565	1539	498	NP	NP	NP	NP	NP	NP
6	1413	1391	454	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	1027	1004	252	M1	M1	M1	M1?	M1	M1
		314	97	M2	M2	M2	M2?	M2	M2
		275	9	?	?	?	?	?	?
8	890	868	237	NS1	NS1	NS1	NS1	NS1	NS1
		396	121	NS2	NS2	NS2	NS2	NS2	NS2

[1] На основании анализа последовательности, проведенного G. Winter и соавт. (см. текст).
[2] На основании последовательности вирионной РНК, за исключением хозяйского клеточного праймера и цепи поли(А).
[3] На основании рекомбинационного анализа [178, глава 2 настоящего издания].
[4] [7, 8, 9, 105, 108, 110].
[5] [67, 73, 75].
[6] На основании подвижностей в двухмерных гелях [27, 98, 273].
Знак вопроса означает, что данные назначения еще не определены.

ностями вируса FPV [61, 281], выявили, что генные продукты сегментов 1, 2 и 3 представляют собой основной белок PB2 (м.м. 85 900), большой основной белок PB1 (м.м. 86 500) и кислый белок PA (м.м. 82 400) соответственно. Эти данные полностью согласуются с результатами двухмерного анализа в геле продуктов этих генов для вируса FPV/Rostock [98; C. R. Penn, D. Blaas, E. Kuechler, B. W. J. Mahy, неопубликованные данные], для вируса гриппа WSN [98, 273] и для вируса гриппа A/PR/8/34 [26, 27]. В каждом случае основные белки разделялись на быстро мигрирующие (PB2) и медленно мигрирующие (PB1) полипептиды.

Другие штаммовые различия касаются сегментов 5 и 6 РНК генома, кодирующих соответственно гены нуклеопротеина и NA. Для некоторых вирусных штаммов, как, например, для вируса FPV/Dobson и человеческого штамма Hong Kong, присущ обратный порядок миграции их РНК в геле полиакриламид/мочевина.

2. Мутанты с ts-повреждениями в сегменте 1 РНК

Первый сегмент РНК кодирует основной полипептид PB2, который в случае вируса PR8 имеет м.м. 85 900 [61]. Недавно биохимическим анализом была установлена одна из функций этого белка. В ранних стадиях синтеза мРНК в инфицированных клетках моле-

кула мРНК хозяйской клетки, имеющая метилированную кэп-1-структуру ($m7Г[5']ppp[5']N_m$), узнается вирусным комплексом транскриптазы и может быть использована в праймировании транскрипции. Методами поперечных сшивок при помощи УФ-лучей [273] и фотоаффинной метки [26, 27, 189] in vitro показано, что РВ2 действует как кэп-узнающий белок, причем второй метод имеет преимущество перед первым, поскольку в нем используется транскрипционный комплекс неинактивированной РНК. Белок РВ2 является также кэп-узнающим у всех четырех изученных до сих пор вирусных штаммов — PR8, WSN, FPV/Rostock и FPV/Dobson.

Есть все основания полагать, что генный продукт сегмента 1 РНК функционирует в ранних стадиях вирусной инфекции и включен в синтез мессенджер-РНК. Множество исследований фенотипа ts-мутантов вируса гриппа с повреждениями в сегменте 1 РНК генома подтверждает этот вывод.

а) Активность транскриптазы вирионной РНК

Изучение активности транскриптазы вирионных РНК ts-мутантов из Кембриджа вируса FRV/Rostock показало, что сегмент 1 кодирует белок, включающийся в праймирование действия вирионной транскриптазы. S. Nichol и соавт. [170] анализировали активность вирионной транскриптазы у 11 ts-мутантов из шести различных рекомбинационных групп. Исследования проводили либо при 31 °С (оптимальная температура для активности РНК-транскриптазы), либо при 40,5 °С (непермиссивная температура). Активность РНК-транскриптазы вируса FPV дикого типа, измеренная в присутствии праймера — динуклеотидаденилин (3′ и 5′)гуанозина (ApГ), при большей температуре составила 10—13% от активности, измеренной при 31 °С. Для всех других ts-мутантов в тех же условиях были получены сходные результаты при этих двух температурах, за исключением одного мутанта — tsC17 (группа III), у которого активность при 40,5 °С составляла 1,4% по сравнению с активностью при 31 °С. Было решено, что этот мутант, имеющий ts-повреждение в гене, кодирующем РВ2, является дефектным по ApГ-праймированию in vitro активности РНК-транскриптазы. Дальнейший анализ с использованием кроличьей глобиновой мРНК в качестве праймера вместо ApГ показал, что оба мутанта — tsC17 и tsC44 — являются негативными по активности РНК-транскриптазы, хотя девять других исследованных мутантов (из других рекомбинационных групп) были позитивными. Очевидно, tsC44 (также из III группы мутантов) способен транскрибировать вирионную РНК in vitro в присутствии ApГ (комплементарно 3′-концу сегментов вирионной РНК), но неспособен узнавать (или использовать) кэпированную молекулу мРНК в качестве праймера. После изучения четырех других мутантов III группы обнаружили, что все они дефектны по мРНК-праймированной транскрип-

ции in vitro; три из них (tsC3, tsC5, tsC21) были также негативными при 40,5 °С в ApI'-праймированной транскрипции, но один (tsC9) обладал ts-фенотипом, сходным с таковым у tsC44, реагируя на праймер АрГ, но не на глобиновую мРНК [145, 148].

Эти исследования проводились для того, чтобы определить различия в активностях вирионных РНК-транскриптаз мутантов при 40,5 °С и при 31 °С in vitro, но некоторые из анализируемых ts-мутантов имели активность транскриптазы, в 2—3 раза меньшую при 31 °С, чем у дикого типа. Ранее S. Mowshowitz и M. Ueda [163], работая с мутантами из Нью-Йорка — Токио, показали, что два мутанта I группы с повреждениями в сегменте 1 РНК (tsNYT1 и tsNYT6) являются температурочувствительными для активности вирионной транскриптазы in vitro, однако все эти исследования проводились при температурах более низких, чем пермиссивная температура для роста мутантов in vivo. При использовании в качестве праймера 1 мМ гуанозина [158] активности транскриптаз вирионных РНК измеряли при 25, 28 и 31 °С; за пределами данной температурной области активность ts^+-вируса была стабильной, но активности tsNYT1 и tsNYT6 падали почти до 20% при 31 °С относительно 25 °С [163]. Ни один из изученных мутантов из других рекомбинационных групп не проявлял такого дефекта. Кроме того, S. Mowshowitz и M. Ueda [163] обнаружили, что чувствительность к температуре вирионной транскриптазы обратима вне зависимости от повышенной термолабильности, что было определено измерением инфекционности мутантов I группы после предварительной инкубации при непермиссивной температуре. Недавно эти результаты были подтверждены I. Ulmanen и соавт. [274], которые для анализа активности вирионной транскриптазы tsNYT1 и tsNYT6 вместо вируса, разрушенного детергентом, использовали коры вируса, разрушенного лизолецитином [211]. При этом было обнаружено сходство скоростей транскрипции у ts^+-вируса при 39,5 и 33 °С, хотя транскрипция in vitro для обоих мутантов составляла всего около 15% при 39,5 °С по сравнению с 33 °С. Испытуемая смесь в этих экспериментах включала РНК-4 вируса мозаики люцерны в качестве праймерной молекулы кэпированной мРНК, а ступени ts-взаимодействия можно было определять по 5′-терминальной кэп-структуре на праймере в соответствии с известной функцией PB2 в кэп-связывании [274].

Пока неясно, почему некоторые ts-мутанты имеют пониженную активность транскриптазы вирионной РНК при пермиссивной температуре, так как они должны функционировать при такой температуре в инфицированной клетке. Однако результаты I. Ulmanen и соавт. [274] дают основание предполагать, что липидная оболочка может играть роль ингибитора и, возможно, в том случае, когда вирионы лишены оболочки, ts-полимераза нормально функционирует в инфицированной клетке при пермиссивной температуре. С другой стороны, вполне вероятно, что активности транскриптазы вирионной РНК, составляющей 5% активности вируса дикого типа, все-таки достаточно для инициации нормаль-

ной инфекции. W. Bean и R. Simpson [20], работая с мутантами штамма WSN из Нью-Йорка, обнаружили мутант tsNY24, у которого активность транскриптазы вирионной РНК с трудом определялась при 37 °С и никогда не превышала 5% от активности вируса дикого типа при 32 °С — пермиссивной температуре. К сожалению, неизвестно, который из сегментов РНК несет мутационное повреждение у tsNY24. Активность транскриптазы tsNY24 нельзя было увеличить за счет изменений условий взаимодействия, в том числе замены дивалентных катионов, концентрации детергента или температуры. Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы, выявляемая в микросомальной фракции клеток, инфицированных этим мутантом, была также значительно ниже по сравнению с таковой в клетках, инфицированных ts^+-вирусом [20]. В клетках, инфицированных этим мутантом, были также отмечены уменьшение количества вирионного РНП, несмотря на то что при этом регистрировали обычные урожаи инфекционного вируса [81].

Активности транскриптаз вирионных РНК мутантов из Москвы FPV/Weybridge исследовались Ю. Гендоном и соавт. [74] in vitro при 38 и 42 °С. Исследовали один мутант — tsM29; уменьшение активности фермента при 42 °С относительно 36 °С было подобно тому, что наблюдали у вируса дикого типа (7—20%). Было решено, что tsM29 не обладает дефектной вирионной транскриптазой; при повторных экспериментах авторы утвердились в этом мнении [69].

б) Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы экстрактов инфицированных клеток

Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы обнаруживается и в ядре, и в микросомальных фракциях клеток, инфицированных вирусом гриппа [84, 146, 147, 231, 246, 249]. Группа исследователей из Гессена использовала данную ферментативную активность в качестве маркера для изучения фенотипических изменений синтеза вирусиндуцированной РНК мутантов FPV/Rostock [221, 222, 226]. Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы измеряют in vitro, используя условия взаимодействия, подобные тем, которые применяются для вирионной транскриптазы, за исключением детергентов. РНК, синтезированная в микросомальной фракции in vitro, комплементарна вирионной РНК [84, 219]; поскольку данная ферментативная активность возрастает сравнительно поздно в репродукционном цикле, то вполне вероятно, что она является производной комплексов РНК-транскриптазы, предназначенных для внедрения в зрелые вирионы [147, 246]. Остается неясным, что представляет собой активность РНК-зависимой РНК-полимеразы ядерной фракции. Эту ферментативную активность отмечают в ранних стадиях репродукционного цикла; она синтезирует в основном комплементарную РНК in vitro и для оптимальной активности ей требуются условия, аналогичные таковым для микросомального фермента in vitro [84]. Ни ядерная, ни микросомальная РНК-по-

лимераза не выявляются ранее чем через 2 ч после заражения, поэтому бо́льшая часть исследований проводилась через 5 ч после него. Мутанты, являющиеся температурочувствительными для индуцирования РНК-полимеразы, могут, следовательно, иметь дефекты на любой из многих стадий цикла размножения, в том числе и на тех, которые не касаются синтеза РНК. Неудивительно поэтому, что C. Scholtissek и A. Bowles [222] обнаружили мутанты, негативные по полимеразе, во всех шести изученных рекомбинационных группах.

Десять мутантов I группы (с ts-повреждениями в сегменте 1 РНК) изучали по индуцированию активности РНК-зависимой РНК-полимеразы в ядре и микросомальной фракции через 5 ч после заражения при 33 или 40 °С [222]. Восемь из них оказались негативными по полимеразе (tsG3, 8, 115, 117, 132, 206, 254 и 293), а два были положительными по полимеразе (tsG121 и 290). Негативные мутанты индуцировали менее чем 5% активности при 40 °С по сравнению с 33 °С. Более детально изучали индуцированную активность РНК-полимеразы tsG3. После заражения при 33 °С активность полимеразы, индуцированная этим мутантом, не разрушалась in vivo, если температуру клеток доводили до 40 °С через 4 ч после заражения, а затем исследовали через 5 или 6 ч после него [226]. Кроме того, активность РНК-полимеразы, индуцированная tsG3 при 33 °С, была такой же стабильной, как и у фермента, индуцированного вирусом дикого типа, при исследовании in vitro при 40 °С [226], хотя фермент вируса дикого типа быстрее инактивируется in vitro при температуре выше 38 °С [230].

в) Синтез вирусспецифической РНК in vivo

В клетках, инфицированных вирусом гриппа, обнаруживаются три класса вирусспецифических РНК [80, 89, 250, 251, см. главу 3 настоящего издания]. Первый из этих трех классов — А(+)кРНК — охватывает функциональные мессенджер-РНК [77] и синтезируется в инфицированных клетках в процессе «первичной транскрипции» [19] при отсутствии синтеза вирусспецифических белков. А(+)кРНК представляет собой неполные геномные транскрипты, у которых отсутствует около 16 нуклеотидов, комплементарных 5′-концу вирионной РНК [210, 250, 251] и имеются дополнительные 3′-терминальные полиаденилированные последовательности, а на 5′-концах — гетерогенные кэпированные утолщения из 10—15 нуклеотидов. Эти нуклеотиды появляются, по-видимому, как производные от концов клеточных мРНК или их предшественников в процессе праймирования транскрипции вирусных А(+)кРНК [39, 51, 125, 126]. Второй класс вирусспецифических РНК — А(—)кРНК — включает полные геномные транскрипты 5′-терминальных pppA, которые не нуждаются в праймировании для своего синтеза; считают, что они являются матрицей для синтеза новой геномной РНК в процессе репликации [89]. Третий класс вирусспецифических РНК, синтезируемых в инфицированных клетках, включает

негативно-нитчатые вирионные геномные РНК (вРНК). Ни А(—)кРНК, ни вРНК не синтезируются в инфицированных клетках в условиях первичной транскрипции, когда белковый синтез блокирован добавлением циклогексимида. В ранних стадиях синтеза РНК в клетках, инфицированных ts-мутантами, определяли кРНК и вРНК, но не различали два класса кРНК. Совсем недавно были исследованы все три класса РНК при помощи методов, определяющих суммарное накопление либо вирусспецифических РНК при гибридизации с радиомеченными зондами [16, 149, 263], либо заново синтезированных вирусспецифических РНК, с импульсной меткой в инфицированных клетках, и гибридизованных с избытком немеченных вРНК и кРНК [85, 162], или с однонитчатой гриппозной вирусспецифической ДНК, клонированной в фаге М13 [264].

Исследования раннего периода. В первых исследованиях фенотипа РНК мутантов вируса гриппа изучали включение ^{3}Н-уридина в инфицированных клетках, к которым через 3—4 ч после заражения добавляли актиномицин D [74, 262]. Несмотря на то что актиномицин D ингибирует репликацию вируса гриппа [18], относительно позднее его добавление в цикле размножения в концентрациях, способных подавлять синтез РНК хозяйской клетки, неполностью ингибирует синтез вирусспецифической РНК. В частности, если синтез А(+)кРНК, происходящий в ранних стадиях заражения, чувствителен к действию актиномицина, то синтез А(—)кРНК и вРНК, не требующий «праймирования» хозяйскими клеточными мРНК [89], относительно устойчив к антибиотику [193, 232, 259].

Используя подобный подход, Ю. Гендон и соавт. [74] обнаружили, что tsM29, имеющий ts-повреждение в сегменте 1 РНК, является негативным по синтезу РНК, устойчивому к актиномицину D при непермиссивной температуре. Они провели также эксперименты с tsM29 при повышенных температурах [69]. Инфицированные клетки инкубировали при пермиссивной температуре (36 °С) в течение 3 ч, затем добавляли актиномицин D и через $3^3/_4$ ч после заражения клетки метили ^{3}Н-уридином на последующие 2 ч либо при 36 °С либо при 42 °С. В клетках, инфицированных tsM29, невозможно было заметить никакого синтеза РНК, если мечение ^{3}Н-уридином проводилось при непермиссивной температуре [69]. В более детальном исследовании A. Sugiura и соавт. [262] использовали подобный метод для сравнения синтеза РНК у ts-мутантов и вируса WSN дикого типа при непермиссивной температуре. После инкубирования инфицированных культур при 39,5 °С в течение 3 ч добавляли актиномицин D, а еще через 1 ч — ^{3}Н-уридин в условиях продолжающегося присутствия актиномицина D. Смеси выдерживали еще 2 ч (т. е. 4—6 ч после заражения). После вычитания фона включенного ^{3}Н-уридина в якобы инфицированных культурах инкорпорирование его за счет инфицированных ts-мутантом культур выражали в процентах относительно включения, наблюдаемого в процессе заражения вирусом дикого типа.

Эти исследования выявили, что 7 мутантов с повреждениями в сегменте 1 РНК (tsNYT1, 6, 8, 54, 58, 63 и 65) являются полностью негативными по синтезу РНК, а один (tsNYT55) обусловливает 16,7% включения. У tsNYT55 не выявлено текучести при использованных условиях эксперимента, поэтому можно было сделать заключение, что он позитивен по синтезу РНК и составляет исключение по сравнению с другими мутантами, имеющими повреждения в сегменте 1 РНК. A. Sugiura и соавт. [262] пытались определить, какой именно синтез — кРНК или вРНК — затрагивается в первую очередь; для этого они выдерживали две серии культур при пермиссивной температуре в течение 4 ч после заражения перед добавлением актиномицина D. Затем одну серию оставляли при пермиссивной температуре, а температуру второй серии поднимали до непермиссивных значений, и через 1 ч все культуры метили на 2 ч ^{3}H-уридином, после чего сравнивали уровни синтеза РНК при двух температурах. Шесть изученных мутантов с повреждениями в сегменте 1 РНК оказались негативными по синтезу РНК после подъема температуры (tsNYT54 и 55 не были включены в эту серию).

Анализ фенотипов РНК методом гибридизации. Ю. Гендон и соавт. [69] исследовали синтез вирусспецифической кРНК в клетках, инфицированных tsM29, путем включения метки ^{3}H-уридина через 1—2½ или 2½—4 ч после заражения и определения рибонуклеазорезистентной радиоактивности РНК, выделенной из инфицированных клеток после прокаливания для удаления избытка вирионной РНК. Приблизительно 3% РНК, меченной ^{3}H-уридином, оказались рибонуклеазорезистентны в клетках, инфицированных при 36 °С по сравнению с 1% в клетках, инфицированных при 42 °С. Имеются определенные трудности в интерпретации этих данных, но сами авторы считают, что синтез кРНК ослабляется в клетках, инфицированных tsM29, при 42 °С. Недавно этот мутант был проанализирован подробнее Ю. Гендоном и соавт. [71] при помощи процедуры, разработанной А. Нау и соавт. [85]. РНК, экстрагированную из инфицированных клеток, меченную ^{3}H-уридином через 2¼—3 ч после заражения, прокаливали с избытком немеченой вирионной РНК. А(+) и А(—) гибридные молекулы разделяли LiCl-фракционированием, после чего А(+) молекулы инкубировали с нуклеазой S1; затем двунитчатые РНК анализировали методом электрофореза в ПААГ. Эти эксперименты показали, что уровень синтеза мРНК в клетках, инфицированных tsM29, при 42 °С составляет менее 5% от того же уровня в клетках, инфицированных при 36 °С, хотя синтез мРНК вирусом дикого типа был одинаков при любой температуре. Однако синтез А(+)кРНК в присутствии циклогексимида (первичная транскрипция) был одинаков при любой температуре в клетках, инфицированных tsM29. Были проведены эксперименты с резким подъемом (shift) температуры, когда после 2 ч инкубации при 36 °С добавляли циклогексимид и температуру клеток доводили до 42 °С. В этих условиях синтез А(+)кРНК в клетках, инфицированных

tsM29, прекращался, и отсюда был сделан вывод, что tsM29 имеет дефект во «вторичном» синтезе мРНК. Украшением этих результатов является то, что «первичный» и «вторичный» синтез мРНК включает различные ферменты или ферментативные комплексы. Кроме дефекта во «вторичном» синтезе мРНК, tsM29 оказался также дефектным в синтезе и А(—)кРНК, и вРНК [71].

Мутанты WSN, полученные A. Sugiura и соавт. [262], были проанализированы R. Krug и соавт. [127] и S. Mowshowitz [162] по синтезу вирусспецифических РНК при заражении клеток MDBK. Синтез кРНК изучали в ранних экспериментах методом гибридизации РНК, экстрагированной из инфицированных клеток, с вирионной РНК, меченной ^{3}H-аденозином, после кипячения с низким содержанием соли для диссоциации вирусспецифических двунитчатых форм. Поскольку специфическая активность вирионной РНК составляла только около 10^4 имп/мин/мкг, чувствительность этой процедуры была относительно низка, и нельзя было определять первичную транскрипцию. Однако один мутант I группы (tsNYT6) индуцировал синтез кРНК при 39,5 °С, сравнимый с таковым при 33 °С, и если клетки оставляли при пермиссивной температуре на 5 ч после заражения tsNYT6 и затем доводили температуру до 39,5 °С, то невозможно было определить последующее увеличение количества кРНК [127]. Более поздние эксперименты показали, что ts-мутация в tsNYT6 расположена в сегменте 1 РНК [183].

S. Mowshowitz [162] измерил количество вновь синтезированной РНК в клетках MDBK, инфицированных мутантом WSN, при помощи импульсной метки ^{3}H-уридином на различных сроках. Общую кРНК определили методом гибридизации с немеченой вирионной РНК, а общую вРНК — путем гибридизации с немеченой мРНК, выделенной из инфицированных клеток. Для определения матричной кРНК общую кРНК, меченную ^{3}H-уридином, гибридизовали с немеченой вРНК и дважды пропускали через колонку с бензолированной DEAE целлюлозой, связывающей нуклеиновые кислоты с однонитчатыми участками. Материал, прошедший через такую колонку, анализировали на рибонуклеазорезистентную радиоактивность, измеряя тем самым матричную кРНК, которая представляла собой примерно $^1/_3$ от общего количества кРНК, синтезированной в процессе заражения вирусом дикого типа. Мутант tsNYT1 (I группы) оказался в значительной степени дефектным по синтезу и кРНК, и вРНК, когда инфицированные клетки после 4 ч инкубации при 33 °С переводили в условия 39,5 °С и импульсно метили ^{3}H-уридином в течение 1 ч.

Синтез РНК мутантов вируса FPV из Гессена исследован подобным импульсным мечением инфицированных клеток ^{3}H-уридином через $4^1/_2$—6 ч после заражения и гибридизацией общей меченой РНК с немеченой вРНК или кРНК [226]. Два мутанта с повреждениями в сегменте 1 РНК (tsG3 и tsG132) оказались негативными по синтезу РНК в клетках, выдерживаемых при непермиссивной температуре на протяжении всего заражения, или если

температуру культур резко меняли от пермиссивной до непермиссивной — за $3^1/_2$ ч перед импульсным мечением [222, 226].

Предварительное изучение мутантов вируса FPV из Кембриджа показало, что один мутант с повреждением сегмента 1 РНК, tsC17, дефектен по синтезу всех классов вирусспецифических РНК при непермиссивной температуре [18]. Анализ синтеза трех классов РНК проводили по методу T. Barrett и соавт. [16] — гибридизацией специфических радиомеченных зондов с немеченой РНК, экстрагированной из клеток, инфицированных мутантом. вРНК определяли гибридизацией с ^{3}H-кДНК-зондом, приготовленным при обратной транскрипции вирионной РНК в присутствии праймера — олиго(dГ). Этот зонд содержал последовательности из целого генома [16]. Комплементарную РНК определяли гибридизацией с меченой ^{125}I вирионной РНК; фракции А(+)кРНК и А(—)кРНК были отобраны предварительно при пропускании общей РНК через колонку с олиго(dT)-целлюлозой. Первичную транскрипцию определяли при инкубировании инфицированных фибробластов куриного эмбриона в присутствии циклогексимида на протяжении всей инфекции и анализом РНК, экстрагированной из клеток через 5 ч после заражения либо при 34 °С, либо при 40,5 °С [145, 148, 188]. Все девять изученных мутантов с повреждениями в сегменте 1 РНК (tsC3, 5, 9, 17, 21, 25, 33, 44 и mN5) синтезировали уменьшенные количества кРНК при 40,5 °С по сравнению с 34 °С, хотя количества кРНК в клетках, инфицированных вирусом дикого типа, были одинаковыми при любой температуре. Концентрация вирусспецифической А(+)кРНК (нг/мкг клеточной РНК) в клетках, инфицированных мутантом с повреждением в сегменте 1 РНК, при 40,5 °С колебалась от 29 до 53% относительно концентрации, определенной при подобных заражениях при 34 °С. У двух из этих мутантов (tsC17 и mN5) изучали способность индуцировать синтез А(—)кРНК и вРНК в процессе заражения при двух температурах и в отсутствие циклогексимида. Синтез обоих типов РНК был значительно снижен при 40,5 °С по сравнению с 34 °С [145]. Эксперименты с резким подъемом температуры проводились с мутантом tsCmN5. Заражение проводили при 34 °С за 2 ч до резкого подъема температуры до 40,5 °С и последующей инкубации еще в течение 2 ч до экстракции РНК. В этих условиях синтез и А(—)кРНК, и вРНК достигал того же уровня, что и в клетках, выдерживаемых при 34 °С на протяжении 4 ч после инфицирования. Был сделан вывод, что tsCmN5 дефектен по синтезу мРНК, но не по синтезу матричной или вРНК [148].

г) Синтез вирусспецифических полипептидов

Несмотря на дефекты в синтезе вирусспецифической РНК, обнаруженные при заражении при непермиссивной температуре у мутантов с дефектами в сегменте 1 РНК, имеются лишь немногочисленные сообщения об изменениях в синтезе вирусспецифических полипептидов. Ю. Гендон и соавт. [74] выяви-

ли почти нормальную картину синтеза полипептидов методом импульсной метки, инфицированных при 42 °С на 5 ч tsM29. Подобно тому A. Sugiura и соавт. [262] обнаружили почти нормальные количества РНП, НА и NA при ограничивающей температуре после 10 ч инфекции tsNYT8, 54, 55, 58, 63 и 65, хотя заражение двумя другими мутантами с поврежденным сегментом 1 РНК, tsNYT1, 6, привело к значительному сокращению синтеза этих продуктов. A. Sugiura и соавт. [262] считают, что РНК-негативные мутанты способны синтезировать вирусспецифические белки за счет того, что небольшие количества мРНК транскрибируются из-за низкого уровня текучести или в процессе неусиленной первичной транскрипции, достаточной для кодирования заметных количеств белка.

Исследовали также способность индуцировать синтез вирусспецифических белков двух мутантов вируса FPV/Rostock из Гессена с дефектами в сегменте 1 РНК. Если клетки выдерживали при 40,5 °С на протяжении всего заражения, то невозможно было заметить никакого синтеза вирусспецифических белков у tsG3 [188; C. Scholtissek, личное сообщение]. Однако если культуры инфицированных фибробластов куриного эмбриона инкубировали при пермиссивной температуре (33 °С) в течение 3 ч (tsG3) или 4 ч (tsG293) до резкого подъема температуры до 40 °С, а затем метили через 1 ч различными ^{3}H-аминокислотами, то оба мутанта индуцировали почти нормальные количества всех вирусспецифических полипептидов, хотя и отмечалось, что клетки, инфицированные tsG293, инкорпорируют $^{1}/_{3}$—$^{1}/_{5}$ нормального количества радиоактивности в области Р-белка в геле [222, 226]. Смысл этих наблюдений пока недостаточно ясен, хотя представляется возможным избыточное производство мРНК для белка Р в процессе инкубации при пермиссивной температуре.

Недавно при помощи высокоразрешающего метода электрофореза в ПААГ полипептидов, меченных ^{35}S-метионином, и последующей авторадиографии [106] ts-мутанты вируса FPV/Rostock, полученные в Кембридже, были изучены по способности индуцировать синтез вирусспецифических белков в фибробластах куриного эмбриона. Подобный подход позволил четко охарактеризовать три стадии синтеза вирусспецифических белков в процессе нормальной продуктивной инфекции: самую раннюю стадию (первичная транскрипция), когда все полипептиды синтезируются с эквивалентной скоростью, раннюю стадию (до 2 ч после заражения при 37 °С), когда происходит нарастание синтеза белков NP и NS1, и позднюю стадию, в которой без труда наблюдается нарастание синтеза полипептидов НА, М и NS2 [107, 109]. Ранняя и поздняя стадии схожи в клетках, инфицированных при 34 °С (пермиссивная температура), но при 40,5 °С инфекция протекала быстрее, и картина позднего синтеза белков проявлялась уже к 2 ч после заражения [145, 188]. Было изучено 9 мутантов с повреждениями в сегменте 1 РНК. Каждый раз картина синтеза вирусиндуцированных белков при 34 °С была похожа на синтез белков вирусом дикого типа, а поздний белковый синтез наступал к 4—6 ч после

заражения. При 40,5 °С два мутанта (tsC21 и tsC33) индуцировали такой же синтез белков, как и ts^+-вирус. У шести из этих мутантов при 40,5 °С не наблюдалось характерной картины позднего синтеза полипептидов; белок М синтезировался с такой же скоростью, как и NS1, а синтез НА не определялся при помощи метки ^{35}S-метионином. В то же время наблюдался синтез силайсированного генного продукта — NS2. Исключение составил tsC3, у которого усиление синтеза белков NS1 и NP не предвосхищало усиления синтеза белка М, а начало белкового синтеза было поздним относительно заражения. В клетках, инфицированных tsC3 при 40,5 °С, не наблюдалось синтеза полипептида NS2. Попытка подсчитать уровень белкового синтеза в клетках, инфицированных этими ts-мутантами, путем окрашивания кенацидовым голубым [188], подтвердила, что у всех изученных мутантов с дефектами в сегменте 1 РНК при 40,5 °С накапливается меньшее количество вирусспецифических белков. Эти результаты не позволили составить твердое мнение о роли белка РВ2 в процессе инфекции. Кроме того, стало очевидным, что существует специфическая потребность в РВ2 для контроля переключения от раннего к позднему белковому синтезу.

д) Заключение

Было испытано большое количество мутантов с повреждением в сегменте 1 РНК (кодирующем РВ2) по фенотипическим изменениям при ограничительной температуре (табл. 20). Обе коллекции мутантов вируса FPV/Rostock — из Кембриджа и из Гессена — содержат больше мутантов, относящихся к группе с повреждениями в сегменте 1 РНК, чем к другим рекомбинационным группам. В соответствии с предположениями о важной роли РВ2 в кэп-связывании все мутанты оказались дефектными по транскрипции РНК, а 11 мутантов — дефектными в узнавании кэпированных праймерных молекул мРНК. Варьирующие данные, полученные в процессе изучения белкового синтеза, указывают тем не менее на то, что синтез мРНК не полностью блокирован in vivo, и только один мутант, исследованный более тщательно (tsG3), оказался полностью негативным в данном отношении. Белковый синтез многих мутантов из Кембриджа отличался от синтеза вируса дикого типа тем, что синтез НА не наблюдался при ограничительной температуре и не происходило усиление синтеза белка М при соответствующем усилении синтеза NS1. Эти мутанты были также дефектными по регуляции транскрипции. Представляет интерес, что при ограничительной температуре tsM29 осуществляет первичный, но не вторичный синтез мРНК. Можно, таким образом, предположить, что РВ2 не только участвует в распознавании кэпированных молекул РНК для использования их в качестве праймеров, но и включен также в процесс контроля транскрипции в более поздних стадиях репликационного цикла.

Таблица 20. *Фенотип мутантов вируса гриппа А с ts-повреждением сегмента 1 РНК при ограничительной температуре*

Мутант	РНК-транскриптаза		Вирусспецифическая РНК			Вирусспецифические полипептиды		Примечания
	вирионная	индуцированная	общая[1]	А (+)[2] кРНК	А (−)[2] кРНК и вРНК	ранние	поздние	
C3	—			±		±	±	Задержка синтеза всех полипептидов, NS2 и NS1 не синтезируются
C5	—			±		+	—	
C9	—			±		+	—	
C17	—			±	—	+	—	Вирионная транскриптаза не стимулируется копированной (глобиновой) мРНК у любого мутанта из Кембриджа
C21	—			±		+	+	
C25	—			±		+	—	
C33	—			±		+	+	
C44	—			±		+	—	
CmN5	—			±	—	+	—	А (−) кРНК и вРНК в норме после шифта температуры на 2 ч. Поздний белковый синтез в норме после шифта температуры на 3 ч
G3		—	—		—	—	—	
G8		—						
G115		—						
G117		—						
G121		+						
G132		—	—		—			
G206		—						
G254		—						
G290		+						
G293		—						
M29	+		—	±	—		+	Поздний белковый синтез определен после шифта температуры на 4 ч. Дефектен вторичный, но не первичный синтез мРНК
NYT1	—		—	—	—		—	Дефекты в связывании копированной РНК-праймерной молекулы
NYT6	—		—	—			—	
NYT8			—				+	
NYT54			—				+	Белковый синтез всех мутантов NYT расщепивается как накопление вирусспецифических РНП, НА и NA
NYT55			+				+	
NYT58			—				+	
NYT63			—				+	
NYT65			—				+	

[1] Определено при помощи ^{3}H-уридиновой метки в присутствии актиномицина D.
[2] Определено при помощи метода гибридизации со специфическими зондами.

У двух мутантов с дефектами в сегменте 1 РНК из Кембриджа (tsC21 и tsC33) был обнаружен ослабленный синтез мРНК, но не наблюдалось отличий в синтезе вирусспецифических полипептидов при ограничительной температуре. Непонятно, почему подобные мутанты не образуют бляшек при ограничительной температуре, хотя, возможно, это объясняется не обнаруженным еще до сих пор общим дефектом. Тем не менее некоторые мутации, хотя и неспособны тотально угнетать рост вируса, могут ослабить его таким образом, что не будут образовываться бляшки в течение времени стандартной постановки метода бляшек. В соответствии с этой точкой зрения, J. Almond [4] обнаружил, что оба ts-мутанта (tsC21 и tsC33) являются текучими и способны продуцировать некоторое количество инфекционного (но все-таки ts-) вируса после одного цикла репликации при 40,5 °С.

3. Мутанты с повреждениями в сегменте 2 РНК

Второй сегмент РНК кодирует основной полипептид РВ1, имеющий у штамма PR8 м.м. 86 500 [281]. Он является самым медленно мигрирующим вирусспецифическим полипептидом в ПААГ из всех изученных. Недавно были получены биохимические доказательства того, что функцией РВ1 является инициация транскрипции вирионной РНК за счет катализа процесса удлинения праймерной молекулы. Все сегменты РНК вируса гриппа содержат на 3′-конце последовательность УрЦрГрУрУ [50, 208, 250]. Инициация транскрипции при помощи праймерных кэпированных РНК происходит за счет включения гуанозина в 3′-конец праймерных фрагментов, генерированных активностью вирионной эндонуклеазы. После инкубации коров вируса гриппа WSN в течение 30 мин при 31 °С с (α-^{32}Р)-GTP в присутствии праймерной глобиновой мРНК и последующего облучения в течение 60 мин при 0 °С 3×10^5 эрг/мм^2 УФ-лучами белок РВ1 специфично перекрестно связывался с меченными остатками гуанозина [273]. Если в качестве праймера вместо кэпированных фрагментов РНК использовать динуклеотид АрГ [158], то разрушенные детергентом вирионы (FPV/Rostock) катализируют реакцию АрГ+pppЦ⟶АрГрЦ+ppi в присутствии единственно возможного нуклеотида (α-^{32}Р)-CTP, и в течение этой реакции РВ1 образует ковалентный комплекс с меченым цитидиловым остатком [99]. Происходит это таким образом, что РВ1 несет каталитический сайт для добавления гуанозина или цитозина к праймерной молекуле в процессе инициации транскрипции, хотя пока неясно, катализирует ли данный белок также удлинение цепи. Подобно белку РВ2 белок РВ1 специфично мигрирует в клеточное ядро в разных стадиях вирусной репликации [29].

а) Активность вирионной транскриптазы

При изучении ранних стадий проявления активности транскриптазы РНК in vitro мутантами с поврежденными вторыми сегментами (III группа) из коллекции A. Sugiura получены двусмыслен-

ные результаты [163]. Два мутанта — tsNYT15 и tsNYT101 — дали различные результаты при измерении активности транскриптазы in vitro в пределах температурной области 25—36 °С (т. е. ниже значения ограничительной температуры ts-мутантов). S. Mowshowitz [161] провел всестороннее обследование мутанта ts101, использовав динуклеотидные праймерные молекулы [158] при действии транскриптазы. В реакциях, катализируемых разрушенными детергентом вирусами ts^+- или ts101 при 35 и 28 °С, менялась концентрация динуклеотида АрГ. При уменьшении концентрации АрГ tsNYT101 становился все более и более чувствительным к температуре по транскрипции РНК; оказалось, что ts^+- и tsNYT101 обладают различным аффинитетом к праймеру АрГ при более высокой температуре. Было сделано заключение, что продукт сегмента 2 РНК необходим для инициации синтеза кРНК [161]. Более поздние исследования M. Horisberger [99] подтвердили, что tsNYT101 является температурочувствительным даже при 28 °С в случае использования низких концентраций АрГ в реакционной смеси. Синтез АрГрЦ происходил с одинаковыми скоростями в реакциях, катализируемых tsNYT101 и ts^+-вирусом, если концентрация АрГ составляла 0,4 мМ, но при 0,05 мМ АрГ ферментативная активность мутанта быстро инактивировалась [99].

Сравнение активностей транскриптаз мутантов вируса FPV, выделенных в Москве, показало, что активность транскриптазы in vitro одного мутанта с поврежденным сегментом 2, tsM131, падает почти на 75% при 42 °С по сравнению с таковой при 36 °С, хотя активность ts^+-вируса снижается только на 15% при повышенной температуре [69, 74]. Последние опыты Nichol [169] показали, что tsM131 является также дефектным по АрГ-праймированию транскрипции РНК in vitro. Прямой рекомбинационный анализ ts-мутантов из Москвы вируса FPV/Weybridge и ts-мутантов из Кембриджа вируса FPV/Rostock подтвердил, что tsM131 точно так же дефектен по сегменту 2, как и мутантный вирус FPV/Rostock [73].

S. Nichol и соавт. [170] обнаружили, что активность транскриптазы вирионной РНК двух мутантов вируса FPV/Rostock — tsC1 и tsC15 — слабо уменьшается при 40,5 °С по сравнению с ts^+-вирусом и одинаково реагирует на добавку праймеров АрГ или глобиновой мРНК. Таким образом кажется маловероятным, что полипептид PB1 играет какую-то роль в распознавании кэпированной праймерной молекулы.

б) Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы в экстрактах инфицированных клеток

Два мутанта из Гессена вируса FPV/Rostock, принадлежащих к III рекомбинационной группе, изучали по их способности индуцировать активность РНК-зависимой РНК-полимеразы в цитоплазме или ядре клеток, инкубированных при 33 или 40 °С в течение 5 ч после заражения [222]. В цитоплазме клеток, инфицированных

ts-мутантом, при любой температуре выявлялась активность полимеразы, но при 33 °С активность полимеразы накапливалась в основном в ядерной фракции. При 40 °С ядра клеток, инфицированных ts-мутантом, обладали почти 20% активности РНК-зависимой РНК-полимеразы, обнаруженной в клетках, инфицированных ts^+-вирусом. Накопление РНК-зависимой РНК-полимеразы в клеточных ядрах при 33 °С в результате заражения мутантами tsG90 или tsG93 интерпретировалось как дефект в транспорте комплекса полимеразы из ядра в цитоплазму, а продукт сегмента 2 РНК был назван транспортным белком [220]. В этой связи представляет интерес, что один ts-мутант — ts20 — оказался дефектным по транспорту РПП из ядра в процессе инфекции при ограничительной температуре [143]. Невзирая на такой «транспортный» дефект, синтез вирусспецифической РНК мутантами из Гессена не ослабевал при ограничительной температуре [221]. Позднее E. Heller и C. Scholtissek [90] изучили еще два мутанта из этой группы — tsG18 и tsG236, которые не индуцировали активность РНК-зависимой РНК-полимеразы в клеточных экстрактах при ограничительной температуре [222].

в) Синтез вирусспецифической РНК in vivo

Первые исследования мутантов вируса FPV/Weybridge показали, что tsM131 дефектен по синтезу кРНК при 42 °С [69, 74]. Были проведены эксперименты по резкому подъему температуры; клетки, инфицированные tsM131, выдерживали при 36 °С в течение 3 ч, затем обрабатывали актиномицином D, после чего температуру резко увеличивали до 42 °С перед мечением ^{3}H-уридином. При этих условиях (когда должен был наблюдаться главным образом синтез вРНК) не обнаруживали меченой вирусспецифической РНК или определяемого образования вирусспецифических структур РНП [69]. При детальном изучении tsM131 Ю. Гендон и соавт. [71] обнаружили замедление синтеза и кРНК, и вРНК при ограничительной температуре. Синтез А(+)кРНК не страдал в присутствии циклогексимида («первичная транскрипция»), но значительно ослабевал при 42 °С в отсутствие синтеза белкового ингибитора. Это ослабление рассматривали как вторичное относительно дефекта в синтезе вРНК при ограничительной температуре, а не как результат дефекта в синтезе А(+)кРНК мутантом tsM131 [71]. Подобная зависимость синтеза мРНК от вновь синтезированной вРНК обусловливает синтез мРНК и вРНК, который наблюдали G. Smith и A. Hay [253] при репликации вируса FPV. С другой стороны, ослабление синтеза А(—)кРНК и вРНК в клетках, инфицированных tsM131, при ограничительной температуре явилось прямым следствием температурной чувствительности РНК-репликазы [71], что позволило сделать вывод о принадлежности PB1 к этому ферменту.

Мутанты вируса FPV из Гессена не были изучены столь подробно, но два мутанта с «транспортным» дефектом — tsG90 и

tsG93 — продуцировали почти нормальные количества вРНК и кРНК при ограничительной температуре [222], как и tsG18 [90, 221]. Другие мутанты из Гессена с дефектом в сегменте 2 РНК [90] были тем не менее негативными по синтезу вирусспецифической РНК при ограничительной температуре [222].

Был изучен синтез вирусспецифической РНК одного мутанта из Кембриджа с повреждением в сегменте 2 РНК — tsC15 [145]. Первичная транскрипция в присутствии циклогексимида снижалась почти на 50% при 40,5 °С по сравнению с 34 °С; это снижение соответствовало таковому для мутантов с дефектом в сегменте 1 РНК. Однако вторичная транскрипция и синтез вРНК страдали в большей степени. А(—)кРНК и вРНК изучали после инкубации клеток, инфицированных tsC15, в течение 2 ч при 34 °С, последующего быстрого подъема температуры до 40,5 °С на 2 ч. При этом в культурах, полученных после резкого подъема температуры, наблюдались такие же количества А(—)кРНК, как и в культурах, выдержанных при 34 °С в течение всего 4-часового периода. На основании слабовыраженного синтеза вРНК в шифтовых культурах предположили, что РВ1 непосредственно вовлечен в синтез вРНК [145]. Необходимо отметить, что в этих экспериментах учитывалось только общее количество (накопленное) каждого вида РНК. То, что наибольшая А(—)кРНК синтезируется к 2 ч при 34 °С в данной системе и отсутствует накопленная вРНК между 2 и 4 ч при 40,5 °С, согласуется с предположением Ю. Гендона и соавт. [71] о принадлежности РВ1 к компонентам репликазы.

A. Sugiura и соавт. [262] показали, что три мутанта III группы с повреждением в сегменте 2 РНК — tsNYT5, 15 и 101 — являются негативными при исследовании включения ^{3}H-уридина в присутствии актиномицина D, добавленного через 3 ч после заражения. В более подробном гибридизационном анализе R. Krug и соавт. [127] обнаружили, что tsNYT5 синтезирует некоторое количество кРНК при ограничительной температуре, но tsNYT15 и 101 были полностью негативными. В опытах по температурному шифту клетки, инфицированные tsNYT15, выдерживали при 33 °С в течение 5 ч, затем температуру резко повышали до 39,5 °С. При этом накопление кРНК прекращалось после подъема температуры, на основании чего предположили, что белок Р1 (РВ1) необходим для синтеза кРНК [127, 183]. Такой вывод подтвердился позднее при кинетическом анализе, где учитывалась вновь синтезированная кРНК [162].

Один из мутантов вируса гриппа Hong Kong, полученных в Бетезде, — tsB315 — исследовали путем отжига однонитчатых ДНК-зондов гемагглютининового генного фрагмента, приготовленных в фаге М13 [264]. Зонды ДНК готовили путем любой ориентации, позволяющей определять последовательности кРНК или вРНК, а предварительная селекция поли(А)-содержащей РНК методом хроматографии на олиго(dT)-целлюлозе позволила разделить определенные фракции А(+)- и А(—)кРНК. Клетки метили ^{3}H-аденозином в различные сроки после заражения, и РНК гибри-

дизировалась на фильтрах, содержащих зонды соответствующей немеченой ДНК. В клетках, инфицированных tsB315, скорости накопления всех трех видов исследуемых РНК падали при 39 °С до 20—50% относительно скоростей, выявляемых при 32 °С. Как показали шифтовые температурные опыты, первичный дефект в tsB315 представляет собой неспособность синтезировать А(—)кРНК, что приводит к нарушению как синтеза вРНК, так и нарастания А(+)кРНК [264]. Данные результаты согласуются, таким образом, с ролью РВ1 в активации репликазы.

г) Синтез вирусспецифических полипептидов

Синтез вирусиндуцированных белков в клетках, инфицированных мутантами с повреждениями в сегменте 2 РНК, мало изучен. Ю. Гендон и соавт. [74] обнаружили сильное ослабление синтеза всех вирусиндуцированных белков в клетках, инфицированных tsM131, выдерживаемых при 42 °С в течение 5 ч перед мечением радиоактивными аминокислотами с последующим контролем в ПААГ. Позднее авторы сообщили, что клетки, инфицированные tsM131, выдерживаемые при 42 °С, не проявляют таких характерных ультраструктурных изменений, как при 36 °С, а вирус не созревает на клеточных мембранах [11].

A. Sugiura и соавт. [262] заметили выработку РНП, НА и NA через 10 ч инкубации при 39,5 °С (ограничительной температуре). Все изученные ts-мутанты III группы (tsNYT5, 15 и 101) оказались чрезвычайно несовершенными по наработке этих вирусспецифических компонентов. Единственный изученный с помощью ^{35}S-метиониновой метки при 2 и 4 ч после заражения мутантом из Кембриджа tsC15 индуцировал синтез всех вирусспецифических полипептидов в процессе инкубации при 40,5 °С [145]. Более детальный анализ полипептидного синтеза мутантами данной группы и другой — II-группы пока не осуществлен.

