

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Н.А. Новикова

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСОВ С КЛЕТКОЙ

Учебное пособие

Рекомендовано Ученым советом Института биологии и биомедицины
для студентов ННГУ, обучающихся по направлению подготовки
06.04.01 «Биология».

Нижний Новгород

2015

УДК 578.7
ББК 52.64
Б 90

Б 90 Новикова Н.А. Молекулярные аспекты взаимодействия вирусов с клеткой: Учебное пособие. – Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского. 2015. – 87 с.

Рецензенты:

Конторщикова К.Н., д.б.н., профессор
Веселов А.П., д.б.н., профессор

В учебном пособии изложены современные знания о взаимодействии вирусов с клетками на молекулярном уровне, о структурной и молекулярной организации геномов вирусов, способах реализации заложенной генетической информации и молекулярных механизмах влияния вирусов на клетку-хозяина.

Пособие адресовано магистрам и аспирантам биологических факультетов университетов, углубленно изучающих вирусологию, а также преподавателям биологических факультетов университетов и всем научным сотрудникам, работающим в области вирусологии и в смежных областях.

Ответственный за выпуск: председатель методической комиссии биологического факультета ННГУ, д.б.н., профессор И.М. Швец

УДК 578.7
ББК 52.64

© Н.А. Новикова
© Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

Оглавление

Список сокращений.....	5
Введение.....	6
Глава 1.....	7
Краткая характеристика универсального жизненного цикла вирусов.....	7
1.1 Проникновение/раздевание генома вирусов.....	7
1.2 Внутриклеточные стадии репродукции.....	13
Глава 2.....	17
Общая характеристика геномов вирусов.....	17
2.1 Химическая природа нуклеиновых кислот вирусов.....	17
2.2 Отличия геномов вирусов от геномов организмов.....	18
2.3 Изменчивость геномов вирусов.....	22
2.4 Генетические взаимодействия между вирусами.....	24
Глава 3.....	26
Принципы реализации генетической информации вирусов.....	26
3.1 Генетические стратегии ДНК-содержащих вирусов.....	26
3.1.1 Экспрессия генов ДНК-содержащих вирусов.....	26
3.1.2 Репликация ДНК-геномов вирусов.....	29
3.1.2.1 Виды ДНК-геномов вирусов.....	29
3.1.2.2 Общие принципы репликации.....	30
3.1.2.3 Репликация геномов днДНК-содержащих вирусов.....	33
3.1.2.4 Репликация геномов онДНК-содержащих вирусов.....	39
3.2 Генетические стратегии РНК-геномных вирусов, не требующих обратной транскрипции (рибовирусов).....	43
3.2.1 Виды РНК-геномов вирусов.....	43
3.2.2 Экспрессия генов РНК-содержащих вирусов.....	46
3.2.3 Репликация РНК-геномов вирусов.....	48
3.2.3.1 Общие принципы репликации РНК-геномов.....	48
3.2.3.2 Репликация днРНК-геномов вирусов.....	49
3.2.3.3 Репликация (+)РНК-геномов вирусов.....	51
3.2.3.4 Репликация (-)РНК-геномов вирусов.....	56
3.3 Генетические стратегии ретровирусов.....	64
3.3.1 Особенности репликации/транскрипции РНК-ОТ вирусов.....	65
3.3.1.1 Ретровирусы.....	65

3.3.1.2 Ретротраспозоны.....	70
3.3.2 Особенности репликации/транскрипции параретровирусов.....	71
Глава 4	77
Взаимоотношения вируса и клетки	77
4.1 Воздействие вируса на клетку хозяина	77
4.2 Противовирусный ответ хозяина.....	86
Литература	87

Список сокращений

а.о. – аминокислотные остатки
АТФ – аденозинтрифосфат
ГТФ – гуанозинтрифосфат
ВЧ – вирусная частица
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
дн (\pm) – двунитевая (ДНК, РНК)
кДа – килодальтон
кДНК – ДНК, комплементарная РНК
м.м. – молекулярная масса
НТР – нетранслируемый регион
н.о. – нуклеотидные остатки
он – однонитевая (ДНК, РНК)
ОРС – открытая рамка считывания
ОТ-ПЦР – обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
(+)РНК – РНК позитивной полярности
(-)РНК – РНК негативной полярности
(+,-)РНК – амбисенс (обоюдозначающая) РНК
рРНК – рибосомальная РНК
РФ – репликативная форма
РНП – рибонуклеопротеид
т.н. – тысяча нуклеотидов
т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов
тРНК – транспортная РНК
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
cis-acting – регуляторная последовательность нуклеотидов, выполняющая роль минимального промотора
DdDp – ДНК-зависимая ДНК-полимераза
kb – килобаза (1 тысяча пар нуклеотидов)
RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза

Введение

Вирусология, как наука о вирусах, традиционно разделена на общую и частную. Начиная с 60-х годов XX века при стремительном развитии методов молекулярной биологии, в рамках общей вирусологии начинает формироваться один из важнейших ее разделов – молекулярная вирусология. На современном этапе молекулярная вирусология изучает структуру и функции вирусных нуклеиновых кислот, механизмы экспрессии вирусных генов, природу устойчивости организмов к вирусным заболеваниям, молекулярную эволюцию вирусов. С одной стороны молекулярная вирусология, изучая вирусы на молекулярном и субмолекулярном уровнях, является разделом вирусологии, с другой стороны это составная часть молекулярной биологии.

Вирусы (от латинского слова *vīrus* – яд) – субмикроскопические надмолекулярные создания природы, являются своеобразной неклеточной формой жизни, способной воспроизводиться только в клетке. С точки зрения паразитологии вирусы – внутриклеточные генетические паразиты; с точки зрения биохимии – белково-нуклеиновые комплексы; с точки зрения молекулярной генетики – мобильные генетические элементы. За открытие генетической природы вирусов в 1969 г. М. Дельбрюку, А. Херши и С. Лурия (Max Delbrück, Alfred D. Hershey, Salvador E. Luria) была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины.

При проникновении вируса в клетку происходит столкновение генетических программ вируса и его хозяина (клетки). Знание деталей такого взаимодействия не только обогащает наше понимание биосферы вообще и отношений вируса с хозяином в частности, но также создает возможности для разработки противовирусных препаратов, для использования вирусов в качестве векторов экспрессии и создания живых ослабленных вакцин. Поскольку окружающая среда, в которой вирусы реплицируются и развиваются, определяется в значительной степени их хозяевами, понимание вирусной репликации также освещает биологию хозяина на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях.

В основу учебного пособия положен материал спецкурса «Молекулярная вирусология», который читается на биологическом факультете Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского с 2001 года и является продолжением курсов «Вирусология» и «Основы вирусологии». Освоение материала настоящего учебного пособия требует знаний в области основ вирусологии, биохимии, молекулярной генетики, молекулярной биологии, иммунологии и цитологии.

Глава 1

Краткая характеристика универсального жизненного цикла вирусов

1.1 Проникновение/раздевание генома вирусов

Нигде в природе нет других таких паразитарных отношений, которые наблюдаются между вирусом и клеткой-хозяином. Вирусы используют клетку для своего воспроизводства, эксплуатируя следующие клеточные молекулярные системы:

- системы ферментов, синтезирующие аминокислоты, нуклеотиды, углеводы и липиды;
- системы ферментов энергетического обмена, в частности, использующие в качестве источника АТФ;
- рибосомы, тРНК и ферменты, используемые в синтезе белка;
- мембраны, которые концентрируют клеточные макромолекулы, малые молекулы и ионы.

Независимо от того, являются ли вирусы вирусами прокариот, архей или эукариот они имеют общую схему жизненного цикла (рис. 1, 2). Вирус, найдя восприимчивую клетку, независимо от вида хозяина, реализует следующие стадии (этапы) жизненного цикла:

- специфическая адсорбция вирусной частицы на клеточной поверхности;
- проникновение/раздевание генома;
- экспрессия (ранняя и поздняя) генов: транскрипция и трансляция;
- репликация вирусного генома;
- сборка вирусных частиц;
- выход вирусного потомства из клетки.

Специфическая адсорбция вириона на клеточной поверхности.

Специфическое сродство вирусов к клеткам и тканям определяется присутствием на клеточной поверхности мембранных молекул, называемых *рецепторами* и способных связываться с вирусными поверхностными образованиями, называемыми *антирецепторами*.

Вирусные антирецепторы – это разные молекулы и надмолекулярные образования. По своей природе это белки (в основном гликопротеины), их также называют прикрепительными белками. Часто (но не всегда), прикрепительные белки образуют выступы на поверхности вириона (шпы, фибриллы, пепломеры), однако собственно антирецептор (функциональная часть молекулы прикрепительного белка), как правило, экранирован от

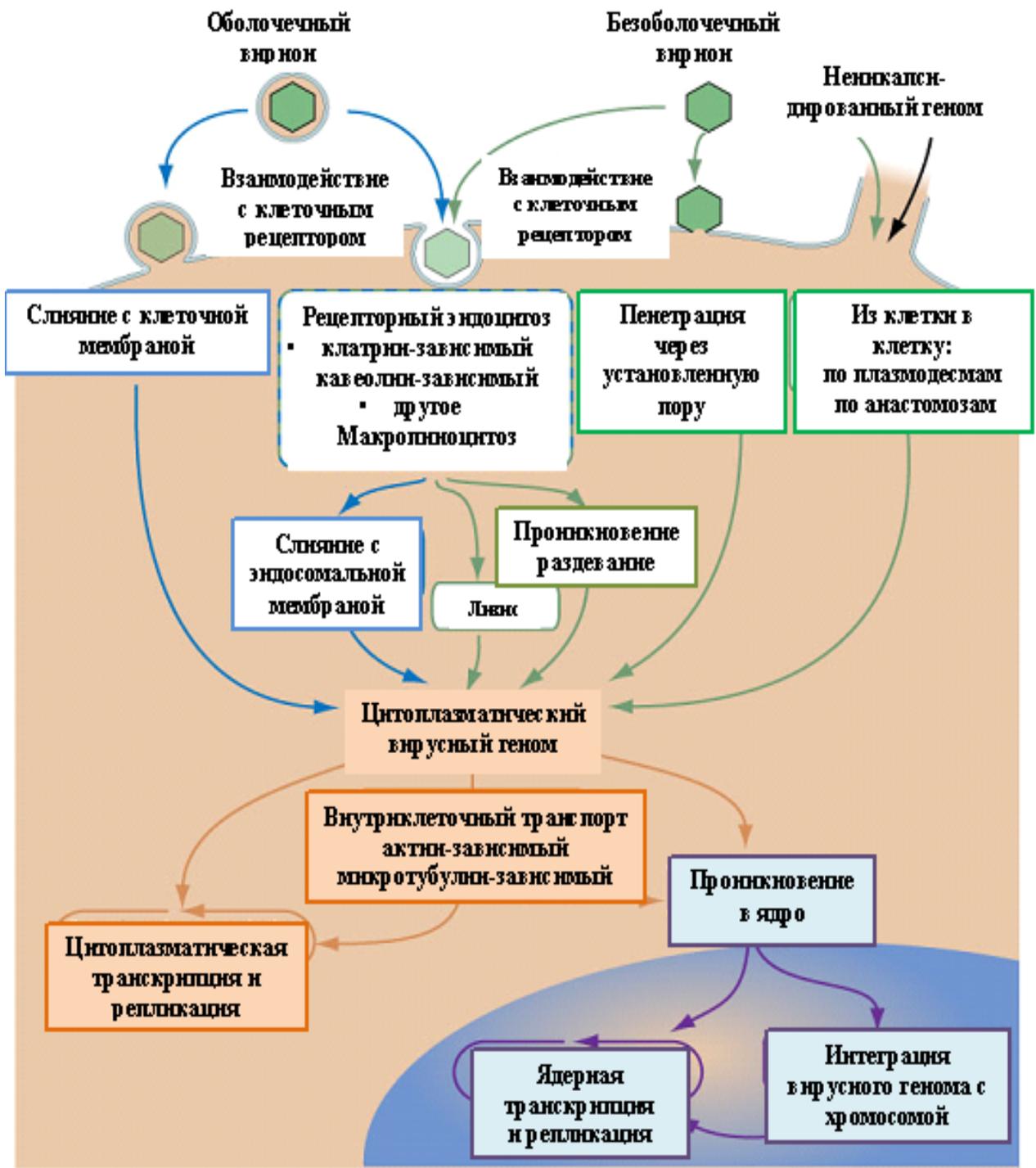


Рис. 1. Жизненный цикл вирусов эукариот [по <http://www.expasy.org/viralzone>]

Вирусы эукариот по месту репликации разделяют на ядерные и цитоплазматические, в связи с этим ядерные вирусы раздеваются в два этапа, транспортируя свои геномы в ядро, где и протекают внутриклеточные стадии.

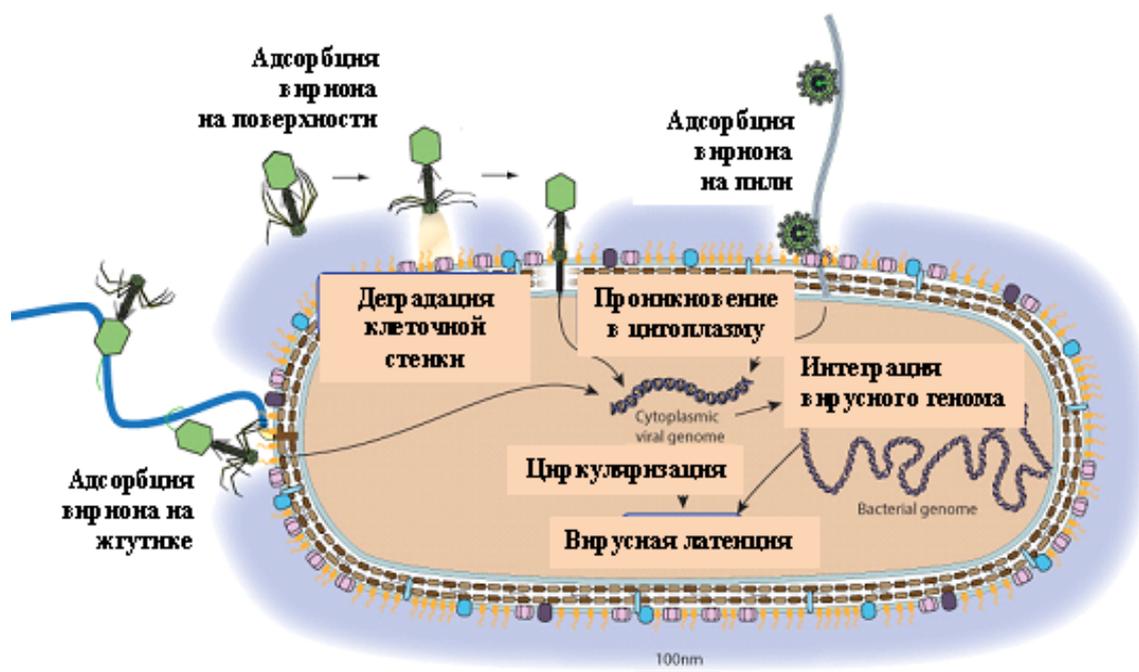


Рис. 2. Жизненный цикл вирусов прокариот
[по <http://www.expasy.org/viralzone>]

случайных взаимодействий и находится в углублении поверхностной структуры. Примерами прикрепительных белков вирусов человека и животных, выступающих над поверхностью вириона, являются гемагглютинин вируса гриппа и белок фимбрий аденовирусов. Специфическими прикрепительными структурами бактериофагов являются фибриллы. У энтеровирусов антирецепторы находятся на дне каньонов – углублений на поверхности капсида.

Часто для выполнения прикрепительной функции и функции слияния мембран вирусные поверхностные белки должны быть протеолитически активированы. В результате «раскола» белковой молекулы на ее поверхности экспонируются гидрофобные аминокислоты, которые облегчают ее внедрение в липидный бислой клеточной мембраны. Примерами белков, подверженных протеолитической активации, являются гемагглютинин вирусов гриппа, белок шипа (VP4) ротавируса, F белок парамиксовирусов и др.

Эволюция не создала для вирусов особых клеточных мембранных структур, обеспечивающих проникновение вирусов в клетку. Вирусы используют в качестве *клеточных рецепторов* уже существующие молекулы. Так, для вирусов бактерий рецепторами могут служить белки клеточной стенки (муреин, квазин), белки наружной мембраны (Omp, порин), липотеины цитоплазматической мембраны (липотейхоевая кислота), белки наружных структур (пилин пилей, флагеллин жгутиков), белки, обеспечивающие транспорт в клетку мальтозы, нуклеозидов и др.

Вирусы позвоночных животных используют в качестве клеточных рецепторов мембранные молекулы и механизмы, существующие для проникновения в клетку жизненно-важных факторов – питательных веществ, факторов роста, гормонов и т.д. Химическая природа клеточных рецепторов многообразна и до конца не изучена. Для разных вирусов это разные мембранные молекулы (рис. 3).

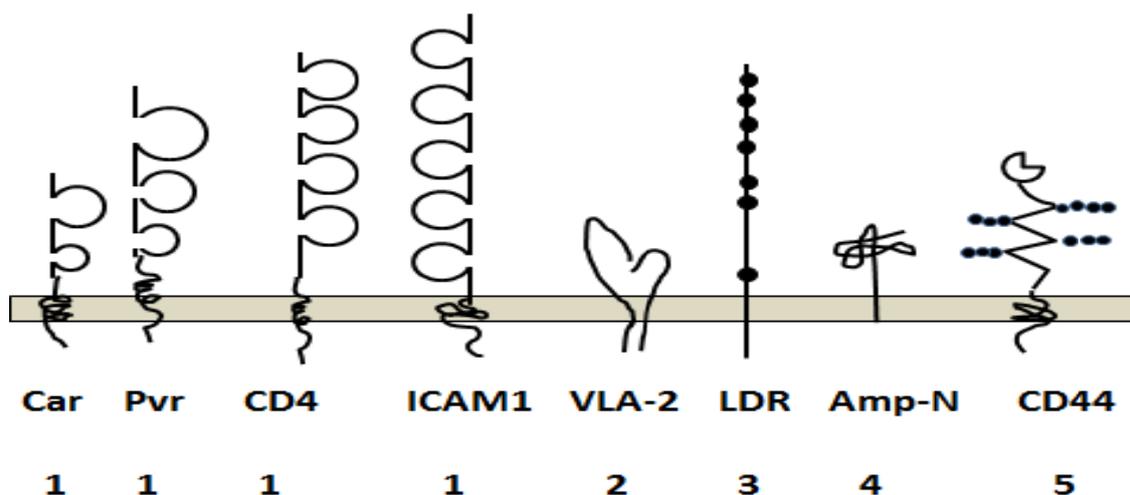


Рис. 3. Схематическое изображение клеточных белков с функцией вирусного рецептора (по А.Ж. Cann, 2012).

1 – суперсемейство иммуноглобулинов: Car – рецептор для вирусов Коксаки и аденовирусов, Pvr (молекула CD155) – рецептор для полиовирусов, CD4 – рецептор для ВИЧ, ICAM1 – рецептор для риновирусов; 2 – суперсемейство интегринов: VLA-2 – рецептор для вирусов ECHO; 3 – липопротеиноподобный рецептор LDR для риновирусов; 4 – аминокпептидаза N – коронавирусы; 5 – ганглиозиды (сиаловая кислота в составе гликопротеина): рецепторы для вирусов гриппа, реовирусов.

Так, для ряда вирусов человека и животных рецепторами являются мембранные молекулы интегринового суперсемейства. Для вирусов Коксаки А (*Picornaviridae, Enterovirus*) – $\alpha_v\beta_3$ интегрин, для вирусов Коксаки В – $\alpha_2\beta_3$ интегрин, для ротавирусов (*Reoviridae, Rotavirus*) – $\alpha_2\beta_1$ интегрин.

Для других вирусов рецепторами являются молекулы иммуноглобулинового суперсемейства. Так, основным рецептором для ВИЧ (*Retroviridae, Lentivirus*) является молекула CD4, для риновирусов (*Picornaviridae, Enterovirus*) – молекула адгезии ICAM-1, для вируса гепатита С (*Flaviviridae, Hepacivirus*) – молекула CD81. Рецепторами для вирусов парагриппа (*Paramyxoviridae*) и вируса бешенства (*Rabdoviridae*) являются ганглиозиды GT1b, GQ1b (гликопротеины, содержащие сиаловую кислоту).

Установлено, что в проникновении вируса в клетку могут принимать участие не одна, а несколько разных мембранных молекул, относящихся к

различным суперсемействам. Так, в проникновении в клетку аденовируса (*Adenoviridae, Mastadenovirus*) принимают участие белки двух суперсемейств – иммуноглобулинового и интегринового. Дистальный конец фибры взаимодействует с белком суперсемейства иммуноглобулинов (CAR), основание фибры (пентон) – с интегринными (рис. 4). Количество рецепторов, участвующих в проникновении в клетку вирусов герпеса достигает десяти. ВИЧ, кроме молекулы CD4, использует для проникновения в качестве корецептора молекулу CCR5 (рецептор для ряда хемокинов).

Одни и те же рецепторы могут принимать участие в проникновении разных вирусов. Так, мембранный белок иммуноглобулинового суперсемейства CAR используют аденовирусы и вирусы Коксаки А. Полиовирусы (*Picornaviridae, Enterovirus*) и вирусы герпеса (*Herpesviridae*) имеют один и тот же рецептор на клетках ЦНС, что определяет их нейротропность (молекула суперсемейства иммуноглобулинов CD155).

Рецепторы распределены в мембране клетки диффузно. Подвижность (текучесть) белково-липидного слоя мембраны определяет возможность концентрации рецепторов в ограниченном участке. Такая концентрация способствует образованию мультивалентных связей между рецептором и антирецептором, которые необходимы для необратимой адсорбции вируса, которая является пусковым механизмом для следующего этапа взаимодействия вируса с клеткой.

Проникновение/раздевание. Проникновение вирусного генома в клетку обычно происходит очень быстро после специфического прикрепления вириона к рецептору на клеточной мембране. В отличие от адсорбции, это процесс энергозависимый и, чтобы проникновение произошло, клетка должна быть метаболически активной.

Вирусы бактерий доставляют свой геном в цитоплазму с использованием различных способов – конформационной перестройки капсида, лизиса пептидогликана клеточной стенки, шприцевого механизма. Вирусы растений попадают в клетку в процессе раневой инфекции. Проникновение

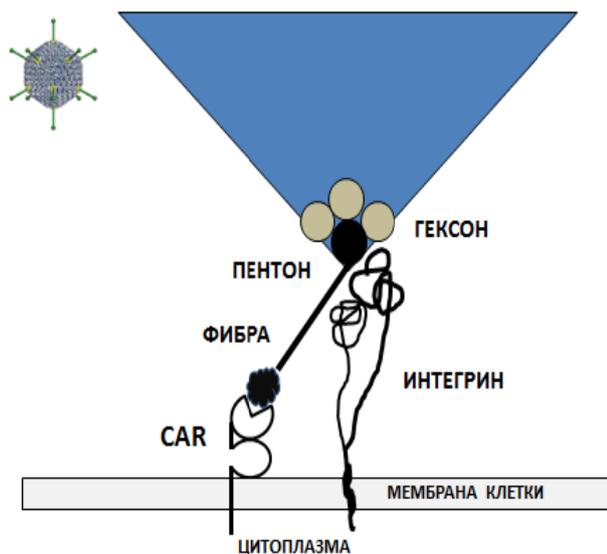


Рис. 4. Адсорбция аденовириона на клеточной поверхности.

вирусного генома в клетку вирусов позвоночных животных может быть реализовано с использованием трех главных механизмов:

1. Прямая пенетрация генома через установленную пору за счет конформационной перестройки белков капсида в результате взаимодействия с рецептором. Применим для безоболочечных вирусов.

2. Слияние мембраны вирусного суперкапсида с клеточной мембраной или непосредственно на поверхности клетки или после эндоцитоза в цитоплазматической везикуле. Процесс требует присутствия в вирусной оболочке определенного белка слияния, способного к конформационной перестройке (например, гемагглютинин вируса гриппа или трансмембранные гликопротеины ретровирусов). Существует два типа управляемого вирусом слияния мембран – рН-зависимое и рН-независимое слияние. Применим только к оболочечным вирусам.

3. Эндоцитоз – наиболее распространенный и универсальный механизм проникновения вирусов в клетки животных. Известны четыре классических варианта эндоцитоза:

- *клатрин-опосредованный* эндоцитоз (рецептор-опосредованный способ, предполагающий образование везикул размером 100 нм, временно окаймленных внутриклеточным белком клатрином);
- *кавеолин-опосредованный* эндоцитоз (рецептор-независимый эндоцитоз, предполагающий образование кавеол размером 50-100 нм, состоящих из олигомеров мембранных белков кавеолинов, холестерина и сфинголипидов);
- *рафт-опосредованный* эндоцитоз (липидный рафт – микродомен клеточной мембраны, обогащенный холестерином, сфинголипидами и насыщенными фосфолипидами, имеет размер 50-200 нм);
- *макропиноцитоз* (рецептор-независимый процесс поглощения клеткой жидкой фазы из окружающей среды, содержащей крупные молекулярные структуры).

От вируса процесс эндоцитоза не требует дополнительных вирусных белков, кроме тех, что используются для закрепления на рецепторе. Применим как для безоболочечных вирусов, так и вирусов с оболочкой. Покрытые вирионы покидают эндосому за счет слияния мембран, непокрытые вирусы вводят геном или нуклеокапсид в цитозоль через сформированные трансмембранные каналы или стимулирование лизиса эндосомальной мембраны.

В процессе проникновения в клетку геномы вирусов раздеваются. В зависимости от вида генома в цитоплазму может проникнуть голый геном или нуклеокапсид (РНП или субвирусная частица).

1.2 Внутриклеточные стадии репродукции

Внутриклеточный транспорт. Проникнув в цитоплазму, вирусные нуклеокапсиды транспортируются в пределах клетки вдоль микроканальцев, используя клеточные белки-транспортёры динеин и кинезин. Ядерные вирусы транспортируют свои геномы в ядро через поры, используя клеточный комплекс белков-транспортёров в энергозависимом процессе.

При реализации внутриклеточной стадии жизненного цикла вирус осуществляет три молекулярных процесса: транскрипцию, трансляцию и репликацию геномной нуклеиновой кислоты. На каждой стадии вирус вмешивается в клеточные синтетические механизмы и подчиняет их своим задачам, создавая приоритеты для вирусных нуклеиновых кислот.

Транскрипция – процесс синтеза мРНК на геномной матрице. В вирусных системах транскрипция осуществляется ДНК-зависимыми РНК-полимеразами в случае ДНК-геномов и РНК-зависимыми РНК-полимеразами в случае РНК-геномов. Общие принципы транскрипции геномов вирусов сходны с таковыми клеток хозяев (прокариот или эукариот), но различаются у ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Индивидуальные особенности также проявляются на стадиях посттранскрипционного процессинга (созревания) мРНК и регуляции транскрипции. Необходимость такой регуляции определяется разной потребностью в вирусоспецифических белках. Структурные белки, как правило, требуются в больших количествах, чем ферменты. Белки, обеспечивающие репликацию генома вируса, нужны на ранних стадиях инфекции, а структурные белки – на поздних. Поэтому целесообразно, чтобы разные вирусные гены считывались с разной эффективностью, и эта эффективность менялась во времени.

Процесс транскрипции регулируется количественно и качественно на уровне транскрипта за счет работы репрессоров и активаторов белковой природы и энхансеров (небольшой участок ДНК, способный связываться с факторами транскрипции и усиливать работу генов). У вирусов установлено существование целого ряда способов регуляции транскрипции: временной (*основан на существовании трех периодов транскрипции – сверххранного, раннего и позднего*), каскадный (*продукты сверххранной транскрипции, например α -белки, необходимы для транскрипции генов, кодирующих β -белки, которые в свою очередь включают транскрипцию следующей группы генов - γ -белков*), полярный (*определяется порядком расположения генов в геноме*) типы регуляции, взаимное расположение и сила регуляторных сигналов (промоторов и терминаторов).

Трансляция – синтез белка на матрице РНК. Вирусы не имеют своих белоксинтезирующих систем и используют трансляционный аппарат клетки-хозяина. Для синтеза простых белков вирусы используют рибосомы цитоплазмы, для синтеза гликопротеинов – рибосомы, связанные с мембранами

ЭПР. Молекулярные механизмы синтеза вирусных белков принципиально не отличаются от синтеза белков клетки хозяина и включают четыре стадии: инициацию, элонгацию, терминацию синтеза и посттрансляционную модификацию белков (гликозилирование, ацилирование, фосфорилирование, протеолитическое расщепление).

Первые стадии определяются особенностями белоксинтезирующих систем клетки-хозяина. В клетках прокариот каждый ген полицистронной мРНК может транслироваться независимо. В тоже время в мРНК эукариот, как правило, функционирует только один иницирующий кодон. В результате, эукариоты подчиняются правилу «одна мРНК – одна полипептидная цепь», и, за немногими исключениями, каждая мРНК функционирует как отдельная единица трансляции.

Репликация геномов вирусов – это матричный комплементарный синтез нуклеиновых кислот, преследующий целью наработку геномных последовательностей для инкапсидации в вирион. ДНК-геномы реплицируются клеточными или вирусоспецифическими ДНК-полимеразами. РНК-геномы реплицируются вирусоспецифическими РНК-полимеразами, которые также являются и транскриптазами. Репликация вирусных геномов происходит или одновременно с транскрипцией, или эти два процесса разделены во времени.

Морфогенез вирионов – образование целой инфекционной вирусной частицы включает сборку капсида, упаковку геномной нуклеиновой кислоты, приобретение оболочки, созревание вириона. Принципиально вирусы одной таксономической группы реализуют одинаковые стратегии морфогенеза, т.к. особенности протекания этих процессов детерминированы геномом. В тоже время есть много примеров того, что детали морфогенеза могут отличаться у вирусов с одинаковым видом генома, но имеющих разных хозяев.

