

А.А. Аграновский

Репликация вирусных РНК

Товарищество научных изданий КМК

Москва ❖ 2019

УДК 578.2(075.8)

ББК 28.3я73-1

A25

Аграновский А.А. Репликация вирусных РНК. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2019. 165 с.

Книга профессора кафедры вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова Алексея Анатольевича Аграновского «Репликация вирусных РНК» написана по материалам авторских лекций, читаемых на биологическом факультете университета. Учебник включает разделы, посвященные механизмам синтеза рибонуклеиновых кислот при инфекции вирусов с позитивным РНК геномом (бактериофагов, альфавирусов, пикорнавирусов, коронавирусов), негативным РНК геномом (рабдовирусов, парамиксовирусов, вирусов гриппа и буньявирусов), двуцепочечным РНК геномом (цистовирусов и реовирусов), а также агентов «субвирусного мира» (вирионидов и вируса гепатита дельта). Автор последовательно рассматривает механизмы синтеза РНК, сравнивая различные вирусные системы и делая обобщения. В учебнике дается единообразная номенклатура вирусных белков и регуляторных элементов генома, упрощающая труд читателя.

Учебник предназначен для студентов, аспирантов и научных сотрудников, интересующихся современной молекулярной вирусологией.

Рецензенты:

д.х.н., проф. А.Б. Вартапетян

(химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова);

д.б.н., проф. С.Ю. Морозов

(НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова);

д.б.н., проф. А.Б. Четверин

(Институт белка РАН)

*Учебник предназначен для студентов бакалавриата
и магистратуры кафедр вирусологии, биоинженерии и генетики
биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
а также аспирантов и молодых преподавателей факультета*

ISBN 978-5-907099-63-0

© А.А. Аграновский, текст, иллюстрации, 2019

© Товарищество научных изданий КМК, 2019

Оглавление

1. Список сокращений	5
2. Предисловие	9
3. Вводные замечания: принципы репликации вирусных РНК геномов	11
4. Вирусы с позитивным РНК-геномом	13
4.1. РНК-содержащие бактериофаги	13
4.1.1. Фаг Q β	14
4.1.2. Другие РНК фаги	21
4.2. Пикорна-подобные вирусы	21
4.2.1. Пикорнавирусы	22
4.2.2. Калицивирусы	34
4.2.3. Пикорна-подобные вирусы растений	37
4.3. Альфа-подобные вирусы	39
4.3.1. Альфавирусы	39
4.3.2. Альфа-подобные вирусы растений — бромовирусы	48
4.4. Флавивирусы и вирус гепатита С	55
4.4.1. Флавивирусы	55
4.4.2. Вирус гепатита С	60
4.5. Томбусвирусы и диантовирусы	65
4.5.1. Томбусвирусы	65
4.5.2. Диантовирусы	71
4.6. Нидовирусы	72
4.6.1. Артеривирусы	74
4.6.2. Коронавирусы	80
4.6.3. Другие нидовирусы	85
5. Вирусы с негативным РНК-геномом	87
5.1. Рабдовирусы	88
5.2. Парамиксовирусы	97
5.3. Филовирусы	104
5.4. Борнавирусы	104
5.5. Ортомиксовирусы	110

5.6. Буньявирусы	118
5.6.1. Ортобуньявирусы, хантавирусы и найровирусы	119
5.6.2. Флебовирусы и тосповирусы	126
5.7. Аренавирусы	130
6. Вирусы с двунитчатым РНК-геномом	136
6.1. Цистовирусы	136
6.2. Реовирусы	142
6.3. Бирнавирусы	146
6.4. Тотивирусы и гиповирусы	147
7. Вироиды и вирус гепатита дельта	149
7.1. Вироиды	149
7.2. Вирусоиды	154
7.3. Вирус гепатита дельта	155
8. Заключение	160
Благодарности	165

1. Список сокращений

Употребление сокращений в современном научном тексте на русском языке встречает вполне очевидные трудности, связанные с тем, что подавляющая масса литературы по молекулярной биологии и вирусологии, со своим сложившимся сводом терминов, написана на английском. Автор постарался использовать компромиссные варианты употребления терминов и сокращений, избегая как чрезмерных англицизмов (рибонуклеиновая кислота обозначается здесь всё же как «РНК», а не «RNA»), так и устаревших аббревиатур с использованием букв русского алфавита (например, остатки нуклеиновых кислот и фосфатные группы обозначаются латинскими буквами).

aa — аминокислотный остаток (amino acid residue)
нт — (рибо)нуклеотидный остаток
оц — одноцепочечная (нуклеиновая кислота)
дц — двуцепочечная (нуклеиновая кислота)
НТО — нетранслируемая область мРНК
РНП — рибонуклеопротеин
СЧ — субвирусная частица (у цистовирусов и реовирусов)
ЭР — эндоплазматический ретикулум.
АТФ — (рибо)аденозинтрифосфат
АТРаза — (рибо)аденозинтрифосфатаза
СР — белок оболочки (coat protein)
ESCRT — белковые комплексы эндосомального сортирования и транспорта (endosomal sorting complexes required for transport)
HEL — домен РНК хеликазы
HN — гемагглютинин
IRES — участок внутренней посадки рибосом (internal ribosome entry site)
kB — kilobase, 1000 нт
MTR — домен метилтрансферазы РНК
NA — нейраминидаза
NES — сигнал ядерного экспорта (nuclear export signal)
NLS — сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal)
NiRAN — нидовирусная нуклеотидилтрансфераза (nidovirus RNA polymerase-associated nucleotidyl transferase)

NTPаза — (рибо)нуклеозидтрифосфатаза
NU — нидовирусная уридилат-специфичная энднуклеаза (EndoN)
ORF — открытая рамка трансляции (open reading frame)
PABP — поли(А)-связывающие белки (poly(A)-binding proteins)
PCBP — белки, связывающиеся с полицитозиновыми участками РНК (poly(rC) tract-binding proteins)
POL — домен РНК-зависимой РНК полимеразы
P^{Pro} — домен цистеиновой (тиоловой или папаин-подобной) протеиназы
PTB — белки, связывающиеся с полипиримидиновыми участками РНК (polypyrimidine tract-binding proteins)
RF — репликативная форма
RI — репликативный предшественник (replicative intermediate)
Rtn — ретикулон
rNTP — рибонуклеозидтрифосфат
S^{Pro} — домен сериновой (химотрипсин-подобной) протеиназы
TLS — тРНК-подобная структура (tRNA-like structure)

СПИСОК НАЗВАНИЙ ВИРУСОВ И ВИРУСНЫХ ГРУПП

Номенклатура вирусов и вирусных триб дается в соответствии с классификацией, принятой на момент написания данного учебника Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee For Virus Taxonomy, ICTV; <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>). Здесь и в основном тексте сокращенные названия вирусов приведены на латинице, названия родов даются в расшифровке аббревиатуры: «AlMV — alfalfa mosaic *Alfavirus*» или «BunV — Bunyamwera virus (*Orthobunyavirus*)». В списке указан также тип геномной нуклеиновой кислоты.

AMV — вирус мозаики люцерны, (+)РНК (alfalfa mosaic *Alfavirus*, сем. *Bromoviridae*).
ASBVd — вириод солнечных пятен авокадо, кольцевая оцРНК (avocado sunblotch viroid, сем. *Avsunviroidae*)
BMV — вирус мозаики костра, (+)РНК (brome mosaic *Bromovirus*, сем. *Bromoviridae*).
BunV — вирус Буньямвера, (–)РНК (Bunyamwera virus, *Orthobunyavirus*, сем. *Bunyaviridae*).
CYDV-RPV — вирус желтой карликовости злаковых, (+)РНК (cereal yellow dwarf *Polerovirus*, сем. *Luteoviridae*).
ChicV — вирус Чикунгунья, (+)РНК (Chicungunya virus, *Alphavirus*, сем. *Togaviridae*).

- Cystoviridae* — семейство, включающее дцРНК бактериофаг ф6 и родственные фаги псевдомонад.
- EAV — вирус артрита лошадей, (+)РНК (equine arthritis virus, *Arterivirus*, сем. *Arteriviridae*, order *Nidovirales*).
- EEEV — вирус восточного энцефаломиелита лошадей, (+)РНК (equine Eastern encephalomyelitis virus, *Alphavirus*, сем. *Togaviridae*).
- EMCV — вирус энцефаломиокардита, (+)РНК (encephalomyocarditis virus, *Cardiovirus*, сем. *Picornaviridae*).
- EWEV — вирус западного энцефалита лошадей, (+)РНК (equine Western encephalomyelitis virus, *Alphavirus*, сем. *Togaviridae*).
- FMDV — вирус ящура, (+)РНК (foot-and-mouth disease virus, *Aphthovirus*, сем. *Picornaviridae*).
- GAV — ассоциированный с жабрами (креветок) вирус, (+)РНК (gill-associated virus, *Okavirus*, сем. *Roniviridae*, order *Nidovirales*).
- HAV — агент гиповирулентности грибового увядания каштана, дцРНК (chestnut blight hypovirulence-associated agent, сем. *Hypoviridae*).
- HBV — вирус гепатита В, кольцевая дцДНК (hepatitis B virus, *Orthohepadnavirus*, сем. *Hepadnaviridae*).
- HCV — вирус гепатита С, (+)РНК (hepatitis C virus, *Hepacivirus*, сем. *Flaviviridae*).
- HDV — вирус гепатита дельта, (–)РНК (hepatitis delta virus, *Deltavirus*).
- HuNoV — человеческий норовирус, (+)РНК (human Norwalk virus, *Norovirus*, сем. *Caliciviridae*).
- HtnV — вирус Хантаан, (–)РНК (Hantaan virus, *Hantavirus*, сем. *Bunyaviridae*).
- IAV — вирус гриппа А, (–)РНК (influenza A virus, сем. *Orthomyxoviridae*).
- IBDV — вирус инфекционного заболевания бursы, дцРНК (infectious bursal disease virus, *Birnaviridae*).
- Leviviridae* — семейство, включающее (+)РНК бактериофаги MS2 и R17 (*Levivirus*) и Q β (*Allolevivirus*).
- Luteoviridae* — семейство, включающее изометрические вирусы растений с небольшими (+)РНК геномами.
- MHV — вирус мышинного гепатита, (+)РНК (murine hepatitis *Coronavirus*, сем. *Coronaviridae*).
- Mononegavirales* — порядок, объединяющий вирусы с однокомпонентным (–)РНК геномом (сем. *Rabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae*).
- MPVd — вирион мексиканской стеркулии (*Sterculia campanulata*), кольцевая оцРНК (Mexican papita viroid).
- MRV — ортореовирус млекопитающих, дцРНК (mammalian *Orthoreovirus*, сем. *Reoviridae*).

- Potyviridae* — семейство (+)РНК-содержащих нитевидных вирусов растений.
- PSTVd — вирион веретеновидности клубней картофеля, кольцевая оцРНК (potato spindle tuber viroid, сем. *Pospiviroidae*).
- PVY — Y вирус картофеля, (+)РНК (potato virus Y, *Potyvirus*, сем. *Potyviridae*).
- Rabdoviridae* — семейство вирусов с однокомпонентным (–)РНК геномом.
- RCNMV — вирус некротической мозаики клевера, (+)РНК (red clover necrotic mosaic *Dianthovirus*, сем. *Tombusviridae*).
- RYMV — вирус желтой крапчатости риса, (+)РНК (rice yellow mottle virus, *Sobemovirus*).
- RVFV — вирус лихорадки долины Рифт, (–)РНК, амбисенс РНК (Rift valley fever virus, *Phebovirus*, сем. *Bunyaviridae*).
- SARS-CoV — коронавирус атипичной пневмонии, (+)РНК (severe acute respiratory syndrome *Coronavirus*, сем. *Coronaviridae*).
- SeV — вирус Сендай, (–)РНК (Sendai virus, сем. *Paramyxoviridae*).
- SFV — вирус Леса Семлики, (+)РНК (Semliki Forest virus, *Alphavirus*, сем. *Togaviridae*).
- SINV — вирус Синдбис, (+)РНК (Sindbis virus, *Alphavirus*, сем. *Togaviridae*).
- TBSV — вирус кустистой карликовости томатов, (+)РНК (tomato bushy stunt *Tombusvirus*, сем. *Tombusviridae*).
- TEV — вирус гравировки табака, (+)РНК (tobacco etch *Potyvirus*, сем. *Potyviridae*).
- TNV — вирус некроза табака, (+)РНК (tobacco necrosis *Necrovirus*, сем. *Tombusviridae*).
- Tombusviridae* — семейство, включающее изометрические вирусы растений с (+)РНК геномами (RCNMV, TBSV, TNV).
- ToRSV — вирус кольцевых пятен табака (+)РНК (tobacco ringspot *Nepovirus*, сем. *Secoviridae*).
- UukV — вирус Уукуниеми, (–)РНК, амбисенс РНК (Uukuniemi virus, *Phebovirus*, сем. *Bunyaviridae*).
- VSV — вирус везикулярного стоматита, (–)РНК (vesicular stomatitis *Vesiculovirus*, сем. *Rabdoviridae*).