д) Заключение

Детально было изучено сразу несколько мутантов с повреждениями в сегменте 2 РНК (табл. 21), но последние данные по tsNYT101 подтвердили, что РВ1 необходим для инициации транскрипции РНК. На основании исследования 5 мутантов показано, что синтез вРНК также является РВ1-зависимым, хотя и неясно, в какой стадии. Возможно, для инициации синтеза вРНК также требуется РВ1; кроме того, транспортировка полимеразного комплекса из ядра в цитоплазму необходима для синтеза вРНК, а этому процессу также требуется РВ1. Два мутанта из Гессена — G90 и G93, — у которых комплекс РНК-полимеразы задерживается в ядре при ограничительной температуре, позволили C. Scholtissek [220] назвать этот сегмент транспортным геном, а его продукт — $P_{тра}$. Это одна, но не единственная, функция продукта сегмента 2 РНК, хотя и непохоже, чтобы он был связан с процессом инициации,

Таблица 21. *Фенотип при ограничительной температуре мутантов вируса гриппа А, имеющих ts-повреждение в сегменте 2 РНК*

Мутант	Транскриптаза РНК		Вирусспецифическая РНК			Вирусспецифические полипептиды		Примечания
	вирионная	индуцированная	общая	А(+) кРНК[2]	А(—) кРНК[2] и вРНК	ранние	поздние	
C1	+							
C15	+			±	—	+	+	
G18		—	+					Эти мутанты дефектны по транспорту полимеразного комплекса из ядра
G90		±	+					
G93		±	+					
G236		—	—					
M131	—		—	+	—	—	—	
NYT5			±			—	—	
NYT15			—		—	—	—	
NYT101	±		—		—	—	—	
B315				±	—			

[1] Определено при помощи ^{3}H-уридиновой метки в присутствии актиномицина D.
[2] Определено методом гибридизации со специфическими зондами.

являющимся температурочувствительным in vitro. Представляется достаточно надежным до получения более детальной информации о функциях рассматривать этот сегмент как второй, а продукт — как PB1.

4. Мутанты с повреждениями в сегменте 3 РНК

Третий сегмент РНК кодирует кислый полипептид PA, имеющий у вируса PR8 м.м. 82 400 [61]. На основании данных секвенирования [25; J. Robertson, I. Roditi, в печати] и двухмерного электрофореза в ПААГ с неуравновешенным pH и градиентом SDS [98, 100] считают, что продукт сегмента 3 является кислым белком у всех изученных штаммов вируса гриппа А и В.

Имеется мало сведений относительно функции PA. Совместно с PB1 и PB2 он представлен в транскрипционных комплексах, выделенных из инфицированных клеток, которые включают также NP [106]; недавно появилось сообщение о выделении активного транскриптивного комплекса из вирионов PR8, который содержал только PB1, PB2 и PA [116]. Методом импульсной метки (pulse-chase) за клетками MDCK, инфицированными вирусом FPV, показано, однако, что PA отличается от PB1 и PB2 тем, что последние два полипептида быстрее мигрируют в клеточное ядро после синтеза (вместе с NP и NS1), а PA остается в основном (если не полностью) в цитоплазме [29, 148].

а) Активность транскриптазы вириона

В обзоре, посвященном активности транскриптазы мутантов вируса гриппа WSN, S. Mowshowitz и M. Ueda [163] отметили отсутствие значительной температурной лабильности у активности транскриптазы вириона tsNYT53. Подобно тому и московский мутант tsM166 с дефектом в сегменте 3 РНК вел себя как вирус дикого типа при изучении активности транскриптазы in vitro при 36 и 42 °С [74], и не наблюдались температурочувствительные дефекты у мутантов tsC45 или tsCmN4 в присутствии в качестве праймера in vitro ApI' или глобиновой мРНК [170]. Эти сообщения согласуются с отсутствием включения РА в реакцию транскриптазы in vitro, но были изучены всего четыре мутанта, поэтому необходим дополнительный фенотипический анализ, прежде чем делать твердое заключение.

б) Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы в экстрактах инфицированных клеток

C. Scholtissek и A. Bowles [222] обнаружили, что мутант tsG263 с дефектным сегментом 3 РНК не индуцирует активность РНК-зависимой РНК-полимеразы в цитоплазме клеток, выдержанных при 40 °С в течение всего инфекционного периода — $5^1/_2$ ч. Если заражение проводили при 33 °С на 4-м часу, а затем температуру резко поднимали до 40 °С через $4^1/_2$—5 ч после инфицирования, то активность полимеразы индуцировалась и сохранялась на нормальных уровнях. Было сделано заключение, что tsG263-индуцированная активность полимеразы стабильна при 40 °С, даже если циклогексимид присутствовал в течение $1^1/_2$ ч инкубации при повышенной температуре [222]. Это согласуется с полученными до сих пор данными об активностях транскриптаз вирионных РНК мутантов данной группы.

в) Синтез вируспецифической РНК in vivo

Ранние исследования синтеза РНК, когда использовали ^{3}H-уридиновую метку и добавляли актиномицин D через 3—4 ч после заражения, привели к основному выводу, что мутанты с дефектом в сегменте 3 РНК являются РНК-негативными; как уже отмечалось, примененная в этих экспериментах методика, возможно, позволяла обнаруживать синтез только новой вРНК. Ю. Гендон и соавт. [74] вначале определили, что tsM166 также РНК-негативен при использовании данной процедуры. В более позднем исследовании клетки инкубировали с ^{3}H-уридином 2—4 ч после заражения при отсутствии актиномицина D, и вируспецифическую кРНК определяли гибридизацией. Оказалось, что tsM166 не имеет дефекта по синтезу кРНК [69].

Изучение мутантов WSN, у которых включение ^{3}H-уридина измеряли в присутствии актиномицина D, показало, что 7 мутантов

II группы (сегмент 3) [206], tsNYT4, 7, 52, 53, 57, 59 и 103, РНК-негативны [262]. Гибридизационный анализ tsNYT53 выявил, что синтез кРНК подавлен при повышенной температуре, но зависит от множественности, поскольку наблюдается усиление синтеза кРНК при высокой множественности заражения (в противоположность вирусу дикого типа) [127]. Когда температуру клеток, предварительно инфицированных tsNYT53 в течение 4 ч при 33 °С, резко поднимали до 39,5 °С, синтез кРНК продолжался с той же или с еще большей скоростью, чем при 33 °С. Было решено, что мутанты II группы дефектны не по транскриптазе, а скорее всего по синтезу вРНК [127]. Непосредственное измерение синтеза кРНК и вРНК в клетках, инфицированных tsNYT53, подтвердило, что синтез кРНК в основном не затронут при ограничительной температуре, хотя синтез вРНК негативен у этого мутанта [162]. Представляет интерес, что другой мутант из этой группы — tsNYT52 — легко индуцирует дефектные интерферирующие вирус образования при пермиссивной температуре: другие изученные мутанты II группы не обладали таким свойством [168].

Мутант вируса FPV — tsC45 — также является вРНК-негативным [145]. При сравнении клеток, инфицированных при 40,5 и 34 °С этим мутантом, не было обнаружено дефекта в первичной транскрипции. Однако накопление А(—)кРНК и вРНК было меньше 10% при ограничительной температуре, а шифтовые эксперименты подтвердили, что очень мало вРНК синтезируется между 2 и 4 ч при ограничительной температуре, даже при условии, если клетки накапливают А(—)кРНК при ограничительной температуре в течение первых 2 ч заражения [145]. Один мутант вируса FPV из Гессена, дефектный по сегменту 3 РНК, — tsG263 — также оказался негативным по синтезу вРНК и в случае, когда на протяжении всего заражения поддерживалась температура 40 °С, и при шифтовом подъеме температуры до 40,5 °С после 3 ч инкубации при 33 °С [222]. На примере мутантов из Бетезды также изучали роль продукта сегмента 3 в синтезе вРНК. F. Thierry и O. Danos [264] обнаружили, что tsB454 продуцирует А(—)кРНК нормально при 39 °С, но неспособен индуцировать синтез значительных количеств вРНК. Все эти исследования свидетельствуют о непосредственной роли, которую играет PA в синтезе вРНК.

г) Синтез вирусспецифических полипептидов

Относительно синтеза вирусиндуцированных полипептидов различными мутантами, дефектными по сегменту 3 РНК, получены достаточно разноречивые результаты. Ю. Гендон и соавт. [74] не находили дефекта в индуцированном вирусом белковом синтезе при заражении клеток tsM166 при 42 °С по сравнению с 36 °С. Подобно этому и A. Sugiura и соавт. [262] сообщили, что синтез PHII, HA и NA в клетках, инфицированных при 39,5 °С tsNYT4, 7, 52, 53, 57, 59 и 103, протекает так же, как и при заражении вирусом дикого типа. Однако J. Almond [4] не обнаруживал вирусиндуци-

рованных полипептидов в клетках, инфицированных tsCSP10 при ограничительной температуре. Другой мутант из Кембриджа — tsC45 — индуцировал при 40,5 °С с низкой скоростью синтез похожих количеств всех вирусспецифических белков, кроме NS2 (который закодирован в сплайсированной мРНК) [145]. Это напоминает картину полипептидного синтеза, наблюдаемую в клетках, инфицированных вирусом дикого типа, после освобождения от циклогексимидной блокады, т. е. когда осуществлялась только первичная транскрипция [109]. Предположили, что репликационный цикл tsC45 может быть блокирован сразу после первичной транскрипции, поэтому tsC45 неспособен инициировать синтез полных цепей матричной кРНК и последующее усиление вРНК [145].

д) Заключение

Результаты, полученные при изучении мутантов с дефектным сегментом 3, указывают, что РА включен в синтез вРНК в инфицированных клетках (табл. 22). Поскольку этот процесс наименее

Таблица 22. *Фенотип при ограничительной температуре мутантов вируса гриппа А, имеющих ts-повреждение в сегменте 3 РНК*

Мутант	Транскриптаза РНК		Вирусспецифическая РНК				Вирусспецифические полипептиды		Примечания
	вирионная	индуцированная	общая[1]	А(+) кРНК[2]	А(−) кРНК[2]	вРНК[2]	ранние	поздние	
C45	+			+	—	—	±	—	Белковый синтез блокирован в стадии первичной транскрипции
CmN4	+								
CSP10							—	—	
G263		+				—			
M166	+		—	+	—			+	Белковый синтез рассматривается как накопление вирусспецифических РНП, НА и NA
NYT4			—					+	
NYT7			—					+	
NYT52			—					+	
NYT53	+		—	+	+	—		+	
NYT57			—					+	
NYT59			—					+	
NYT103			—					+	
B454					+	—			

[1,2] То же, что и в табл. 21.

понятен из всех стадий геномного формирования после заражения, все дальнейшие выводы о ts-мутантах этой группы должны многократно повторяться. У мутантов с дефектом в сегменте 3 РНК не

было пока отмечено дефекта ни по активности вирионной транскриптазы, ни по первичной транскрипции; таким образом, нет доказательств, что РА играет непосредственную роль в синтезе вирусспецифических мРНК.

5. Мутанты с ts-повреждениями в сегменте 4 РНК

Четвертый сегмент РНК кодирует гемагглютининовый полипептид, который формирует одну из субъединиц тримера, представляющего полный шип НА [277]. У вируса PR8 этот сегмент РНК имеет в длину 1765 остатков; мРНК, синтезируемая с этого сегмента, кодирует гемагглютининовую молекулу-предшественник, которая модифицируется гликозилированием и кливеджем, преобразуясь в бо́льшую субъединицу НА1 и меньшую субъединицу НА2 [282]. Изучено несколько мутантов с повреждениями в сегменте 4 РНК; при этом не было отмечено дефектов в синтезе вирусспецифической РНК.

A. Sugiura и соавт. [262] сообщили кратко, что один из их мутантов IV группы — tsNYT104 — был дефектен в гемагглютинации, но это оказалось результатом текучести при биохимическом анализе. Показано, что другой мутант — tsNYT61 — является двойным мутантом (V и VI группы), имеющим необычную лабильную при нагревании гемагглютинирующую активность: отделение одиночных мутантов tsNYT61 привело к получению одного из них, относящегося к VI группе и сохраняющего дефект НА; его назвали tsNYT61S [272]. В клетках, инфицированных tsNYT61S с множественностью выше чем 1 PFU на клетку, при пермиссивной температуре наблюдали цитопатический эффект, но активность НА и NA не выявлена в культуральной среде. Однако активность NA, но не НА, обнаруживали в экстрактах клеток, выдержанных при непермиссивной температуре в процессе заражения. Потомство высвобождали из tsNYT61S-инфицированных клеток при 39,5 °С за счет смешанной инфекции при пермиссивной температуре температурорезистентным рекомбинантом H3N1, и те частицы, что имели НА-серотип ts-родителя, были все температурочувствительными, имеющими ts-дефект в гене НА [272].

В клетках, инфицированных tsNYT61S, были выявлены два очевидных дефекта. Первый заключался в том, что ни НА, ни его негликозилированный предшественник (НА0) не наблюдались в клетках, инфицированных при ограничительной температуре и меченных [^{14}C]-глутамином или [^{14}C]-фукозой. Второй сводился к тому, что НА мутанта tsNYT61S даже при пермиссивной температуре обладал необычной лабильностью к нагреванию и проявлял меньшую чувствительность к кливеджу на НА1 и НА2 в хозяйских клетках MDBK, чем вирус ts^+ [272]. Позднее сообщалось, что tsNYT61S в действительности синтезирует НА при непермиссивной температуре, но в частично гликозилированной форме, отличающейся по подвижности в геле от НА зрелого ts^+-вируса [179].

Четыре мутанта из Гессена имели ts-дефекты в сегменте 4 РНК

и два из них — tsG227 и 79 — были дефектны по активности НА [222]. Детальный анализ tsG227 показал, что НА синтезируется при ограничительной температуре и инкорпорируется в грубый эндоплазматический ретикулум, но не транспортируется к гладкому эндоплазматическому ретикулуму или к клеточной поверхности [134]. Предположительно НА, сформированный при 40 °С, не имеет структурных особенностей, необходимых для содействия переносу к клеточной поверхности. Этот миграционный клеточный ts-дефект отчасти предотвращает полное гликозилирование и протеолитическое расщепление НА-мутанта; манноза и глюкозамин инкорпорируются, а галактоза и фукоза только прикрепляются при пермиссивной температуре. Как и в случае tsNYT61S, синтез NA в клетках, инфицированных tsG227, протекает нормально при ограничительной температуре, что свидетельствует о небольшой взаимозависимости процессов наработки двух оболочечных гликопротеидов [134].

Три мутанта из Кембриджа имели ts-повреждения в сегменте 4 РНК и один из них — tsCUS4 — оказался температурочувствительным по гемагглютинации [9]. Тесты гемагглютинации с этим мутантом можно было ставить при 34 °С, но при 40,5 °С не происходило гемагглютинации эритроцитов [4]. Сформированные при 34 °С комплексы вирус — эритроцит диссоциировали при 40,5 °С. Другой мутант — tsC46 — не синтезировал заметных количеств полипептида НА в клетках, инфицированных при 40,5 °С; не образовывался ни зрелый НА, ни молекула негликозилированного предшественника [J. McCauley, P. Colloby, неопубликованные данные]. Неизвестно, на каком уровне блокируется синтез НА у этого мутанта.

6. Мутанты с ts-повреждениями в сегментах РНК, кодирующих нуклеопротеид

Пятый — самый большой — сегмент РНК кодирует NP. Для штамма PR8 NP представляет собой основную, богатую аргинином, молекулу, состоящую из 498 аминокислот [280]. В основном полагали, что транскрипция вирусной РНК осуществляется в комплексах, состоящих из одного или более белков P, так же как и NP, и подобные комплексы, выделенные из инфицированных клеток, проявляли транскрипционную активность [35, 42, 106, 211, 240]. Однако недавно появилось сообщение о выделении активного комплекса транскриптазы РНК, содержащего только три белка P; NP был удален двумя циклами центрифугирования в Cs_2SO_4 [116]. Большое количество мутантов с ts-повреждениями в гене NP оказалось дефектным по последним стадиям цикла репликации вируса, включая синтез вРНК и созревание вируса.

а) Активность транскриптазы РНК

При изучении активности транскриптазы in vitro мутантных вирионов tsNYT S. Mowshowitz и M. Ueda [163] на примере одного мутанта V группы — tsNYT56 — не обнаружили чувствительности

к температуре, хотя эксперименты проводились при температуре ниже ограничительной. Подобно тому при испытании tsC34 и tsCUS1 в присутствии либо АрГ, либо глобиновой мРНК (добавленных в качестве праймерных молекул in vitro) активность транскриптазы РНК была сравнимой с таковой у ts$^+$-вируса при 40,5 °С [145, 170]. C. Scholtissek и A. Bowles [222] сообщили об индуцированной активности РНК-зависимой РНК-полимеразы четырех мутантов VI группы из Гессена. Три из них — tsG19, tsG71 и tsG283 — при 40,5 °С индуцировали около 50—70% активности полимеразы, обнаруживаемой в клетках, выдержанных при 33 °С. Необходимо отметить, что ts$^+$-вирус в этих экспериментах индуцировал при 40 °С активность полимеразы, на 30—50% бо́льшую, чем при 33 °С, но тем не менее эти два мутанта были отнесены к положительным по РНК-полимеразе. Другой NP-мутант — tsG81 — оказался негативным по полимеразе, поскольку менее 5% активности, индуцированной при 33 °С, наблюдалось в клетках, инфицированных при 40,5 °С. Все испытания в этих экспериментах проводились при 32 °С, поэтому не удалось установить, сохранялась ли сформированная ранее чувствительность к температуре индуцированной активности РНК-зависимости РНК-полимеразы [222].

б) Синтез вирусспецифической РНК in vivo

A. Sugiura и соавт. [262] сообщали, что tsNYT56 был негативен по синтезу РНК in vivo, хотя другой мутант с дефектным геном NP — tsNYT12 — включал около 30% всего количества ^{3}H-уридина в присутствии актиномицина D по сравнению с ts$^+$-вирусом. Предположили, что tsNYT12 был текучим мутантом, что позднее подтвердили R. Krug и соавт. [127]. Они обнаружили, что tsNYT56 не имеет дефекта по синтезу кРНК и продолжает синтезировать кРНК после шифтового подъема до ограничительной температуры на 5-м часу после заражения. Несмотря на отсутствие непосредственных измерений в этом исследовании, было решено, что синтез вРНК дефектен в клетках, инфицированных tsNYT56 [127].

Один из мутантов VI группы из Гессена — tsG19 — не имел дефекта в синтезе РНК, хотя другой мутант — tsG18 — был негативен по синтезу вРНК [222]. Ни кРНК, ни вРНК не синтезировались в клетках, инфицированных tsG81 и выдерживаемых непрерывно при 40,5 °С. Однако если клетки выдерживали при 33 °С в течение 4 ч после заражения и затем температуру резко поднимали до 40 °С на последующие 2 ч, то синтезировалось очень немного вРНК, несмотря на присутствие нормальных количеств кРНК [220]. Было решено, что дефект мутанта tsG19, который не являлся, очевидно, дефектным по синтезу вирусспецифической РНК, обнаруживается в какой-либо стадии созревания вируса [221].

Единственный изученный мутант с дефектным NP-геномом из Кембриджа — tsCUS1 — не синтезировал ни А(—)кРНК, ни вРНК, выдерживаемых при 40,5 °С на протяжении всей инфекции. Однако если клетки выдерживали при 34 °С в течение 2 ч и затем

температуру быстро доводили до 40,5 °С, то А(—)кРНК накапливалась нормально, а вРНК скапливалась только до 40% относительно концентрации, достигаемой в клетках, постоянно выдерживаемых при 34 °С [145]. Таким образом, фенотип tsCUS1 подобен фенотипу tsG81.

Два NP-мутанта вирусного штамма Hong Kong анализировали при помощи однонитчатых ДНК-зондов, приготовленных методом М13-клонирования. Как и в случае мутантов из Гессена, два мутанта из Бетезды имели совершенно отличный фенотип: tsB463 не имел заметных ts-дефектов по синтезу вирусспецифической РНК, в то время как tsB2C синтезировал сокращенные количества А(+)кРНК и не синтезировал вРНК при ограничительной температуре [264].

в) Синтез вирусспецифических полипептидов

В клетках, инфицированных tsNYT12 и tsNYT56, было обнаружено сокращенное производство РНП, НА и NA [262], но сообщений о дальнейшем изучении белков этих мутантов не было. C. Scholtissek и A. Bowles [222] изучали картину вирусиндуцированных полипептидов в клетках, инфицированных tsG19; большинство полипептидов синтезировалось нормально при 40 °С, но наблюдалось ослабление синтеза белков М и/или NS1. Метод тонких срезов геля, использованный в этих экспериментах, дал слабое разрешение в данной области ПААГ. Картина вирусиндуцированных полипептидов в клетках, инфицированных tsCUS1, была сходной при ограничительной и неограничительной температурах [145].

г) Заключение

Относительно небольшое число мутантов с ts-повреждениями в гене NP составили предмет фенотипического изучения (табл. 23). Изученные мутанты попадали в один из двух классов: в одной группе синтез вРНК является чувствительным к температуре, а в другой синтез вирусспецифической РНК и белков протекает явно нормально. В последнем случае предположили, что существует ts-дефект в процессе созревания вируса. Например, по всей видимости, NP требуется для взаимодействия и с сегментами РНК, и с матричным белком в процессе ассамблирования. Подобная двойственная роль NP в синтезе вирионной РНК и ассамблировании соответствует генетическому свидетельству — внутрицистронной комплементации, случающейся с этим сегментом [244, 265, 266]. При изучении ts-мутантов пока не получено доказательства, что NP играет роль в синтезе мРНК, и это согласуется с недавним выделением транскрипционно активных комплексов, содержащих только белки P [116].

Таблица 23. *Фенотип при ограничительной температуре мутантов вируса гриппа А, имеющих ts-повреждение в сегменте РНК, кодирующем нуклеопротеид*

Мутант	Транскриптаза РНК		Вирусспецифическая РНК				Вирусспецифические полипептиды		Примечания
	вирионная	индуцированная	общая[1]	А(+) кРНК[2]	А(−) кРНК[2]	вРНК[2]	ранние	поздние	
G34	+				+	±	+	+	
CUS1	+								
G19		±		+	+	+	+	±	Ослаблен синтез M/NS1
G71		±							
G81		±		+	+	±			
G283		±							
NYT12			±					±	Ослаблен синтез РНП, НА и NA
NYT56			−	+	+	−		±	
B2C				±		−			
B463				+	+	+			

[1] Определено при помощи метки ^{3}H-уридином в присутствии актиномицина D.
[2] Определено методом гибридизации со специфическими зондами.

7. *Мутанты с ts-повреждениями в сегменте РНК, кодирующем нейраминидазу*

Было выделено большое количество мутантов, дефектных по NA, и их изучение имело существенное значение в понимании роли этого белка в процессе вирусной репликации. C. Scholtissek и A. Bowles [222] отметили, что три мутанта — tsG113, 210 и 288, принадлежащие к IV рекомбинационной группе, продуцировали при 40 °C НА, который давал только неполную гемагглютинацию в стандартном тесте и не продуцировал заметной активности NA. Если клетки, инфицированные мутантом, инкубировали при 33 °C, активности NA составляли 1% (tsG113) или 10% (tsG210 и tsG288) от обнаруживаемой в клетках, инфицированных ts^+-вирусом. Освобождение вируса не страдало при 40 °C, и урожай ts-мутантного вируса, титруемый при 33 °C, был подобен тому, что получали при 33 °C в экспериментах с единичным циклом. Однако образование бляшек этими тремя мутантами было ненормальным при 40 °C, и только крошечные бляшки образовывались в процессе длительной инкубации [222].

Два мутанта с дефектным нейраминидазным геном штамма WSN (tsNYT3 и 11), изученные P. Palese и соавт. [186], проявляли отчасти различный фенотип. Активность NA этих мутантов оказалась термолабильной, даже если вирус нарабатывался при 33 °C. Самые интересные результаты были получены, когда клет-

ки, инфицированные мутантным вирусом, исследовали методом электронной микроскопии [186]. При 39,5 °С в этих клетках наблюдали морфологически интактные вирусные частицы, но большие агрегаты вирионов накапливались возле клеточной поверхности. Оболочки таких агрегированных вирусов содержали нейраминовую кислоту, что было выявлено путем окрашивания коллоидным железом. Было решено, что эта нейраминовая кислота служит рецептором для НА других вирионов, способствуя тем самым агрегации частиц и препятствуя их освобождению с клеточной поверхности. Обработка бактериальной NA способствовала разрушению агрегатов, образованных при ограничительной температуре, и восстанавливала активность НА. Эти данные позволяют предположить, что вирусная NA необходима для репликации не потому, что это требуется для высвобождения из клетки, а для того, чтобы предотвратить агрегацию частиц за счет НА [186].

Недавно было выявлено частичное отличие фенотипа tsM5, имеющего повреждение в сегменте 6 РНК, кодирующем NA у штамма Weybridge вируса FPV [67, 70]. В клетках, инфицированных tsM5, при непермиссивной температуре отмечался синтез всех видов вирусспецифической РНК, а также синтез всех вирусспецифических белков. Однако при сравнении с клетками, инфицированными ts^+-вирусом, выяснилось, что регуляция синтеза РНК и белков меняется в клетках, инфицированных tsM5, при непермиссивной температуре. Синтез сегментов 1, 2, 3, 4, 6 и 7 РНК, и кРНК и вРНК, а также синтез соответствующих им полипептидов был ослаблен в поздней фазе цикла роста (начиная с 3-го часа после заражения), и вирусный морфогенез был поврежден. И NA, и НА, синтезированные при непермиссивных условиях, функционировали нормально и мигрировали от шероховатого эндоплазматического ретикулума в плазменные мембраны, хотя кливедж НА был нарушен [70]. Пока неясно, что представляет собой мутация в гене NA, которая, не влияя на энзиматическую активность, может предотвратить формирование вириона; еще труднее понять, какова роль NA в регуляции синтеза РНК и транскрипции. Тем не менее эти результаты позволяют предположить, что роль NA в процессе вирусной репликации не сводится только к предотвращению формирования вирусных агрегатов.

8. Мутанты с ts-повреждениями в сегменте 7 РНК

Седьмой сегмент РНК кодирует матричный (М) полипептид (м.м. 28 000) — наиболее обильную белковую часть вириона, а также один или, возможно, два дополнительных полипептида с неизвестными функциями. Изучение последовательности этого сегмента у вирусного штамма PR8 выявило две открытые рамки считывания [3, 279], которые были также обнаружены в сегменте 7 РНК вируса FPV [155] и A/Udorn/72 (H3N2) [131]. Однако анализ сегмента 7 вирусспецифической РНК в клетках, инфицированных вирусом, показал, что имеются не две, а три мРНК, произведенные

от этого сегмента в процессе сплайсинга [103, 105, 132, 133]. Дополнительно к белку М второй белок (М2) с неизвестной функцией был обнаружен во множестве клеток, инфицированных вирусом гриппа [129], но продукт третьей мРНК, транскрибированной с сегмента 7 РНК (?М3), не идентифицирован (см. главу 2).

Последовательность белка М высококонсервативна у изученных до сих пор штаммов вируса гриппа, и этим в сочетании с малым размером мишени данного сегмента и существованием перекрывающихся рамок считывания можно объяснить тот факт, что были описаны только три мутанта с ts-повреждениями в сегменте 7 РНК. A. Sugiura и соавт. [262] сообщали о двух мутантах VII группы — tsNYT51 и tsNYT62, у которых впоследствии были обнаружены повреждения в сегменте 7 РНК [203]. При заражении этими мутантами при непермиссивной температуре не наблюдались дефекты ни в синтезе РНК, ни в наработке РНП, НА или NA, а индуцируемые цитоплазматические эффекты были эквивалентны таковым при заражении вирусом дикого типа [262]. В клетках, инфицированных мутантами, при непермиссивной температуре синтезировались все вирусспецифические полипептиды (Tobita K. и Palese P., неопубликованные данные, изложенные в [206]). Более глубокий анализ tsNYT51 и tsNYT62 не проводился.

Недавно Ю. Гендон и соавт. [73] провели фенотипический анализ tsM303/1, имеющего ts-повреждение в сегменте 7 РНК, что было показано скрещиванием с отличающимся штаммом вируса FPV/Rostock, у которого все восемь геномных сегментов различаются по подвижности [151]. Вирионы tsM303/1 проявляли неполную гемагглютинирующую активность даже после выращивания на яйцах при пермиссивной температуре и имели отношение $ИД_{50}$/ПА в 20 раз большее, чем в случае ts^+-вируса. В клетках, инфицированных tsM303/1, при непермиссивной температуре происходил синтез всех типов РНК и полипептидов, но не наблюдался синтез функционально активных НА и NA. В частности, не осуществлялся кливедж НА на НА1 и НА2 при ограничительной температуре, и даже при пермиссивной температуре он был значительно слабее, чем в случае ts^+-вируса. При изучении рекомбинантных вирусов между tsM303/1 и tsC46 было обнаружено, что НА мутанта tsM303/1 не содержит ts-повреждения; подобные скрещивания с вирусом A/England/42/72 подтвердили также, что NA tsM303/1 не имеет дефекта. Было решено, что нарушение кливеджа НА у этого мутанта происходит не за счет изменения молекулы НА и не за счет изменения NA, способного повернуть вспять кливедж НА [237]. Скорее всего, некоторое конформационное изменение белка М оказывает воздействие на созревание НА и NA у этого мутанта, хотя нельзя исключать возможность того, что ts-дефект выражается через изменение белка М2 или М3, индуцированного tsM303/1 [73]. Представляется интересным дальнейшее выделение ts-мутантов с дефектами в сегменте 7; они должны оказаться полезными при изучении роли белков малого сегмента 7 РНК в процессе репликации вируса гриппа.

9. Мутанты с ts-повреждениями в сегменте 8 РНК

Самый маленький геномный сегмент РНК вирусов гриппа кодирует два неструктурных белка — NS1 и NS2, которые синтезируются со сплайсированных мРНК, закодированных в перекрывающихся рамках считывания [104, 108, 128, 130]. NS1 (м.м. 26 000) является ранним вирусспецифическим белком, который быстро мигрирует в клеточное ядро после синтеза в цитоплазме [29, 52]; позднее в ростовом цикле вируса NS1 формирует цитоплазматические включения у некоторых штаммов вируса гриппа [160, 241], чего не наблюдается у других вирусов, например FPV [191]. Эти включения представляют собой NS1, комплексированный с РНК [286]; то, что они не наблюдаются при некоторых вирусных инфекциях, может объясняться различиями в заряде белка NS1, который является основным в клетках, инфицированных вирусом A/Udorn, но кислым в клетках, инфицированных вирусом FPV191. NS2 (м.м. 14 000) накапливается в инфицированных клетках позднее, чем NS1, и остается в цитоплазме [29, 144].

До сих пор детально изучено только три ts-мутанта, имеющих дефекты в сегменте 8 РНК, и они были производными от штамма Rostock вируса FPV. По всей видимости, как и в случае сегмента 7, выделение мутантов ограничено малыми размерами мишени, консервативностью последовательности и присутствием перекрывающихся рамок считывания. Однако недавно K. Shimizu и соавт. [244] обнаружили в своей коллекции из 136 мутантов A/Udorn еще четыре мутанта с дефектом в сегменте 8. Фенотипический анализ этих мутантов пока не проведен.

J. Almond [4] выделил два мутанта с повреждениями в сегменте 8 РНК. Один из них — tsC47 — индуцирует синтез полипептида NS1, характеризующегося подвижностью, превышающей нормальную [8], и м.м. 23 000 [209]. Это является стабильным фенотипом, не зависящим от температуры: недавно при анализе последовательности сегмента 8 tsC47 была выявлена бессмысленная мутация в нуклеотиде 634, у которого остаток Ц замещен остатком У в геномной РНК [209]. Этот переход Г в А в транскрипте приводит к изменению кодона УГГ (trp) в последовательности мРНК на бессмысленный кодон УГА (opal). Однако единичное основное изменение расположено внутри перекрывающейся рамки считывания, и в этой рамке превращает кодон ГГА (gly) в кодон ГАА (glu) в NS2-мРНК. Неясно поэтому, наблюдаются ли фенотипические изменения у tsC47 в результате превращений в NS1, NS2 или обоих полипептидов. Представляет интерес, что потеря 28 аминокислот на карбоксильном конце NS1, индуцируемая tsC47 явно не влияет на рост этого мутанта при пермиссивной температуре.

Фенотипическое исследование tsC47 свидетельствует, что активность вирионной транскриптазы при ограничительной температуре подобна таковой для ts^+-вируса и нормально реагирует на праймирование глобиновой мРНК или АрГ [170, 285]. Синтез А(+)кРНК также протекает нормально в клетках, инфицированных tsC47, при 40,5 °С, а содержание А(—)кРНК увеличено, как и в клетках с

ts^+-вирусом, вплоть до 2½ ч после заражения. Однако синтез вРНК в клетках, инфицированных tsC47, при 40,5 °С сокращен до 6% относительно того, что обнаруживается при 34 °С. Шифтовый подъем температуры до 40,5 °С в течение 3 ч после заражения блокировал репликацию вируса [285].

Кроме дефекта по синтезу вРНК, в клетках, инфицированных tsC47, были обнаружены изменения в регуляции синтеза вирусспецифических полипептидов. Переключение от раннего к позднему белковому синтезу [109] протекало нормально при 34 °С и не происходило при 40,5 °С, так что синтез НА и М был значительно сокращен. Хотя NS2 наблюдался только при пермиссивной температуре в этих экспериментах [285], совсем недавно NS2 был также обнаружен в клетках, инфицированных tsC47, при 40,5 °С, невзирая на то что относительное количество мРНК для этого белка сокращено [D. Smith, S. Inglis, неопубликованные данные].

Подобное исследование tsCmN3 показало, что этот мутант индуцирует картину синтеза вирусспецифической РНК в инфицированных клетках подобно той, что наблюдается для tsC47 [285]. В частности, вРНК не синтезируется при ограничительной температуре, хотя А(—)кРНК и А(+)кРНК накапливаются с похожими скоростями при более высоких и более низких температурах. Присутствие кРНК при фактическом отсутствии вРНК у этих мутантов позволяет предполагать, что бо́льшая часть кРНК может транскрибироваться с инфекционной вирионной РНК.

Полипептидный синтез в клетках, инфицированных tsCmN3, ограничен при 40,5 °С ранним синтезом, как и в случае tsC47. Однако белок NS2 не наблюдался ни при более высокой, ни при более низкой температуре в этих экспериментах [285]. Недавно мРНК, кодирующая NS2, была идентифицирована в клетках, инфицированных tsCmN3, при пермиссивной температуре методом меченой гибридизации с использованием фрагментов специфической клонированной ДНК, произведенной с сегмента 8 РНК вируса FPV [D. Smith, S. Inglis, неопубликованные данные]. Однако концентрация NS2-мРНК в клетках при пермиссивной температуре была более чем в 10 раз ниже в клетках, инфицированных мутантом, по сравнению с клетками, инфицированными ts^+-вирусом, а полипептид NS2 пока не обнаружен в клетках, инфицированных tsCmN3, ни при какой температуре. Конечно, не исключена возможность того, что NS2, индуцируемый tsCmN3, имеет измененную подвижность, и в настоящее время проводятся эксперименты с учетом такой возможности.

Третий мутант с дефектным сегментом 8 РНК — tsG412 — имеет поздний дефект в вирусной репликации [123]. Этот мутант был получен путем 5-ФУ-мутагенезом от N-рекомбинанта вируса FPV/Rostock (90/N3), который несет сегменты 2 и 8 РНК от вируса N, а все остальные — от вируса FPV. При непермиссивной температуре все виды вирусспецифической РНК синтезируются нормально, и активность РНК-зависимой РНК-полимеразы не ослаблена в клетках, инфицированных tsG412, по сравнению с таковой

в клетках, инфицированных родительским вирусом. Единственный отчетливый дефект, отличающийся от неспособности продуцировать инфекционные частицы, заключается в том, что не происходит переключения от раннего белкового синтеза к позднему [123]. В этом отношении фенотип tsG412 имеет сходство с фенотипом tsC47 и tsCmN3.

C. Scholtissek и S. Spring [233, 234] сообщали о двух дополнительных ts-мутантах, полученных путем мутагенеза вируса 19N, возможно, частично гетерозиготного вируса [228]. Один из них — tsG451 — оказался двойным мутантом с повреждениями в сегментах 5 и 8; другой — tsG526 — мог быть получен за счет рекомбинации с ts-мутантами всех групп (с I по VI) из Гессена, но не рекомбинировал с tsG412, поэтому предположили, что он представляет собой единичный рекомбинант с повреждением в сегменте 8. Тем не менее возможность присутствия дефекта также и в сегменте 7 РНК не была учтена. Не было сообщений о подробных фенотипических исследованиях этих мутантов, но в данных экспериментах было сделано два интересных наблюдения. Во-первых, одновременная замена 2-го или 1-го и 3-го сегментов РНК сегментами других штаммов вируса гриппа восстанавливала свойства нормального роста у этих мутантов, хотя повреждение в сегменте 8 сохранялось. Это явление, названное супрессорной рекомбинацией [233, 234], обусловливает то, что продукты полимеразных сегментов кооперируют с неструктурным(и) белком(ами) в процессе репликации и соответствуют вРНК-негативному фенотипу, наблюдаемому у tsC47 и tsCmN3 [285].

Второй интересной особенностью этих экспериментов явилось то, что по крайней мере один случай супрессии ts-фенотипа рекомбинанта tsG526 происходил в клетках фибробластов куриного эмбриона, но не в клетках MDCK [234]. Это наводит на мысль, что хозяйский фактор также может быть необходим для кооперации с генными продуктами сегмента 8 и/или с продуктом сегментов с 1-го по 3-й в процессе репликации. Зависящие от хозяина ts-мутанты вируса A/Udorn также были изучены K. Shimizu и соавт. [243] и рассматриваются более подробно в разделе V.

Г. Вакцины, полученные на основе температурочувствительных мутантов

Много лет назад предположили, что ts-мутанты вирусов гриппа могут быть аттенуированы и поэтому достойны изучения в плане конструирования живых вакцин [140]. Пониженная температура (32—34 °С) верхнего респираторного тракта принципиально допускает размножение ts-вирусов, репликация которых должна быть ограничена в легких и в нижнем респираторном тракте. Серьезные исследования в данном направлении были проведены B. Murphy и соавт., недавно был опубликован обзор этих результатов [164]. Наиболее широко изучены два вирусных ts-донора — рекомбинанты ts1 [E] и ts1A2. Исходный родительский вирус ts1 являл-

ся производным штамма Asian (H2N2), A/Great Lakes/65 после обработки 5-ФУ [159] и был рекомбинирован со штаммом A/Hong Kong/68 (H3N2), давая мутант НК/68-ts1[E], имеющий ts-повреждения в сегментах РНК, кодирующих белки PB2 и NP [181]. Второй клон, полученный рекомбинацией ts1 со штаммом Hong Kong дикого типа, обозначенный как ts1[A], был рекомбинирован со штаммом A/Udorn/72 (H3N2) для выделения клона [189], содержащего одно ts-повреждение в сегменте 1 РНК, и уже этот клон был рекомбинирован с мутантом V группы вируса Hong Kong из Бетезды (tsB315), имеющим ts-повреждение в сегменте 2 РНК, чтобы получить рекомбинант A/Udorn/72-ts1A2, дефектный по обоим белкам — и PB2, и PB1 [152].

Степень аттенуации этих двух донорских вирусов сравнивали при испытании рекомбинантов штамма A/Victoria/75, названных A/Vic/75-ts1[E] и A/Vic/75-ts1A2, на экспериментальных животных и волонтерах [164]. Рекомбинанты, содержащие ts1A2, оказались отчасти более слабыми по вирулентности, чем рекомбинанты ts1[E], и были генетически стабильнее. Однако включение в эти исследования рекомбинанта A/Alaska/77-ts1A2, использованного для вакцинации серонегативных детей, привело к возвращению фенотипа дикого типа, что было связано со многими генетическими изменениями, включающими экстрагенный супрессор и другие мутации [165, 267]. Хотя у привитых и не было выраженных симптомов, ревертант (обозначенный FV1319) достиг высокого титра in vivo и обладал вирулентностью, сравнимой с таковой для вируса дикого типа A/Alaska/77, при интраназальном введении серонегативным взрослым волонтерам [267].

Генетическая нестабильность этих кандидатов в вакцинные донорские штаммы иллюстрирует замечательную способность генома вируса гриппа подвергаться изменениям даже в тех генах, кодирующих внутренние белки, которые почти не затрагиваются при антигенном селекционном давлении. В случае, когда мутации формируют основу будущих аттенуированных вакцин вируса гриппа, необходимо разрабатывать пути преодоления этой проблемы.

IV. Холодоадаптированные мутанты

Один из подходов в разработке аттенуированных штаммов вируса гриппа, пригодных для вакцинации человеческой популяции, представляет собой адаптация вируса к оптимальному росту при низкой температуре, так что рост ограничен при 37 °С. Холодоадаптированное (cold-adapted — ca) свойство может быть затем передано подходящему кандидату в вакцинные штаммы путем генной пересортировки. Подходящие донорные ca-вирусные штаммы были разработаны в СССР на основе вирусов A/Ленинград/9/46 (H1N1) и A/Ленинград/134/57 (H2N2) Г. Александровой и соавт. [1, 2] и в США на основе вируса A/Ann Arbor/6/60 H. Maassab и соавт. [137, 138, 139, 171]. Все эти вирусы оказались температурочувстви-

тельными и либо неспособными образовывать бляшки при 39 °С, либо плохо растущими на куриных эмбрионах, инкубированных при 40 °С. Недавно был опубликован подробный отчет об использовании этих вирусов для приготовления аттенуированных рекомбинантных вакцинных штаммов и в клинических испытаниях [119], в связи с чем эти результаты здесь не рассматриваются. Однако генетическая основа са-фенотипа была недавно исследована у обоих вирусов — Ленинград и Ann Arbor, и эти данные будут кратко изложены.

Ts-повреждения в ленинградских са-вирусах были обнаружены рекомбинацией с мутантами вируса FPV, выделенными в Москве или Кембридже. Отсутствие рекомбинации со специфическими мутантами указывало на повреждения у са-вируса А/Ленинград/9/46 (пассированного 37 раз при 25 °С) в сегментах 1, 2 и 7 и у вируса А/Ленинград/134/57 (пассированного 47 раз при 25 °С) в сегментах 1, 2, 5, 7 и 8 [119].

Са-мутанты A/Ann Arbor/6/60 были проанализированы подобным же образом в рекомбинационных опытах с мутантами tsNYT штамма WSN N. Cox и соавт. [43]. Рекомбинация происходила во всех изученных группах, за исключением III группы, с повреждением в сегменте 2 РНК, на основании чего можно было предположить, что этот сегмент несет ts-повреждение у са-вируса. Однако это противоречило полученным ранее результатам, в которых подобные рекомбинационные эксперименты с ts-мутантами из Бетезды вируса Hong Kong привели к обнаружению ts-повреждения в сегменте 1 РНК са-мутанта Ann Arbor [257, 258]. Для разрешения этого противоречия была приготовлена серия рекомбинантов при 33 °С между са-мутантом и либо определенными мутантами tsNYT, либо ts^{+}-вирусом A/Ann Arbor/9/73 (H3N2). Полученные клоны ts^{+}- и ts-вируса анализировали для определения происхождения сегментов их РНК, но ни один сегмент РНК не соответствовал ts-свойству, и каждый сегмент са-мутанта вируса A/Ann Arbor/6/60 присутствовал в одном или более не-ts-рекомбинантном вирусе [43, 44]. Единственным соответствием с ts-свойством было то, что сегменты 1 и 7 РНК са-мутанта всегда присутствовали в ts-рекомбинантных вирусах. Поэтому было решено, что генетический синергизм между белками М и РВ2 в какой-то степени соответствует ts-свойству.

Помимо наличия ts-свойства, биохимические опыты с са-вирусом A/Ann Arbor/6/60 выявили, что каждый сегмент содержит мутации относительно вируса дикого типа [44]. Однако фенотипический анализ са-вируса в процессе заражения клеток MDCK или клеток фибробласта куриного эмбриона при 39 °С показал отсутствие дефекта по сравнению с вирусом дикого типа, за исключением более медленной скорости миграции белка Р2 [44]. Было решено, что са-мутации действуют на поздние репликационные функции [119].

V. Мутанты круга хозяев

Репликация вируса гриппа либо на клетках в культуре, либо в почке животного целиком характеризуется узким кругом видов пермиссивных хозяйских клеток [18, 190, 276]. Мало изучены факторы, управляющие пермиссивностью каждого данного типа хозяйских клеток. Некоторые клетки вообще непермиссивны, но во многих случаях вирус гриппа претерпевает абортивный репликационный цикл, который может быть блокирован в любой стадии вплоть до процесса окончательного созревания [36]. Однако конечный результат всех подобных взаимодействий характеризуется неспособностью вируса образовывать бляшки на ограничительных монослоях хозяйских клеток, и это свойство было использовано для установления мутантов круга хозяев (host-range — hr) вируса гриппа. Подобные мутанты могут быть как условными температурозависимыми (td), так и неусловными — известны оба типа. Кроме того, присущая вирусам гриппа способность претерпевать замену сегментов РНК за счет пересортировки привела к выделению hr-рекомбинантных вирусов.

A. Неусловные мутанты круга хозяев

Вирус FPV не образует нормально бляшки на клетках ВНК или L, в которых репликационный цикл абортивен. J. Zavada [287] адаптировал штамм Dobson вируса FPV (A/FPV/Dutch/27, H7N7) к бляшкообразованию на клетках ВНК. Оригинальный штамм Dobson пассировали 5 раз, колонию чистили 3 раза на клетках фибробласта куриного эмбриона и обозначали как вирус Dobson дикого типа. Hr- мутанты получали попеременным выращиванием на клетках фибробласта куриного эмбриона и ВНК шестью пассажами и последующими семью последовательными пассажами и одной очисткой колонии на клетках ВНК. Полученный вирусный клон сохранял способность вырастать до высоких титров на куриных эмбрионах (J. Zavada, личное сообщение, опубликованное в [4]).

A. Israel и соавт. [114] сравнивали hr-мутант Dobson с вирусом Dobson дикого типа и отметили разницу в миграционных свойствах НА двух штаммов при электрофорезе в ПААГ, что подтвердили другие исследователи [6]. Тем не менее создавалось впечатление, что hr-свойство штамма Dobson связано не с 4-м, а с 1-м сегментом РНК. J. Almond [4] получил пулы вируса Dobson дикого типа и hr-мутанта, клонированного J. Zavada, от A. Israel (Париж), — трижды чистил hr-мутант на бляшках в клетках фибробластов куриного эмбриона при 40,5 °С и назвал окончательный клон 4Н. При сравнении этого клона с вирусом Dobson дикого типа оказалось, что оба вируса образуют бляшки на клетках ВНК, но только hr-мутант на клетках фибробластов куриного эмбриона. L. J. Almond и соавт. [8] приготовили большое количество рекомбинантных вирусов, содержащих 1-й сегмент РНК мутанта Dobson и 2-й, 3-й и 4-й сегменты РНК вируса Dobson дикого типа. Эти рекомбинанты были hr-, и, следовательно, 1-й сегмент РНК hr-мутанта Dobson несет hr-свойство.

бинантов между вирусами FPV/Rostock (которые не образовывали бляшек на клетках ВНК или L) и hr-Dobson (клон 4Н). Способность некоторых из этих рекомбинантов образовывать бляшки на клетках ВНК либо L коррелировала только с наличием сегмента 1 РНК вируса 4Н, который кодирует РВ2 [5, 6]. Возможность причастности кливеджа НА к hr-свойству не учитывалась, поскольку методом импульсной метки белков, образованных в инфицированных клетках, было показано, что кливедж НА происходит одинаково у вирусов Rostock и Dobson в клетках каждого типа [6].