При наличии разнообразия способов сборки вирионов, которые используют вирусы, можно выделить ряд фундаментальных понятий, знание которых необходимо для понимания детальных внутриклеточных процессов взаимодействия конкретных вирусов с клеткой:

- вирусы упаковывают свои геномные нуклеиновые кислоты в белковые капсиды; у некоторых вирусов может быть липидсодержащая оболочка;
- капсиды мелких вирусов построены из одного или небольшого количества идентичных субъединиц, что делает их симметричными;
- вирусные капсиды, образующие квазисферические структуры, имеют двадцатигранную симметрию с 5-ти, 3-х и 2-х кратными осями симметрии (икосаэдрический тип симметрии);
- самые маленькие капсиды с двадцатигранной симметрией построены из 60 идентичных субъединиц;
- большие вирусные капсиды с двадцатигранной симметрией обычно сделаны из $60 \times T$ субъединиц, где T – триангуляционное число;

- удлиненные вирусные капсиды обладают спиральной симметрией, и их длина зависит от длины упакованной геномной нуклеиновой кислоты;
- многие, но не все, вирусные оболочки получены от предварительно подготовленных клеточных мембран;
- вирусные оболочки обычно включают вирусные гликопротеины с трансмембранным якорем;
- некоторые вирусные капсиды собираются вокруг геномной нуклеиновой кислоты, другие смонтированы заранее и геном упаковывается в «незрелый» капсид;
- сборке капсидов помогают «строительные» белки, которые впоследствии удаляются и не являются частью «зрелого» капсида вируса.
- многие вирусные геномы содержат специфические упаковочные последовательности, которые узнаются белками капсида, гарантируя инкапсидацию единственного неповрежденного генома.

Выход вирионов из клетки. Вирионы покидают клетку-хозяина разными путями. Бактериофаги могут покинуть клетку в результате ее лизиса под влиянием вирусных киллерных белков или по секреторному механизму. Вирусы человека и животных могут покинуть клетку в результате экзоцитоза, отпочковываясь от цитоплазматической мембраны, через аппарат Гольджи или путем опосредованного вирусом лизиса клетки. Вирионы могут не иметь механизма выхода из клетки (например, аденовирусы), они накапливаются в ядре и ждут случайного лизиса или лизиса, опосредованного организмом хозяина.

Цикл репродукции вирусов. Первые эксперименты по изучению циклов репродукции вирусов были проведены Э. Эллис и М. Дельбрюком в 1939 году. Для этого суспензию *E.coli* заражали бактериофагом и через равные промежутки времени определяли титр вируса (число бляшкообразующих единиц, БОЕ) методом «негативных колоний». Было показано, что после внесения вируса в культуру бактерий наблюдается период продолжительностью 10-15 минут, когда после посева культуры бляшки не образуются. Этот период получил название **эклипс-фазы** – фазы затмения. В это время вирусные частицы (ВЧ) проникают в клетку и разрушаются, геном раздевается. В период эклипс-фазы культура неинфекционна, ВЧ не обнаруживаются. Более детальное изучение кривых роста показало, что скрытый (латентный) период может быть продолжительнее эклипс-фазы. Полный латентный период – время до появления первых внеклеточных ВЧ, в течение которого происходит репликация генома, синтез белков и сборка вирионов, длится 20-25 минут для большинства бактериофагов. Приблизительно через 40 минут после заражения, титр БОЕ резко возрастает (рис. 5А).

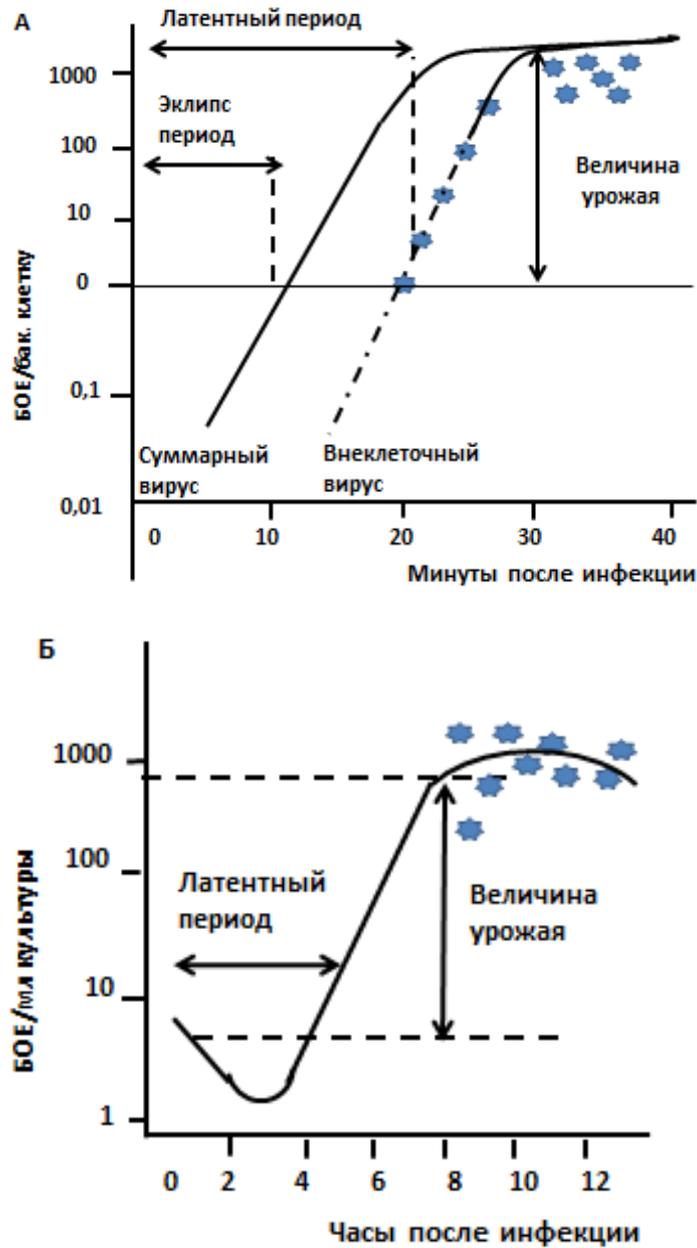


Рис. 5. Кривые роста бактериофага (А) и литического эукариотического вируса (Б)

Для многих вирусов животных эксперименты по изучению циклов репродукции были проведены в 1950 годах. Было установлено, что вирусы эукариот, в отличие от бактериофагов, требуют для ответа более длительный временной период, исчисляемый несколькими часами и даже днями (рис.5Б). По всей вероятности это связано с более медленным темпом роста эукариотических клеток и сложностью вирусной репродукции.

Глава 2

Общая характеристика геномов вирусов

Внутриклеточный вирус существует в едином комплексе вирус-клетка и только при их тесном взаимодействии. Различают две формы внутриклеточного вируса – интегрированную (покоящийся провирус) и вегетативную (представляет собой функционально-активный геном).

Геном – генетический состав клетки, вируса. На молекулярном уровне это индивидуальная нуклеиновая кислота, которая является носителем, хранящим генетическую информацию.

Ген – дискретный фактор наследственности – последовательность нуклеотидов, кодирующая полипептид, тРНК или рРНК.

Генотип – совокупность генов. У вирусов генотип – классификационная единица, определяемая путем сравнения нуклеотидных последовательностей. Генотипы подразделяют на субтипы. Основанием для выделения нового генотипа служит различие в нуклеотидных последовательностях на уровне 15-35 %, в зависимости от варибельности генома.

2.1 Химическая природа нуклеиновых кислот вирусов

По своей химической природе нуклеиновые кислоты вирусов не отличаются от нуклеиновых кислот клеток (организмов) и представляют собой полинуклеотидные цепи, образованные чередованием четырех дезоксирибонуклеотидов в случае ДНК или рибонуклеотидов в случае РНК, соединенных фосфодиэфирными связями. Нуклеотид представляет собой азотистое основание (аденозин (А), гуанозин (G), цитидин (С), тимидин (Т) или уридин (U) в случае РНК), связанное с дезоксирибозой (в ДНК), или рибозой (в РНК) гликозидной связью. Фосфорная кислота в нуклеиновых кислотах присоединяется сложноэфирной связью к 3'- и 5'-ОН группам сахаров смежных нуклеотидов. Отличительной особенностью ДНК целого ряда вирусов бактерий является наличие метилированных оснований (5'-метилцитозина, или 5-МЦ; 6'-метиламинопурин, или 6-МАП), которые могут входить в состав ДНК в качестве минорных или мажорных оснований. Так, ДНК фагов fd и φX174 (колифаги) содержит 1-2 метилированных основания, а в ДНК фага X12, лизирующего морскую бактерию *Xantomonas oyuza*, вообще нет обычного цитозина, который полностью замещен 5-МЦ. Источником происхождения таких оснований является энзиматическое метилирование уже синтезированной цепи ДНК. Этот процесс осуществляют вирусоспецифические метилазы, которые используют в качестве донора метильных групп S-аденозилметионин клетки хозяина.

Как и в других живых системах, у вирусов соответствие между аминокислотной последовательностью белка и нуклеотидной

последовательностью геномной нуклеиновой кислоты устанавливается с помощью универсального вырожденного генетического кода, где кодирующей единицей является триплет нуклеотидов (кодон). В вирусных системах используются те же наборы кодоновых значений, что и в бактериальных, архейных и эукариотических системах. Однако у вирусов генетическая информация может храниться как в смысловой полинуклеотидной цепи, так и в последовательности матричной цепи.

2.2 Отличия геномов вирусов от геномов организмов

Размеры. Если ориентировочно учесть, что геном эукариот имеет размер 4×10^9 п.н. и длину, достигающую 1,5-2 метра, а геном прокариот – 6×10^6 п.н., то размеры геномов вирусов значительно меньше. Так, самые крупные известные вирусы, реплицирующиеся в планктоне (*Mimivirus*, $d=400$ нм), имеют геном, состоящий приблизительно из 1,2 млн нуклеотидов, которые кодируют более, чем 900 белков. Геном крупных ДНК-содержащих вирусов позвоночных животных составляет только $2-4 \times 10^5$ п.н. (200-450 т.п.н. у поксвирусов и вирусов герпеса). Самые маленькие известные вирусы бактерий (18-20 нм в диаметре) имеют геном меньше чем 2 т.п. нуклеотидов, которые кодируют только 1-2 белка. Самый маленький геном среди вирусов, поражающих человека, имеет вирус гепатита В – 3,2 т.п.н.

Экономичность. Размеры геномов вирусов определяются емкостью (вместимостью) капсида вириона. В связи с этим, вирусы очень экономно хранят генетическую информацию, что проявляется наличием минимального набора вирусных генов, отсутствием многократно повторяющихся генов и, часто, наличием перекрывающихся ОРС. У ряда вирусов (в частности вирусов растений) ограничения, накладываемые размером капсида, преодолеваются распределением генов в разные вирусные частицы. Такое явление получило название *мультипартитности*.

Разнообразие типов, видов, структурных форм геномов вирусов. Носителем генетической информации у вирусов может быть как ДНК, так и РНК. Приблизительно 80% всех вирусов являются РНК-содержащими, 20% – ДНК-содержащими. Доказательством использования вирусами в качестве генетического материала РНК является наличие урацила вместо тимидина, наличие рибозы вместо дезоксирибозы, повышенная плотность нуклеиновых кислот (РНК является более плотной, чем ДНК), чувствительность к РНКазе, а не ДНКазе, инфекционность некоторых очищенных вирусных РНК.

Наличие двух *типов* генома является уникальным свойством вирусов, отличающим их от клеточных организмов. Каждый тип генома может существовать в двух *видах* – двунитевом и одонитевом. В свою очередь в каждом виде генома могут присутствовать линейные и кольцевые *формы*,

которые могут быть непрерывными или сегментированными. Однонитевые геномы вирусов могут различаться полярностью нитей: положительной полярности (+), отрицательной полярности (-), обоюдозначашие, или амбисенс нити (+,-). Двунитевые геномы вирусов образованы комплементарными нитями разной полярности (\pm ; +/-).

На основе вида генома в 1971 году Дэвидом Балтимором (Нобелевская премия 1975 г.) предложена классификация вирусов, которая включает семь генетических групп вирусов, имеющих особенности репликации геномов и разные стратегии реализации генетической информации (рис. 6).

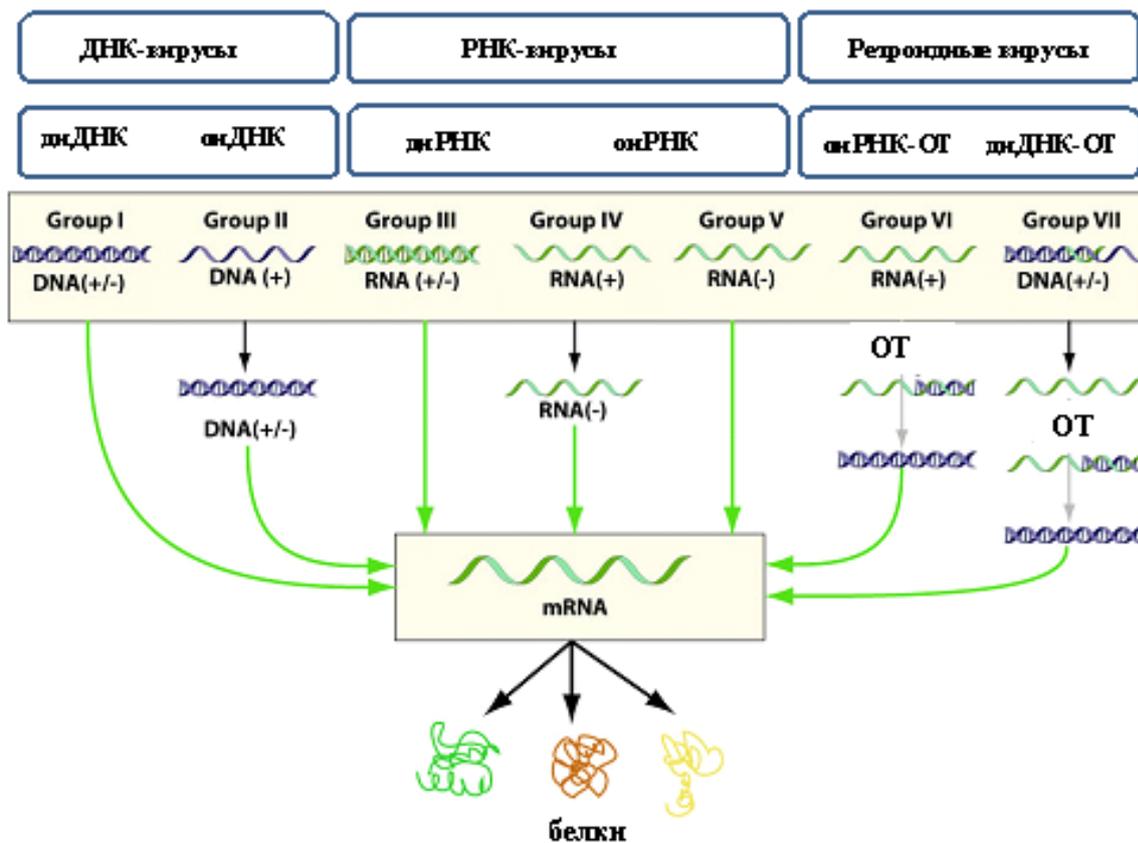


Рис. 6. Классификация вирусов на основе вида генома
[по <http://www.expasy.org/viralzone>]

Геномы вирусов различаются способом его укладки. Например, геномная ДНК вирусов может быть ассоциирована с белками, подобными гистонам эукариот, и организована в виде типичных нуклеосом. Сегментированные днРНК-геномы образуют подвижные катушки, ассоциированные с белковым полимеразным комплексом, (-)РНК всегда ассоциирована с нуклеокапсидным белком и образует структуру под названием рибонуклеопротеид (РНП), а (+)РНК может быть «голой».

Разнообразие стратегий репликации геномов вирусов.

В зависимости от вида генома вирусы могут осуществлять ДНК-зависимый синтез ДНК (репликация ДНК), ДНК-зависимый синтез РНК (транскрипция), РНК-зависимый синтез РНК (транскрипция/репликация РНК), РНК-зависимый синтез ДНК (обратная транскрипция, ОТ).

Существует три модели репликации нуклеиновых кислот – полуконсервативная, консервативная и дисперсная. Консервативная и дисперсная модели репликации нуклеиновых кислот установлены только у вирусов. Полуконсервативная модель предполагает, что после первого раунда репликации одна цепь в каждой из двух дочерних молекул является родительской, другая – синтезируемой заново. По такой схеме реплицируются дндНК-геномы вирусов. При реализации консервативной модели репликации одна дочерняя молекула состоит из двух родительских цепей, а другая – из вновь синтезированных цепей. Согласно консервативной модели реплицируются двунитевые РНК ротавирусов (*Reoviridae*, *Rotavirus*). ДНК-содержащие вирусы, реплицирующиеся таким образом, неизвестны. Дисперсная модель репликации приводит к образованию молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из фрагментов родительских и вновь синтезированных цепей. Дисперсная модель реализуется, например, на промежуточной стадии репликации онДНК-генома парвовирусов (*Parvoviridae*).

Разнообразие стратегий реализации генетической информации.

Транскрипция.

Многообразие видов вирусных геномов определяет существование различных подходов к синтезу вирусных мРНК в клетке-хозяине:

- *дндНК*-геномы реализуют стратегию, которую могут осуществлять как клеточные ферменты, так и вирусоспецифические полимеразы, в том числе входящие в состав вириона. Этапы: *дндНК* → *мРНК*.
- *онДНК* прежде чем транскрибироваться должна перейти в двунитевую форму. Этапы: *онДНК* → *дндНК* → *мРНК*.
- Кольцевая *частично дндНК* прежде, чем транскрибироваться должна пройти стадию репарации. Этапы: *чдндНК* → *дндНК* → *мРНК*.
- *(+)РНК-геномы* – это мРНК, то есть геномная нуклеотидная последовательность соответствует последовательности мРНК. Для осуществления процесса транскрипции вирусам с таким геномом необходимо синтезировать минус-нить с использованием РНК-зависимой РНК-полимеразы, которая чаще детерминирована вирусным геномом и транслируется непосредственно с геномной РНК. Этапы: *(+)РНК* → *(-)РНК* → *мРНК*.

Транскрипция *(+)РНК*-геномов может протекать двумя путями – с образованием субгеномных мРНК (необходимы для синтеза ранних белков) и

без образования субгеномных мРНК. В последнем случае транскрипция будет являться также и репликацией.

- *(-)РНК-геномы* (нуклеотидная последовательность комплементарна мРНК) являются матрицей для транскрипции и для репликации. Оба эти процесса протекают на матрице, находящейся в составе РНП, при участии вирионной РНК-полимеразы. Синтезируемые мРНК моноцистронны, так как все вирусы с (-)РНК геномом поражают только эукариот. (-)РНК геномы могут быть непрерывны, а могут быть сегментированы.

Этапы: (-)РНК \longrightarrow мРНК.

- *Диплоидный (+)РНК-геном ретровирусов.* Прежде, чем произойдет транскрипция ретровирусного генома, он претерпевает целый ряд молекулярных превращений, включающих обратную транскрипцию, интеграцию ДНК в геном хозяина и только после этого синтез мРНК с использованием клеточного транскрипционного комплекса. Геном ретровирусов монолитен, кодирует полипротеин, то есть транскрибируется без образования субгеномных РНК. Первичные транскрипты подвергаются сплайсингу.

Этапы: (+)РНК \longrightarrow днДНК \longrightarrow интеграция \longrightarrow мРНК

- *днРНК-геном реовирусов.* Транскрипцию осуществляет вирионная транскриптаза – РНК-зависимая РНК-полимераза, находящаяся в составе однокапсидной вирусной частицы. Этапы: (+)РНК \longrightarrow (-)РНК \longrightarrow мРНК.

- У сложно устроенных РНК-содержащих вирусов транскрипция происходит не на голой матрице, а в составе транскрипционных комплексов. Капсидные белки обеспечивают правильную конформацию РНК, защиту от клеточных нуклеаз, связь фрагментов генома друг с другом, а также регуляцию транскрипции. Этапы: (-)РНК \longrightarrow мРНК.

- *Амбисенс (обоюдозначающая, амбиполярная) РНК* имеет 5'-конец позитивной полярности, а 3'-конец негативной полярности. При попадании в клетку с геномной РНК считываются два класса комплементарных РНК: с 3'-конца считывается субгеномная мРНК и полноразмерный антигеном. Антигеном в свою очередь опять служит матрицей для двух классов РНК. С антигенома считывается вторая субгеномная мРНК и полноразмерная обоюдозначающая геномная, которая идет на построение вирусных частиц.

Трансляция.

В зависимости от особенностей организации 5'-конца мРНК вирусы эукариот могут осуществлять два механизма трансляции – универсальный *кэп-зависимый* и уникальный *кэп-независимый* механизмы.

2.3 Изменчивость геномов вирусов

Как генетический материал ДНК и РНК обладают разным эволюционными возможностями, так как с разной эффективностью реализуют внутренние источники наследственной изменчивости, которыми являются спонтанные генные мутации и рекомбинационные процессы, включающие интеграционные взаимодействия с геномом хозяина.

Мутации (точковые и множественные) представляют собой изменение генетического кода в результате замены (транзиции, трансверсии), выпадения (делеции) или вставки (инсерции) одного или нескольких нуклеотидов в геномной последовательности. Большинство мутаций носит нейтральный характер. К изменению фенотипа ведут только мутации, затрагивающие функционально активные последовательности белковой молекулы (миссенс-мутации). По изменению фенотипа различают летальные, условно-летальные и нелетальные мутации. Примером летальных делеционных мутантов вирусов служат ДИ-частицы, условно-летальных – температурочувствительные мутанты. Нелетальные мутации обеспечивают *антигенный дрейф* и определяют существование различных серотипов и генетических вариантов вирусов.

В естественных условиях размножения движущей силой изменчивости вирусов являются спонтанные мутации, частота которых существенно варьирует внутри различных генетических групп вирусов. Скорость спонтанных мутаций в ДНК-геномах чрезвычайно мала и составляет 10^{-8} - 10^{-11} на цикл репликации независимо от размера генома, Относительно низкая мутабельность ДНК-геномов вирусов компенсируется высокой численностью вирусных популяций (10^8 - 10^9 вирионов в мл тканевой суспензии), где имеет значение не столько частота возникновения мутаций, сколько их абсолютное количество.

В отличие от ДНК-содержащих вирусов, РНК-содержащие вирусы обладают повышенной мутабельностью. Это свойство определяется химическим составом, структурой и способом репликации РНК, исключая возможность исправления ошибок на неповрежденной комплементарной нити. В результате, частота возникновения ошибок при синтезе РНК приблизительно в 10 тысяч раз выше, чем при репликации ДНК, и она зависит от числа нуклеотидов, составляющих вирусный геном. Вследствие отсутствия репарационного механизма при репликации РНК в каждом репликационном цикле около 10% потомства РНК-содержащих вирусов имеет мутации. У вирусов гриппа и ВИЧ замещается около 1 % последовательности в год. В РНК-геномах скорость спонтанных мутаций составляет 10^{-3} - 10^{-4} . Это означает, что геном любой индивидуальной частицы РНК-содержащего вируса будет содержать одну или несколько мутаций, отличающих его от последовательности дикого типа данной вирусной разновидности. Потомство РНК-вируса (природное или лабораторное) представляет собой не совокупность однородных двойников, а скорее молекулярный рой родственных

нуклеотидных последовательностей, сгруппированных в месте их синтеза. Этот молекулярный рой или **“квази-разновидность”** обеспечивает источник фенотипических вариантов, которые могут быстро ответить на изменяющееся давление естественного отбора. Как следствие, РНК-содержащие вирусы могут эволюционировать в миллион раз быстрее чем, ДНК-организмы.

Различают два механизма мутагенеза – *ошибка включения и ошибка репликации*. В первом случае причиной мутаций является присутствие в клетке веществ, обладающих мутагенным действием – аналогов нуклеотидных оснований, свободных радикалов, перекисей и т. д. Во втором случае причина заложена в точности воспроизведения геномной нуклеиновой кислоты в процессе репликации.

Фенотип мутантного вируса зависит от типа мутации (й) и ее (их) местоположения в геноме. Каждый из классов мутаций, представленных ниже, у вирусов может произойти как естественным путем (спонтанно), так и может быть вызван искусственно (индуцирован) в экспериментальных целях.

- *Мутации, имеющие биохимические маркеры* – мутации, приводящие к устойчивости к лекарственным средствам, изменению вирулентности, чувствительности к инактивирующим агентам.
- *Делеционные мутанты* – дефектные интерферирующие (DI) частицы. Они неинфекционны, но не обязательно генетически инертны, могут вернуться к дикому типу только путем рекомбинации, которая обычно происходит сравнительно с низкой частотой.
- *Мутанты по диапазону хозяев (host range, hr)* – наличие условных мутантов этого класса показано не только для бактериофагов, но также и для вирусов животных в системе *in vitro*.
- *Температурочувствительные мутанты (t.s.)* – образуются в результате мутаций, приводящих к замене аминокислоты в белке. В результате этих мутаций синтезируются белки полного размера с тонко измененной структурой, которые могут функционировать при (пермиссивных, разрешающих) низких температурах, но не при более высоких (непермиссивных, неразрешающих) температурах. Эти мутанты реплицируются медленнее вируса дикого типа и редко возвращаются.
- *Холодочувствительные мутанты (c.s.)* – противоположность *t.s.*-мутантов – чаще встречаются у бактериофагов и вирусов растений, клетки-хозяева которых могут быть размножены при низких температурах, но менее полезны для вирусов животных, потому что их клетки-хозяева вообще не будут расти при значительно более низких температурах, отличающихся от нормы.

Мутантные вирусы могут вернуться к оригинальному фенотипу путем реверсии (*обратная мутация, восстанавливающая исходную структуру последовательности*), супрессии (*подавление, запрещение мутантного фенотипа второй мутацией*) или внегенной супрессии (*мутация гена, кодирующего тРНК*).

Рекомбинация – физическое взаимодействие вирусных геномов во время суперинфекции, приводящее к генным комбинациям, не существующим в любом родителе. Известны три механизма рекомбинации у вирусов, в зависимости от вида генома вируса:

- *внутримолекулярная рекомбинация с использованием разрывов и воссоединений* (лигирования) происходит у всех ДНК- и РНК-вирусов, реплицирующихся через ДНК-интермедиат, по всей вероятности с использованием клеточных ферментов;
- *внутримолекулярная рекомбинация с использованием «выбора копии»* (смены матрицы) наблюдается у РНК-содержащих вирусов (для пикорнавирусов явление было известно с 1960-ых годов, позднее признано для коронавируса). Механизм переключения вирусной полимеразы с одной материнской нити на другую во время синтеза генома до конца не понятен. Предполагают, что происходит это случайным образом;
- *межмолекулярная рекомбинация (реассортация, пересортировка)* наблюдается у вирусов с сегментированным геномом при суперинфекции. Вирусное потомство, имеющее новые комбинации генов называют *реассортантным*. В его геном входят гены каждого из родителей. У вирусов с сегментированным геномом при реассортации сегменты перемешиваются случайным образом. Реассортация является одним из способов генетических взаимодействий между вирусами.

2.4 Генетические взаимодействия между вирусами

Генетические взаимодействия между вирусами происходят в организме хозяина, зараженного более чем одним вирусом. Экспериментально генетические взаимодействия могут быть проанализированы при смешанной инфекции (суперинфекции) клеток в культуре. При проведении таких экспериментов была получена информация о существовании двух типов взаимодействия вирусов – комплементации и рекомбинации.

Комплементация – дополнение. Известны три варианта таких взаимоотношений геномов вирусов при суперинфекции:

- взаимодействие вирусных генных продуктов во время суперинфекции приводит к воспроизводству одного или обоих родительских вирусов, в то время как оба вируса остаются генетически неизменными;
- один из вирусов в смешанной инфекции обеспечивает функциональный генный продукт для другого вируса, который является дефектным по этой функции. Как правило, вирус дикого типа спасает мутанта и выступает в роли вируса-помощника;
- оба вируса имеют дефекты и могут дополнять друг друга функциональными генными продуктами. Если оба мутанта дефектны по одной

функции, то репродукции вирусов не происходит. Дополнение может быть ассиметричным – репродуцируется только один мутантный вирус.

Рекомбинационные взаимоотношения могут наблюдаться на уровне одного вируса, между разными типами вируса и между разными вирусами.

Описана *внутримолекулярная рекомбинация* между сегментами РНК трипартитного бромовируса растений, когда дефектный 3'-конец одной нити РНК был восстановлен за счет рекомбинации с 3'-концом нити другого сегмента.

Подтверждением существования *межтиповой рекомбинации* служит обнаружение природных штаммов полиовируса вакцинного происхождения, геном которых содержал последовательности генома всех трех серотипов вируса. Такие рекомбинанты возникают при вакцинации живой пероральной поливалентной полиовирусной вакциной, что создает возможность заражения одной клетки кишечника всеми тремя полиовирусами с последующей сменой матрицы РНК-полимеразой в процессе их репликации.

В качестве примера существования рекомбинационных взаимоотношений между разными вирусами может быть приведен вирус западного энцефалита лошадей (*Alphavirus*), который является гибридом вируса восточного энцефаломиелита лошадей и вируса Синдбис, от которого он приобрел регион, кодирующий поверхностный гликопротеин.