Предисловие

РНК-содержащие вирусы являются классическими моделями для изучения фундаментальных биологических закономерностей. Это связано с малыми размерами РНК геномов, их сравнительно простой организацией, разнообразием способов репликации и экспрессии генетической информации РНК и относительной простотой экспериментальной работы со многими РНК-вирусами. К числу открытий в области молекулярной биологии, связанных с использованием вирусных моделей, относится доказательство роли РНК как носителя генетической информации, развитие представлений о промежуточной роли мРНК в переносе информации от ДНК к белку, доказательство принципа моноцитронности эукариотических мРНК и многие другие. Настоящая книга посвящена именно теоретическим, молекулярным аспектам вирусологии, и почти не затрагивает вопросов, связанных с эпидемиологией, патогенезом и разработкой антивирусных препаратов.

РНК-содержащие вирусы используют клеточные механизмы генерации энергии и синтеза белка. Единственный базовый механизм, который обеспечивается вирус-специфическими белками — это репликация РНК. Все вирусные РНК геномы кодируют РНК-зависимую РНК полимеразу, основной фермент синтеза РНК. Исключение составляют только вироиды и некоторые другие «субвирусные» агенты, использующие для копирования РНК генома клеточные ДНК-зависимые РНК полимеразы. Относительная самостоятельность репликации (эта самостоятельность не абсолютна, поскольку в реликативных системах используются также клеточные белки и мембраны) диктует особый интерес исследователей к механизмам синтеза вирусных РНК, служащих для хранения и передачи генетической информации, и матричных молекул, определяющих ее реализацию при трансляции вирусных генов рибосомами.

В основу учебника положен курс лекций, читаемый автором на кафедре вирусологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. Читатель не найдет здесь систематического описания механизмов репликации у всех известных групп РНК вирусов, акцент скорее сделан на существующем в природе разнообразии этих механизмов и параллелях между ними. Порядок изложения был продиктован не тем, на каких хозяевах — животных, расте-

ниях или бактериях — паразитируют вирусы, а близостью или контрастностью стратегий, используемых ими для синтеза РНК.

Термины, используемые в вирусологической литературе для обозначения элементов молекулярных механизмов репликации и транскрипции, промоторов синтеза РНК и вирусных белков, разнятся в зависимости от принадлежности вируса к той или иной группе (семейству). Для облегчения знакомства читателя с разнообразными системами репликации и проведения параллелей между ними, в настоящем учебнике сделана попытка использовать единую номенклатуру белков и регуляторных элементов РНК генома, при том, что в тексте даются и принятые в литературе названия и аббревиатуры. Названия вирусных триб даны в соответствии с текущей версией классификации, принятой Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee for Virus Taxonomy, ICTV); при этом автор постарался избегать чрезмерного насыщения текста таксономическими подробностями. Вместе с тем, здесь используется «неофициальная» концепция суперсемейств (+) РНК-содержащих вирусов, поскольку она имеет эволюционный смысл и объединяет вирусы, относящиеся к разным семействам и порядкам, которые имеют родственные ферменты репликации и сходные механизмы синтеза РНК.

Рисунки сделаны автором по мотивам иллюстраций в вирусологической литературе, с необходимыми изменениями, иногда существенными.

Учебник предназначен для студентов, аспирантов и научных сотрудников, интересующихся современной молекулярной биологией и вирусологией.

А.А. Аграновский

3. Вводные замечания: принципы репликации вирусных РНК геномов

В соответствии с классификацией Д. Балтимора, модифицированной В.И. Аголом, РНК-содержащие вирусы можно разделить на четыре группы. У вирусов первой группы на матрице геномной одноцепочечной (+)РНК синтезируется (–)РНК, которая служит матрицей для воспроизводства копий (+)РНК (рис. 1а). У вирусов второй группы на матрице (+)РНК также синтезируется (–)РНК, но она не существует в свободном виде, а включена в состав двуцепочечной РНК («плюс-минус РНК»), так что синтез потомства (+)РНК происходит на матрице (–)РНК в составе дуплекса (рис. 1б). Есть и две «симметричные» группы вирусов. У одних геном представлен одноцепочечной (–)РНК, на которой синтезируется (+)РНК, которая используется в качестве матрицы для трансляции и репликации (рис. 1с). У других геном представлен дцРНК, и на её (–)цепи синтезируется (+)РНК, используемая и как мРНК в трансляции, и как матрица для синтеза потомства дцРНК (рис. 1д). Группы (а) и (б) можно рассматривать как единый класс вирусов с позитивным РНК геномом.

Во всех четырех вирусных системах используется вирус-специфическая РНК-зависимая РНК полимераза. Здесь и далее употребляются термины «РНК репликаза» и «РНК-полимераза». Репликаза — это активный фермент вирусной репликативной системы, иногда состоящий из нескольких вирусных и хозяйских компонентов, а РНК-

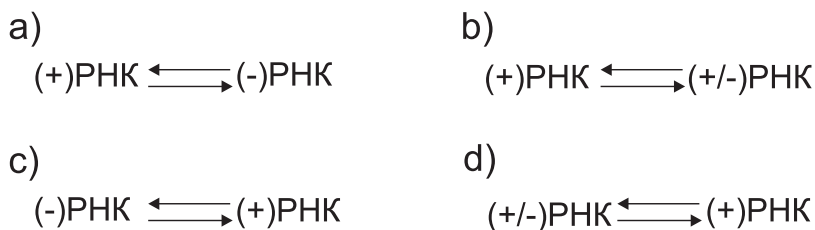


Рис. 1. Условные группы РНК-содержащих вирусов по типу генома и схеме репликации.

полимераза — фермент с консервативным доменом POL, участие которого является необходимым, но не всегда достаточным условием репликации. В группах (а) и (b) РНК полимераза синтезируется после первого раунда трансляции вирусной РНК, попадающей в незараженную клетку. В группах (с) и (d) фермент включается в состав вириона и попадает в клетку вместе с (–)РНК или дцРНК. Вирусные РНК полимеразы строго специфичны по отношению к «своим» РНК, что определяется сигналами узнавания, представленными элементами первичной и вторичной структуры на 3'-концах и внутри молекул (+)РНК и (–)РНК. Однако специфичность не является простым «механическим» свойством вирусных систем, как будет видно из рассмотренных ниже примеров.

Поскольку схемы репликации вирусных групп (а) – (с) и (b) – (d) симметричны, принципиальные различия между ними сводятся к выбору типа РНК, которая в процессе эволюции стала использоваться в качестве геномной. В некоторых случаях такой выбор, возможно, является следствием недавнего эволюционного события. В качестве примера можно привести (+)РНК вирусов растений семейства *Potyviridae* и дцРНК агента гиповирулентности увядания конского каштана (HAV) — закодированные в этих геномах репликативные и протеиназные домены показывают близкое родство между собой.

4. Вирусы с позитивным РНК-геномом

4.1. РНК-содержащие бактериофаги

Общие сведения. Представителями первой группы, репликация которых включает синтез (–)РНК на матрице геномной (+)РНК, являются РНК-содержащие бактериофаги, входящие в семейство *Leviviridae* — MS2 и R17 (род *Levivirus*), и Q β (род *Allolevivirus*). На заре молекулярной вирусологии они были излюбленными объектами изучения. В начале XXI века наступил «ренессанс» в исследовании репликации фагов, хотя ряд принципиальных вопросов остается нерешенным.

РНК фагов состоит из 3400–4300 нт и имеет длину 1,9 мкм, сравнимую с наибольшим сечением клетки *E. coli*. Нативная РНК имеет компактную третичную структуру и умещается в вирионе диаметром 27 нм. Геном бактериофагов несет 3–4 гена, кодирующие белок А (белок сборки, assembly protein, maturation protein), СР (белок оболочки), L (белок лизиса) и POL (РНК полимеразу) (рис. 2). Белок А связан с 5'- и 3'-концами РНК и необходим для ее правильной упаковки в вирион. Кроме того, этот белок экспонирован в вирионе и связывается с F-пилями бактерий. После связывания он расщепляется на две части, и РНК оказывается способна проникнуть в клетку. В геноме MS2 белок лизиса закодирован в отдельном гене L. В геноме Q β полипептид А1 (также свя-

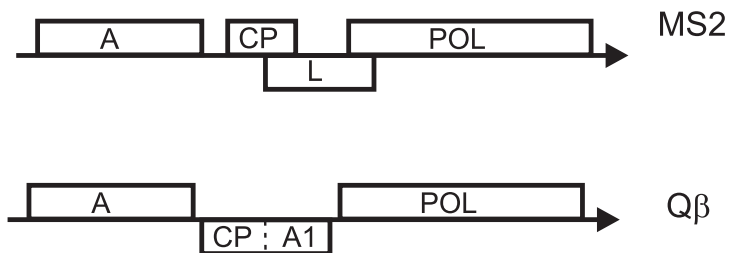


Рис. 2. Структура генома бактериофагов MS2 и Q β . Стрелкой обозначен 3'-конец РНК. Прямоугольники, гены белка А (assembly protein), белка оболочки (СР), белка лизиса (L) и РНК-зависимой РНК полимеразы (POL). Супрессируемый стоп-кодон в гене СР-L Q β показан пунктирным отрезком.

занный со сборкой и созреванием частиц) экспрессируется в результате супрессии слабого терминирующего кодона. Функция лизиса в системе Q β выполняется белком А (А2) (рис. 2).

На 3'-конце РНК имеется последовательность CCCAон, выше которой находится элемент из 12 пар нуклеотидов, напоминающий акцепторный домен тРНК, образуемый за счет коаксиального стэкинга аминок-акцепторного стебля и псевдоуридинового стебля. На этом основании иногда утверждают, что РНК фага несет «тРНК-подобную структуру» на 3'-конце. Следует оговориться, что эта структура очень далека от «настоящих» тРНК-подобных структур (TLS) в геномах вирусов растений, о которых речь пойдет в следующих главах — в первую очередь, потому что не была обнаружена способность фаговой РНК взаимодействовать с клеточными ферментами, субстратами для которых является тРНК.

4.1.1. Фаг Q β

Особенности системы фаговой репликации in vitro. Система репликации РНК фага Q β уникальна в смысле её исключительной неприхотливости. Если поместить очищенный препарат РНК-репликазы Q β в бесклеточную систему, содержащую смесь четырех rNTP и матрицу фаговой РНК, то фермент будет осуществлять синтез полноразмерных копий (–)РНК и (+)РНК, пока не будет исчерпан субстрат. Из одной молекулы РНК за 10 мин образуется около миллиарда копий — это рекорд скорости амплификации генетического материала в бесклеточных системах. Таких устойчивых систем, осуществляющих полный цикл синтеза инфекционного потомства РНК *in vitro* с помощью одного фермента, в вирусологии больше нет. Именно простота и эффективность репликации сделали РНК-содержащие бактериофаги классическими моделями.

Репликаза Q β обладает достаточно высокой специфичностью. Для того чтобы бесклеточная система работала, в качестве матрицы должны использоваться геномная (+)РНК, или комплементарная полноразмерная (–)РНК, или так называемые «малые реплицирующиеся РНК» (RQ РНК), которые накапливаются в зубактериальной клетке при нормальной инфекции фага. Последние представляют собой низкомолекулярные РНК размером около 70–240 нт, последовательности которых могут напоминать таковые (+)РНК и (–)РНК Q β , но могут и существенно отличаться от них.

Специфичность РНК репликазы проявляется на разных уровнях. Для узнавания нужна определенная 3'-концевая последовательность. В случае фага Q β это CCCA-3'. Хотя тРНК в клетках *E. coli* оканчиваются та-

кой же последовательностью, они не являются эффективными матрицами для репликазы Q β , поскольку 3'-конец в них экранирован элементами пространственной структуры и не узнается ферментом. Если последовательность 3'-СССА «пересадить» на чужеродную слабо структурированную РНК, то фермент будет работать, но при этом синтезируется «тупиковый вариант» — (–)цепь, образующая дуплекс с исходной матрицей РНК. Этот РНК дуплекс далее не реплицируется. Ситуация не разрешается, даже если противоположный конец матрицы будет снабжен сигналом, который в комплементарной цепи мог бы узнаваться репликазой. Репликаза Q β имеет сродство к остаткам цитидиловой кислоты, и если внутри матрицы есть последовательность СССА, то синтез комплементарной цепи сможет стартовать с этого участка и благополучно завершиться, но снова будет тупиковым. Репликаза работает, хотя и достаточно неэффективно, с использованием искусственной РНК затравки, находящейся в комплексе с матрицей.

Все эти варианты матриц, которые позволяют инициировать синтез и довести его до конца с образованием «тупикового» дуплекса, называют «незаконными», в отличие от «законных» матриц, которые могут размножаться по экспоненте.