Подтверждением вовлечения сегмента 1 РНК в определение круга хозяев явились исследования способности ts-мутантов из Гессена вируса FPV/Rostock образовывать бляшки на клетках MDCK при пермиссивной температуре — 33 °С [227]. Все мутанты образовывали бляшки на клетках фибробластов куриного эмбриона, но четыре мутанта по сегменту 1 РНК (tsG3, 115, 117 и 132) и два мутанта по сегменту 2 РНК (tsG90 и 93) не образовывали бляшек на клетках MDCK. Однако мутанты обеих групп были генетически компетентными в клетках MDCK, поскольку tsG3 и tsG90 могли дополнять один другой и образовывать бляшки в клетках, инфицированных одновременно обоими мутантами. Неясно, несет ли ts-повреждение ответственность за hr-ограничение у этих мутантов, но эти свойства были ковариантны, поскольку ревертанты, селекционированные ради утраты ts-повреждения, вновь приобрели способность образовывать бляшки в клетках MDCK [227]. E. Tuckova и соавт. [12, 268, 269] показали, что вирус гриппа A/NWS-D размножается на клеточных линиях диплоидных фибробластов человека (LEP) или в культуре фибробластов эмбриона хомяка (HEF), но очень близкий вирус A/WS-МК не растет ни на одном из клеточных штаммов. Рекомбинантный вирус круга хозяев (r_{12}), выделенный при скрещивании родительских штаммов, продуцировал 7 сегментов РНК от родителя WS и только 1 сегмент (6-й) от родителя NWS [75]. Этот рекомбинант растет в клетках HEF, по-видимому, из-за того, что происходит кливедж НА, в отличие от родителя WS, так что некоторый дефект в NA вируса WS несет ответственность за хозяйскую рестрикцию. Тем не менее вирус r_{12} не размножается в клетках LEP, и иной ген NWS должен нести ответственность за способность к росту в человеческих клетках [75].

Ген NA также был вовлечен в способность вируса A/WSN образовывать бляшки в клетках почки быка (MDBK). Были приготовлены рекомбинанты между вирусами A/WSN и либо A/GM1, либо A/Hong Kong, которые не образовывали бляшек в клетках MDBK. Бляшки могли быть продуцированы в клетках MDBK вирусами НК-WSN или FM1-WSN, несущими только ген NA вируса WSN, в то время как рекомбинант вирусов WSN-НК, содержащий только NA НК, неспособен образовывать бляшки [237].

Оба этих исследования свидетельствуют о том, что функцией NA является способствование кливеджу НА, необходимому для образования бляшек. Однако C. Scholtissek и соавт. [225] сообщили

о рекомбинанте FPV-A/Hond Kong (81/H0), который несет ген HA вируса FPV, но неспособен образовывать бляшки в клетках фибробластов куриного эмбриона, хотя и образует их в клетках MDCK. Этот рекомбинант был получен при смешанной инфекции tsG81 или tsG19 и штамма Hong Kong в клетках MDCK при ограничительной для мутанта температуре (39 °C) и приобрел сегменты 1, 2, 5, 6 и 8 РНК от вируса Hong Kong, а сегменты 3, 4 и 7 — от вируса FPV. Способность к бляшкообразованию в клетках фибробластов куриного эмбриона коррелировала с патогенностью для цыплят, поэтому рекомбинант 81/H0 был апатогенным [225]. Взаимосвязь между генной констелляцией и патогенностью сложна и выходит за рамки настоящего обзора; авторитетное мнение относительно факторов, затрагивающих патогенность, можно найти у R. Rott [216] и в главе 9.

Б. Условные мутанты круга хозяев

Температурочувствительные мутанты круга хозяев (td-hr), имеющие расширенный круг хозяев только при пермиссивной температуре, обеспечивают удобный подход для идентификации hr-генов. A. Israel [112] охарактеризовал один подобный мутант (td4), который он выделил путем 5-ФУ-мутагенеза hr-мутанта вируса FPV/Dobson и селекционировал по способности к бляшкообразованию на клетках L при 34 °C, но не при 39,5 °C. Этот мутант не был температурочувствительным при выращивании в клетках фибробластов куриного эмбриона. Ts-дефект располагался в сегменте 1 td4, поскольку при замене данного сегмента сегментом вируса FPV/Rostock восстанавливалась способность к бляшкообразованию в клетках L при 39,5 °C. Фенотипический анализ этого мутанта подтвердил, что синтез вРНК был дефектен в клетках L, но не в куриных клетках при 39,5 °C [112].

K. Shimizu и соавт. [242, 243, 245] изучили 36 ts-мутантов вируса A/Udorn, имеющих td-ограничение по хозяевам. Четыре из этих мутантов были ограничены по способности к бляшкообразованию на клетках почки обезьяны резус (RMK), но могли образовывать бляшки на клетках MDCK при 40 °C. Остальные 32 мутанта (обозначенные типом III) образовывали бляшки на клетках RMK, но были ограничены по способности к бляшкообразованию на клетках MDCK при 40 °C. У 16 из этих 32 мутантов типа III было обнаружено более чем 10 000-кратное снижение способности к бляшкообразованию на клетках MDCK при 40 °C. Для 15 мутантов был определен локус ts-повреждения: 5 имели мутацию в сегменте 2, 2 — в сегменте 3, 4 — в сегменте 6 (NP) и 4 — в сегменте 8. Было решено, что клетки RMK содержат хозяйские факторы, подавляющие ts-дефект в этих td-hr-мутантах [245].

Возможно, что генетическое взаимодействие, подобное тому что наблюдается для td-hr-мутантов, лежит в основе температурной чувствительности вирусов, апатогенных для цыплят. R. Rott и соавт. [218] обнаружили, что только патогенные рекомбинантные ви-

русы способны нормально размножаться при 41 °С, температуре тела птиц, в то время как патогенные и апатогенные вирусы одинаково хорошо растут при 37 °С. Каждый раз, когда патогенные рекомбинанты получали скрещиванием вирусов FPV/Rostock и A/индюк/England/63, сегменты 1, 2 и 3 РНК происходили от одного родителя. Смешанное происхождение сегментов с 1-го по 3-й ассоциировалось с утратой патогенности для цыплят, так же как и с потерей способности к росту при 41°С[218].

В. Заключение

Результаты, полученные при анализе мутантов круга хозяев вирусов гриппа, указывают на тесную кооперацию между генами Р и некоторым пока еще неопределенным, факторам клетки хозяина в процессе вирусной репликации. В частности, PB2 имеет отношение к детерминанту круга хозяев в нескольких исследованиях. Известно, что этот белок взаимодействует с кэпированными мРНК хозяйской клетки, но нет доказательств в пользу специфической распознающей последовательности у этих мРНК, которые используются вирусом в качестве праймеров. Наиболее вероятно, что некоторые физические воздействия на комплекс транскриптазы внутри клеточного ядра могут препятствовать правильности регуляции транскрипции в определенных клетках. хозяина.

VI. Мутанты, устойчивые к амантадину

Некоторые лекарства будут ингибировать репликацию вирусов гриппа в клеточной культуре, и несколько химиотерапевтических агентов были идентифицированы [173, 177]. Однако генетические исследования устойчивости к лекарствам почти полностью были ограничены амантадином (1-адамантанамином) и его производными [56], первоначально изученными W. Davies и соавт. [48]. Это лекарство ингибирует репликацию вируса гриппа в самой ранней стадии — перед первичной транскрипцией [252], и хотя, по всей видимости, «раздевание» ингибируется [115, 124], конкретно пока неясно, какая именно стадия подвергается воздействию. Амантадин ингибируется внутриклеточно в лизосомах, что приводит к возрастанию в них pH [172], но антивирусные свойства лекарства представляются зависимыми в большей степени от его наличия в экстраклеточной среде, чем внутри клетки [202].

Размножение устойчивых к лекарству мутантов наблюдали в клеточных культурах [41] и на мышах, обработанных амантадином [175, 176], но было отмечено, что устойчивость к амантадину или к близкому соединению — циклооктиламину — в значительной мере зависит от штамма вируса гриппа; в тесте ослабления бляшек 50% эффекту соответствовали 0,1 мкг/мл для штамма A/Singapour-ге/1/57 по сравнению с 20 мкг/мл для штамма A/PR/8/34, и устой-

чивость варьировала при генетических скрещиваниях независимо от поверхностных антигенов [13, 15, 270].

Местоположение сегмента РНК, несущего ген чувствительности к амантадину, определяли путем сравнения генетического строения рекомбинантных штаммов с их реакцией на амантадин. Только сегменту 7 РНК была присуща связь с устойчивостью или чувствительностью к лекарству [86, 136], хотя, поскольку этот сегмент генерирует три мРНК в инфицированных клетках, непонятно, какая функция полипептида задействована. А. Звонарев и Ю. Гендон [289] изучали влияние ремантадина на реакцию РНК-транскриптазы, катализируемую РНП вируса гриппа, полученным из вирионов, разрушенных дезоксихолатом. Добавление белка М к этой реакции угнетает in vitro транскрипцию до 40%, а добавление 200 мкг ремантадина снижает активность еще дополнительно на 40%. Подобного действия ремантадина не наблюдали, если белок М, добавляемый in vitro, был получен из мутанта, устойчивого к ремантадину. Это свидетельствует в пользу того, что лекарство каким-то образом может взаимодействовать с матричным белком [289].

Недавно А. Букринская и соавт. [30] идентифицировали промежуточные звенья процесса вирусного раздевания; субвирусные частицы (содержащие РНП и белок М) были обнаружены в ассоциированной с ядром цитоплазме, а РНП (свободные от белка М) — в ядерной плазме. Ремантадин блокировал появление РНП и в ядре, и в цитоплазме клеток, инфицированных чувствительным к ремантадину вирусом, но в клетках, инфицированных устойчивыми к ремантадину штаммами, «раздевание» РНП протекало нормально. Был сделан вывод, что ремантадин блокирует вторую стадию процесса «раздевания» вируса гриппа — удаление белка М от РНП [31].

В противоположность этим результатам, касающимся роли белка М, C. Scholtissek и G. Faulkner [223] предположили, что устойчивость к амантадину не может быть ограничена только одним генным продуктом или механизмом. Отличия были обнаружены у одного вирусного штамма: вирус FPV был чувствительным к амантадину при измерении урожая НА в одном цикле, но устойчивым в тесте ослабления бляшкообразования. Была проанализирована серия штаммов и рекомбинантов, приготовленных с использованием tsG-мутантов вируса FPV. Ген НА был ассоциирован с переносом устойчивости в тесте определения урожая НА, но не в тесте ослабления бляшкообразования, когда сегменты 5 и 6 переносили чувствительность, а сегмент 7 изредка переносил устойчивость. Было сделано заключение, что для устойчивости к амантадину требуется точная констелляция генов, а не перенос одного гена, как было обнаружено для различных маркеров патогенности и круга хозяев.

VII. Общие заключения

В середине 70-х годов было обнаружено, что геном вируса гриппа состоит из восьми отдельных сегментов РНК. Это послужило основой для многочисленных генетических исследований вируса. В отличие от изучения генетических систем других отрицательно-нитчатых вирусов, таких, как вирус везикулярного стоматита [199], у генетиков, занимающихся вирусом гриппа, почти нет проблем по установлению местоположения мутации, и в случае необходимости они могут определить точное изменение нуклеотидной последовательности [209]. Действительно, ясна линия действия по созданию сайт-специфических мутаций в отдельных генах вируса гриппа, клонированных в M13 [278], хотя есть еще проблемы с повторным введением подобных генов в систему вирус — клетка хозяина.

Несмотря на столь очевидные преимущества, сегментированность генома сопровождается осложнениями за счет легкости, с которой генная пересортировка может воздействовать на экстрагенную супрессию фенотипа мутанта. Подобный тип генетического взаимодействия трудно определить, он может в некоторой степени лежать в основе затруднений по установлению специфических фенотипов для мутантов вируса гриппа с повреждениями в отдельных сегментах генома. Другой отличительной чертой фенотипической характеристики является плейотропизм, отражающий тесную взаимосвязь определенных вирусспецифических белков друг с другом. Плейотропные эффекты были обнаружены между группами белков, такими, как PB1, PB2 и NS1, NP и M, HA и NA. Они были четко определены с мутантами вируса гриппа даже до того, как было изучено назначение ts-повреждений относительно индивидуальных сегментов РНК [92]. Наибольшее количество доступных ts-мутантов вируса гриппа имеет дефекты в сегменте 1 РНК, но и внутри этой группы достаточно широк круг фенотипов.

Два подхода должны оказаться очень полезными в дальнейших исследованиях с использованием мутантов вируса гриппа. Во-первых, первичное повреждение у большого количества нетекущих мутантов с повреждениями в отдельном сегменте РНК генома вируса гриппа должно быть установлено при тщательном изучении каждой из установленных стадий репликационного цикла. Использование кóров для сравнения in vitro активностей вирионной транскриптазы ts-мутанта и вируса дикого типа должно оказать существенную помощь в расшифровке данных по инкубации при ограничительной температуре [274]. Недавно разработанные методы, в которых используются клонированные копии индивидуальных сегментов РНК [264], могут быть применены для проведения более прямого анализа фенотипа РНК по сравнению с тем, что было возможно до настоящего времени. И наконец, применение метода двухмерного электрофореза в геле в сочетании с изоэлектрическим фокусированием или электрофорезом в неравновесном градиенте pH дает значительные преимущества в характеристике изменений фенотипа в клетках, инфицированных мутантным ви-

русом. Подобная техника значительно упростила характеристику полипептидов P, которые плохо разрешаются в одномерном электрофорезе [98], и можно, например, легко определить изменение одного заряда у полипептида NS2, специфицированного tsG47 [C. Penn, неопубликованные данные].

Второй подход также ценен для характеристики мутантов; он сводится к детальному изучению отдельных селекционированных мутантов, которые имеют фенотип, представляющий собой интерес. Мутанты, неспособные к гемагглютинации или дефектные по распознаванию 5′-терминального кэпа, например, могут обеспечить ценные данные при исследовании структурных изменений из белков.

Наконец, рассматривая все исследования, проведенные в настоящей области, остается только удивляться, что не было приложено значительных усилий для получения мутантов с повреждениями в сегментах 7 и 8; было изучено очень мало таких мутантов. Вероятнее всего, понимание функций вплоть до четырех неструктурных белков, установленных этими двумя сегментами, будет достигнуто только при изучении их условно-летальных мутантов.

Список литературы

1. *Alexandrova G., Garmashova L., Golubev D. et al. (Александрова Г., Гармашова Л., Голубев Д. и др.).* — Вопр. вирусол., 1979, № 4, p. 342—346.
2. *Alexandrova G., Smorodintsev A. (Александрова Г., Смородинцев А.).* — Rev. roum. Intramicrobiol., 1965, v. 2, p. 179—186.
3. *Allen H., McCauley J., Waterfield M., Gething M.-J.* — Virology, 1980, v. 107, p. 548—551.
4. *Almond J.* — Ph. D. Thesis, University of Cambridge, 1978.
5. *Almond J.* — Nature, 1977, v. 270, p. 617—618.
6. *Almond J., Barry R.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. N. Y., 1978, p. 675—684.
7. *Almond J., Barry R.* — Virology, 1979, v. 92, p. 407—415.
8. *Almond J., McGeoch D., Barry R.* — Virology, 1977, v. 81, p. 62—73.
9. *Almond J., McGeoch D., Barry R.* — Virology, 1979, v. 92, p. 416—427.
10. *Ames B., Whitfield H.* — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1966, v. 31, p. 221—255.
11. *Anisimova E., Ghendon Y., Markushin S. (Анисимова Е., Гендон Ю., Маркушин С.).* — J. Gen. Virol., 1980, v. 47, p. 11—18.
12. *Anisimova E., Tuckova E., Vonka V., Zavadova A.* — Virology, 1977, v. 77, p. 330—336.
13. *Appleyard G.* — J. Gen. Virol., 1977, v. 36, p. 249—255.
14. *Appleyard G., Mater H.* — J. Gen. Virol., 1974, v. 25, p. 351—357.
15. *Appleyard G., Mater H.* — J. Antimicrob. Chemother., 1975, v. 1 (Suppl.), p. 49—53.
16. *Barrett T., Wolstenholme A., Mahy B.* — Virology, 1979, v. 98, p. 211—225.
17. *Barry R.* — Virology, 1961, v. 14, p. 398—405.
18. *Barry R., Mahy B.* — Brit. Med. Bull., 1979, v. 35, p. 39—46.
19. *Bean W., Simpson R.* — Virology, 1973, v. 56, p. 646—651.
20. *Bean W., Simpson R.* — J. Virol., 1975, v. 16, p. 516—525.

21. *Bean W., Simpson R.* — J. Virol., 1976, v. 18, p. 365—369.
22. *Bean W., Webster R.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. N. Y., 1978, p. 685—692.
23. *Bentley D., Brownlee G.* — Nucleic Acids Res., 1982, v. 10, p. 5033—5042.
24. *Bishop D., Huddleston J., Brownlee G.* — Ibid., p. 1335—1343.
25. *Bishop D., Jones K., Huddleston J., Brownlee G.* — Virology, 1982, v. 120, p. 481—489.
26. *Blaas D., Patzelt E., Kuechler E.* — Virology, 1982, v. 116, p. 339—348.
27. *Blaas D., Patzelt E., Kuechler E.* — Nucleic Acids Res., 1982, v. 10, p. 4803—4812.
28. *Brand C., Palese P.* — Virology, 1980, v. 107, p. 424—433.
29. *Briedis D., Conti G., Munn E., Mahy B.* — Virology, 1981, v. 111, p. 154—164.
30. *Bukrinskaya A., Vorkunova N., Kornilayeva G. et al. (Букринская А., Воркунова Н., Корнилаева Г. и др.)* — J. Gen. Virol., 1982, v. 60, p. 49—59.
31. *Bukrinskaya A., Vorkunova N., Pushkarskaya N. (Букринская А., Воркунова Н., Пушкарская Н.).* — J. Gen. Virol., 1982, v. 60, p. 61—66.
32. *Burge B., Pfefferkon E.* — Virology, 1964, v. 24, p. 126—128.
33. *Burnet F., Lind P.* — Austral. J. Sci., 1949, v. 12, p. 109—110.
34. *Burnet F., Lind P.* — Austral. J. Exp. Biol., 1952, v. 30, p. 469—477.
35. *Caliguiri L., Compans R.* — J. Virol., 1974, v. 14, p. 191—197.
36. *Caliguiri L., Holmes K.* — Virology, 1979, v. 92, p. 15—30.
37. *Carter M., Mahy B.* — Arch. Virol., 1982, v. 71, p. 13—25.
38. *Carter M., Mahy B.* — Arch. Virol., 1982, v. 73, p. 109—119.
39. *Caton A., Robertson J.* — Nucleic Acids Res., 1980, v. 8, p. 2591—2603.
40. *Chu C.-M., Tian S.-F., Ren G.-F. et al.* — J. Virol., 1982, v. 41, p. 353—359.
41. *Cochran K., Maassab H., Tsunoda A., Berlin B.* — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, v. 130, p. 432—440.
42. *Compans R., Caliguiri L.* — J. Virol., 1973, v. 11, p. 441—448.
43. *Cox N., Kendal A., Maassab H. et al.* — In: The Replication of Negative Strand Viruses, 1981, p. 405—413.
44. *Cox N., Konnecke I., Kendal A., Maassab H.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y., 1981, p. 639—652.
45. *Cremer K., Bodemer M., Summers W. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 430—434.
46. *Dales S., Pons M.* — Virology, 1976, v. 69, p. 278—286.
47. *Davies P., Barry R.* — Nature, 1966, v. 211, p. 384—387.
48. *Davies W., Grunert R., Haff R. et al.* — Science, 1964, v. 144, p. 862—863.
49. *Desselberger U., Palese P.* — Virology, 1978, v. 88, p. 394—399.
50. *Desselberger U., Rucaniello V., Zazra J., Palese P.* — Gene, 1980, v. 8, p. 315—328.
51. *Dhar R., Chanock R., Lai C.-J.* — Cell, 1980, v. 21, p. 495—500.
52. *Dimmock N.* — Virology, 1969, v. 39, p. 224—234.
53. *Donald H., Isaacs A.* — J. Gen. Microbiol., 1954, v. 10, p. 457—464.
54. *Duesberg P., Robinson W.* — J. Mol. Biol, 1967, v. 25, p. 383—405.
55. *Fenner F., Sambrook J.* — Ann. Rev. Microbiol., 1964, v. 18, p. 47—94.
56. *Field H.* — In: The 5th Beecham Colloquium «Problems of Antiviral Chemotherapy». London, 1983, p. 71—107.
57. *Fields B.* — Curr. Topics Microbiol. Immunol., 1981, v. 91, p. 1—24.
58. *Fields B., Joklik W.* — Virology, 1969, v. 37, p. 335—342.
59. *Fields S., Winter G.* — Gene, 1981, v. 15, p. 207—214.
60. *Fields S., Winter G.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y., 1981, v. 21, p. 55—64.
61. *Fields S., Winter G.* — Cell, 1982, v. 28, p. 303—313.
62. *Fields S., Winter G., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 290, p. 213—217.
63. *Fowler R., Degnen G., Cox E.* — Molec. Gen. Genet., 1974, v. 133, p. 179—191.
64. *Freese E.* — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1959, v. 45, p. 622—633.

65. *Freese E., Bantz-Freese E., Bantz E.*—J. Mol. Biol., 1961, v. 3, p. 133—143.
66. *Ghendon Y. (Гендон Ю.).* — Prog. Med. Virol., 1972, v. 14, p. 68—122.
67. *Ghendon Y., Klimov A., Blagoveshenskaya O., Genkina D. (Гендон Ю., Климов А., Благовещенская О., Генкина Д.).* — J. Gen. Virol., 1979, v. 43, p. 183—191.
68. *Ghendon Y., Markushin S. (Гендон Ю., Маркушин С.).* — Phil. Trans. R. Soc. (Lond.), 1980, v. B288, p. 383—392.
69. *Ghendon Y., Markushin S., Blagoveshenskaya O., Genkina D. (Гендон Ю., Маркушин С., Благовещенская О., Генкина Д.).* — Virology, 1975, v. 66, p. 454—463.
70. *Ghendon Y., Markushin S., Ginzburg V., Hay A.* — Arch. Virol., 1983, v. 75, p. 55—70.
71. *Ghendon Y., Markushin S., Klimov A., Hay A.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 63, p. 103—111.
72. *Ghendon Y., Markushin S., Klimov A. et al. (Гендон Ю., Маркушин С., Климов А. и др.).* — J. Gen. Virol., 1983, v. 64, p. 291—304.
73. *Ghendon Y., Markushin S., Lisovskaya K. et al. (Гендон Ю., Маркушин С., Лисовская К. и др.)* —J. Gen. Virol., 1982, v. 62, p. 239—248.
74. *Ghendon Y., Markushin S., Marchenko A. et al. (Гендон Ю., Маркушин С., Марченко А. и др.).* — Virology, 1973, v. 55, p. 305—319.
75. *Ghendon Y., Tuckova E., Vonka V. et al.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 44, p. 179—186.
76. *Ghenkina D., Ghendon Y. (Генкина Д., Гендон Ю.).* — Acta Virol., 1979, v. 23, p. 97—106.
77. *Glass S., McGeoch D., Barry R.* — J. Virol., 1975, v. 16, p. 1435—1443.
78. *Glass R., Nene V., Hunter M.* — Biochem. J., 1982, v. 203, p. 1—13.
79. *Gopinathan K., Weymouth L., Kunkel T., Loeb L.* — Nature, 1979, v. 278, p. 857—859.
80. *Gordon M., Staehelin M.* — Biochim. Biophys. Acta, 1959, v. 36, p. 351—361.
81. *Gregoriades A., Hirst G.* — Virology, 1976, v. 69, p. 81—92.
82. *Harms E., Rohde W., Bosch F., Scholtissek C.* — Virology, 1978, v. 86, p. 413—422.
83. *Hartman P., Roth J.* — Advances in Genetics, 1973, v. 17, p. 1—105.
84. *Hastie N., Mahy B.* — J. Virol., 1973, v. 12, p. 951—961.
85. *Hay A., Bellamy A., Abraham G. et al.* — Develop. Biol. Stand., 1977, v. 39, p. 15—24.
86. *Hay A., Kennedy N., Skehel J., Appleyard G.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 42, p. 189—191.
87. *Hay A., Lomniczi B., Bellamy A., Skehel J.* — Virology, 1977, v. 83, p. 337—355.
88. *Hay A., Skehel J., McCauley J.* — Phil. Trans. Roy. Soc. (Lond.), 1980, v. B288, p. 341—348.
89. *Hay A., Skehel J., McCauley J.* — Virology, 1982, v. 116, p. 517—522.
90. *Heller E., Scholtissek C.* — J. Gen. Virol., 1980, v. 49, p. 133—139.
91. *Henle W., Liu O.* — J. Exp. Med., 1951, v. 94, p. 305—322.
92. *Hightower L., Bratt M.* — In: Comprehensive Virology. Vol. 9. N. Y., 1977, p. 535—598.
93. *Hirst G.* — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1962, v. 27, p. 303—308.
94. *Hirst G.* — Virology, 1973, v. 55, p. 81—93.
95. *Hirst G., Gotlieb T.* — Virology, 1955, v. 1, p. 221—235.
96. *Hirst G., Pons M.* — Virology, 1973, v. 56, p. 620—631.
97. *Holland J., Spindler K., Horodyski F. et al.* — Science, 1982, v. 215, p. 1577—1585.
98. *Horisberger M.* — Virology, 1980, v. 107, p. 302—305.
99. *Horisberger M.* — Virology, 1982, v. 120, p. 279—286.
100. *Horisberger M., De Staritzky C.* — FEMS Microbiol. Lett., 1981, v. 12, p. 95—98.

101. *Hoyle L.* — Virology Monographs. V. 4. Wien — N. Y., 1968.
102. *Huddleston J., Brownlee G.* — Nucleic Acids Res., 1982, v. 10, p. 1029—1038.
103. *Inglis S.* — In: The Replication of Negative Strand Viruses. N. Y., 1981, p. 261—267.
104. *Inglis S., Barrett T., Brown C., Almond J.* — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 3790—3794.
105. *Inglis S., Brown C.* — Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 2727—2740.
106. *Inglis S., Carroll A., Lamb R., Mahy B.* — Virology, 1976, v. 74, p. 489—503.
107. *Inglis S., Conti G., Mahy B.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. London, 1978, p. 239—248.
108. *Inglis S., Gething M.-J., Brown C.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 3575—3589.
109. *Inglis S., Mahy B.* — Virology, 1979, v. 95, p. 154—164.
110. *Inglis S., McGeoch D., Mahy B.* — Virology, 1977, v. 78, p. 522—536.
111. *Isaacs A., Donald H.* — J. Gen. Microbiol., 1955, v. 12, p. 241—247.
112. *Israel A.* — Virology, 1980, v. 105, p. 1—12.
113. *Israel A.* — J. Gen. Virol., 1980, v. 47, p. 473—483.
114. *Israel A., Semmel M., Huppert J.* — Virology, 1975, v. 68, p. 503—509.
115. *Kato N., Eggers H.* — Virology, 1969, v. 37, p. 632—641.
116. *Kawakami K., Ishihama H.* — J. Biochem. (Tokyo) (in press, 1983).
117. *Kendal A., Cox N., Galphin J., Maassab H.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 44, p. 443—456.
118. *Kendal A., Galphin J., Palmer E.* — Virology, 1977, v. 76, p. 186—195.
119. *Kendal A., Maassab H., Alexandrova G., Ghendon Y.* — Antiviral Res., 1981, v. 1, p. 339—365.
120. *Kilbourne E.* — Progr. Med. Virol., 1963, v. 5, p. 79—126.
121. *King A., McCahon D., Slade W., Newman J.* — Cell, 1982, v. 29, p. 921—928.
122. *Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blodorn J.* — Virology, 1975, v. 68, p. 426—439.
123. *Koennecke I., Boschek C., Scholtissek C.* — Virology, 1981, v. 110, p. 16—25.
124. *Koff W., Knight V.* — J. Virol., 1979, v. 31, p. 261—263.
125. *Krug R.* — Curr. Topics Microbiol Immunol., 1981, v. 93, p. 125—149.
126. *Krug R., Broni B., Bouloy M.* — Cell, 1979, v. 18, p. 329—334.
127. *Krug R., Ueda M., Palese P.* — J. Virol., 1975, v. 16, p. 790—796.
128. *Lamb R., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 4908—4912.
129. *Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1981, v. 112, p. 729—737.
130. *Lamb R., Lai C.* — Cell, 1980, v. 21, p. 475—485.
131. *Lamb R., Lai C.* — Virology, 1981, v. 112, p. 746—751.
132. *Lamb R., Lai C.* — In: The replication of Negative Strand Viruses. N. Y., 1981, p. 251—259.
133. *Lamb R., Lai C., Choppin P.* — Proc. N. A. S. (U. S.), 1981, v. 78, p. 4170—4174.
134. *Lohmeyer J., Klenk H.-D.* — Virology, 1979, v. 93, p. 134—145.
135. *Loveless A.* — Nature, 1969, v. 223, p. 206—207.
136. *Lubeck M., Schulman J., Palese P.* — J. Gen. Virol., 1978, v. 28, p. 710—716.
137. *Maassab H.* — Nature, 1967, v. 219, p. 645—646.
138. *Maassab H., Monto A., DeBorde D. et al.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y., 1981, p. 617—637.
139. *Maassab H., Spring S., Kendal A., Monto A.* — In: Negative Srand Viruses and the Host Cell. London, 1978, p. 721—732.
140. *Mackenzie J.* — Br. Med. J., 1969, v. 3, p. 757—758.
141. *Mackenzie J.* — J. Gen. Virol., 1970, v. 6, p. 63—75.
142. *Mackenzie J.* — In: The Biology of Large RNA viruses. London, 1970, p. 507—534.

143. *Mackenzie J., Dimmock N.* — J. Gen. Virol., 1973, v. 19, p. 51—63.
144. *Mahy B., Barrett T., Brtedis D. et al.* — Phil. Trans. R. Soc., 1980, v. B288, p. 349—357.
145. *Mahy B., Barrett T., Nichol S. et al.* — In: The replication of negative strand viruses. Elsevier/North-Holland, 1981. p. 379—387.
146. *Mahy B., Bromley P.* — J. Virol., 1970, v. 6, p. 259—268.
147. *Mahy B., Hastie N., Raper R. et al.* — In: Negative strand viruses. London, 1975, p. 445—467.
148. *Mahy B., Penn C., Nichol S. et al.* — In: Genetic variation among influenza viruses. Academic Press, 1981, p. 113—125.
149. *Mark G., Taylor J., Broni R., Krug R.* — J. Virol., 1979, v. 29, p. 744—752.
150. *Markushin S., Ghendon Y. (Маркушин С., Гендон Ю.).* — Acta Virol., 1973, v. 17, p. 369—376.
151. *Markushin S., Isachenko V., Molibug E. et al. (Маркушин С., Исаченко В., Молибог Е. и др.).* — Acta Virol., 1981, v. 25, p. 65—70.
152. *Massicot J., Murphy B., Thierry F. et al.* — Virology, 1980, v. 101, p. 242—249.
153. *Massicot J., Murphy B., van Wyke K. et al.* — Virology, 1980, v. 106, p. 187—190.
154. *Massicot J., van Wyke K., Chanock R., Murphy B.* — Virology, 1982, v. 117, p. 496—500.
155. *McCauley J., Mahy B., Inglis S.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 58, p. 211—215.
156. *McGeoch D.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 55, p. 1—16.
157. *McGeoch D., Fellner P., Newton C.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 3045—3049.
158. *McGeoch D., Kitron N.* — J. Virol., 1975, v. 15, p. 686—695.
159. *Mills J., Chanock R.* — J. Infect. Dis., 1971, v. 123, p. 145—157.
160. *Morrongiello M., Dales S.* — Intervirology, 1977, v. 8, p. 281—293.
161. *Mowshowitz S.* — Virology, 1978, v. 91, p. 493—495.
162. *Mowshowitz S.* — In: Replication of negative strand viruses. Elsevier/North-Holland, 1981, p. 317—323.
163. *Mowshowitz S., Ueda M.* — Arch. Virol., 1976, v. 52, p. 135—141.
164. *Murphy B., Markoff L., Chanock R. et al.* — Phil. Trans. R. Soc. (Lond.), 1980, v. B288, p. 401—415.
165. *Murphy B., Tolpin M., Massicot G. et al.* — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1980, v. 345, p. 172—182.
166. *Nakajima K., Sugiura A.* — Virology, 1977, v. 78, p. 365—374.
167. *Nayak D.* — Ann. Rev. Microbiol., 1980, v. 34, p. 619—644.
168. *Nayak D., Tobita K., Janda J. et al* — J. Virol., 1978, v. 28, p. 375—386.
169. *Nichol S.* — Ph. D. Thesis, University of Cambridge, 1980.
170. *Nichol S., Penn C., Mahy B.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 57, p. 407—413.
171. *Odagiri T., DeBorde D., Maassab H.* — Virology, 1982, v. 119, p. 82—95.
172. *Okhuma S., Poole B.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1978, v. 75, p. 3327—3331.
173. *Oxford J.* — J. Antimicrobial. Chemotherapy, 1975, v. 1, p. 7—23.
174. *Oxford J., Corchoran T., Schild G.* — J. Gen. Virol., 1980, v. 48, p. 383—389.
175. *Oxford J., Logan I., Potter C.* — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1970, v. 173, p. 300—313.
176. *Oxford J., Logan I., Potter C.* — Nature, 1970, v. 226, p. 82—83.
177. *Oxford J., Williams J.* — Chemotherapy and control of influenza, London, 1976.
178. *Palese P.* — Cell, 1977, v. 10, p. 1—10.
179. *Palese P.* — In: Topics in infectious diseases. Vol. 3. Wien — New York, 1978, p. 49—57.
180. *Palese P., Racaniello V., Desselberger U. et al.* — Phil. Trans R. Soc. (London), 1980, v. B288, p. 299—305.
181. *Palese P., Ritchey M.* — Virology, 1977, v. 78, p. 183—191.
182. *Palese P., Ritchey M., Schulman J.* — Virology, 1977, v. 76, p. 114—121.
183. *Palese P., Ritchey M., Schulman J.* — J. Virol., 1977, v. 21, p. 1187—1195.
184. *Palese P., Schulman J.* — J. Virol., 1976, v. 17, p. 876—884.

185. *Palese P., Schulman J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 2142—2146.
186. *Palese P., Tobita K., Ueda M., Compans R.* — Virology, 1974, v. 61, p. 397—410.
187. *Palese P., Young J.* — Science, 1982, v. 215, p. 1468—1474.
188. *Penn C.* — Ph. D. Thesis, University of Cambridge, 1983.
189. *Penn C., Blass D., Kuechler E., Mahy B.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 62, p. 177—180.
190. *Pereira M.* — In: Virus persistence. Cambridge University Press, 1982, p. 15—37.
191. *Petri T., Patterson S., Dimmock N.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 61, p. 217—231.
192. *Pons M.* — In: Current topics Microbiol. immunol., 1970, v. 52, p. 142—157.
193. *Pons M.* — Virology, 1973, v. 51, p. 120—128.
194. *Pons M.* — Virology, 1976, v. 69, p. 789—792.
195. *Pons M.* — Virology, 1980, v. 100, p. 43—52.
196. *Porter A., Barber C., Carey N. et al.* — Nature, 1979, v. 282, p. 471—477.
197. *Porter A., Smith J., Emtage J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 5074—5078.
198. *Portner A., Webster R., Bean W.* — Virology, 1980, v. 104, p. 235—238.
199. *Pringle C.* — Arch. Virol., 1982, v. 72, p. 1—34.
200. *Pringle C., Devine V., Wilkie M. et al.* — J. Virol., 1981, v. 39, p. 377—388.
201. *Ramig R., Fields B.* — Virology, 1979, v. 92, p. 155—167.
202. *Richman D., Yazaki P., Hostetler K.* — Virology, 1981, v. 112, p. 81—90.
203. *Richey M., Palese P.* — J. Virol., 1977, v. 21, p. 1196—1204.
204. *Ritchey M., Palese P., Kilbourne E.* — J. Virol., 1976, v. 18, p. 738—744.
205. *Ritchey M., Palese P., Schulman J.* — J. Virol., 1976, v. 20, p. 307—313.
206. *Ritchey M., Palese P., Schulman J.* — Virology, 1977, v. 76, p. 122—128.
207. *Ritchie D.* — Brit. Med. Bull., 1973, v. 29, p. 247—252.
208. *Robertson J.* — Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 3745—3757.
209. *Robertson J., Robertson E., Roditi I. et al.* — Virology (in press, 1983).
210. *Robertson J., Schubert M., Lazzarini R.* — J. Virol., 1981, v. 38, p. 157—163.
211. *Rochovansky O.* — Virology, 1976, v. 73, p. 327—338.
212. *Rohde W., Harms E., Scholtissek C.* — Virology, 1977, v. 79, p. 393—404.
213. *Rohde W., Harms E., Scholtissek C.* — In: Negative strand viruses and the host cell. London, 1978, p. 11—17.
214. *Rohde W., Boschek C., Harms E. et al.* — Arch. Virol., 1979, v. 62, p. 291—302.
215. *Rohde W., Scholtissek C.* — Arch. Virol., 1980, v. 64, p. 213—223.
216. *Rott R.* — Arch. Virol., 1979, v. 59, p. 285—298.
217. *Rott R., Orlich M., Scholtissek C.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 44, p. 471—477.
218. *Rott R., Orlich M., Scholtissek C.* — Virology, 1982, v. 120, p. 215—224.
219. *Scholtissek C.* — Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 179, p. 389—397.
220. *Scholtissek C.* — In: Current topics in microbiology and immunology. Vol. 80, 1978, p. 139—169.
221. *Scholtissek C.* — Adv. Genetics, 1979, v. 20, p. 1—36.
222. *Scholtissek C., Bowies A.* — Virology, 1975, v. 67, p. 576—587.
223. *Scholtissek C., Faulkner G.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 44, p. 807—815.
224. *Scholtissek C., Harms E., Rohde W. et al.* — Virology, 1976, v. 74, p. 332—344.
225. *Scholtissek C., Koennecke I., Rott R.* — Virology, 1978, v. 91, p. 79—85.
226. *Scholtissek C., Kruczinna R., Rott R., Klenk H.-D.* — Virology, 1974, v. 58, p. 317—322.
227. *Scholtissek C., Murphy B.* — Arch. Virol., 1978, v. 58, p. 323—333.
228. *Scholtissek C., Rohde W., Harms E. et al.* — Virology, 1978, v. 89, p. 506—516.

229. *Scholtissek C., Rott R.* — Virology, 1964, v. 22, p. 169—176.
230. *Scholtissek C., Rott R.* — J. Gen. Virol., 1969, v. 5, p. 283—290.
231. *Scholtissek C., Rott R.* — J. Gen. Virol., 1969, v. 4, p. 125—137.
232. *Scholtissek C., Rott R.* — Virology, 1970, v. 40, p. 989—996.
233. *Scholtissek C., Spring S.* — In: The replication of negative strand viruses, 1981, p. 389—394.
234. *Scholtissek C., Spring S.* — In: Genetic variation among influenza viruses. Academic Press, 1981, p. 399—413.
235. *Scholtissek C., Spring S.* — Virology, 1982, v. 118, p. 28—34.
236. *Schulman J., Palese P.* — J. Virol., 1976, v. 20, p. 248—254.
237. *Schulman J., Palese P.* — J. Virol., 1977, v. 24, p. 170—176.
238. *Schuster H., Schramm G.* — Z. Naturforsch., 1958, Bd 13b, S. 697—704.
239. *Schwartz D., Beckwith J.* — Genetics, 1969, v. 61, p. 371—376.
240. *Schwartz R., Scholtissek C.* — Z. Naturforsch., 1973, Bd 28C, S. 202—207.
241. *Shaw M., Compans R.* — J. Virol., 1978, v. 25, p. 605—615.
242. *Shimizu K., Murphy B., Chanock R.* — In: The replication of negative strand viruses. Elsevier/North-Holland, 1981, p. 370—378.
243. *Shimizu K., Mullinix M., Chanock R., Murphy B.* — Virology, 1982, v. 117, p. 38—44.
244. *Shimizu K., Mullinix M., Chanock R., Murphy B.* — Virology, 1982, v. 117, p. 45—61.
245. *Shimizu K., Mullinix M., Chanock R., Murphy B.* — Virology, 1983, v. 124, p. 35—44.
246. *Simpson R., Bean W.* — In: The influenza virus and influenza. N. Y.: Academic Press, 1975, p. 125—143.
247. *Simpson R., Hirst G.* — Virology, 1961, v. 15, p. 436—451.
248. *Simpson R., Hirst G.* — Virology, 1968, v. 35, p. 41—49.
249. *Skehel J., Burke D.* — J. Virol., 1969, v. 3, p. 429—438.
250. *Skehel J., Hay A.* — Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 1207—1219.
251. *Skehel J., Hay A.* — J. Gen. Virol., 1978, v. 39, p. 1—8.
252. *Skehel J., Hay A., Armstrong J.* — J. Gen. Virol., 1977, v. 38, p. 97—110.
253. *Smith G., Hay A.* — Virology, 1982, v. 118, p. 96—108.
254. *Spidler K., Horodyski F., Holland J.* — Virology, 1982, v. 119, p. 96—108.
255. *Spring S., Nusinoff S., Mills J. et al.* — Virology, 1975, v. 66, p. 522—532.
256 *Spring S., Nusinoff S., Tierney E. et al.* — Virology, 1975, v. 66, p. 542—550.
257. *Spring S., Maassab H., Kendal A. et al.* — Virology, 1977, v. 77, p. 337—343.
258. *Spring S., Maassab H., Kendal A. et al.* — Arch. Virol., 1977, v. 55, p. 233—246.
259. *Staroff A., Bukrinskaya A.* — Arch. Virol., 1981, v. 67, p. 105—110.
260. *Sugiura A.* — In: The influenza viruses and influenza. N. Y.: Academic Press, 1975, p. 171—213.
261. *Sugiura A., Tobita K., Kilbourne E.* — J. Virol., 1972, v. 10, p. 639—647.
262. *Sugiura A., Ueda M., Tobita K., Enomoto C.* — Virology, 1975, v. 65, p. 363—373.
263. *Taylor J., Illmensee R., Littwin S. et al.* — J. Virol., 1977, v. 21, p. 530—540.
264. *Thierry F., Dance O.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 2925—2937.
265. *Thierry F., Spring S.* — Virology, 1981, v. 115, p. 137—148.
266. *Thierry F., Spring S., Chanock R.* — Virology, 1980, v. 101, p. 484—492.
267. *Tolpin M., Massicot J., Mullinix H. et al.* — Virology, 1981, v. 112, p. 505—517.
268. *Tuckova E., Vonka V.* — Acta Virol., 1973, v. 17, p. 501—504.
269. *Tuckova E., Vonka V., Starek M.* — Acta Virol., 1971, v. 15, p. 337—344.
270. *Tuckova E., Vonka V., Zavadova A., Kutineva L.* — J. Biol. Stand., 1973, v. 1, p. 341—346.
271. *Ueda M.* — Arch. Virusforsch., 1972, Bd 39, S. 360—368.
272. *Ueda M., Kilbourne E.* — Virology, 1976, v. 70, p. 425—431.
273. *Ulmanen I., Broni B., Krug R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 7355—7359.

274. *Ulmanen I., Broni B., Krug R.* — J. Virol., 1983, v. 45, p. 27—35.
275. *Von Magnus P.* — Adv. Virus Res., 1954, v. 2, p. 59—79.
276. *Webster R., Laver W., Air G., Schild G.* — Nature, 1982, v. 296, p. 115—121.
277. *Wilson I., Skehel J., Wiley D.* — Nature, 1981, v. 289, p. 366—373.
278. *Winter G., Fersht A., Wilkinson A. et al.* — Nature, 1982, v. 299, p. 756—758.
279. *Winter G., Fields S.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 1965—1974.
280. *Winter G., Fields S.* — Virology, 1981, v. 114, p. 423—428.
281. *Winter G., Fields S.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 2135—2143.
282. *Winter G., Fields S., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 292, p. 72—75.
283. *Winter G., Fields S., Gait M., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, p. 237—245.
284. *Winter G., Fields S., Pratti G.* — Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 6907—6915.
285. *Wolstenholme A., Barrett T., Nichols S., Mahy B.* — J. Virol., 1980, v. 35, p. 1—7.
286. *Yoshida T., Shaw M., Young J., Compans R.* — Virology, 1981, v. 110, p. 87—97.
287. *Zavada J.* — J. Gen. Virol., 1969, v. 4, p. 571—576.
288. *Zhang Y., Tian S., Zhu J.* — Scientia Sinica, 1982, v. B25, p. 411—419.
289. *Zvonarjev A., Ghendon Y. (Звонарев А., Гендон Ю.).* — J. Virol., 1980, v. 33, p. 583—586.

Структура дефектных интерферирующих РНК вируса гриппа и их прогениторных генов

Д. Нейяк, Н. Сивесабраманьян
(D. Nayak, N. Sivasubramanian)

I. Введение

Термин «дефектные интерферирующие (ДИ) вирусные частицы» был введен A. Huang и D. Baltimore [31] для определения класса вирусных частиц, обладающих следующими свойствами: а) они являются дефектными, неспособными к независимой репликации; б) требуют вспомогательной функции стандартного вируса для репликации; в) интерферируют с репликацией стандартного вируса; г) являются обычно делеционными мутантами, т. е. геном ДИ частиц не представляет собой полный геном стандартных вирионов. Все изученные до настоящего времени ДИ геномы короче стандартного вирусного генома и являются делеционными мутантами; вероятно, что отдельные ДИ геномы могут содержать измененную последовательность нуклеиновой кислоты, а не делецию, и в связи с этим становятся как дефектными, так и интерферирующими. Впервые ДИ частицы наблюдал Р. фон Магнус [64, 65] при серийном пассировании неразведенного вируса гриппа на куриных эмбрионах. Он назвал эти частицы «неполными», и они были одновременно и дефектными, и интерферирующими. Впоследствии ДИ частицы были обнаружены почти у всех видов животных при пассировании с высокой множественностью заражения (подробный обзор см. [32]).

Хотя ДИ частицы вируса гриппа впервые были выявлены около 30 лет назад [64, 65], детально их свойства изучены совсем недавно. Отдельные сообщения о свойствах ДИ частиц вируса гриппа и их геномах были представлены ранее [48, 50]. С этого момента с использованием техники клонирования и секвенирования ДНК были определены полные последовательности прогениторных генов (PB1, PA и PB2) и число ДИ РНК. Поэтому в настоящей главе основное внимание уделено анализу современных данных по структуре ДИ РНК и их связи с прогениторными генами.