Реассортация генов при смешанном инфицировании клеток вирусами разной видовой специфичности может служить причиной возникновения реассортантов не только с новыми антигенными свойствами, но и с новым эпидемическим потенциалом, дающим возможность реассортантам преодолевать межвидовые барьеры (межвидовая трансмиссия, переход от одного вида хозяина к другому). В общебиологическом смысле *межвидовая трансмиссия* - процесс смешения популяций, приводящий к нарушению их изоляции, влекущий за собой одно-, или двусторонний обмен генами и приводящий к увеличению запасов наследственной изменчивости популяций за счет поступления генов из генофонда другой популяции. Явление межвидовой трансмиссии широко распространено в природе у вируса гриппа и ротавирусов.

Для вируса гриппа преодоление межвидового барьера является одним из источников формирования пандемических штаммов. Например, известные в настоящее время пандемические штаммы вируса гриппа А возникли в результате реассортации генов вируса гриппа человека и вируса гриппа птиц при смешанной инфекции в организме свиней. Для ротавирусов человека показано появление новых штаммов, связанных с трансмиссией генов кошек, свиней, собак, овец, крупного рогатого скота. Реассортанты, несущие гены ротавирусов животных, привнесли в популяции ротавирусов человека новые серотип-определяющие гены.

Глава 3

Принципы реализации генетической информации вирусов

3.1 Генетические стратегии ДНК-содержащих вирусов

3.1.1 Экспрессия генов ДНК-содержащих вирусов

Транскрипция. Транскрипцию ДНК-геномов вирусов осуществляют ДНК-зависимые РНК-полимеразы, которые могут иметь клеточное или вирусное происхождение (чаще у бактериофагов). В клетках эукариот транскрипцию вирусных ДНК осуществляет РНК-полимераза II (в клетке синтезирует пре-мРНК), реже – РНК-полимераза III (в клетке синтезирует тРНК). Холофермент эукариотических РНК-полимераз представляет собой одну субъединицу, способную взаимодействовать с различными белковыми факторами. Бактериальная РНК-полимераза является тетрамером, состоящим из субъединиц $2\alpha, \beta, \beta'$. Возможны ситуации, когда транскрипцию ранних вирусных генов осуществляет клеточная РНК-полимераза, а поздних – вирусоспецифическая или модифицированная клеточная РНК-полимераза, содержащая вирусоспецифическую субъединицу (бактериофаги T7 и T4, соответственно).

Транскрипция состоит из стадий инициации, элонгации и терминации. Единицей транскрипции является транскриптон – фрагмент молекулы ДНК, состоящий из промотора, транскрибируемой части и терминатора.

Для инициации синтеза мРНК полимеразы должна связаться с участком нуклеотидной последовательности ДНК, называемым **промотором**, и несколькими белковыми факторами инициации транскрипции. В клетках хозяев вирусов содержится множество активных промоторов, что создает определенные трудности для вирусной ДНК, т.к. вирусные промоторы должны конкурировать за использование клеточного транскрипционного аппарата. Для этого ДНК-вирусы осуществляют стратегию эффективного инициирования транскрипции на вирусной ДНК в одном или более специфическом промоторе, которые непосредственно управляют транскрипцией ранних генов. Для того чтобы элементы клеточного транскрипционного аппарата могли взаимодействовать с ранними вирусными промоторами, многие ДНК-вирусы содержат усилители генов или **энхансеры** – регуляторные последовательности, выполняющие роль минимальных промоторов. В отличие от промоторов, они могут активизировать транскрипцию, находясь выше или ниже сайта связывания, запускающего транскрипцию, со скоростью от тысячи пар азотистых оснований в секунду. Хотя клеточные гены часто содержат энхансеры, первый ген-усилитель был обнаружен у полиомавируса обезьян SV40.

В дополнение к энхансерам некоторые ДНК-вирусы кодируют *белки*, облегчающие транскрипцию ранних генов. Такие белки упакованы в вирион и поступают в клетку с вирусной ДНК. Например, VP16 вируса простого герпеса (HSV) синтезируется на поздней стадии вирусной инфекции и упаковывается в часть вириона, известную как тегумент (*аморфная белковая масса, находящаяся между мембраной и капсидом вириона*). После проникновения HSV в клетку VP16 транспортируется в ядро, где формирует комплекс, по крайней мере, с двумя клеточными белками-активаторами транскрипции, что обеспечивает мощную активацию транскрипции ДНК HSV.

После образования и стабилизации транскрипционного комплекса РНК-полимераза начинает процесс элонгации. Синтез РНК протекает в направлении от 5'- к 3'- концу, то есть по матричной цепи ДНК РНК-полимераза движется в направлении от 3'- к 5'-концу. Фаза элонгации заканчивается после освобождения растущего транскрипта и диссоциации фермента от матрицы (терминация).

В клетках прокариот синтезируемый транскрипт полицистронен и имеет внутренние сайты связывания рибосом. В клетках эукариот трансляционный аппарат не приспособлен для внутренней инициации, в связи с чем, первичные транскрипты подвергаются посттранскрипционным изменениям, или *процессингу*, который включает экпирование 5'-конца (присоединение [m7G(5')ppp(5')N]), полиаденилирование 3'-конца (присоединение аденилового хвоста в участках, несущих сигнал полиаденилирования) и сплайсинг (удаление различных участков первичного транскрипта).

У ДНК-содержащих вирусов экпирование может идти эффективно на разных стадиях репродукции вируса и происходит до завершения синтеза транскрипта. Процессы полиаденилирования и сплайсинг могут протекать в альтернативном формате. Таким образом, зрелые мРНК ДНК-содержащих вирусов имеют структуру мРНК клетки-хозяина, позволяющую осуществлять экп-зависимую стратегию трансляции.

Трансляция – процесс синтеза белка на матрице мРНК. Как уже неоднократно отмечалось, вирусы характеризуются полной зависимостью от белоксинтезирующих систем клетки хозяина. Для синтеза простых белков вирусы используют рибосомы цитоплазмы, для синтеза гликопротеинов – рибосомы, связанные с мембранами ЭПР. Молекулярные механизмы синтеза вирусных белков принципиально не отличаются от синтеза белков клетки хозяина и включают четыре стадии: инициацию, элонгацию, терминацию синтеза и посттрансляционную модификацию белков.

Первые стадии трансляции определяются особенностями белоксинтезирующих систем клетки-хозяина. В клетках прокариот каждый ген полицистронной мРНК может транслироваться независимо, *инициация* трансляции обеспечивается всего тремя белковыми факторами, синтез белка может начаться еще до завершения синтеза транскрипта. В тоже время в мРНК

эукариот, как правило, функционирует только один иницирующий кодон, в связи с чем, вирусная мРНК также должна быть моноцистронна.

Инициация трансляции требует участия, по крайней мере, 13 общих эукариотических факторов инициации (eIF), которые, связываясь с мРНК в области кэпа, образуют прединицирующий комплекс для осуществления кэп-зависимого (сканирующего) механизма трансляции. Важную роль в трансляции мРНК в клетках эукариот играет поли-А трек, который через поли-А-связывающий белок (РАВР) взаимодействует с элементами кэп-связывающего комплекса, включая в его состав 5'-конец мРНК и создавая, таким образом, трансляционный комплекс в форме «закрытой петли» (рис. 7).

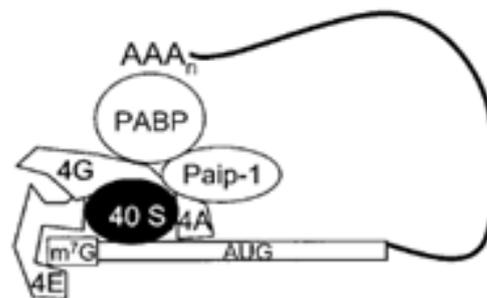


Рис. 7. Модель трансляционного комплекса в замкнутой системе с мРНК при реализации кэп-зависимой трансляции

Сборка комплекса замкнутой системы может стабилизировать взаимодействие 40S субъединицы рибосомы с мРНК.

Сближение концов мРНК, обеспеченное закрытым трансляционным комплексом, вносит вклад в стабильность мРНК и 5'-кэп-комплекса и обеспечивает эффективную сборку полирибосом. Таким образом, полный эффект закрытой петли заключается в увеличении эффективности трансляции. Вирусы используют закрытый трансляционный комплекс как средство переключения трансляционного аппарата клетки на трансляцию вирусных мРНК путем разрушения или модификации РАВР.

После ассоциации с мРНК, прединицирующий комплекс начинает *сканирование* мРНК от 5'-конца до взаимодействия Met-tRNA_i с иницирующим кодоном AUG. В течение стадии *элонгации* трансляции мРНК связана со многими 80S рибосомами, или полисомами, поскольку аминокислотные остатки последовательно присоединяются к COOH-концу растущей цепи пептидов. Во многих вирусных системах жизненный цикл разграничен на ранние и поздние события, которые могут различаться дифференцированным привлечением вирусных мРНК в полисомные комплексы в определенное время после инфекции. Например, у вируса простого герпеса (HSV-1) это часто совпадает с синтезом факторов латентности и детерминант вирулентности.

Процесс завершения трансляции (*терминация*) происходит в тот момент, когда 80S рибосома сталкивается в рамке считывания с терминирующим кодоном, который является фактором, запускающим процесс гидролиза связи пептидной цепи и тРНК, освобождения синтезированного полипептида от 80S рибосомы и разобщения субъединиц рибосомы. Как только завершение синтеза произошло, 40S субъединица может продолжить сканировать мРНК. При считывании мультицистронной последовательности завершение трансляции

может сопровождаться переиницированием трансляции. Завершение трансляции переиницированием распространено среди вирусов и используется ими для управления синтезом определенного генного продукта.

3.1.2 Репликация ДНК-геномов вирусов

3.1.2.1 Виды ДНК-геномов вирусов

ДНК-геномы вирусов существуют в трех видах – двунитевой (группа I вирусов), однонитевой (группа II вирусов) и частично двунитевой (группа VII вирусов). Вирусы группы VII имеют особенности репликации (наличие стадии обратной транскрипции) и будут рассмотрены в соответствующем разделе.

ДНК-геномы вирусов, независимо от того однонитевые или двунитевые, могут быть линейными или кольцевыми. Самый маленький ДНК-геном имеют полиомавирусы – кольцевая днднк длиной 4,5 т.п.н. (5-9 ОРС). Самый большой ДНК-геном имеет пандоравирус амебы – линейная днднк длиной 2 473 п.н., 2556 ОРС.

Особенностями линейных ДНК-геномов вирусов является то, что молекулы никогда не имеют бессмысленных концов. Концы молекул могут содержать прямые (▶▶) или инвертированные концевые повторы (▶◀), выступающие комплементарные липкие концы (■), терминальные петли, самокомплементарные концевые последовательности, образующие концевые шпильки, терминальные геномные белки (○) (рис. 8).

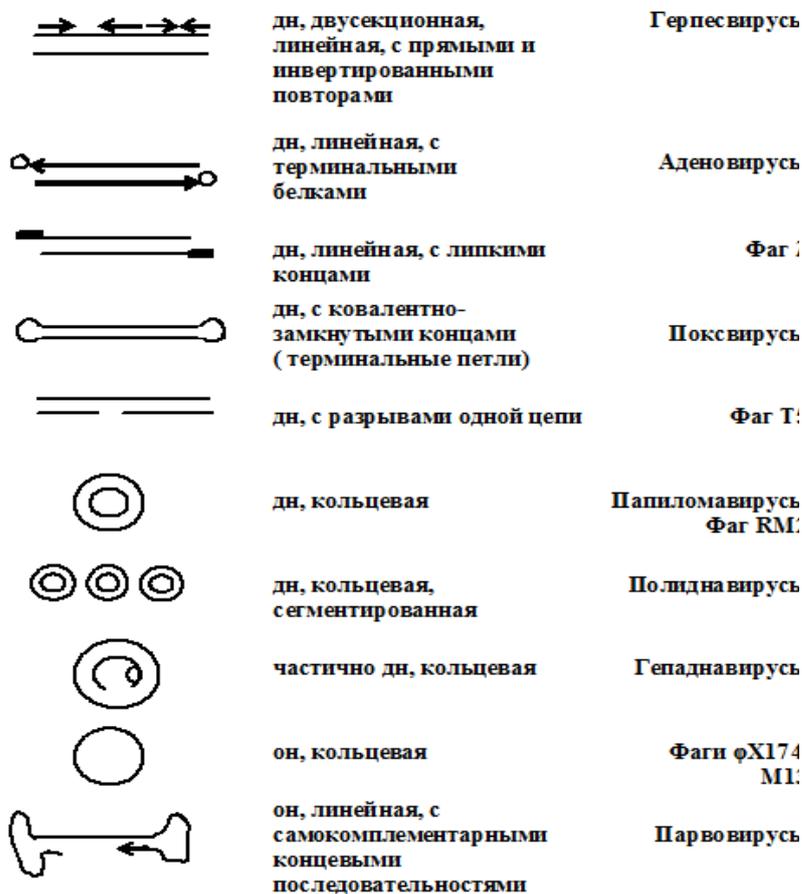


Рис. 8. Структурная организация ДНК-геномов вирусов

Особенности структурной организации ДНК-геномов вирусов и взаимоотношений с хозяином определяют наличие разнообразных стратегий

репликации. Так, линейные геномы, не образующие кольца, требуют терминальной инициации (шпилька, Б-Н затравка), а линейные геномы, способные образовать кольцо и кольцевые геномы используют инициацию на внутренних участках и реализуют механизм катящегося кольца или схему Кернса. Часто вирусы в процессе репликации ДНК реализуют несколько стратегий. Вирусы, способные интегрировать в геном хозяина, реплицируются совместно с его ДНК (репликация через интеграцию).

3.1.2.2 Общие принципы репликации

Подготовка клеток для репликации вирусной ДНК. В ходе продуктивной вирусной инфекции многие ДНК-вирусы из единственной молекулы генома могут получить 100 000 или больше копий генома в течение нескольких дней. Для этого требуется работа множества белков, включая ДНК-связывающие белки и полимеразы, а также обильная поставка нуклеотидов. Репликация некоторых ДНК-вирусов происходит только в клетках, которые естественно реплицируют свою собственную ДНК, то есть находятся в S-фазе клеточного цикла (парвовирусы), обеспечивая тем самым необходимую клеточную среду для репликации вирусной ДНК. Другие ДНК-вирусы кодируют белки, стимулирующие клеточный цикл деления (папилломавирусы, полиомавирусы, аденовирусы). Наконец, некоторые из самых больших ДНК-содержащих вирусов ограничено используют клеточный репликативный аппарат, т.к. сами кодируют вирусные версии многих из необходимых белков (вирусы герпеса и поксвирусы).

Независимо от вида ДНК-генома единицей его репликации является так называемый **репликон** – единица генома, способная к автономной репликации. Репликон представляет собой нуклеотидную последовательность, расположенную между точкой начала репликации (origin или ori) и точкой окончания репликации (terminus). Процесс репликации ДНК разделен на три стадии: инициация цепи, элонгация (удлинение) цепи и терминация синтеза. Вирусы с различными видами ДНК-генома реализуют оригинальные стратегии репликации. При этом главные особенности наблюдаются при инициации синтеза.

Основные этапы репликации ДНК-геномов вирусов являются общими для вирусов про- и эукариот. ДНК-содержащие вирусы эукариот (кроме поксвирусов) копируют свои геномы в ядре.

Инициация синтеза ДНК. Репликация ДНК-геномов вирусов иницируется в специфических точках ori. В отличие от клеточных ориджинов, которые в течение клеточного цикла активируются один раз, вирусные точки ori могут срабатывать многократно в течение отдельного цикла репликации. Инициация синтеза цепи ДНК может происходить только

при наличии затравки для ДНК-полимеразы. Вид затравки и способ ее образования различаются у разных вирусов и определяют своеобразие вирусных репликативных систем. Различают три основных способа инициации синтеза ДНК у вирусов:

- инициация на внутренних участках ДНК – характерна как для линейных, так и для кольцевых матриц. Затравкой служит олигорибонуклеотид, который может быть синтезирован ДНК-зависимой РНК-полимеразой, праймазой или праймосомой. Эти ферменты могут иметь клеточное происхождение, или быть вирусоспецифическими. Синтезироваться может одна или несколько затравок. На однонитевой матрице затравка синтезируется на определенном участке, узнаваемом ферментом. Двунитевая ДНК-матрица сначала подготавливается к инициации. На участке *ori* происходит присоединение хеликазы. Этот фермент расплетает участок матрицы, что приводит к образованию репликативной вилки и последующему синтезу затравки (многие вирусы);
- инициация на концах ДНК (терминальная инициация) – характерна для линейных матриц. Различают две группы способов концевой инициации ДНК-синтеза: с использованием белок-нуклеотидной затравки (аденовирусы) и с использованием концевой шпильки – самозатравочный механизм (парвовирусы);
- инициация синтеза с использованием разрывов и брешей – затравкой для дальнейшего удлинения цепи может быть 3'-ОН конец разорванной цепи ДНК. Такой механизм иницирования синтеза наблюдается у ряда бактериофагов.

Элонгация цепи при репликации вирусных геномов принципиально не отличается от процесса синтеза клеточных ДНК. Используются ферменты, вспомогательные белки и репликационные белки, принадлежащие как клетке-хозяину, так и вирусу. Синтез ДНК, как правило, осуществляет ДНК-зависимая ДНК-полимераза. Основным свойством синтеза является его полярность, при которой очередной нуклеотид присоединяется к 3'-концу растущей цепи. То есть направление синтеза идет от 5' - к 3'-концу, считывание – от 3' - к 5'-концу. Особенности синтеза комплементарных нитей связаны со способом инициации.

Терминация синтеза. В случае кольцевых геномов окончание синтеза и расхождение геномов упрощены, поскольку синтез дочерней цепи идет по кругу и в конце полного оборота в точке *ori* или при двунаправленной репликации в середине кольца 3'- и 5'-концы вновь синтезированной цепи совмещаются и лигируются. Попарно сцепленные кольца разъединяются топоизомеразой. В линейных ДНК, синтезированных с помощью РНК-затравок, все обстоит сложнее. Удаление РНК-праймера дает молекулу ДНК с выступающим 3'-концом и пробелом на 5'-конце. Предложено два способа завершения репликации с образованием полной копии матричной цепи: с использованием конкатемеров или через образование шпильки (рис. 9).

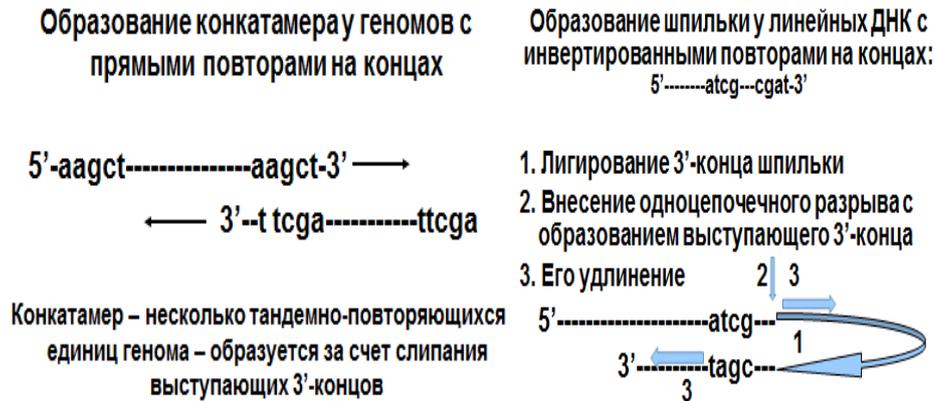


Рис. 9. Способы завершения репликации с образованием полной копии матричной цепи

Универсальный механизм синтеза ДНК.

Двунитевая ДНК представляет собой две антипараллельные комплементарные нити. Дочерние нити также должны быть антипараллельны, что решается при синтезе с использованием репликативной вилки. В репликативных вилках одна нить (ведущая) копируется непрерывно в направлении от 5'- к 3'-концу. Поскольку другая нить (отстающая) должна также синтезироваться от 5'- к 3'-концу, она копируется с перерывами, многократно иницилируя синтез и соединя короткие фрагменты Оказаки (рис. 10).

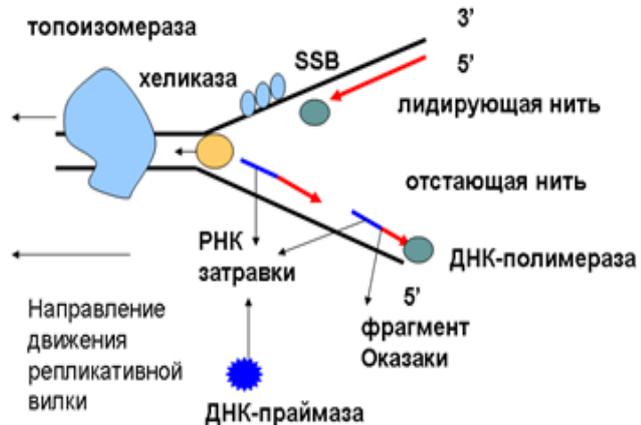


Рис. 10. Схема репликации днДНК с использованием репликативной вилки

Синтез ДНК в репликативной вилке обеспечивается целым набором белков-ферментов, которые могут иметь разное происхождение. Мелкие ДНК-содержащие вирусы используют клеточные репликативные белки. Другие вирусы сами обеспечивают почти все белки репликативной вилки. Например, вирусы герпеса кодируют ДНК-полимеразу, фактор элонгации, праймазо-хеликазный комплекс, онДНК-связывающий белок и, вероятно, еще ряд вирусных белков, которые не идентифицированы.

3.1.2.3 Репликация геномов днднк-содержащих вирусов

Вирусы с двунитевым ДНК-геномом (**группа I вирусов**) инфицируют бактерий, архей, амёб, микоплазм, водоросли, грибы, беспозвоночных и позвоночных животных, но отсутствуют среди вирусов растений. По данным 2014 года группа I вирусов включала 33 семейства, объединяющих 136 родов, и 6 неклассифицированных родов вирусов. Основная масса днднк-содержащих вирусов – это бактериофаги (порядки *Caudovirales*, *Ligamtyvirales*). Вирусы позвоночных сосредоточены в 7 семействах, в том числе 5 включают инфекционных агентов человека - *Adenoviridae*, *Poxviridae*, *Herpesviridae* (*Herpesvirales*), *Polyomaviridae* и *Papillomaviridae*.

❖ Репликация линейной ДНК, не образующей кольца, с использованием терминальной инициации при помощи белок-нуклеотидной заправки.

Аденовирусы (*Adenoviridae*).

Семейство представлено 5 родами вирусов позвоночных животных – птиц, рыб, животных и человека. Аденовирусы, поражающие человека, объединены в род *Mastadenovirus*, включающий 7 серологических групп (А-Г), число серотипов приближается к 100. Заболевания человека вызывают вирусы 50-ти серотипов: ОРЗ, пневмония, фарингоконъюнктивит, конъюнктивит, гастроэнтерит, миокардит, гидроперикардит, серозный менингит, геморрагический цистит, ожирение. Ряд аденовирусов животных обладают онкогенным потенциалом.

Аденовирусы – относительно крупные (d=65-90 нм) безоболочечные ядерные вирусы с псевдо Т=25 икосаэдрическим типом симметрии капсида (рис.11).

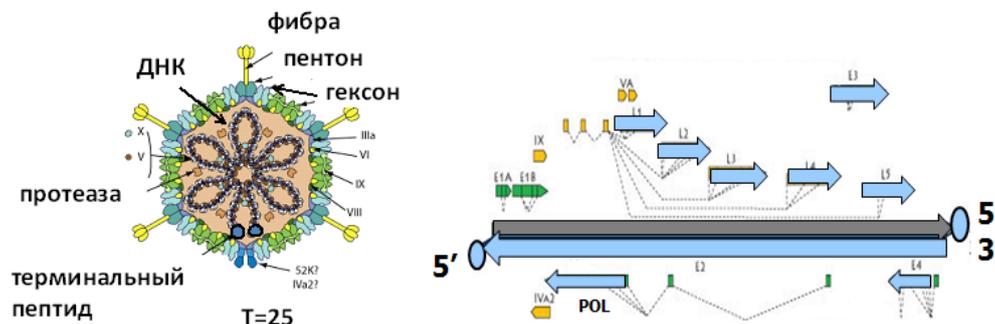


Рис. 11. Структура вириона и генома аденовируса человека

Капсид образован 252 субъединицами – 240 тримерами гексонов (групповой антиген) и 12-ю пентонами, расположенными на вершинах икосаэдра и

имеющими 12 фибр (типоспецифический антиген), выполняющих прикрепительную функцию.

Геном аденовирусов представлен *не образующей кольца линейной днДНК* размером 35-36 т.п.н., которая имеет на 5'-концах обеих цепей инвертированные повторы (100-140 н.о.) и ковалентно присоединенные геномные (терминальные) белки с м.м. 55 кДа, кодирует 40 белков. ДНК ассоциирована с клеточными гистонами.

Аденовирусы реплицируются в эпителиальных клетках. Клеточными рецепторами для фибр аденовирусов разных серотипов являются CAR, CD80, CD86, CD46. Вирус проникает в клетку с использованием клатрин-опосредованного эндоцитоза, из эндосомы еще одетый геном выходит в цитоплазму в результате лизиса мембраны вирусоспецифическим белком. Одетая ДНК транспортируется к ядру посредством микротрубочек. Стыковка капсида с ядерной мембраной приводит к его разрушению и проникновению ДНК в ядро.

Цикл репродукции аденовирусов условно разделяют на раннюю и позднюю фазы: «ранняя» фаза – транскрипция; «поздняя» фаза – репликация ДНК (через 6-9 часов после заражения), транскрипция поздних генов, трансляция. В раннюю фазу синтезируются ранние транскрипты генов-Е, кодирующих неструктурные белки (в том числе терминальный белок, ДНК-связывающий белок, ДНК-полимераза) с помощью клеточных ферментов (РНК-пол II, ген А – РНК-пол III). При этом Рол II–мРНК подвергаются альтернативному сплайсингу (удаление интронов).

После синтеза вирусной ДНК-полимеразы наступает этап репликации ДНК, которая происходит с использованием *белок-нуклеотидной (Б-Н) затравки*. В инфицированной аденовирусом клетке синтезируется вирусный белок массой 80 кДа, который через серин связывается с дезоксицитидином (рис. 12-1). Образовавшаяся структура (80)Б---Ser—dCTP является затравкой, которая через цитозин комплементарно связывается с 3'-концевым гуанозином генома и инициирует синтез цепи ДНК. Инициация может наблюдаться на любом конце родительской ДНК и может происходить или одновременно или последовательно. При последовательной инициации синтез дочерней цепи сопровождается вытеснением одной из родительских, а синтез комплементарной цепи идет на односторонней матрице по репарационному механизму (рис. 12-2).

В то же время обсуждается и другой механизм синтеза второй нити. Замещенная родительская онДНК имеет на концах самокомплементарные инвертированные повторы, которые отжигаются (образуется структура «сковороды» с ручкой), восстанавливая двунитевую точку *оg₁*, узнаваемую иницирующими белками, обеспечивающими синтез родительско-дочернего дуплекса. Таким образом, каждый родительский дуплекс копируется полуконсервативно. Однако процесс протекает без синтеза отстающей цепи, т.е. без образования множественных сайтов инициации и синтеза фрагментов Оказаки.

После синтеза вирусной ДНК наступает этап транскрипции поздних генов-L, кодирующих структурные белки вириона. Для поздней транскрипции используются только вновь синтезированные ДНК. У аденовирусов осуществляется временная тип регуляции транскрипции.

После синтеза вирионных белков в цитоплазме происходит сборка незрелого вириона. Он образуется путем преформирования гексонов и пентонов – протомеров, формирующих капсомеры. Незрелый вирион поступает в ядро, где служит основой для инкапсидации ДНК и формирования целого вириона. Вирионы накапливаются в ядре, поскольку у аденовирусов нет механизма выхода. При длительной инфекции аденовирусный белок Е3 вызывает апоптоз клеток, опосредованный вирусными белками Е1а и Е1b, которые связывают репрессоры опухолевого роста Rb и p53, соответственно. При случайном лизисе клетки может произойти реактивация инфекции.

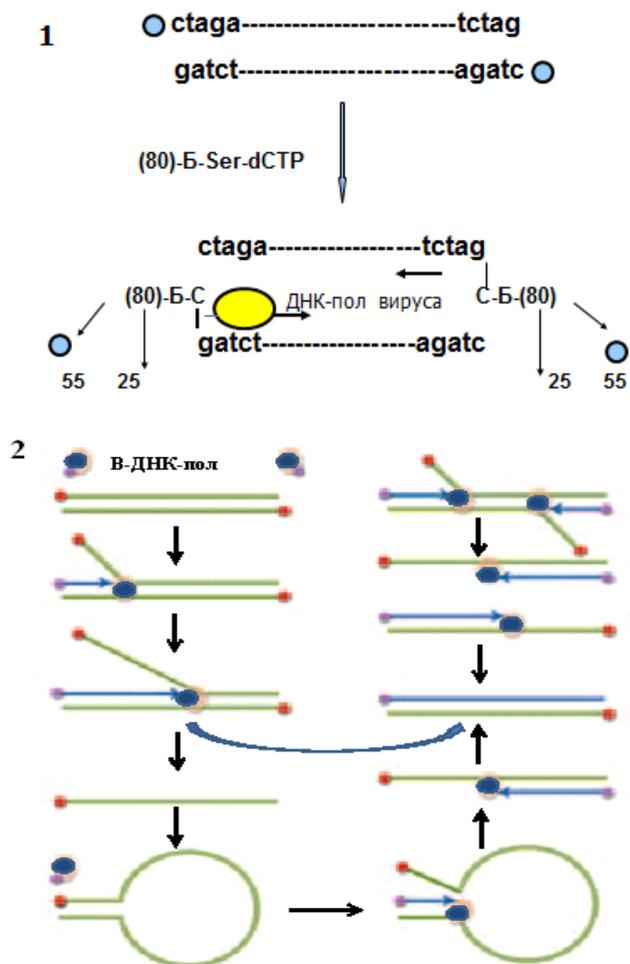


Рис.12. Репликация генома аденовирусов с использованием терминальной инициация с помощью Б-Н затравки

1 – формирование Б-Н затравки
2 – шаги дупликации ДНК

❖ **Репликация линейных днДНК геномов, способных образовать кольцо.** Механизм катящегося кольца.