Структура репликазы, функции ее компонентов и процесс репликации РНК. Репликаза бактериофага Q β состоит из четырех субъединиц, одна из которых (каталитическая субъединица с активностью РНК-зависимой РНК полимеразы) кодируется геном фага, а три других представляют собой клеточные белки. Эта структура, разгаданная в начале 70-х годов XX века, была первым комплексом, составленным из вирус-специфических и клеточных белков, что в свое время произвело сильное впечатление. Хозяйскими субъединицами являются белок малой рибосомальной субъединицы S1 и факторы элонгации трансляции Tu и Ts. Однако, четырехкомпонентный комплекс для проявления полноценной активности при синтезе (–)цепи РНК требует присутствия еще одного клеточного белка, HFQ (host factor of bacteriophage Q β). Это низкомолекулярный белок (около 12 кДа), образующий гомополимерный комплекс из 7 субъединиц, который способен изменять конформацию 3'-конца матричной РНК и влиять на её узнавание Q β репликазой. Вопрос о том, почему РНК-полимеразу, S1, Tu и Ts следует считать «компонентами репликазы», а HFQ «фактором», представляется достаточно условным. Тем не менее, различие в способе их действия есть. Компоненты репликазы требуются в каталитических количествах и способны производить множество копий молекул дочерних РНК, а HFQ, связываясь с матрицей, требуется в стехиометрических количествах.

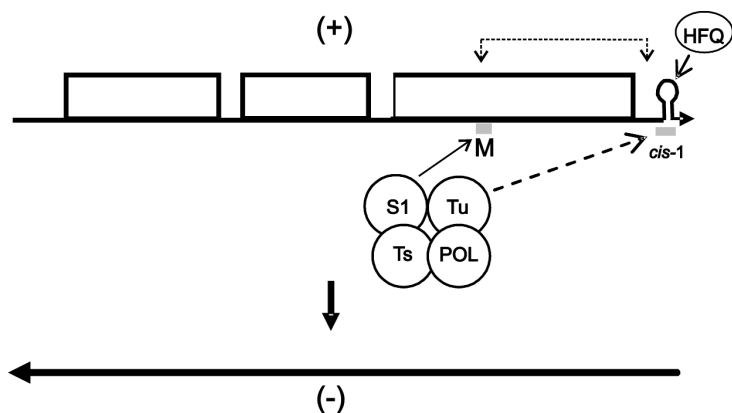


Рис. 3. Инициация синтеза антигеномной цепи РНК фага Q β согласно «модели 1». М-сайт указан затененным прямоугольником.

Сначала репликативный комплекс благодаря белку S1 (который также обладает РНК-связывающей активностью) узнает внутренний участок (М-сайт) на матрице (+)РНК, расположенный в гене репликазы (примерно 1400 нт от 3'-конца РНК, рис. 3).

Белок S1 несет домены ОВ 1–6 (от англ. oligonucleotide/oligosaccharide-binding). ОВ 1 и 2 отвечают за взаимодействие S1 с рибосомой, а в условиях фаговой инфекции — с полимеразой Q β . ОВ 3 представляет собой гибкий выступающий домен, который, действуя в комплексе с ОВ 1 и 2, играет ключевую роль в инициации репликации фаговой РНК. ОВ 4, 5 и 6 усиливают взаимодействие ОВ 1–3 с *cis-1*, но не являются необходимыми доменами для инициации репликации.

Согласно одной из моделей (обозначаемой здесь условно как «модель 1»), за счет дальнего взаимодействия комплементарных участков РНК происходит сближение М-сайта и главного промотора *cis-1*. Однако сначала репликаза не может «найти» 3'-конец матрицы, поскольку он вовлечен в образование прочной вторичной структуры с псевдоузлом. На этой стадии подключается HFQ, расплетающий элементы вторичной структуры и делающий 3'-конец доступным для репликазы. В клетках *E. coli*, мутантных по HFQ (эта мутация не летальна), репликация фаговой РНК происходит с очень низкой эффективностью и приводит к отбору потомства молекул РНК с измененным, экспонированным 3'-концом, репликация которых не требует помощи HFQ.

Синтез комплементарной (–)РНК на чинается с включения комплементарного остатка гуанозина, а терминальный остаток А матричной

цепи игнорируется (рис. 4). Когда копирование (+)цепи доходит до конца, на 3'-конце (–)РНК синтезируется последовательность CCCA. Затем репликаза нематрично добавляет остаток А. Чтобы проделать эту операцию, которая является одним из условий правильной терминции репликации и выхода свободной (–)цепи, снова необходим белок S1 (домены OB1 и OB2). Таким образом, S1 является фактором терминции репликации в системе Qβ.

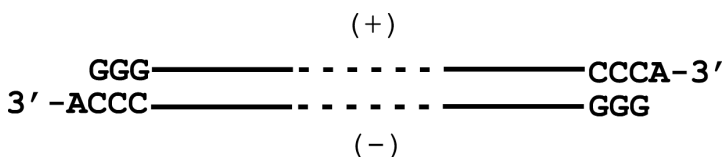


Рис. 4. Структура концевых областей (+) и (–)цепей РНК бактериофага Qβ.

В результате этих процессов синтезируется свободная (–)цепь РНК фага.

Для инициации репликации на матрице (–)РНК необходимо узнавание репликазой специфичных полипиримидиновых цитозин-богатых участков (*cis-2*), но этот процесс не требует HFQ и S1 (следует отметить, впрочем, что S1 требуется для терминции синтеза дочерней цепи, как и минус-цепи) (рис. 5). Таким образом, репликация (+) и (–)цепей требует разных наборов белков.

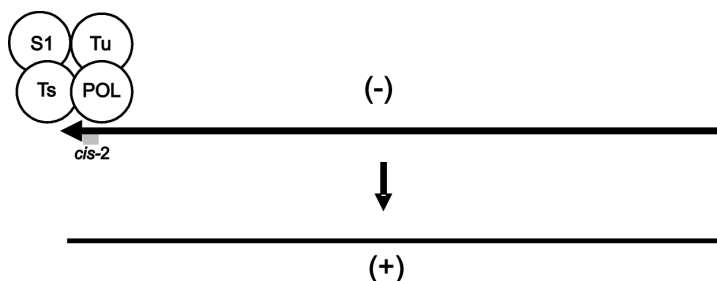


Рис. 5. Синтез дочерних геномных РНК.

На стадии элонгации синтеза Tu и Ts не являются категорически необходимыми субъединицами. В бесклеточной системе РНК полимеразы способна продолжить копирование цепи РНК и без них, хотя и менее эффективно.

Ключевые функции факторов элонгации Tu и Ts связаны с инициацией репликации (+) и (–)цепей РНК. Делались попытки связать «нор-

мальные» функции этих белков в процессе клеточной трансляции с их репликативными функциями. Так, то обстоятельство, что *Tu* способен образовывать тройственный комплекс с аминоацил-тРНК и GTP, представлялось логичным с точки зрения функционирования *Tu* в фаговой репликации, поскольку копирование CCCA конца РНК начинается с предпоследнего нуклеотида и первым включаемым остатком должен быть гуанозин, донором которого мог бы являться тройственный комплекс *Tu*-тРНК-GTP (рис. 4).

Кроме того, тот факт, что *Tu* имеет сайт узнавания аминоацил-тРНК, позволяет предположить, он способен связываться с терминальной структурой РНК Q β , напоминающей структуру тРНК.

Однако, химическая модификация (алкилирование) *Tu*, приводившая к ингибированию способности связывать GTP и функционировать в трансляционной системе, не влияла существенным образом на его работу в составе репликазы. Равным образом, ковалентная пришивка тРНК к активному центру *Tu* не ингибировала активность фаговой репликазы, включавшей такой комплекс. Вместе с тем, изучение вариантов фаговой репликазы, в которых использовались мутанты *Tu*, показало, что существует прямая корреляция между способностью *Tu* связывать aa-тРНК и активностью репликазы, в состав которой он входит. Можно предположить, что нормальные функциональные активности *Tu* имеют косвенное отношение (или не имеют никакого отношения) к репликации Фага, и что в системе Q β используются некоторые структурные особенности этого белка, благоприятствующие сборке и функционированию активной репликазы.

Похожим образом складывается и ситуация с фактором *Ts*, который занимается обменом GTP и GDP на молекуле *Tu* при трансляции. Были получены мутанты этого белка, которые обеспечивали нормальную трансляцию, но не поддерживали репликацию РНК Q β . Очевидно, «привычные» функции *Ts* в трансляции также не коррелируют с его работой в репликативном комплексе.

По последним данным, включающим разрешение топологии комплекса *Tu*-*Ts*-POL с помощью рентгеноструктурного анализа, *Tu* и *Ts* играют роль шапероно-подобных белков, поддерживающих РНК полимеразу в стабильной конформации. Кроме того, *Tu* обеспечивает взаимодействие с матрицей РНК и способствует разделению цепей в коротком дуплексе, возникающем при элонгации синтеза РНК.

Здесь мы сталкиваемся с некоей общей эволюционной проблемой. Известно, что вирусы используют клеточные белки для собственных нужд. Иногда в вирусной системе используются специфические функции белка, т.е. он привлекается как «квалифицированная рабочая сила». Однако, в других случаях могут использоваться дополнительные (скрытые) спо-

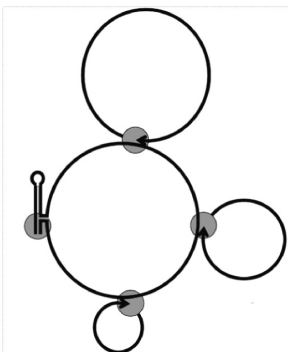


Рис. 6. Модель Четверина. Гипотетическая структура репликативного комплекса, в котором на матрице РНК, удерживаемой в виде кольца с помощью концевой спирали, может синтезироваться несколько комплементарных цепей РНК, не образующих дуплекса с матрицей.

способности клеточного белка, которые не реализуются в условиях незараженной клетки.

Механизм образования свободных (–)цепей РНК Q β . Среди всех вирусов с позитивным РНК геномом, РНК бактериофаги предоставляют единственный пример системы синтеза вирусной РНК, продуктом которого является оцРНК, а не дуплекс (рис. 1). Следует иметь в виду, что ни матричная, ни дочерняя цепи не одеваются каким-либо белком, который мог бы предотвратить их отжиг. Очевидно, существуют определенные особенности и фаговых РНК, и фагового фермента, препятствующие образованию дцРНК в этой системе. Объяснить это достаточно непросто, поскольку в момент синтеза цепи частично комплементарны, а потом должны, как застежка-«молния», закрываться с образованием дуплекса. По модели Четверина, молекула (+)РНК образует кольцевую структуру типа «сковородки с кривой ручкой», и репликаза, двигаясь по матрице, удерживает 5'-конец вновь синтезированной цепи (рис. 6). Предполагается, что при этом вновь синтезируемая (–)РНК выпетливается. Если это так, то образование дуплекса действительно будет затруднено. При терминации, посредством S1, полимераза доведиивает нематричный остаток А, и свободная (+) или (–)цепь высвобождается. «Законные» матрицы для фаговой репликазы — плюс-РНК, минус-РНК, RQ РНК — имеют концы, способные к образованию черешка с прилегающей к нему шпилькой.

Внимательный читатель не может не заметить противоречия данной модели и «модели 1», описанной выше (рис. 3). Однако это кажущееся противоречие. Взаимодействие репликазы с М-сайтом, опосредуемое S1, может быть первым этапом инициации репликации, не показанным на упрощенной схеме (рис. 6). Затем М-сайт и промотор репликации на 3'-конце РНК могут сближаться за счет выпетливания матричной цепи, давая репликативному комплексу возможность узнавать 3'-конец (+)

РНК или (–)РНК, находящийся в контакте с 5'-концом циклизованной РНК (рис. 6). Накопление одноцепочечных РНК в результате репликации также зависит от белка S1 в составе фагового фермента.

Нерешенные проблемы репликации фаговых РНК. Ряд вопросов, связанных с репликацией РНК бактериофагов, остается невыясненным. Одним из них является вопрос о способе синтеза нематричных остатков А на концах цепей. Непонятно также, почему включается именно остаток аденозина.

Хотя различные полимеразы обладают способностью «довешивать» на концы вновь синтезированных цепей нуклеиновых кислот нематричные нуклеотиды, в системе фага Q β этот процесс носит специфичный характер и требует кофактора S1. Если в эксперименте использовать РНК матрицу с делецией естественного 5'-конца, то 3'-концевой остаток А добавляться не будет. Следовательно, этот процесс сопряжен с нормальной репликацией, и существуют некие сигналы, обеспечивающие включение нематричного А. Концевой адениловый остаток не строго необходим для репликации. Если его удалить, то РНК будет инфекционна, и репликаза Q β будет работать на такой матрице, хотя и менее эффективно, чем на нативной. Как уже отмечалось, добавление нематричного А, вероятно, связано с терминацией репликации. Интересно, что терминация занимает существенную или большую часть цикла — 18 из 20 сек для RQ РНК, и 18 сек из 2 мин для полноразмерной цепи РНК Q β .