II. Свойства ДИ частиц вируса гриппа

Ряд авторов [14, 32, 47] подтвердили наблюдения Р. фон Магнуса [64, 65] об образовании неинфекционного вируса при пассировании неразведенного вирусного материала либо в куриных эмбрионах

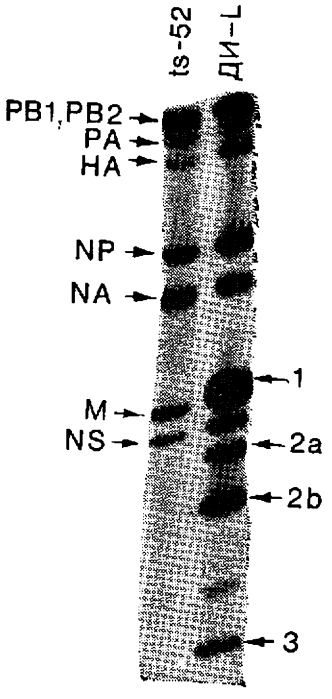
[47], либо в клеточных культурах. При использовании системы штамма WSN вируса и клеток линии MDBK ДИ частицы эффективно продуцировались при пассировании с высокой множественностью заражения. На 3—5-м пассажах ДИ частицы замещали более 99% стандартных вирусных частиц. Эти частицы могли быть усложнены и сохранены (по крайней мере в ряде пассажей) с использованием стандартного вируса как помощника. Свойство интерференции могло быть точно оценено величиной ДИЕ (дефектные интерферирующие единицы)/мл с использованием теста ингибиции пляк [12, 14, 35]. Далее было показано, что одна ДИ частица способна ингибировать образование пляка стандартными вирусными частицами. Ингибиция видимых пляк стандартными вирусными частицами имеет место вследствие уменьшения цитопатического действия ДИ частиц в конфицированных клетках [35].

Хотя образцы ДИ частиц вируса гриппа содержат отклоняющиеся от нормы частицы [66], они имеют ту же плотность и содержат те же белки, что и стандартный вирус. Незначительные различия наблюдали только в количествах белков NP, M или гликопротеидов (HA и NA) [42, 46].

ДИ частицы вируса гриппа до некоторой степени нестабильны; популяция ДИ частиц при длительном пассировании часто претерпевает дальнейшую эволюцию с появлением новых ДИ частиц, заменяющих предшествующие. Поскольку ДИ частицы подавляют цитопатические эффекты, они способствуют установлению персистирующих инфекций клеток MDBK и HeLa вирусами гриппа in vitro [24].

III. РНК ДИ частиц вируса гриппа

Ранее было показано, что ДИ частицы содержат меньше РНК и меньше РНП по сравнению со стандартным вирусом [1, 2, 42]. Помимо этого, было обнаружено, что РНК ДИ частиц содержит один или более малых сегментов РНК (ДИ РНК) [20, 21, 44, 49, 61], которые не присутствуют в стандартном вирусе (рис. 33). Кроме того, как сообщалось ранее, наблюдается значительное уменьшение или даже полная потеря больших сегментов РНК [13, 18, 20, 22, 61]. Однако, поскольку уменьшение сегмента (сегментов) специфической РНК в образце ДИ вирусных частиц не всегда было причиной потери инфекционности [5], высказано предположение [48], что причина потери инфекционности кроется скорее в случайной, чем в специфической потере одного или более сегментов РНК, и новые сегменты РНК, обнаруживаемые в ДИ частицах, вероятнее всего, являются интерферирующими молекулами [34]. Впоследствии частичной комплементацией [37] при высокой множественности ДИ частиц была подтверждена гипотеза, что значительно меньшая инфекционность ДИ частиц имеет место скорее вследствие случайной, чем специфической потери одного или более сегментов вирусной РНК, и что полная комплементация при высокой множественности ДИ частиц предотвращается при-



33. Анализ методом гель-электрофореза сегментов стандартных и ДИ РНК (L) [23].
Меченые РНК выделяли из очищенных стандартных и ДИ вирусных частиц и анализировали методом электрофореза в сложном геле (полиакриламида 2,2%, агарозы 0,6% и мочевины 6М) в течение 23 ч при 180 В и 4 °С [23].

сутствием ДИ РНК в ДИ частицах. Имеется ряд данных, свидетельствующих в пользу того, что эти малые молекулы РНК (ДИ РНК) ответственны за интерференцию: 1) ДИ РНК определенно присутствуют в ДИ образцах и отсутствуют в образцах повторно клонированного стандартного вируса; 2) эти малые молекулы РНК образованы и усложняются при повторном пассировании с высокой множественностью заражения; их присутствие и количество часто коррелируют с интерферирующим свойством (ДИЕ/мл) образца; 3) результаты определения УФ-чувствительности показывают, что размер мишени интерферирующей молекулы мал и приблизительно равен среднему размеру меньших видов РНК в ДИ образце; 4) комплексы рибонуклеопротеида (РНП), содержащие ДИ молекулы РНК, были интерферирующими, в то время как этого не наблюдали у различных комплексов РНК, содержащих стандартные сегменты РНК [34]. Поэтому ДИ частицы вируса гриппа содержат меньше, чем полный комплемент генов стандартного вируса из-за потери одного или более сегментов РНК и, помимо этого, одну или более ДИ сегментов РНК, которые ответственны за интерференцию.

Эти ДИ РНК, которые далее были проанализированы, имели ту же полярность, что и вирусные сегменты РНК, и в отличие от большинства ДИ РНК несегментированного минус-цепочечного вируса, вируса везикулярного стоматита, не имели комплементарных концов. Методами гибридизации, олигонуклеотидного картирования и секвенирования РНК 5′- и 3′-концов было показано, что все изученные до настоящего времени 16 ДИ РНК имеют природу гена полимеразы (PB1, PB2, PA) [21, 23, 24, 44] и несут оба 5′- и 3′-геномных конца [23, 51]. Олигонуклеотидное картирование показало, что различные по размеру ДИ РНК могут быть генерированы из одного гена полимеразы и что последовательности меньших ДИ РНК не всегда являются составляющими больших ДИ РНК. Поэтому было высказано предположение, что по крайней мере некоторые ДИ РНК образуются из внутренних делеций гена полимеразы с сохранением обоих концов [23]. Однако эти эксперименты

не позволили выявить точные связи в последовательности среди ДИ РНК или между прогенитерным геном и его ДИ РНК, так как подобная информация могла быть получена только при детальном анализе последовательности. Кроме того, поскольку считается, что белки полимеразы играют важную роль в генерировании этих ДИ РНК и в ДИ-опосредованной интерференции (см. разделы VI и VII), тщательное и более подробное изучение первичных и вторичных структур этих полимеразных белков должно прояснить детали взаимодействий РНК — белок, которые необходимы для транскрипции и репликации стандартных РНК, а также генерации ДИ РНК. Поэтому в IV разделе будет представлен сравнительный анализ последовательности нуклеотидов трех полимеразных генов и предсказанных первичных и вторичных структур белков PB1 и PB2. В настоящее время проводится анализ вторичной структуры белка PA.

IV. Структура генов и белков полимеразы

A. Последовательность нуклеотидов генов полимеразы

Три гена полимеразы отвечают более чем за половину генетической информации в геноме вируса гриппа. С помощью техники рекомбинантной ДНК была определена полная последовательность всех трех генов полимеразы вирусов гриппа А [7, 8, 27, 36, 58, 69]. Ген PB1 штаммов WSN, A/NT/60/68 и PR/8 длиной в 2341 нуклеотид с первым АУГ в 25-м положении и открытой рамкой считывания из 2271 нуклеотида (в 25—2295-м положениях) кодирует 757 аминокислот. Кодируемый белок PB1 основный, с м.м. 96 500. Ген PA штаммов PR/8 и A/NT/60/68 состоит из 2233 нуклеотидов

Таблица 24. *Частоты нуклеотидов в генах вируса гриппа (вРНК)*

	PB1	PA	PB2	HA	NP	NA	M	NS	Среднее
У	34,4	33,3	33,6	34,8	32,5	29,6	28,6	33,3	32,5
Г	19,9	18,8	18,4	18,3	20,1	18,4	21,1	19,8	19,4
Ц	22,4	23,6	25,5	22,8	25,9	25,3	26,1	23,4	24,3
А	23,3	24,2	22,5	24,2	21,5	26,8	24,1	23,5	23,8

Примечание. Частоты нуклеотидов генов вируса гриппа были подсчитаны по данным опубликованных последовательностей нуклеотидов индивидуальных генов. Были использованы последовательности генов PB1, PB2, HA и NA штамма A/WSN/33 [36, 58, 29a, 29h], генов NP и M штамма A/PR/8 [67, 68], гена NS штамма A/Udorn/72 [39a] и гена PA штамма A/NT/60/68 [8]. Частоты нуклеотидов=(число специфических нуклеотидов/общее число нуклеотидов в специфическом гене) × 100.

с одной рамкой считывания, кодирующей 716 аминокислот и первым АУГ в 25-м положении. Кодируемый белок слабокислотный, с м.м. 82 400. Ген PB2 обоих штаммов — WSN и PR/8 — состоит из

2341 нуклеотида, кодирующих основной белок из 759 аминокислот с первым АУГ в 27-м положении. В табл. 24 указана частота нуклеотидов в генах вируса гриппа.

Б. Первичная структура белков PB1 и PB2

Ранее из предсказанных последовательностей нуклеотидов была приведена первичная структура белков PB1 и PB2 штаммов WSN и PR/8 вирусов [27, 36, 58, 69]. Поскольку оба гена PB1 и PB2 имеют одинаковое число нуклеотидов и кодируют основные белки одинаковых размеров и поскольку оба белка участвуют также в процессе транскрипции и могут взаимодействовать с теми же матрицами вирусной РНК, при сравнении первичной и вторичной структур этих двух белков можно обнаружить некоторые общие черты в отношении способов взаимодействия РНК — белок. Для выяснения существования какой-либо гомологии на уровне первичной структуры были определены обе меж- и внутрибелковые гомологии и гомологии соответствующей последовательности нуклеотидов (табл. 25). Удивительным оказалось наличие повторяющегося

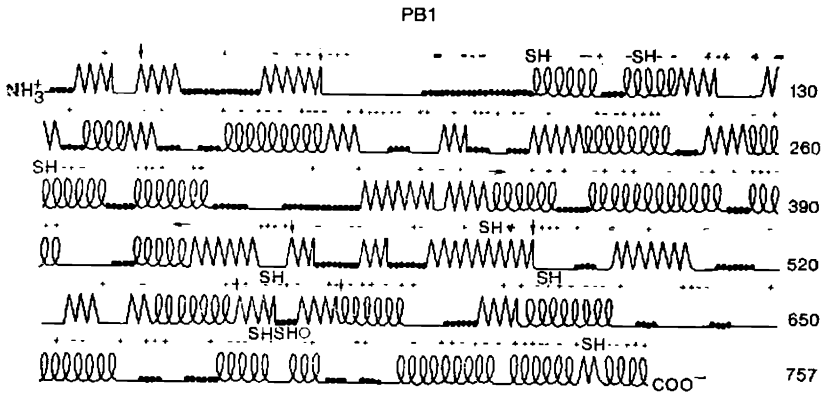
Таблица 25. *Гомологии нуклеотидов с гомологиями соответствующих пептидов белков PB1 и PB2*

Ген	№ нуклеотида	Гомология нуклеотида	Белок	№ аминокислоты	Гомология аминокислоты
PB1	2188	ГЦЦЦГААУУГАУ	PB1	722	Ала Арг Иле Асп
PB1	2200	ГЦАЦГААУУГАУ	PB1	726	Ала Арг Иле Асп
PB1	2080	ГААЦАААУГУАЦ	PB1	686	Глу Глн Мет Тир
PB2	748	ГААЦАГАУГУАЦ	PB2	241	Глу Глн Мет Тир
PB1	355	АУГГАГГУУГУУ	PB1	111	Мет Глу Вал Вал
PB2	517	АУГГААГУУГУУ	PB2	164	Мет Глу Вал Вал
PB1	649	ААГЦАГАГАУУГААЦ	PB1	210	Лиз Глн Арг Леи Асн
PB2	1300	ААУЦАГЦГАУУГААЦ	PB2	426	Асп Глп Арг Леи Асн

Примечание. Подчеркнута непарность оснований в гомологичных участках.

начального тетрапептида на 722-м аминокислотном остатке (Ала-Арг-Иле-Асп-Ала-Арг-Иле-Асп) в белке PB1 штаммов WSN, A/NT/60/68 и PR/8 [7, 58, 69]. РНК, которая кодирует этот участок, в равной степени повторяющаяся, с одной непарностью оснований в нуклеотиде гена PB1 штамма WSN [58]. Вероятность появления такого повторяющегося тетрапептида и последовательности нуклеотидов низкая и наводит на мысль о возможной дупликации при эволюции гена PB1. Этот октапептид предсказан как образующий α-спираль (рис. 34).

N-конец белка PB1 содержит меньше заряженных остатков (3 из 31) по сравнению с белком PB2 (11 из 31). С-конец белка PB1 содержит больше заряженных остатков (18 из 37, чем белок PB2



34. Схема вторичной структуры, предсказанная для белка PB1 [58] с использованием вероятностного метода Chou-Fasman [19a].

Спиралеобразными линиями обозначены α-спиральные структуры; зигзагообразными — β-складчатые плоскости: темными кружками — β-витки (инверсии цепи), тонкой линией — случайная или неопределенная структура. Знаками + и — отмечены положительные и отрицательные заряды; SH — локализация остатков цистеина. Двумя стрелками указан участок антипараллельных β-плоскостей, одной — участок четырехспиральной супервторичной структуры.

(9 из 37). Помимо этого, N-конец белка PB1 также более гидрофобный (16 из 31), чем N-конец белка PB2 (12 из 31). Расчеты заряда показывают, что белок PB1 более основный, чем белки NP и M, но значительно менее основный, чем белок PB2 [36].

Белок PB1 содержит много кластеров основных аминокислот в участках, которые, очевидно, лишены вторичной структуры (т. е. аминокислотные остатки, которые начинаются от 187, 207, 429 и 479 [58]). Эти кластеры содержат 3—4 аргинина и лизин, расположенные в непосредственной близости без прерывания аминокислотными остатками. Такие кластеры основных аминокислот подобны присутствующим в белке PB2, но более выражены, чем кластеры в белке NP штамма PR/8 [62, 68] и белке M [67]. Кластеры основных аминокислот обнаружены в α-спиральных участках молекулы белка. Поскольку белок PB1, вероятно, взаимодействует с матрицей вирусной РНК во время инициации транскрипции, эти кластеры основных остатков могут играть существенную роль в катализе этого процесса. Было высказано предположение о существовании подобных взаимодействий РНК — белок через кластеры основных аминокислот для белка PB2 вируса гриппа [36], белка NP вируса гриппа [68], нуклеокапсида вируса леса Семлики [29], белка VP1 SV40 [63] и вируса полиомы [60] и антигена кора вируса гепатита [52].

В табл. 25 показана также частота нескольких гомологий между последовательностями нуклеотидов и аминокислот белков PB1 и PB2. Поскольку маловероятно, что гомологии последовательностей аминокислот и нуклеотидов случайны, они могут быть генетически значимы. Однако, за исключением этих ограниченных

подобий, первичные структуры обоих генов — PB1 и PB2 — и их белков различны и предполагают независимую эволюцию многочисленных генов полимеразы вирусов гриппа.

Сравнение групп аминокислот среди основных белков вируса гриппа, белков репликазы бактериофага MS2 [28] и P3-1b полиовируса [39] выявило несколько интересных свойств. В то время как все белки, которые вовлечены в связывание нуклеиновых кислот и синтез, являются основными белками, содержание аргинина (наиболее часто встречающейся основной аминокислоты) высоко среди основных белков вируса гриппа (табл. 26). Поскольку арги-

Таблица 26. *Типы аминокислот, представленные в основных белках вируса гриппа (PB1 и PB2 штамма A/WSN/33 и NP, M штамма A/PR/8/34) и других белках, обладающих активностью полимеразы [16, 25].*

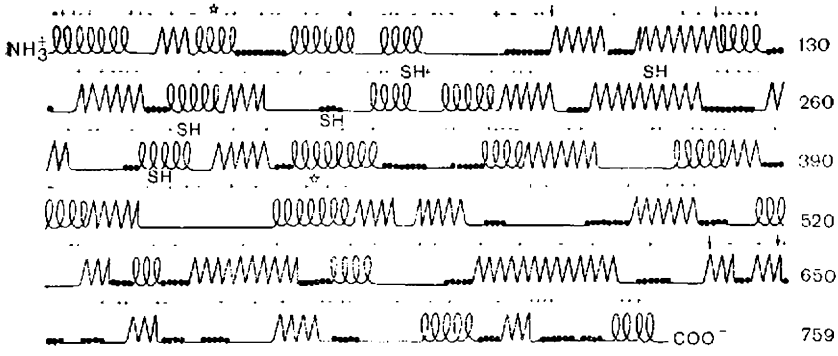
Тип аминокислот	% каждого типа аминокислоты						Средний % в белках[1]
	PB1	PB2	P	M	репликаза MS2	P3-1b полиовируса	
Малые алифатические (Ала, Гли)	11,5	12,5	16,0	16,3	16,8	14,5	16,9
Гидроксильные (Сер, Тре)	14,7	14,1	13,6	14,2	14,5	12,5	13,1
Кислотные (Глу, Асп)	10,5	10,7	9,9	9,2	10,1	11,6	11,6
Кислотные+амидные (Глу, Асн, Асп, Глн)	21,3	20,0	22,1	19,6	16,2	19,2	19,8
Основные (Лиз, Арг, Гис)	14,9	15,1	15,2	14,0	14,2	13,8	13,5
Гидрофобные (Лей, Вал, Иле, Мет)	23,3	27,1	22,6	26,7	22,6	24,6	20,2
Ароматические (Фен, Тир, Три)	8,7	6,6	6,6	5,2	10,7	9,5	8,3

[1] Среднее значение состава аминокислот в белках дано для сравнения. Расчет величины среднего значения состава аминокислот сделан для последовательностей аминокислот для 314 белков [24a].

ниновые остатки в гистонах играют существенную роль в организации комплекса нуклеопротеида эукариотов [10], они могут быть также вовлечены в организацию комплекса нуклеопротеида вируса гриппа. Интересно также отметить, что в белке PB2 присутствует больше гидрофобных аминокислот (см. табл. 26) и они распределены в более длинных отрезках, чем в белке PB1. Это может объяснить предполагаемое прикрепление белка PB2 к мембране [6]. Кроме этого, все белки PB1, PB2, NP и репликаза MS2, P3-1b полиовируса, вовлеченные в полимеризацию РНК, имеют тот же композиционный состав различных групп аминокислот (см. табл. 26).

B. Предсказанные вторичные структуры белков PB1 и PB2

Поскольку белки полимеразы вовлечены в сложные биологические процессы, например транскрипцию и репликацию, они должны ассоциироваться в комплекс белок — белок так же хорошо, как и при



35. Схема вторичных структур, предсказанная для белка PB2. Обозначения те же, что на рис. 34.

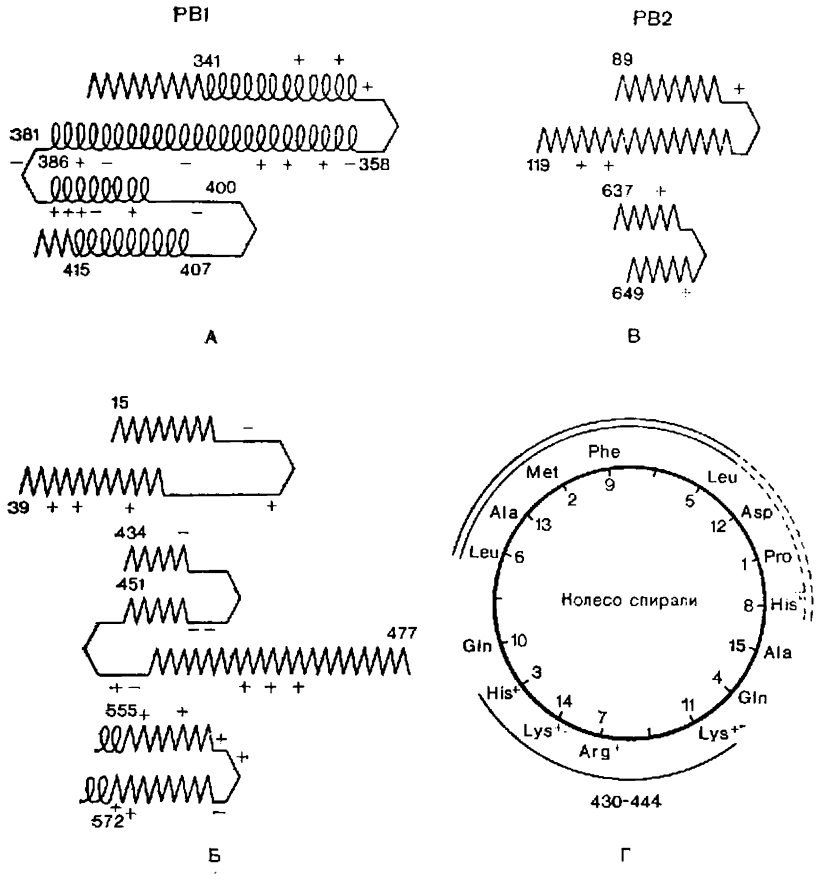
взаимодействии РНК — белок. Понимание этих процессов требует разъяснения структурно-функциональных связей различных областей в пределах этих белков. На рис. 34 и 35 показаны предсказанные вторичные структуры белков PB1 и PB2, а в табл. 27 указано содержание элементов вторичной структуры этих белков.

Таблица 27. *Содержание предсказанных элементов вторичной структуры в белках PB1 и PB2*

Вторичная структура	PB1	PB2
α-спираль	33%	23%
β-складчатая плоскость	26 »	30 »
β-обратный виток	23 »	20 »
Неопределенная структура	18 »	27 »

Примечание. Анализ вторичной структуры проведен с использованием вероятностного метода Chou—Fasman [19], как показано на рис. 34 и 35. Содержание элементов вторичной структуры в белках PB1 и PB2 было подсчитано следующим образом: (число аминокислот в элементе вторичной структуры/общее число аминокислот) × 100.

Белок PB1 имеет супервторичную структуру (четыре антипараллельные α-спирали, аминокислотные остатки 341—345 (рис. 36, А), которая может быть вовлечена в процесс взаимодействия РНК — белок. Подобные четырехспиральные супервторичные структуры присутствуют в других белках, вовлеченных во взаимодействие либо с РНК, либо с ДНК, например белок вируса табачной мозаики [16], тирозил-тРНК-синтетаза [33] и ДНК-полимераза I E. coli [9]. Присутствие многих положительных зарядов в этих α-спиралях белка PB1 также подтверждает их вовлечение в связывание РНК. Кроме этого, более гидрофильная (заряженная) α-спираль (аминокислотные остатки 386—393) и более гидрофоб-



36. Важные свойства вторичной структуры белков PB1 и PB2.

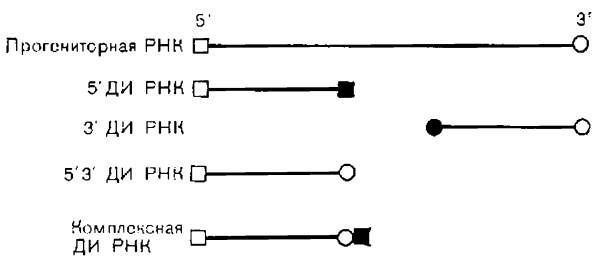
А — четыре спиральные супервторичные структуры в белке PB1. Было предсказано, что аминокислотные остатки в положениях 341—415 [58] образуют четыре антипараллельные α-спирали, прерванные β-обратными витками. Спиралеобразными линиями обозначены α-спирали; β-витки представлены перестановками цепи. Б — «двойные спирали полипептидов» (антипараллельные плоскости) в белке PB1. Четыре антипараллельные плоскости были предсказаны из последовательности аминокислот [58] белка PB1 (см. рис. 34): а) аминокислотные остатки в положениях 15—39; б) аминокислотные остатки в положениях 431—451; в) аминокислотные остатки в положениях 447—477; г) аминокислотные остатки в положениях 555—572. Зигзагообразными линиями обозначены аминокислотные остатки, которые включены в β-складчатые плоскости; β-витки представлены инверсиями цепи. В — «двойные спирали полипептидов» (антипараллельные β-плоскости) в белке PB2. Две антипараллельные β-плоскости были предсказаны из последовательности аминокислот [36] белка PB2 (см. рис. 35): а) аминокислотные остатки в положениях 89—119; б) аминокислотные остатки в положениях 637—649. Г — «колесо спирали» одной из амфифильных спиралей (аминокислотные остатки 430—444) белка PB2. Цифры 1—15 означают положения аминокислотных остатков 430—444. Аминокислотные остатки были отложены на «колесе спирали» в соответствии с техникой M. Schiffer и A. Edmundson [56a], используя 3,6 аминокислотного остатка на 1 виток. Одной тонкой линией обозначен участок гидрофильности, двумя — участок гидрофобности. Двумя пунктирными линиями показан участок гидрофобности, генерированный через солевую связку между Асп− и Гис+.

ная α-спираль (аминокислотные остатки 407—415, см. рис. 36, А), как было определено методом графического анализа спиральных гидрофобных моментов [58] белка PB1, составляют две из α-спиралей этой супервторичной структуры. Такая структура отсутствует в белке PB2. Другой важной чертой структуры является присутствие двойных спиралей полипептидов (антипараллельный ββ-димер) в обоих белках (рис. 36, В). Эти двойные спирали полипептидов, вероятно, вовлечены во взаимодействие с меньшей канавкой спирали РНК [11] и обнаруживаются в ДНК-полимеразе [9] и Lac-репрессоре [19]. Четыре такие структуры имеются в белке PB1 (рис. 36, Б) в сравнении с двумя в белке PB2 (см. рис. 36, В). Дополнительный анализ спиральных гидрофобных моментов показал [58], что ни одна из α-спиралей белков PB1 и PB2 не является спиралью трансмембранного типа. Бо́льшая часть α-спиралей белков PB1 и PB2 имеет гидрофобные моменты в среде и низкие значения величин главных гидрофобностей, которые являются характеристикой растворимых глобулярных белков. Исключение составляют одна α-спираль в белке PB1 (аминокислотные остатки 695—700) и две α-спирали в белке PB2 (аминокислотные остатки 26—33 и 430—444; рис. 36, Г), которые имеют большие гидрофобные моменты, чем α-спирали глобулярных белков [58]. Одна из таких α-спиралей при нанесении на «колесо спирали» показывает, что одна поверхность существенно гидрофильна (Гис$^+$, Лиз$^+$, Арг$^+$ и Лиз$^+$; см. рис. 36, Г), в то время как другая существенно гидрофобна (Лей, Ала, Мет, Фен и Леи; см. рис. 36, Г). Такие α-спирали, имеющие обе — гидрофильную и гидрофобную — поверхности, называются амфифильными спиралями. Величины спирального гидрофобного момента и главной гидрофобности для этих спиралей одинаковы с соответствующими величинами стремящихся к поверхности спиралей полипептидов мелиттина, δ-гемолизина и дифтерийного токсина, которые поверхностно-активны и являются литическими [71]. Эти амфифильные спирали, по всей вероятности, появляются на поверхности белка и вызывают обратимые связи между белками и поверхностями двойных липидных слоев.

V. Структура ДИ РНК

А. Классы ДИ РНК

На основании их первичных структур ДИ РНК могут быть классифицированы по четырем основным классам (рис. 37 [40]): 1) 5′ ДИ РНК: ДИ РНК, принадлежащие к этому классу, несут 5′-конец геномной РНК, а не 3′-геномный конец. 3′-конец ДИ РНК создается копированием 5′-конца ДИ РНК. Таким образом, 5′- и 3′-концы ДИ РНК становятся комплементарными друг другу и могут образовывать двухцепочечный стержень варьирующейся длины. Различия в этом классе ДИ РНК обусловлены варьирующими количествами делеций и длины двухцепочечного стержня, образованно-



37. Классы ДИ РНК. Светлыми квадратами и кружками обозначены геномные 5′- и 3′-концы соответственно, темными — последовательности, комплементарные геномным 5′- и 3′-терминальным последовательностям.

го копированием 5′-геномного конца. У этих ДИ РНК отсутствует, таким образом, геномный сайт узнавания транскриптазы и лидерпоследовательность на 3′-конце, а потому они неспособны действовать как матрицы для транскрипции поли(А)-содержащих кэппированных сигналов, хотя малый фрагмент РНК часто транскрибируется [30]. Новый сайт связывания полимеразы, генерированный на его 3′-конце, по всей вероятности, имеет более высокую аффинность к вирусной полимеразе (репликазе), чем 3′-геномный конец, и поэтому интерферирует с репликацией РНК стандартного вируса, конкурируя более эффективно за ограниченное число молекул полимеразы. Бóльшая часть ДИ РНК из несегментированных минус-цепочечных вирусов принадлежит к этому классу [30]. Хотя бóльшая часть этих ДИ РНК имеет только одну точку делеции, возможность множественных делеций в некоторых ДИ РНК не должна быть исключена; 2) 3′ ДИ РНК: эти ДИ РНК будут являться копией 5′ ДИ РНК, т. е. будут содержать 3′-конец, но у них отсутствует 5′-конец геномной РНК. 5′-Конец этой ДИ РНК будет образован копированием 3′-конца ДИ РНК. Однако на сегодня ни одна из таких ДИ РНК неизвестна, а это предполагает, что 5′-конец геномной РНК не отвечает за репликацию вируса и морфогенез. В дополнение к активности связывания полимеразы последовательность 5′-конца может иметь другие свойства, такие, как, например, сигнал нуклеации для сборки нуклеопротеида и образования вириона и т. д. Этот класс ДИ РНК, в случае его обнаружения, должен транскрибировать поли(А)-содержащие кэппированные сигналы таким же образом, что и геномная РНК; 3) 5′—3′ ДИ РНК: эти ДИ РНК содержат внутреннюю делецию (делеции), но сохраняют оба 5′ и 3′ геномных конца и ожидается, что они будут транскрибироваться в молекулы РНК. Бóльшая часть, если не все, ДИ РНК вируса гриппа [24, 51, 59] и некоторые ДИ РНК вирусов Сендай и VSV (вируса везикулярного стоматита) принадлежат к этому классу [4, 53]; 4) сложные ДИ РНК: любые ДИ РНК, которые не относятся ни к одному из этих упомянутых классов, будут входить в эту группу. Здесь происходят интенсивные изменения в ДИ РНК с образованием новых последовательностей и/или новых концов. VSV ДИ LT2 [38], 18 S ДИ РНК вируса леса Семлики [41] и мозаичная РНК вируса гриппа [43] являются примерами ДИ РНК этого класса. Транскрипционные свойства

ДИ РНК, принадлежащих к этому классу, могут варьировать в зависимости от ряда факторов, например природы 3′-конца, присутствия сигналов регуляции транскрипции, терминаторов транскрипции, сайтов добавки поли(А) и т. д.

Б. Полные последовательности нуклеотидов ДИ РНК

Недавно был полностью секвенирован ряд ДИ РНК белка РВ1 и РВ2, и впервые представлена, таким образом, информация о специфической связи ДИ РНК с прогенитерным геном на уровне нуклеотида. Однако следует быть осторожными в интерпретации последовательностей, полученных только с использованием техники клонирования ДНК, из-за возможности перестройки последовательности во время клонирования [26].

Две ДИ РНК (L2b и L3) белка РВ1 содержат 683 и 441 нуклеотид соответственно, что подтверждено данными их миграции в РНК гелях (см. рис. 33). В положительном смысле L2b содержит 270 нуклеотидов от 5′-конца и 413 нулеклеотидов от 3′-конца гена РВ1 с делецией 1658 нуклеотидов. С другой стороны, L3 содержит 197 нуклеотидов с 5′-конца и 244 нуклеотидов с 3′-конца гена РВ1 с внутренней делецией 1900 нуклеотидов. Последовательность L3, как и ожидалось, является составляющей последовательности L2b [51]. За исключением делеции, никакая другая перестройка или мутация основания не наблюдалась среди последовательностей L2b, L3 и РВ1.

Полная последовательность нуклеотидов ДИ РНК белка РВ2 определена с использованием техники клонирования ДНК [59, 70]. Клон В длиной в 444 нуклеотида содержит 190 и 254 нуклеотида от 5′- и 3′-концов гена РВ2 соответственно [70]. Клоны В и С получены из штамма PR/8/34 вируса и только несколько непарностей оснований были обнаружены в этих последовательностях при их сравнении с последовательностью РВ2 штамма прародителя PR/8: А ⟶ Ц и А ⟶ У в нуклеотидах 94 и 369 соответственно в клоне В и А ⟶ Ц, А ⟶ Ц, У ⟶ А в нуклеотидах 94, 142 и 369 соответственно в клоне С. Два других клона ДИ РНК содержат 659 (L2a-7) и 611 (L2a-17) нуклеотидов [59], которые соответствовали ожидаемому размеру L2a РНК гена РВ2 штамма WSN (см. рис. 33). Оба L2a-17 и L2a-7 содержат 272 нуклеотида от 5′-конца гена РВ2 штамма и делецию 1682 нуклеотидов (от 273 до 1954 нуклеотидов). Однако L2a-17 содержит дополнительную делецию из 48 нуклеотидов последовательности Р3 (нуклеотиды 2032—2079). L2a-7 содержит две мутации в 103-м положении нуклеотида (Г ⟶ Ц) и в 423-м положении нуклеотида (Г ⟶ А), в то время как L2a-17 содержит одну мутацию (Г ⟶ А) в 497-м нуклеотиде.

Проведенные анализы показали, что ДИ РНК вируса гриппа несут внутреннюю делецию (делеции) различной длины. Кроме того, хотя большинство ДИ РНК содержало одну внутреннюю делецию, некоторые включали многочисленные внутренние деле-

ции. За исключением делеции (делеций) и некоторой непарности оснований, интенсивная перестройка геномных последовательностей, часто обнаруживаемая в других ДИ РНК [41], не наблюдалась в ДИ РНК вируса гриппа. Однако для того, чтобы сделать четкие выводы о структуре ДИ РНК вируса гриппа, нужно провести секвенирование большого количества ДИ РНК.

VI. Генерирование ДИ РНК из прогениторных РНК

Малые сегменты РНК, похожие на ДИ РНК, присутствуют в большей части (если не во всех) образцов вируса гриппа и вирусном материале, использованном в лаборатории. Они обнаруживаются в вирусном материале, получаемом как на клеточной культуре из пляков, так и при клонировании, хотя и на низком уровне [35]. Несмотря на то что ДИ частицы и ДИ РНК обычно присутствуют во многих образцах вируса гриппа, механизм зарождения и эволюции ДИ РНК из их прогениторных РНК представляет собой сложное явление и до сих пор слабо освещен по ряду причин.

1. До настоящего времени не были получены полные последовательности ДИ РНК и их прогениторных РНК и, таким образом, точная связь последовательности ДИ РНК с последовательностью прогениторных РНК не могла быть определена. Кроме того, доступное в настоящее время количество последовательностей недостаточно для построения общей модели для зарождения ДИ РНК.

2. Более того, ДИ РНК, которые были секвенированы или широко изучены, обычно представляют собой доминирующие виды ДИ РНК. Очевидно, эти ДИ РНК выжили при давлении отбора и претерпели многие циклы экстракопирования. Поэтому они могут и не представлять первый продукт в процессе зарождения ДИ РНК из прогениторного гена. Они могут не быть также конечными ДИ РНК, поскольку известно, что природа ДИ РНК изменяется при пассировании. Хотя неясно, происходят ли вновь появляющиеся ДИ РНК из больших ДИ РНК или из прогениторных генов, ни одну из этих возможностей в настоящее время не следует исключать. Действительно, многие из этих ДИ РНК могут представлять промежуточные виды в эволюции ДИ РНК. Если многочисленные механизмы функционируют в различных фазах зарождения и эволюции ДИ РНК, весьма сложно рассортировать их по классам и предложить общую модель, заключающую весь процесс возникновения и эволюции ДИ РНК. Для определения точного направления и локализации посредников в зарождении ДИ РНК нужна in vitro система репликации вирусной и ДИ РНК, но подобной системы репликации пока нет.

3. В дополнение к сказанному отсутствует информация о вторичной структуре больших РНК в особенности, поскольку они

существуют в комплексах РНП. Такие вторичные структуры дополнение к последовательности, могут дать важные нити к р шифровке регуляции событий процесса репликации и, следо тельно, зарождения ДИ РНК.

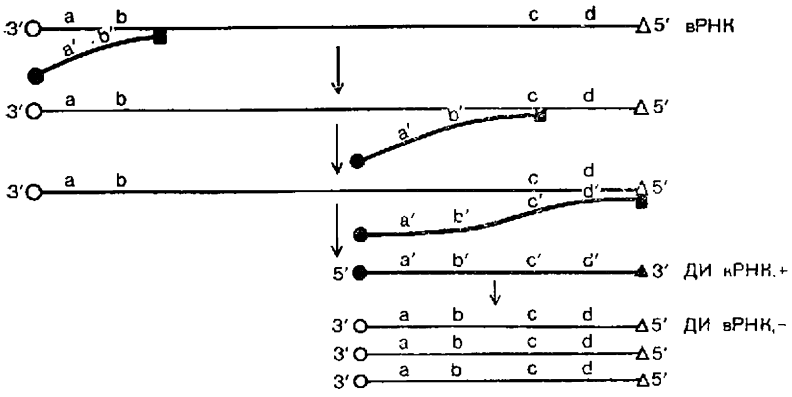
4. Следующая трудность возникает из наблюдений, ДИ РНК вируса гриппа происходят предпочтительнее, если исключительно, из генов полимеразы, и анализ последовате ности не обнаруживает ни одной уникальной структурной чер генов полимеразы, которая бы отвечала за эту идиосинкрази Кроме того, не было определено, имеет ли место малое коли ство неполимеразных ДИ РНК из-за неспособности этих ДИ РН зарождаться или продолжать существовать и эффективно реп цироваться во время этапов экстракопирования.

Учитывая эти ограничения, современные данные о зарож ции и эволюции ДИ РНК вируса гриппа можно суммировать с дующим образом. Методы изучения последовательности пока вают, что сплайсирование, возможно, не вовлечено в зарожде ДИ РНК (табл. 28). Последовательности боковых участков п генитерных РНК, которые дают жизнь различным ДИ РНК, похожи на согласованные последовательности сплайсирован клеточных РНК [27, 51, 59]. Хотя было высказано предположен

Таблица 28. *Матричные последовательности в сайтах делеции в ДИ Р вируса гриппа*

			Сайт реинициации	Сайт прикрепления
кРНК				
	L3	5′	АЦААЦАААЛЦАЦЦГЛАА	. . .АЦЦАААЛГ↓УГЦУГЦАА
	L2	5′	ГУГГУУАУ↓ГЦЦЦАААЦ	. . .АЛЦЦАУАА↓АГАЦАУУГ
	L2a-7	5′	АЛААУГАА↓УГАЦГЦЦГ	. . .ГАГГГГАУ↓ЦАГГААУГ
	L2a-17	5′	АЛААУГАА↓УГАЦГЦЦГ	. . .ГАГГГГАУ↓ЦАГГААУГ
	L2a-17	5′	ЦАГУУЦУЦ↓ГГАААГГА	. . .ГЦАЦАГЦУ↓ГГАГУУГА
	A и B	5′	АЛУГАЛЛУ↓АУЦЦАЛУУ	. . .ГГАГУГГА↓АУУЦЦУЦА
	C	5′	ЛААУГАГЦ↓ЛАГГАЦАА	. . .ЦУГАГГГГ↓АУУЦЦУЦА
вРНК				
	L3	5′	УУГЦАГЦЛ↓ЦУУУУГГУ	. . .УУУЦГГУГ↓УУУГУУГУ
	L2	5′	ЦАЛУГУЦУ↓УУЛЛУГГУУ	. . .ГУУУГГГЦ↓АУААЦЦАЦ
	L2a-7	5′	ЦАУУЦЦУГ↓АУЦЦЦЦУЦ	. . .ЦГГЦГУЦЛ↓УУЦАУУУУ
	L2a-17	5′	ЦАУУЦЦУГ↓АУЦЦЦЦУЦ	. . .ЦГГЦГУЦЛ↓УУЦЛУУУУ
	L2a-17	5′	УЦААЦУЦЦ↓АГЦУГУГЦ	. . .УЦЦУУУЦЦ↓ГАГААЦУГ
	A и B	5′	ЦАГЦГГАЦ↓УЦЦАЦУЦЦ	. . .ААУУГГАУ↓АУУУЦАУУ
	C	5′	УГАГГАЛУ↓ЦЦЦЦУЦАГ	. . .УУГУЦЦУУ↓ГЦУЦАУУУ
Согласованная последовательность сплайсирования			АГ↓ГУКЛГ	. . .Х—ХХХ—ЦАГ↓

Примечание. Матричные последовательности [51, 59, 70] определены э перименталь но как сайты прикрепления полимеразы и сайты реинициации, за сящие от синтеза минус- или плюс-цепей. Матричные последовательности читаю в направлении 3′→5′. Стрелки указывают место делеции. R и X представляют ринновые и пиримидиновые основания соответственно в сайте согласованного спл сирования [57а].



38. Зарождение внутренней делеции прогениторного гена (или предшественника ДИ РНК) через отклоняющийся от нормы процесс репликации.

Молекула полимеразы с прикрепленной возникающей цепью РНК может отделиться от матрицы вРНК (минус-цепь), вновь прикрепиться ниже и вследствие этого генерировать укороченную плюс-цепь. Эти плюс-цепочные молекулы могут служить матрицей для синтеза делеционных минус-цепей (ДИ РНК). Хотя на рисунке этого не показано, делеция возможна при синтезе минус-цепи из матрицы полной плюс-цепи. Когда делеционная минус-цепь зарождается, она может быть экстракопирована путем синтеза матрицы плюс-цепи. Темными квадратами обозначена молекула полимеразы с прикрепленной возникающей РНК; a, b и c, d — 3′- и 5′-терминальные последовательности матрицы РНК.

что сплайсирование вовлечено в зарождение некоторых мРНК генов M и NS, еще не было показано, что эти гены продуцируют ДИ РНК. Подобным же образом последовательности, напоминающие обе акцепторные и донорские последовательности сплайсирования, присутствуют в генах полимеразы [36], но точки соединения в ДИ РНК не включают эти последовательности (см. табл. 28). Поэтому вероятно, что отклоняющиеся от нормы события репликации во время синтеза либо плюс-, либо минус-цепочечной РНК включают «проскакивание» по части матрицы РНК (рис. 38). Однако при изучении последовательности не было выявлено согласованной последовательности (последовательностей) для прикрепления либо повторного присоединения полимеразы при возникновении ДИ РНК (см. табл. 28). Возможное включение богатого урацилом участка [27] в матрицу как общего или единственного сигнала для прикрепления полимеразы несостоятельно по ряду причин.

1. Такие последовательности не присутствуют в местах соединения всех ДИ РНК плюс- или минус-цепи (см. табл. 28).

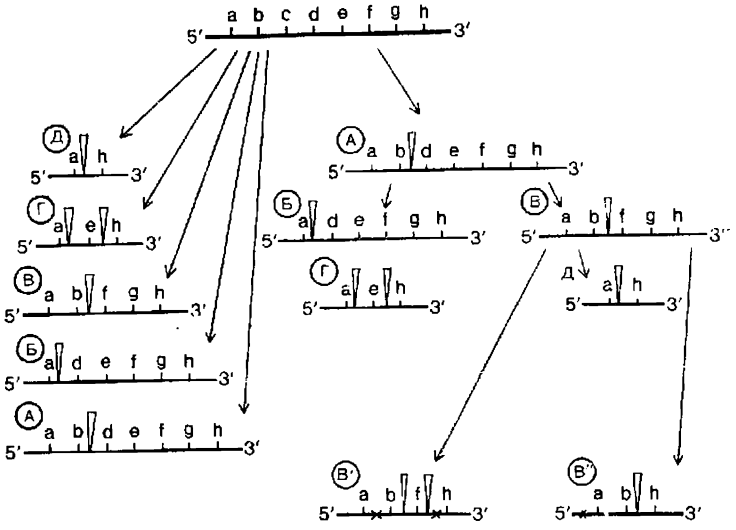
2. Богатые урацилом последовательности присутствуют также в сегментах M, NS, NA, HA и NP, которые не дают жизнь главным ДИ РНК (см. табл. 24). Поскольку РНК вируса гриппа в общем смысле богаты урацилом [45], присутствие в последовательности кластеров урацила, расположенных в непосредственной близости в нескольких местах соединения, может быть случайным.

3. Остановка РНК-полимеразы (или РНК-полимераз) в бога-

тых урацилом последовательностях часто вызывает «проскальзывание» и добавление большего количества остатков аденина, чем то, которое наблюдают во время полиаденилирования вирусных мРНК [3, 15]. Однако никакие дополнительные адениновые или другие остатки не обнаруживаются в местах соединения в ДИ РНК.

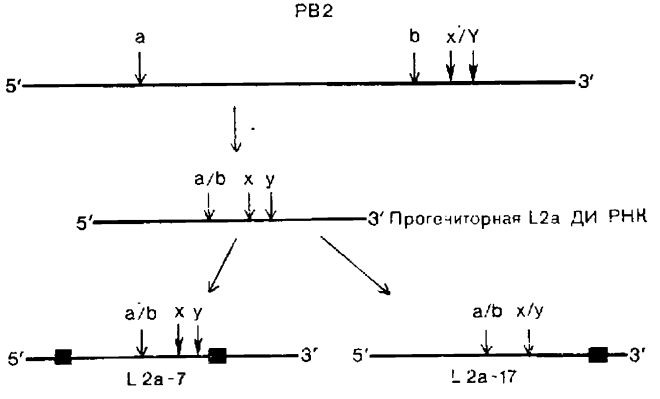
Большинство (если даже не все) ДИ РНК являются по своему происхождению моногенными, а не полигенными. Это свидетельствует о том, что полимераза с прикрепленной возникающей цепью может не полностью открепиться от матрицы, а, возможно, подойти к новому сайту матрицы, который оказывается наложенным при образовании кратковременной вторичной структуры (или структур). Такие кратковременные вторичные структуры могут образовываться при репликации вследствие динамической природы взаимодействий РНК — белок. Хотя недавно было продемонстрировано наличие рекомбинации между молекулами РНК [38a], вовлечение подобного процесса зарождения ДИ РНК вируса гриппа происходит, очевидно, очень редко. Была предложена идея о возможном зарождении одной ДИ РНК, включающем сложные рекомбинационные события между генами РВ1 и РВ2, которая основывалась на полученных в результате клонирования рекомбинантной РНК данных [43].