Катящееся кольцо – способ репликации, при котором репликационная вилка совершает множество оборотов на кольцевой матрице. Синтезирующаяся в каждом цикле нить вытесняет прежнюю (гомологичную) цепь двунитевой молекулы, синтезированную в предыдущем цикле, образуя хвост, состоящий из набора последовательностей, комплементарных однонитевому матричному кольцу. В общих чертах репликация по механизму катящегося кольца имеет следующие стадии (рис.13):

- вирусоспецифический фермент вносит односторонний разрыв в уникальном сайте родительской цепи репликативной формы (1);
- фермент остается связанным с 5'-концом, освободившийся 3'-концевой нуклеотид служит затравкой для ДНК-полимеразы (2);

• ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды комплементарно замкнутой цепи, то есть синтезируется только лидирующая цепь. 5'-конец родительской цепи вытесняется в конкатемерной форме (3). Наблюдается образование сигма-молекул (δ);

• после того, как репликационная вилка завершит чуть больше полного оборота, вытесненная цепь может замкнуться в кольцо, а фермент переместиться на вновь синтезированную нить и повторить цикл. Таким образом, вновь синтезированная нить, имеющая последовательность геномной, становится компонентом РФ, а предшествующая (родительская) оказывается в свободном виде (4).

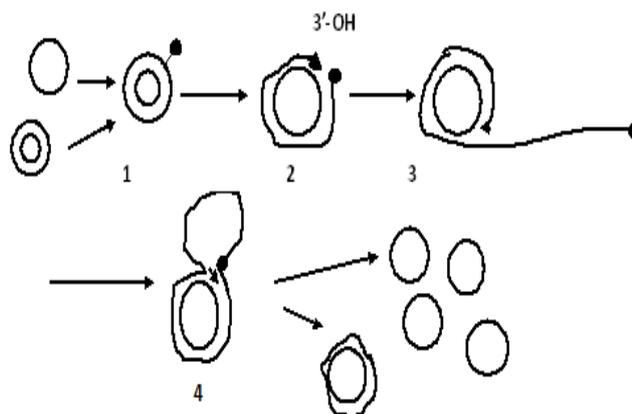


Рис.13. Схема репликации ДНК-геномов по механизму катящегося кольца

Механизм катящегося кольца при репликации ДНК используют многие бактериофаги, например бактериофаг λ (*Caudovirales*, *Siphoviridae* – вирусы с длинным хвостовым отростком), не игнорируют его и вирусы эукариот.

Герпесвирусы (*Herpesviridae*).

В настоящее время к герпесвирусам отнесены более 100 вирусов различных видов позвоночных животных (обезьян, лошадей, крупного рогатого скота, овец, свиней, кроликов, кошек, собак, мышей, крыс, птиц, морских свинок) и человека. Среди герпесвирусов, поражающих человека, наиболее значимы вирусы простого герпеса типов 1 и 2 (ВПГ1, ВПГ-2, *Simplexvirus*), цитомегаловирус (ЦМВ, *Cytomegalovirus*) и вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ, *Lymphocryptovirus*). Герпесвирусы вызывают целый ряд заболеваний человека из которых приведем только некоторые: герпетический гингивостоматит, рецидивирующий герпес, герпетический кератит (ВПГ-1); генитальный герпес, герпес новорожденных, герпетический менингоэнцефалит, рак шейки матки (ВПГ-2); лимфома Беркитта, инфекционный мононуклеоз, назофарингиальная карцинома (ВЭБ); внутриутробная инфекция (ЦМВ) и др.

Герпесвирусы имеют оболочечный вирион от сферического до плейоморфного размером 120-200 нм, включающий не менее 30 структурных белков (рис.14). Оболочка – липопротеиновая мембрана клеточного происхождения, чаще мембрана Гольджи, реже ЭПР, включает множество пепломеров. Под оболочкой находится матрикс (тегумент), содержащий не менее 15 белков. Внутри расположен капсид, представляющий собой икосаэдр размером 100-110 нм (Т=16), образованный 6-ю белками, формирующими 162 капсомера (150 гексомеров, 12 пентамеров), имеются каналы диаметром 4 нм. Внутри капсида находится ДНК.

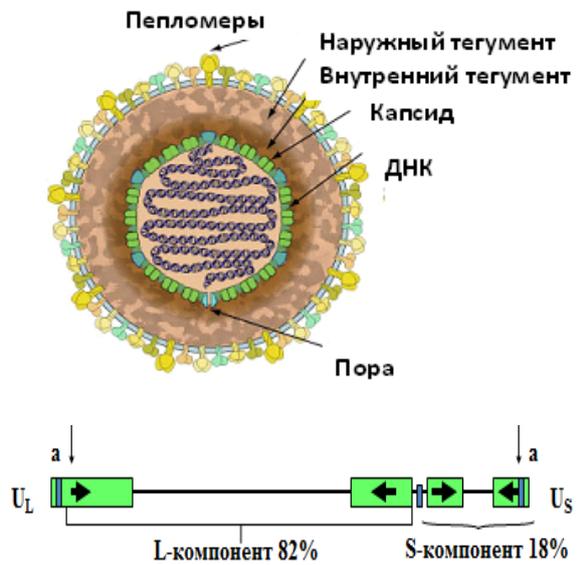


Рис.14. Структура вириона и генома герпесвирусов

Геном герпесвирусов – линейная днДНК размером 125-240 т.п.н., богата G-C (32-75%), составляет 10% массы вириона. Количество ОРС у разных вирусов колеблется от 70 до 200. Выделенная ДНК имеет множественные концевые повторы и внутренние повторения концевых последовательностей. Имеет односторонние разрывы и односторонние пробелы. Во многих лабораториях обнаружена гомология между ДНК герпесвирусов (ВЕБ) и клеточной ДНК, что предполагает наличие сайтов интеграции.

ДНК герпесвирусов – молекула, состоящая из двух ковалентно-связанных компонентов – длинного L-компонента и короткого S-компонента (82 и 18%, соответственно). Каждый компонент состоит в основном из уникальных последовательностей и фланкирован инвертированными повторами. Выделено как минимум

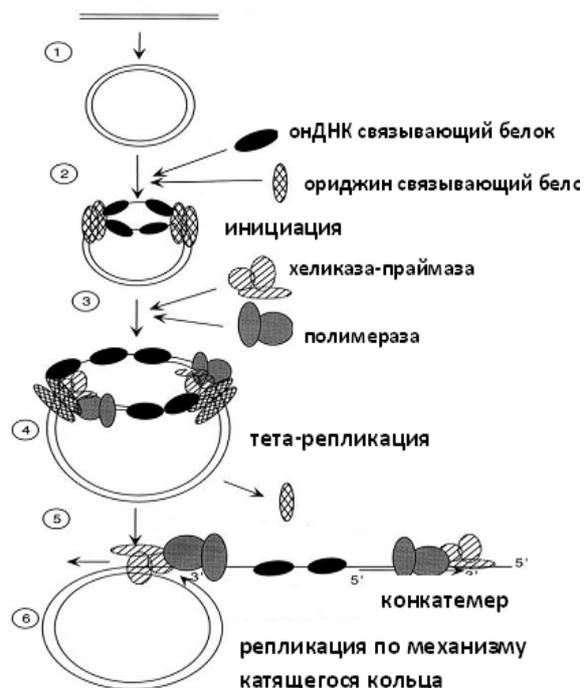


Рис. 15. Репликация днДНК генома (Е-тип) герпесвирусов

5 различных типов внутренней организации ДНК у различных герпесвирусов. На концах молекулы ДНК всех герпесвирусов находятся α -последовательности, которые, после проникновения и разведения ДНК, атакуются эндонуклеазой рестрикции, отщепляющей однонитевые фрагменты с образованием **липких концов**. Это позволяет молекуле перейти в кольцевую форму и, пройдя первую стадию двунаправленной тета-репликации (см. ниже), реализовать механизм катящегося кольца. Однако, вместо производства кольцевых дочерних молекул, репликация генерирует конкатемерные молекулы (рис.15). Чтобы восстановить линейные дочерние молекулы ДНК вирусоспецифические белки расщепляют конкатемеры в определенных сайтах последовательности в процессе упаковки ДНК в капсиды.

❖ **Репликация кольцевых днДНК геномов** с образованием двух репликативных вилок (схема Кернса или тета-репликация).

Кольцевую ДНК имеют представители 3-х семейств вирусов: полиомавирусы (*Polyomaviridae*, например, обезьяний вирус SV40), папилломавирусы (*Papillomaviridae* – насчитывают 60 с/т, которые являются причиной новообразований и цервикальной карциномы), бакуловирусы (*Baculoviridae* – вирусы насекомых, используемые в качестве биорегуляторов численности насекомых и для получения рекомбинантных белков в лабораторных условиях).

Полиома- и папилломавирусы – это безоболочечные, относительно мелкие (45-55 нм) икосаэдрические (T=3) вирусы. Капсид образован тремя белками, имеет четко выраженную капсомерную структуру (72 капсомера). Вирусы реплицируются в ядре. Геном – двунитевая кольцевая сверхспирализованная ДНК размером 5-8 т.п.н., ассоциирована с 4-мя клеточными гистонами (рис.16) Кодировать два неструктурных белка – большой и малый Т-АГ. Это трансформирующие антигены. Гены Т-АГ транскрибируются сразу после попадания ДНК в ядро. Таким образом, транскрипция ДНК у этих вирусов опережает репликацию. Геном может интегрироваться с геномом клетки хозяина.

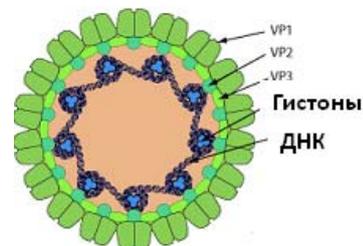


Рис.16. Структурная организация вириона полиомавируса

Репликация ДНК этих вирусов представляет собой полуконсервативную репликацию по типу «глазков» с образованием двух репликативных вилок. Детально изучена репликация обезьяньего полиомавируса SV40, где вовлеченные репликативные белки были идентифицированы в бесклеточной системе *in vitro*. Установлено, что в репликации ДНК SV40 принимают участие 10 белков. Девять из них имеют клеточное происхождение. Единственный вирусный белок, который требуется для репликации ДНК SV40 – это большой

Т-антиген, который обладает свойствами хеликазы и обеспечивает расплетение двунитевой структуры в репликативной вилке. В общих чертах репликация включает несколько этапов (рис.17):

- вирусоспецифический неструктурный белок (большой Т-АГ), обладающий хеликазной активностью, связывается с ДНК-последовательностью в точке *ori* и расплетает двунитевую структуру;

- праймаза синтезирует две РНК-затравки. Образуются две репликативные вилки (2 лидирующие и 2 отстающие цепи), которые в процессе комплементарного синтеза удаляются друг от друга, двигаясь в разных направлениях, т.е. репликация двунаправленная. Все белки репликативного комплекса (9 белков) имеют клеточное происхождение, и только 1 (Т-АГ) – вирусное. В результате

двунаправленного синтеза наблюдается образование тета-молекул (θ);

- сбрасывание внутримолекулярного напряжения обеспечивает топоизомераза I путем внесения точечных одностебельных разрывов, которые тут же лигируются. Образуются два двунитевых кольца, где родительские цепи соединены друг с другом. Разъединение осуществляет топоизомераза II, которая вносит разрывы в двунитевые кольца. Затем разрывы лигируются. Образуются два двунитевых кольца, где одна нить – материнская, другая синтезирована вновь.

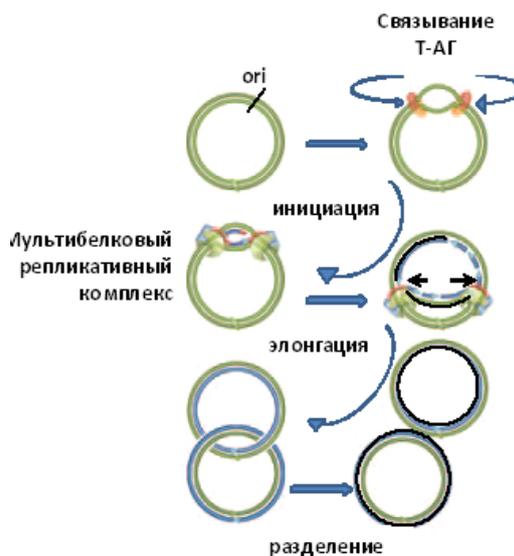


Рис. 17. Репликация кольцевой ДНК по схеме Кернса (тета-репликация)

3.1.2.4 Репликация геномов онДНК-содержащих вирусов

Группа II вирусов включает как минимум 9 семейств вирусов, объединяющих 43 рода. Вирусы этой группы имеют очень широкий круг хозяев: бактерии и археи, беспозвоночные и позвоночные животные, растения. Для человека патогенны представители семейств *Anelloviridae* (могут быть связаны с различными болезнями: гепатит, болезни легких, гематологические нарушения, миопатия и волчанка) и *Parvoviridae*.

онДНК геномы вирусов могут быть кольцевыми (бактериофаги *Inoviridae*) и линейными (*Parvoviridae*). Репликация кольцевой онДНК бактериофагов происходит с использованием сигма- или тета- механизмов после воссоздания двунитевой репликативной формы по стандартному механизму репарационного синтеза. Линейные онДНК геномы используют

уникальный многоступенчатый синтез, в результате реализации которого образуется дисперсная молекула ДНК.

❖ **Репликация с использованием терминальной инициации при помощи самозатраповочного механизма вращения шпильки (rolling-hairpin mechanism).**

Парвовирусы (*Parvoviridae*).

Семейство включает вирусы, поражающие человека и животных (*Parvovirinae*), в том числе дефектные вирусы-сателлиты (*Dependovirus, AAV*), и вирусы, поражающие насекомых (*Densovirinae*). Значение в инфекционной патологии человека имеют бокавирусы (*Bocaparvovirus*, возбудители диареи и ОРЗ) и эритровирусы (*Erythrovirus*, в частности вирус В19, вызывающий эритему, артрит, водянку плода, тяжелую анемию).

Парвовирусы – самые мелкие из вирусов эукариот (18-26 нм) икосаэдрические, безоболочечные, ядерные вирусы. Капсид образован 60-ю копиями (Т=1) капсидного белка (СР). Геном парвовирусов представлен линейной онДНК, размером 4-6 т.н.о., преимущественно отрицательной полярности (рис.18). Геном может быть представлен как минус-нитью (вирус В19), так и плюс-нитью ДНК. Так, у аденоассоциированных вирусов (AAV) нити двух полярностей инкапсидированы в разные вирионы.

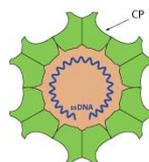


Рис.18. Структурная организация вириона и генома парвовирусов

Геномы автономных парвовирусов (В19) и вирусов-сателлитов (AAV), несмотря на существование ряда отличий в структурной организации, характеризуются наличием на концах ДНК инвертированных и палиндромных (симметричные самокомплементарные, содержащие GC-пары) последовательностей, самопроизвольно формирующих шпильчатые структуры. При этом 3'-последовательности формируют уникальные Y- или T-образные симметричные шпильки, а шпильки, образующиеся на 5'-конце, не являются уникальными и абсолютно симметричными.

Парвовирусы проникают в клетку с использованием клатрин-опосредованного рецепторного эндоцитоза. Вирион выходит в цитоплазму через пермеабиллизацию эндосомальной мембраны и транспортируется к ядру с использованием микротубулярного транспорта. Вирусная онДНК пенетрирует в ядро, где клеточная ДНК-полимераза, используя свободный 3'-конец шпильки в качестве праймера в результате репарационного синтеза (без синтеза отстающей цепи) комплементарной цепи воссоздается дуплекс, обе цепи

которого на концах ковалентно соединены. Образованная днДНК-репликативная форма далее служит для транскрипции и репликации.

Репликация ДНК автономных парвовирусов начинается с внесения вирусной эндонуклеазой NS1, ковалентно связанной с 5'-концом, однонитевого разрыва между кодирующей последовательностью и шпилькой, что инициирует *механизм катящейся шпильки* (рис.19).

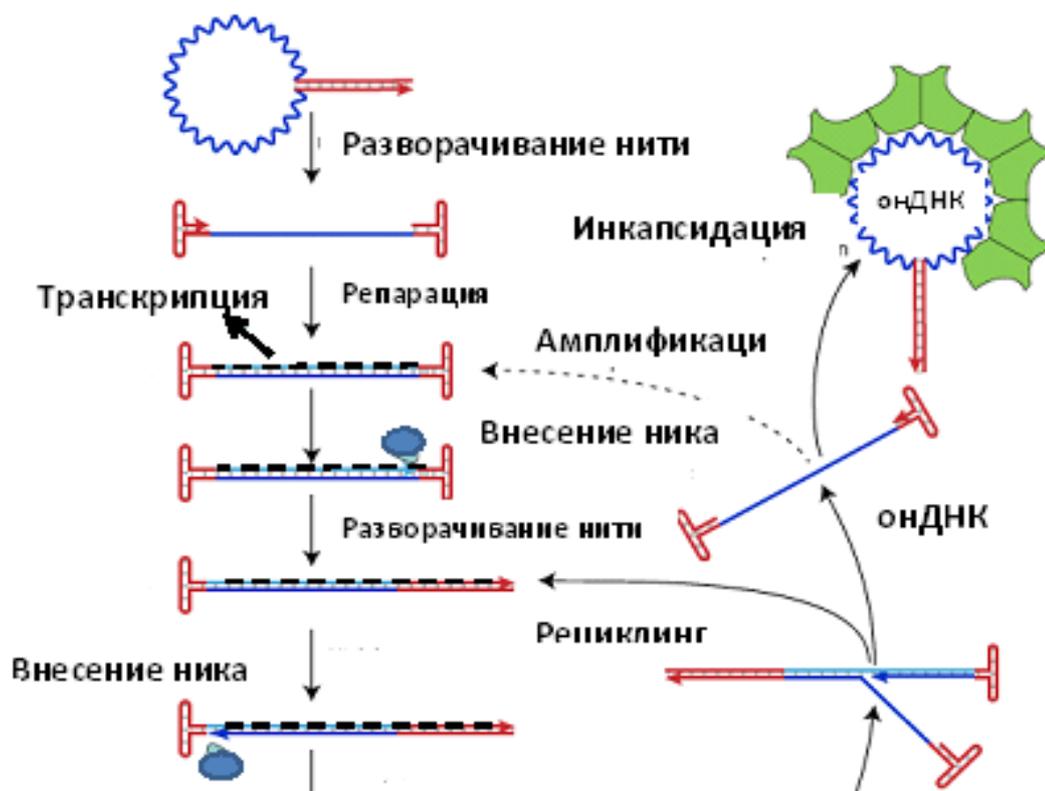


Рис.19. Репликация онДНК парвовирусов с использованием терминальной инициации по механизму катящейся (подвижной) шпильки

Пунктиром показаны вновь синтезированные участки.

Внесение первого ника и разворачивание шпильки позволяет воссоздать дуплекс на 5'-конце генома, при этом 3'-концевой сегмент родительского генома в качестве матрицы не используется. Следовательно, полного воспроизведения вирусного генома пока не произошло. На следующем этапе никаза вносит второй разрыв в родительскую цепь на границе между реплицированным и не реплицированным участками последовательности (между 125 и 126 нуклеотидами). Концевые 125 нуклеотидов родительского генома становятся условной частью вновь синтезированной цепи и возникший таким образом 3'-конец родительской цепи используется для ее регенерации.

В результате этих реакций возникает дисперсная двунитевая вторая репликативная форма вирусной ДНК. Далее следует цепь реакций, включающих образование на одном из концов ДНК-затравки в виде «заячьих ушек», синтез новой цепи с вытеснением родительской. Очередной репликативный интермедиат используется в качестве матрицы для дальнейшего синтеза вирусной ДНК, а вытесненная из дуплекса одонитевая молекула или вступает в репликативный цикл или входит в состав дочерней вирусной частицы.

Парвовирусы могут реплицировать свою ДНК и осуществлять полный инфекционный цикл только в клетках, находящихся в стадии репликации ДНК — то есть в S-фазе клеточного цикла. Фактически, экспрессия вирусных генов не активизируется до тех пор, пока клетка не войдет в S-фазу и ДНК-геном вируса не будет преобразован в двунитевую РФ, которая является матрицей для транскрипции. Однако, в отличие от других вирусов, которые требуют, чтобы клетки активно копировали свою ДНК, парвовирусы неспособны стимулировать переход клетки в S-фазу. В связи с этим, они могут выполнять успешную репродукцию только в том случае, если попадают в клетку, уже осуществляющую синтез ДНК. Некоторые парвовирусы, особенно аденассоциированный вирус (AAV), имеют даже более строгие требования и могут копироваться только в присутствии помощника — аденовируса или вируса герпеса, генные продукты которых активируют экспрессию генов парвовируса и репликацию его ДНК. Парвовирусы покидают клетку путем лизиса.

3.2 Генетические стратегии РНК-геномных вирусов, не требующих обратной транскрипции (рибовирусов)

3.2.1 Виды РНК-геномов вирусов

РНК-геномы вирусов являются примерами структурного разнообразия. Различные семейства РНК-содержащих вирусов имеют геномы, представленные двунитевой (дн) или однонитевой (он) РНК, каждая из которых может быть линейной или кольцевой, может быть единственной или состоять из многих долей (рис. 20).

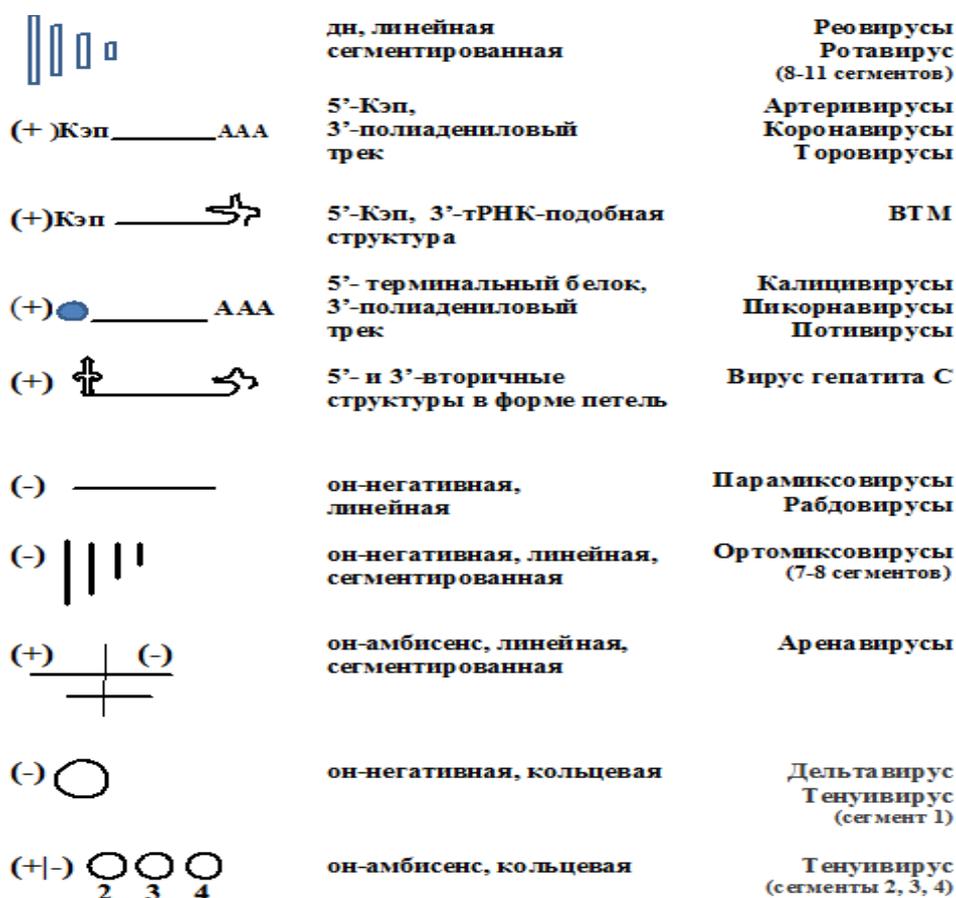


Рис. 20. Разнообразие структурной организации генома РНК-содержащих вирусов

Многообразие видов РНК-геномов расширяется за счет существования последовательностей, отличающихся направлением связей сахаро-фосфатного

остова. Однонитевые РНК могут иметь позитивную полярность – (+)РНК, негативную полярность – (-)РНК или могут быть представлены обоюдозначающей цепью – (+,-)РНК (амбисенс стратегия кодирования). В свою очередь, РНК позитивной полярности могут иметь разную структурную организацию. Являясь матричной РНК, могут иметь на 5'-конце кэп (7-метилгуанозин) или геномный белок, или вторичную структуру, состоящую из петель. На 3'-конце РНК может быть поли-А последовательность или короткий поли-С трек, может быть тРНК-подобная или шпилечная структуры. Каждая разновидность генома имеет свои стратегии экспрессии генов, репликации генома и его упаковки в вирионы.

Одно- и двунитевые РНК-геномы вирусов. Семейства онРНК-вирусов превосходят численностью семейства вирусов с днРНК геномом почти в 10 раз. Ввиду большей стабильности двунитевых нуклеиновых кислот, это различие требует объяснения. Кажутся вероятными две причины, объясняющие относительный дефицит днРНК вирусов:

- наличие эквимольного количества анти-смысловых нитей и как следствие – подавление трансляции;
- днРНК является индуктором системы интерферона у позвоночных, которая направлена на подавление вирусной репликации.

Эти же самые причины важны и для онРНК-содержащих вирусов. Чтобы ограничить накопление промежуточных репликативных форм, содержащих двунитевые области, вирусы разработали стратегии, различающиеся у (+)РНК и (-)РНК. Все (+)РНК-содержащие вирусы синтезируют непропорционально низкие уровни негативных нитей – 1-5% от уровня положительной РНК и таким образом минимизируют потенциал для накопления днРНК. Наоборот, (-)РНК-вирусы нуждаются в существенных количествах (+)РНК нитей, чтобы использовать их в качестве матрицы для синтеза геномного потомства. Обычно (-)РНК-вирусы предотвращают отжиг (+) и (-) нитей, сохраняя геномную РНК в составе нуклеокапсида.

(+)РНК и (-)РНК геномы. Различие между положительным и отрицательным РНК-геномами определяется полярностью нитей, инкапсидированных в вирионы, и внутриклеточной стратегией репродукции. (+)РНК-геном, попав в клетку, сразу транслирует неструктурные белки, в первую очередь – RdRp. После того, как синтезированные вирусоспецифическая RdRp и другие неструктурные белки покидают рибосомы начинается репликация РНК. Затем вновь синтезированные структурные белки вириона и РНК ассемблируют с образованием вирусного потомства. В противовес этому, (-)РНК-геномы и их антигеномные комплексы остаются связанными с белками нуклеокапсида, как в пределах вирусных частиц, так и в течение всего цикла вирусной репликации. Эти фундаментальные адаптационные различия основаны на том, что геномы положительной полярности должны удовлетворять трансляционным критериям, которые диктуются клеткой-хозяином, в то время как негативные геномы и антигеномы должны удовлетворять только матричным требованиям вирусоспецифической RdRp, в связи с тем, что они копируются, но никогда не транслируются. Хотя до настоящего времени остается неясным, как полимераза

может копировать покрытые белком РНК-матрицы. Сегментированные днРНК-геномы являются промежуточными между этими крайностями: родительские доли генома остаются изолированными в субвирусных частицах на протяжении всего инфекционного цикла. Однако следует учитывать, что положительные нити-предшественники днРНК потомства изначально не инкапсидированы. Вероятно, эти вариации отражают существенные различия в структурах вирусных комплексов RdRp-матрица и в молекулярных механизмах репликации положительных, отрицательных и днРНК-геномов.

Линейные и кольцевые РНК-геномы. В отличие от ДНК-полимераз, большинство РНК-полимераз не требует затравок, так что РНК-геномы менее восприимчивы к проблеме синтеза концевых последовательностей. Соответственно, большинство РНК-геномов вирусов – линейные молекулы. Ковалентно-замкнутые кольцевые РНК найдены только у вируса гепатита дельта животных, среди вироидов и некоторых других субвирусных РНК-патогенов, которые инфицируют растения. Однако концы линейных рибонуклеиновых кислот особенно чувствительны к деградации и их репликация особенно склонна к ошибкам. Следовательно, каждое семейство РНК-вирусов имеет особенности, разработанные для сохранения концов генома. Например, множество РНК-геномов положительной полярности несут 5'-кэп и 3'-поли-А трек, которые защищают от деградации концы последовательности эукариотических мРНК. Подобную роль, вероятно, выполняет геномный белок (Vpg), который ковалентно связан к 5'-концом РНК пикорнавирусов, а также устойчивые вторичные структуры РНК, найденные на 3'-конце РНК ряда флавивирусов и в других геномах. 3'-концы многих рибонуклеиновых кислот вирусов растений формируют структуры типа «кленового листа», которые подобны клеточным тРНК.