Другая проблема связана с механизмами асимметричного синтеза цепей разной полярности. В зараженной фагом клетке, как и в системе *in vitro*, преимущественно образуются (+)цепи РНК. Экспериментатор может регулировать этот процесс *in vitro*, добавляя различные количества белка HFQ. Если фактора мало, то на (+)РНК синтезируется небольшое количество (–)цепей, а на матрицах (–)цепей — количество молекул (+)РНК, ограниченное только доступным количеством субстрата rNTP. Если концентрацию фактора повышать, то соотношение (–) и (+)цепей в потомстве будет меняться в пользу первых. Как происходит регуляция синтеза (–) и (+)цепей в клетке, не до конца понятно. Можно себе представить такие способы выведения (+)цепей РНК из репликации, как вовлечение их в трансляцию или упаковка в капсид. Однако, феномен асимметричного синтеза (+) и (–)РНК полностью не объясняется этими механизмами, поскольку имеет место и при их блокировке. Возможно, вирусная репликаза имеет большее сродство к сигналам узнавания в составе матрицы (–)цепи по сравнению с сигналами в (+)цепи.

Репликаза Q β крайне неразборчива в выборе матрицы при однократном копировании, но очень избирательно размножает РНК, ограничи-

ваясь «законными» матрицами. По-видимому, все «законные» матрицы обладают некими особенностями, которые провоцируют перевод репликативного комплекса в «закрытую» конформацию на стадии инициации, в которой он нечувствителен к ингибитору взаимодействий РНК-белок ауриин-трикарбоновой кислоте (АТК). В этой конформации репликаза высокопроцессивна, т.е. комплекс не распадается, пока не будет завершен синтез комплементарной цепи.

4.1.2. Другие РНК-фаги

Описанный для фага Q β HFQ-зависимый способ репликации не универсален для всех фагов. Так, при репликации фага MS2 синтез РНК может происходить без участия HFQ. Если уровень репликации Q β в бактериях, мутантных по гену HFQ, снижается в 5000 раз, то MS2 может в них реплицироваться с высокой эффективностью. Если у Q β фактор HFQ нужен для синтеза (–)цепи, то в системе фага f2 другой клеточный фактор (который не был полностью охарактеризован) необходим для синтеза как (–)цепи, так и (+)цепи РНК. При этом системы MS2, f2 и Q β сходны по такому ключевому свойству, как состав репликативного комплекса, включающего фагоспецифическую РНК-полимеразу, S1, Tu и Ts.

В заключение этой главы хотелось бы отметить общую эволюционную особенность систем репликации РНК фагов. Такое важнейшее свойство, как специфичность реплицирующих ферментов, в большинстве случаев определяется самим вирусным геномом. Однако в случае РНК фагов исключительно малые размеры генома, по-видимому, направили эволюцию репликативной системы в сторону привлечения клеточных белков-партнеров для реализации специфичности синтеза РНК и его регуляции.

4.2. Пикорна-подобные вирусы

Супергруппа пикорна-подобных вирусов включает семейства *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Astroviridae* и еще несколько групп вирусов эукариот. С начала XXI века обнаруживают все возрастающее число родственных вирусов насекомых и простейших. Следует оговориться, что, хотя многие исследователи одобряют концепцию супергрупп вирусов с позитивным РНК геномом, она лишь отчасти отражена в официальной классификации, принятой Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV). Вместе с тем, данная концепция имеет несомненный эволюционный смысл — в частности, геномы всех «пикорна-

подобных» вирусов кодируют домены РНК-полимеразы, образующие компактный кластер в филогенетической реконструкции доменов POL вирусов с позитивным РНК геномом. Репликативные гены представителей данной супергруппы кодируют инвариантный набор консервативных доменов HEL-S^{pro}-POL. Другие общие свойства пикорна-подобных вирусов включают использование кеп-независимого механизма трансляции РНК и присутствие на 5'-конце геномной РНК ковалентно присоединенного белка VPg (virus protein genome-linked).

4.2.1. Пикорнавирусы

Общие сведения. Вирусы животных с (+)РНК геномом, представители семейства *Picornaviridae* (от лат. *pico* — малый, и сокращения «RNA») имеют икосаэдрические частицы (около 30 нм в диаметре), лишённые наружной мембраны. В семействе выделяют несколько родов, типовыми представителями которых являются полиовирусы, энтеровирусы, эховирусы, риновирусы, вирус гепатита А, вирус энцефаломиокардита (EMCV) и вирус ящура (FMDV). Репликация пикорнавирусов происходит в цитоплазме.

Пикорнавирусы сыграли важную роль в молекулярной вирусологии и молекулярной биологии. Именно при изучении этих вирусов впервые было сформулировано положение о моноцистронности эукариотических РНК, открыт механизм внутренней IRES-зависимой инициации трансляции, открыта РНК-зависимая РНК полимераза и двуцепочечная репликативная форма РНК, обнаружен протеолитический процессинг белка-предшественника, рекомбинация РНК и использование нуклеотид-белковой затравки при синтезе РНК. На модели EMCV была впервые показана возможность бесклеточной репродукции вируса: добавление вирусной РНК к экстракту клеток приводило к образованию потомства полноценных вирусных частиц. Полиовирус был первым вирусом, полностью синтезированным химическим путем, с помощью сшивания олигонуклеотидов в полноразмерную ДНК-копию, пригодную для последующей транскрипции и синтеза инфекционной РНК *in vitro*.

Особенности генома пикорнавирусов. Геномная РНК пикорнавирусов содержит 7,5–8 тыс. нт и по своей организации принципиально отличается от РНК фагов, рассмотренных в предыдущей главе. Эти отличия имеют как структурную, так и функциональную природу и являются важными факторами, обуславливающими особенности репликации пикорнавирусного генома. На 5'-конце молекулы находится небольшой (22 aa) белок VPg, через остаток тирозина ковалентно присоединенный

фосфодиэфирной связью к терминальному уридиловому остатку РНК. На 3'-конце вирусной РНК есть гетерополимерные поли(А)-«хвосты» (20–150 нт). Вирионная РНК пикорнавирусов инфекционна, причем искусственное удаление VPg на инфекционность не влияет.

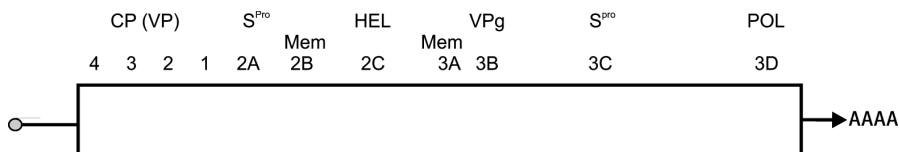


Рис. 7. Структура генома полиовируса. CP (VP) 1–4 — структурные белки; S^{pro} — сериновые протеиназы; Mem — мембрано-связывающие белки; HEL — РНК хеликаза; VPg — белок, ковалентно присоединенный к 5'-концу генома; POL — РНК полимераз; AAAA — поли(А).

5'- и 3'-нетранслируемые области (НТО) в геноме полиовируса (длинной до ~750 и 100 нт, соответственно), фланкируют единую открытую рамку трансляции (ORF), в которой закодированы все вирусные белки (рис. 7). Образующийся в результате трансляции полипротеин (~2200 аминокислотных остатков) подвергается ограниченному протеолитическому расщеплению на индивидуальные зрелые белки вирусными протеиназами 2A^{pro} и 3C^{pro} (или предшественником этого белка — 3CD) (рис. 7). Из N-концевой части полипротеина образуются четыре структурных (капсидных) белка (VP1–4 или 1A–D), из С-концевой части — 7 неструктурных белков, 2A–2С и 3A–3D (рис. 7).

Ферментативный аппарат репликации РНК. Непосредственное или вспомогательное участие в репликации генома пикорнавирусов принимает не менее 6 вирус-специфических и несколько хозяйских белков. Существенно, что процессинг вирусного полипротеина происходит постепенно, и по его ходу возникают промежуточные продукты. Эти «недорезанные» полипептиды (интермедиаты) могут выполнять функции, несвойственные входящим в их состав зрелым белкам, что дополнительно увеличивает число активных участников процесса репликации. Например, промежуточный продукт 3AB обладает активностью РНК-шаперона, придающего определенную конформацию некоторым участкам вирусной РНК, а зрелые 3A и 3B представляют собой, соответственно, мембрано-связывающий белок (Мем) и VPg (рис. 7).

Репликативный белок 2С связывает АТР, обладает АТРазной активностью, образует кольцеобразные гексамеры, характерные для хеликаз, и содержит аминокислотные мотивы, типичные для определенного клас-

са этих ферментов. Способность 2С расплетать двуспиральные РНК пикорнавирусов показана в опытах *in vitro*. Кроме того, 2С выполняет функции РНК-шаперона, т.е. способствует образованию определенной вторичной структуры РНК. Возможно, хеликазная активность 2С — не единственная в пикорнавирусной репликативной системе. Есть данные о том, что РНК полимеразы 3D^{pol} пикорнавирусов также способна расплетать РНК-дуплексы. Кроме того, 2С, вместе с мембранными белками 2В и 3А, принимает участие в преобразовании клеточных мембран и создании «вирусных фабрик» — сайтов вирусной репликации.

Белком, способным катализировать образование фосфодиэфирной связи, является 3D^{pol} с молекулярной массой ~60 kDa. Важнейшая особенность РНК-зависимой РНК-полимеразы пикорнавирусов, отличающая ее, в частности, от репликазы Q β , — потребность в затравке (праймере), т.е. неспособность начать синтез молекулы РНК *de novo*. В качестве затравки для 3D^{pol} служит диуридилат белка VPg (VPg-pU-pU_{OH}). Нуклеотид-белковая затравка используется при *инициации синтеза* позитивных и негативных нитей РНК.

Существенная особенность РНК-зависимых РНК полимераз, в том числе и пикорнавирусных — «грамматическая небрежность», неточность при копировании матрицы (очевидно, связанная с отсутствием активности «вычитывания гранок», что характерно для данной группы ферментов, за исключением примеров, описанных в главе 4.6). Включение некомплементарного нуклеотида происходят в среднем один раз на ~10 000 актов образования фосфодиэфирной связи. Принимая во внимание, что геном пикорнавирусов содержит лишь ненамного меньше 10 kВ, большая часть вновь синтезированных молекул РНК должны содержать по крайней мере 1 мутацию. Таким образом, любая популяция пикорнавирусов, даже потомство одного генома — гетерогенна и содержит «облако» мутантных геномов. Частота мутаций столь высока, что ее увеличение всего в несколько раз может привести к гибели вирусной популяции (так называемой «мутационной катастрофе»).

Цис-элементы пикорнавирусного генома. Узнавание «своих» матриц пикорнавирусной РНК-полимеразой — по крайней мере на первый взгляд — должно осложняться тем обстоятельством, что геномная РНК этих вирусов имеет на 3'-конце поли(А), как и большинство эукариотических клеточных мРНК. Следовательно, *цис*-сигнал репликации не может находиться непосредственно на 3'-конце матрицы или, по крайней мере, не может ограничиваться полиадениловой последовательностью. В геномных пикорнавирусных РНК есть три главных репликативных *цис*-элемента, определяющих специфичность репликации. Два из них — *cis*-1 (*ori* L) и *cis*-3 (*ori* R), — располагаются в 5'- и 3'-нетранслируемых

областях, а третий — *cis-2 (oriI)* — во внутреннем районе молекулы РНК (*ori* — от origin of replication; L, R, I — от left, right, internal) (рис. 8).

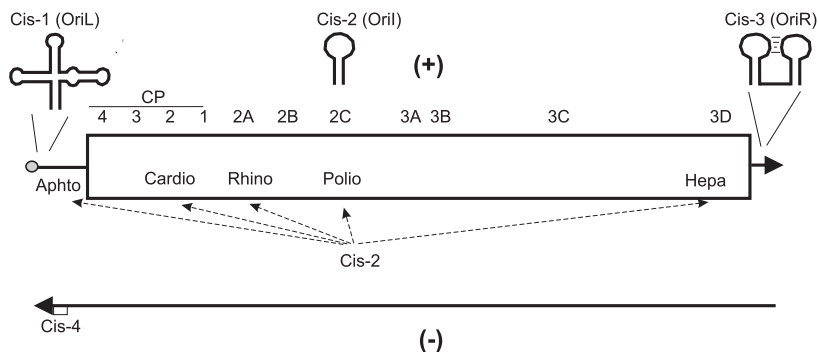


Рис. 8. *Cis*-сигналы в геномной (+)цепи и антигеномной (–)цепи РНК пикорнавирусов. Прерывистыми стрелками показаны приблизительные положения сигнала *cis-2* в геномах представителей различных пикорнавирусов.

Хотя функции этих элементов у всех пикорнавирусов, по-видимому, сходны, структурная организации *cis*-элементов может несколько отличаться у представителей разных родов.

Cis-1 (Ori L) включает в себя ~100 5'-концевых нуклеотидов геномной РНК и образует вторичную структуру, напоминающую клеверный лист. Шпилечные домены обладают сродством к ряду вирусных и клеточных белков — наиболее хорошо изучены взаимодействия шпильки d с вирусным белком 3CD (предшественником протеиназы и 3D^{pol}) и шпильки b с клеточным поли(rC)-связывающим белком (PCBP). На *cis-1* формируется репликативный комплекс — ключевой инструмент на разных стадиях синтеза вирусных РНК. Для нормального функционирования *cis-1* важное значение имеет поддержание вторичной структуры, но не последовательности РНК в стеблях шпилек. Вместе с тем, последовательности петель b, c и d весьма консервативны и существенны для репликации.