Существует два пути зарождения ДИ РНК вируса гриппа из их прогениторных генов: 1) все ДИ РНК, большие и малые, генерируются прямо из их вирусных прогениторных генов, т. е. генов РВ1, РВ2, РА; 2) некоторые из ДИ РНК (если не все из основных видов ДИ РНК) происходят не прямо из прогениторного гена (или генов), а из предшественника ДИ РНК. Эти два пути показаны на рис. 39, где продемонстрировано, что те же ДИ РНК могут зарождаться либо прямо из прогениторного гена, либо из предшественника ДИ РНК. Ясно, что некоторые ДИ РНК (продукты первой генерации) должны возникать прямо из прогениторного гена. Наибольшие ДИ РНК являются хорошими кандидатами для этого пути. Однако даже наибольшие ДИ РНК, изученные в настоящее время, не имеют всех последовательностей, которые присутствуют в некоторых меньших ДИ РНК (т. е. L1 и $ts^{+}3$, или L1 и D1b белка РВ2 [48]). Следовательно, либо должен существовать даже больший предшественник ДИ РНК, либо некоторые из этих малых ДИ РНК происходят независимо от вирусного прогениторного гена. Вполне вероятно, что некоторые из этих ДИ РНК могут возникать из предшественника ДИ РНК, а не прямо из вирусного прогениторного гена, как показано в случае с L2a-7 и L2a-17 (рис. 40). Поскольку эти две ДИ РНК содержат идентичную делецию, маловероятно, что они возникают независимо из прогениторного гена белка РВ2. Более того, они могут произойти из одного предшественника ДИ РНК, который содержал общую делецию и впоследствии эволюционировал в два вида ДИ РНК — одну с двумя непарностями оснований и другую с отдельными непарностями оснований и дополнительной деле-



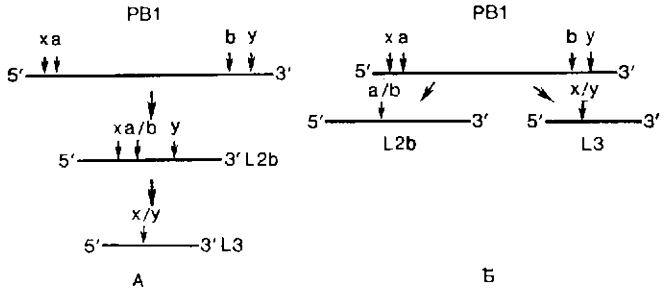
39. Возможные пути зарождения ДИ РНК вируса гриппа.

Эта модель описывает, как могут несколько ДИ РНК (А, Б, В, Г, Д) зарождаться из одного прогениторного гена за счет использования многочисленных путей. В одном случае (левая часть рисунка) ДИ РНК, содержащие варьирующие внутренние делеции, могут быть образованы прямо и независимо из того же прогениторного гена. Альтернативно те же ДИ РНК могут зарождаться путем последовательных внутренних делеций предшественника ДИ РНК (правая часть рисунка). Также некоторые ДИ РНК (В) могут дать жизнь многочисленным ДИ РНК (В′, В″) через аккумуляцию точечных мутаций (Х) и внутренних делеций (вытянутые треугольники).



40. Возможные пути зарождения и эволюции L2a-7 и L2a-17 из прогениторной ДИ РНК.

a, b, x и y — точки делеции; темный квадрат — точка мутации [59].



41. Возможные пути зарождения и эволюции L2b и L3 ДИ РНК.

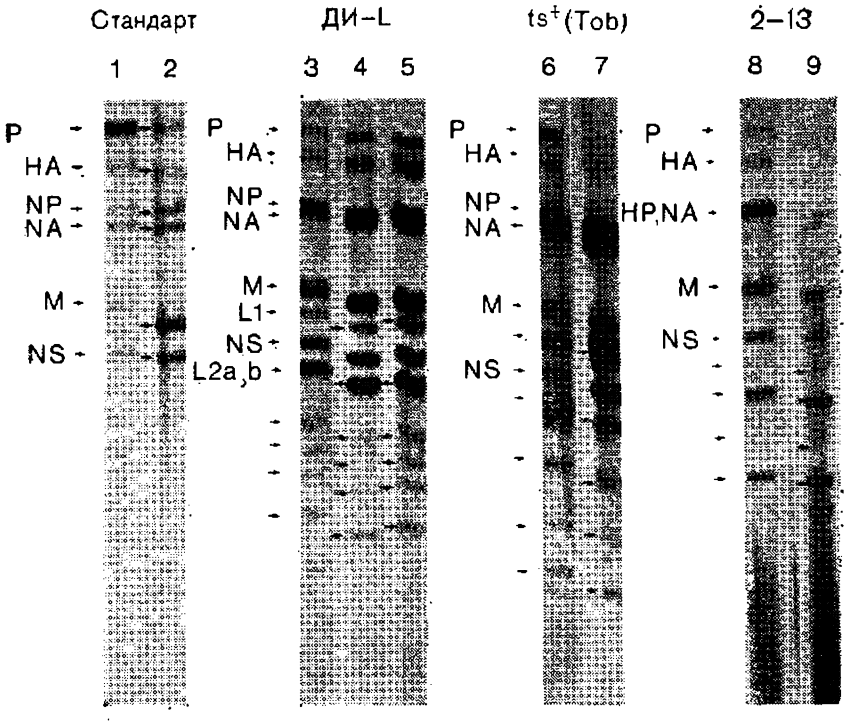
Показано, как две ДИ РНК (L2b и L3), которые были полностью секвенированы (см. рис. 48), могут возникнуть двумя независимыми путями, как предложено на рис. 39. Поскольку полная последовательность L3 присутствует в L2b и не имеется ни одной путаницы оснований, L3 могла произойти из большей ДИ РНК, L2b (А). Альтернативно обе L2b и L3 могли быть генерированы независимо из прогениторного гена PB1 (Б). a, b, x и y показывают точки делеции.

цией (см. рис. 40). Эта гипотеза предполагает, что ДИ РНК после своего образования подвергаются эволюции. В действительности было сообщено о зарождении прогрессирующе меньших ДИ РНК после многих пассажей [35]. Дополнительно было показано, что некоторые из меньших ДИ РНК содержат последовательности, которые являются составляющими бо́льших ДИ РНК (т. е. L2b и L3 белка PB1). Эти меньшие ДИ РНК могли возникнуть либо в результате прогрессирующего изменения, включая делецию бо́льших ДИ РНК, либо прямо из вирусного прогениторного гена (рис. 41). Данные секвенирования не исключают ни одной из этих возможностей. Более вероятны оба пути, независимое зарождение прямо из вирусного прогениторного гена (или генов) так же, как и прогрессирующая эволюция, могут быть действующими в создании различных ДИ РНК.

Таким образом, ДИ РНК предпочтительно, если не исключительно, генерируются из генов полимеразы. Один ген полимеразы может дать жизнь многочисленным ДИ РНК различных размеров. Одна ДИ РНК обычно происходит из одного гена полимеразы (т. е. моногенна), что указывает на редкую многосегментную рекомбинацию. ДИ РНК генерируются из прогениторного гена (или генов) в результате отклоняющихся от нормы репликационных событий. Кроме того, однажды генерированные ДИ РНК могут подвергнуться дальнейшей эволюции, продуцируя новые ДИ РНК.

VII. Транскрипция ДИ частиц вируса гриппа

Методы анализа последовательности показали, что структуры ДИ РНК вируса гриппа отличаются от таковых для 5′ ДИ РНК, наблюдаемых с несегментированными вирусами с минус-цепью. Поскольку ДИ РНК вируса гриппа содержали оба геномных 5′- и 3′-конца, они, вероятно, содержат геномный сайт связывания



42. Анализ методом гель-электрофореза транскриптов ДИ L, ДИ ts+ (Tob) и ДИ 2—13 вирусных частиц.

Меченые поли(А)+ транскрипты были выделены, деаденилированы и подвергнуты электрофорезу [17]. Полосы означают: 1 — стандартная геномная РНК; 2 — АрГ-праймированные стандартные геномные транскрипты; 3 — ДИ L РНК; 4 — АрГ-праймированные ДИ L транскрипты; 5 — РНК 4-праймированные ДИ L транскрипты вируса мозаики люцерны; 6 — ДИ ts+ (Tob) РНК; 7 — АрГ-праймированные ДИ ts+ (Tob) транскрипты; 8—ДИ 2—13 РНК; 9 — АрГ-праймированные ДИ 2—13 транскрипты.

полимеразы на обоих концах. На основании подобного рассуждения было предсказано, что эти ДИ РНК должны быть транскрибированы в мРНК. Действительно, ДИ вирусы гриппа в отличие от других ДИ вирусов с минус-цепью транскрибируют комплементарные РНК in vitro [17]. Условия транскрипции были идентичны условиям для стандартного вируса. Активность вирионассоциированной полимеразы была также одинакова в ДИ и стандартных вирусных образцах. Как известно, для стандартного вируса [45, 46] транскрипция зависела от присутствия специфических внешних праймеров, например АрГ или кэпированных РНК. УрГ, как и ожидалось, не мог являться праймером для транскрипции. Поскольку ДИ частицы вируса гриппа в отличие от несегментированных РНК-содержащих вирусов также содержали сегменты стандартной РНК в дополнение к сегментам ДИ РНК, было важно определить, какие из сегментов РНК были транскрибированы. На рис. 42 показано, что размеры транскрип-

тов точно соответствуют размерам сегментов ДИ РНК. Транскрипты ДИ РНК также содержат поли(А) (длиной в 60—350 нуклеотидов) на 3′-конце и АрГ праймер на 5′-конце [17]. Гибридизация транскриптов ДИ РНК с соответствующими сегментами ДИ РНК и анализ дуплексов РНК показал, что ДИ РНК-специфические транскрипты не являются неполными продуктами гена полимеразы, а представляют собой точные копии ДИ РНК. Эти результаты прямо показывают, что ДИ РНК транскрибируются в поли(А)-содержащие комплементарные РНК, которые имеют характеристики стандартных геномных транскриптов.

Таким образом, с точки зрения транскрипции, ДИ РНК могут быть классифицированы на две группы: 1) те, которые не могут генерировать поли(А)-содержащие транскрипты; 2) те, которые могут продуцировать поли(А)-содержащие транскрипты. Бо́льшая часть ДИ РНК вируса гриппа относится ко второй группе, в то время как бо́льшая часть ДИ РНК несегментированных вирусов с минус-цепью относится к 5′-типу и принадлежит к первой группе. Однако последнее сообщение показывает, что 5′—3′ ДИ РНК могут и не являться редко встречающимися среди несегментированных вирусов [4]; следует выяснить, могут ли эти ДИ РНК продуцировать транскрипты.

VIII. Интерференция ДИ вирусами гриппа

Механизм, с помощью которого ДИ РНК интерферируют с репликацией стандартной РНК, еще полностью неизвестен. Для 5′ ДИ РНК несегментированных вирусов с минус-цепью установлено, что поскольку у них отсутствует 3′-конец генома, но имеются на их 3′-конце переменные последовательности с более высокой аффинностью для полимеразы, они интерферируют с репликацией стандартного генома, конкурируя за ограниченное число молекул полимеразы [54]. С другой стороны, поскольку ДИ РНК вируса гриппа содержат оба 5′ и 3′ геномных конца и функционируют как матрицы транскрипции, маловероятно, что они имеют измененные сайты связывания полимеразы на своих концах. Поэтому также маловероятно, что предложенный для интерференции 5′ ДИ РНК механизм является основным способом интерференции для 5′—3′ ДИ РНК. Хотя окончательное направление интерференции ДИ вирусами гриппа в настоящий момент не может быть выделено, полученные данные предполагают наличие нескольких возможностей, которые могут быть экспериментально проверены. Во-первых, ДИ РНК могут интерферировать на уровне первичной транскрипции. Действительно, такой способ интерференции был предложен для ДИ LT VSV, который также относится к 5′—3′ типу [57]. Во-вторых, поскольку транскрипты ДИ РНК обладают характеристиками РНК, они могут быть транслированы, продуцируя дефектные, подобные полимеразе белки. Эти белки, если они продуцируются, могут связываться предпочтительно со спе-

цифическим участком (или участками) геномной матрицы (или матриц) и ингибировать транскрипцию и/или репликацию геномной РНК. Бо́льшая часть таких дефектных белков будет иметь N-конец соответствующих белков полимеразы, но отличный С-конец, так как ДИ РНК часто не сохраняет рамку считывания прогениторного гена. И наконец, транскрипция ДИ РНК может не играть функциональной роли в интерференции, но другие параметры, как, например, структура или размер ДИ РНК, могут иметь значение при конкуренции. Детальное изучение транскрипции стандартных и ДИ РНК сегментов in vivo, а также трансляция геномных и ДИ транскриптов прояснит механизм интерференции 5′—3′ ДИ вирусами гриппа. Кроме того, опосредованная ДИ частицами интерференция вирусов гриппа может вовлекать не только интерференцию с репликацией и/или транскрипцией вирусной РНК, но также интерференцию на уровне сборки и созревания вируса.

IX. Заключение

ДИ частицы вируса гриппа, продуцируемые при высокой множественности заражения, содержат молекулы ДИ РНК, которые относятся к 5′—3′ типу и возникают из внутренних делеций одного из генов полимеразы. Они могут быть транскрибированы в поли(А)-содержащие комплементарные РНК, имеющие характеристики РНК стандартного вируса. Структура ДИ РНК вируса гриппа и их возможная функция (т. е. транскрипция) оказываются отличными от соответствующих характеристик 5′ ДИ РНК, которые представляют большинство несегментированных минус-цепочечных ДИ РНК. Хотя клонирование ДНК и секвенирование помогло в расшифровке первичной структуры ряда ДИ РНК и их прогениторных генов, специфические этапы, вовлеченные в зарождение и эволюцию ДИ РНК вируса гриппа, а также механизм интерференции остаются еще во многом неразрешенными и будут являться предметом исследования на ближайшие годы.

ДИ частицы вируса гриппа, подобно ДИ частицам других вирусов, подавляют цитопатический эффект инфекции стандартным вирусом и помогают в инициации персистентно инфицированных клеточных культур in vitro. Поскольку ДИ частицы повсеместно присутствуют и интерферируют с репликацией стандартного вируса, они могут оказывать дополнительное селекционирующее давление на эволюцию вирусов гриппа в природе.

Список литературы

1. *Ada G., Perry B.* — Nature, 1955, v. 175, p. 209—210.
2. *Ada G., Perry B.* — J. Gen, Microbiol., 1956, v. 14, p. 623.
3. *Adman R., Grossman L.* — J. Mol. Biol., 1967, v. 23, p. 417—439.

4. *Amesse L., Pridgen C., Kingsbury D.* — Virology, 1982, v. 118, p. 17—27.
5. *Bean W., Simpson R.* — J. Virol., 1976, v. 18, p. 365—369.
6. *Bennink J., Yewdell J., Gehard W.* — Nature, 1982, v. 296, p. 75—76.
7. *Bishop D., Huddieston J., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 1335—1343.
8. *Bishop D., Jones K., Huddleston J. et al.* — Virology, 1982, v. 120, p. 481—489.
9. *Brown W., Stump K., Kelley W.* — J. Biol. Chem., 1982, v. 257, p. 1965—1972.
10. *Camerini-Otero R., Sollner-Webb B., Felsenfeld G.* — In: Nucleic Acid-Protein Recognition. N. Y.: Academic Press, 1977, p. 151—158.
11. *Carter C., Kraut J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 283—287.
12. *Carter M., Mahy B.* — Arch. Virol., 1982, v. 71, p. 12—25.
13. *Carter M., Mahy B.* — Arch. Virol., 1982, v. 73, p. 109—119.
14. *Carter M., Mahy B.* — Arch. Virol., 1982, v. 74, p. 71—76.
15. *Chamberlin M., Berg P.* — J. Mol. Biol., 1964, v. 8, p. 708—726.
16. *Champness J., Bloomer A., Bricogne A. et al.* — Nature, 1976, v. 259, p. 20—24.
17. *Chanda P., Chambers T., Nayak D.* — J. Virol., 1983, v. 45, p. 55—61.
18. *Choppin P., Pons M.* — Virology, 1970, v. 42, p. 603.
19. *Chou P., Adler A., Fasman G.* — J. Mol. Biol., 1975, v. 96, p. 29—45.
19a. *Chou P., Fasman G.* — Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, p. 251—276.
20. *Crumpton W., Dimmock N., Minor P., Avery R.* — Virology, 1978, v. 90, p. 370—373.
21. *Crumpton W., Clewley J., Dimmock N., Avery R.* — FEMS Lett., 1979, v. 6, p. 431—434.
22. *Crumpton W., Avery R., Dimmock N.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 53, p. 173—177.
23. *Davis A., Nayak D.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 3092—3096.
24. *Davis A., Hiti A., Nayak D.* — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 215—219.
24.a. *Dayhoff M.* — Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5, Suppl. 3. Washington DC, 1978, p. 363—373.
25. *De B., Nayak D.* — J. Virol., 1980, v. 36, p. 847—859.
26. *Fields S., Winter G.* — Gene, 1981, v. 15, p. 207—214.
27. *Fields S., Winter G.* — Cell, 1982, v. 28, p. 303—313.
28. *Fiers W., Contreras R., Duerinck F. et al.* — Nature, 1976, v. 260, p. 500—507.
29. *Garoff H., Frischauf A., Simons K. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 6376—6380.
29a. *Hiti A., Davis A., Nayak D.* — Virology, 1981, v. 111, p. 113—124.
29b. *Hiti A., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 41, p. 730—734.
30. *Holland J., Kennedy S., Sempler B. et al.* — In: Comprehensive Virology. Vol. 16. N. Y.: Plenum Press, 1980, p. 137—192.
31. *Huang A., Baltimore D.* — Nature, 1970, v. 226, p. 325.
32. *Huang A., Baltimore D.* — In: Comprehensive Virology. Vol. 10. N. Y.: Plenum Press, 1977, p. 73—116.
33. *Irwin M., Nyborg J., Reid B., Blow D.* — J. Mol. Biol., 1976, v. 105, p. 577—586.
34. *Janda J., Nayak D.* — J. Virol., 1979, v. 32, p. 697—702.
35. *Janda J., Davis A., Nayak D., De B.* — Virology, 1979, v. 95, p. 48—58.
36. *Kaptein J., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 55—63.
37. *Kaverin N., Kolomietz L., Rudneva I. (Каверин Н., Коломиец Л., Руднева Н.).* — J. Virol., 1980, v. 34, p. 506—511.
38. *Keene J., Chien I., Lazzarini R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 18, p. 2090—2094.
38a. *King A., McCahon D., Slade W., Newman J.* — Cell, 1982, v. 29, p. 921—928.
39. *Kitamura N., Semer B., Rothberg P. et al.* — Nature, 1981, v. 291, p. 547—553.

39a. *Lamb R., Ching-Juh L.* — Cell, 1980, v. 21, p. 475—485.
40. *Lazzarini R., Keene J., Schubert M.* — Cell, 1981, v. 26, p. 145—154.
41. *Lehtovara P., Soderlund H., Keranen S. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 5353—5357.
42. *Lenard J., Compans R.* — Virology, 1975, v. 65, p. 418—426.
43. *Moss B., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, p. 1941—1947.
44. *Nakajima K., Ueda M., Sugiura A.* — J. Virol., 1979, v. 29, p. 1142—1148.
45. *Nayak D., Baluda M.* — J. Virol., 1967, v. 1 (6), p. 1217—1223.
46. *Nayak D.* — Fed. Proc., 1969, v. 28, p. 1858—1865.
47. *Nayak D.* — J. Gen. Virol., 1972, v. 14, p. 63.
48. *Nayak D.* — Ann. Rev. Microbiol., 1980, v. 34, p. 619—644.
49. *Nayak D., Tobita K., Janda J. et al.* — J. Virol., 1978, v. 28, p. 375—386.
50. *Nayak D., Davis A., Cortini R.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y.: Academic Press, 1982, p. 77—92.
51. *Nayak D., Sivasubramanian N., Davis A. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 2216—2220.
52. *Pasek M., Goto T., Gilbert W. et al.* — Nature, 1979, v. 282, p. 575—579.
53. *Perrault J.* — Curr. Topics in Microbiology and Immunology, 1981, v. 93, p. 152—207.
54. *Perrault J., Semler B., Leavitt R., Holland J.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. N. Y.: Academic Press, 1978, p. 527—538.
55. *Plotch S., Krug R.* — J. Virol., 1977, v. 21, p. 24—34.
56. *Plotch S., Bouloy M., Krug R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 1618—1622.
56a. *Schiffer M., Edmundson A.* — Biophys. J., 1967, v. 7, p. 121—135.
57. *Schnitzlein W., Reichmann M.* — J. Mol. Biol., 1976, v. 101, p. 307—325.
57a. *Sharp P.* — Cell., 1981, v. 23, p. 643—646.
58. *Sivasubramanian N., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 44, p. 321—329.
59. *Sivasubramanian N., Nayak D.* — Virology, 1983, v. 124, p. 232—237.
60. *Soeda E., Arrand J., Griffin B.* — J. Virol., 1980, v. 33, p. 619—630.
61. *Ueda M., Nakajima K., Sugiura A.* — J. Virol., 1980, v. 34, p. 1—8.
62. *Van Rompuy L., Min Jou W., Huylebroeck D. et al.* — Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, p. 347—353.
63. *Von Heuverswyn H., Van de Voorde A., Fiers W.* — Eur. J. Biochem., 1978, v. 91, p. 415—430.
64. *Von Magnus P.* — Mineral. Geol., 1947, v. 24 (7), p. 1.
65. *Von Magnus P.* — Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1951, v. 29, p. 157.
66. *Von Magnus P.* — Adv. Virus Res., 1954, v. 2, p. 59—78.
67. *Winter G., Fields S.* — Nucl. Acid Res., 1980, v. 8, p. 1965—1974.
68. *Winter G., Fields S.* — Virology, 1981, v. 114, p. 423—428.
69. *Winter G., Fields S.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 2135—2143.
70. *Winter G., Fields S., Ratti G.* — Nucl. Acid. Res., 1981, v. 9, p. 6907—6915.
71. *Eisenberg D., Weiss R., Terwilliger T.* — Nature, 1982, v. 299, p. 371—374.

9

Вирусы гриппа B и гриппа C

Г. Эйр, Р. Компанс (G. Air, R. Compans)

I. Введение

Уже давно отмечено, что для поверхностных антигенов вирусов, классифицированных как вирусы гриппа, характерно полное отсутствие перекрестной активности. Однако все вирусы, классифицированные как вирусы гриппа типа А, обладали перекрестно-реактивными внутренними компонентами — матричным и нуклеокапсидным белками. Морфология (рис. 43), строение и процессы репликации вирусов гриппа В и С подобны таковым для вирусов гриппа А. Однако не наблюдалось никакой антигенной перекрестной реактивности между этими вирусами, поэтому они были охарактеризованы как совершенно не связанные между собой антигенные серотипы. Морфология вирионов гриппа А и В неразличима при исследовании с помощью электронной микроскопии; с другой стороны, вирионы гриппа С обладают некоторыми отчетливыми структурными отличиями, которые детально рассматриваются в разделе III.

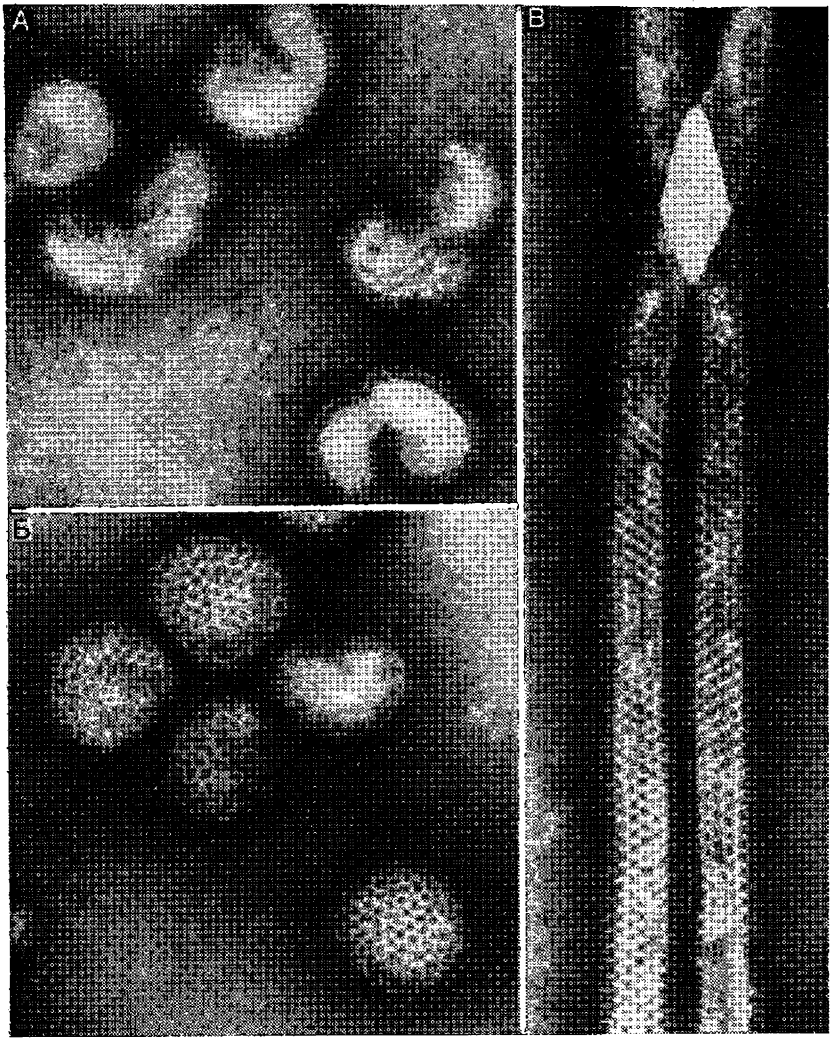
Четко прослеживаются основные различия между экологией и антигенной изменчивостью вируса гриппа А, с одной стороны, и вирусов гриппа В и С — с другой. Вирусы гриппа А выделяют из различных животных резервуаров, в то время как вирусы гриппа В и С, за исключением единственного сообщения, выделяют только у человека. Не наблюдали значительных антигенных сдвигов у поверхностных антигенов вирусов гриппа В и С, хотя гемагглютинин (НА) вирусов гриппа В подвержен антигенному дрейфу.

Настоящая глава посвящена структуре, репликации, генетике и эпидемиологии вирусов гриппа В и С, а также вопросам сходства и различия этих вирусов с вирусами гриппа А.

II. Вирус гриппа B

A. Разновидность РНК вируса гриппа B

РНК вирусов гриппа В имеют 8 сегментов [85], которые, очевидно, кодируют по крайней мере 9 полипептидов, аналогичных таковым у вирусов А; было определено, каким сегментом РНК кодирует-



43. Электронная микрофотография вирионов гриппа В и С.

А — вирионы гриппа В/НК/8/73; Б — вирионы гриппа С/JHB/1/66, выращенные в куриных эмбрионах; В — филаментозные частицы гриппа С/JHB/1/66, выращенные на клетках фибробласта куриного эмбриона. Негативное окрашивание фосфовольфраматом натрия, pH 7,0. Увеличение: А×150 000; Б×150 000; В×165 000.

ся каждый вирусный белок [41, 83, 99]. Генные сегменты вируса гриппа В определенно крупнее, чем соответствующие сегменты РНК вирусов гриппа А [20].

Интенсивно накапливается информация о последовательностях для генов и для белков вирусов гриппа В. Современные сведения суммированы в табл. 29. J. Skehel и A. Hay [95] сообщили о последовательностях 5′-конца вРНК штамма B/Hong Kong/8/73, а

Таблица 29. *Размеры генов и белков вируса гриппа B/Lee/40*

Гены			Белки			
№ сегмента	количество нуклеотидов: по данным электрофореза в геле[1]	количество нуклеотидов: по данным секвенирования	обозначение	м. м. по данным электрофореза в SDS-геле[1]	Углеводы	Аминокислоты по данным нуклеотидного секвенирования
1	2 800		P2 или P3	93 000 или 80 000		
2	2 800		P1	102 000		
3	2 700		P3 или P2	80 000 или 93 000		
4	2 100	1882[2]	HA	84 000	+	584[2]
			HA1		+	346
			HA2		+	223
5	2 000		NP	66 000		
6	1 700	1557[5]	NA	66 000	+	466[5]
7	1 150	1191[3]	M	25 000		248[3]
			M2			195[3]
8	1 000	1096[4]	NS1	40 000		281[4]
			NS2	11 500[4]		131[4]

[1] [83]; [2] [39]; [3] [12]; [4] [11]; [5] [94].

U. Desselberger и соавт. [21] получили сведения о последовательности нуклеотидов с 20-го по 30-й с 5′- и 3′-концов сегментов РНК вируса гриппа B/Hong Kong/8/73. Как и в случае вирусов гриппа A [95], сегменты РНК имеют общие последовательности на концах. Последовательности нуклеотидов для штаммов B похожи, но не идентичны таковым для штаммов A. По крайней мере больший размер гемагглютининового и нейраминидазного генов вирусов B отчасти обусловлен наличием более длинной некодирующей последовательности на 5′-конце вРНК [39, 94].

При помощи клонированной ДНК были получены полные последовательности для сегментов РНК вируса B/Lee/40 — 7-го [12], 8-го [11], 4-го [39] и 6-го [94]. Опубликованные данные о терминальных последовательностях РНК вируса гриппа B представлены в табл. 30 и 31 и свидетельствуют о возможно большей разнородности по сравнению с уже рассмотренными терминальными последовательностями вирусов гриппа A. Это достаточно неожиданно в свете относительно слабой антигенной изменчивости вируса гриппа B по сравнению с вирусами гриппа A.

Б. Белки вируса гриппа B

Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS показал, что белкам вируса гриппа B присущи молекулярные массы, отличающиеся от таковых для соответствующих белков вируса гриппа A. HA, NP

Таблица 30. *3′-терминальные последовательности сегментов РНК вируса гриппа В*

Вирус	Сегмент/ген	Последовательность	Ссылка
		10 20	
B/HK/8/73	1+2+3	УЦГУЦУУЦГЦ $^{У}_{Г}$ УЦГУААА-Г	[21]
B/HK/8/73	HA	УЦГУЦУУЦГЦ УУЦГУААААГ	[21]
B/Lee/40	HA	УЦГУЦУУЦГЦ ААЦГУААААГ	[39]
B/HK/8/73	NP	УЦГУЦУУЦГЦ ГУЦГУААААГ	[21]
B/HK/8/73	NA	УЦГУЦУУЦГЦ УУЦГУАГААГ	[21]
B/Lee/40	NA	УЦГУЦУУЦГУ ГУЦГУАУААГ	[94]
B/HK/8/73	M	УЦГУЦУУЦГЦ УУ	[21]
B/Lee/40	7	УЦГУЦУУЦГУ ГЦГУГАААГА	[12]
B/HK/8/73	NS	УЦГУЦУУЦГЦ УУЦЦУАА $^{У}_{Ц}$УА	[21]
B/Lee/40	NS	У———УУЦГУ ЦУЦЦУАААААУ	[2]
B/Lee/40	NS	(Г)ЦГУЦУУЦГУ ЦУЦЦУАААУА	[11]

Таблица 31. *5′-терминальные последовательности сегментов РНК вируса гриппа В*

Вирус	Сегмент	Последовательность	Ссылка
		10 20	
B/HK/8/73	1+2+3*	АГУАГАААЦА ЦГАГЦАУУУУ	[95]
B/HK/8/73	1+2+3	АГУАГАААЦА АГАГ $^{У}_{Ц}$АУУУУ	[21]
B/Lee/40	HA	АГУАГУААЦА АГАГЦАУУУУ	[39]
B/HK/8/73	HA	АГУАГУААЦА АГАГЦАУУУУ	[21]
B/HK/8/73	4+5*	АГУАГАААЦА АГАГЦАУУУУ	[95]
B/HK/8/73	NP	АГУАГАААЦА АЦАГЦАУУУУ	[21]
B/HK/8/73	6*	АГУАГАААЦА АГАГЦАУУУУ	[95]
B/HK/8/73	6	АГУАГУААЦА АГАГ $^{У}_{Ц}$АУУУУ	[21]
B/Lee/40	6	АГУАГУААЦА АГАГЦАУУУУ	[94]
B/HK/8/73	7*	АГУАГАААЦА АГ $^{А}_{Г}$ГААУУУУ	[95]
B/HK/8/73	7	АГУАГАААЦА АЦГЦА $^{Ц}_{А}$УУУУ	[21]
B/Lee/40	7	АГУАГАААЦА АЦГЦАЦУУУУ	[12]
B/HK/8/73	8*	АГУАГАААЦА АГАГГАУУУУ	[95]
B/HK/8/73	8	АГУАГУААЦА АГАГААУУУУ	[21]
B/Lee/40	8	АГУАГУААЦА АГАГГАУУУУ	[11]

* Возможные назначения.

и NA вируса B/GL/1760/54 оказались отчасти крупнее (м. м. 82 000, 66 000 и 64 000 соответственно), хотя белок M был меньше (м. м. 24 000) по сравнению с соответствующими белками A/WSN/33 [14, 16]. Очень близкие к этим значения были получены в более позднем исследовании белков B/Lee/40 [83].

1. Гемагглютинин

Белок НА вируса гриппа В подвержен протеолитическому расщеплению на НА1 и НА2, как и полипептиды НА вируса гриппа А. Кливедж может быть имитирован трипсином, но явно не плазмином [14]. Оба полипептида — НА1 и НА2 — содержат глюкозамин, но НА2 из B/GL/1760/54 не содержит фукозу, хотя этот сахар присутствует в НА2 вирусов гриппа А [14]. Это свидетельствует, что олигосахариды, связанные с субъединицей НА2 вируса гриппа В, относятся к простому, богатому маннозой типу.

M. Waterfield и соавт. [102], изучив последовательности N-терминальных участков НА1 и НА2 B/Lee/40, выявили наличие гомологии с последовательностями НА1 и НА2 вируса гриппа А.

M. Krystal и соавт. [39] секвенировали клонированные кДНК-копии гена НА B/Lee/40. Полная последовательность НА была получена при помощи двух клонов, один из которых простирался от синтетического олигонуклеотида, использованного в качестве праймера при синтезе кДНК, до 1336 основных пар. Второй клон начинался с нуклеотида 483 и простирался до 5′-конца вирионной РНК, что облегчило определение полной последовательности. Общая длина составляет 1882 нуклеотида. Первый АУГ начинается в нуклеотиде 34, и в случае трансляции последовательности с этого инициирующего кодона предсказан белок из 584 аминокислот. N-терминальная последовательность начинается аминокислотой 16 [102]. Последовательность с 3-й по 15-ю аминокислоту неполярна и предположительно является сигнальным пептидом, как и у вирусов гриппа А [1, 22].

Последовательность N-терминала НА2, определенная M. Waterfield и соавт. [102], начинается после аминокислоты 346 НА1, представляющей собой аргининовый остаток. Таким образом, протеолиз, расщепляющий предшественник НА на НА1 и НА2, включает трипсиноподобную активность, как и в случае вирусов гриппа А [101], что было показано P. Choppin и соавт. [14]. Неизвестно, идет ли в дальнейшем процесс на С-терминале НА1.

W. Laver и G. Air (неопубликованные данные) проанализировали триптические пептиды НА1 и НА2 B/Lee/40, которые можно было идентифицировать по последовательности, предсказанной на основании нуклеотидной последовательности, расшифрованной M. Krystal и соавт. [39]. Последовательности НА1 и НА2 представлены с идентифицированными пептидами, отмеченными так же, как и два различия в последовательностях: Val появлялся в пептиде чаще, чем Ala в положении 90 НА1, а Ser — вместо Tyr в положении 54 НА2.

Сайты потенциального гликозилирования присутствуют в остатках 25, 59, 165, 232, 303 и 332 НА1 и в остатках 145, 171, 184 и 216 НА2. В противоположность этому гемагглютинины вирусов гриппа А — A/Mem/102/72 и A/Jap/305/57 — имеют только один углевод, прикрепленный к НА2, и 6 и 4 соответственно — в НА1. Дополнительно к сигнальному пептиду видны гидрофобные обла-

сти на N-терминале и возле С-терминала НА2 [39]. С-терминальный участок НА2 является предположительно трансмембранным сегментом, как и для гемагглютининов вирусов гриппа А [101].

При сравнении последовательностей вирусов гриппа B/Lee/40 и A/PR/8/34 [109] обнаружено наличие 24% и 39% консервативности аминокислот в НА1 и НА2 соответственно. При сравнении последовательностей вирусов A/PR/8/34 и A/Aichi/2/68 [100] консервативность была представлена 35% и 53%; таким образом, последовательность НА вируса гриппа В, несмотря на имеющиеся отличия, все-таки имеет определенные гомологии с последовательностями НА известных вирусов гриппа А. Тринадцать цистеиновых остатков у B/Lee/40 и A/PR/8/34 могут быть выстроены в одну линию; только лишние цистеиновые остатки находятся в сигнальном пептиде и очень близки к С-терминалу НА2 вируса A/PR/8/34. Ни один из них не включен в глобулярную структуру НА. Таким образом, вполне вероятно, что основная трехмерная структура НА вируса гриппа В будет подобна таковой для вируса гриппа A/Aichi/2/68 [107].

2. Нейраминидаза

Имеется единственное сообщение об аминокислотном строении NA вируса гриппа В [46]. Однако аминокислотная последовательность может быть предсказана на основании последовательности клонированной кДНК-копии вирусной или мессенджер-РНК [94]. Клонированная ДНК содержит 10 нуклеотидов, полученных от клеточной РНК за счет процесса «переноса кэпа», который является общим для вирусов гриппа А и В [37].

Вирусспецифическая часть клона NA вируса B/Lee/40, секвенированного M. Shaw и соавт. [94], содержит в длину 1557 основных пар. Первый кодон АУГ расположен с 47-го по 49-й нуклеотид, а открытая рамка считывания для трансляции, которая начинается этим кодоном, заканчивается после нуклеотида 346. Подобная рамка должна давать белок с м. м. только 11 242, что несовместимо с известным размером белка NA. Второй кодон АУГ расположен на участке с 54-го по 56-й нуклеотид и следует за открытой рамкой считывания, простираясь до двух последовательных терминирующих кодонов с 1452-го по 1457-й нуклеотид; предполагают, что именно этот второй кодон АУГ является инициирующим сайтом для трансляции NA. Трансляция, начинаясь в этом кодоне, будет давать белок, состоящий из 466 аминокислот с м. м. 51 721, что соответствует размеру NA. Белок должен содержать четыре сайта потенциального гликозилирования (т. е. аспарагин, за ним — неопределенная аминокислота, за ней — серин или треонин), которые обнаруживаются в аминокислотах 56, 64, 144 и 284. Аминокислотное строение, предсказанное по нуклеотидной последовательности, хорошо согласуется с результатами аминокислотного анализа очищенной NA вируса гриппа B/Lee/40 [46].

Обращает на себя внимание такое отличие предсказанных

аминокислотных последовательностей от нуклеотидных последовательностей восьми различных подтипов NA вируса гриппа A, как то, что первые шесть аминокислот на N-терминале идентичны [7, 8]. Аминокислотная последовательность на этом участке NA вируса гриппа B/Lee различается, хотя третий остаток, пролин, одинаков у белков вирусов A и B.

Нейраминидаза вируса A имеет область, близкую к N-терминалу, которая прикрепляет белок к вирусной мембране [9, 23], и подобно тому в NA вируса B/Lee/40 единственный гидрофобный сегмент, достаточно длинный для образования мостика к мембране, простирается с 4-го по 34-й остаток. За этой областью следует участок, который должен соответствовать тонким ножкам, обнаруживаемым на электронных микрофотографиях, и который в случае последовательности вируса B/Lee [94] содержит сайты гликозилирования и цистеиновые остатки, как уже было замечено для NA различных подтипов вируса гриппа A [7].

В последовательностях NA, представляющих 8 подтипов вируса гриппа A, не выявлено гомологии в последовательности места прикрепления к гидрофобной мембране или ножке [7], но некото-

Таблица 32. *Цистеиновые остатки в нейраминидазах вирусов гриппа A и B*

B/Lee/40[1]	A/PR/8/34[2] и A/WSN/33[3]	A/Udorn/72[4] и A/NT/60/68[5]
	14	21
		42
54	49	53
		78
87	77	92
122	109	124
127	114	129
	146	
		175
182	169	183
		193
229	216	230
231	218	232
236	223	237
251		
277	264	278
279	266	280
289	275	289
291	277	291
318	303	318
337	320	337
420	402	417
424	406	421
447	431	447

Примечание. Остатки пронумерованы, начиная с инициирующего метиониновогo остатка, который для некоторых штаммов вируса гриппа A является N-терминальным остатком белка [9]. Номера остатков на одних и тех же линиях соответствуют цистеинам, последовательности вокруг которых гомологичны [94].

[1] [94]; [2] [23]; [3] [31]; [4] [51]; [5] [6].

рая гомология наблюдается отчасти в области цистеина в положении 77 для NA вируса A/PR/8/34. NA вируса гриппа B не имеет убедительной гомологии с NA вирусов A/PR/8/34 или A/Udorn/72 вплоть до аминокислоты 116. Из последующих 248 остатков NA B/Lee/40 87 аминокислот — такие же, как и в NA вируса A/Udorn/72. Двенадцать из них являются цистеиновыми остатками. Это свидетельствует, что трехмерные структуры нейраминидаз A и B могут быть в основном одинаковыми, хотя NA вируса A/Udorn/72 имеет два дополнительных цистеиновых остатка в этой области (табл. 32).

Размер белка NA вируса гриппа B, аминотерминальный гидрофобный участок и гомология между вирусами A и B — все эти данные свидетельствуют в пользу того, что трансляция NA B/Lee начинается со 2-го кодона АУГ на 5′-конце мРНК [94]. В большинстве мРНК эукариот, включая те или другие секвенированные гены вируса гриппа, первый кодон АУГ используется как сайт инициации трансляции, но есть несколько случаев среди генов эукариот, когда первый кодон АУГ не принимается во внимание за счет гипотетического «сканирующего механизма» [36]. Однако ген NA вируса гриппа B необычен тем, что содержит длинную открытую рамку считывания, способную кодировать 100 аминокислот, следующую за первым кодоном АУГ. Пока сообщений о синтезе подобного белка не было [94].

3. Матричный белок

Была определена полная нуклеотидная последовательность клонированной в полную длину ДНК-копии сегмента 7 РНК генома, кодирующего матричный белок вируса гриппа B/Lee/40 [83]. Был получен клон от кДНК-копий вирусной РНК и мессенджер-РНК [12].

Сегмент 7 РНК вируса гриппа B/Lee/40 содержит 1191 нуклеотид. После 5′-некодирующего участка из 24 нуклеотидов следует открытая рамка считывания, простирающаяся от первого кодона возможной инициации белкового синтеза в нуклеотидах 25—27 до терминального кодона в нуклеотидах 769—771. Этот участок может кодировать белок, состоящий из 248 аминокислот, что соответствует по размеру оцененной молекулярной массе белка M. Начиная с нуклеотида 513, следует второй открытый участок — рамка считывания +2, простирающаяся до терминирующего кодона в нуклеотидах 1095—1097. В нуклеотидах 1171—1175 располагается тракт из пяти адениновых остатков. Этот участок, возможно, представляет сайт полиаденилирования для вирусных мРНК, как и в случае вируса гриппа A [86]. Полиаденилирование в этом сайте должно давать M1 мРНК из примерно 1175 вирусных нуклеотидов.

Открытый участок рамки считывания +2 может кодировать 195 аминокислот, которые перекрывают кодирующий участок для белка M1 по 86 аминокислотам. Возможно, вторая кодирующая

область сегмента 7 РНК вируса гриппа В используется для кодирования полипептидного аналога белка М2 вируса группа А [12]. Хотя данный участок может кодировать 195 аминокислот, первый кодон АУГ не возникает вплоть до нуклеотидов 771—773. Если белковый синтез будет инициироваться в этой точке, то должен будет появиться белок из 105 аминокислот. Если, однако, М2 мРНК вируса гриппа В содержит прерванную последовательность и действительно употребляет инициирующий кодон в 5′-ведущей последовательности, как и в случае вируса гриппа А [45], то структура мРНК может кодировать любое количество аминокислот вплоть до 195. Пока не было обнаружено никаких белков, соответствующих белку М2 вируса гриппа В — ни в инфицированных клетках, ни в экспериментах с гибридно-задерживаемой трансляцией [10, 11].

Белок М1 вируса гриппа В содержит 248 аминокислот, включая инициирующий метионин, хотя матричный белок вируса A/Udorn/72 включает 252 аминокислоты [44]. Из 248 аминокислот белка М1 вируса гриппа В 63 являются общими с белками обоих вирусов, но они располагаются с промежутками и нет последовательности из более чем трех последовательных гомологичных аминокислот. Подобные наблюдения может объяснить отсутствие иммунологической перекрестной реактивности между двумя белками [105], несмотря на наличие 25% аминокислотной гомологии.

В белке М1 вируса гриппа А имеется длинная гидрофобная последовательность между аминокислотами 115—151 [44, 108]. У белка М1 вируса гриппа В есть похожая, но более короткая последовательность между аминокислотами 122 и 151.

Три цистеиновых остатка сохранены у двух штаммов точно в тех же положениях в данной области. Консервативность цистеинсодержащих внутренних гидрофобных участков белка М1 вирусов гриппа А и В свидетельствует об их значимости, которая может быть связана с взаимодействиями белок — белок или белок — липид, для которых важна сульфгидрильно-связанная вторичная структура.

После окончания кодирующих участков М1 нуклеотидная гомология между сегментами 7 вирусов гриппа А и В снижается до только 1 из 4 ожидаемых совпадений и не наблюдается никакой отчетливой аминокислотной гомологии между М2-последовательностями. Карбоксильный терминал белка М1 вируса гриппа В имеет последовательность из 9 аминокислот после кодона АУГ и может быть аналогичен потенциальному пептиду, кодируемому третьей мРНК сегмента 7 вируса гриппа А, который имеет только 9 аминокислот, включая инициирующий метиониновый остаток, идентичный таковому на карбоксильном терминале белка М1.

Гибридизационный анализ [92] выявил 51% гомологии оснований последовательностей между 7-ми сегментами РНК вируса гриппа А и В. Действительная гомология последовательностей до

некоторой степени меньше этого значения, которое показывает, как распределение гомологичных нуклеотидов может влиять на результаты гибридизации.

4. Неструктурные белки

Восьмой и наименьший сегмент РНК вируса гриппа В, подобно таковому у вируса гриппа А, кодирует два неструктурных белка [10, 83]. Больший обозначается как NS1, а меньший, который транслируется с отдельной мРНК и не разделяет ^{35}S-метионинсодержащие триптические пептиды с NS1, называется NS2 [10]. Полипептиды NS1 и NS2 вируса гриппа А распределяют 9 аминокислот на своих N-терминалах и после ведущей последовательности, кодирующей эти аминокислоты, NS2 мРНК имеет прерывистую последовательность из 473 нуклеотидов перед своей структурой, которая транслируется в рамке считывания +1 [42].

Клоны двунитчатой ДНК, полученные с сегмента 8 РНК вируса гриппа В, были построены путем гибридизации кДНК-копий полной длины сегмента 8 РНК и NS1 мРНК. Эту ДНК клонировали в плазмиду pBR322 и секвенировали [11]. NS1 мРНК (1080 вирусных нуклеотидов) содержит невирусные нуклеотиды на своем 5′-конце и способна кодировать белок из 281 аминокислоты. Секвенирование NS2 мРНК показало, что она содержит прерванную последовательность из 655 нуклеотидов и, скорее всего, синтезирована сплайсирующим механизмом. Первые примерно 75 вируспецифических нуклеотидов на 5′-конце NS2 мРНК — такие же, как и обнаруженные на 5′-конце NS1 мРНК. Этот участок содержит инициирующий кодон для белкового синтеза и кодирующую информацию для 10 аминокислот, общих для обоих белков. Участок NS2 мРНК из приблизительно 350 нуклеотидов может быть транслирован в рамке считывания +1, а последовательность указывает на то, что участки, содержащие белки NS1 и NS2, перекрываются 52 аминокислотами, транслированными с различных рамок считывания. Таким образом, организация NS1 мРНК и NS2 мРНК, а также размер NS2 мРНК и белка консервативны у вирусов гриппа А и В, несмотря на больший размер сегмента 8 РНК, NS1 мРНК и белка NS1 вируса гриппа В [11].