В отличие от (+)РНК-геномов вирусов, негативные и амбисенс РНК-геномы обычно обладают некоторой степенью комплементарности концевой последовательности, которая, как думают, стабилизирует вирусный нуклеокапсид и промотирует репликацию РНК, возможно, делая матрицу функционально кольцевой

Сегментированные и несегментированные РНК-геномы. Сегментация генома вирусов облегчает синтез индивидуальных белков в эукариотических клетках. Это означает, что каждая доля генома для обеспечения экспрессии, репликации и сборки вирионов должна содержать соответствующие регуляторные cis-acting сигналы. В некоторых семействах вирусов с сегментированным геномом (*Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*) эти сигналы включают консервативные для всех сегментов концевые последовательности, но у вирусов других семейств (бипартитные *Noda-* и *Tetraviridae*), существенных консервативных последовательностей у разных долей генома не выявлено. В этих случаях специфичность репликации РНК и сборки вирионов, возможно, определяется консервативностью вторичной или третичной структуры РНК.

3.2.2 Экспрессия генов РНК-содержащих вирусов

Транскрипция РНК-геномов вирусов осуществляется вирусоспецифической РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp), которая может входить в состав вириона (днРНК- и (-)РНК-содержащие вирусы), или быть детерминированной геномом (+)РНК-содержащих вирусов

У РНК-содержащих вирусов RdRp является и транскриптазой и репликазой, процессы репликация и транскрипции взаимосвязанны и часто их трудно разделить. Так у (+)РНК-вирусов геном является мРНК и, попав в клетку, сразу транслируется. Синтезированная RdRp запускает первый этап репликации – синтез промежуточной (-)нити, служащей матрицей для синтеза (+)нити. В связи с этим транскрипция является вторым этапом репликации. У (-)РНК-вирусов и днРНК-вирусов транскрипция является первым этапом репликации, где полноразмерный (+)-антигеном служит матрицей для синтеза геномных минус-нитей. Переключение транскрипции на репликацию часто определяется пулом вновь синтезированных вирусных белков, когда их избыток начинает тормозить трансляцию и возникает необходимость для инкапсидации геномных последовательностей.

Процесс синтеза РНК на матрице РНК имеет три стандартных этапа – инициацию, элонгацию, терминацию. Однако, в отличие от ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которая требует для инициации синтеза затравки, RdRp может инициировать синтез *de novo* (3'-концевая инициация, инициация на внутреннем участке с использованием NP) и с использованием праймера (белок-нуклеотидной затравки или кэпированного олигонуклеотида).

Синтезированные мРНК подвергаются посттранскрипционным модификациям – кэпированию 5'-конца, полиаденилированию 3'-конца и сплайсингу. Однако не все РНК-вирусы осуществляют все три процесса созревания мРНК. Вирусные мРНК, имеющие на 5'-конце кэп, приобретают его по-разному. Например, реовирусы имеют в составе вириона 7-метилгуанидилтрансферазу и кэпируют свои мРНК в составе субвирусной частицы. Уникальный механизм кэпирования используют ортомиксовирусы (вирусы гриппа), у которых транскрипция протекает в ядре в составе РНП. В качестве затравки для РНК-полимеразы используются фрагменты транскриптов клеточных мРНК. Вирусоспецифический белок (Р-белок) узнает кэпированные 5'-концы этих транскриптов и фиксирует их на 3'-конце геномных РНК. Затем этот же или другой белок вносит одноцепочечный разрыв на расстоянии 10-13 нуклеотидов от 5'-конца транскрипта. Возникающий короткий клеточный кэпированный олигонуклеотид является затравкой для синтеза вирусных мРНК и входит в их состав.

Механизмы полиаденилирования 3'-концов мРНК РНК-содержащих вирусов могут отличаться от синтеза, опосредованного поли-А-полимеразой. Так, у вируса гриппа и вируса везикулярного стоматита поли-А последовательность на 3'-конце мРНК образуется за счет пробуксовывания RdRp в специфических, богатых уридином, участках последовательности

матрицы. Кэпированные и полиаденилированные мРНК вирусов транслируются с использованием клеточного кэп-зависимого механизма.

Матричная РНК (она же является геномной РНК) ряда (+)РНК-содержащих вирусов (пикорнавирусов: энтеровирусов, риновирусов, кардиовирусов, гепавирусов, афтовирусов; гепацивирусов: вируса гепатита С и др.) не имеет кэп-структуры, 5'-конец РНК представляет собой сложную вторичную структуру, состоящую из множества петель и расположенную перед AUG кодоном. Этот участок РНК последовательности, способный связываться с рибосомами, получил название IRES (англ. *Internal Ribosomal Entry Site*) – внутренний сайт связывания рибосомы. Следует отметить, что у разных вирусов, структура этой области РНК различна (рис. 21). Наличие IRES обеспечивает вирусам кэп-независимую трансляцию.

Трансляция. Основная масса РНК-содержащих вирусов – вирусы эукариот. Среди вирусов прокариот РНК-содержащими являются *Cystoviridae* (днРНК вирусы) и *Leviviridae* (+РНК вирусы). Реплицируясь в эукариотических клетках вирусы должны подчиниться правилу – одна мРНК-один белок. Ограничения хозяина РНК-вирусы преодолевают путем сегментации генома (вирусы гриппа, *Orthomyxoviridae*), путем синтеза субгеномных мРНК (коронавирусы, *Coronaviridae*) и путем синтеза полипротеина (энтеровирусы, *Picornaviridae*).

Синтез полипротеина осуществляют вирусы, геномная (+)РНК которых не имеет кэпа и транслируется с использованием IRES-зависимого механизма.

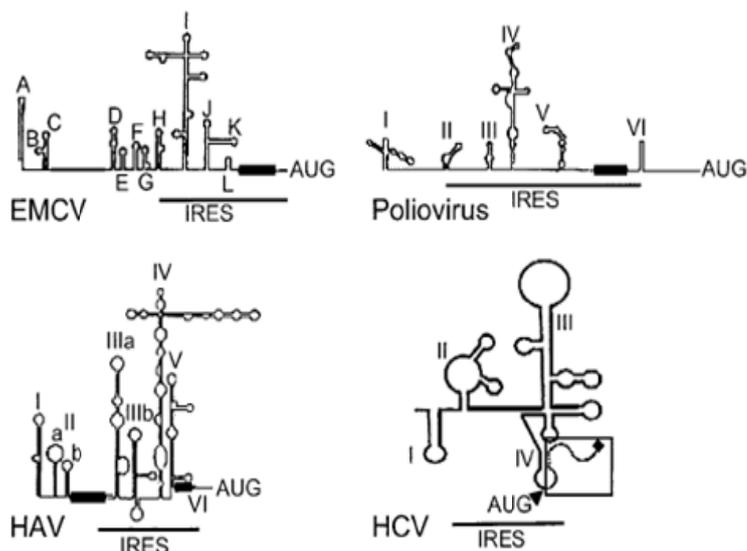


Рис. 21. Структура IRES, расположенного на 5'-НТФ генома вируса энцефаломиокардита (EMCV), полиовируса (PV), вируса гепатита А (HAV) и вируса гепатита С (HCV)

3.2.3 Репликация РНК-геномов вирусов

3.2.3.1 Общие принципы репликации РНК-геномов

РНК-содержащие вирусы, не требующие обратной транскрипции, копируют свои геномы с использованием РНК-зависимого синтеза РНК, что требует работы фермента, который обычно отсутствует в неинфицированных клетках-хозяевах. В связи с этим, РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) должна быть генетически детерминирована вирусом и экспрессирована в течение инфекции. В некоторых семействах РНК-содержащих вирусов эти уникальные синтетические процессы необходимы на первых стадиях инфекционного цикла, что требует наличия упакованных в вирион полимеразы и других ферментов, необходимых для осуществления следующего цикла инфекции.

Внутриклеточные места репликации РНК-геномов вирусов.

Основная масса РНК-содержащих вирусов эукариот реплицируется в цитоплазме. Однако известен ряд исключений из этого правила. Так, целый ряд вирусов, например ортомиксо- и борнавирусы, чей геном представлен линейной (-)РНК, и кольцевая РНК вируса гепатита дельта, подобная вириодам растений, реплицируются в ядре. Каждый компартмент клетки имеет свои возможности и резервы, определяемые доступностью клеточных компонентов и биохимических путей, которые могут быть использованы и скоординированы вирусами.

Мембраны клетки-хозяина. В отличие от фаговых репликаз, RdRp вирусов эукариот связана с надмолекулярными структурами: мембранами клетки-хозяина у (+)РНК-вирусов, нуклеокапсидом у (-)РНК-вирусов и субвирусными частицами у днРНК-вирусов. Внутриклеточные мембраны клеток, инфицированных вирусами с (+)РНК-геномом, подвергаются быстрому перераспределению, формируя места заякоривания вирусных репликативных комплексов. Когда эти комплексы отсоединяются от мембран, они теряют способность катализировать истинную репликацию РНК, хотя часто сохраняют ограниченную способность копировать РНК-матрицу, т.е. мембранная организация играет центральную роль в репликации (+)РНК. Хотя определенная роль мембран неясна, вероятно, они могут ускорять сборку репликативных комплексов, сокращая время процесса и отделяя дочерние молекулы от матриц.

Следует учитывать, что репликация (-)РНК геномов идет через синтез полноразмерной репликативной (+)нити, а синтез (+)РНК геномов идет на матрице полноразмерного антигена негательной полярности.

3.2.3.2 Репликация днРНК-геномов вирусов

Группа III вирусов включает не менее 12 семейств, объединяющих 36 родов вирусов, геном которых представлен двунитевой РНК, которая может быть линейной монолитной или линейной сегментированной (от 2 до 12 сегментов). Вирионы днРНК-содержащих вирусов могут быть оболочечными (*Cystoviridae*), безоболочечными икосаэдрами (*Totiviridae*), могут не иметь истинного капсида, когда геном вместе с RdRp заключен в плейоморфную липидную везикулу (*Hypoviridae*) или представлять собой сложную трехслойную двукапсидную частицу (*Reoviridae*).

днРНК-содержащие вирусы поражают бактерий, дрожжи, простейших, грибы, беспозвоночных и позвоночных животных. Среди вирусов, значимых в инфекционной патологии человека, следует отметить представителей семейства *Reoviridae*: возбудителей энцефалита (*Seadornavirus*), лихорадки (*Coltivirus*), диареи (*Rotavirus*).

Ротавирусы (*Reoviridae*, *Sedoreovirinae*, *Rotavirus*) являются наиболее распространенной причиной тяжелой диареи у детей и молодняка животных.

У ротавирусов идентифицировано 7 групп вирусов – от А до G, среди которых ротавирусы групп А, В и С являются патогенными для человека. На долю ротавирусов группы (вида) А (РВ-А) приходится 98% штаммов.

Вирион – безоболочечная трехслойная частица $d=75$ нм, на поверхности располагаются 60 двулопастных выступов (spike), имеется 132 канала (рис.22).

Наружный капсид ротавириона образован двумя белками VP7 и VP4, которые несут типовые антигенные детерминанты и определяют существование G и P серологических типов (генотипов) ротавируса, соответственно. Существует не менее 27G и 37[P] генотипов вируса. Промежуточный капсид ротавириона имеет икосаэдрическую симметрию (T=13), образован одним белком VP6, несущим групповые эпитопы.

Внутренний капсид ротавириона также представляет собой икосаэдр, образованный белком VP2 (T=2).

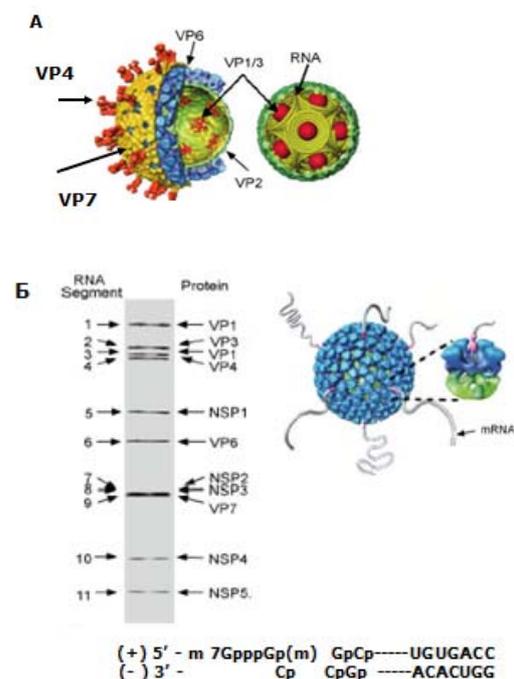


Рис. 22. Структурная и молекулярная организация вириона (А) и генома ротавируса вида А (Б)

Геном ротавирусов представлен 11-ю сегментами линейной днРНК размером 667-3302 п.н.о., общий размер генома составляет 18 550 н.о. (для вируса обезьян SiRV-A/SA11). Большинство сегментов моноцистронны. Сегмент 11 РВ-А бицистронен, дополнительно кодирует второй белок NSP6. 5'-конец (+)нити всех сегментов кэпирован, 3'-конец заканчивается последовательностью UGACC. Каждый сегмент днРНК ассоциирован с полимеразным комплексом VP1/3, состоящим из РНК-полимеразы и метилгуанил-трансферазы (М-GT). Геном ротавирусов неинфекционен, т.к. жизненный цикл вируса начинается с транскрипции.

Входными воротами для ротавирусов служат клетки эпителия верхних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, местом основной репликации – верхние отделы тонкого кишечника, клетка-хозяин – энтероциты. Ротавирусы адсорбируются путем взаимодействия с мембранными молекулами интегринового суперсемейства ($\alpha\upsilon\beta3$, $\alpha4\beta1$, $\alpha2\beta1$) и проникают в клетку с использованием рецепторного клатрин-опосредованного эндоцитоза. После поступления рецептосомы в цитоплазму она теряет Ca^{+2} , т.к. в межклеточном пространстве кальция больше, чем внутри клетки. Потеря кальция дестабилизирует наружный капсид вириона, происходит сдувание белков VP7 и VP4, которые в свою очередь дезинтегрируют мембрану эндосомы. В цитоплазму выходит двуслойная субвирусная частица, т.е. геном до конца не раздевается, чтобы не индуцировать противовирусный ответ клетки (днРНК является интерференогеном). Частичное раздевание вириона дает возможность доступа через каналы внутрь частицы нуклеозидтрифосфатов, что активирует полимеразный комплекс. Фрагменты днРНК в пределах субвирусных частиц транскрибируются связанными RdRp's, производя мРНК, которые кэпируются внутри частицы М-GT. Синтезированные мРНК покидают субвирусную частицу через поры. В 1971 году Шонбергом было показано, что у реовирусов субвирусную частицу покидают вновь синтезированные молекулы РНК, т.е. репликация идет без вытеснения родительской цепи. мРНК каждого фрагмента транслируется в кэп-зависимом механизме с образованием в первую очередь неструктурных, а затем структурных белков.

После накопления достаточного пула белков они начинают ассемблировать в цитоплазме вокруг мРНК. В состав ансамбля входит и RdRp, которая инициирует синтез (-)нити РНК на (+)РНК матрице, что и дает двунитевые доли генома. Элонгация (-)нити происходит одновременно с формированием субвирусной частицы, т.е. вторая нить днРНК также является вновь синтезированной. Т.о., днРНК-геном ротавирусов реализует консервативную модель репликации. Далее новые субвирусные частицы вносят вклад в выражение вирусных генов и репликацию РНК. На следующем этапе жизненного цикла ротавирусов субвирусные частицы из цитоплазмы поступают в каналы ЭПР с помощью своего неструктурного гликопротеида – NSP4, выполняющего функцию транслоказы. При транслокации в просвет ЭПР субвирусные частицы приобретают временную оболочку, которая затем замещается белками наружного капсида VP7 и VP4. Вирионы покидают клетку

в результате ее некроза, связанного с накоплением вирусных токсических продуктов через 6 часов после инфицирования, максимум – через 15-24 часа.

В патогенезе ротавирусной инфекции определяющую роль играет неструктурный трансмембранный гликопротеин NSP4, который способен образовывать тетрамеры и формировать в мембранах Ca^{+2} -каналы, приводящие к внутриклеточному перераспределению кальция, что является причиной возникновения диареи.

При одновременном инфицировании клетки двумя вариантами ротавируса может произойти реассортация (пересортировка) генов и потомство будет иметь новые свойства. Пересортировка генов VP7 и VP4 служит механизмом возникновения новых G[P] комбинаций и вариантов ротавируса с эпидемическим потенциалом.

3.2.3.3 Репликация (+)РНК-геномов вирусов

Группа IV вирусов является самой многочисленной и включает не менее 32 семейств вирусов, объединяющих как минимум 129 родов, и 10 неклассифицированных родов вирусов. Имеются порядки: *Nidovirales* (4 семейства), *Picornavirales* (5 семейств) и *Tymovirales* (4 семейства). Вирусы с (+)РНК-геномом поражают бактерий, грибы, насекомых, растения, птиц, млекопитающих, в том числе человека.

Отличительной особенностью вирусов с (+)РНК-геномом является то, что их геном – это мРНК, которая, попав в цитоплазму клетки, сразу связывается с рибосомами. Т.е. **инфекционный цикл начинается с процесса трансляции**, соответственно, эти геномные РНК инфекционны, даже когда полностью депротенинированы. Однако, несмотря на это общее свойство, вирусы с (+)РНК геномом могут отличаться по многим позициям.

1. (+)РНК-содержащие вирусы различаются морфотипами вирионов. Имеются оболочечные (округлые, бацилоформные, плеоморфные) и безоболочечные (палочковидные, нитевидные, изометрические) вирусы со спиральным и икосаэдрическим типами симметрии.

2. Геномы (+)РНК-вирусов различаются структурной организацией 5'- и 3'- концов. На 5'-конце РНК может быть «кэп» или геномный пептид или вторичная структура из двунитевых петель, на 3'-конце – поли-А трек или вторичная структура, или короткая поли-С последовательность.

3. Геномы (+)РНК-вирусов могут быть «голыми» или находиться в составе РНП.

4. (+)РНК-содержащие вирусы, используя общую стратегию транскрипции на матрице минус-нити, реализуют два способа экспрессии генов: без образования субгеномных мРНК (например, энтеровирусы и другие пикорнавирусы) и с образованием субгеномных мРНК (например, коронавирусы и другие нидовирусы).

5. (+)РНК-содержащие вирусы могут реализовывать два способа трансляции – кэп-зависимую и кэп-независимую.

6. Все (+)РНК-содержащие вирусы реплицируются в цитоплазме. Репликация происходит по принципу РНК-зависимого синтеза РНК и идет через образование промежуточной репликативной формы. При этом могут быть использованы разные способы инициации репликации: с использованием белок-нуклеотидной затравки и *de novo*.

Рассмотрим особенности реализации генетической информации представителей этих двух групп (+)РНК-содержащих вирусов.

Энтеровирусы (*Picornavirales, Picornaviridae, Enterovirus*).

Род включают 9 видов (А-І) вирусов человека и животных, из которых патогенными для человека являются энтеровирусы видов А, В, С, D. От человека выделено не менее 111 типов энтеровирусов. Исторически серотипы энтеровирусов могут называться: вирусы ЕСНО, вирусы Коксаки А, Коксаки В и энтеровирусы. Начиная с ЭВ 68-го типа, новые вирусы называют только по номеру типа, названия «ЕСНО» и «Коксаки» не используются.

Вирионы энтеровирусов представляют собой безоболочечные икосаэдры, $d=30$ нм, $T=1$ (60 мономеров, псевдо $T=3$). Мономер образован четырьмя белками – VP1, VP2, VP3, экспонированных снаружи, и VP4, находящимся во внутренней части мономера. На поверхности вирионов находится 60 каньонов (углублений) в которых расположены антирецепторы (сайты связывания с рецептором). Также имеются гидрофобные карманы, содержащие по одной молекуле клеточного липида. Основные нейтрализующие антигенные детерминанты расположены на белке VP1. Первичную структуру области генома, кодирующей этот белок, используют для идентификации типа энтеровируса.

Белок VP1 несет антирецепторные участки. Для разных серотипов энтеровирусов клеточными рецепторами могут быть мембранные молекулы интегринового ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_2\beta_1$ интегрины) и иммуноглобулинового суперсемейств (CD54, CD55, CAR, PVR).

Геном энтеровирусов представляет собой РНК позитивной полярности размером 7,5 т.н.о. На 5'-конце РНК находится ковалентно связанный геномный пептид (VPg), далее за поли-уридиновым трактом следует IRES, 3'-конец РНК полиаденилирован. Геном (мРНК) энтеровирусов имеет одну

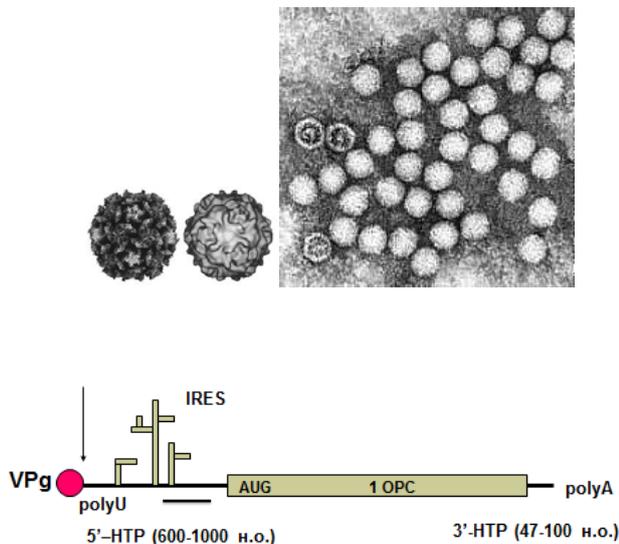


Рис. 23. Структурная организация вириона и генома энтеровирусов

открытую рамку считывания, кодирующую 4 структурных и 8 неструктурных белков. В одной ОРС выделено три зоны: P1 – кодирует структурные белки, P2 – протеазу и др. NS, P3 – полимеразу, VPg и NS (рис.23).

Энтеровирусы характеризуются политропностью и способны реплицироваться в клетках разных тканей (клетки слизистых верхних дыхательных путей, нервные клетки, клетки миокарда, клетки лимфоидной ткани, энтероциты, клетки кожи, клетки конъюнктивы) организма.

Вирусы проникают в клетку в конформационно зависимом процессе, через «установленную пору». Происходить это может, как путем прямой пенетрации через клеточную мембрану, так и пенетрации через мембрану рецептосомы в процессе рецепторного эндоцитоза (рис.24).

Стыковка антирецептора с клеточным рецептором в каньоне вириона ведет к потере липида из гидрофобного кармана, что приводит к конформационной перестройке капсида. Белок VP4 теряется, VP1 раздвигает цитоплазматическую мембрану и формирует цилиндр (пору), через который РНК выходит в цитоплазму и выполняет функцию мРНК. Пустой капсид вируса остается неповрежденным.

мРНК энтеровирусов связывается с рибосомами за счет IRES и реализует кэп-независимую стратегию трансляции, при этом теряет VPg. Отключение кэп-зависимой трансляции клеточных мРНК происходит за счет расщепления вирусной протеазой клеточных факторов инициации трансляции.

Геном транслирует полипротеин (250 кДа) – предшественник и структурных и неструктурных вирусных белков, которые поэтому синтезируются в эквимольных количествах. Полипротеин протеолитически расщепляется сначала с помощью клеточных протеаз на три предшественника – P1, P2 и P3. Затем P3 аутокаталитически расщепляется на VPg, протеазу и полимеразу. Протеаза 3C осуществляет каскадный протеолиз фрагментов полипротеина (рис.25).

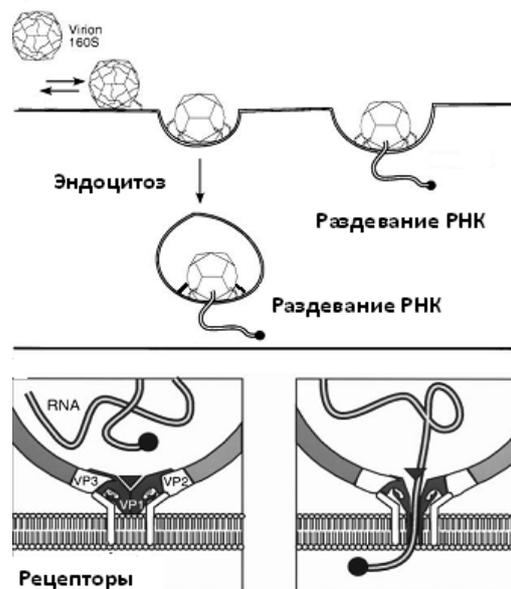


Рис. 24. Проникновение РНК энтеровирусов в клетку

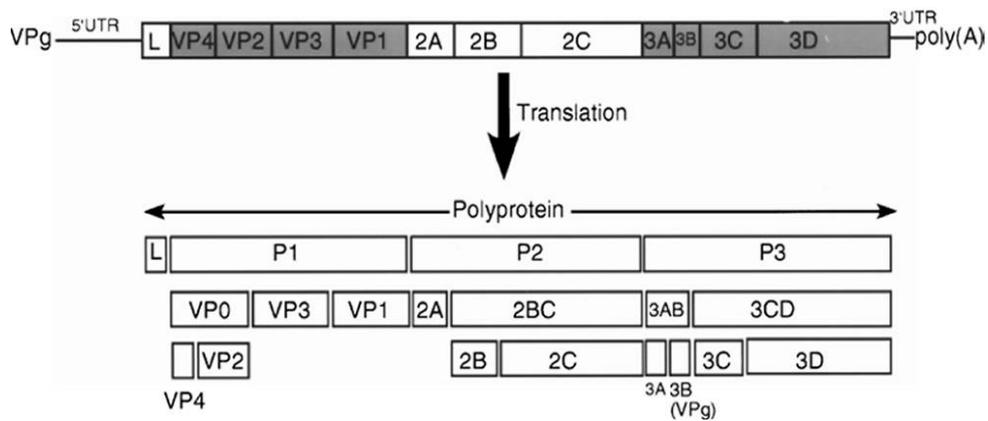


Рис. 25. Протеолитический каскад полипротеина энтеровирусов

Синтезированная вирусная РНК-полимераза начинает первый этап репликации – синтез (-)нити, который инициируется VPg-dU-затравкой. Происходит это следующим образом: гидрофобный белок 3A-VPg ассоциирует с мембранами ЭПР, полимераза присоединяет остаток уридина к ОН-тирозина VPg и фиксирует 3-конец РНК за счет U-A комплементарности на 3' конце (+)РНК и синтезирует (-)нить, протеаза отщепляет комплекс от мембраны (рис. 26А).

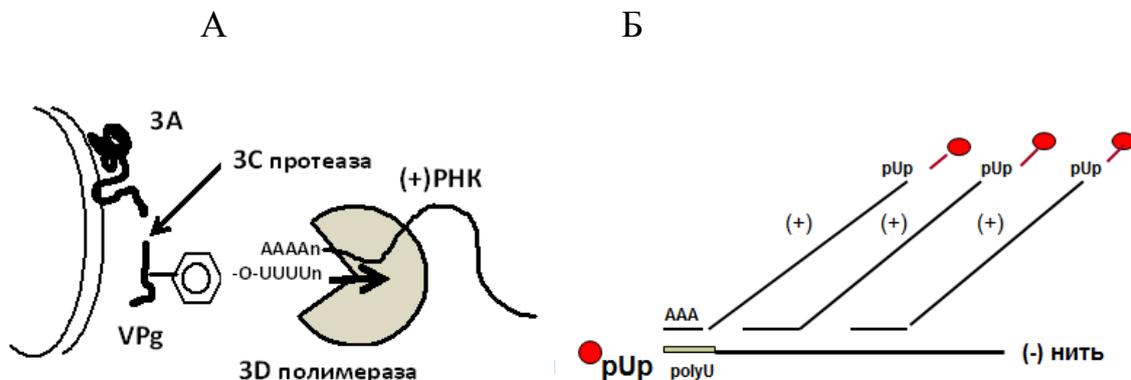


Рис. 26. Синтез минус (А) и плюс (Б) нитей генома энтеровирусов

Второй этап репликации – синтез (+)РНК на матрице (-)нити – происходит с использованием Б-Н затравки с вытеснением цепи (рис.26Б). Возможно образование кольцевого репликативного комплекса.

Сборка вирионов происходит в несколько этапов, (+)РНК геном инкапсидируется в заранее собранный провирион, созревание провириона

осуществляет клеточная протеаза, зрелые вирионы покидают клетку в результате ее лизиса.

Коронавирусы (*Nidovirales, Coronaviridae*) инфицируют многих позвоночных животных. У человека коронавирусы (*Coronavirinae, Coronavirus*) вызывают респираторную инфекцию, в том числе атипичную пневмонию (SARS), и кишечные заболевания (*Coronavirinae, Coronavirus; Torovirinae, Torovirus*).

Вирион размером приблизительно 120 нм представляет собой РНП, покрытый оболочкой (рис. 27).



Рис. 27. Структурная организация вириона и генома коронавирусов

Пеплос содержит 2 вида пепломеров – gpS (трансмембранный прикрепительный гликопротеин, проникает через мембрану, взаимодействует с нуклеокапсидом N) и HE (гликопротеин, вызывает слияние мембран).

Геном коронавирусов – монопартитная, линейная (+)РНК размером 27-32 т.н. (самый большой из всех вирусных (+)РНК геномов), кэпирована, полиаденилирована, упакована в спиральный или трубчатый нуклеокапсид. На 5'-конце геномной и субгеномных РНК имеется лидерная последовательность размером 65-89 н.о. Геномная РНК является инфекционной.

Коронавирусы проникают в клетку за счет рецепторного эндоцитоза и опосредованного рецептором слияния мембран при участии поверхностных гликопротеинов S и HE. Геном выходит в цитоплазму и, являясь мРНК, направляет синтез неструктурных белков, включая вирусную RdRp, которая осуществляет синтез полноразмерного антигена.