Cis-3 (ori R) содержит шпилечные домены (главные — X и Y), формирующие третичную структуру благодаря kissing-взаимодействиям («целующиеся» шпильки), которые, по сути, представляют собой псевдоузел. Поддержание этого взаимодействия и ориентации доменов X и Y важно для эффективной репликации РНК, а последовательность двуспиральных стеблей менее существенна. С *cis-3* взаимодействуют вирусные и, вероятно, клеточные белки. Примыкающая поли(A)-последовательность также может рассматриваться как часть этого *цис*-элемента. Поли(A)-тракт связывается с клеточным поли(A)-

связывающим белком (РАВР), и это обстоятельство имеет важный функциональный смысл для циркуляризации РНК перед началом синтеза антигенной цепи. Поли(А) можно сокращать до 20 нт, но РНК с более короткой поли(А) не реплицируется.

Внутренний репликативный *цис*-элемент *cis-2* (*ori1* или *cre*, *central replicative element*) представляет собой простую шпильчатую структуру. Несмотря на структурную консервативность, он может располагаться в разных участках генома у представителей данного семейства (у вируса ящура — в 5'-НТО, у кардиовирусов — в области VP2, у риновируса 2 — 2А, у полиовируса — 2С, у вируса гепатита А — 3D; рис. 8). Более того, локализация этого элемента в конкретном вирусном геноме, по-видимому, не имеет решающего значения. Например, если в РНК полиовируса «переставить» *cis-2* в другое место генома, то репликация существенно не нарушится. *Cis-2* всех пикорнавирусов содержат инвариантный нуклеотидный мотив СААА в петле шпильки.

Ключевым сигналом синтеза (+)цепей (*cis-4*) является последовательность на 3'-конце антигенной цепи РНК (3'-AAUUUUGUC для полиовируса, рис. 8).

Инициация синтеза антигенной цепи РНК. Чтобы начать синтез антигенной цепи РНК, пикорнавирусная система должна обеспечить несколько подготовительных этапов: сблизить физически удаленные части матрицы (+)РНК, синтезировать затравку и «настроить» репликативные белки.

Одно из необходимых событий — циркуляризация родительской матрицы, отключающая трансляцию и создающая условия для репликации. После накопления достаточного количества пикорнавирусных белков система должна переключиться с трансляции на синтез дочерних молекул РНК. «Трансляционная циркуляризация» основана на сродстве клеточного белка PCBP к структурному элементу пикорнавирусного IRES, обогащенному остатками цитозина; PCBP/IRES взаимодействует с РАВР/3'-поли(А). Переключение с трансляции на репликацию у пикорнавирусов, вероятно, происходит вследствие альтернативного связывания PCBP со шпилькой *b-cis-1* (рис. 9). После накопления в зараженной клетке интермедиата 3ABCD (или 3CD), он взаимодействует с *d-cis-1*, что значительно увеличивает сродство между PCBP и *cis-1*. В результате PCBP «переселяется» с IRES на репликативный *цис*-элемент, что сопровождается угнетением трансляции и стимулированием репликации. Другим, не обязательно альтернативным, фактором переключения может служить «компартиментализация» цепей РНК — сосредоточение их в мембранных везикулах, образуемых уже на самых ранних стадиях вирусной репликации.

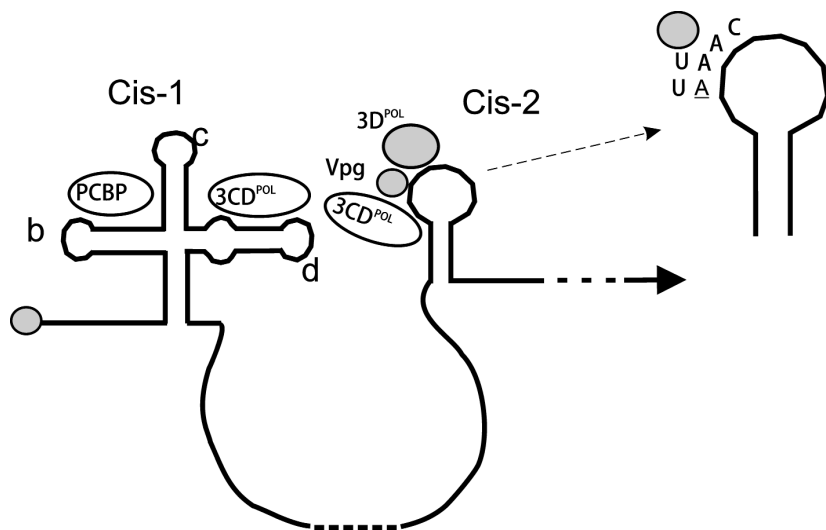


Рис. 9. Вариант 1 циклизации (+)РНК пикорнавирусов — сближение сигналов *cis-1* и *cis-2* за счет белок-белковых взаимодействий позволяет включить процесс уридилирования VPg. Матричный остаток аденозина в петле шпильки *cis-2* выделен жирным шрифтом и подчеркнут.

Сближение за счет белок-белковых взаимодействий *cis-1* и *cis-2* дает возможность начать синтез РНК-белковой затравки в петле шпильки *cis-2*, в ходе которого РНК полимераза 3D катализирует образование фосфодиэфирной связи между остатком тирозина молекулы VPg и α -фосфатом уридиловой кислоты. Это матричный синтез, причем роль матрицы выполняет 5'-адениловый остаток последовательности 5'-**AAAC**-3' в петле *cis-2*. Соседний аденозин, 5'-**AAAC**-3' обеспечивает специфичность реакции уридилирования и ее эффективность. После синтеза VPg-pU, молекула затравки сдвигается на один нуклеотид назад, и к ней присоединяется второй уридилат с образованием VPg-pU-pU. Почему дело ограничивается двумя остатками уридина, неизвестно. Существенное нарушение структуры *cis-2* полностью подавляет репликацию генома пикорнавирусов. Уридилирование VPg зависит и от нативной структуры *cis-3*, поскольку от нее также зависит точный контакт *cis*-элементов и белков. Интермедиат 3CD повышает способность 3D^{pol} уридилировать VPg.

Второй вариант циклизации реализуется собственно при инициации синтеза антигеномной цепи. Контакт между 5'- и 3'-концом геномной РНК происходит посредством белок-белковых взаимодействий между PCBP, находящимся на *cis-1*, и PABP на 3'-поли(A) (рис. 10).

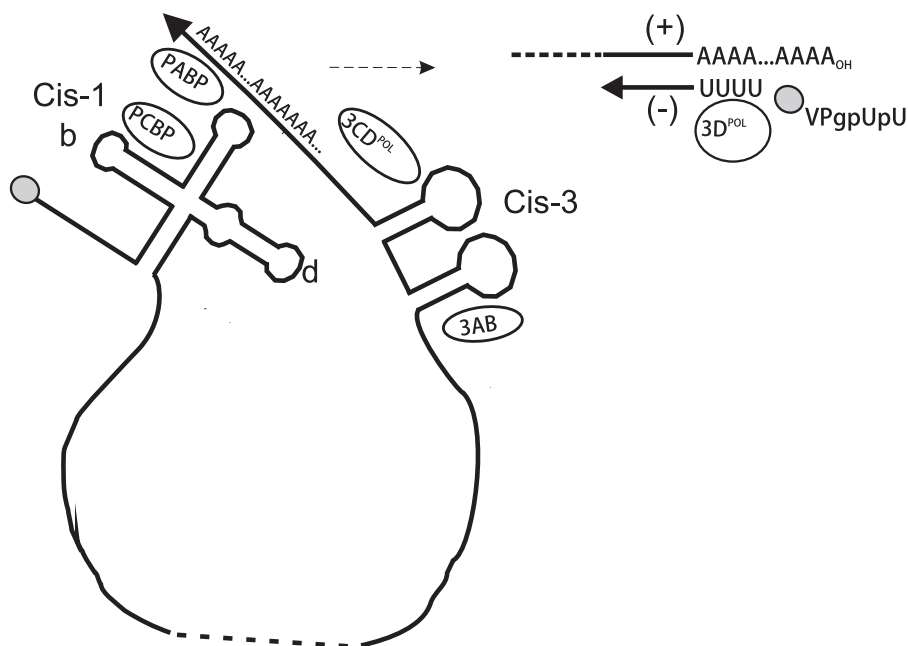


Рис. 10. Сближение 5'- и 3'-концов геномной РНК пикорнавирусов за счет белок-белковых взаимодействий (PCBP – PABP) и инициация синтеза антигеномной цепи.

Элемент *cis-3* (*oriR*) привлекает белки 3AB и 3CD^{POL} (рис. 10). Считается, что 3AB некоторое время работает как РНК шаперон, способствующий отжигу цепей РНК, но точное значение этой активности в процессе репликации не установлено. Ферментативный комплекс активируется на *cis-1* и *cis-3*, когда интермедиаты-предшественники разрезаются вирусной протеиназой 3С. При этом решается еще одна задача — гидрофобный домен белка 3А выполняет роль «гида», направляющего репликативный комплекс в мембранные везикулы.

Когда кольцевая структура создана, к ней привлекается диуридилат VPg и начинается синтез (–)цепи. Копируется не вся поли(А), но примерно 20 остатков, прилегающих к гетерополимерной части РНК. Самое простое объяснение — это определяется топологией комплекса репликазы и РНК, «нацеливающей» активный центр РНК полимеразы именно на 20-й остаток полиаденилата.

Точечные мутации, нарушающие топологию структуры «целующихся шпилек» *cis-3*, приводят к блокировке синтеза (–)цепи РНК. Однако парадокс заключается в том, что если «затрагивать» этот элемент нель-

зя, то удалить его полностью можно. Делеция *cis-3* не приводит к утрате жизнеспособности вируса. Репликация идет, хотя и с низкой эффективностью, и в потомстве обнаруживаются дочерние (+)РНК, лишенные *cis-3*. Это иллюстрирует некий важный биологический принцип. Репликация требует специфичности, поэтому в процессе эволюции сигналы в составе вирусной нуклеиновой кислоты и репликативные белки были тщательно «подогнаны» друг к другу. Однако в систему заложены дополнительные скрытые возможности, и если в некоторых случаях сложная структура РНК оказывается удалена или утрачена, это не означает остановки процесса — он просто идет несколько по-другому. Возможно, в данном случае РНК полимеразы 3D оказывается в состоянии найти свободный 3'-конец матрицы, не маркированный сложным сигналом.

Синтез негативной цепи — элонгация. При элонгации растущая цепь антигеномной РНК будет находиться в дуплексе с матричной (+)РНК. Синтез комплементарной цепи неизбежно приводит к разрушению вторичной и третичной структуры РНК матрицы. В частности, происходит инактивация *cis-2* и прекращение синтеза VPg-pU-pU на данной молекуле матричной РНК (рис. 11). По подсчетам, до того момента, когда структура *cis-2* поглотится дуплексом, может синтезироваться несколько сот молекул диуридилированного VPg, что создает пул нуклеотид-белковой затравки, который будет затем использоваться при синтезе (+)РНК. Однако это означает, что должны быть доступны сотни копий VPg, для чего РНК должна быть протранслирована эквивалентное число раз. Поскольку инфекционный процесс может начаться с одной молекулы (+)РНК, то именно она должна участвовать в сотнях раундов трансляции. Теоретически это возможно, но достаточно маловероятно. Рассматриваемая модель была построена на основании экспериментов с бесклеточными экстрактами, в которые вводили высокие концентрации РНК полиовируса, но насколько эта ситуация отражает реальность в зараженной клетке, неизвестно. Более того, тот факт, что *cis-2* находится на разных дистанциях от 3'-конца геномной РНК у разных пикорнавирусов (рис. 8), скорее указывает на то, что на ранней стадии репликации молекула (+)РНК служит матрицей для синтеза ограниченного числа копий VPg-pU-pU. Основной пул затравки может синтезироваться в результате вторичной трансляции и репликации дочерних цепей РНК.

Конечным продуктом элонгации (–)цепи является полноразмерная двунитевая молекула, которую называют репликативной формой (RF) вирусной РНК.

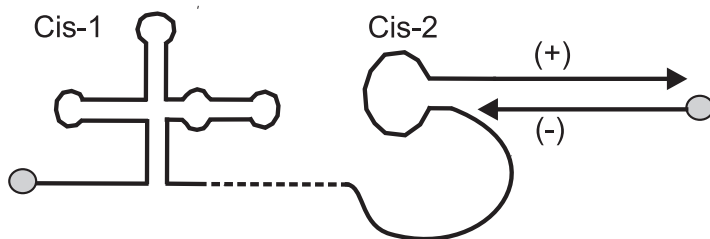


Рис. 11. Образование дуплекса RF при синтезе антигенной цепи РНК и поглощение *cis*-сигналов.