5. Белки Р

Сегменты 1, 2 и 3 вируса гриппа В кодируют белки Р [83], которые предположительно аналогичны трем белкам, кодируемым сегментами 1, 2 и 3 вируса гриппа, и связаны с транскрипцией, репликацией и переносом кэпа. Приблизительные размеры генов и белков включены в табл. 29; более детальной информации пока нет.

В. Репликация вируса гриппа В

Поскольку геном вируса гриппа В кодирует белки, подобные таковым у вируса гриппа А, то кажется наиболее вероятным, что процессы репликации будут похожи, и активность РНК-зависи-

мой РНК-полимеразы была также обнаружена у вирионов гриппа В [73]. Похоже, что, как и у вирусов гриппа А, транскрипция в мРНК приводит к появлению копии вирусной цепи неполной длины с поли(А) на 3′-конце. Последовательности клонированной кДНК показывают, что на 5′-конце присутствует около 10 дополнительных нуклеотидов, а кэп-структура происходит от клеточных мРНК [11, 12, 94], как и у вирусов гриппа А [37].

Кроме данных, что нуклеопротеид синтезируется в ранней стадии инфекции и ассоциируется в вирионы с белком М, синтезированным в поздней стадии инфекции [14], о процессе репликации получено пока мало информации.

Г. Эпидемиология

Вирусологический надзор за эпидемиями гриппа в последние 25 лет показал, что именно вирусы гриппа А были ответственны за большинство тех эпидемий, когда заболеваемость и смертность были особенно высоки. Однако, начиная с 1957 г., почти каждую зиму происходят вспышки, вызванные вирусом гриппа В. Хотя и сообщалось, что эпидемии гриппа В возникают циклично: один раз в 4—6 лет [96], болезнь может быть распространена более широко по сравнению с количеством выделенных и идентифицированных вирусов. Наиболее часто вирус гриппа В выделяли у детей, но, поскольку обычно заболевание не приводит к госпитализации или смерти [75], значение этого вируса может оказаться недооцененным. Однако в зимний период 1979—1980 гг. было отмечено значительное увеличение случаев гриппа, вызванного вирусом В. Болели не только дети, но и взрослые, причем иногда болезнь протекала намного тяжелее, чем обычно бывает при заражении вирусом гриппа В [4].

Зимой 1981—1982 гг. заболеваемость гриппом была значительно ниже, чем в предшествовавшие две зимы [60], но 75% всех изолятов вируса гриппа были идентифицированы как грипп В. Болели в основном школьники, и хотя, как правило, в слабо выраженной форме и не было зарегистрировано смертельных случаев, тем не менее остается повод для беспокойства, поскольку, возможно, существует связь между заболеванием гриппом В и синдромом Рея [19, 58].

R. Reye и соавт. [84] обнаружили клиническое и патологическое явление у австралийских детей, которое впоследствии было признано более широко распространенным. Возросшая осведомленность об этой болезни и новые средства лечения значительно сократили показатели смертности — с 85—100 до 35—50% [90], но заболевание все еще представляет собой серьезную проблему, а его этиологию предстоит определить. Первичные симптомы представляют собой острую невоспалительную энцефалопатию, церебральную эдему и ожирение печени. В большинстве случаев синдрому Рея предшествует вирусное заболевание. Ассоциация с

вирусами совершенно отчетлива, хотя патологический процесс имеет сходство с результатом действия токсинов. Просто вирусы могут действовать как пусковой механизм для экзогенных или эндогенных токсинов, могут вызывать прямой токсический эффект или взаимодействовать с токсинами синергидным образом. Однако результаты многих эпидемиологических исследований и поисков потенциальных токсинов у пациентов в их окружении были пока отрицательными [90], хотя в этом определенно играла роль ацетилсалициловая кислота [59]. Синдром был ассоциирован со многими вирусами, но чаще всего его связывали с вирусом гриппа В, и скопление пациентов с синдромом Рея наблюдалось именно в районах, охваченных вспышкой гриппа В.

Изучение эпидемиологии синдрома Рея в 1974 и 1977 гг., когда преобладал вирус гриппа В, по сравнению с периодом 1977—1978 гг., когда доминировал вирус гриппа А, привело к выводу, что в годы преобладающей циркуляции вируса гриппа В число случаев синдрома Рея было примерно вдвое больше, чем в годы циркуляции вируса гриппа А. События 1977—1978 гг. позволили предположить, что вирус гриппа А также ассоциирован с синдромом Рея, однако эта связь не была столь же отчетливой, как и в случае вируса гриппа В [65]. M. Norman и соавт. [68] выделили вирус гриппа В из печени пациента, страдавшего синдромом Рея. Известны и другие, хотя и редкие, случаи выделения вируса гриппа В из тканей пациентов, пораженных этим заболеванием.

Д. Антигенная изменчивость вирусов гриппа В

У вирусов гриппа В наблюдается антигенная изменчивость, но менее выраженная, чем в случае вирусов гриппа А [13, 91].

В лабораториях с высокой частотой получали рекомбинанты между антигенно отличными вирусами гриппа В [83, 98]. Однако пока не отмечалось значительных антигенных изменений (шифтов), затрагивающих вирусы гриппа В, поэтому вполне вероятно, что рекомбинанты вирусов гриппа В не могут иметь столь эффективного эпидемиологического значения, как рекомбинанты между вирусами гриппа А. Ни из каких других источников, кроме человека, вирус гриппа В не выделяли [74], поэтому представляется, что эти вирусы не имеют переменного резервуара хозяев. Никогда не выделяли рекомбинантов между штаммами гриппа А и В.

R. Webster и M. Berton [104] использовали моноклональные антитела к молекуле НА вируса гриппа B/Hong Kong/8/73 для более детального изучения антигенного дрейфа этих вирусов. Антигенный дрейф происходил в каждом из эпитопов, определенных 12 различными моноклональными антителами, у вирусов гриппа В, выделенных у людей с 1973 г. Чувствительность моноклональных антител позволила определить антигенно отличимые вирусы от вирусов гриппа В, давших вспышки в Ганновере в 1978 и 1979 гг. и в Сингапуре в 1979 г.

Эти исследования были продолжены с моноклональными антителами к НА вируса гриппа B/Oregon/5/80 [40]. Большинство из 20 моноклональных антител не ингибировало вирусы гриппа В, выделенные до 1970 г., хотя некоторые препараты выявляли одну общую детерминанту между вирусами B/Lee/40 и B/Ore/80. Большинство моноклональных антител к B/Ore/80 реагировало с вирусом B/Sing/222/79, но отмечались некоторые отличия. При изучении более 50 штаммов вируса гриппа В, выделенных после 1975 г., было показано, что 20 моноклональных антител выявляют 13 различных картин реактивности в РТГА, указывая тем самым, что бо́льшая часть антител индуцирована различными эпитопами на вирусе B/Ore/80.

В 1982 г. во многих странах мира были зарегистрированы эпидемии гриппа В. Особенно тяжело они протекали в Японии и Англии. Анализ недавно полученных изолятов из этих стран показал, что там циркулировали антигенные варианты, которые реагировали только с одним или двумя из 13 анти-B/Ore/80 моноклональных антител (т. е. B/Eng/19/82 и B/Shiga/75/82). Это свидетельствовало, что в них произошел антигенный дрейф. С другой стороны, остальные изоляты из этих же эпидемий обладали 10 из 13 эпитопов. Предварительные исследования дали основания полагать, что большинство вирусов гриппа В, выделенных в Японии и Англии в 1982 г., реагирует только с ограниченным количеством моноклональных антител, в то время как большинство изолятов из США реагирует с гораздо более широким набором моноклональных антител.

Сейчас ясно, что многие различные антигенные варианты вируса гриппа В могут быть выделены в течение эпидемического года и что в разных странах выделяются антигенно похожие вирусы. Большинство изолятов вируса гриппа В отличается один от другого; 19 изолятов из Японии дают 14 картин реактивности с набором моноклональных антител. В то же время в Японии и Англии были выделены вирусы, имеющие одинаковую характеристику реактивности с моноклональными антителами [40].

Остается невыясненным, происходит ли коциркуляция множества различных штаммов или появление антигенных вариантов в процессе эпидемической селекции. B. Lu и соавт. [49] сообщили, что во время эпидемии в Мемфисе в течение одной недели были выделены два различных варианта: B/Mem1/82 имел 12 из 13 антигенных детерминант B/Ore/5/80, а B/Mem/3/82 имел только 4 из 13 детерминант B/Ore/5/80. Простейшее объяснение этих данных можно свести к тому, что множество вирусов гриппа В коциркулирует в процессе эпидемии. Сходство между вирусами B/Mem/1/82 и B/Albany/1/77 также подтверждает, что антигенные варианты могут циркулировать у людей в течение нескольких лет или, альтернативно, что похожие варианты появляются в различные моменты от родительского штамма. Пока не охарактеризованы изменения последовательностей, касающиеся изменчивости вирусов гриппа В.

III. Вирус гриппа С

Как показали недавние исследования, вирусы гриппа С обладают многими такими же особенностями строения и репликации, как и другие ортомиксовирусы. Однако обнаружены и некоторые существенные отличия в структуре многих сегментов РНК и белковых компонентов, а также по типу и распределению биологических активностей в вирусных гликопротеидах. Именно этими различиями был стимулирован поиск непосредственных путей для более подробной характеристики генов и вирускодированных полипептидов вирусов гриппа С. При изучении изолятов вируса гриппа С было отмечено, что этому вирусу также присуще отсутствие выраженной антигенной изменчивости в противоположность вирусам гриппа А и В. Причина подобного отличия неясна.

А. Структура вируса

1. Морфология вирионов

Вирионы гриппа С имеют много таких же структурных особенностей, как и вирусы гриппа А и В; в вирусных препаратах наблюдаются как сферические частицы, так и длинные филаментозные образования (см. рис. 43). Обращает на себя внимание такое отличие вируса гриппа С от большинства препаратов вирусов гриппа А и В, как группирование поверхностных гликопротеидов в правильные гексагональные образования [18, 24, 103]. При большом увеличении на каждой из шести верхушек гексагональных образований наблюдается одна морфологическая субъединица [28]. Предполагается, что гексагональная организация может вовлекать непосредственные боковые взаимодействия между самими молекулами гликопротеидов, так как иногда наблюдают, что шипы сохраняют свое расположение в решетке при высвобождении из вирусной мембраны за счет ограниченного протеолитического расщепления или при спонтанном разрушении вирусной оболочки [28]. Шипы вируса гриппа С имеют длину 8—10 нм и диаметр 4—5 нм. Не было получено убедительных доказательств подобного правильного расположения шипов на поверхностях большинства вирусов гриппа А. Как обсуждается далее, у вируса гриппа С обнаружена только одна разновидность гликопротеидов, и это может оказаться существенным для формирования правильной поверхностной решетки из гликопротеидов. Присутствие морфологически отличимых шипов HA и NA у вирусов гриппа А и В, обладающих различными элементами симметрии, может препятствовать образованию правильных поверхностных формирований.

Рибонуклеиновые компоненты вирионов гриппа С [18] состоят из коротких спиральных сегментов, похожих по размерам на те, что наблюдаются в вирионах гриппа А, разрушенных детергентом [17, 80]. Нитеподобные структуры имеют около 15 нм в ши-

рину и вытянуты в длину на 30—100 нм. При центрифугировании в скоростном зональном градиенте рибонуклеопротеиды можно разделить по размерам на составляющие классы, предположительно содержащие молекулы РНК различных размеров.

2. Разновидности вирусной РНК

Как известно, вирионы гриппа С содержат сегментированный геном, состоящий из 7 видов РНК с молекулярными массами, колеблющимися в пределах $0{,}94—0{,}23 \cdot 10^6$ [15, 78, 82]. Хотя и нет окончательных сведений относительно определения кодирующих назначений каждого сегмента РНК, о некоторых особенностях кодирующих взаимосвязей между разновидностями вирусной РНК и полипептидами можно судить на основании их взаимоотношений по молекулярной массе и по аналогии с вирусами гриппа А (табл. 33). 3′- и 5′-терминальные последовательности сегментов

Таблица 33. *Разновидности белков и РНК вируса гриппа С*[1]

Сегмент РНК	Приблизительное количество нуклеотидов	Полипептид	
		обозначение	м. м.
1	2 350	P1	89 000
2	2 350	P2	85 000
3	2 150	P3	82 000
4	2 000	gp88	64 000
5	1 750	NP	60 000
6	1 150	M	30 000
7	975	NS1	25 000
		NS2	14 000

[1] Данные по размерам видов РНК — из [15]. Кодирующие взаимосвязи между видами РНК и белков не установлены; и те и другие пронумерованы по порядку уменьшения молекулярной массы.

РНК вируса гриппа С содержат частичную гомологию с соответствующими последовательностями вирусов гриппа А и В [21]. Как было определено при помощи метки конца рЦр, 3′-терминальная последовательность представляет собой УЦГУ($\frac{\text{У}}{\text{Ц}}$)УУЦГУЦЦ для каждого сегмента РНК. Сегменты РНК 1, 2, 3 и 4 в положении 5 содержали остаток У, в то время как сегменты 5, 6 и 7 включали остаток Ц; больше терминальные последовательности из 12 остатков между собой ничем не различались. После этих 12 нуклеотидов наблюдается некоторое расхождение последовательностей. Для каждого сегмента РНК 5′-терминальная последовательность представляла собой АГЦАГУАГЦАА. 3′-терминальные последовательности сегментов РНК вируса гриппа С отличаются только по положениям 4 и 5 от соответствующих 3′-терминальных последовательностей РНК вирусов гриппа А, а 5′-последовательности отличаются по положениям 3, 6 и 8 у этих двух типов вирусов. Подобное сходство указывает на тесную эволюционную взаимосвязь этих вирусов.

3. Вирусные полипептиды

Внутренние структурные полипептиды вирионов гриппа С имеют большое сходство с таковыми у вирусов гриппа А и В; это касается субъединиц нуклеопротеина и мембранного белка как основного вида полипептидов, а также трех минорных полипептидов, обозначенных как Р1, Р2 и Р3 [18, 33, 79]. Однако в противоположность двум гликопротеидам вирусов гриппа А и В, обладающим гемагглютинационной и нейраминидазной активностью, у вирионов гриппа С обнаружен только один гликопротеид [27, 28, 54]. Этому гликопротеиду присущи рецепторсвязывающая активность, функция проникновения и неидентифицированная активность фермента, разрушающего рецептор (см. далее). Поскольку пока нет более полных сведений относительно его функции, на основании его молекулярной массы (88 000) этот гликопротеид обозначен как gp88.

Негликозилированная форма гликопротеида недавно была идентифицирована в клетках, обработанных оболочечным муцином (м. м. 64 000) [61]. Гликопротеид gp88 мигрирует в той же области в SDS-ПААГ, что и три белка Р, поэтому такие белки можно идентифицировать только после удаления гликопротеидов обработкой протеазой, бромелайном или экстракцией детергентом [79]. Вирусная активность РНК-зависимой РНК-полимеразы также наблюдалась в вирионах гриппа С, и по аналогии с вирусом гриппа А она ассоциирована, скорее всего, с полипептидами Р [55, 56]. Анализ полипептидов, синтезируемых в клетках, инфицированных вирусом гриппа С, также подтверждает, что геном вируса гриппа А может кодировать два неструктурных белка, обозначаемых как NS1 и NS2 и соответствующих двум продуктам наименьшего сегмента РНК вируса гриппа А [79]. Данные о разновидностях полипептидов вируса гриппа С и их примерные молекулярные массы приведены в табл. 33. Кроме гликопротеида, другие полипептиды вируса гриппа С по биохимическим свойствам не были охарактеризованы.

Гликопротеид вируса гриппа С, который синтезируется в виде одной полипептидной цепи, превращается при протеолитическом расщеплении в две дисульфидно-связанные единицы [27]. Было обнаружено, что препараты вируса гриппа С из различных хозяйских клеток отличаются по степени кливеджа гликопротеида. Вирионы, выращенные в фибробластах куриного эмбриона (CEF), содержали только нерасщепленный гликопротеид, а вирионам, выращенным в курином эмбрионе, была присуща в основном расщепленная форма. Обработка вирионов, выращенных в CEF, трипсином приводила к кливеджу гликопротеида in vitro, чему сопутствовало увеличение специфической инфекционности вирусного препарата (вплоть до 50-кратного), подтверждая тем самым, что кливедж необходим для проявления вирусной инфекционности [27]. Эти данные напоминают предшествовавшие наблюдения о свойствах гемагглютининового гликопротеида вируса гриппа А

[35, 47], когда кливедж полипептида НА на две субъединицы значительно увеличивал инфекционность вирусных препаратов. Активации инфекционности вируса гриппа С можно также достигнуть обработкой эластазой — ферментом отличающейся специфичности, поэтому можно предположить, что инфекционность может быть активирована кливеджем в двух близких, но различных сайтах в молекуле gp88 [97]. В том же исследовании было обнаружено, что химиотрипсин и термолизин не оказывают влияния на кливедж gp88 или активацию инфекционности, и ни один из испытанных ферментов не действовал на гемагглютинирующий титр.

При исследовании в невосстанавливающих условиях нерасщепленный гликопротеид значительно отличается по своей видимой молекулярной массе от невосстановленной расщепленной формы; две формы имеют видимые м. м. 105 000 и 85 000 соответственно [28]. Причина такого различия неизвестна. После восстановления меркаптоэтанолом нерасщепленный гликопротеид имел видимую м. м. 88 000, а расщепленный гликопротеид разделялся на две субъединицы с видимыми м. м. 65 000 и 30 000 и обозначенными как gp65 и gp30. Нерасщепленный гликопротеид оказался гликозилированным в большей степени, поэтому предположили, что углеводсодержащая часть могла быть удалена в процессе протеолитического кливеджа [27]. Кроме того, дуплет gp65 часто наблюдается при восстанавливающих условиях, и группа с более низкой электрофоретической подвижностью также представляется более значительно гликозилированной [55]. Однако не было замечено никаких качественных отличий в обработанных проназой гликопептидах двух групп gp65; невозможно также было обнаружить различия в триптических пептидах этих двух групп, а также в гликопептидах нерасщепленных и расщепленных гликопротеидов [28, 55]. Поэтому дальнейшие исследования должны быть направлены на определение природы процесса протеолитического кливеджа и молекулярных различий между расщепленной и нерасщепленной формами гликопротеидов вируса гриппа С.

Как показал анализ N-терминальных аминокислотных последовательностей, N-терминалы gp88 и gp65 устойчивы к Edman-разрушению, что свидетельствует о наличии блокированных N-терминалов [28]. Эти данные говорят о том, что gp65 произошел от N-терминальной части предшественника гликопротеида. Для gp30 была частично определена последовательность. Оказалось, что она содержит преобладающее количество гидрофобных остатков и отчасти гомологична соответствующей последовательности субъединицы НА2 вирусов гриппа А. В частности, N-терминальная трипептидная последовательность gp30 вируса гриппа С представляет собой Иле-Фен-Глу, что в точности соответствует последовательности гликопротеида НА2 вируса A/Victoria/3/75, однако последний содержит дополнительный N-терминальный глициновый остаток [57]. Гомологичная последовательность присутствует также на N-терминалах субъединиц F1 гликопротеидов F парамиксовирусов, и у этих гликопротеидов отсутствует терми-

нальный глициновый остаток. Таким образом, похожая терминальная последовательность обнаружена в gp30 вируса гриппа С [25, 89]. Эти результаты, так же как и биологическая активность гликопротеида (см. далее), подтверждают, что гликопротеид вируса гриппа С может проявлять структурные особенности, как бы промежуточные между таковыми у гликопротеидов вирусов гриппа А и парамиксовирусов.

4. Активности слияния и гемолиза

Оказалось, что активация инфекционности в процессе протеолитического кливеджа сопровождается активацией гемолиза и активности слияния вирионов гриппа С [72]. Гемолитическая активность хорошо выявлялась в опытах с мышиными эритроцитами, в то время как человеческие и куриные эритроциты оказались нечувствительными. Для проявления активностей гемолиза и слияния необходим кислый pH, как и в случае вируса гриппа А [30, 48, 50]. Требование кислого pH предполагает, что проникновение вируса гриппа С сопряжено с поглощением в лизосомы, сопровождающим слияние вирусной оболочки и лизосомальной мембраны, как первоначально это предположили для вируса леса Семлики [26]. В соответствии с полученными данными кливедж gp88 необходим для проникновения вируса, как и в случае гликопротеида HA вируса гриппа А и гликопротеида F парамиксовирусов.

5. Фермент, разрушающий рецептор

Доказательство различия между ферментом, разрушающим рецептор, вируса гриппа С и других ортомиксовирусов впервые было получено G. Hirst [29], который показал, что вирусы гриппа А и В разрушали свои собственные рецепторы на эритроцитах без воздействия на рецептор, как и в случае вируса гриппа С. Наоборот, вирионы гриппа С элюируют с эритроцитов с разрушением своих рецепторов, хотя рецепторы других орто- и парамиксовирусов не удаляются [33, 54]. A. Kendal [33] получил дополнительное доказательство того, что фермент, разрушающий рецептор вирионов гриппа С, не является α-нейраминидазой, у которой нет свободной нейраминовой кислоты из любой серии известных нейраминидазных субстратов. Кроме того, гемагглютинация вирионами гриппа С не ингибировалась гликопротеидами, содержащими растворимую нейраминовую кислоту. Это действительно противоречит тому, что известно относительно вирусов гриппа А, хотя, как было отмечено, крысиные сывороточные ингибиторы необычайно активны против вирионов гриппа С [69]. Мнение об отсутствии NA у вирионов гриппа С подтверждается также обнаружением сиаловой кислоты в углеводных компонентах гликопротеидов вируса гриппа С [64]. Три различных по размеру класса гликопептидов были различимы после расщепления вирионов

гриппа С или выделения гликопротеидов при помощи проназы. Гликопептиды (обозначенные как G1, G2 и G3) наблюдались у gp88, gp65 или gp30, однако относительные количества этих трех компонентов варьировали у гликопротеидов. И G1 и G2 были уменьшены в размере при обработке очищенной NA Vibrio cholera, а сиаловая кислота методом тонкослойной хроматографии идентифицировалась как освобожденный продукт. С другой стороны, вирусы гриппа А не имеют в своем составе сиаловой кислоты [34, 62, 93].

До сих пор попытки идентифицировать рецептор и объяснить природу фермента, разрушающего рецептор, у вируса гриппа С не увенчались успехом. Было получено доказательство того, что рецептор на куриных эритроцитах для вируса гриппа С инактивируется обработкой формалином, но не окислением перйодатом [71]. Авторы наблюдали также, что вирус гриппа С способен агглютинировать эритроциты типа В большинства людей, но не эритроциты типа А. Природа вирусного рецептора и активности фермента, разрушающего рецептор, у вирионов гриппа С представляет собой наиболее нерешенные проблемы в понимании молекулярной биологии данного вируса.

Б. Репликация вируса гриппа С

Имеется сравнительно мало информации относительно репликационного процесса вируса гриппа С. Репликационный цикл изучали в клетках первичных культур почки цыпленка (СК) [76], а также в нескольких обычных клеточных линиях [66, 67, 69]. В условиях одного цикла НА и инфекционный вирус обнаруживались впервые в клетках СК спустя 8 ч после инфицирования, а наиболее высокие титры — через 24 ч после заражения. Такой цикл роста значительно медленнее, чем у вирусов гриппа А в клеточных системах большинства хозяев. Синтез клеточных полипептидов незначительно ингибировался инфицированием клеток СК вирусом гриппа С, однако большинство вирусных полипептидов можно наблюдать на фоне клеток хозяина при сравнительном параллельном мечении инфицированных и неинфицированных клеток. Эти полипептиды включали нерасщеплепный гликопротеид (gp88), нуклеопротеид (NP) и белок М, а также два неструктурных белка, обозначенных как NS1 и NS2 (м. м. 24 000 и 14 000 соответственно). Эти неструктурные белки похожи по размерам на те, что кодируются наименьшим сегментом РНК вируса гриппа А [32, 41].

Подобно вирусам гриппа А и В, вирусу гриппа С для успешного репликационного процесса требуется функциональное ядро клетки-хозяина. Ингибиторы актиномицин D и α-аманитин блокировали процесс репликации вируса гриппа С, будучи добавленными в инфицированные клеточные культуры в ранней стадии цикла роста [77]. Оказалось, что фаза репликационного цикла, чувствительная к актиномицину D, длится дольше, чем у вируса

гриппа А, что соответствует более медленному репликационному циклу, характерному для вируса гриппа С. Предварительная обработка клетки-хозяина УФ-облучением также в одинаковой степени блокировала репликацию вируса гриппа С и вируса гриппа А [77]. Была также выявлена ядерная фаза репликации методом иммунофлюоресценции, который показал, что некоторые антигены вируса гриппа С встречаются в ядре инфицированных клеток [5]. По-видимому, ядерная функция вирусов гриппа А связана со сплайсированием 5-кэп-структур мессенджер-РНК клетки-хозяина с вновь синтезированными вирусными транскриптами [38], а сходство с репликацией вируса гриппа С позволяет предположить, что подобные события могут оказаться необходимыми и для репликации вирусов гриппа С.

Изучение морфогенеза вируса гриппа С в клетках MDCK [28] выявило типичные вирионы с электронно-плотным нуклеокапсидным почкованием в клеточной поверхности. Кроме того, плотно упакованные пучки поверхностных выступов наблюдались также на серповидных развернутостях плазматической мембраны на клеточных поверхностях, где происходит созревание вируса; подобные области явно были лишены лежащих в основании плотных нуклеокапсидных структур. Часто наблюдали также высвобождение частиц, не имеющих нуклеокапсидов. Это позволило предположить, что в случае вируса гриппа С не обязательно присутствие нуклеокапсидов для инициации процесса почкования на клеточной поверхности и что взаимодействие между оболочечными компонентами достаточно для разворачивания мембраны и образования частиц. Это противоречит тому, что наблюдается в случае вируса гриппа А, когда образование «пустых» частиц происходит редко.

Клетки MDCK образуют монослои, в которых плотные соединения разделяют плазматическую мембрану на два домена, и вирусы гриппа А и парагриппа собираются на свободной верхушечной поверхности [87, 88]. Обнаружено, что вирус гриппа С подобным же образом собирается на свободной верхушечной поверхности [28]. Эти данные подчеркивают, что верхушечное вирусное созревание не может непосредственно соответствовать присутствию или отсутствию вирусной NA или сиаловой кислоты на вирусной оболочке, так как вирус гриппа С содержит сиаловую кислоту, хотя вирусы гриппа А и парагриппа не имеют этого углеводного компонента.

В. Генетика и эпидемиология

Несмотря на то что вирус гриппа С редко являлся причиной вспышек респираторных заболеваний, у многих индивидуумов обнаружены антитела к этому вирусу [70]. Положительные сыворотки составляют 96% в группе взрослых молодого возраста, и наивысшие средние титры также обнаружены в этой возрастной группе. Положительные сыворотки реже встречаются у ма-

леньких детей, и относительно низкие титры наблюдаются у взрослых старше 65 лет. Высокий процент лиц с антителами к вирусу гриппа С указывает на то, что заражение этим вирусом происходит в значительно более высокой степени, чем это обычно распознается.

Генетический анализ вируса гриппа С был крайне ограничен, отчасти из-за трудностей определения подходящих биологических или биохимических маркеров. Использовав морфологию бляшек и олигонуклеотидные фингерпринты РНК в качестве маркеров, V. Racaniello и P. Palese [83] показали, что рекомбинация может происходить путем пересортировки геномных сегментов вирусов гриппа С. Клетки MDCK, зараженные двумя штаммами — C/JHB/66 и C/JJ/50, давали урожай вирусов, которые продуцировали бляшки такой же морфологии, что и родительский вирус C/JJ/50, а фингерпринтный анализ РНК одного из этих выделенных клонов показал, что он содержит олигопуклеотиды от обоих родителей. Исследование необычных олигонуклеотидных пятен, приписываемых индивидуальным сегментам РНК, выявило, что только определенные сегменты РНК данных родителей присутствуют в полученном рекомбинанте, т. е. произошла пересортировка геномных сегментов.

Нет доказательств в пользу антигенных изменений вируса гриппа С с момента его первого выделения в 1947 г. Антигенная стабильность вируса гриппа С имеет сходство со стабильностью таких респираторных агентов, как вирусы парагриппа и респираторно-синцитиальный вирус, в большей степени, чем вирусов гриппа А или В. Изменчивость нуклеотидной последовательности исследовали у пяти репрезентативных штаммов вируса гриппа С, выделенных в течение 32 лет, сравнивая их по результатам олигонуклеотидного фингерпринтирования [55, 56]. Хотя олигонуклеотидные картины для каждого штамма и различались, было обнаружено, что степень их изменчивости значительно, ниже, чем для набора штаммов вируса гриппа А (H3N2), выделенных только за 5 лет [106]. Эти данные подтверждают мнение, что вирусы гриппа С не подвержены значительной антигенной изменчивости. Причина подобного отличия в стабильности поверхностного антигена непонятна, особенно на фоне данных о том, что вирус гриппа С имеет много общих черт с вирусами гриппа А и В по строению вириона и по вирусной репликации.

Хотя обычно считается, что вирусы гриппа С, подобно вирусу гриппа В, обнаруживаются только у человека, недавно появилось сообщение о выделении вируса гриппа С от свиней на скотобойне в Бейджинге (Китай) [40]. В тестах перекрестной нейтрализации и РТГА было выявлено, что вирусы, выделенные от свиней, являются вирусами гриппа С, отличающимися от референс-штамма C/1233/47. У 19 из 100 обследованных свиней имелись отчетливые титры антител в РТГА к вирусу гриппа С. Это сообщение свидетельствует, что свиньи могут служить природным резервуаром для вируса гриппа С человека.

Список литературы

1. *Air G.* — Virology, 1979, v. 97, p. 468—472.
2. *Air G., Hackett J.* — Virology, 1980, v. 103, p. 291—298.
3. *Apostolov K., Flewett T., Kendall A.* — In: The Biology of Large RNA Viruses, 1970, p. 3—26.
4. *Baine W., Luby J., Markin S.* — Am. J. Med., 1980, v. 68, p. 181—188.
5. *Barclay G., Leader-Williams L., Flewett T.* — J. Hyg., 1971, v. 69, p. 587—592.
6. *Bentley D., Brownlee G.* — Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, p. 5033—5042.
7. *Block J., Air G.* — Biochemistry, 1982, v. 21, p. 4001—4007.
8. *Blok J., Air G.* — Virology, 1982, v. 121, p. 211—229.
9. *Blok J., Air G., Laver W. et al.* — Virology, 1982, v. 119, p. 109—121.
10. *Briedis D., Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1981, v. 112, p. 417—425.
11. *Brieldis D., Lamb R.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 186—193.
12. *Briedis D., Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1982, v. 116, p. 581—588.
13. *Chakraverty P.* — Bull. Wld Hlth Org., 1972, v. 45, p. 755—766.
14. *Choppin P., Lazarowitz S., Goldberg A.* — In: Negative Strand Viruses and Host Cell, 1975, p. 105—119.
15. *Clerx J., Clerx van Haaster C., Meier-Ewert H.* — Submitted for publication, 1983.
16. *Compans R., Klenk H., Caliguiri L., Choppin P.* — Virology, 1970, v. 42, p. 880—889.
17. *Compans R., Content J., Duesberg P.* — J. Virol., 1972, v. 10, p. 795—800.
18. *Compans R., Bishop D., Meier-Ewert H.* — J. Virol., 1977, v. 21, p. 658—665.
19. *Corey L., Rubin R., Thompson T. et al.* — J. Infect. Dis., 1977, v. 135, p. 398—407.
20. *Desselberger U., Palese P.* — Virology, 1978, v. 88, p. 394—399.
21. *Desselberger U., Racaniello V., Zazra J., Palese P.* — Gene, 1980, v. 8, p. 315—328.
22. *Elder K., Bye J., Skehel J. et al.* — Virology, 1979, v. 95, p. 343—350.
23. *Fields S., Winter G., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 290, p. 213—217.
24. *Flewett T., Apostolov K.* — J. Gen. Virol., 1967, v. 1, p. 297—304.
25. *Gething M., White J., Waterfield M.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 2737—2740.
26. *Helenius A., Kartenbeck J., Simons K., Fries E.* — J. Cell Biol., 1980, v. 84, p. 404—420.
27. *Herrler G., Compans R., Meier-Ewert H.* — Virology, 1979, v. 99, p. 49—56.
28. *Herrler G., Nagele A., Meier-Ewert H. et al.* — Virology, v. 113, p. 439—451.
29. *Hirst G.* — J. Exp. Med., 1950, v. 91, p. 177—185.
30. *Huang R., Rott R., Klenk H.-D.* — Virology, 1981, v. 110, p. 243—247.
31. *Hiti A., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 41, p. 730—734.
32. *Inglis S., Barrett T., Brown C., Almond J.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 3790—3794.
33. *Kendal A.* — Virology, 1975, v. 65, p. 87—99.
34. *Klenk H.-D., Compans R., Choppin P.* — Virology, 1970, v. 42, p. 1158—1162.
35. *Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blodorn J.* — Virology, 1975, v. 68, p. 426—439.
36. *Kozak M.* — Current topics in Microbiol. Immunol., 1981, v. 93, p. 81—123.
37. *Krug R., Broni B., Bouloy M.* — Cell, 1979, v. 18, p. 329—334.
38. *Krug R., Plotch S., Ulmanen I. et al.* — In: Genetic Variation Among Influenza Viruses. N. Y., 1981, p. 93—112.
39. *Krystal M., Elliott R., Benz E. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1982, v. 79, p. 4800—4804.
40. *Kuo Y., Jin F., Wang M. et al.* — Kexue Tongbao, 1982, v. 27, p. 1118—1121.

41. *Lamb R., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 4908—4912.
42. *Lamb R., Lai C.-J.* — Cell, 1980, v. 21, p. 475—485.
43. *Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1981, v. 112, p. 737—745.
44. *Lamb R., Lai C.-J.* — Virology, 1981, v. 112, p. 746—751.
45. *Lamb R., Lai C.-J., Choppin P.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 4170—4174.
46. *Laver W., Baker N.* — J. Gen. Virol., 1972, v. 17, p. 61—67.
47. *Lazarowitz S., Choppin P.* — Virology, 1975, v. 68, p. 440—454.
48. *Lenard J., Miller D.* — Virology, 1981, v. 110, p. 479—482.
49. *Lu B., Webster R., Brown L., Nerome K.* — Bull. Wld Hlth Org., (in press).
50. *Maeda T., Ohnishi S.* — FEBS Lett., 1980, v. 122, p. 283—287.
51. *Markoff L., Lai C.-J.* — Virology, 1982, v. 119, p. 288—297.
52. *Martin M., Palmer E., Kendal A.* — J. Clin. Microb., 1977, v. 6, p. 84—86.
53. *Meier-Ewert H., Compans R., Bishop D., Herrer G.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. N. Y., 1978, p. 127—133.
54. *Meier-Ewert H., Herrler G., Nagele A., Compans R.* — In: Structure and Variation in Influenza Virus, 1980, p. 357—366.
55. *Meier-Ewert H., Nagele A., Herrler G. et al.* — In: Replication of Negative Strand Viruses. N. Y., 1981, p. 173—180.
56. *Meier-Ewert H., Petri T., Bishop D.* — Arch. Virol., 1981, v. 67, p. 141—147.
57. *Min Jou W., Verhoeyen M., Devos R. et al.* — Cell, 1980, v. 19, p. 686—696.
58. *Morbidity and Mortality Weekly Report,* 1980, v. 29, p. 321—322.
59. *Ibid.,* p. 532—538.
60. *Morbidity and Mortality Weekly Report,* 1982, v. 31, p. 494—495.
61. *Nagele A., Meier-Ewert H.* — Submitted for publication, 1983.
62. *Nakamura K., Compans R.* — Virology, 1978, v. 86, p. 432—442.
63. *Nakamura K., Compans R.* — Virology, 1979, v. 93, p. 31—47.
64. *Nakamura K., Herrler G., Petri T. et al.* — J. Virol., 1979, v. 29, p. 997—1005.
65. *Nelson D., Hurwitz E., Sullivan-Bolyai J. et al.* — J. Infect. Dis., 1979, v. 140, p. 436—439.
66. *Nerome K., Ishida M.* — J. Gen. Virol., 1978, v. 39, p. 179—181.
67. *Nerome K., Ishida M., Nakayama M.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 43, p. 257—259.
68. *Norman M., Lowden J., Hill D., Bannatyre R.* — Can. Med. Ass. J., 1968, v. 99, p. 549—554.
69. *O'Callaghan R., Laughlin S., Labat D., Howe C.* — J. Virol., 1977, v. 24, p. 875—882.
70. *O'Callaghan R., Gohd R., Labat D.* — Infect. Immun., 1980, v. 30, p. 500—505.
71. *Ohuchi M., Homma M., Muramatsu M., Ohyama S.* — Microbiol. Immunol., 1978, v. 22, p. 197—203.
72. *Ohuchi M., Ohuchi R., Mifune K.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 1076—1079.
73. *Oxford J.* — J. Virol., 1973, v. 12, p. 827—835.
74. *Pereira H.* — Prog. Med. Virol., 1969, v. 11, p. 46—79.
75. *Pereira M.* — Phil. Trans. Roy. Soc., 1980, v. B288, p. 423—432.
76. *Petri T., Meier-Ewert H., Compans R.* — FEMS Microbiol. Letters, 1979, v. 5, p. 277—230.
77. *Petri T., Meier-Ewert H., Compans R.* — J. Virol., 1979, v. 32, p. 1037—1040.
78. *Petri T., Meier-Ewert H., Crumpton W. et al.* — Arch. Virol., 1979, v. 61, p. 239—243.
79. *Petri T., Herrler G., Compans R., Meier-Ewert H.* — FEMS Microbiol. Letters, 1980, v. 9, p. 43—47.
80. *Pons M., Schulze I., Hirst G.* — Virology, 1969, v. 39, p. 250—259.
81. *Portner A., Webster R., Bean W.* — Virology, 1980, v. 104, p. 235—238.
82. *Racaniello V., Palese P.* — J. Virol., 1979, v. 32, p. 1006—1014.

83. *Racaniello V., Palese P.* — J. Virol., 1979, v. 29, p. 361—373.
84. *Reye R., Morgan C., Barol J.* — Lancet, 1963, v. 2, p. 749—752.
85. *Ritchey M., Palese P., Kilbourne E.* — J. Virol., 1976, v. 18, p. 738—744.
86. *Robertson J., Schubert M., Lazzarini R.* — J. Virol., 1981, v. 38, p. 157—163.
87. *Rodriguez Boulan E., Sabatini D.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 74, p. 5071—5075.
88. *Roth M., Fitzpatrick J., Compans R.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 6430—6434.
89. *Scheid A., Graves M., Silver S., Choppin P.* — In: Negative Strand Viruses and the Host Cell. London, 1978, p. 181—193.
90. *Schiff G.* — Ann. Rev. Med., 1976, v. 27, p. 447—452.
91. *Schild G., Pereira M., Chakraverty P. et al.* — Brit. Med. J., 1973, v. 4, p. 127—131.
92. *Scholtissek C., Rohde W., Harms E.* — J. Gen. Virol., 1977, v. 37, p. 243—247.
93. *Schwartz R., Schmidt M., Anwer U.* — J. Virol., 1977, v. 23, p. 217—226.
94. *Shaw M., Lamb R., Erickson B. et al.* — Proc. nat. Acad. Sci., 1982, v. 79, p. 6817—6821.
95. *Skehel J., Hay A.* — Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 1207—1219.
96. *Stuart-Harris C., Schild G.* — In: Influenza: The viruses and the disease. London, 1976, p. 22—27.
97. *Sugawara K., Ohuchi M., Nakamura K., Homma M.* — Arch. Virol., 1981, v. 68, p. 147—151.
98. *Tobita K., Kilbourne E.* — J. Virol., 1974, v. 13, p. 347—352.
99. *Ueda M., Tobita A., Sugiura A., Enomoto C.* — J. Virol., 1978, v. 25, p. 685—686.
100. *Verhoeyen M., Fang R., Min Jou W. et al.* — Nature, 1980, v. 286, p. 771—776.
101. *Ward C.* — Curr. Topics Microbiol. Immunol., 1981, v. 94/95, p. 1—74.
102. *Waterfield M., Espelie K., Skehel J.* — Br. Med. Bull., 1979, v. 35, p. 57—63.
103. *Waterson A., Hurrell J., Jensen K.* — Arch. ges. Virusforsch., 1963, Bd 12, S. 487—495.
104. *Webster R., Berton M.* — J. Gen. Virol., 1981, v. 54, p. 243—251.
105. *Webster R., Hinshaw V.* — Infect. Immun., 1977, v. 17, p. 561—566.
106. *Webster R., Laver W.* — In: The Influenza Viruses and Influenza. N. Y., 1975, p. 269—314.
107. *Wilson I., Skehel J., Wiley D.* — Nature, 1981, v. 289, p. 366—373.
108. *Winter G., Fields S.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 1965—1974.
109. *Winter G., Fields S., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 292, p. 72—75.

10

Различия в патогенезе гриппозной инфекции, зависящие от вируса

Дж. Шульман (J. Schulman)

I. Введение

К фенотипическим особенностям вирусов гриппа относятся различия биологической активности в разных клеточных системах хозяина, включая различия в ареале хозяев, органоспецифичности и распространенности среди животных, а также в бляшкообразовании в разных культурах клеток. Разработаны надежные лабораторные методы, позволяющие определить происхождение отдельных сегментов РНК у реассортантных вирусов, возникших в естественных условиях или полученных в лаборатории. Это позволило получить ранее недоступную информацию о роли отдельных генов или их комбинаций в возникновении некоторых биологических различий, а также приступить к изучению ряда фундаментальных вопросов сложных молекулярных механизмов.

В этой главе предпринята попытка дать обзор современной информации, полученной при сравнении диких типов и реассортантных вирусов в различных клеточных системах. При этом необходимо отметить, что в данном обзоре внимание сконцентрировано на генетических основах биологических различий между разными штаммами вируса гриппа А. Из-за недостатка соответствующих данных мы не делаем попытки обратиться к очень важным вопросам, касающимся причин относительно ограниченного числа естественных хозяев вирусов гриппа В и С.

Следует отметить, что хотя основное внимание в обзоре уделено различиям в биологической активности, зависящим от самого вируса, понятие «вирулентность» обычно отражает сложный комплекс взаимодействий, в которых большое значение имеют также различия, обусловленные хозяином. Например, вирусы гриппа, преобладающие в птичьих популяциях, могут очень редко (или вообще не могут) преодолевать видовые барьеры и инфицировать людей [18]. Аналогичным образом птичьи вирусы гриппа, летальные для индюков и цыплят, не вызывают заболеваний у птиц других видов [1, 56]. В отношении механизма различий в восприимчивости, обусловленных хозяином, имеется ограниченная информация; однако существует несколько исключений, которые будут обсуждены далее. Например, показано, что генети-

чески обусловленная резистентность мышей линии A2G, имеющих ген Mx, связана с различными ответными реакциями на интерферон [16]. Другими работами четко установлено, что лизис инфицированных вирусом гриппа клеток in vitro человеческими или мышиными цитолитическими Т-клетками требует распознавания антигенов, кодируемых вирусов, в ассоциации с кодируемыми MHC поверхностными антигенами клеток. Были получены данные, что: а) на ответ Т-клеток могут влиять другие продукты гена MHC; б) различные HLA-антигены могут быть предпочтительно использованы в процессе лизиса клеток, инфицированных вирусами гриппа А и В [3]. Однако следует подчеркнуть, что остаются невыясненными взаимосвязи между восприимчивостью к гриппозной инфекции в естественных условиях и генетически контролируемым иммунным ответом на антигены вируса гриппа.

Наконец, следует указать, что мы не пытались детально рассмотреть роль специфического иммунитета в патогенезе вирусной инфекции in vivo. Многократно было показано, что специфические антитела к HA могут предупредить инфицирование или значительно изменить течение инфекции; антитела к NA также обладают защитными свойствами [52]. Недавно было доказано сходное защитное действие парентерального введения мышам специфических моноклональных антител к HA или NA [3]. Кроме того, результаты новейших исследований клеточного иммунитета у мышей и людей наводят на мысль, что клеточный иммунитет может играть решающую роль в период выздоровления, когда вирус исчезает из инфицированных тканей. Эти реакции клеточного иммунитета характеризуются гораздо более выраженной перекрестной реактивностью между различными подтипами вируса гриппа А, что можно было бы ожидать на основании результатов обычных серологических методов [3]. Поэтому для получения значимых данных сравнение in vivo вирулентности различных штаммов вирусов гриппа А можно проводить только на непримированных животных, не имеющих иммунологической памяти на родственные вирусы гриппа.

II. Методы

Корреляции специфических биологических фенотипов со специфическими генами или продуктами генов вирусов гриппа базируются на сравнении близкородственных диких типов или мутантных штаммов, а также на результатах анализа реассортантных вирусов, у которых четко детерминировано родительское происхождение каждого из 8 сегментов РНК. В первом случае сравнение различных штаммов дикого типа в отношении их репликации в разных клеточных системах хозяина было основано на различиях в отдельных генах. Показательно, что изучение различных птичьих вирусов гриппа четко выявило наличие связи патогенности для цыплят с чувствительностью HA к протеолитическому

расщеплению в различных клеточных системах [8]. В частности, при выращивании вирусов на хорион-аллантоисных мембранах показана возможность продуктивной репликации авирулентных штаммов в эпителиальных клетках аллантоиса, однако вирусное потомство в клетках хориона не содержит расщепленного НА и не обладает инфицирующей способностью. Наоборот, НА вирулентных штаммов расщеплялся в клетках обоих типов [41].

Во второй системе у реассортантных вирусов, полученных после смешанной инфекции, вызванной родительскими вирусами с хорошо различимыми фенотипами, определяли происхождение каждого сегмента РНК с последующим изучением в соответствующей клеточной системе с целью определения сегмента (или сегментов) РНК вирулентного родительского вируса, обусловливающего вирулентность. Методы, используемые для генотипирования реассортантных вирусов, более детально описаны в главе 4, включая сравнение родительских и реассортантных вирусов в отношении нескольких параметров — характера миграции РНК в ПААГ [37]; белкового спектра, выявляемого в ПААГ [38]; олигонуклеотидного строения отдельных сегментов РНК [64]; прямой молекулярной гибридизации кРНК с меченными радиоактивными веществами отдельными сегментами вирионной РНК [45] и конкурентной гибридизации, при которой сегменты РНК исследуемых вирусов использовали для конкуренции при связывании меченой вРНК и кРНК [6].

За редким исключением, эти технические приемы представляют собой надежные методы для генотипирования реассортантных вирусов, полученных в лаборатории. Однако при анализе вирусов, выделенных в естественных условиях, получаемые данные обычно не столь убедительны. Поскольку родительские штаммы точно неизвестны, имеется возможность только определить, какой прототипный вирус содержит сегмент РНК, наиболее близкий определенному сегменту реассортантного вируса.