На следующем этапе на матрице антигена из одной точки инициации синтезируются полногеномная и набор субгеномных РНК разной длины, кодирующие неструктурные и структурные белки. Нуклеотидные последовательности этих РНК идентичны не только по 3'-, но и по 5'-концам. Объясняется это тем, что синтез всех (+)нитей начинается на 3'-конце антигена с синтеза лидерной последовательности. Этот «лидер» обладает

слабой связью с матрицей и может отсоединяться от нее, а затем присоединяться к другому участку в последовательности антигена. Минус-матрица содержит участки, комплементарные лидерной последовательности, что и определяет существование нескольких классов субгеномных РНК. Каждая мРНК транслирует только один полипептид, что отличает коронавирусы от других (+)РНК вирусов, транслирующих полипротеины. Вирионы созревают путем почкования РНП через мембраны шероховатого ЭР и аппарата Гольджи, но не через цитоплазматическую мембрану, покидают клетку в результате лизиса или слияния мембран, ряд вирусов могут покидать клетку в процессе клеточной секреции.

Следует отметить, что другие (+)РНК-содержащие вирусы порядка *Nidovirales*, например тога-, астро- и калицивирусы, используют другой механизм синтеза субгеномных мРНК.

3.2.3.4 Репликация (-)РНК-геномов вирусов

Группа V объединяет вирусы, геном которых представлен РНК негативной полярности. Вирусы этой группы поражают растения, беспозвоночных животных, птиц, млекопитающих, в том числе человека. Отсутствуют вирусы, поражающие прокариот.

(-)РНК-содержащие вирусы образуют 8 семейств, включающих, как минимум, 32 рода, 4 из которых не классифицированы. Четыре семейства вирусов с линейным, монолитным (-)РНК геномом объединены в порядок *Mononegavirales*. Кроме линейной монолитной формы, (-)РНК может быть кольцевой монопартичной и кольцевой сегментированной. В ряде случаев, отдельные сегменты могут обладать амбисенс стратегией кодирования.

Вирусные геномы, которые представлены (-)РНК и (+,-)РНК, не инфекционны, потому что вирусы с таким геномом начинают жизненный цикл с транскрипции, а неинфицированные клетки не содержат соответствующей RdRp. Кроме, как у вируса гепатита дельта, эта реакция катализируется ферментами, которые попадают в клетки с вирионами инфицирования.

Вирус гепатита D (неклассифицированный, блуждающий род *Deltavirus*). Это вирус-сателлит, требующий для осуществления своего жизненного цикла вируса-помощника (вирус гепатита В) и использующий его белки для формирования вириона.

Вирион – оболочечная сферическая частица диаметром 22 нм. В состав оболочки входят поверхностные белки вируса гепатита В (гликопротеины М, S и L). Нуклеокапсид образован двумя белками – большим и малым дельта-антигенами (HDAg).

Геном HDV представлен однонитевой замкнутой РНК длиной 1,7 т.н. с высокой степенью внутримолекулярной комплементарности. В естественных условиях РНК HDV образует стержнеобразную двунитевую структуру, содержащую 60 % ГЦ-пар и напоминающую РНК растительных патогенов – вирусоидов (рис. 28).

РНК HDV содержит одну ОРС для малого S-HDAg. На поздней стадии инфекции геном редактируется хозяином, увеличивая ОРС S-HDAg на 19 аминокислот, в результате чего транслируется большой L-HDAg. Отредактированный геном, по всей вероятности, не способен копироваться. Вирус реплицируется в гепатоцитах, куда проникает за счет взаимодействия HBs-антигена с соответствующим рецептором и слияния мембран. В цитоплазму проникает комплекс РНК-HDAg, который транспортируется в ядро, где реплицируется уже без помощи вируса гепатита В.

Вирус гепатита дельта реализует самый простой механизм репликации РНК, в котором клеточная РНК-полимераза II с использованием механизма катящегося кольца синтезирует мультимерные РНК положительной и отрицательной полярности. После этого рибозим за счет аутокаталитической расщепляющей и лигирующей (рибозимазной) активности расщепляет линейные конкатемеры РНК на мономеры и ковалентно соединяет их в кольца, производя, таким образом, зрелые антигеномы и геномы, соответственно. Этот простой механизм установлен только для вироидов и ряда других субвирусных патогенов растений. Вирус гепатита дельта – единственный РНК-содержащий вирус животных, который использует для репликации РНК механизм катящегося кольца.

Mononegavirales – порядок, объединяющий вирусы, геном которых представлен линейной непрерывной РНК негативной полярности, включает 5 семейств вирусов, патогенных для растений, беспозвоночных и позвоночных животных и человека. Среди вирусов, патогенных для человека значение в инфекционной патологии имеют вирус кори (*Morbillivirus*), вирус паротита (*Rubulavirus*), респираторно-синцитиальный вирус.

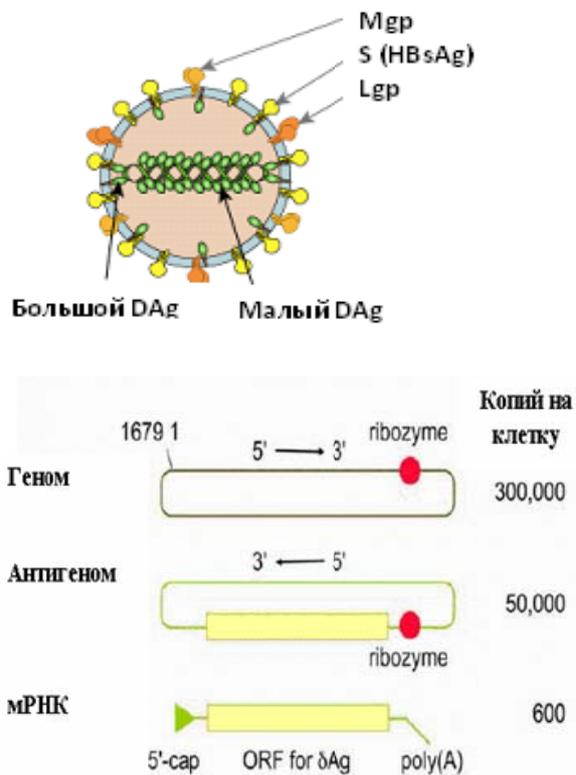


Рис. 28. Структурная организация вириона и генома вируса гепатита D

Респираторно-синцитиальный вирус человека (*Mononegavirales*, *Paramyxoviridae*, *Pneumovirinae*, *Pneumovirus*, HRSV). Вирус тропен к клеткам респираторного тракта, вызывает поражение верхних и нижних дыхательных путей, преимущественно у детей первых лет жизни.

Вирион – сферическая оболочечная частица диаметром 150 нм. Пепломеры представлены тетрамерами гликопротеина G (HN) и тримерами белка слияния F. У пневмовирусов этот белок осуществляет функцию слияния самостоятельно, у вирусов других родов – совместно с HN (белок, обладающий двумя свойствами – гемагглютинаина и нейраминидазы). Под оболочкой располагается слой матриксного белка (M), внутри – рибонуклеокапсид, представляющий собой (-)РНК длиной 15 т.н.о., одетую нуклеокапсидным белком N (у вируса кори белок M располагается не под мембраной, а покрывает РНП). На 3'-конце генома находится молекула белка L (RdRp), связанная с лидерной последовательностью (рис. 29).

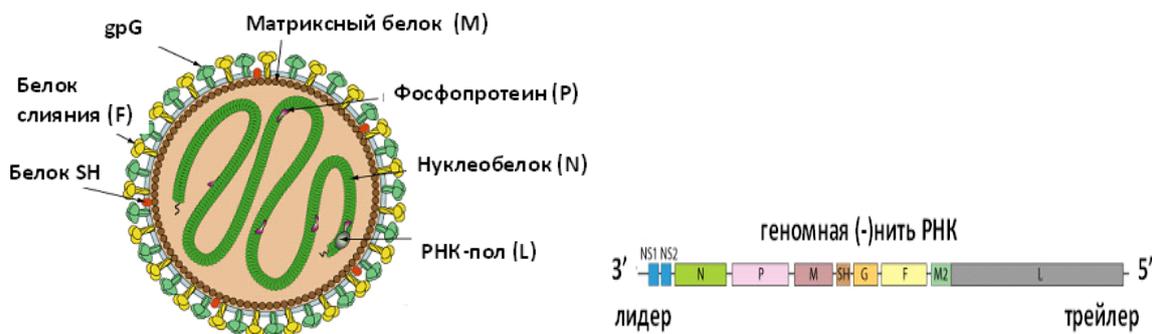


Рис. 29. Структурная организация вириона и генома пневмовируса

Вирион адсорбируется на клеточной поверхности через взаимодействие поверхностного гликопротеина G с остатками сиаловой кислоты. После слияния вирусной и клеточной мембран (без образования эндосомы) в цитоплазму проникает рибонуклеокапсид. В цитоплазме РНК-полимераза при сохранении целостности нуклеокапсида транскрибирует вирусные гены, начиная с лидерной последовательности и иницируя синтез РНК de novo. Полимераза синтезирует отдельные мРНК для каждого гена с учетом сигналов инициации и терминации. Транскрипты копируются и полиаденилируются полимеразой в процессе синтеза. Парамиксовирусы экспрессируют белок С, необходимый для сканирования и редактирования мРНК.

Репликация пневмовируса, как и других членов порядка *Mononegavirales*, начинается после достижения пула нуклеобелка, достаточного для инкапсидации вновь-синтезированных антигенов и генов. (-)РНК реплицируется в процессе непрерывного копирования линейных (+)матриц, сопровождающегося последовательными актами вытеснения дочерних цепей. Однако для матричного синтеза требуются оба конца РНК. Это предполагает, что даже линейные РНК могут функционировать, как кольцевые, возможно облегчая повторяющуюся репликацию и препятствуя концевой терминации синтеза. Синтезирующаяся (-)нить РНК сразу же покрывается белком, образуя рибонуклеокапсид (рис. 30). Сформированный рибонуклеокапсид взаимодействует с матричным белком под плазматической мембраной и отпочковывается от мембраны при участии эндосомального сортировочного мультибелково/мультипузырькового комплекса (ESCRT), функцией которого является сортировка белков и опосредованная деформация, разрыв и соединение разрыва мембран.

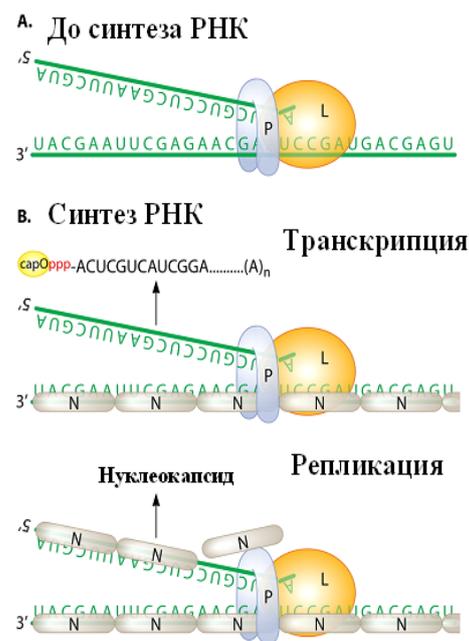


Рис. 30. Схема транскрипции/репликации (-)РНК

Рабдовирусы (*Rabdoviridae*).

Семейство включает не менее 11 родов вирусов, патогенных для растений, беспозвоночных и позвоночных животных. Инфекционными для человека являются вирус везикулярного стоматита (*Vesiculovirus*) и вирус бешенства (*Lessavirus*). Лиссавирусы – единственные среди рабдовирусов, которые поражают исключительно млекопитающих.

Вирионы рабдовирусов, поражающих позвоночных имеют пуле- или конусовидную форму, а поражающих растения – бацилообразную форму. Все рабдовирусы имеют единообразное строение и используют единую стратегию репродукции, однако репликация рабдовирусов может происходить как в цитоплазме, так и в ядре клетки (ряд вирусов растений).

Вирионы лиссавирусов имеют пулевидную форму (180x75 нм), окружены липидной оболочкой с выступающими шипами размером 5-10 нм, образованными тетрамерами гликопротеина G. Изнутри липидная оболочка выстлана матричным белком (M). Внутренний компонент представлен РНП диаметром 50 нм со спиральным типом симметрии. Геном рабдовирусов – одна

нить РНК негативной полярности размером 11 т.н., кодирующая последовательности 5-ти белков и еще 4-х инициированных альтернативно (рис. 31).

Вирус проникает в клетки путем опосредованного клатрином рецепторного эндоцитоза. Из эндосомы РНП проникает в цитоплазму за счет слияния мембран. Репликация/транскрипция протекает в цитоплазме в составе РНП. Каждый ген транскрибируется отдельно, мРНК экзпируются и полиаденилируются белком L во время синтеза. Репликация начинается после накопления нуклеобелка в количестве, достаточном для покрытия (инкапсидации) вновь синтезированных геномов и антигеномов. Синтез генома (негативной нити) идет на матрице полноразмерного (+)антигенома.

Сформированный РНП отпочковывается от цитоплазматической мембраны в местах скопления матриксного белка, используя клеточный ESCRT комплекс.

Таким образом, представленный материал на основе анализа двух вирусов порядка *Mononegavirales* демонстрирует наличие общих принципов реализации генетической информации (-)РНК-содержащих вирусов, которые также применимы для *Bunyavirus*- и *Arenaviruses*.

Ортомиксовирусы (*Orthomyxovirida*).

Семейство в основном представлено вирусами гриппа, патогенными для млекопитающих и птиц (*Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*), лосося (*Isavirus*) и арбовирусами, где вектором являются клещи (*Thogotovirus*, *Quarantavirus*)

1. *Influenzavirus A* – включает наиболее вирулентные и эпидемически значимые вирусы гриппа А человека. К данному роду относятся также вирусы гриппа А лошадей, свиней, тюленей, кур, уток и других видов птиц.

2. *Influenzavirus B* – вирусы гриппа В слабопатогенны для животных, в результате чего потеряли источники шифтов. Вызывают более ограниченные эпидемии.

3. *Influenzavirus C* – включает вирусы гриппа С человека и свиней. Вирусы вызывают относительно легкие спорадические заболевания, не принимающие эпидемического характера. Геном вирусов гриппа С представлен 7-ю сегментами РНК, отсутствует ген нейраминидазы.

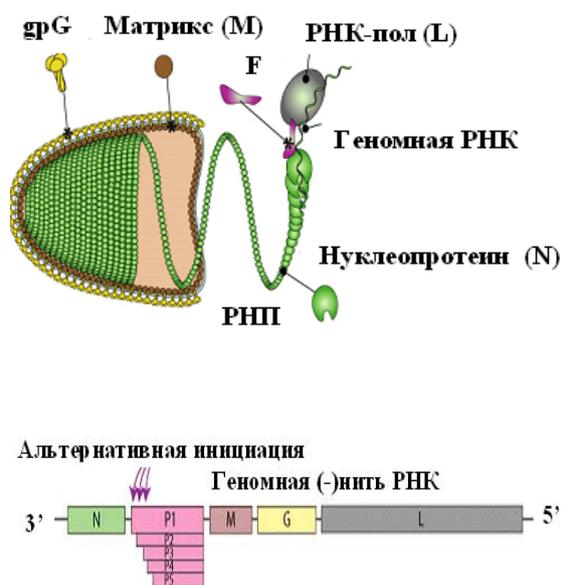


Рис. 31. Структурная организация вириона и генома лиссавирусов

Вирус гриппа А (*Influenzavirus A*).

Вирион оболочечный, округлый, может быть филаментозный, 80-120 нм в диаметре. На поверхности вириона находятся пепломеры: 49 тетрамеров нейраминидазы (NA) и 300-450 тримеров гемагглютинина (HA).

Под оболочкой располагается матриксный белок, имеются ионные каналы, внутри вириона присутствуют несколько молекул NS1-белков ядерного транспорта (рис.32).

Гликопротеин HA опосредует связывание вириона с клеточным рецептором, содержащим сиаловую кислоту. Протеолитически активированный HA обладает фузионной активностью и участвует в слиянии мембран вируса и эндосомы при низких значениях pH. NA – фермент, отщепляющий остаток сиаловой кислоты от любой олигосахаридной цепи, включая собственные цепи HA и NA.

HA и NA несут антигенные детерминанты вируса. На их сочетании основана классификация вирусов гриппа. У вируса гриппа А выделено 15 типов HA и 9 типов NA. Сочетание этих типов определяет антигенный профиль вируса гриппа. Так, например вирус Испанского гриппа обозначен как H1N1, вирус гриппа Гонконг – H3N2, вирус птичьего гриппа, патогенного для человека – H5N1, вирус свиного гриппа, патогенного для человека – H1N1sw.

Геном – линейная сегментированная (-)РНК, инкапсидирована нуклеобелком (NP). Сегментированность генома делает возможным пересортировку генов (реассортацию), что приводит к появлению новых генных комбинаций и лежит в основе высокой скорости эволюции вирусов гриппа. Восемь сегментов генома кодируют 12-14 белков, в зависимости от штамма. Размеры сегментов колеблются от 890 до 2341 н.о. Общий размер генома составляет 13.5 тыс. н.о. На 3'-конце каждого сегмента находится полимеразный комплекс, включающий три субъединицы (PB1- эндонуклеаза, PB2-полимераза и PA-участвует в репликации).

Вирусы тропны к клеткам слизистых оболочек трахеи, имеющей на поверхности клеток сиаловые кислоты. Для вирусов гриппа А человека рецептором является SA α 2,6Gal (трахея), у вирусов гриппа птиц – SA α 2,3Gal (кишечник), у вирусов гриппа свиней – оба рецептора, находящиеся и в трахее и в кишечнике. Прикрепительным белком вируса является HA. Проникновение генома вируса в цитоплазму происходит с использованием клатрин-опосредованного эндоцитоза. Из эндосомы в цитоплазму РНП выходит путем слияния мембран, опосредованного HA, который также имеет пептид слияния.

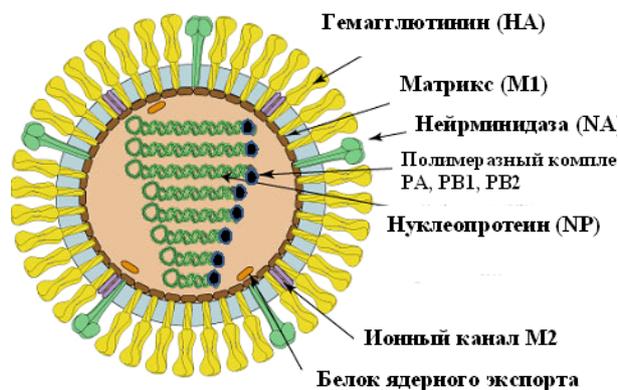


Рис. 32. Структурная организация вириона и генома вируса гриппа А

Протеолитически-активированный пептид слияния при низких значениях pH претерпевает конформационную перестройку, приводящую к экспонированию гидрофобного N-конца, что необходимо для слияния мембран. Закисление среды в эндосоме происходит за счет работы протонной помпы. При этом закисление среды через ионные каналы происходит и в полости вириона, что нарушает связь РНП с матричным белком и позволяет РНП свободно выйти в цитоплазму.

После частичного разделения, проникнувший в цитоплазму РНП транспортируется в ядро, где подвергается транскрипции, которая предусматривает кооперацию клеточных и вирусных факторов. Собственная РНК-зависимая РНК-полимераза не способна инициировать синтез мРНК и поэтому использует в качестве затравки экзипированный и метилированный 5'-конец (10-13 нуклеотидов) клеточных пре-мРНК, синтезированных РНК-полимеразой II. Отщепление затравки осуществляет вирусоспецифический белок PB1. В результате транскрипции с каждого сегмента синтезируются мРНК, мРНК белков M2 и NS1(Nep) подвергаются сплайсингу. мРНК экзипируется и полиаденилируется полимеразным комплексом. Синтезированные мРНК поступают в цитоплазму и транслируются с использованием универсального экзп-зависимого механизма. Первым синтезируется белок NS1, димер которого участвует в подавлении иммунного ответа хозяина через нарушение клеточного сигналинга. Белки NP, Nep, PA, PB1, PB2, PA поступают в ядро и обеспечивают репликацию РНК и сборку РНП. При достижении определенного количества нуклеобелка, RdRp переключается с транскрипции на репликацию. Репликацию РНК RdRp, ассоциированная с нуклеокапсидом, начинает de novo через синтез не экзипированного и не полиаденилированного полноразмерного (+)РНК антигенома, на матрице которого синтезируются сегменты (-)РНК. Антигеномы не направляют белковый синтез, а используются исключительно как матрицы для синтеза геномной РНК.

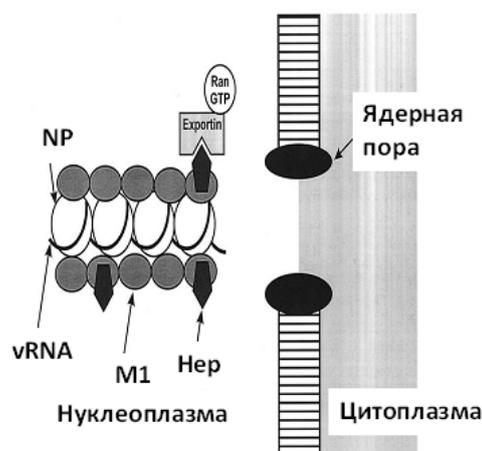


Рис. 33. Экспорт РНП вируса гриппа из ядра в цитоплазму

В процессе синтеза вновь синтезированные нити ассоциируют с белком NP, образуя РНП. В ядре РНП взаимодействует с M1 и Nep, который в свою очередь взаимодействует с клеточными белками семейства экспортинов (RAN-GTP). Образовавшийся комплекс РНП-M1-Nep транспортируется в цитоплазму через ядерную пору в GTP-зависимой реакции (рис. 33).

Структурные белки вириона – HA, NA, M2 подвергаются посттрансляционному процессингу в аппарате Гольджи. HA и NA

гликозилируются, НА некоторых штаммов может подвергнуться протеолизу на НА1 и НА2, М2 – тетрамеризируется. Все белки экспортируются в ЦПМ, где происходит сборка вирионов. Матриксный белок М1 концентрируется с внутренней стороны мембраны, где связывается с цитоплазматическими доменами НА и НА. НА отщепляет остатки сиаловых кислот у гликопротеинов в участке почкования, предотвращая адсорбцию почкующихся вирионов. Вирионы, покинувшие клетку, являются инфекционно-активными.

Флебовирусы (*Bunyaviridae*, *Phlebovirus*) – являются арбовирусами. Хозяева – жвачные животные, верблюды, люди. Резервуар и вектор – москиты. У людей флебовирусы поражают клетки центральной нервной системы, сосудистый эндотелий. Вызывают лихорадочные заболевания (москитные лихорадки), некоторые вирусы – менингит, менингоэнцефалит.

Вирионы флебовирусов, в т.ч. всех буньявирусов, представляют собой сферические, оболочечные частицы, размером 80-120 нм, без матриксного слоя. Оболочка имеет на поверхности два типа пепломеров. Гликопротеины на поверхности оболочки образуют двадцатигранную решетку с симметрией T=12 (рис. 34).

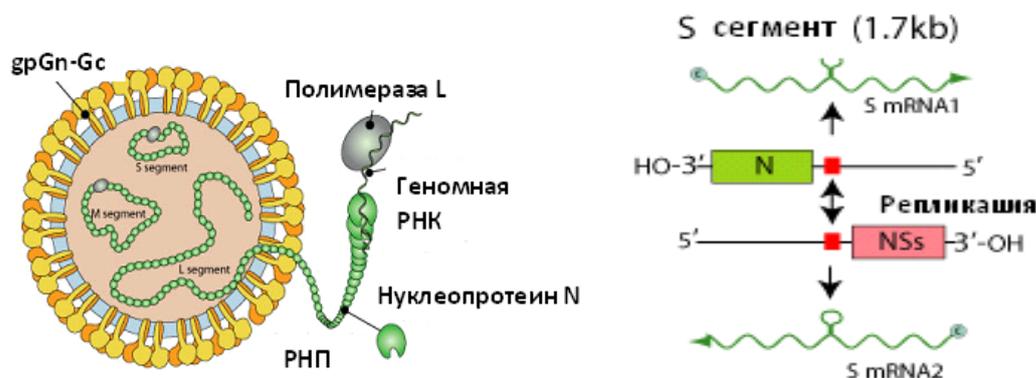


Рис. 34. Структурная организация вириона и S-сегмента генома флебовирусов

Геном – 3 сегмента линейной (-)РНК, кодирующие 6 белков. L сегмент имеет размер 6.4 тыс. н.о., М сегмент – 3.2 тыс. н.о. и S сегмент – 1,7 тыс. н.о. Каждый сегмент одет нуклеобелком и ассоциирован с полимеразой (L). На протяжении последовательностей сегментов в конце каждого гена имеются последовательности-шпильки, необходимые для торможения РНК-полимеразы.

Флебовирусы являются цитоплазматическими вирусами, проникают в клетку путем рецепторного эндоцитоза, опосредованного гликопротеинами Gn-Gc. В цитоплазму проникает РНП в результате слияния мембран вируса и эндосомы. RdRp осуществляет транскрипцию в составе РНП. Синтез

начинается на 3'-конце каждого инкапсидированного сегмента и заканчивается на последовательности шпильки в конце каждого гена. Синтезированные мРНК связаны с белком L (RdRp) во время синтеза, но не являются полиаденилированными.

Отличительной особенностью генома флебовирусов является наличие **амбисенс** (обоюдозначающая, амбиполярная) РНК (S сегмент генома), что определяет особенности ее транскрипции (рис.34). Амбиполярная РНК имеет 5'-конец позитивной полярности, а 3'-конец негативной полярности. При попадании в клетку с геномной РНК считываются два класса комплементарных РНК: с 3'-конца считывается субгеномная мРНК и полноразмерный антигеном. Антигеном в свою очередь опять служит матрицей для двух классов РНК. С антигена считывается вторая субгеномная мРНК и полноразмерная обоюдозначающая геномная, которая идет на построение вирусных частиц. S сегмент кодирует несколько белков и также имеет последовательности-шпильки, которые препятствуют тому, чтобы амбисенс-транскрипция произвела днРНК. При достижении необходимого количества нуклеокапсидного белка происходит переключение транскрипции на репликацию. Полноразмерные геномы инкапсидируются и отпочковываются от ЦПМ-мембраны.

Кроме флебовирусов амбисенс стратегию кодирования используют буньявирусы растений (*Tospovirus*, сегменты M и S), неклассифицированные вирусы растений/насекомых (*Tenuivirus*, сегменты 2, 3, 4), родентвирусы, поражающие человека (*Arenaviridae*, *Arenavirus*, сегменты L и S).

3.3 Генетические стратегии ретроидных вирусов

Ретроидные вирусы – вирусы, репликация которых включает стадию обратной транскрипции (ОТ). ОТ представляет собой матричный комплементарный синтез ДНК на матрице РНК, осуществляемый ферментом обратной транскриптазой (РНК-зависимой ДНК-полимеразой или ревертазой). Этот фермент был открыт независимо друг от друга Д. Балтимором и Х. Темином в 1970 г. в составе РНК-содержащих опухолеродных вирусов (Нобелевская премия за 1975 г. совместно с Р. Дульбекко).

К ретроидным вирусам относятся вирусы с разными типами генома – собственно ретровирусы, диплоидный геном которых представлен (+)РНК (группа VI) и параретровирусы с днДНК геномом (группа VII). Несмотря на глубокие различия в биологии и молекулярной генетике ретровирусы (РНК-ОТ вирусы) и параретровирусы (ДНК-ОТ вирусы) имеют филогенетические взаимосвязи, дающие основание полагать, что эти вирусы имели общего предка в переходном периоде от мира РНК к миру ДНК.

3.3.1 Особенности репликации/транскрипции РНК-ОТ вирусов

Группа VI вирусов, геном которых представлен (+)РНК, включает представителей семейства ретровирусов (8 родов вирусов животных и человека) и ретротраспозоны (2 семейства).

3.3.1.1 Ретровирусы (*Retroviridae*)

Семейство ретровирусов объединяет 7 родов вирусов: *Alpharetrovirus* (вирус миелобластома птиц, AMV; вирус саркомы Рауса, RSV), *Betaretrovirus* (вирус опухолей молочных желез мышей, MMTV); *Gammaretrovirus* (вирус лейкемии мышей, MuLV); *Deltaretrovirus* (вирус Т-клеточного лейкоза человека, HTLV); *Epsilonretrovirus* (вирус саркомы рогаковицы, WDSV); *Lentivirus* (вирус иммунодефицита человека, HIV); *Spumavirus* (пениющиеся вирусы) и неклассифицированные вирусы. В патологии человека важную роль играют вирус Т-клеточного лейкоза и вирус иммунодефицита человека.

Вирионы ретровирусов – оболочечные, сферические, 80-100 нм в диаметре. Геном диплоидный – представлен двумя молекулами (+)РНК, которая кэпирована и полиаденилирована. Структурная организация генома в общих чертах представлена на рисунке 35.

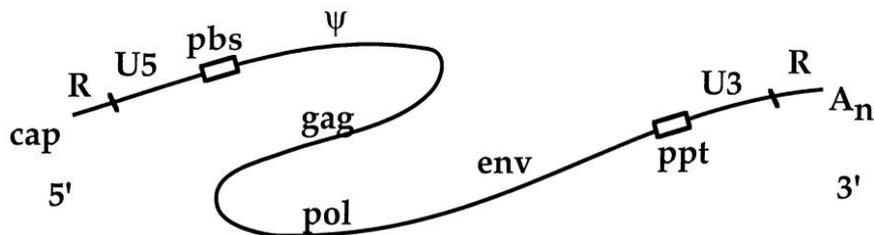


Рис. 35. Структурная организация генома ретровирусов

Cap – m⁷G5'ppp5'mp; U5-уникальная 5'послед.(75-120 н.о.); Pbs – сайт связывания затравки (праймера); R – прямые повторы; Ψ – упаковочный сигнал; Gag (group specific antigen) – белки капсида, М, НК; Pol (polimerase) – ОТ, протеаза, интеграз; Env (envelope) – gp41 (трансмембранный), gp120 (поверхностный); Ppt – полипиримидиновый трек, обеспечивает инициацию синтеза (+)нити ДНК; U3-уникальная 3'послед. (17-1200 н.о.)