Синтез позитивных цепей — инициация. RF пикорнавирусов — соединение биологически-активное, о чем говорит ее инфекционность. Скорее всего, инфекционность объясняется наличием в незараженной клетке механизмов, обеспечивающих расплетание RF, что позволяет осуществить ее трансляцию рибосомами. Природа этих механизмов не выяснена, и неизвестно, принимают ли они участие в «нормальной» репликации вирусных РНК.

При синтезе (+)РНК происходит расплетание «левого» конца RF (соответствующего 3'-концу антигенной цепи) при помощи вирус-специфических белков ($2C^{Hel}$) и/или клеточных белков. Расплетание около сотни пар нт приводит к освобождению *cis*-1 (+)цепи, приобретению им функциональной структуры «клеверного листа» и повторному привлечению PCBP и $3CD^{Pol}$ (рис. 12).

На 3'-конце (–)цепи есть сигнал *cis*-4 (3'-AAUUUUGUC у полиовируса), частично комплементарный *cis*-1, специфически узнаваемый клеточным белком hnRNPC, который есть и в ядре, и в цитоплазме. Этот белок участвует в биогенезе пре-мРНК и способствует их стабильности и сплайсингу. При пикорнавирусной инфекции hnRNPC привлекается как кофактор репликации. Транс-взаимодействие PCBP на *cis*-1 и hnRNPC на конце антигенной цепи создает условия для инициации синтеза дочерней (+)цепи $3D^{Pol}$, затравляемого VPg-pU-pU (рис. 12).

Синтез позитивных цепей — элонгация. Важнейшее различие между синтезом (+) и (–)цепей заключается в том, что (–)РНК, входящая в RF, используется как матрица многократно. Синтез (–) и (+)РНК пикорнавирусов ассиметричен за счет неравенства силы *cis*-сигналов (репликативный комплекс обладает наибольшей аффинностью к *cis*-4), обеспечивающих тот и другой процесс. Промежуточное соединение — репликативный интермедиат (RI) — представлено молекулами, в состав которых входит одна полноразмерная (–)цепь и несколько недостроенных молекул (+)цепей (рис. 13). В среднем, таких «хвостов» 5–7.

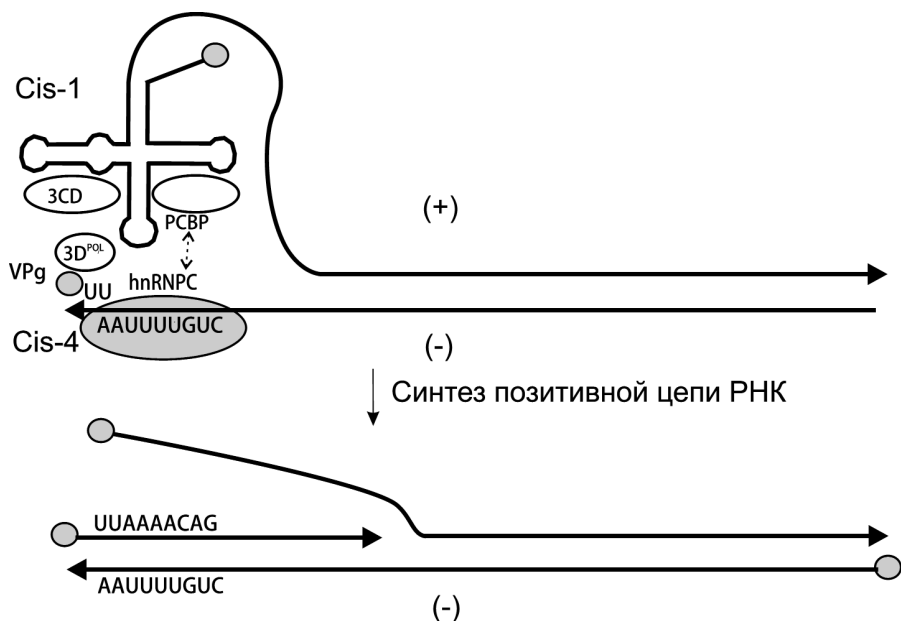


Рис. 12. Инициация синтеза дочерней (+)цепи РНК пикорнавируса.

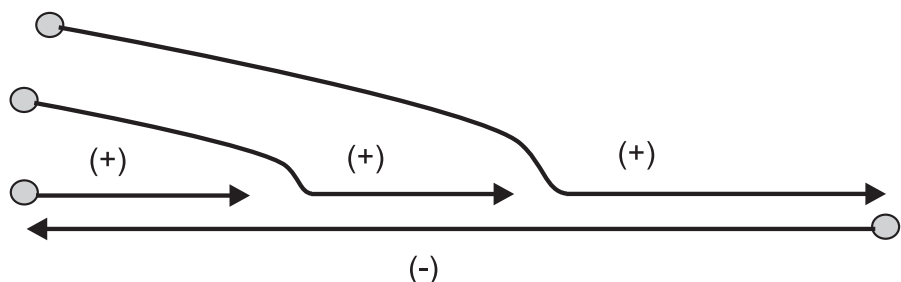


Рис. 13. Синтез дочерних (+)цепей с вытеснением и образование репликативного интермедиата (RI).

Очевидно, что синтез каждой новой (+)цепи сопряжен с вытеснением из дуплекса (+)цепи, образовавшейся в предыдущем раунде инициации (рис. 13).

При завершении синтеза (+)цепи на ее 3'-конце будет поли(А)-последовательность (~20 нт), возникающая в результате копирования 5'-поли(У) в (-)цепи. Каким образом синтезируются гетеродисперсные поли(А) в дочерних (+)РНК (20–150 нт)? Были получены доказательства «скользящего синтеза», т.е. процесса, при котором РНК-полимераза

движется по матрице олиго(U) вперед и назад, повторно копируя один и тот же матричный нуклеотид. При этом синтезируются гетерогенные полиаденилаты. Это регулируемый процесс, и регулятором выступает анти-*cis*-3: мутации этого элемента приводят к тому, что длина поли(A) в (+)цепи становится равной длине поли(U) в (–)цепи.

Вновь синтезированные дочерние молекулы (+)РНК вовлекаются в трансляцию и вторичную репликацию, а на заключительных стадиях инфекции взаимодействуют с вирусными структурными белками и формируют вирионы.

Цитология репликации. Репликация генома пикорнавирусов осуществляется в тесной связи с мембранами. В случае полиовируса репликация происходит в специализированных мембранных структурах, появляющихся на ранней стадии инфекции, примерно, через 2 ч после заражения культуры клеток, в которых весь цикл репродукции может занимать 6–8 ч.

Мембранные структуры в зараженной полиовирусом клетке — гетерогенные по размерам (50–400 нм) пузырьки (везикулы), располагающиеся сначала в перинуклеарной зоне, а затем распространяющиеся по всей цитоплазме. В них можно обнаружить маркерные белки разных внутриклеточных мембранных структур (в частности, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, систем везикулярного транспорта), а также репликативные белки и РНК. Мембранные комплексы можно выделить из зараженных клеток, и они сохраняют способность синтезировать вирусные РНК. Эта способность исчезает после разрушения мембран детергентами.

Мембранные репликативные комплексы возникают из предсуществующих клеточных мембран, в частности мембран фрагментированного аппарата Гольджи или мембран систем СОРІ и/или СОРІІ, обеспечивающей секреторный путь Гольджи-ЭР. При этом под влиянием вирусных белков нарушается нормальный внутриклеточный транспорт. Основную роль в модификации мембранного аппарата клетки играют неструктурные вирусные белки 2В, 2С и 3А. Они имеют гидрофобные домены и способны взаимодействовать с мембранами непосредственно. Кроме того, они контактируют с клеточными белками, регулирующими мембранный транспорт (Arf GTPазами и GBF1, связанными с Гольджи, системой СОРІ и другими системами), и привлекают их в создаваемые «вирусные фабрики». Экспрессия в клетках только 2В, 2С и 3А приводит к появлению везикулярных структур, внешне очень похожих на нативные, но не способные — при последующем введении вирусной РНК — обеспечить ее репликацию. По всей видимости, формирование «рабочих» мембранных комплексов должно быть сопряжено с синтезом вирусной РНК.

По одной из моделей, сначала формируются однослойные мембранные везикулы на базе мембран СОП, в которых происходит репликация РНК. Затем они преобразуются в изогнутые структуры, и далее образуются двуслойные везикулы (DMV, double membrane vesicles), родственные аутофагосомам. Наиболее активный синтез РНК происходит в однослойных везикулах, однако, он продолжается и в составе двуслойных везикул. В обоих типах везикул могут собираться вирусные частицы, транспортироваться к плазматической мембране, и экспортироваться из клетки.

Некоторые функции мембранных структур достаточно очевидны. Они, в частности, защищают вирус-специфические РНК от воздействия клеточных нуклеаз и защитных механизмов, связанных с узнаванием клеткой дцРНК. Возможно, мембранные комплексы способствуют достижению достаточных концентраций вирус-специфических продуктов, гNTP и оптимальных ионных условий. Нарушение внутриклеточного транспорта, сопровождающее создание вирусных фабрик, играет важную роль в подавлении механизмов врожденного и адаптивного иммунитета (секреции цитокинов, презентации поверхностных антигенов и рецепторов и т.д.), затрудняя защитные функции хозяина.

Баланс репликации и трансляции. При репликации и трансляции пикорнавирусных РНК используется одна и та же матрица — геномная (+) цепь. Однако рибосома и РНК полимеразы передвигаются по матрице в противоположных направлениях и должны создавать препятствия друг другу. Следовательно, трансляции и репликации должны быть разведены во времени и в пространстве клетки. Выше обсуждался механизм переключения с трансляции на репликацию, основанный на пересадке РСВР с участка IRES на *cis*-1. Пикорнавирусы также обладают механизмом, который исключает помехи рибосомам со стороны 3D^{pol}, очевидно, основанный на «трансляционной циклизации» геномной РНК. Более того, инициация синтеза (–)цепи не может произойти до тех пор, пока не будет закончена «правильная» трансляция матрицы РНК. Это, в частности, следует из экспериментов, в которых во внутренний район пикорнавирусной ORF вводили дополнительный терминирующий кодон и предоставляли репликативные белки *in trans*. Оказалось, что репликация такой мутантной РНК затруднена. По-видимому, синтез антигеномной цепи наиболее эффективно осуществляется молекулой 3D^{pol}, которая была синтезирована на той же самой РНК матрице.

Организация генома пикорнавирусов (синтез единого полипротеина-предшественника) диктует «затратный» механизм трансляции. Вирион содержит 60 копий каждого из структурных белков и всего одну молекулу РНК. Это означает, что каждая молекула (+)РНК должна быть много-

кратно транслирована для создания зрелого вириона. Такая стратегия кажется неэкономной. На каждую копию предшественника капсидных белков образуются копии всех прочих белков, в том числе, и ферментативных. Мы не знаем количественные потребности вируса в таких белках, как 2В, 2С^{HEL} или 3А, но образование существенного избытка 3D^{pol} кажется биологически мало оправданным. Однако, для инициации репликации эти белки, если они «второй свежести» (находятся в полностью процессированной, «зрелой» форме), не пригодны — для синтеза каждой новой цепи РНК обязательно требуются предшественники 3АВ и 3СD, а не смесь 3А, 3В (VPg), 3С и 3D^{pol}. Возможно, эти обстоятельства объясняют, почему такая неэкономная стратегия используется большой группой вирусов. Следует, впрочем, иметь в виду, что некоторые пикорнавирусы (например, вирус энцефаломиокардита) используют при трансляции РНК механизм -1 рибосомального фреймшифтинга, позволяющий (причем на поздних стадиях инфекции) осуществить преимущественный синтез белков капсида VP и неструктурного белка 2А.

4.2.2. Калицивирусы

Семейство *Caliciviridae* (от лат. *calix*, чаша) включает несколько родов вирусов, поражающих теплокровных животных, рептилий и амфибий. Некоторые из них являются достаточно опасными патогенами. Так, норовирус (human Norwalk virus, HuNoV) является возбудителем 90% острого небактериального гастроэнтерита у человека. Икосаэдрические частицы калицивирусов (диаметр 25–40 нм) построены из основного и минорного структурных белков и не имеют наружной оболочки.

Структура генома калицивирусов. Однокомпонентный (+)РНК геном калицивирусов несет 5'-концевой VPg (13–15 кДа) и 3'-поли(А) последовательность. 5'-НТО парадоксально короткая (в геноме HuNoV всего 5 нт), 3'-НТО — около 80 нт. У разных представителей геном состоит из 7–8 т.н. и содержит три ORF. В 5'-концевой протяженной ORF1 закодированы консервативные домены репликации и процессинга белков. 3'-концевые ORF2 и 3 кодируют структурные белки.

У HuNoV трансляция 5'-концевого гена (которая зависит от VPg, взаимодействующего с факторами инициации) приводит к синтезу полипептида-предшественника из 1800 аминокислотных остатков, который нарезается вирусной протеиназой на 6 зрелых белков, прямо или косвенно участвующих в репликации. 3'-концевые гены кодируют, соответственно, основной и минорный белки оболочки (CP1 и 2), которые экспрессируются с помощью образования бицистронной субгеномной РНК (рис. 14).