Особенно важно, что в процессе выделения и очистки реассортантных вирусов возможны случайные мутации, которые могут влиять на фенотип [11, 13, 35, 46, 54]. Подобные наблюдения в отношении реассортантных вирусов были сделаны у реовирусов; при этом было показано, что нейровирулентность обеспечивается геном S1 реовируса типа 3. Однако после обнаружения не обладающего нейровирулентностью мутанта вируса 3-го типа было показано, что нейровирулентность восстанавливалась у реассортантных вирусов, наследующих ген M2 от различных родителей [19]. Таким образом, выраженная корреляция набора генов с биологическими свойствами основывается на исследовании нескольких реассортантных вирусов идентичного генотипа.

Помимо того, фенотипы реассортантных вирусов частично могут зависеть от эффективности взаимодействий отдельных генов. Показано, что генетическая пересортировка вирусов гриппа типа А не является полностью случайной; при пересортировке некоторые комбинации сегментов РНК, происходящие от данных роди-

телей, наблюдали значительно чаще, чем это можно было ожидать. Такая взаимосвязь была особенно выражена в отношении генов, кодирующих Р-белки [30]. Кроме того, обнаружено, что среди реассортантных вирусов, полученных в результате смешанной инфекции двумя вирулентными птичьими штаммами, все вирусы, унаследовавшие гены с кодом Р- и NP-белков от одних и тех же родителей (за исключением только одного вируса), были вирулентными для цыплят [39]. У всех реассортантных вирусов со смешанным происхождением этих генов вирулентность отсутствовала.

III. Различия биологических свойств, связанные с гемагглютинином

Несомненно, что наиболее точно установленные к настоящему времени различия в вирулентности, зависящие от вируса, связаны с расщеплением НА. H-D. Klenk и соавт. [27], а также S. Lazarowitz и P. Choppin [28] первыми показали, что частицы вируса, продуцируемые в клетках, в которых не имеется протеаз хозяина, способных расщеплять вирусный НА на субъединицы НА1 и НА2, могут прикрепляться к рецепторам клетки-хозяина, но неспособны инициировать инфекцию. Впоследствии на различных клеточных системах и интактных животных было показано, что для многоцикловой репликации различных вирусов гриппа необходимо, чтобы клетки хозяина могли осуществлять процесс расщепления [8]. Затем было обнаружено, что это свойство необязательно связано с серотипом НА; некоторые Н7-содержащие вирусы являются патогенными и реплицируются с расщепленным НА, тогда как НА других авирулентных вирусов того же серотипа не расщепляется [18]. Более того, обнаружили корреляцию этих различий с последовательностью карбоксильных окончаний различных видов НА1. В вирусах человека, содержащих Н2 и Н3, а также в авирулентных Н7-содержащих птичьих вирусах только аргинин-глициновый пептид чувствителен к протеолитическому расщеплению, в то время как связующий пептид в карбоксильных окончаниях НА1 вирулентных штаммов с Н7 имеет бо́льшую длину и содержит основные пептиды. В результате возникло предположение, что эти структурные различия в участках расщепления непосредственно связаны с «расщепляемостью» различных гемагглютининов в тех или иных клеточных системах хозяина [8].

Хотя из приведенных выше данных ясно, что чувствительность НА птичьих вирусов гриппа к расщеплению детерминирована их структурой, в других системах различия в вирусной NA могут обусловливать способность к расщеплению НА. Среди человеческих вирусов гриппа способностью претерпевать многоцикловую репликацию и образовывать бляшки в культуре клеток MDBK обладает только вирус гриппа A/WSN/33 (H1N1). Анализ реас-

сортантных вирусов, полученных после смешанной инфекции вирусами гриппа WSN и A/HK/68 (H3N2) или A/FM/1/47 (H1N1), показал, что NA вируса WSN необходима для образования бляшек и что реассортантные вирусы, наследующие только ген NA вируса WSN, способны к бляшкообразованию. Более того, было установлено, что реассортантные вирусы, не имеющие NA вируса WSN, продуцировали в клетках MDBK неинфекционное потомство с нерасщепленным HA; инфекционная активность активировалась при обработке трипсином in vitro [53]. В аналогичных исследованиях было показано, что среди реассортантных вирусов из вирусов гриппа A/turkey/Ontario/7732/66 (H5N9) и A/WSN/33 (H1N1) только штаммы, наследующие ген HA вируса WSN и ген NA птичьих вирусов гриппа, не обладали способностью образовывать бляшки в клетках CEF при отсутствии экзогенной протеазы. Затем обнаружили, что эти же реассортантные вирусы были абсолютно невирулентны для однодневных цыплят [5]. Кроме того, оказалось, что нейровирулентность вируса WSN для мышей исчезала у реассортантов, не обладающих NA этого вируса [58], и что только у содержащих ее реассортантных вирусов имелся также расщепленный HA и они могли продуктивно размножаться в клетках нейробластомы [34]. Среди человеческих вирусов гриппа уникальную способность к репликации с расщепленным HA вирус WSN и рессортанты, содержащие NA этого вируса, проявляли также в клетках BHK, KB, L и W138 [J. Schulman, неопубликованные данные]. Механизмы, с помощью которых вирусная NA в некоторых случаях может способствовать расщеплению HA, пока не выяснены; возможно, что различные вирусные NA могут дифференцированно активировать или инактивировать необходимые для этого процесса протеазы хозяина.

На основе изучения влияния активации расщепления на инфекционную активность вирусов гриппа и парамиксовирусов высказано предположение о функциональном сходстве N-концов белка F1 парамиксовирусов и N-концов HA2 вирусов гриппа; наличие этих окончаний необходимо, для проникновения вируса в клетку [44]. Полученные недавно данные о слиянии вируса гриппа и клеточных мембран при низких значениях pH [21, 29, 62], а также о последовательности аминокислот в N-концах этих полипептидов [14, 55] хорошо согласуются с такой гипотезой. Затем было показано, что липосомы, содержащие нерасщепленный HA, неспособны к слиянию с клетками, однако такое слияние отмечали после расщепления молекул HA in vitro при обработке трипсином [20]. Таким образом, очень вероятно, что потребность в протеолитическом расщеплении HA для проявления инфекционной активности связана с ролью HA2 в процессе слияния мембраны вируса и клетки-хозяина, который осуществляется, по-видимому, в эндосомах [62].

Однако необходимо подчеркнуть, что, помимо этих четко определенных взаимосвязей между расщеплением HA и инфекционной активностью, другие различия гемагглютининов вируса

гриппа могут также играть роль в определении вида хозяина. Таким образом, различия в авидности, с которой отдельные гемагглютинины прикрепляются к специфическим рецепторам (сиаловым кислотам) разных клеток хозяина или дифференциально связываются со специфическими гликопротеиновыми ингибиторами на поверхностях, покрытых слизью, могут быть важными факторами, влияющими на выбор хозяина.

IV. Вирулентность для цыплят

У птиц разных видов патогенез инфекций, вызванных птичьими вирусами гриппа, различается в значительной степени, проявляясь от бессимптомной инфекции желудочно-кишечного тракта у водоплавающих до летального диссеминированного процесса у цыплят и индюков [18]. Вирусы, выделенные из содержимого желудочно-кишечного тракта или из фекалий уток, имели разнообразные подтипы HA и NA; в настоящее время недостаточно данных, чтобы связать адаптацию вирусов гриппа к тканям желудочно-кишечного тракта с отдельными генами или набором генов этих вирусов.

Наибольшая информация накоплена в отношении сегментов РНК, с которыми связана высокая вирулентность возбудителей. Как отмечено ранее, установлена четкая корреляция между «расщепляемостью» HA в различных культивируемых клеточных системах и патогенностью вирусов для цыплят [40, 42]. Позднее было показано, что родительские и реассортантные вирусы, патогенные для цыплят, активно размножались при 41 °С. Наоборот, непатогенные вирусы, содержащие «легкорасщепляемый» HA, менее интенсивно размножались при 41 °С; это подтверждает, что температурозависимая репликация является дополнительным фенотипическим признаком авирулентных реассортантных вирусов [43].

Используя ts-мутанты высоковирулентных штаммов вирусов чумы птиц (ВЧП) при скрещивании с различными вирусами гриппа человека и животных, изучали вирулентность для цыплят реассортантов, у которых только один сегмент РНК не происходил от родительских ВЧП [46]. Потерю вирулентности наблюдали при замене каждого сегмента ВЧП соответствующими сегментами РНК из других используемых родительских вирусов. Например, после замещения сегмента 2 РНК соответствующим участком РНК вируса гриппа A/Singapore/57 (H2N2) реассортанты обладали такой же вирулентностью, как и исходный ВЧП, но замена того же сегмента соответствующим фрагментом РНК вируса гриппа A/Hong Kong/1/68 (H3N2) приводила к образованию авирулентных реассортантных вирусов. Это наблюдение заслуживает особого внимания из-за очень большого сходства последовательностей оснований в сегменте 2 РНК у вирусов Сингапур и

Гонконг [47]. Оно подтверждает вывод авторов, что потеря патогенности в значительной мере зависит от особенностей штамма, использованного для защиты специфического сегмента РНК. Необходимо также отметить, что реассортанты, возникшие в результате замены гена НА ВЧП, не были изучены. Несомненно, все они должны быть авирулентными из-за отсутствия способного к расщеплению НА ВЧП. Кроме того, не было получено реассортантов, имеющих в своем составе ген НА ВЧП и сегмент 7 РНК (кодирующий полипептиды М1 и М2) других родительских штаммов. Поэтому не представляется возможным определить, будут ли авирулентными все реассортанты, у которых отсутствует сегмент 7 РНК, независимо от того, какие штаммы использовались в качестве доноров.

В другом исследовании определяли патогенность для однодневных цыплят реассортантов, полученных в процессе смешанной инфекции, вызванной вирусами гриппа A/turkey/Ontario/7732/66 (H5N9) и A/WSN/33 (H1N1). Только эти реассортанты, включающие НА вируса индюков или NA вируса WSN (или оба этих антигена), вызывали образование бляшек в культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов и были вирулентны для цыплят. Кроме того, обнаружено, что все вирулентные реассортантные вирусы наследовали сегмент 3 РНК (вероятно, кодирующий PA) и сегмент 5 РНК (кодирующий NP) от вирулентных родительских вирусов индюков. Так как не получены реассортанты, содержащие только один из этих двух сегментов, невозможно определить, необходимо ли для проявления вирулентности наличие одного или обоих сегментов, полученных от вирулентных родительских штаммов. При изучении реассортантов, происходящих от вирусов A/chicken/Japan/24 (H7N7) и А/утка/Украина/1/63 (H3N8), обнаружено, что штаммы, наследующие гены НА и NA, а также сегмент 7 (кодирующий полипептиды М1 и М2) вирулентного родительского вируса A/Japan, были так же вирулентны для куриных эмбрионов и 10-дневных цыплят, как и родительский штамм [35]. Реассортанты, не имеющие H7, были полностью авирулентны, тогда как вирусы, содержащие H7, но не имеющие ген NA или сегмент 7 РНК вирулентного родителя, обладали пониженной вирулентностью. Тем не менее они были более патогенны, чем авирулентный родительский штамм А/утка/Украина. Наличие NAN7 вирулентного штамма A/Japan не влияло на расщепление H7 в культуре клеток, но получение реассортантов с антигенной формулой H7N7 в результате смешанной инфекции антигенными гибридами H7N8 и H3N7 подтверждало зависимость вирулентности от наличия N7.

Во всех этих исследованиях четко выявляется общая закономерность — связь расщепления НА с вирулентностью. В отношении зависимости вирулентности от наличия различных сегментов РНК также ясно, что вирулентность для цыплят связана со многими генами и что значение отдельных сегментов РНК зависит от использованных родительских штаммов.

V. Нейровирулентность для мышей

Уникальную способность некоторых штаммов вируса гриппа к репликации в мышиных нейронах использовали в качестве генетического маркера в течение трех десятилетий при изучении генетики вирусов гриппа [57]. Ретроспективно можно отметить, что указания на связь нейровирулентности с нейраминидазной активностью были получены еще в ранних экспериментах [10]. Позднее при изучении антигенных гибридов вирусов A/WSN/33 (H1N1) и A/Japan/305/57 (H2N2) пришли к выводу, что нейровирулентность не обязательно связана с HA или NA [31]. Однако дальнейшее изучение генотипированных реассортантных вирусов, полученных из вируса WSN, показало, что для наличия у вируса нейровирулентности необходимо присутствие NA штамма WSN [58]. Кроме того, эти же исследователи обнаружили, что только те реассортанты, которые унаследовали сегменты 7 и 8 РНК вируса WSN, имели такую же нейровирулентность, как и вирус WSN. Вирусы, содержащие наряду с NA вируса WSN любые другие сегменты РНК авирулентного родительского вируса Гонконг, размножались в мозге мыши в значительно низшем титре и не вызывали гибели мышей (за исключением животных с иммунодепрессией). В подобных исследованиях при изучении репликации тех же вирусов в клетках нейробластомы показано, что только реассортанты, содержащие NA вируса WSN, размножались с расщепленным HA в этих клетках [34].

Была изучена нейровирулентность реассортантных вирусов, происходящих из вирусов A/FPV/Rostock/34 (H7N1) и A/PR/8/34 (H1N1) или A/England/1/61 (H2N2) [49]. Хотя ни один из родительских штаммов не был вирулентен для мышей, реассортантные вирусы обладали нейровирулентностью. Нейровирулентные реассортанты, полученные в результате смешанной инфекции виру-

Таблица 34. *Сочетания генов, обусловливающие нейро- и пневмовирулентность для мышей у реассортантов, полученных из вирусов FPV и A/England/1/16 или вирусов FPV и A/PR/8/34* [49]

Гены	FPV × A/England		FPV × A/PR/8	
	нейровирулентность	пневмовирулентность	нейровирулентность	пневмовирулентность
PB1	A	—	—	—
PA	A	A	P	P
HA	A	—	F	—
M1, 2	F	—	F	—
Все другие гены	—	—	—	—

Примечание. A — сегмент РНК из вируса A/England.
P — сегмент РНК из вируса A/PR/8.
F — сегмент РНК из вируса FPV.
— из других родительских штаммов.

сами H2N2 и ВЧП, имели в своем составе сегменты 1 и 2 РНК (кодирующие соответственно PB2 и PB1) родительского вируса H2N2, а также сегменты 4 и 7 РНК ВЧП, кодирующие соответственно НА, М1 и М2 (табл. 34). При использовании в качестве второго родительского штамма вируса A/PR/8/34 нейровирулентность была связана с геном этого вируса, кодирующим PB1, и сегментами 4 и 7 РНК ВЧП. Более того, было показано, что некоторые реассортанты, обладающие нейровирулентностью при внутримозговом введении мышатам-сосункам, способны к диссеминации: поражение дыхательной системы приводит в дальнейшем к виремии и вовлечению ЦНС в инфекционный процесс. Отмечено также, что к многоцикловой репликации в культуре клеток мышиных эмбрионов были способны только те реассортанты, которые могли диссеминировать in vivo. Вирусы, содержащие гемагглютинин H1 или H2, обладали пневмотропизмом, но не были способны к диссеминации in vivo; они могли размножаться в культуре клеток мышиных эмбрионов только в присутствии трипсина [60]. Эти наблюдения четко показывают, что вирулентные реассортанты могут возникать после смешанной инфекции, вызванной двумя авирулентными родительскими вирусами; этот факт еще раз подтверждает решающую роль «расщепляемости» НА H7 в диссеминации инфекции.

VI. Вирулентность для других экспериментальных животных

А. Хорьки

В течение нескольких десятилетий в качестве удобной модели гриппозной инфекции используют хорьков, особенно для сравнения вирулентности различных штаммов вируса гриппа с целью прогнозирования вирулентности для человека. В последнее время в некоторых из этих экспериментов сравнивали реассортантные вирусы, имеющие определенные генотипы. Например, при сравнении 16 реассортантов, происходящих из вирусов гриппа A/Okuda/57 (H2N2) и A/Finland/4/74 (H3N2), обнаружено, что вирусы с кодирующими НА и NA генами из аттенуированного родительского вируса A/Okuda/3/57 были менее вирулентными, чем вирусы, получившие те же сегменты РНК от вирулентных родителей [11]. Хотя вирулентность не может быть связана со специфическим набором генов, отмечена отчетливая обратная зависимость между вирулентностью реассортантных вирусов и числом сегментов РНК, полученных от авирулентных родителей.

Б. Крысы

Аналогичные эксперименты с использованием как диких вирусов, так и реассортантов были выполнены на новорожденных крысах. В отношении некоторых вирусов имелась информация об их

вирулентности для добровольцев. Это позволило выявить определенную корреляцию между вирулентностью вирусов для людей и их патогенностью для новорожденных крыс (критериями определения патогенности служили размножение вирусов на слизистых оболочках носовых раковин и чувствительность к суперинфекции Haemophilus influenzae B). Однако недостаточное число исследованных реассортантов не позволило выявить взаимосвязь патогенности с наличием отдельных сегментов РНК или их сочетаний [23, 32, 59].

В. Мыши

При изучении на мышах нейровирулентности реассортантов, полученных из ВЧП и адаптированных к мышам вирусов H2N2 или H1N1, исследовали также пневмотропность этих вирусов при интраназальном заражении мышат-сосунков [49]. Как следует из табл. 34, для наличия пневмовирулентности необходимо только, чтобы сегмент РНК, кодирующий PA, происходил от родительского вируса гриппа, пневмотропного для мышей [49]. Кроме того, было отмечено, что все пневмотропные вирусы могут размножаться в культуре клеток мышиных почек. Один реассортант, при наличии у него сегмента, кодирующего PA, от вируса A/England/61 (H2N2) не обладал пневмотропностью и не реплицировался в клетках почек мышей.

В других исследованиях, результаты которых не опубликованы, сравнивали пневмовирулентность вирусов с гибридными антигенами, полученными от адаптированного к мышам вируса A/PR/8 (H1N1) и неадаптированного вируса A/HK/8/68 (H3N2). Реассортантный вирус (R1), имеющий все сегменты РНК вируса A/PR/8 (за исключением гена HA), был менее вирулентен, чем родительский вирус A/PR/8 (табл. 35). Наоборот, штамм R2, у

Таблица 35. *Пневмовирулентность реассортантов вирусов A/PR/8/34 и A/HK/68*

Вирусы	Геном								Титры вируса в легких[3]	Поражения легких[4]
	PB1	PA	PB2	HA	NP	NA	M1, 2	NS1, 2		
A/PR/8	P[1]	P	P	P	P	P	P	P	7,7	73
A/HK/68	H[2]	H	H	H	H	H	H	H	6,2	5
R1	P	P	P	H	P	P	P	P	6,9	33
R2	H	H	H	P	H	H	H	H	6,8	28
R3[5]	P	P	P	P	P	P	P	P	7,9	68

[1] P — происходящие от вируса A/PR/8.
[2] H — происходящие от вируса A/HK/68.
[3] EID_{50}, log_{10}, средние геометрические величины на 3-й день после заражения.
[4] Средняя частота легочных поражений (%) через 7 дней после заражения.
[5] Вирус, полученный после смешанной инфекции, вызванной вирусами R1 и R2.

которого только ген НА происходил от вируса A/PR/8, был более вирулентен, чем его родительский вирус A/HK/8/68, от которого происходили все его остальные гены. Сходные результаты были получены при изучении других реассортантов, идентичных по генотипу с R1 или R2. При последующей микстинфекции этими двумя реассортантами был получен вирус R3, все гены которого происходили от штамма A/PR/8; он обладал такой же вирулентностью для мышей, как и исходный вирус A/PR/8, и был более вирулентным, чем вирусы R1 и R2. Эти результаты вновь показали, что НА является ведущим фактором, детерминирующим вирулентность. Однако неизвестно, связаны ли эти различия в вирулентности, обусловленной НА, с различиями в его расщеплении в клетках респираторного тракта мышей. Эти наблюдения также показывают, что вирулентность вируса A/PR/8 может быть связана и с другими генами. В аналогичных опытах неразведенную смесь реассортантов, полученных при смешанной инфекции вирусами A/PR/8 и A/HK/68, вводили мышам. Вирусы, выделенные из легких этих мышей, вносили в клетки MDCK, чтобы определить наличие двойных сегментов РНК (что указывает на происхождение от обоих родительских штаммов) или одинарных сегментов, подтверждающих селекцию реассортантов, сегменты РНК которых происходят от вируса A/PR/8. Только сегмент 8 (кодирующий NS1 и NS2) оказался двойным. Сегменты вируса A/HK/68, кодирующие PB1, PA, PB2, NP или M1 и M2, не были выявлены. Следовательно, при репликации в легких мышей происходит селекция генов этих белков из вируса A/PR/8 [J. Schulman, неопубликованные данные]. Наоборот, в ранних работах при заражении такой же смесью куриных эмбрионов селекция генов вируса A/PR/8, кодирующих белки P, NS1 или NS2, не была выявлена [54]. Таким образом, вероятно, что адаптация вируса A/PR/8 при множественных пассажах в организме мышей приводит к селекции изменений в большинстве сегментов РНК.

Таблица 36. *Гепатотропные и негепатотропные реассортантные вирусы*

PB1	PA	PB2	HA	NP	NA	M1, 2	NS1, 2	Гепатотропизм
P	T	T	T	T	P	T	P	+
T	T	P	T	T	T	T	T	+
T	T	P	T	T	P	T	P	+
P	T	T	T	T	P	T	T	+
P	P	P	T	T	T	T	T	—
T	T	T	P	T	T	T	T	—
P	P	P	T	P	T	P	T	—
T	T	T	T	T	T	P	T	—

Примечание. P — производные вируса A/PR/8.
T — производные вируса A/Turkey.

Гепатотропизм. O. Haller [15] получил птичий вирус гриппа А с уникальной способностью реплицироваться в печени мыши при внутрибрюшинном заражении или инфицировании респираторного тракта. Реассортанты, происходящие от такого вируса и вируса A/PR/8, проверяли на гепатотропизм (табл. 36). Оказалось, что для проявления гепатотропизма требуется наличие сегментов РНК, кодирующих PA, HA, NP, M1 и M2, происходящих из гепатотропного родительского штамма [J. Schulman, неопубликованные данные].

VII. Вирусзависимые различия в других системах

А. Культуры клеток

Ограниченная способность ВЧП к продуктивной репликации в некоторых клетках млекопитающих связана как с нарушением миграции RNP из ядер, так и с угнетением вторичного синтеза мембранного белка [12]. В двух разных культурах клеток показано, что ген, кодирующий PB2, контролирует вид хозяина. Обнаружено, что ген PB2 ВЧП Dobson определяет возможность многоцикловой репликации в клетках ВНК [2]. Показано, что этот же ген детерминирует способность мутантного штамма ВЧП Dobson к размножению в L-клетках [22].

Б. Выращивание вируса в эмбрионах

Показано, что генетическая пересортировка может быть использована для получения вирусов, сочетающих антигенные свойства вирусов диких типов и высокую «урожайность» лабораторных штаммов [24]. При сравнении скорости роста 47 реассортантных вирусов, полученных из вирусов A/PR/8 и A/HK/68, было обнаружено, что способность к высокому «урожаю» связана с сегментами вируса A/PR/8, кодирующими NP, M1 и M2 [54]. Введение в эмбрионы реассортантных смесей в низких разведениях вызывало увеличение числа вирусных частиц реассортантов, содержащих сегменты вируса A/PR/8, кодирующих NP, M1 и M2, но не способствовало селекции реассортантов, содержащих гены вируса A/PR/8, ответственные за P белки или NS1 и NS2. Определены генотипы высокопродуктивных реассортантов, полученных после смешанной инфекции вирусом A/PR/8 и различными дикими типами вируса; также обнаружено, что единственным общим для всех вирусов был сегмент 7 РНК, кодирующий белки M1 и M2 [4].

В. Чувствительность к амантадину

Для различных штаммов вируса гриппа характерны значительные отличия в чувствительности к ингибирующему действию амантадина [36]. В двух независимых исследованиях, включаю-

щих анализ генотипа и изучение чувствительности к амантадину, обнаружено, что сегмент РНК, кодирующий белки М1 и М2, детерминирует чувствительность или резистентность вируса [17, 30]. Однако в другой работе показано, что чувствительность к амантадину в зависимости от использованных в исследовании систем может детерминироваться геном, кодирующим НА, или преимущественно генами, кодирующими NP и NA [48].

VIII. Вирулентность для человека

Уже более 40 лет назад, в 1943 г., F. Burnet и D. Bull предсказали, что генетическая нестабильность вируса гриппа может быть использована для селекции вирусов, аттенуированных к организму человека серийными пассажами на необычном хозяине, например в куриных эмбрионах. Тем не менее генетические основы аттенуации вирусов гриппа в организме человека остаются неясными [7]. Несомненно показано, что полученные лабораторным путем ts и холодоустойчивые мутанты менее вирулентны для человека, чем штаммы, из которых они получены [33]. Однако все эти мутанты были отобраны на основе их способности к репликации при различных температурах; остается неясным, связана ли их аттенуация для человека со специфическими мутациями в определенных генах или это результат изменения температурозависимого фенотипа, который оказывает влияние на размножение вируса в нижних дыхательных путях при высоких температурах. В последнем случае другие мутанты с повреждениями в других генах, но с одинаковыми температурозависимыми фенотипами должны быть аттенуированы в равной мере. Хотя такие вирусы могут иметь большое потенциальное значение для конструирования перспективных живых вирусных вакцин, они не позволяют легко идентифицировать специфические гены вирусов дикого типа, обусловливающие вирулентность для человека.

Предпринимались также попытки идентифицировать гены, связанные с вирулентностью для человека у реассортантов, полученных из вирусов дикого типа, обнаруженных в смывах из зева, и из аттенуированных лабораторных штаммов. Однако результаты этих опытов очень трудно интерпретировать из-за недостаточного числа обследованных добровольцев и изученных реассортантов, а также вследствие нестабильности генетического фона хозяев и различий в предшествующих иммунологических реакциях на другие вирусы гриппа. По этим причинам трудно выявить связь вирулентности с определенными генами или их комбинациями. Так, вирус X31, все гены которого происходят из вируса A/PR/8 [4] и который невирулентен для человека, аттенуировался лишь частично. В то же время другие реассортантные вирусы H3N2, имеющие различные комбинации генов вируса A/PR/8, были либо полностью аттенуированы, либо вирулентны [7]. Подобно этому опыты на добровольцах с генотипированными реас-

сортантами, происходящими из вируса H3N2 и аттенуированного лабораторного штамма вируса H2N2, не выявили какого-либо постоянного генотипа, связанного с вирулентностью или аттенуацией; в вирулентности реассортантов одного и того же генотипа имелись значительные различия [7].

Также сложно было установить вариабельность вирулентности для человека естественных штаммов вируса гриппа А [26]. При последовательных эпидемиях, вызванных вирусами H3N2 и H1N1 у неиммунных детей, выявлено, что вирус H3N2 чаще вызывал лихорадочные заболевания [63]. Однако необходимо еще выяснить, имелась ли подобная закономерность при других вспышках. Учитывая доминирование штаммов вируса H1N1, содержащих сегменты РНК, которые кодируют белки P и NP или белки P, NP, M1 и M2, происходящие из параллельно циркулирующих вирусов H3N2, высказано предположение, что естественные реассортанты могут иметь селективное преимущество [64]. Однако вновь остается неясным, продолжают ли доминировать эти вирусы.

Несмотря на то что в течение нескольких десятилетий предпринимались попытки получить штаммы вируса гриппа, адаптированные к человеческому организму сериями пассажей на чужеродных для хозяина клеточных системах, результаты этих опытов были весьма вариабельными [7]. Кроме того, даже когда наблюдали нарушение адаптации к человеческому организму, было невозможно определить генетические основы изменения фенотипа. Подобно этому до сих пор не уточнены мутации, необходимые для адаптации к человеческому организму вирусов, обитающих не в человеческой популяции [26]. К настоящему времени имеются лишь крайне ограниченные сведения о специфических мутациях в отдельных генах, влияющих на адаптацию к определенным хозяевам. В этом отношении определенный интерес представляет недавнее выделение и изучение вируса H7N7 при диссеминированной смертельной гриппозной эпизоотии у тюленей. С помощью метода конкурентной гибридизации было найдено, что каждый из 8 сегментов РНК этого вируса был очень близок к эквивалентным сегментам других птичьих вирусов. Однако было обнаружено, что вирус лучше размножался в организме млекопитающих, чем птиц [61]. Хотя такое изменение вида хозяев может быть связано с определенным набором генов птичьего вируса, также вполне возможно, что адаптация была обусловлена серией последовательных мутаций.

Наконец, следует обратиться к вопросу о генетических детерминантах трансмиссивности. Однако о генетическом контроле способности к трансмиссии известно еще меньше, чем о детерминантах вирулентности. Нет оснований считать, что особопатогенные для человека штаммы (если таковые существуют) имеют бо́льшую способность к распространению. С одной стороны, можно ожидать, что вирусы с высокой репродуктивной активностью могут легче распространяться. С другой стороны, транс-

миссивность per se может подвергаться влиянию мутаций генов, не связанных с контролем тяжести заболевания. Действительно, результаты изучения передачи вирусной гриппозной инфекции у мышей показали, что способность к трансмиссии может не быть связана с другими признаками вирулентности, например с максимальными титрами вируса в легких или распространенностью пневмонии [50, 51].

IX. Резюме

1. К настоящему времени наиболее четко установлена связь вирулентности вируса и вида хозяина с чувствительностью вирусного НА к протеолитической активации инфективности клеткой хозяина. У птичьих вирусов это свойство может быть связано со структурой НА, однако в случае вируса WSN вирусная NA с помощью неизвестных еще механизмов способствует расщеплению НА.

2. В отношении роли других генов результаты исследований пока значительно труднее объяснить; эти результаты зависят от конкретных исходных вирусов, используемых для получения реассортантов.

3. Клональные изменения в фенотипе реассортантов, имеющих одинаковое распределение родительских генов, указывают на значительное влияние случайных мутаций.

4. В тех же системах для проявления вирулентности требуется эффективное взаимодействие полипептидов, которые закодированы генами, происходящими от одного из родителей.

5. Реассортанты, полученные из двух родительских вирусов, авирулентных для определенных клеточных систем, могут быть более вирулентны, чем любой из родительских штаммов. Наоборот, реассортантные вирусы, полученные из вирулентного и авирулентного родителей, значительно чаще аттенуированы (по крайней мере частично).

6. В большинстве животных систем вирулентность находится под полигенным контролем, который, вероятно, отражает селекцию нескольких сегментов в процессе адаптации к определенному хозяину.

7. Генетические детерминанты вирулентности и трансмиссивности пока не определены.

Список литературы

1. *Alexander D., Allan W., Parsons D., Parsons G.* — Res. Vet. Sci., 1978, v. 24, p. 242—257.
2. *Almond J.* — Nature, 1977, v. 270, p. 617—618.
3. *Askonas B., McMichael A., Webster R.* — In: Basic and applied influenza research. Boca Raton: CRC Press, 1982, p. 157—188.
4. *Baez M., Palese P., Kilbourne E.* — J. Infect. Dis., 1980, v. 141, p. 362—365.
5. *Bean W., Webster R.* — In: Negative strand viruses and the host cell. N. Y.: Academic Press, 1978, p. 685—692.

6. *Bean W., Sriram G., Webster R.* — Analyt. Biochem., 1980, v. 102, p. 228—232.
7. *Beare A.* — In: Basic and applied influenza research. Boca Raton: CRC Press, 1982, p. 211—234.
8. *Bosch F., Garten W., Klenk H.-D., Rott R.* — Virology, 1981, v. 113, p. 725—735.
9. *Burnet F., Bull D.* — Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1943, v. 21, p. 55—69.
10. *Burnet F.* — In: The Viruses. N. Y.: Academic Press, 1959, v. 3, p. 275—306.
11. *Campbell D., Sweet C., Hay A. et al.* — J. Gen. Virol., 1982, v. 58, p. 387—398.
12. *Conti G., Valcavi P., Natali A., Schito G.* — Arch. Virol., 1980, v. 66, p. 309—320.
13. *Erickson A., Kilbourne E.* — Virology, 1980, v. 107, p. 320—330.
14. *Gething M., White J., Waterfield M.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 2737—2740.
15. *Haller O.* — Arch. Virol., 1975, v. 48, p. 77—88.
16. *Haller O., Arnheiter H., Gresser I., Lindenmann J.* — J. Exp. Med., 1979, v. 149, p. 601—612.
17. *Hay A., Kennedy N., Skehel J., Appleyard G.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 42, p. 189—191.
18. *Hinshaw V., Webster R.* — In: Basic and applied influenza research. Boca Raton: CRC Press, 1982, p. 79—104.
19. *Hrdy D., Rubin D., Fields B.* — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 1298—1302.
20. *Huang R., Wuhn K., Klenk H.-D., Rott R.* — Virology, 1980, v. 104, p. 294—302.
21. *Huang R., Rott R., Klenk H.-D.* — Virology, 1981, v. 110, p. 243—247.
22. *Israel A.* — J. Gen. Virol., 1980, v. 51, p. 33—44.
23. *Jennings R., Potter C., Teh C., Mahmud M.* — J. Gen. Virol., 1980, v. 49, p. 343—354.
24. *Kilbourne E., Murphy J.* — J. Exp. Med., 1960, v. 3, p. 387—406.
25. *Kilbourne E.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 6258—6262.
26. *Kilbourne E.* — Phil. Trans. R. Soc., 1980, v. B288, p. 291—297.
27. *Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blondon J.* — Virology, 1975, v. 68, p. 426—439.
28. *Lazarowitz S., Choppin P.* — Virology, 1975, v. 68, p. 440—454.
29. *Lenard J., Miller D.* — Virology, 1981, v. 110, p. 479—482.
30. *Lubeck M., Schulman J., Palese P.* — J. Virol., 1978, v. 28, p. 710—716.
31. *Mayer V., Schulman J., Kilbourne E.* — J. Virol., 1973, v. 11, p. 272—278.
32. *Michaels R., Mahmud M., Coup A. et al.* — J. Med. Virol., 1978, v. 2, p. 253—264.
33. *Murphy B., Markoff L., Chanock R. et al.* — Phil. Trans. R. Soc., 1980, v. B288, p. 401—415.
34. *Nakajima S, Sugiuro A.* — Virology, 1980, v. 101, p. 450—457.
35. *Ogawa T., Ueda M.* — Virology, 1981, v. 113, p. 304—313.
36. *Oxford J.* — In: Chemoprophylaxis and virus infections of the respiratory tract. Vol. 1. Cleveland: CRC Press, 1977, p. 140—187.
37. *Palese P., Schulman J.* — Proc. nat. Acad. Sci USA, 1976, v. 73, p. 2142—2146.
38. *Ritchey M., Palese P., Schulman J.* — Virology, 1977, v. 76, p. 122—128.
39. *Rott R., Orlich M., Scholtissek C.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 44, p. 471—477.
40. *Rott R.* — Phil. Trans. R. Soc., 1980, v. B288, p. 393—399.
41. *Rott R., Reinacher M., Orlich M., Klenk H.-D.* — Arch. Virol., 1980, v. 65, p. 123—133.
42. *Rott R.* — Hoppe-Seyler's Z. Physiol., 1982, v. 363, p. 1273—1282.
43. *Rott R., Orlich M., Scholtissek C.* — Virology, 1982, v. 120, p. 215—224.
44. *Scheid A., Graves M., Silver S., Choppin P.* — In: Negative strand viruses and the host cell. N. Y.: Academic Press, 1978, p. 181—193.
45. *Scholtissek C., Harms E., Rohde W. et al.* — Virology, 1976, v. 74, p. 332—344.

46. *Scholtissek C., Rott R., Orlich M.* et al. — Virology 1977, v. 85, p. 74—80.
47. *Scholtissek C., Rohde W., von Hoyningen V., Rott R.* — Virology, 1978, v. 87, p. 13—20.
48. *Scholtissek C., Faulkner G.* — J. Gen. Virol., 1979, v. 44, p. 807—815.
49. *Scholtissek C., Vallbracht A., Flehmig B., Rott R.* — Virology, 1979, v. 95, p. 492—500.
50. *Schulman J.* — J. Exp. Med., 1967, v. 125, p. 479—488.
51. *Schulman J.* — Am. J. Publ. Hlth, 1968, v. 58, p. 2092—2096.
52. *Schulman J.* — In: The influenza viruses and influenza. N. Y.: Academic Press, 1975, p. 373—394.
53. *Schulman J., Palese P.* — J. Virol., 1977, v. 24, p. 170—176.
54. *Schulman J., Palese P.* — In: Negative strand viruses and the host cell. N. Y.: Academic Press, 1978, p. 663—674.
55. *Skehel J., Waterfield M.* — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 93—97.
56. *Slemons R., Easterday B.* — Bull. WHO, 1972, v. 47, p. 521—527.
57. *Sugiura A.* — In: The influenza viruses and influenza. N. Y.: Academic Press, 1975, p. 171—213.
58. *Sugiura A., Ueda M.* — Virology, 1980, v. 101, p. 440—449.
59. *Teh C., Jennings R., Potter C.* — J. Med. Microbiol., 1980, v. 13, p. 297—306.
60. *Vallbracht A., Scholtissek C., Flehmig B., Gerth H.-J.* — Virology, 1980, v. 107, p. 452—460.
61. *Webster R., Hinshaw V., Bean W. et al.* — Virology, 1981, v. 113, p. 712—724.
62. *White J., Kartenbeck J., Helenius A.* — The EMBO J., 1982, v. 1, p. 217—222.
63. *Wright P., Thompson J., Karzon D.* — Amer. J. Epidemiol., 1980, v. 112, p. 814—818.
64. *Young J., Palese P.* — Proc. Natl Acad. Sci USA, 1979, v. 76, p. 6547—6551.

11

Молекулярная эпидемиология вируса гриппа

П. Пейлиз, Дж. Юнг (P. Palese, J. Young)

I. Введение

Последние достижения в развитии новейших технологических приемов значительно расширили наши возможности в определении генетического строения и молекулярной структуры вирусов, а также выявлении сходства штаммов и идентификации различий между вариантами вирусов. Наиболее важные из этих методов — клонирование и определение последовательности нуклеиновых кислот, картирование РНК и пептидов, а также антигенный анализ белков с помощью моноклональных антител. Задача последней обзорной главы данной книги — обсуждение эпидемиологии вируса гриппа в свете применения этих новых методов. Особое внимание уделено оценке последних достижений и изучению вопросов эпидемиологии, которые могут быть успешно решены при использовании молекулярных методов.

II. Вирусы гриппа A, B и C и связанные с ними заболевания

Как отмечено в предыдущих главах, вирусы гриппа могут быть разделены на три типа: A, B и C. Все штаммы одного типа имеют в своем составе дающие перекрестные серологические реакции белки M и NP, которые являются главными компонентами вируса. Из трех типов вирусы гриппа типа A — наиболее актуальные возбудители заболеваний у людей, так как с ними связаны пандемии гриппа.

При неосложненном течении гриппозная инфекция вовлекает в патологический процесс эпителиальные клетки верхних дыхательных путей. После короткого инкубационного периода (1—3 дня) у больного обычно остро появляются высокая температура, недомогание, головная боль, тошнота, озноб и кашель. Заболевание обычно имеет затяжное течение, но через 2—3 нед наступает полное выздоровление. Опубликованы многочисленные подробные обзорные сообщения о клиническом течении инфекций, вызванных вирусом гриппа A [16, 47, 56].

Возникает вопрос, сходны ли клинические проявления инфекции, вызванной вирусом гриппа A, с симптоматологией заболева-

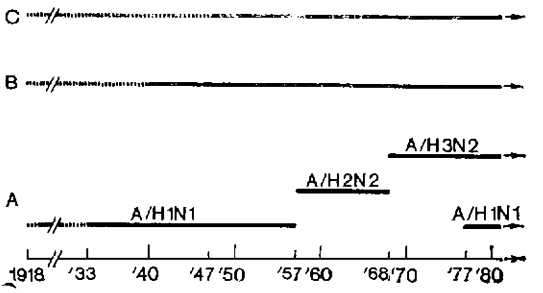
ний, вызванных вирусами гриппа B и C. Несомненно, что между вирусами трех типов имеются существенные различия в вызываемых ими поражениях, уровнях заболеваемости людей и, что наиболее важно, в степени сложности выделения и идентификации вируса [33]. Однако недавно появилось сообщение об изучении инфекции, вызванной вирусом гриппа C [17]. Несмотря на небольшое число обследованных, авторы считают, что по тяжести течения заболевание было подобно гриппу, вызванному вирусом типа A, или протекало даже несколько тяжелее. Аналогичным образом недавние сообщения показывают, что не имеется значительных различий в клинических проявлениях инфекций, вызванных вирусами типов B и A [2, 13, 28, 39, 57]. Следовательно, можно подвергнуть сомнению ранее высказанные предположения [13, 28], что вирусы гриппа типов B и C дают значительно более низкую заболеваемость, чем вирус типа A.

Осложнения гриппа, вызванные вирусом типа A, включают первичную вирусную пневмонию и/или (в редких случаях) поражения сердечно-сосудистой и нервной систем. В последнее время большое внимание привлекло еще одно серьезное осложнение гриппа. После вспышек гриппа, вызванных вирусами типа A и B, может развиться синдром Рейе. Для вируса гриппа типа A (H1N1) установлено, что частота этого осложнения составляет 2,5 случая на 100 000 детей [22]. Для детей, инфицированных вирусом гриппа типа B, этот показатель в 10 раз выше [11]. Хотя синдром Рейе хорошо известен проявлениями со стороны печени и нервной системы, особенно у людей определенных возрастных групп, точная этиология этого синдрома остается неясной. Создается впечатление, что факторы окружающей среды и/или различия в ответных реакциях макроорганизма более важны, чем специфический фенотип инфицирующего вируса. В связи с этим следует отметить результаты предварительных экспериментов, показавших, что вирусы гриппа типов A и B, выделенные у больных с синдромом Рейе, при анализе белков с помощью электрофореза в геле с додецилсульфатом натрия были неотличимы от других штаммов [M. Krystal, Partin, P. Palese, неопубликованные данные].

За исключением работ, касающихся синдрома Рейе, очень мало было сделано для установления частоты и многообразия осложнений после заболеваний, вызванных вирусом гриппа типа B. Еще меньше известно о возможных осложнениях после гриппа, связанного с вирусом гриппа C, хотя многочисленные исследования выявили антитела к этому вирусу у большинства взрослых людей [27, 48].

III. Грипп в XX столетии

В течение многих лет вирусы гриппа типа A привлекали большое внимание специалистов по клинической и молекулярной эпидемиологии [32] из-за способности этих вирусов вызывать пандемии. Эти глобальные эпидемии обычно возникали в результате появ-



44. Циркуляция вирусов человеческого гриппа A, B и C с 1918 г.

Прерывистые линии указывают на возможное продолжение циркуляции штаммов, но отсутствие выделения штаммов вируса в этот период. Подтип вируса гриппа А определяли по поверхностным белкам, НА и NA. Три различных подтипа вируса А наблюдали в XX столетии. Следует отметить, что антигенный дрейф встречается среди вирусов гриппа В и С, так же как и среди штаммов, принадлежащих к тому же подтипу вируса гриппа А.

ления штаммов вируса нового подтипа. Полагают, что в XX столетии по крайней мере трижды вирусы с новой комбинацией HA/NA поражали человеческую популяцию (рис. 44). Впервые новое сочетание антигенов появилось в 1918 г. у свиного штамма вируса гриппа, с которым была связана высокая заболеваемость и смертность. Этот «новый» штамм вируса вызвал пандемию, при которой в мире погибло около 20 млн. человек. Серологические данные показали, что вирус 1918 г. был близок к вирусам, выделенным от свиней в 1931 г. Именно поэтому данные штаммы относят к вирусам свиней, или H1N1 вирусам. Вирусы с НА, слегка отличавшимся от НА свиного вируса 1918 г., вероятно, продолжали циркулировать почти 40 лет. В 1956 г. появились штаммы с антигенной формулой H2N2 (азиатские штаммы), которые заменили штаммы H1N1. Антитела против ранее циркулировавших штаммов H1N1 не нейтрализовали вирусы H2N2. Эти вирусы циркулировали в течение 11 лет — до 1968 г., когда появились штаммы нового подтипа. Новые вирусы H3N2 (штаммы Гонконг) сохранили NA от штаммов H2N2 и приобрели ранее неизвестный гемагглютинин H3. Таким образом, в 1918—1968 гг. штаммы трех различных подтипов (H1N1, H2N2 и H3N2) последовательно циркулировали в человеческой популяции.

Помимо трех новых подтипов вируса гриппа, в 1977 г. появился «старый» подтип этого вируса. Неожиданно оказалось, что штаммы 1977 г. («русские» вирусы) обладали поверхностными белками, сходными с таковыми вирусов H1N1, которые циркулировали около 1950 г. [30, 38, 66]. С 1977 г. эти «русские» штаммы сосуществовали в популяции с вирусами H3N2, которые впервые появились в 1968 г.

Эпидемиология вирусов гриппа типов В и С представляется менее сложной (см. рис. 44). Вирусы гриппа типа В выделяли и описывали с 1940 г. За более чем 40-летний период не было выявлено данных о существовании различных подтипов этого вируса. Однако анализ показывает, что у вирусов гриппа типа В имеет место антигенный дрейф, аналогичный таковому у вирусов гриппа типа А [9, 51]. Бóльшая часть эпидемиологических наблюдений вирусов гриппа С основывалась на серологическом анализе раз-

личных популяций, но лишь немногие работы посвящены характеристике штаммов вируса. Первичное выделение вируса с использованием стандартных лабораторных методов могло быть менее успешным в отношении вирусов гриппа типа С из-за их потребности в специальных условиях роста [46]. Однако имеющиеся данные показывают, что инфекции, вызванные вирусом гриппа типа С, развиваются не в виде эпидемических вспышек, а как эндемичные заболевания. Хотя у вирусов гриппа типа С наблюдались небольшие антигенные различия [10], неясно, оказывают ли эти антигенные изменения влияние на эпидемиологию гриппозной инфекции.

IV. Надзор за вирусами гриппа

Эффективный биохимический анализ свежевыделенных штаммов вируса гриппа и правильная интерпретация этих данных основываются на материалах, которые дают системы эпидемиологического надзора. Международное наблюдение за гриппозной инфекцией у людей организует Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Эти усилия поддерживают национальные гриппозные центры, расположенные во многих странах. В 1980 г. 101 центр в 71 стране сотрудничал с двумя гриппозными центрами ВОЗ, которые находятся в Атланте и Лондоне. В США вирусы гриппа выделяют местные лаборатории органов здравоохранения или лаборатории отдельных штатов. В этой стране действует хорошо развитая национальная система надзора за гриппом, охватывающая всю страну. Высококачественные сообщения о постоянной работе этой системы публикуются в еженедельном бюллетене «Morbidity and Mortality Weekly Reports», который издают Центры по контролю заболеваемости в Атланте (Centers for Disease Control).

Несмотря на публикации об отдельных подобных случаях, наша лаборатория, как и другие учреждения, получает штаммы вирусов гриппа, которые в дальнейшем оказываются артефактами или контаминантами, хотя такие случаи и происходят весьма редко. Поэтому необходимо, чтобы лаборатории всего мира, которые участвуют в надзоре за гриппом и изучают клинические материалы, неукоснительно применяли только надежные лабораторные методы [61]. Особое значение имеет создание компетентных лабораторий, таких, как Исследовательский центр по гриппу в Хьюстоне, который имеет соответствующие методики и обученный персонал для проведения достоверного наблюдения. Этот центр постоянно собирает ценную информацию об эпидемиологии гриппозной инфекции.