Ретровирусы имеют уникальный механизм репликации – репликация через интеграцию с хромосомой клетки-хозяина. Сохраняя генетическую информацию в составе эндогенного провируса, ретровирусы реплицируют ее вместе с геномом клетки, подчиняясь его механизмам. Ретровирусы копируют свои однонитевые (+)РНК геномы в днДНК-провирусы с использованием

обратной транскриптазы (РНК/ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, которую несет вирион инфицирования). После интеграции в хромосому хозяина провирусная ДНК транскрибируется клеточной РНК-полимеразой II с образованием несплайсируемых и сплайсируемых мРНК для направленного вирусного белкового синтеза. Полноразмерный транскрипт ассемблирует в созревающие вирусные частицы.

Каждая зрелая вирусная частица включает 50-100 молекул ревертазы, которая является полифункциональным ферментом и обладает тремя ферментативными активностями: ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК; активностью РНКазы Н – разрушает находящуюся в дуплексе с ДНК цепь РНК до олигомеров размером 6-12 нуклеотидов; ДНК-эндонуклеазной активностью – вносит одноцепочечные разрывы преимущественно в кольцевую форму ДНК.

Структурная организация фермента у разных вирусов семейства может отличаться. Так у вируса миелобластома птиц фермент, состоящий из двух субъединиц, присутствующих в эквимоллярных количествах – малой α (р65) и большой β (р95), обладает четырьмя ферментативными активностями. Альфа-субъединица обладает активностью полимеразы и РНКазы Н. Эндонуклеазная активность обусловлена С-концевой областью бета-субъединицы, с которой связана также активность интегразы. Ревертаза ВИЧ представляет собой гетеродимер (субъединицы р66 и р51), обладающий тремя активностями, т.к. интегразы является самостоятельной структурой.

Ревертаза способна работать только при наличии затравки в качестве которой ретровирусы используют клеточные тРНК. Разные ретровирусы используют разные тРНК, которые ассоциированы с геномной РНК и входят в состав вириона.

Реакция обратной транскрипции протекает в составе коровой частицы и начинается после ее проникновения в цитоплазму клетки, но не с 3'-конца, как это принято для прямой транскрипции, а с синтеза расположенного на 5'-конце короткого фрагмента кДНК путем удлинения 3'-конца тРНК. После достижения конца РНК-матрицы синтез останавливается, в связи с чем, первый фрагмент (-)ДНК назван strong-stop ДНК. На следующем этапе ревертаза в комплексе с strong-stop-ДНК совершает «прыжок» на 3'-конец матрицы, в результате которого синтезируется правый LTR (длинный концевой регион).

Следует отметить, что в процессе синтеза ДНК периодически происходит смена матриц, что затрудняет ответ на вопрос, какая из двух молекул геномной РНК в данном случае является матричной. Далее ревертаза синтезирует плюс-нить правого LTR, используя в качестве затравки остаток матричной РНК в области P_u . При этом синтез продолжается за LTR и включает образование участка, комплементарного 3'-концу тРНК (область Р). Этот участок обеспечивает возможность второго прыжка в ходе обратной транскрипции. По результатам реакции образуется двуниевая ДНК протяженностью больше, чем геномная РНК за счет образования длинных концевых повторов.

Затем линейная днДНК поступает в ядро клетки, где переходит в кольцевую форму. После образования кольцевой формы в местах стыка LTR возникает короткий инвертированный повтор, выполняющий функцию специфического участка интеграции. Этот участок узнается вирусным ферментом-интегразой (С-концевой участок ревертазы, обладающий эндонуклеазной активностью), который вносит ступенчатые разрывы в LTR и клеточный сайт. Этот же фермент осуществляет и воссоединение цепей ДНК. При этом оба вирусные LTR теряют по две концевые пары нуклеотидов, а участок хозяйской ДНК, куда встраивается провирус, дублируется.

Интеграция вирусного генома в клеточную ДНК является обязательной стадией репродукции ретровирусов. Вирусоспецифическая ДНК реплицируется вместе с клеточной ДНК при митозе и передается в дочерние клетки. Синтез ретровирусных (+)РНК происходит только на матрице провирусной ДНК и осуществляется клеточным транскрипционным аппаратом, то есть, транскрипция вирусных генов является также и репликацией вирусного генома. Общая схема репликации/транскрипции ретровирусов представлена на рисунке 36.



Рис. 36. Схема стратегии репликации/транскрипции генома ретровирусов

В репликативном цикле присутствуют стадии обратной транскрипции и интеграции. Геном вируса не участвует в транскрипции.

Вирус иммунодефицита человека (*Retroviridae*, *Orthoretrovirinae*, *Lentivirus*, HIV, ВИЧ).

В 1983 г. практически одновременно и независимо Р. Галло в США (Национальный институт рака) и Л. Монтанье во Франции (Институт Пастера) описали вирус – возбудитель иммунодефицита человека, названный HTLV-III и LAV, соответственно. После того, как было установлено, что они являются

одним и тем же вирусом, ICTV (1986 г.) было утверждено единое название – вирус иммунодефицита человека или ВИЧ-1. В 2008 г. французские исследователи Ф. Барре-Синусси и Л. Монтанье за открытие ВИЧ получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины.

ВИЧ-1 наиболее распространенный вид лентивирусов человека, вызывающий медленно прогрессирующее заболевание ВИЧ-инфекцию, терминальной стадией которого является синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). ВИЧ-2 — вид вируса иммунодефицита человека, идентифицированный в 1986 году. ВИЧ-2 отличается от ВИЧ-1 в структуре генома, менее патогенен и передается с меньшей вероятностью, чем ВИЧ-1. Отмечено, что люди, инфицированные ВИЧ-2, обладают слабым иммунитетом к ВИЧ-1.

На долю вида ВИЧ-1 приходится более 90% случаев ВИЧ инфекции. ВИЧ-1 классифицируют на главную группу М и несколько побочных групп (N, O, P). Предполагают, что эти группы образовались в результате независимых случаев передачи SIV (вирус иммунодефицита обезьян) от обезьяны к человеку, и последующей мутации вируса до ВИЧ. В группе М выделено 11 субтипов вируса (А-К).

Вирионы ВИЧ-1 оболочечные, от сферических до плейоморфных размером 80-100 нм. Наружная поверхность вириона имеет 80 грибовидных выступа ($d=15$ нм, $h=9$ нм). Выступы образованы тетрамером белка gp120 (несет антирецептор), ковалентно связанного с двумя молекулами трансмембранного gp41. Оболочка вируса с внутренней стороны выстлана матриксным белком p17, образующим изометрическую структуру. Внутренний компонент вириона представлен спиральным РНП, заключенным в грушевидный неикосаэдрический капсид (В тип), состоящий из белка p24 (рис.37)

Поверхностные гликопротеины gp120 и gp41 являются основными протективными антигенами вируса и играют определяющую роль в проникновении вируса в клетку.

gp120 – это прикрепительный белок, служащий лигандом клеточных рецепторов вируса. Рецепторами являются молекула CD4, выполняющая роль “фиксатора” вируса, и рецепторы для ряда хемокинов (молекула CCR5). Поскольку тропизм к конкретным типам клеток обеспечивается соответствующими хемокиновыми рецепторами, не все CD4-положительные клетки, инфицируются ВИЧ. Чувствительными к ВИЧ являются Т-лимфоциты, моноциты и макрофаги и некоторые другие клетки. Небольшое количество gp120 может произвольно отделяться от вириона и попадать в кровь и ткани в виде растворимой субстанции.

gp41 – белок слияния. Этот белок участвует в трех процессах:

- слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной;
- слияние соседних участков клеточных мембран;
- слияние мембран соседних клеток.

gp41 индуцирует слияние мембран при нейтральных значениях рН. Первый из этих процессов обеспечивает проникновение вируса в клетку. Теоретически вирион может проникать в клетку и путем эндоцитоза и путем прямой пенетрации, дезинтеграции вириона и выбросу РНП в цитоплазму.

Геном ВИЧ, так же, как и у других ретровирусов, является диплоидным и представлен двумя молекулами РНК позитивной полярности размером 9200 н.о. РНК кэпирована, полиаденилирована и каждая ассоциирована с лизиновой тРНК. Геном содержит гены gag, pol, env и minigene, но отличается от других ретровирусов тем, что гены pol и env не перекрываются, а отделены друг от друга рядом регуляторных генов (рис. 37). Другой отличительной особенностью организации генома ВИЧ является наличие регуляторных генов, названных **трансактиваторами**. Они рассеяны по геному и расположены на некотором расстоянии от генов, на которые воздействуют. Трансактиваторы усиливают работу структурных и NS генов более чем в 100 раз.

Репликация ВИЧ идет по схеме, характерной для ретровирусов, и включает стадию обратной транскрипции (синтез кДНК происходит в цитоплазме в составе РНП), транспорт кДНК в ядро и ее интеграцию в геном клетки. В состоянии латентного провируса ВИЧ может находиться до 10-15 лет без проявления клинических симптомов заболевания. Лиц, содержащих ВИЧ в латентном состоянии, называют ВИЧ-инфицированными. Активация провируса приводит к репликации вируса и развитию клинических проявлений инфекции, заканчивающейся летально. Активация может быть блокирована применением аналогов нуклеозидов.

Активация провируса приводит к транскрипции полноразмерных геномных РНК, часть которых в процессе сплайсинга образует мРНК gag, gag-pol и env и ряд коротких субгеномных РНК. Основные субгеномные РНК транслируют **полипротеины-предшественники**, которые нарезаются вирусоспецифическими и клеточными протеазами на функциональные белки.

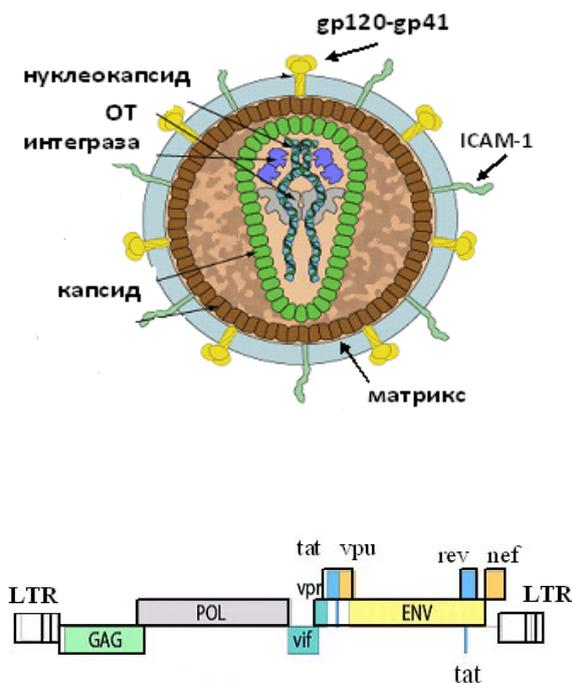


Рис. 37. Структурная организация вириона и провируса ВИЧ-1

Продукт гена gag нарезается вирусоспецифической аспарагиновой протеазой на 4 белка - p17 (матриксный белок), p24 (капсидный белок), p7 и p9 (белки нуклеокапсида). Продукт гена gag-pol, состоящий из протеазы и ревертазы, расщепляется на функциональные белки-ферменты за счет аутокаталитической активности протеазы. Продукт гена env (gp160) нарезается клеточной трипсиноподобной протеазой на поверхностные белки p120 и p41, которые после нарезания гликозилируются в аппарате Гольджи.

Сборка вирионов ВИЧ осуществляется на цитоплазматической мембране, куда транспортируются поверхностные белки. Матриксный белок, ассоциированный с капсидным белком, заякоривается на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны за счет своего миристилированного N-конца. Спиральный нуклеокапсид собирается в цитоплазме самостоятельно и почкуется через мембрану в местах скопления матриксного белка.

Как уже отмечалось, gp41 обеспечивает слияние клеток изнутри. При достижении определенной концентрации этого гликопротеина на мембране клетки происходит слияние мембран соседних клеток, что приводит к образованию многоядерных синцитиев, которые включают десятки, и даже сотни лимфоцитов. Клетки, входящие в состав синцития погибают. Цитопатическое действие вирус оказывает только на Т-лимфоциты, что постепенно приводит к их количественному уменьшению. Моноциты являются резервуаром вируса, так как вирус может длительное время персистировать в ядре, не нанося ущерба этим клеткам.

ВИЧ характеризуется очень высокой скоростью изменчивости, которая в 10 раз превышает скорость мутаций у вируса гриппа и в 100 раз – скорость мутаций клеточных ДНК. В процессе репродукции ВИЧ в организме за счет высокой изменчивости происходит образование и накопление нескольких подтипов вируса (квазивидов). Это придает вирусу селективные преимущества в борьбе за выживание под прессом иммунной системы, позволяя уходить от иммунологического надзора. Скорость образования квазивидов как правило выше скорости формирования эффекторных клонов иммунокомпетентных клеток хозяина (Т- и В-лимфоциты). В результате даже здоровая иммунная система не в состоянии бороться с ВИЧ-инфекцией.

3.3.1.2 Ретротраспозоны

Ретротраспозоны (квазивирусные семейства *Pseudoviridae* и *Metaviridae*) представляют собой интегрированные ДНК-последовательности, кодирующие, в том числе ревертазу, способные перемещаться по геному, используя механизм траспозиции (транскрипция – обратная транскрипция – интеграция с помощью транспозазы). Ретротранспозоны являются потомками эндогенных ретровирусов, потерявших способность формировать капсид, и передающихся только вертикально с ДНК клеток зародышевой линии. Ретротраспозоны обнаружены у сахаромикетов, дрожифил и млекопитающих.

3.3.2 Особенности репликации/транскрипции параретровирусов

Группа VII вирусов включает ДНК-содержащие вирусы, имеющие в жизненном цикле стадию обратной транскрипции (днДНК-ОТ-вирусы). Эта группа вирусов объединяет вирусы растений (*Caulimoviridae*) и вирусы позвоночных животных (*Hepadnaviridae*).

Семейство *Caulimoviridae* объединяет 7 родов вирусов, наибольшее экономическое значение из которых имеют представители двух родов. Так например вирус мозаики цветной капусты (CaMV, *Caulimovirus*) – один из очень немногих вирусов, имеющих промышленное значение. Наносит вред урожаю цветной капусты в Китае, переносится тлями, является источником регуляторных элементов, используемых в генной инженерии растений. Баднавирусы (*Badnavirus*) имеют широкий круг хозяев, поражают однодольные и двудольные растения. Имеют важное народнохозяйственное значение, т.к. поражают деревья какао, рис, банановую пальму. Переносятся ползающими насекомыми – кокцидами и псевдококцидами.

Семейство *Hepadnaviridae* включает род *Orthohepadnavirus*, представленный вирусами гепатита В человека), обезьян, сурка, и род *Avihepadnavirus*, включающий хорошо изученный вирус пекинских уток (ДНВУ), и менее изученных возбудителей гепатита цапель (ННВУ) и домашних гусей. Представители не имеют антигенных связей с вирусами млекопитающих, но имеют некоторое сходство в нуклеотидных последовательностях. Кроме этих вирусов семейство включает н/к вирус гепатита змей о. Тайвань.

Особенности жизненного цикла и уникальную стратегию репликации-транскрипции ОТ-ДНК вирусов рассмотрим на примере вируса гепатита В.

Вирус гепатита В человека (*Hepadnaviridae*, *Orthohepadnavirus*, HBV, ВГВ) является прототипным вирусом семейства. Для ВГВ известно 8 генотипов (А-Н, различия в нуклеотидных последовательностях составляют не менее 8%) и 24 подгенотипа (различия в нуклеотидных последовательностях составляют не менее 4%).

Первое сообщение, связанное с открытием ВГВ было сделано в 1965 г. Б.С. Бламбергом с соавт., которые обнаружили в крови австралийских аборигенов антиген неизвестный антиген, получивший название австралийского антигена (HBsAg). За это открытие в 1976 г. Бламберг получил Нобелевскую премию. В 1970 г. Д. Дейн методом электронной микроскопии идентифицировал в крови больных гепатитом вирусные частицы, получившие название частиц Дейна, которые представляют собой полные, инфекционные частицы вируса гепатита В. У больных гепатитом В количество вирусных частиц может колебаться от 10^3 до 10^9 на 1 мл крови.

Вирион ВГВ – оболочечная, сферическая частица диаметром 42 нм (рис.38). На поверхности оболочки располагаются пепломеры, состоящие из гликопротеинов L (preS1), M (preS2) и S (HBsAg). Под оболочкой расположен икосаэдрический капсид диаметром 27 нм с T=4 (коровая частица), образованный белком С (HBcAg). Коровая частица содержит ДНК и два клеточных шаперона Hsp70 Hsp90 (heat-shock proteins - белки теплового шока).

Геном ВГВ представляет собой частично двунитевую, кольцевую молекулу ДНК, состоящую примерно из 3200 нуклеотидов, наименьшую из всех известных в настоящее время вирусов человека. ДНК построена из двух линейных компонентов:

- полноразмерной (-)нити (3,2 т.п.н.), на 5'-конце которой ковалентно присоединен терминальный пептид (TP), который является одним из доменов вирусной ДНК-полимеразы;

- сегмента (+)нити (1,7-2,8 т.п.н.), 5'-конец которой содержит участки, комплементарные обоим концам (-)нити – DR I и DR II (11-15 н.о.) и одигонуклеотид (19 нуклеотидов 5'-кэпированной РНК), который имеет происхождение от 5'-конца прегеномной РНК вируса. является затравкой для синтеза (+)нити. Кольцевая структура генома поддерживается благодаря спариванию оснований на 5'-концах двух нитей ДНК в районах DR I и DR II. Нахлест составляет 240 нуклеотидов.

В то время как минус-цепь содержит полную копию вирусного генома, плюс-цепь ДНК является неполной и составляет примерно 60 % от длины минус-нити.

Минус-нить ДНК является матрицей для синтеза транскриптов и имеет 4 перекрывающиеся ОРС (S, C, P и X), кодирующие 7 белков (рис. 38). В эти кодирующие последовательности включены также регуляторные последовательности, управляющие синтезом вирусных белков и циклом репликации.

Ген S. ОРС кодирует белки пре-S1 (L), пре-S2 (M) и HbsAg (S). S-белок является основным трансмембранным поверхностным компонентом частиц Дейна и субвирусных структур. Липид-содержащие сфероподобные и

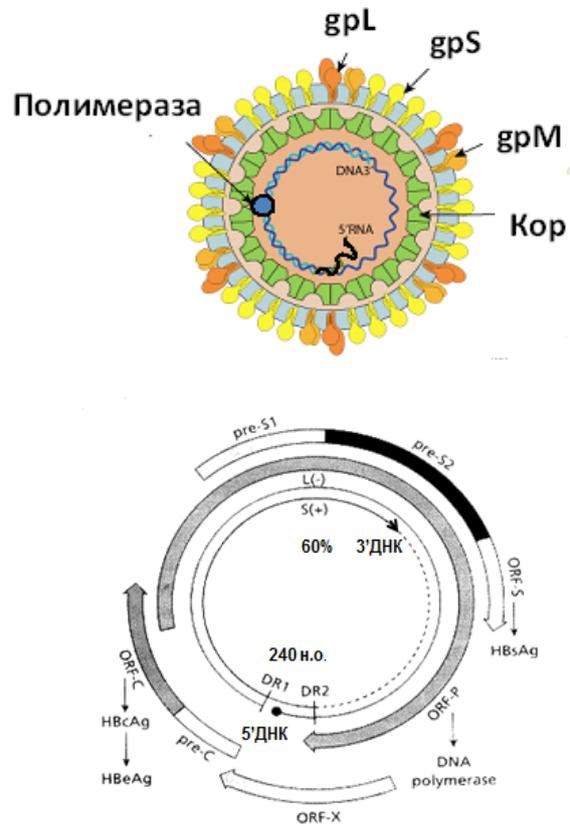


Рис. 38. Структура вириона и генома вируса гепатита В

стержнеподобные (нитевидные) субвирусные структуры построены в основном из S-белка и небольшого количества M и L белков. Субвирусные сфероподобные структуры имеют диаметр 22 нм, не содержат белка С и ДНК. Стержнеобразные субвирусные структуры имеют ширину 20 нм и длину до 200 нм, также лишены нуклеокапсида. Концентрация субвирусных структур в крови может превышать концентрацию полных вирионов в 100-1000 раз.

Трансляция L (пре-S1) и M (пре-S2) белков начинается с иницирующих кодонов, локализованных выше места инициации трансляции S-белка. Тем не менее, все три полипептида имеют одинаковые С-концы. Все три полипептида содержат N-связанные олигосахариды. N-конец L-полипептида модифицирован миристиновой кислотой. L-белок вероятно служит лигандом рецептора. При хроническом инфицировании долговременная экспрессия L-белка может приводить к развитию гепатоклеточной карциномы. Уровень экспрессии L и M белков составляет 5-15 % и 1-2 % в сравнении с уровнем экспрессии S-белка. Ген S экспрессируется на очень высоком уровне только в клетках печени и под влиянием стероидных гормонов. Эти данные объясняют тот факт, что риск развития хронического гепатита, формирования гепатомы для мужчин выше, чем для женщин, у которых уровень стероидных гормонов ниже.

Ген С. Открытая рамка считывания гена *core* кодирует вирусный капсидный белок весом 21 кДа, названный HBcAg, и полипептид пре-кор (pre-core) весом 16-18 кДа, названный HBeAg. В отличие от HBcAg, входящего в состав капсида, HBeAg секретируется клеткой в растворимой форме. HBeAg является маркером наличия вируса в организме. Оказалось, что инфекционность сыворотки крови с HBeAg в миллион раз выше, чем с анти-HBe. Выявлены мутантные формы вируса гепатита В у которых синтез HBeAg блокируется. При этом, несмотря на наличие в сыворотке крови анти-HBe, удается тестировать ДНК-ВГВ.

Ген Р – самый большой ген генома (850 н.о.), кодирующий полимеразу (м.м.90 КДа). Полимераза состоит из N-концевого TP-домена, способного иницировать синтез ДНК без олигонуклеотидного праймера, спейсерного домена и OT-домена, обладающего активностью РНКазы Н.

Ген Х. Открытая рамка считывания X кодирует протеин массой 170 кДа, названный рХ и функционирующий в качестве транс-активатора некоторых промоторов, включая промоторы генов *core* и S. Белок X обладает протеинкиназной активностью, однако истинная роль X-белка в механизмах реализации инфекции пока не ясна. Показано, что X-белок играет важную роль в индукции гепатомы.

Вирус гепатита В имеет сродство к различным тканям: хотя он чаще всего поражает печень, но вирусная ДНК и белки также обнаруживаются в почках, селезенке, поджелудочной железе, коже, костном мозге и мононуклеарах периферической крови. Периферические мононуклеары могут быть первыми мишенями при HBV инфекции. Поражение клеток крови может играть прямую роль в развитии апластической анемии.

Вирус гепатита В проникает в гепатоцит через взаимодействие L белка с гепаран-сульфатом. Клеточным рецептором является SLC10A1/NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide). Вирус проникает в клетку путем рецепторного эндоцитоза, эндосому покидает за счет слияния мембран. Коревая частица транспортируется к ядру и при прохождении через ядерную пору десассемблируется. После попадания геномной ДНК вируса в ядро гепатоцита происходит отщепление TP, репарация двунитевой структуры ДНК и ее переход в ковалентно-замкнутую кольцевую форму (cccDNA). Процесс осуществляется как вирусной, так и клеточной полимеразой. Эта эписомальная ДНК служит матрицей для транскрипции. При длительной хронической инфекции может интегрировать в хромосому гепатоцита в процессе неспецифической рекомбинации.

В ядре минус нить ДНК транскрибируется клеточной РНК-полимеразой II под контролем 4-х промоторов (core, preS1, preS2, pX) и 2-х энхансеров (ENH1 и ENH2). В результате транскрипции образуются три класса субгеномных РНК и пре-геномная РНК размером 3,4 т. п.н., что несколько длиннее, чем геномная ДНК.

Пре-геномная РНК кэпируется, полиаденилируется, избыточные последовательности (E-области) формируют stem-loops структуры (рис. 39).

Пре-геномная РНК альтернативно сплайсируется. Кэпированные и полиаденилированные субгеномные мРНК и несплайсированная пре-геномная РНК экспортируются в цитоплазму и транслируются. В цитоплазме несплайсированная пре-геномная РНК связывается с полимеразой и инкапсидируется в коровую частицу, где ДНК-полимераза осуществляет синтез минус-нити ДНК на матрице РНК по механизму самопраймирования. В процессе синтеза происходит деградация матричной РНК. Синтез минус-нити ДНК начинается вблизи 3'-конца пре-геномной РНК, вследствие чего 5'-конец негативной ДНК становится связанным с ревертазой. После завершения синтеза минус-нити ДНК и удаления основной части матричной РНК остается кэпированный 5'-

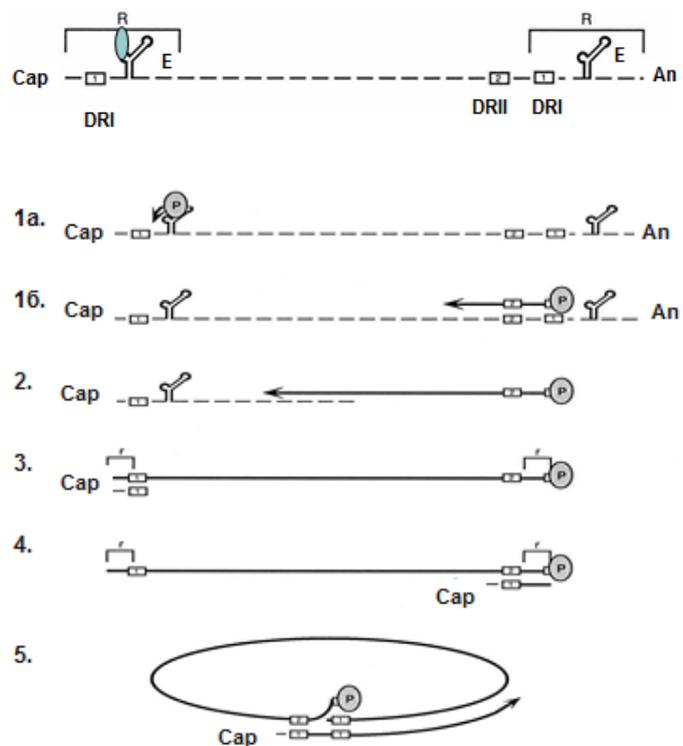


Рис. 39. Структура пре-геномной РНК вируса гепатита В и механизм синтеза кДНК. Механизм репликации ДНК вируса гепатита В был раскрыт в 1982 г. Дж. Саммерсом и У. Мейсоном.

конец РНК, содержащий копию участка инициации синтеза ДНК (DRI). Этот фрагмент РНК переносится на 3'-концевой комплементарный участок минус-нити ДНК (DRII) и служит затравкой для синтеза плюс-нити ДНК (рис.39).

Затем ДНК-полимераза синтезирует неполную плюс-нить ДНК и геном или реимпортируется в ядро или происходит созревание коровой частицы до инфекционного вириона. В инфицированной клетке образуется два типа вирионов – вирионы, содержащие частично двуниевую кольцевую ДНК (80-95%) и вирионы, содержащие двуниевую линейную ДНК. Кольцевой геном (репликативная кольцевая форма, RC) служит для образования сссDNA, а линейный геном (DSL форма) может интегрировать в геном клетки-хозяина.

Схема стратегии репликации/транскрипции генома гепаднавирусов представлена на схеме (рис.40).



Рис. 40. Стратегия репликации/транскрипции генома гепаднавирусов

Гепаднавирусы и ретровирусы, обладая общей стратегией синтеза ДНК на матрице РНК (обратной транскрипцией), реализуют ее по-разному, что не исключает наличия сходных моментов (табл.).

Таблица Сравнение основных параметров ретровирусной и гепаднавирусной транскрипции (по S.J. Flint et al., 2009)

Параметр	Ретровирусы	Гепаднавирусы
Вирусный геном	РНК (псевдодиплоидный)	ДНК (частично дн)
РНК как матрица:	Геномная РНК, мРНК (gag, pol)	Прегеномная РНК, мРНК (С и Р белки)
ДНК интермедиат	Кольцевая ДНК с 5' перекрыванием	Кольцевая ДНК с 5' перекрыванием
Фермент, кодируемый вирусом	ОТ	(Р белок)
Количество молекул в коровой частице	5-100	1
Функции фермента	ДНК-полимераза, РНКазы Н, хеликаза (расплетение нитей)	ДНК-полимераза, РНКазы Н, белок праймирования, белок РНК инкапсидации
Праймер для первой (-)нити ДНК	тРНК хозяина	Р белок
Сайт инициации	Около 5'-конца генома	Около 5'-конца прегенома
Первый ДНК-продукт	(-)strong stop ДНК, Около 100 нуклеотидов	4 нуклеотида, копируемые с 5' –концевой петли
Первая смена матрицы	На комплементарной последовательности в повторяющейся последовательности	На комплементарной последовательности в повторяющейся последовательности
Праймер для второй (+)нити ДНК	Производная РНК, внутренний продукт РНКазы Н (ppt)	Производная РНК, 5'-кэп терминальный продукт РНКазы Н
Сайт инициации	Около 5 конца (-)ДНК	Около 5 конца (-)ДНК
Время инициации	Перед завершением (-)нити	После завершения (-)нити
Тип праймирования	Праймирование in situ	Транслоцированный праймер
Вторая смена матрицы	На 3' конец (-)нити ДНК через комплементарную rbs последовательность	На 3' конец (-)нити ДНК через комплементарную последовательность
Нуклеопротеиновый комплекс, осуществляющий ОТ	Субвирусные коровые частицы, накапливающиеся в цитоплазме при проникновении вируса	Возникающие субвирусные коры; цитоплазматические интермедиаты при сборке вируса
Финальные продукты	Двунитевая линейная ДНК	Кольцевая вирусная ДНК или ковалентно-замкнутая эписомальная ДНК
ДНК, содержащаяся в ядре	Интегрированная в геном хозяина провирусная ДНК	Неинтегрированная эписома в ядре клетки-хозяине

Глава 4

Взаимоотношения вируса и клетки

4.1 Воздействие вируса на клетку хозяина

Некоторые вирусы реплицируются в клетке-хозяине без причинения ей какого-либо вреда. Однако обычно репликация вирусов, сталкиваясь с нормальной функцией клетки, вызывает эффект подавления хозяина.