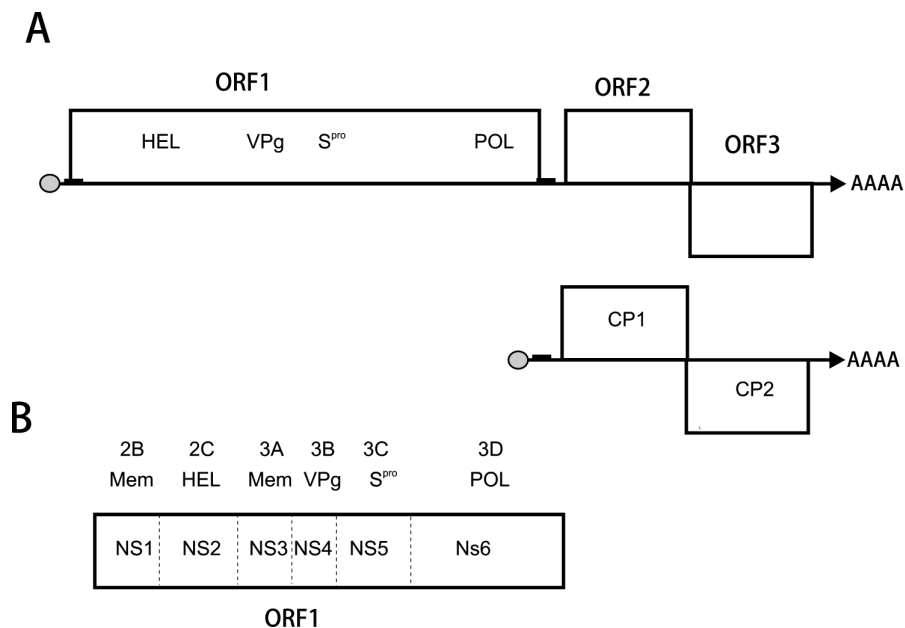


Рис. 14. Структура генома калицивируса (норовирус человека, HuNoV). Утолщенный отрезок обозначает участок из 33 нт, дублированный в геноме. На нижней диаграмме показаны домены неструктурных белков — продуктов ORF1, эквивалентных репликативным доменам пикорнавирусов.

Все калицивирусные геномы начинаются с последовательности 5'-GU. Затравкой при синтезе (–)цепей служит VPg-pU, а (+)цепей — возможно, VPg-pG.

Ферментативный аппарат репликации РНК. В репликации генома калицивирусов участвуют несколько белков, образующихся в результате процессинга полипептидного продукта ORF1: NS1 (мембрано-связывающий белок), NS2 (НТФаза/хеликаза), NS3 (мембрано-связывающий белок), NS4 (VPg), NS5 (Pro) и NS6 (POL). Эти неструктурные белки соотносят с пикорнавирусными белками 2B, 2C, 3A, 3B, 3C и 3D (рис. 14).

Процессинг неструктурных белков калицивирусов происходит ступенчато, с образованием белковых интермедиатов, и некоторые интермедиаты могут выполнять уникальные функции при репликации, как и в уже рассмотренных пикорнаиврусных системах. NS1 и NS3 прикрепляются к мембранам и опосредуют сборку репликативного комплекса. Лидерный белок NS1 специфически взаимодействует с NS2 (HEL), NS3 (Мем) и NS5-NS6 (предшественник S^{Pro}-POL).

Синтез негативной цепи. В 5'- и 3'-концевых областях генома HuNoV есть комплементарные участки, которые необходимы для циркуляризации матрицы. Эти участки достаточно коротки (6 нт), поэтому замкнутая структура РНК, вероятно, поддерживается прикреплением до восьми клеточных белков к участкам нт 1–21 с 5'-конца и нт 1–47 с 3'-конца генома. Эти белки не были полностью охарактеризованы, но в их числе есть РАВР и РСВР, а также белки La (lupus antigen) и РТВ. Кроме того, репликация требует нескольких шпильчатых структур на 5'- и 3'-концах геномной РНК, которые условно можно обозначить как «*cis*-1» и «*cis*-3». Они занимают около 250 нт на 5'-конце и 200–230 нт на 3'-конце геномной РНК, включая часть кодирующих областей генома.

Есть данные, что предшественник S^{Pro}-POL проводит реакцию уридилирования VPg по остатку Туг-27. Эта реакция осуществляется на специфическом элементе 3'-НТО, примыкающем к поли(А) (функциональному аналогу *oriI* или *cis*-2 пикорнавирусов), и требует присутствия самой поли(А). Продуктом реакции является моноуридилат VPg, который служит затравкой для синтеза полноразмерной антигеномной цепи, входящей в состав RF калицивирусов.

Синтез позитивных цепей. RF преобразуется в ветвистую структуру RI при синтезе дочерних позитивных цепей, которая инициируется, вероятно, за счет узнавания репликативным комплексом гипотетического сигнала на 3'-конце негативной цепи. При этом используется затравка VPg-pG. Место и механизм синтеза «второй затравки» неизвестны. Также непонятен механизм транскрипции (синтеза сгРНК). Вероятно, важную роль в транскрипции играет 33-нт участок, дублированный в геноме калицивирусов (рис. 14). Возможно, VPg-pG затравляет синтез на этом участке матрицы (–)РНК.

Цитология репликации. Неструктурные белки и RF калицивирусов локализуются сначала в перинуклеарной зоне, а затем в скоплениях мембранных везикул, образованных из мембран ЭР, аппарата Гольджи и эндосом зараженной клетки. NS1, NS2 и NS3 являются трансмембранными белками, способными независимо присоединяться к мембранам ЭР и аппарата Гольджи. Индукция везикул происходит в клетках при экспрессии NS2 и NS3. Поскольку NS1 обладает способностью связываться со всеми прочими неструктурными белками, возможно, этот белок выполняет функцию «посадочной площадки» при организации репликативного комплекса.

4.2.3. Другие пикорна-подобные вирусы

Большое число вирусов животных (сем. *Dicistroviridae*, *Astroviridae*) и вирусов растений (сем. *Potyviridae*, *Comoviridae* и *Secoviridae*), а также возрастающее число вирусов простейших также относят к суперсемейству пикорна-подобных вирусов.

Dicistroviridae



Comoviridae

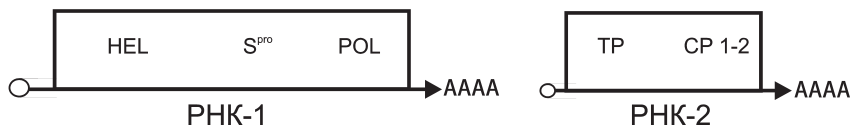


Рис. 15. Структуры РНК геномов пикорна-подобных вирусов семейств *Dicistroviridae* (вирус паралича сверчка, CrPV) и *Comoviridae* (вирус мозаики коровьего горошка, CPMV). CP1, CP2, CP3 — структурные белки, формирующие икосаэдрические частицы. TP — белок межклеточного транспорта вируса растений.

Пикорна-подобные вирусы содержат (+)РНК, несущую VPg на 5'-конце, их геном (однокомпонентный или двухкомпонентный) экспрессируется путем непрерывной трансляции единой ORF и протеолитического разрезания белка-предшественника (рис. 15). Репликация осуществляется с помощью нуклеотид-белковой затравки (по-видимому, VPg-pU в большинстве случаев). Однако есть существенные вариации. Во-первых, VPg у многих пикорна-подобных вирусов имеет гораздо большие размеры, чем у пикорнавирусов (13–15 кДа). Трансляция РНК калицивирусов, потивирусов и комовирусов зависит от VPg, который связывается с eIF3, eIF4E и другими факторами инициации и фактически «замещает» функции кеп-структуры мРНК. Кроме того, «большие VPg» контактируют с целым рядом других клеточных белков-партнеров.

Особого комментария заслуживает репликация представителей семейства *Potyviridae*, включающей Y-вирус картофеля (PVY), вирус гравировки табака (TEV) и другие нитевидные вирусы растений. В N-концевой части полипротеина потивирусов находятся «вспомогательные» проте-

иназы P1, HC-Pro и P3 (рис. 16). Долгое время не удавалось найти белок межклеточного транспорта потивирусов (для вирусов растений такой белок является *sine qua non* инфекционного цикла), пока исследователи не обратили внимания на консервативную ORF, частично перекрывающуюся с участком ORF1, кодирующим P3 (рис. 16). При репликации потивирусного генома существует «магистральный путь», приводящей к синтезу точной копии антигенной РНК, которая служит для воспроизведения дочерних (+)РНК. Однако, при синтезе минус-цепи с определенной вероятностью происходит вставка одного дополнительного остатка уридина на матричной последовательности GAA AAA A (для удобства, разбитого здесь на триплеты ORF1) (рис. 16).

Potyviridae



Рис. 16. Транскрипционный сдвиг рамки считывания (+1 фреймшифт) при экспрессии гена TP потивирусов.

В результате реализуется транскрипционный +1 фреймшифт — небольшая фракция полноразмерных (+)цепей потивируса будет содержать укороченную ORF1, кодирующую слитный белок, состоящий из N-концевой части P3 и С-концевого полипептида TP, который выполняет необходимые функции транспортного белка в растениях (N-P3-TP, рис. 16). Примеры «редактирования РНК» при транскрипции генов известны для вирусов с негативным РНК геномом, парамиксовирусов и филовирусов (глава 5.2); однако, транскрипционный фреймшифт у *Potyviridae*, на момент написания этой книги, уникален для вирусов с позитивным РНК геномом.

Цитология репликации. Все пикорна-подобные вирусы используют клеточные мембраны, трансформируя их в «вирусные фабрики». У каждой группы есть свои особенности с точки зрения биогенеза сайтов репликации. Например, у *Potyviridae* небольшой гидрофобный белок 6К (рис. 16) трансформирует мембраны вокруг «сайта выхода из эндоплазматического ретикулюма» (ERES, ER exit site), создавая везикулы, которые затем перемещаются по цитоскелету к хлоропластам. Мембраны везикул и хлоропластов сливаются, создавая новые структуры для репликации РНК.

4.3. Альфа-подобные вирусы

К супергруппе альфа-подобных вирусов относят семейства *Togaviridae* (роды *Alphavirus* и *Rubivirus*), вирус гепатита Е (*Hepevirus*) и большое число групп вирусов растений, включая такие классические объекты вирусологии, как вирус табачной мозаики (TMV) и вирус мозаики костра (BMV). Они значительно различаются между собой с точки зрения структуры частиц (икосаэдрических, палочковидных или нитевидных), организации генома (одно-, двух- или трехкомпонентного) и биологических свойств. Здесь снова уместна оговорка — данная супергруппа не «канонизирована» в общепринятой классификации ICTV. Альфа-подобные вирусы имеют близкородственные домены РНК полимеразы, а их репликативные белки несут инвариантный набор консервативных доменов метилтрансферазы (MTR), HEL и POL, что указывает на происхождение этих вирусов животных и растений от общего предка. Все вирусы данной супергруппы имеют кеп-структуру на 5'-конце позитивных цепей РНК, которая синтезируется вирусным ферментом (MTR), и их геномы экспрессируются с помощью кеп-зависимой трансляции.

4.3.1. Альфавирусы

Общие сведения. Род *Alphavirus* (семейство *Togaviridae*) включает два известных «модельных» вируса, вирус Синдбис (SINV) и вирус леса Семлики (SFV), и еще около 30 переносимых комарами вирусов животных, в том числе возбудителей опасных заболеваний позвоночных и человека (вирус Чикунгунья, *Chikungunya virus*; вирусы восточного и западного энцефалита лошадей, EEEV, EWEV). Вирионы альфавирусов представляют собой икосаэдрический нуклеокапсид, окруженный липопротеидной мембраной (диаметр около 70 нм). Как и многие другие

(хотя и не все) вирусы с геномной (+)РНК, альфавирусы реплицируются в цитоплазме. Репликация сопровождается образованием характерных везикулярных структур, в которых происходит сборка репликативных комплексов и синтез РНК. Важной особенностью этой группы вирусов является их способность размножаться как в клетках позвоночных, так и беспозвоночных животных (насекомых-переносчиков).

Особенности генома альфавирусов. Геном альфавирусов представлен (+)РНК около 12 тыс. нт, которая несет 5'-концевой кеп и 3'-концевую поли(А). В геноме альфавирусов имеется две открытые рамки трансляции, разделенные межгенным участком (рис. 17).

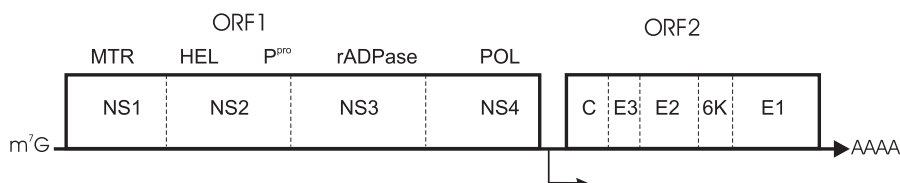


Рис. 17. Структура генома альфавируса (вирус леса Семлики, SFV). Пунктирные отрезки обозначают сайты разрезания полипротеинов. Указаны основные домены неструктурных (репликативных) белков NS1–4. Ломаная стрелка — начало и направление синтеза субгеномной РНК, кодирующей структурные белки; С — белок нуклеокапсида; E1–3 — гликопротеины наружной мембраны; 6K — белок с мол. массой 6 кДа; m⁷G — кеп-структура.