Методы расчета заболеваемости и смертности от гриппа основаны на колебаниях показателей. Оценка заболеваемости может быть получена при использовании данных о невыходах на работу, подтвержденных соответствующими врачебными справками, или о числе штаммов вирусов гриппа, выделенных в данной популя-

ции. Показатели смертности могут быть рассчитаны на основе увеличения числа смертельных исходов в данном месяце или непосредственно по данным регистрации причин смерти. Таким образом, для оценки влияния гриппа на популяцию могут быть использованы многие методы [47].

V. Вирусы H1N1, появившиеся в 1977 г.

В последующих разделах будет показано, как биохимические методы были успешно использованы для дальнейшего анализа загадочных эпидемиологических событий. Приводимый пример связан с повторным появлением вирусов гриппа H1N1 в 1977 г.

Предположение о том, что только один подтип вируса гриппа типа А циркулирует в определенное время, было опровергнуто, когда с 1977 г. наряду с вирусами H3N2 от людей начали выделять и штаммы H1N1. Второй уникальной особенностью этого события явилось практически полное отсутствие у взрослых заболеваний, обусловленных вирусом H1N1. Хотя имелись сообщения о спорадических заболеваниях взрослых, родившихся до 1957 г., иммунитет от предыдущих инфекций, вызванных вирусом H1N1, вероятно, защищал взрослых от инфекцирования и/или заболевания. При детальном серологическом анализе выявлено, что как HA, так и NA штаммов 1977 г. были сходны с HA и NA штаммов 1950 г. Характерно, что сыворотки хорьков оказались отличными объектами для применения в РТГА [30], а для доказательства гомологичности антигенных детерминант штаммов 1950 и 1977 гг. использовали моноклональные антитела [60]. Поэтому неудивительно, что имевшие место ранее контакты с антигенами H1N1 обеспечили защиту от этих вирусов, появившихся вновь в 1977 г.

Последующий биохимический и генетический анализ штаммов 1977 г. позволил получить дополнительные данные о сложном эпидемиологическом процессе гриппа. В то время было признано, что антигенный дрейф является следствием точечных мутаций и иммунной селекции и что любой принципиально новый подтип возникает в результате рекомбинации между вирусами человека и животных [41]. Поэтому совершенно неожиданными показались результаты олигонуклеотидного картирования РНК штаммов 1977 г.; было установлено, что все 8 генов практически идентичны генам ранее выделенных от людей вирусов [45]. Эти данные были подтверждены при использовании метода РНК-РНК-гибридизации [3, 54]. Они показали, что штаммы 1977 г. не являются рекомбинантами.

Последнее заключение было поставлено под сомнение Ю. Козловым и соавт. [34]. Основываясь на данных олигонуклеотидного картирования, эти авторы высказали предположение, что штаммы 1977 г. были рекомбинантами штаммов 1950 и 1947 гг. Так как использованный Ю. Козловым и соавт. метод олигонуклеотидного картирования не был достаточно чувствительным для диф-

ференцировки почти идентичных генов штаммов 1947 и 1950 гг., трудно принять указанный вывод этих авторов. Более того, данные Ю. Козлова и соавт. совпадают с материалами других лабораторий и показывают, что штаммы 1977 г. весьма сходны с ранними штаммами H1N1. Очевидно, что имеющиеся в настоящее время данные не позволяют с точностью идентифицировать вариант-предшественник, который дал начало штаммам 1977 г. Однако эти данные с несомненностью показывают, что штаммы, циркулировавшие около 1950 г. (плюс или минус несколько лет), были прямыми предшественниками этих штаммов.

Рассмотренные результаты также наводят на мысль, что старые вирусы гриппа, циркулировавшие ранее, могут быть «реактивированы» естественным путем или при случайном внедрении лабораторных штаммов. Каковы бы ни были точные обстоятельства повторного «выхода на арену» штаммов 1977 г., в настоящее время результатами биохимических исследований ясно показано, что изменения эпидемиологической характеристики гриппа, связанные с переходом от одного подтипа к другому, не обязательно обусловлены рекомбинацией между различными (человеческими и животными) штаммами вируса гриппа.

VI. Молекулярная эпидемиология гриппа у животных

Вирусы гриппа типа А были выделены от различных животных — свиней, лошадей, а также домашних и диких птиц. Эти штаммы вируса принадлежат к 13 подтипам по НА и 9 подтипам по NA; отмечено также множество различных комбинаций HA/NA [24]. В частности, расширенные исследования, проведенные в популяциях птиц, позволили выделить большое число птичьих штаммов. В настоящее время почти не осталось сомнений в том, что птицы представляют обширнейший естественный резервуар вирусов гриппа типа А. Продолжающиеся исследования обещают раскрыть роль этого животного резервуара в образовании новых штаммов, вызывающих заболевания у людей.

По существу для характеристики штаммов, циркулирующих среди животных, могут быть использованы те же методы, которые применяются при изучении вирусов гриппа человека. Особо следует отметить олигонуклеотидное картирование РНК [14], изучение последовательностей РНК и клонированных генов [1, 18], картирование пептидов, изучение белков и РНК в геле [23, 49], а также серологические методы [52, 55], которые успешно применяли для дифференцировки вирусов гриппа животных. Однако эти вирусы изучены в меньшей степени, чем штаммы, выделенные от людей. Это относится не только к сведениям о структуре вирусов, но также к эпидемиологическим особенностям животных штаммов, патогенезу и иммунному ответу инфицированных животных. Будущие исследования, несомненно, будут направлены на выяснение некоторых из этих вопросов. Представляется воз-

можным сравнить быстроту изменения штаммов у лошадей, свиней и птиц с таковой у штаммов от людей, а также определить факторы, влияющие на патогенность штаммов, выделенных от животных. Наконец, должны быть предприняты усилия для раскрытия механизмов, обуславливающих видовую специфичность хозяев для вирусов гриппа типа A_1 и для определения детерминант, определяющих взаимодействие вирусов гриппа животных и человека.

Общепринято, что ареал вирусов гриппа В и С в значительной степени ограничен человеческой популяцией. Однако имелись отдельные сообщения [29], подтверждающие наличие антител к вирусам гриппа типа В у различных животных — лошадей, свиней или собак. Частота выявленных иммунных ответов была невысокой и коррелировала с ограниченной частотой инфекций, вызванных вирусом гриппа В у животных. Подобно этому было обнаружено небольшое количество сывороток крупного рогатого скота, в которых имелись антитела против вируса гриппа типа С [29]. Большее значение, однако, имеет недавнее сообщение о выделении вирусов гриппа типа С от свиней в Китае [21]. Эти данные могут, действительно, указывать, что животные служат резервуаром для вирусов гриппа типа С. Необходимо проследить, приведет ли усовершенствование методов выделения к более частому обнаружению вирусов гриппа типа С у животных.

VII. Механизмы, влияющие на изменчивость полевых штаммов вирусов гриппа

Имеющаяся информация о генетических механизмах, имеющих значение в изменениях вирусов гриппа типов А, В и С, суммирована ниже. Эти данные основаны на работах многих лабораторий и включают результаты, полученные различными методами.

Механизмы, ответственные за генетическую изменчивость вирусов гриппа типа А, можно разделить на две группы:

I. Изменчивость в пределах одного подтипа
   1. Точечные мутации в генах, кодирующих как поверхностные, так и NS-белки.
   2. Короткие делеции/вставки в генах, кодирующих НА и NA.
   3. Пересортировка (перераспределение) генов, кодирующих NS-белки.

II. Изменчивость, ведущая к образованию новых типов
   1. Пересортировка генов, кодирующих поверхностные белки.
   2. Повторное появление ранее циркулировавших штаммов.

Изменчивость штаммов вируса гриппа типа В обусловлена двумя механизмами:

а) точечные мутации,

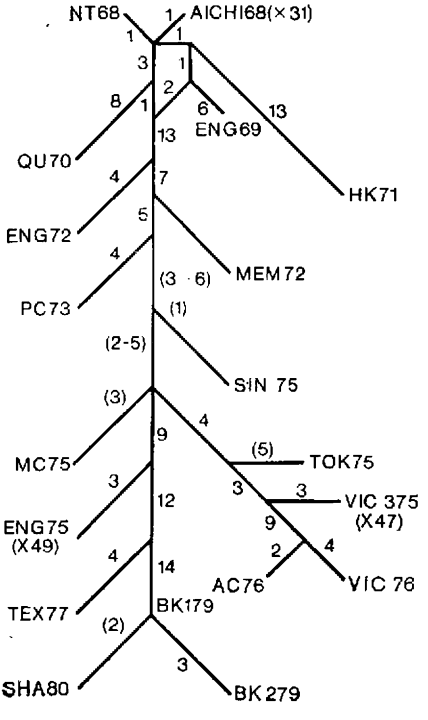
б) короткие делеции/вставки в генах НА.

Что касается механизмов изменчивости штаммов вируса гриппа типа С, то к настоящему времени достаточно достоверных данных пока еще не получено.

А. Точечные мутации

Изменения в генах НА вирусов гриппа типа А были изучены детально. К настоящему времени определена последовательность нуклеотидов в генах НА трех подтипов человеческих вирусов (Н1, Н2, Н3), а также двух птичьих штаммов. Были получены очень ценные данные о последовательностях оснований в НА полевых штаммов с антигенной формулой Н3 (см. главу 5). Эти результаты помогли выявить локализацию антигенных сайтов в трехмерной структуре НА и определить связанную с нарушением последовательности природу мутаций в НА доминирующих полевых штаммов [62, 63].

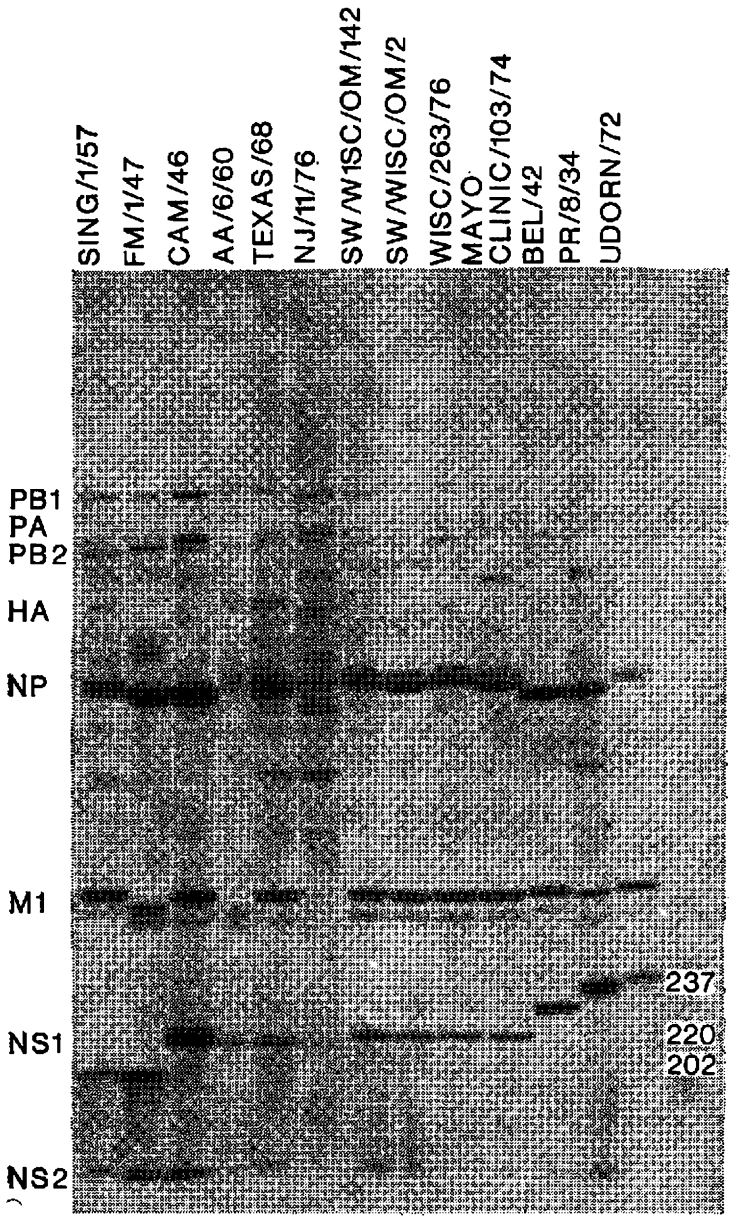
В отличие от вирусов гриппа для других вирусов (например, вирусы герпеса или риновирусы) нехарактерно наличие какого-то одного варианта, который преобладает определенное время; обычно одновременно циркулирует несколько вариантов. Хотя вирусы гриппа подвергаются последовательным изменениям, это не исключает возможности одновременного присутствия в популяции в любой момент нескольких вариантов. Однако течение нескольких лет появляется ряд поколений вируса, которые подтверждают, что доминирующий вариант возникает за счет последовательных изменений. Интенсивное изучение гемагглютининов Н3 с использованием методов определения последовательностей значительно обогатило наши знания относительно эволюции гемагглютининов вируса гриппа за период существования одного подтипа (рис. 45; см. главу 5) [5, 6].



45. Взаимная связь штаммов Н3, установленная по минимальным мутационным интервалам их участков, кодирующих НА1.

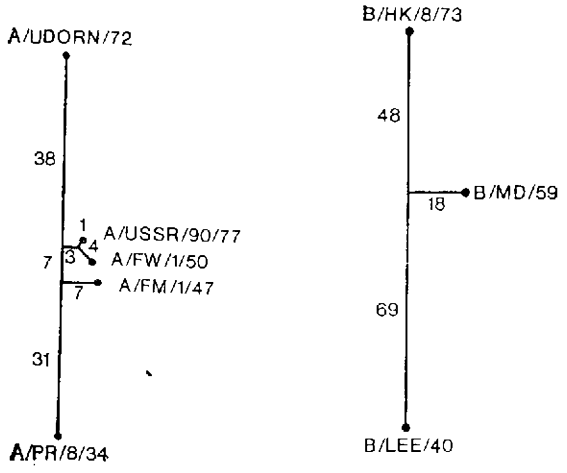
Цифры означают число оснований НА1, в которых имеются различия у разных штаммов; цифры в скобках получены на основании изучения частоты последовательностей [по Both, Sleigh, Cox и Kendall].

Докаазательство того, что. кроме НА, изменениям подвергаются и неповерхностные белки, может быть получено при апализе белков различных полевых вариантов в полиакриламидном геле с применением додецилсульфата натрия (рис. 46). Ясно, что в этой системе соответствующие белки обладают различной скоростью электро-



46. Сравнение белков вирусов гриппа, выращенных в инфицированных клетках MDCK.

Экстракты меченных ^{35}S-метионином клеток разделяли в градиенте 5—13% ПААГ, содержащего SDS [65]. Полипептиды, кодируемые различными вирусными генами, идентифицированы в левой части авторадиограммы. Цифры справа указывают изменяющееся число аминокислот в разных полипептидах NS1. Различное положение гомологичных полипептидов отражает различия как в размерах, так и во вторичной структуре [37].



47. «Эволюционное дерево», построенное на основе нуклеотидных различий между NS-генами.

Для анализа использовали пять штаммов вируса гриппа, выделенных в 1934, 1947, 1950, 1972 и 1977 гг. Сравнивали последовательности в цепочках, состоящих из 890 нуклеотидов NS-генов этих пяти штаммов. Цифры означают число различающихся нуклеотидов. Создается впечатление, что мутации в NS-генах последовательны, за исключением штамма A/СССР/90/77. (Это подтверждает ранее выявленное родство вируса A/СССР/90/70 со штаммами, циркулировавшими в 50-х годах.) Частота мутаций составляет приблизительно две мутации в год. Для анализа использовали последовательности целых генов, включающих около 880 нуклеотидов.

48. «Эволюционное дерево» вирусов гриппа типа В, построенное с учетом различий генов НА.

Цифры означают нуклеотидные различия генов НА трех вирусов — B/Lee/40, B/Md/59 и B/НК/8/73. Для анализа использовали последовательности целых генов, включающих приблизительно 1880 нуклеотидов.

форетической подвижности. Более точный анализ изменений может быть проведен при использовании методов рекомбинации ДНК. После клонирования и определения последовательностей был воссоздан ход эволюции («эволюционное дерево») для NS-генов некоторых полевых штаммов вирусов (рис. 47). Результаты показали, что NS-гены, подобно генам НА, также претерпевают эволюцию в процессе смены поколений. Частота изменений оснований в последовательностях у NS-генов составляет 2,2—3,4% за 10 лет, что может быть подсчитано на основании анализа последовательностей NS-генов у вирусов A/PR/8/34, A/FM/147, A/FM/1/50 и A/Udorn/72 [37]. Очевидно, такие данные являются лишь оценочными и не учитывают индивидуальных отклонений, неизбежных при таком анализе. Частоту изменений, которую наблюдали среди NS-генов, можно сравнить с частотой, рассчитанной для генов НА. Обнаружено, что частота изменений у генов НА была выше (4,5—6,5% за 10 лет), чем такой же показатель для NS-генов, хотя, вероятно, иммунный ответ на НА более выражен, чем на NS-белки, более высокая частота изменений в генах НА может быть результатом (по крайней мере, хотя бы частично) селекции хозяина. Согласно альтернативной точке зрения для

достоверного определения средней частоты изменений в РНК вируса гриппа необходимы дополнительные данные о последовательности оснований, включая такие сведения и о других генах. Результаты недавнего анализа последовательностей в НА трех вирусов гриппа типа В позволили изучить изменения у вирусов типа В [36]. Как это видно на примере НА вируса гриппа типа А, изменения возникали главным образом посредством последовательного накопления замены аминокислот в пределах участка НА1 молекулы НА (рис. 48). Однако изменения в гемагглютининах вирусов гриппа типа В (B/Lee/40, B/Md/59 и B/HK/8/73) происходят значительно медленнее, чем у гемагглютининов вирусов гриппа типа А. За 10 лет осуществляются изменения 2% аминокислот в НА1 вирусов гриппа типа В, хотя в НА1 вирусов гриппа типа А с антигенной формулой Н3 число таких изменений достигает 9,2% за тот же период [5]. Хотя недавно была определена последовательность оснований в НА1 вируса гриппа C/Cal/76 [Creager et al., неопубликованное сообщение], об изменчивости гемагглютининов вирусов гриппа типа С известно значительно меньше. Сравнение этих данных с аналогичными данными в отношении вируса C/Taylor/47 показало наличие точечных мутаций, однако для более детального анализа необходимо получить больше экспериментальных данных.

Б. Рекомбинация

Многие данные подтверждают, что штаммы новых подтипов вируса гриппа типа А возникают в результате рекомбинации (пересортировки) генов различных штаммов. Например, передача гемагглютинина Н3 от вируса животных к более ранним штаммам H2N2 посредством рекомбинации могла привести к созданию нового человеческого подтипа H3N2 [18, 40, 41, 53, 54]. Более того, весьма вероятно, что штаммы H2N2 возникли из штаммов H1N1 в результате рекомбинации, так как штаммы H2N2 содержат гены, кодирующие NS-белки, происходящие из вирусов H1N1 [53]. Среди птичьих штаммов рекомбинация также, вероятнее всего, играет ведущую роль в образовании новых вирусов [14, 23]. Практически не остается никаких сомнений, что подобные рекомбинации могут происходить и у вирусов, обитающих в организме других хозяев.

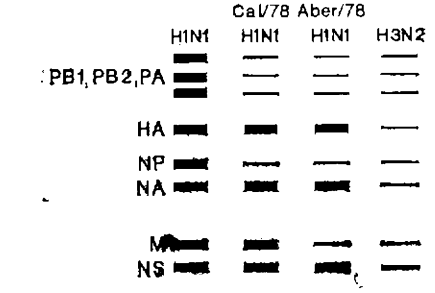
Помимо изменений генов поверхностных белков, приводящих к антигенному шифту (табл. 37), одновременно циркулирующие штаммы могут обмениваться генами, кодирующими NS-белки. В результате рекомбинанты (реассортанты) сохраняют подтип НА или NA одного из родителей. Например, олигонуклеотидное и пептидное картирование генов и их производных вируса A/Cal/10/78 (H1N1), выделенного в Лос-Анджелесе в декабре 1978 г., свидетельствует, что только гены НА, NA, M и NS этого вируса происходят от более ранних штаммов H1N1 и что 4 гена, кодирующих комплекс ядра (PB1, PB2, PA и NP), происходят от ви-

Таблица 37. *Гомологии последовательностей гемагглютининов различных вирусов гриппа*

Сравниваемые штаммы[1]	Сохранение аминокислот, %	
	HA1	HA2
H1 и H2	58	79
H1 и H3	35	53
H2 и H3	36	50
B и H1	24	39

[1] H1, A/PR/8/34; H2, A/Jap/305, 57; H3, A/Aichi/2/68 и B, B/Lee/40. Последовательности гемагглютининов вирусов H1, H2, H3 и B [20, 35, 58, 64].
[2] Гомологии рассчитаны как отношение числа гомологичных остатков к общему числу остатков. Общее число остатков составляет среднее арифметическое двух последовательностей. При сравнении не учитывали последовательности сигнальных пептидов.

руса H3N2. Обнаруженные факты несколько неожиданны, так как раньше полагали, что вирусы одного и того же подтипа весьма близки друг к другу и различаются только происшедшими точечными мутациями. Было обнаружено, что штаммы, подобные прототипному вирусу A/Cal/10/78, широко циркулируют во всем мире [3, 65]. Помимо рекомбинантного вируса A/Cal/10/78 (H1N1), были также идентифицированы штаммы H1N1, обладающие пятью генами от вирусов с антигенной формулой H3N2 и только генами HA, NA и NS от штаммов, подобных A/CCCP/90/77. Прототипным для рекомбинантов этого типа является штамм A/Aberdeen/V1340/78 (H1N1) (рис. 49). Обнаружение новых рекомбинантов с генотипами, отличными от таковых вируса A/Cal/10/78, подтверждает, что пересортировка может часто происходить между одновременно циркулирующими вирусами и что в дополнение к мутации пересортировка способствует генетическим изменениям и, вероятно, появлению биологических различий между вирусами гриппа человека, принадлежащими к одному и тому же подтипу. Так как одновременно циркулирующие штаммы генетически могут быть очень сходными, иногда трудно оценить наличие рекомбинации при совместной циркуляции эпидемических



49. Генные отклонения недавно выделенных вирусов A/Cal/10/78 и A/Aberdeen/V1340/78. Гены H1N1 вирусов, подобных штаммам A/CCCP/90/70, изображены жирными линиями; гены, сходные с таковыми штамма A/Tex/1/77 (H3N2), обозначены тонкими линиями. Штаммы A/Cal/78 и A/Aberdeen/78 наследуют соответственно 4 и 5 генов от родителей H3N2 [P. Joung, J. Palese, 1979, и неопубликованные данные].

штаммов. Несомненно, однако, что эти механизмы частично объясняют ускоренную селекцию эпидемически значимых вариантов вируса гриппа по сравнению с другими вирусами.

В. Делеции/вставки

Сравнение нуклеотидных последовательностей разных генов НА вирусов Н3 показало, что выравнивание инвариантных аминокислот требует делеции или вставки одного или большего числа триплетов. Например, НА вирусов A/Vic/3/75 в аминокислотной позиции 8 дополнительно содержали аспарагин, который отсутствует в НА любых других изученных к настоящему времени вирусов Н3 [58]. Неизвестно, меняет ли антигенную структуру молекулы появление вставки в НА вируса A/Vic/3/75, но вероятно, что в других случаях короткая делеция в НА индуцирует такие антигенные изменения. Гемагглютинин вируса B/HK/8/73 не имеет двух аминокислот (в позициях 158 и 159), которые имеются в НА некоторых других вирусов типа В. Поскольку структурный анализ показывает, что позиции аминокислот 158 и 159 входят в антигенную петлю НА, возможно, что такая делеция сопровождается антигенными изменениями молекулы [35, 36]. Таким образом, короткие делеции и вставки играют определенную роль в генетических изменениях родственных гемагглютининов.

При сравнении гемагглютининов штаммов различных типов или подтипов наблюдали более обширные делеции/вставки [25, 35]. Так как считают, что все гемагглютинины вирусов гриппа, включая вирусы типов В и С, происходят от общего предка, вставки или делеции нуклеотидов — распространенные явления, влияющие на эволюцию НА вирусов гриппа. В этом отношении следует отметить, что различия, наблюдаемые в НА вирусов гриппа, которые имеют ограниченный ареал распространения в клетках млекопитающих и птиц, так же значительны, как и различия в некоторых белках, обнаруживаемые у сильно отличающихся эукариотов. Например, при определении последовательности аминокислот в молекулах цитохрома С свыше 60 различных эукариотов только 27 позиций в цепи, состоящей приблизительно из 100 аминокислот, оказались полностью идентичными у всех видов [42]. При этом были изучены растения, дрожжи, амфибии, птицы и млекопитающие. Поэтому весьма примечательно, что такие же существенные эволюционные отклонения наблюдались в генах НА вирусов гриппа, выделенных только от людей.

Делеции/вставки наблюдались также в генах NA. Определение последовательности части аминокислотных остатков (первые 200—300 нуклеотидов конца 3′) различных N1-генов выявило участки изменений в этом регионе [4]; сравнение полных последовательностей генов N1 и N2 также позволило выявить делеции/вставки в процессе эволюции этих генов [19, 26, 43].

Пока не доказано, что делеции/вставки играют роль в изменениях генов NS-белков недавно выделенных вирусов гриппа ти-

па А. Однако в процессе эволюции вирусов гриппа типов А, В и С от их общего предка такая возможность вполне вероятна. Например, было показано, что соответствующие М- и NS-гены вирусов гриппа типов А и В содержат гомологичные последовательности, но различаются по своим размерам [7, 8, 15].

Г. Повторное появление старых генов

Другим интересным аспектом изменчивости генов вируса гриппа является возможность проявления антигенной цикличности. В сыворотках, полученных от пожилых лиц до пандемии 1968 г., вызванной вирусом H3N2, имелись антитела к H3-подобным антигенам, а музейные сыворотки от лиц, родившихся до 1887 г., давали перекрестные реакции со штаммами H2N2, выделенными после 1957 г. [12, 44]. Эти данные, подтвержденные повторным появлением в 1977 г. вирусов H1N1, могут свидетельствовать, что имеется лишь ограниченное число генов HA и NA вирусов гриппа, которые могут быть обнаружены у вирусов человека и с которыми связана изменчивость.

VIII. Перспективы на будущее

Вирусы гриппа составляют семейство вирусов, которое обладает уникальными эпидемиологическими особенностями в естественных условиях. Крупные исследования последних лет помогли выяснить структуру, размножение и эволюцию этих вирусов.

В настоящее время биохимические методы используются в качестве средств эпидемиологического анализа. Эти методы помогают раскрывать механизмы антигенных изменений в HA и NA вирусов, а также генетических изменений в генах, кодирующих другие белки вирусов гриппа. Методы молекулярной биологии также полезны в определении генетической структуры вирусов H1N1, которые вновь появились в 1977 г., и рекомбинантных (реассортантных) штаммов H1N1, циркулировавших в последующие годы. В последнем случае было показано, что пересортировка между одновременно циркулирующими человеческими штаммами может способствовать появлению генетических изменений. Анализ генных отклонений пандемических вирусов H2N2 и H3N2 показал, что некоторые гены вирусов гриппа сохранялись во всех человеческих штаммах, несмотря на приобретение ими новых генов посредством рекомбинации. Это может указывать на значение данных генов в детерминировании специфичности в отношении определенного хозяина. Хотя с помощью указанных методов вирусы гриппа изучены в значительной мере, необходимо постоянное взаимодействие эпидемиологов и специалистов по молекулярной биологии, чтобы полностью понять сложные процессы, происходящие в этих вирусах.

Список литературы

1. *Air G.* — P. N. A. S., 1981, v. 78, p. 7639—7643.
2. *Baine W., Luby J., Martin S.* — Am. J. Med., 1980, v. 68, p. 181—189.
3. *Bean W., Cox N., Kendal A.* — Nature, 1980, v. 284, p. 638—640.
4. *Blok J., Air G.* — Virology, 1982, v. 118, p. 229—234.
5. *Both G., Sleigh M.* — Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 2561—2575.
6. *Both G., Sleigh M.* — J. Virol., 1981, v. 39, p. 663—672.
7. *Briedis D., Lamb R.* — J. Virol., 1982, v. 42, p. 186—193.
8. *Briedis D., Lamb R., Choppin P.* — Virology, 1982, v. 116, p. 581—588.
9. *Chakraverty P.* — Bull. WHO, 1971, v. 45, p. 755—766.
10. *Chakraverty P.* — Arch. Virol., 1978, v. 58, p. 341—348.
11. *Corey L., Rubin R., Hattwick M. et al.* — Am. J. Med., 1976, v. 61, p. 615—625.
12. *Davenport F., Minuse E., Hennessy A., Francis T.* — Bull. WHO, 1969, v. 41, p. 453—460.
13. *Davenport F.* — In: Viral Infection of Humans. N. Y., 1976, p. 273—296.
14. *Desselberger U., Nakajima K., Alfino P. et al.* — P. N. A. S., 1978, v. 75, p. 3341—3345.
15. *Desselberger U, Palese P.* — Virology, 1978, v. 88, p. 394—399.
16. *Douglas R.* — In: The Influenza viruses and influenza. N. Y.: Academic Press, 1975, p. 395—447.
17. *Dykes A., Cherry J., Nolan C.* — Arch. Intern. Med., 1980, v. 140, p. 1295—1298.
18. *Fang R., Min Jou W., Huylebroeck D. et al.* — Cell, 1981, v. 25, p. 315—323.
19. *Fields S., Winter G., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 290, p. 213—217.
20. *Gething M., Bye J., Skehel J., Waterfield M.* — Nature, 1980, v. 287, p. 301—306.
21. *Guo Y., Jin F., Wang M. et al.* — Kexue Tongbao, 1982, v. 27, p. 1118—1121.
22. *Halsey N., Hurwitz E., Meiklejohn G. et al.* — In: Current chemotherapy and infectious diseases. Vol. 2. Washington, 1980, p. 1207.
23. *Hinshaw V., Bean W., Webster R., Sriram G.* — Virology, 1980, v. 102, p. 412—449.
24. *Hinshaw V., Webster R.* — In: Basic and applied influenza research. West Palm Beach: CRC Press, 1982, p. 79—104.
25. *Hiti A., Davič A., Nayak D.* — Virology, 1981, v. 111, p. 113—124.
26. *Hiti A., Nayak D.* — J. Virol., 1982, v. 41, p. 730—734.
27. *Homma M., Ohyama S., Katagiri S.* — Microbiol. Immunol., 1982, v. 26, p. 639—642.
28. *Joosting A., Head B., Byde N., Tyrrell D.* — Br. Med. J., 1968, v. 4, p. 153—154.
29. *Kawano J., Onta T., Kida H., Yanagawa R.* — Jap. J. Vet. Res., 1978, v. 26, p. 74—80.
30. *Kendal A., Noble G., Skehel J., Dowdle W.* — Virology, 1978, v. 89, p. 632—636.
31. *Kendal A., Joseph J., Kobajashi G. et al.* — Am. J. Epidemiol., 1979, v. 110, p. 449—461.
32. *Kilbourne E.* — J. Infect. Dis., 1973, v. 127, p. 478—487.
33. *Kilbourne E. (ed.)* — The influenza viruses and influenza. N. Y.: Academic Press, 1975.
34. *Kozlov J., Gorbulev V., Kurmanova A. et al. (Козлов Ю., Горбулев В., Курманова А. и соавт.)* — J. Gen. Virol., 1981, v. 56, p. 437—440.
35. *Krystal M., Elliott R., Benz E. et al.* — P. N. A. S., 1982, v. 79, p. 4800—4804.
36. *Krystal M., Young J., Palese P. et al.* — P. N. A. S., 1983, v. 80, p. 4527—4531.
37. *Krystal M., Buonagurio D., Young J., Palese P.* — J. Virol., 1983, v. 45, p. 547—554.

38. *Kung H., Jen K., Yuan W. et al.*—Bull. WHO, 1978. v. 56, p. 913—918.
39. *La Montagne J.* — J. Infect. Dis., 1980, v. 142, p. 452—465.
40. *Laver W.* — Virology, 1978, v. 86, p. 78—87.
41. *Laver W., Webster R.* — Virology, 1972, v. 48, p. 445—455.
42. *Lehninger A.* — Principles of Biochemistry. N. Y., 1982.
43. *Markoff L., Lai C.-J.* — Virology, 1982, v. 119, p. 288—297.
44. *Masurel N.* — Lancet. 1969, v. 1, p. 907—910.
45. *Nakajima K., Desselberger U., Palese P.* — Nature, 1978, v. 274, p. 334—339.
46. *Nerome K., Ishida M.* — J. Gen. Virol., 1978, v. 39, p. 179—181.
47. *Noble G.* — In: Basic and applied influenza research. West Palm Beach: CRC Press, 1982, p. 11—50.
48. *O'Callaghan R., Gohd R., Labat D.* — Infect. Immun., 1980, v. 30, p. 500—505.
49. *Palese P., Ritchey M.* — In: Proc. Int. Symp. Influenza Immunization II, Develop. Biol. Stand., 1977, v. 39, p. 411—415.
50. *Palese P., Joung J.* — Science, 1982, v. 215, p. 1468—1474.
51. *Schild G., Pereira M., Chakraverty P. et al.*—Br. Med. J., 1973, v. 4, p. 127—131.
52. *Schild G., Newman R., Webster R. et al.* — Arch. Virol., 1980, v. 63, p. 171—184.
53. *Scholtissek C., Rohde W., von Hoyningen V., Rott R.* — Virology, v. 87, p. 13—20.
54. *Scholtissek C., von Hoyningen V., Rott R.* — Virology, 1978, v. 89, p. 613—617.
55. *Shortridge K.* — Bull. WHO, 1982, v. 60, p. 129—135.
56. *Stuart-Harris G., Schild C.* — Ann. Intern. Med., 1982, v. 96, p. 153—158.
57. *Van Voris L., Belshe R., Shaffer .* — Ann. Intern. Med., 1982, v. 96, p. 153—158.
58. *Verhoeyen M., Fang R., Min Jou W. et al.* — Nature, 1980, v. 286, p. 771—776.
59. *Webster R., Laver W.* — In: The influenza viruses and influenza. N. Y.: Academic Press, 1975, p. 269—314.
60. *Webster R., Kendal A., Gerhard W.* — Virology, 1979, v. 96, p. 258—264.
61. *WHO* Scientific Activities. — Bull. WHO, 1981, v. 59, p. 846—847.
62. *Wiley D., Wilson I., Skehel J.* — Nature, 1981, v. 289, p. 373—378.
63. *Wilson I., Skehel J., Wiley D.* — Nature, 1981, v. 289, p. 366—373.
64. *Winter G., Fields S., Brownlee G.* — Nature, 1981, v. 292, p. 72—75.
65. *Young J., Palese P.* — P. N. A. S., 1979, v. 76, p. 6547—6551.
66. *Zhdanov V., Zakstalskaya L., Isachenko V. (Жданов В., Закстальская Л., Исаченко В.).* — Lancet, 1978, v. 1, p. 294—295.

Предметный указатель

А

Аминокислоты, секвенирование прямое 116
Антигенный дрейф гемагглютинина вируса гриппа А низших животных 140
— — в нейраминидазах вирусов гриппа А у низших животных 146
— шифт 147
Антигены вируса гриппа А 126
— — — — свойства физические 126
— — — — — химические 126

Б

Белок (белки) вирусные, картирование пептидное триптическое 114
— — миграция, скорость 114
— — родство генетическое 114
— внутриклеточный негликозилированный 179
— матриксный, вариация 153
— мембранный, гены 111
— неструктурные, вариации 154
— — ген 113
— NS1, экспрессия 166
— полимеразы, вариации 154
— — структура 252
— Р, гены 110
— РВ1, РВ2, структура вторичная 255
— — — — первичная 253

В

Вариация в белках матриксных 153
— — — неструктурных 154
— — — полимеразы 154
— — нуклеопротеиде 152
Вирион гриппа, структура 33
Вирус(ы), вирулентность, выявление, роль вирусной генетики 20
— гриппа А 23
— — — антигены, свойства физические 126
— — — — — химические 126
— — — и связанные с ними заболевания 313
— — — подтип НА 125
— — — — NA 125
— — — структура 127
— — В 23, 272
— — — белки 274
— — — — гемагглютинин 276
— — — — матричный 279
— — — — нейраминидаза 277
— — — — неструктурные 281
— — — — Р 281
— — — изменчивость антигенная 283
— — — РНК, разновидность 272
— — — эпидемиология 282
— — С 23, 285
— — — репликация 290
— — — структура 285
— — — — вирионы, гемолизактивность 289
— — — — — морфология 285
— — — — полипептиды вирусные 287
— — — — РНК, разновидность 286
— — — — фермент, разрушающий рецептор 289
— — — эпидемиология 291
— — варианты антигенные, отбор секвенированием 138
— — вирулентность для крыс 304
— — — — мышей 305
— — — — цыплят 301
— — — — человека 308
— — гемагглютинин, свойства 43
— — генетика, изучение, использование условных летальных мутантов 16
— — — — маркеры генетические 14
— — — — методы бляшек 15
— — — — — молекулярной биологии 19

— — — применение практическое 24
— — — развитие 11
— — — современная 12
— — геном, картирование, методы биологические 18
— — — — — — физико-химические 18
— — гены клонированные, экспрессия 161
— — экспрессия в клетках эукариотов 166
— — ДНК, клонирование, схема 40
— — — конструирование, схема 40
— — изменчивость минорная 23
— — изучение, методы генетические традиционные 13
— — картирование внутригенное 20
— — нейровирулентность для мышей 303
— — новые, связь с эпидемиологией гриппа 22
— — номенклатура 124
— — мутанты 186
— — репликация 66
— — РНК 31
— — — сегменты 31, 42
— — — — кодирование гемагглютинина 44
— — — — — — полипептидов 43
— — вРНК, репликация 92
— — — синтез транскриптов во всю длину 91
— — мРНК, синтез 67
— — — — метилирование внутренних А-остатков 84
— — — — регуляция в инфицированной клетке 78
— — — — сайт клеточный 80
— — — — сплайсирование 84
— — родство генетическое 98
— — свойства 17
— — структура 31
— — транскрипция 66
— — эволюция 21
— — эпидемиология 21
— — — молекулярная 313
— патогенность, выявление, роль вирусной генетики 20
— H1N1, появившиеся в 1977 г. 317
Вирусная генетика, выявление вирулентности вирусов 20
— — — патогенности вирусов 20
Вирусное потомство, определение нечеткое, биохимическая идентификация генных продуктов 17
Вирусные РНК, картирование олигонуклеотидное 19
— частицы дефектные интерферирующие 249
— — — — свойства 249
— — — — содержание РНК 250

Г

Гемагглютинин 128
— антигенный дрейф 132
— — — анализ, роль моноклональных антител 133
— вируса гриппа, свойства 43
— — — А дрейф антигенный у низших животных 140
— выделение 129
— ген 108
— превращение в секретированный белок 180
— свойства антигенные 129
— — — изменение при низком pH 131
— синтез 47
— — модификации котрансляционные 47
— — — посттрансляционные 47
— структура, изменение при низком pH 131
— — расположение антигенных сайтов 136
— экспрессия в клетках обезьян 166
— — из рекомбинантных векторов, анализ 172
— — — — — оценка количественная 174
Ген(ы) белка мембранного 111
— — неструктурного 113
— — P 110
— гемагглютинина 108
— клонированные вируса гриппа, экспрессия 161
— матриксный, экспрессия в клетках обезьян с использованием рекомбинантного вируса 176
— нуклеопротеида 111
— полимеразы, структура 252
— функции, определение 36
Генетика вируса гриппа, взаимосвязь с эпидемиологией вируса гриппа 21
— — — изменчивость, данные лабораторные 12
— — — изучение, маркеры 14
— — — — методы 13
— — — применение практическое 24
— — — с раздробленным геномом 25
Генетическое перераспределение в природе, роль в эволюции новых вирусов 22
Геном(ы) рекомбинантные, введение в клетки обезьян 170
— — конструирование 168
— сегменты 34
— структура 33
Гибридизация РНК — РНК конкурентная 101
— — прямая 98

— — техника 102
Грипп А, антигены вирусов, свойства физические 126
— — — — — химические 126
— — вирусы 23
— — — вариации антигенные 123
— — — изменчивость генетическая 12
— — — подтип НА 125
— — — — NA 125
— В, вирусы 23
— — — изменчивость антигенная 283
— — — эпидемиология 282
— С, вирусы 23
— — — репликация 290
— — — структура 285
— — — эпидемиология 291
— вирусы, генетика, применение практическое 24
— — — развитие 11
— — — современная 11
— — гены клонированные, экспрессия 161
— — ДНК, клонирование, схема 40
— — — конструирование, схема 40
— изменчивость минорная 23
— — изучение, методы генетические традиционные 13
— — мутанты 186
— — РНК 31
— — — родство генетическое 96
— — — сегменты 34
— — — — кодирование гемагглютинина 44
— — — — — полипептидов 43
— — вРНК, репликация 92
— — — синтез транскрипта во всю длину 84
— — мРНК, синтез, метилирование внутренних А-остатков 84, 88
— — — — регуляция в инфицированной клетке 78
— — — — сайт клеточный 80
— — — — сплайсирование 84
— — с раздробленным геномом, генетика специальная 25
— — репликация 66
— — структура 31
— — транскрипция 66
— — эволюция 21
— — эпидемиология 21
— проблемы нерешенные 26
— столетия XX 314
— у животных, эпидемиология молекулярная 318

Д

Дидезокси-метод 105
ДНК вируса гриппа, клонирование, схема 40
— — — конструирование, схема 40
Дрейф антигенный гемагглютинина 140
— — нейраминидазы 146
— — — механизм 147

И

Изменчивость генетическая, данные лабораторные 12
Инфекция гриппозная, патогенез, различия, зависящие от вируса 296

К

Картирование внутригенное, роль секвенированная 20
— генома вируса гриппа, методы биологические 18
— — — — — физико-химические 18
— олигонуклеотидное вирусных РНК 19

М

Маркеры генетические вирусов гриппа 14
Методы бляшек для изучения вирусов гриппа 15
— генетические традиционные 13
Мутанты вирусные 186
— — взаимодействие генетическое 194
— — из Бетесды 199
— — — Гессена 198
— — — Кембриджа 197
— — — Москвы 199
— — — Нью-Йорка 198
— — — Токио 198
— — индукция 190
— — классификация 194
— — круга хозяев 235
— — — — неусловные 235
— — — — условные 237
— — реверсия 191
— — текучесть 191
— — с повреждениями в сегменте 1 РНК 202
— — — — 2 РНК 214
— — — — 3 РНК 219
— — — — 4 РНК 223
— — — — 7 РНК 228
— — — — 8 РНК 230
— — — — РНК, кодирующем нейраминидазу 227
— — — — — — нуклеопротеид 224
— — температурочувствительные 194
— — — анализ фенотипический 201
— — — получение вакцин 232

— — устойчивые к амантадину 238
— — характеристика 187
— — — мутанты, индукция 190
— — — мутация естественная, скорость 189
— — — природа вирусной популяции 188
— — — системы вирус гриппа — клетка 188
— — холодоадаптированные 233
— условные летальные, использование 16
Мутация естественная, скорость 189

Н

Нейраминидаза 141
— варианты, селекция с моноклональными антителами 144
— вариации антигенные 143
— вирусов гриппа А низших животных, антигенный дрейф 147, 148
— свойства 49
— структура 49
Нуклеокапсидный белок, структура 48
Нуклеопротеид 152
— вариация 152
— ген 111
— генов полимеразы, последовательность 252

П

Полипептид NA, схема 50
Последовательность сегментов РНК вирусов гриппа нуклеотидная 39
Праймирование 67, 69
— клеточными кэппированными РНК 69
— — — — роль вирусных белков Р 72
Продукты генные, идентификация биохимическая 17

Р

Реакция праймирования 69
РНК вируса гриппа 31
— — — родство генетическое 96
— дефектные интерферирующие, генерирование из прогениторных РНК 261
— — — классы 258
— — — структура 258
— клеточные кэппированные, праймирование 67
— — — — механизм 69
РНК-полимераза 11, 67
РНК, расщепление, метод фингерпринта олигонуклеотидного 103
— сегменты 34, 42
— — кодирование гемагглютинина 44
— — — полипептидов 43
— — миграция, скорость 96
— — полные, секвенирование 107
— — последовательность нуклеотидная 39
— — секвенирование 105
— — — дидсокси-метод 105
— — 1, 42
— — — — 2, 42
— — — — 3, 42
— — — — 4, 43, 44
— — 5, 48
— — 6, 49
— — 7, 52
— — — синтез белков 52
— — — структура 52
— — синтез белков 55
— — — структура 55
вРНК, репликация 92
— синтез транскрипта во всю длину 92
мРНК синтез, метилирование внутренних А-остатков 84, 88
— — регуляция в инфицированной клетке 78
— — сайт клеточный 80
— — сплайсирование 84

С

Сайт клеточный 80
Секвенирование прямое 116
— сегментов РНК 105
Сигнал-минус гемагглютинина 179
Сплайсирование 84
Структура вируса гриппа 31

Ф

Фингерпринт олигонуклеотидный 103

Ч

Частицы вирусные дефектные интерферирующие, транскрипция 266

Ш

Шифт антигенный, механизмы возможные 150
— — среди вирусов гриппа животных 151, 152
Штаммы полевые, изменчивость 319

Э

Экспрессия белков мутанта гемагглютинина, анализ 179
— — NS 166
— гемагглютинина 163
— — непрерывная 177
— гена (ов) вируса гриппа в E. coli 162
— — — — — клетках эукариотов 166
— — клонированных 161
— — — кратковременная в клетках COS-1 176
— — матриксного в клетках обезьян 176
Эпидемиология гриппа, связь с эволюцией новых вирусов 22

К сведению читателей!

ИЗ ПЛАНА ВЫПУСКА ЛИТЕРАТУРЫ ИЗДАТЕЛЬСТВА «МЕДИЦИНА» НА 1986 ГОД:

Жданов В. М., Ананьев В. А., Стаханова В. М. Вирусные гепатиты/АМН СССР. — М.: Медицина, 1986. — 15 л., ил. — В пер.: 2 р. 20 к.

В. М. Жданов — акад. АМН СССР, дир. Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР; **В. А. Ананьев и В. М. Стаханова** — профессора, руководители лабораторий того же института.

Монография посвящена анализу современных данных об этиологии вирусных гепатитов, свойствах вирусов. Рассмотрены методы диагностики — выявление антигенов и антител в различной стадии болезни и реконвалесценции, а также особенности эпидемиологии. Освещены проблемы профилактики и в первую очередь вакцинопрофилактики, клиника и лечение.

Для вирусологов, инфекционистов, терапевтов.

Книги издательства «Медицина» поступают в продажу в специализированные книжные магазины и магазины, где имеются отделы медицинской литературы.

Издательство «Медицина» распространением литературы не занимается.