Эффект подавления хозяина – процесс, в котором клеточный макромолекулярный синтез подавлен из-за доминирования метаболизма вируса над метаболизмом хозяина. Эффект подавления не абсолютен, не всякая вирусная инфекция вызывает эффект подавления, и не всегда эффект подавления требуется, чтобы облегчить вирусную репликацию.

Воздействие вируса на клетку может проявиться морфологическими изменениями клетки, включающими округление клеток, их распад, слияние клеток с образованием синцитиев и симпластов или более тонкие изменения формы клеток. Такие изменения обозначают как цитопатическое действие вируса (ЦПД). Однако, кроме видимых изменений, в инфицированных вирусом клетках происходят глубинные процессы (цитопатогенез), направленные на ингибирование вирусом экспрессии генов хозяина с целью создания приоритетов для собственной репликации и подавления противовирусного ответа хозяина.

Попав в клетку-хозяина, вирус начинает вмешиваться в биосинтетические процессы всех стадий реализации генетической информации.

Ингибирование клеточной транскрипции.

Аппарат транскрипции хозяина представляет логическую цель для ингибирования синтеза белков хозяина на его первых этапах, что вирусы делают с большим разнообразием. Приведем некоторые примеры.

ДНК-содержащие бактериофаги с сократительным хвостовым отростком, например колифаг Т4 (*Caudovirales, Myoviridae*), не кодируют собственной РНК-полимеразы, а используют хозяйскую. Однако, при этом сразу после транскрипции ранних генов фага РНК-полимеразой хозяина синтезируются фаговые ферменты, которые расщепляют ДНК хозяина и модифицируют α -субъединицу его РНК-полимеразы путем АДФ-рибозилирования. Такая модификация не позволяет ферменту распознавать промоторы *E.coli*, тем самым запрещая транскрипцию генов хозяина. Другой бактериофаг Т7 (*Podoviridae* – фаги с коротким хвостовым отростком) кодирует ингибитор бактериальной РНК-полимеразы.

Для членов многих семейств РНК-содержащих вирусов ингибирование синтеза РНК хозяина является особенностью вирусной инфекции, которая известна уже много лет. Так у полиовирусов (*Picornaviridae, PV, ПВ*) и вируса

везикулярного стоматита (*Rabdoviridae*, VSV, ВВС) функцию ингибирования экспрессии генов хозяина выполняют белки, играющие важную роль в вирусном репликативном цикле. Это полиовирусная 3С протеаза и М-белок ВВС. У обоих вирусов все вирусные белки расположены в цитоплазме инфицированных клеток, где происходит репликация и сборка вирионов. Однако, 3С протеаза полиовируса (так же, как ее предшественник 3СD) и М-белок ВВС локализуются и в цитоплазме и в ядре инфицированных клеток, где они выполняют разные функции: участвуют в процессе репликации вируса и ингибировании выражения генов хозяина, соответственно. Оба эти вирусных белка нарушают транскрипцию всех трех РНК полимераз клетки (RNAP), например, путем ингибирования активности транскрипционного фактора IID (TFIID).

TFIID – один из семи основных иницирующих факторов, требующихся в дополнение к РНК-полимеразе II (RNAPII) для транскрипции от RNAPII-зависимого промотора. TFIID – мультисубъединичный комплекс, состоящий из ДНК-связывающей субъединицы, белка, связывающего ТАТА-бокс (TBP), и набора TBP-ассоциированных факторов (TAFs). TFIID - первый основной транскрипционный фактор, асSEMBЛИРУЮЩИЙСЯ с RNAPII-зависимым промотором. Из-за его центральной роли в основной и активизированной транскрипции, TFIID – является очевидной целью для инактивации вирусами, которые запрещают общую экспрессию генов хозяина.

Установлено, что в клетках, инфицированных полиовирусом и вирусом везикулярного стоматита, TFIID бездействует. В экспериментах по изучению активности очищенного TFIID в культуре клеток, трансфицированной полиовирусом, было установлено, что генным продуктом, ответственным за инактивацию TFIID, является 3С протеаза, которая обычно расщепляет P1, P2 и P3 белки-предшественники, используя аминокислотный мотив Gln-Gly. Три таких мотива (Gln-Gly) были найдены в 300-аминокислотной последовательности TBP клеток человека. По всей вероятности, ингибирование транскрипции в клетке-хозяине в случае полиовирусов связано с протеолитическим расщеплением ТАТА-связывающей субъединицы TFIID протеазой 3С.

У рабдовирусов (вируса везикулярного стоматита и близко связанного с ним вируса бешенства), генным продуктом, ответственным за ингибирование транскрипции хозяина, является вирусный матриксный белок (М-белок). М-белок играет главную роль в сборке вирионов. Локализуясь на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны клетки-хозяина, этот белок создает условия для отпочкования нуклеокапсида и приобретения им оболочки. В отличие от 3С протеазы полиовирусов, М-белок не обладает какой либо известной каталитической активностью, которая могла бы быть ответственна за ингибирование экспрессии генов хозяина. То, что вирусный белок, обычно рассматриваемый как структурный, запрещает экспрессию генов хозяина, является необычным. В экспериментах по трансфекции культуры клеток установлено, что М-белок является очень мощным ингибитором, 10000 копий

на клетку М-белка ингибируют 50 % RNAPII-зависимой транскрипции хозяина. Каким образом М-белок инактивирует RNAPIID зависимую транскрипцию – связывается ли он с TFIID или действует косвенно, активизируя подавляющий фактор хозяина, пока неясно. Ясно, что способность М-белка ингибировать выражение генов хозяина представляет функцию, независимую от его роли в сборке вириона.

Ингибирование процессинга и транспорта мРНК хозяина.

Ингибирование выражения генов хозяина в посттранскрипционный период является другой логической стратегией вирусов. Ингибирование процессинга клеточных мРНК и их транспорта из ядра в цитоплазму присуще вирусам гриппа и связано с единственным вирусоспецифическим белком NS1. Аналогично, в ВВС-инфицированных клетках также многие шаги процессинга РНК запрещаются М-белком. Эти два вируса обладают интересными параллелями, которые иллюстрируют некоторые общие принципы ингибирования экспрессии генов хозяина. Однако, различия в деталях того, как они это выполняют, отражают относительную зависимость от хозяина.

Ингибирование процессинга РНК белком NS1 вируса гриппа. Одним из этапов процессинга мРНК является полиаденилирование 3'-конца. Этот этап является мишенью для белка NS1 вирусов гриппа. В инфицированных клетках 3'-концы вирусных мРНК синтезируются вирусной РНК-полимеразой, на которую NS1 белок не действует. Процессинг 3'-концов клеточных мРНК происходит в два связанных этапа, включающих внутриядерное расщепление предшественника мРНК и полиаденилирование образовавшихся 3'-концов. Белок NS1 запрещает оба эти шага. В первом случае NS1 связывает 30-кДа субъединицу нуклеазы и специфический фактор полиаденилирования (CPSF). В результате поли-А-полимераза не может добавить на 3'-конец более чем 10-12 остатков аденозина. Дальнейшая работа поли-А-полимеразы требует ядерного поли-А-связывающего белка (PABII). NS1 белок связывает PABII и сталкивает его с короткого поли-А хвоста. В результате клеточные мРНК, содержащие от 10 до 12 остатков аденозина на 3'-конце, накапливаются в ядре инфицированных вирусом гриппа клеток. Предполагается, что нарушение транспорта мРНК из ядра в цитоплазму связано с блокированием NS1 связывания PABII с 3'-концом мРНК, что необходимо для ядерного транспорта.

Ингибирование М-белком ядерно-цитоплазматического транспорта. Ингибирование процессинга РНК хозяина вирусом гриппа было изначально признано как результат блокирования их ядерно-цитоплазматического транспорта, а блок транспорта РНК в клетках, инфицированных ВВС – как блокирование процессинга. В клетках, инфицированных ВВС, процессинг малых ядерных (snRNAs) и рРНК ингибируется быстро, в то время как процессинг мРНК и тРНК – более медленно, что отражает различную чувствительность процессинга разных рибонуклеиновых кислот к обобщенному блоку ядерно-цитоплазматического транспорта и РНК и белков,

который создает М-белок. Предполагается, что влияние М-белка на транспорт почти всех белков и РНК из ядра в цитоплазму связано с его взаимодействием с одним или несколькими компонентами системы ядерного транспорта (Ran-RC1) и зависит от асимметричного расположения поперек ядерной мембраны двух различных форм Ran и малого GTP-связывающего белка. Таким образом, М-белок, связываясь с элементами, обеспечивающими энергозависимый ядерно-цитоплазматический транспорт молекул, блокирует его, нарушая градиент Ran-GTP/Ran-GDP, направленный поперек ядерной оболочки.

Ингибирование трансляции мРНК хозяина.

Во многих вирусных системах, в которых наблюдается эффект подавления хозяина, наблюдается приоритетная трансляция вирусных мРНК, которая происходит по эндогенным механизмам трансляции хозяина.

Для большинства РНК-содержащих вирусов ингибирование трансляции опережает ингибирование синтеза мРНК хозяина на уровне эндоплазматических мРНК. При этом в инфицированной клетке повышения концентрации мРНК не наблюдается, т.е. цитоплазма инфицированных клеток содержит нормальные уровни мРНК хозяина. Эти РНК, извлеченные из инфицированных клеток, могут быть эффективно транслированы *in vitro* в лизатах ретикулоцитов, что свидетельствует об их активности. Ингибирование трансляции в инфицированных клетках обычно происходит из-за инактивации факторов трансляции хозяина.

Ингибирование трансляции пикорнавирусами:

- Пикорнавирусы вмешиваются в синтетические процессы клетки на уровне инициации трансляции. Классическим примером вызванного вирусом ингибирования трансляции хозяина является протеолитическое расщепление фактора инициации трансляции eIF4G в клетке, инфицированной пикорнавирусами. Для большинства пикорнавирусов это расщепление осуществляет вирусная протеаза 2A, у вируса ящура – лидерная (L) протеаза. EIF4G – одна из субъединиц мРНК-связывающего комплекса eIF4F, которая является посредником взаимодействия eIF4F и мРНК с другими элементами иницирующего комплекса. Разрушение eIF4G предотвращает ассоциацию комплекса с кэп-связывающей субъединицей EIF4E, запрещая, таким образом, кэп-зависимую трансляцию мРНК. Так как РНК пикорнавирусов не кэпирована, это ингибирование не затрагивает трансляции вирусных мРНК.

- мРНК, которые уже участвовали в трансляции на полисомах, в меньшей степени зависят от eIF4G для переиницирования синтеза белка. В связи с этим существуют и другие механизмы блокирования синтеза клеточных белков. Установлено, что протеазы 2A и 3C пикорнавирусов расщепляют клеточный эндоплазматический поли-А-связывающий белок. Этот белок участвует в инициации трансляции, соединяя 3'-конец мРНК с ее 5'-концом, упомянутой как модель замкнутой системы трансляции. Таким образом, расщепление поли-А-связывающего белка может вносить вклад в ингибирование трансляции хозяина, прерывая эту замкнутую систему.

Ингибирование трансляции в клетках, инфицированных ВВС.

Ингибирование белкового синтеза в клетках, инфицированных ВВС, является примером, где ингибирование в значительной степени происходит благодаря противовирусному ответу хозяина, особенно ответу на днРНК. Почти все РНК-содержащие вирусы производят днРНК как побочный продукт вирусной репликации. Для многих РНК-вирусов, включая ВВС, главной особенностью ответа клетки-хозяина на днРНК вируса является ингибирование белкового синтеза PKR, которая известна как киназа, индуцирующая интерферон. Большинство клеток экспрессирует существенные количества этого фермента, который служит главным активатором ответа хозяина на днРНК даже в отсутствие интерферона. В присутствии днРНК, PKR фосфорилирует альфа-субъединицу GTP-связывающего иницирующего фактора eIF2. Фосфорилированная альфа-субъединица блокирует eIF2 в GDP-связанной форме, предотвращая его повторное применение для инициации трансляции. Ингибирование eIF2 является главным механизмом запрещения трансляции в ВВС-инфицированных клетках, однако это не исключает существования и других механизмов.

Ингибирование трансляции в клетках, инфицированных вирусами гриппа. Для вируса гриппа инактивация eIF2 с участием PKR не характерна. Как и в инфицированных полиовирусом клетках, деятельность PKR запрещается за счет активации ее клеточного ингибитора. Целью для инактивации белкового синтеза в клетках, инфицированных вирусом гриппа, является кэп-связывающий иницирующий фактор eIF4E. Для взаимодействия eIF4E с мРНК этот фактор должен быть фосфорилирован клеточной киназой MNK1. В клетках, инфицированных вирусом гриппа, eIF4E – по крайней мере, частично, инактивируется из-за недостатка фосфорилирования. Является ли это результатом снижения активности MNK1 или повышения активности фосфатазы, вирусный это механизм или ответ хозяина на вирусную инфекцию, пока не определено. Ясно лишь, что результатом является снижение эффективности трансляции кэпированных мРНК клетки. Ожидалось, что это ингибирование затронет трансляцию вирусных мРНК также, как мРНК клетки, так как кэп мРНК вируса получен от клеточных мРНК в результате активности вирусной РНК-полимеразы. Как и РНК полиовируса, мРНК вируса гриппа содержат на 5'-конце последовательность, которая увеличивает эффективность трансляции в присутствии низкого уровня факторов инициации трансляции. Эта последовательность включает 12 общих для всех восьми сегментов 5'-концевых нуклеотидов и некоторые специфичные для сегмента фланкирующие последовательности. С этой последовательностью могут связываться разнообразные белки хозяина, и один из них увеличивает трансляцию вирусных мРНК. Этот белок является клеточным фактором G-богатой последовательности 1 (GRSF-1), который предварительно идентифицирован как мРНК-связывающий белок, чья роль в процессе трансляции ранее не демонстрировалась. Таким образом, у вируса гриппа избирательная трансляция мРНК происходит при участии факторов хозяина,

которые взаимодействуют с *cis-acting* последовательностями в геноме вируса, увеличивая трансляцию в условиях, в которых деятельность факторов инициации трансляции хозяина запрещена.

Ингибирование трансляции вирусами герпеса (ВПГ). Подобно другим цитолитическим вирусам, вирусы герпеса облегчают свою репликацию путем приоритетного синтеза вирусных белков в обход экспрессии генов клетки-хозяина. В клетках культуры ткани, инфицированной ВПГ-1 или ВПГ-2, синтез белков и мРНК уменьшается приблизительно на 90 % через 3 часа после инфекции. Эта особенность запрещения синтеза белка хозяина, вызванного ВПГ инфекцией, является мультишаговым процессом, который может быть разделен на две стадии: первичное запрещение и вторичное запрещение. Первичное запрещение синтеза белков хозяина характеризуется прямой дезинтеграцией существовавших ранее полирибосом и деградацией предсуществовавших клеточных и вирусных мРНК, что происходит сразу после проникновения HSV в клетку в отсутствие белкового синтеза *de novo*. Напротив, вторичное запрещение имеет место на поздних стадиях инфекции и требует экспрессии вирусных генов.

Предполагается, что в первичном запрещении белкового синтеза хозяина ключевую роль играет, по крайней мере, один вирусный фактор – вирионный белок запрещения хозяина (VHS), который дестабилизирует мРНК, и, частично, дезинтегрирует полисомы. VHS-белок вирусов герпеса представляет собой фосфопроtein м.м. 58-кДа. Этот белок образует в вирионе слой тегумента. Таким образом, VHS поставляется в цитоплазму инфицированных клеток в составе вириона. Использование *in vitro* высокоочищенного VHS показало, что этот белок непосредственно обладает РНКазной активностью. Предварительные результаты свидетельствуют, что VHS вероятно, или самостоятельно, или в сотрудничестве с другими факторами, расщепляет молекулы мРНК в одном или нескольких участках поли-А трека, функцией которого является защита мРНК от разрушения РНКазами хозяина. Следует отметить, что приведенный выше механизм запрещения синтеза белков хозяина является уникальным, но не единственным для вирусов герпеса.

Воздействие вирусов на клетку на уровне репликации.

1. Смещение клеточного хроматина к периферии ядра во время вирусной репликации (герпесвирусы) может нарушать нормальный процесс удвоения ДНК хозяина.
2. Деградация клеточной ДНК вирусными белками (вирионная ДНКаза поксвирусов может проникать в ядро и деградировать онДНК).
3. Обеднение клеточного ДНК-синтеза, т.к. для синтеза вирусных нуклеиновых кислот используются клеточные репликативные белки.
4. Нарушение репликации ДНК клетки хозяина в результате торможения синтеза клеточных белков (вторичный эффект).

5. Побуждение клетки к репликации ДНК. Для обеспечения собственного синтеза строительным материалом (нуклеотидами или их предшественниками) и инструментами (структурными и репликативными белками-ферментами) вирусы могут стимулировать переход клетки в S (синтетическую) фазу (опухолеродные вирусы),.

6. Использование клеточного репликативного аппарата для синтеза вирусной ДНК. Присуще интегрированным вирусам (например, ретровирусам) и эписомальным геномам (ВЭБ).

Ингибирование функции цитоскелета.

Ингибирование функции цитоскелета полиовирусом. Цитоскелет эукариотической клетки состоит из трех главных элементов: микронитей, микротрубочек и промежуточных филаментов. Микронити составлены из субъединиц актина, а микротрубочки из субъединиц тубулина. Эти элементы цитоскелета являются обычными почти для всех типов клеток. Промежуточные филаменты состоят из субъединиц цитокератина, которые появляются в процессе клеточной дифференцировки. Инфекция полиовирусами вероятно стимулирует существенные перестройки всех трех элементов цитоскелета. Однако единственным продемонстрированным механизмом является разрушение микротрубочек в результате расщепления минорного белка 4 микроканальца (МАР4) вирусной протеазой 3С. Функция МАР4 заключается в регуляции сборки и демонтажа микроканальца, что необходимо для стабилизации микротрубочек. В связи с этим протеолитическое расщепление МАР4 приводит к нарушению сборки микротрубочек и их демонтажу, в то время, как микротрубочки играют главную роль в поддержании формы клетки. Однако, для того, чтобы полностью достичь округления клетки, вероятно необходимо разрушение и других элементов цитоскелета. В то время как инфицированные полиовирусом клетки внешне похожи на апоптотические клетки, все-таки, имеется ряд морфологических отличий от клеток, испытывающих апоптоз. Эти отличия включают недостаток эндоплазматического блеббинга (образования внутриклеточных везикул) и морфологические особенности ядер. Также наблюдается недостаток фрагментации хромосомной ДНК на олигомеры нуклеосомальной длины, которая является характерным признаком апоптотирующих клеток. Несмотря на это, инфекция полиовирусом в непермиссивных условиях может вызывать типичные проявления апоптоза. По всей вероятности полиовирусы в определенных условиях обладают активностью, стимулирующей апоптоз, которая обычно подавляется при продуктивной инфекции. Тождества функций активации апоптоза и подавления апоптоза полиовирусом не были установлены.

Округление клеток, инфицированных вирусом везикулярного стоматита.

Предполагается существование двух различных механизмов, с использованием которых ВВС стимулирует округление клеток. ВВС кодирует белок (М-белок), который кроме ингибирования синтеза клеточных мРНК, воздействует на

клетку путем нарушения функции цитоскелета подобно 3С протеазе полиовируса. В тоже время, VSV может стимулировать клетки к апоптозу в ответ на синтез вирусных днРНК, что обеспечивает второй механизм округления и смерти клеток. Способность М-белка VSV стимулировать округление клеток в отсутствие других вирусных компонентов была его первой описанной цитопатогенетической функцией. Этот эффект М-белка не связан с дезорганизацией цитоскелета в процессе сборки вирионов. Установлено, что округление клеток коррелирует со способностью М-белка запрещать экспрессию генов хозяина. Однако в клетках, инфицированных VSV, наблюдается разрушение промежуточных филаментов цитоскелета, актиновые микронити дезорганизованы, но не разрушены, что также может вносить вклад в округление клетки. Влияние М-белка на полимеризацию тубулина в условиях *in vivo* изучается.

Индукция апоптоза.

В настоящее время имеется много примеров, в которых смерть клетки, инфицированной вирусом, происходит из-за активного участия самой клетки-хозяина, индуцирующей ряд биохимических и морфологических изменений, определяемых как запрограммированная клеточная гибель или апоптоз. Ключ обсуждаемой проблемы заключается в том - следует ли апоптоз из вызванного вирусом ингибирования экспрессии генов хозяина или, альтернативно, является противовирусным ответом хозяина. Можно было ожидать, что вирусные белки, способные к запрещению синтеза, процессинга, транспорта и трансляции РНК хозяина, приводят клетку к смерти, так как ингибирование этих процессов несовместимо с ее жизнью. Однако это невыгодно вирусу.

Апоптоз часто требует синтеза новых клеточных генных продуктов. В связи с этим, вирусные белки, которые запрещают выражение генов хозяина, могут ускорять апоптоз в некоторых типах клеток, но задерживать начало апоптоза в других типах клеток. К вирусам, индуцирующим апоптоз клетки-хозяина, относятся, например, вирусы гриппа, вирус везикулярного стоматита, ВИЧ.

Индукция апоптоза вирусами гриппа. Вирусы гриппа явились первым примером вирусов, при инфекции которыми смерть клеток происходит в результате апоптоза, который происходит в результате противовирусного ответа хозяина. Вирус гриппа стимулирует экспрессию мембранного Fas антигена (CD95) и Fas лиганда, относящегося к семейству фактора некроза опухоли. Роль Fas антигена в вирусиндуцированном апоптозе заключается в том, что этот белок, взаимодействуя с Fas-лигандом, запускает каскад апоптотических реакций через активацию проапоптотической протеазы каспаза-8. Белок Fas имеет в своем составе домен смерти, передающий апоптотический сигнал. При мутациях в этом домене или при его отсутствии сигнал смерти не передается, и клетки приобретают устойчивость к индукции апоптоза вирусом гриппа. Индукция апоптоза может быть вызвана и другими лиганд-рецепторными парами, продуцируемыми вирус-инфицированной

клеткой. Например, большинство типов клеток секретируют растворимую форму фактора роста TGF- β , продукция которого может быть индуцирована вирусом гриппа. Связывание TGF- β с его рецептором может стимулировать апоптоз во многих типах клеток.

Для вирусов гриппа определены два фактора, которые вовлечены в индукцию апоптоза – вирусная днРНК и вирусная нейраминидаза. Есть веские доказательства того, что индукция Fas-опосредованного апоптоза является частью ответа хозяина на днРНК вируса. Индукция экспрессии Fas антигена вирусом гриппа или его двунитевой репликативной формой РНК происходит, по крайней мере, частично, при участии протеинкиназы R (PKR). В дополнение к ответу хозяина на днРНК, индукция апоптоза в инфицированных вирусом гриппа клетках может вызываться вирусной нейраминидазой. Ингибиторы вирусной нейраминидазы тормозят апоптоз, если добавлены в культуру клеток сразу после трансфекции. Вирусы с высоко активной нейраминидазой стимулируют апоптоз в клетках-хозяевах быстрее чем, вирусы, имеющие менее активную нейраминидазу. Вирусная нейраминидаза участвует в активации растворимого TGF- β путем удаления нейраминовой кислоты.

Таким образом, вирусы гриппа используют различные механизмы индукции апоптоза клетки-хозяина. Одни связаны с процессом репликации РНК, другие - с ферментативной активностью гликопротеидов вирусной оболочки (нейраминидаза). Недавние исследования других вирусов показали, что аналогично протекает индукция апоптоза у альфавирусов (вирус Синдбис), у которых способность стимулировать апоптоз связана с двумя факторами – репликацией РНК и активностью гликопротеидов оболочки.

Индукция апоптоза ВВС. Предполагается, что главную роль в индукции апоптоза в клетках, инфицированных ВВС, также играет ответ хозяина на днРНК вируса. Он реализуется через активацию PKR, индуцирующей экспрессию Fas, как и в случае вирусов гриппа. Однако ВВС стимулирует активацию не каспазы-8, а каспазы-9. Эта каспаза обычно активизирует апоптотический путь, вовлекающий выход цитохрома С из митохондрий. Цитохром связывается с проапоптотическим фактором Araf-1, активизирующим каспазу-9. Эмбриональные фибробласты, дефектные по Araf-1, обычно устойчивы к индукции апоптоза ВВС.

Запрещение апоптоза аденовирусами. Взаимодействие аденовирусов с клеткой может проявляться тремя типами инфекции: продуктивной, персистирующей и трансформирующей. Стратегия выживания аденовирусов направлена на подавление апоптоза инфицированной клетки. Установлен целый ряд молекулярных взаимодействий, обеспечивающих вирусу преодоление механизмов клеточной защиты. Продукт ранней транскрипции гена E1A влияет на уровень транскрипции клеточного фактора p53, который является опухолевым супрессором генов апоптоза. Продукт E1B является аналогом клеточного протоонкогена Bcl-2 и регулирует клеточное деление. Один из продуктов группы генов E3 (gp19K), взаимодействует с молекулами

гистосовместимости первого класса, чем препятствует их доставке на поверхность клетки. В результате, инфицированная аденовирусом клетка не узнается цитотоксическими В-лимфоцитами. Еще один путь блокирования апоптоза заключается в том, что продукты генов E3 участвуют в удалении Fas(CD95) молекулы, опосредующей апоптоз, с клеточной поверхности и ее деградации. Аденовирусы также блокируют активность ферментов, участвующих в каталитическом расщеплении клеточных белков, которое происходит при апоптозе.

4.2 Противовирусный ответ хозяина

Бактерии защищаются:

- путем модификации поверхностных белков, используемых вирусом в качестве рецепторов;
- путем блокирования ДНК вируса;
- с использованием систем *gm* (рестрикции-модификации), CRISPR (система прокариотических сайленсинг-РНК).

Клетки растений защищаются путем РНК-сайленсинга – системы РНК-интерференции с участием малых некодирующих РНК, которые являются продуктом ядерного процессинга днРНК. Малые РНК, взаимодействуя с комплементарными последовательностями, препятствуют трансляции или нарушают стабильность транскрипта.

Клетки млекопитающих:

- запускают программу апоптоза – вирусы, в свою очередь, так или иначе блокируют сигнальные пути апоптоза (например аденовирусные белки E1B и E4 связываются с клеточным белком p53);
- синтезируют низкомолекулярные регуляторные белки – интерфероны. ИФН активируют синтез протеинкиназы PKK (инактивирует путем фосфорилирования IF2e, что нарушает трансляцию всех белков, в т.ч. вирусных) и олигоденилатсинтазы OAS (полимеризует АТФ в олиго(А)нуклеотид – активатор латентной РНКазы L, которая фрагментирует все РНК, в том числе вирусные).
- активируют иммунный ответ организма – вирусы уходят от иммунного ответа разными путями. Гликопротеины gE и gI вирусов герпеса связывают Fc-фрагменты, что блокирует систему комплемента, тем самым нейтрализуют антитела. Другие способы избегания иммунного ответа – модификация клеточных рецепторов, необходимых для распознавания инфицированных клеток цитотоксическими лимфоцитами или вмешательство в систему цитокинов (вирусы оспы кодируют 4 белка, которые могут связываться с цитокинами – хемокинами, интерлейкином-1 β , интерфероном IFN- γ).

Литература

1. Новикова Н.А., Новиков В.В., Добротина Н.А., Мазепа В.Н. Вирусология. Учебное пособие. Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2002. – 242 с.
2. Новикова Н.А. Хранение и реализация генетической информации вирусов [Электронный ресурс]: Учебное пособие. Нижний Новгород: ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2007. – 84 с. Режим доступа: <http://www.unn.ru/pages/issues/aids/2007/35.pdf>
3. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Под редакцией Д.К. Львова. Москва: Изд-во. «Медицинское информационное агентство». – 2013. – 1197 с.
4. Acheson N. H. Fundamentals of molecular virology. – 2011. – 497 с.
5. Cann A.J. Principles of Molecular Virology. – 2012. – 303 с.
6. Flint S.J., L.W. Enquist, V.R. Racaniello, A.M. Skalka. Principles of Virology. V.1. Molecular Biology. – 2009. – 566 с.
7. Knip D.M., Howley P.M. Fields Virology. V.II. Specific Virus Families. 2007.
8. Strauss J. H., E.G. Strauss. Viruses and human disease. – 2008. – 468с.
9. Dimmock N.J., A.J. Easton, K.N. Leppard. Modern Virology. – 2007. – 480 с.
10. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, Xenarios I, Le Mercier P. Nucleic Acids Res. 2011 Jan;39(Database issue):D576-82.: http://www.expasy.org/viralzone/all_by_protein/230.html

Новикова Надежда Алексеевна

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСОВ С КЛЕТКОЙ

Учебное пособие

Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Нижегородский государственный университет им.
Н.И. Лобачевского».
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Подписано в печать Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. Уч.-изд. л. 3,3.
Заказ № 325. Тиражэкз.

Отпечатано в типографии Нижегородского госуниверситета
им. Н.И. Лобачевского
603600, г. Нижний Новгород, ул. Большая Покровская, 37
Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01