В 5'-концевой ORF, занимающей примерно две трети генома, закодирован полипротеин — предшественник неструктурных (репликативных) белков, — который разрезается вирусной протеиназой на четыре зрелых белка NS1–4. В 3'-концевой ORF закодирован предшественник структурных белков (белка нуклеокапсида С и гликопротеинов наружной мембраны E1–3) и 6-кДа белка, экспрессирующийся с помощью субгеномной РНК (сгРНК) (рис. 17).

Ферментативный аппарат репликации и транскрипции альфавирусов. Ключевую роль в репликации и транскрипции альфавирусных РНК играют белки NS1, NS2, NS3 и NS4, а также интермедиаты, образующиеся при неполном расщеплении предшественника NS1234.

NS1 является кеп-синтезирующим белком. Метилтрансферазная активность связана с N-концевой частью, а гуанилилтрансферазная — с С-концевой частью молекулы NS1. Вирусный фермент не гомологичен хозяйским метилтрансферазам, участвующим в кепировании клеточных

мРНК, и имеет отличный от последних механизм действия. Если клеточная копирующая система сначала присоединяет гуанозин к 5'-концевому остатку РНК, а затем его метилирует, то альфавирусный фермент метилирует свободный GTP, который затем — после удаления γ -фосфата 5'-концевого нуклеотидного остатка РНК — присоединяется пирофосфатной связью к этому остатку. Кроме копирования, NS1 принимает участие в регуляции синтеза вирусных РНК. В N-концевой части NS1 есть амфипатический альфа-спиральный домен, который обеспечивает взаимодействие белка с мембранами. Предполагается, что именно NS1 организует сборку репликативного комплекса и закрепляет его в мембранах.

Как и NS1, NS2 представляет собой многофункциональный и мультидоменный белок. Его N-концевая часть содержит консервативный домен НТРАЗЫ/хеликазы (HEL), а С-концевая — домен цистеиновой (папаин-подобной) протеиназы (P^{Pro}), осуществляющей процессинг предшественника NS1234, приводящий к образованию интермедиатов и зрелых репликативных белков. NS2 обладает также активностью γ -фосфатазы, способной отщеплять 5'-концевой фосфатный остаток вновь синтезированной (+)цепи РНК, что необходимо для копирования РНК. Хеликазная активность NS2, вероятно, способствует расплетанию дуплексов при репликации молекул РНК. Имеются указания на то, что NS2 способен узнавать *цис*-сигнал на 3'-конце антигеномной РНК. Этот белок выполняет также роль «транскрипционного фактора», присоединяясь к субгеномному промотору и регулируя синтез сгРНК. Кроме того, NS2 обладает сигналом ядерной локализации (NLS) и поступает в ядро зараженной клетки, где ингибирует клеточную транскрипцию. Наконец, NS2 взаимодействует с рибосомным белком S6, что приводит к снижению уровня фосфорилирования S6 и, возможно, способствует предпочтительной трансляции вирусных матриц. NS2 также контактирует с поли(А)-связывающим белком (PABP).

На N-конце белка NS3 находится высококонсервативный «макродомен» (MacroD), имеющий активность гАДР-гидролазы, в середине белковой цепи — цинк-связывающий домен, и на С-конце — гипервариабельный, слабо структурированный и фосфорилированный домен. NS3, как и другие неструктурные белки, необходим для вирусной репликации и транскрипции. Он участвует в синтезе (–)РНК и сгРНК и, вместе с NS1, способствует прикреплению репликативного комплекса к мембранам. NS3 взаимодействует с рядом клеточных белков — компонентами цитоскелета, шаперонами (HSP70, HSP90), РНК-связывающими белками (hnRNP K, YBX1), рибосомными белками, фактором элонгации 1А, амфифизинами (белками, определяющими изгибание мембран) и белками семейства G3BP. Хотя биологическое значение этих взаимодействий неизвестно, они могут иметь отношение к функционирова-

нию вирусных репликативных комплексов в различных условиях или к изменению некоторых клеточных процессов при вирусной инфекции. В частности, гипервариабельный домен NS3, ответственный за большую часть белок-белковых контактов, необходим для репликации в определенных хозяевах (насекомых), и влияет в разной степени на репликацию в различных линиях клеток млекопитающих.

Белок NS4 содержит домен РНК-зависимой РНК-полимеразы (POL) и является каталитической субъединицей репликазы. Кроме того, этот белок обладает активностью терминальной аденилилтрансферазы (TATase), т.е. способен присоединять нематричные остатки аденозина к 3'-концу строящейся (+)цепи РНК. Интересно, что при завершении синтеза (–)цепи репликаза альфавирусов добавляет к ее 3'-концу один нематричный остаток гуанозина. Возможно, эти реакции связаны с кофакторами NS4, вирус-специфическими или клеточными, входящими в состав репликативного комплекса на разных стадиях синтеза РНК.

Зрелые репликативные белки и их предшественники, выполняющие индивидуальные функции при синтезе вирусных РНК, требуются в разных количествах и в разное время. Поэтому регуляция абсолютных и относительных концентраций этих белков — важнейший элемент регуляции репликации и экспрессии альфавирусного генома. При этом конкретные механизмы этой регуляции могут различаться даже у близкородственных альфавирусов. В частности, зрелый белок NS4 (РНК полимеразы) требуется в меньших количествах, чем другие неструктурные белки. В РНК вируса Синдбис между участками ORF1, кодирующими NS3 и NS4, есть слабый терминирующий кодон UGA, который супрессируется рибосомами с вероятностью 5%. В результате «полных» молекул NS1234 образуется примерно в 20 раз меньше, чем молекул NS123. В РНК вируса леса Семлики такого терминирующего кодона нет, но, тем не менее, в зараженной клетке NS4 пропорционально столь же мало. Механизм «понижающей регуляции» синтеза РНК полимеразы SFV неизвестен.

Cis-элементы генома альфавирусов. Выделяют несколько основных *cis*-элементов в геноме альфавирусов, управляющих синтезом антигеномной, геномной и субгеномной РНК. В литературе эти *cis*-элементы не получили унифицированного названия, поэтому здесь мы их будем условно обозначать как *cis*-1, *cis*-1a, *cis*-2, *cis*-3 (сигналы репликации) и *cis*-4 (субгеномный промотор) (рис. 18).

Элементы *cis*-1 и *cis*-2 обнаружили в опытах с дефектными геномами, накапливающимися при репликации вирусной РНК. Такие короткие РНК, способные реплицироваться в присутствии вируса-помощника, известны для пикорнавирусов, многих (+)РНК вирусов растений, вируса гриппа и других вирусных систем. Если заражать клетки вирусом

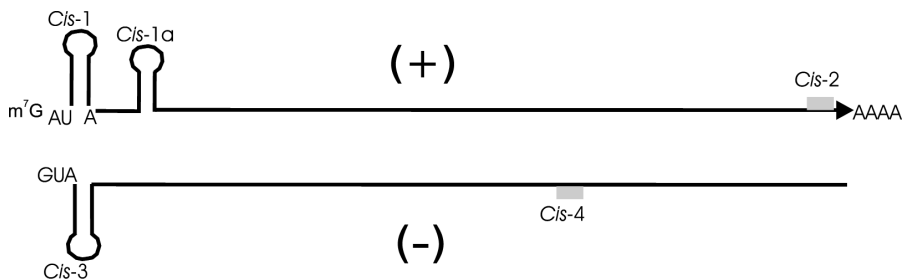


Рис. 18. *Cis*-элементы репликации и транскрипции в позитивной и негативной цепях РНК альфавирусов.

с высокой множественностью (в условиях большого числа инфекционных частиц, приходящихся на одну клетку), то в потомстве можно обнаружить вирусные геномы, несущие разнообразные делеции, иногда весьма обширные. Поскольку такие геномы конкурируют с полноценными геномами за репликативный аппарат, их называют дефектными интерферирующими (DI) РНК. В DI РНК альфавирусов может отсутствовать почти вся кодирующая область, но они сохраняют набор *cis*-элементов, обеспечивающих узнавание и копирование репликативным аппаратом вируса. Секвенирование DI РНК альфавирусов позволило охарактеризовать эти *cis*-элементы.

Ключевым 3'-концевым *cis*-сигналом (*cis*-2; главный промотор для синтеза негативных цепей) является участок длиной 19 нт, непосредственно граничащий с поли(А). Последовательность этого участка консервативна у альфавирусов. Этот элемент, узнаваемый на уровне первичной структуры, необходим для инициации синтеза (-)цепи РНК. Для эффективного синтеза (-)РНК необходима также и поли(А)-последовательность геномной РНК (не менее 11–12 нт). Мутации в *cis*-2 негативно влияют на репликацию альфавирусов. Однако, если этот участок удалить целиком, то это не приводит к гибели вируса. Происходит «регенерация» («отрастание») 3'-НТО, причем исходная последовательность *cis*-2 не восстанавливается, вместо нее появляются АУ-богатые последовательности, которые могут узнаваться вирусной РНК-полимеразой. В результате жизнеспособность мутантного вируса не утрачивается, хотя и снижается. В этой связи нельзя не вспомнить тот факт, что удаление сигнала *cis*-3 («целующихся шпилек») в геноме пикорнавируса также не вызывает блокировку репликации, но приводит к появлению мутантных геномов, способных реплицироваться с более низкой эффективностью (глава 4.2.1).

Сигнал *cis-1* на 5'-конце (+)РНК необходим для инициации синтеза как (–), так и (+)цепей. На 5'-конце находится динуклеотид AU, консервативный у всех альфавирусов, к которому примыкает G-C-богатая шпилька. Терминальный остаток А не спарен, а U входит в состав стебля шпильки. Еще одна шпилька (*cis-1a* или CSE, conserved sequence element), занимающая позиции 155-205 с 5'-конца геномной РНК, выполняет роль энхансера синтеза (–) и (+)цепей, но не является необходимой для репликации (рис. 18). Внесение искусственных мутаций в CSE приводит к накоплению в потомстве таких вирусных геномов мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в NS2 и NS3, которые компенсируют дефекты CSE. Можно предположить, что эти белки в процессе приобретения компенсаторных мутаций сохраняют способность взаимодействовать с CSE-энхансером.

«Симметричная» (по отношению к *cis-1*) G-C богатая шпилька *cis-3* образуется на 3'-конце (–)цепи и выполняет роль главного промотора синтеза (+)цепей (рис. 18). С помощью мутагенеза было установлено, что ключевыми компонентами *cis-3* в (–)цепи являются концевой динуклеотид и топология стебля и петли шпильки, но не их первичная структура.

Эффективность синтеза субгеномной РНК (сгРНК) зависит от субгеномного промотора *cis-4*, расположенного в (–)цепи РНК SINV между позициями –98 и +16 относительно 5'-конца сгРНК (+1 берется как «стартовая точка», т.е. нуклеотидный остаток в (–)цепи, с которого начинается синтез сгРНК) (рис. 19). Критическими последовательностями субгеномного промотора являются элементы между позициями –40 и –20 нт и +6 и +16 нт. Эти элементы действуют синергически, обеспечивая высокую активность транскрипции. Стимулировать синтез сгРНК может и значительно более короткий участок между позициями –19 и +5, хотя его активность в 3–6 раз ниже, чем активность полного промотора (рис. 19).

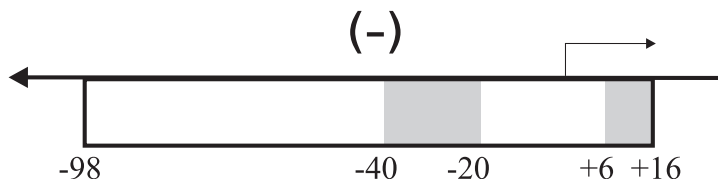


Рис. 19. Структура субгеномного промотора (*cis-4*) в негативной цепи РНК вируса Синдбис (показан небольшой участок полноразмерной цепи). Ломаная стрелка, начало и направление синтеза сгРНК. Прямоугольниками обозначены последовательности (–)РНК, существенные для активности субгеномного промотора, затененными прямоугольниками — наиболее важные для синтеза сгРНК участки.

Есть свидетельства в пользу того, что альфавирусная РНК-полимераза (NS4) сама по себе может узнавать некоторые *cis*-элементы. Вероятно, участки полипептидной цепи, взаимодействующие с этими элементами РНК, пространственно разнесены в третичной структуре РНК полимеразы. Тем не менее, для продуктивного взаимодействия с промоторами и инициации синтеза различных РНК, по-видимому, необходима кооперация NS4 с другими репликативными белками вируса и, возможно, клеточными белками.

Синтез негативной цепи РНК альфавирусов. Есть основания полагать, что у альфавирусов, как и у пикорнавирусов, предварительным условием инициации репликации является циркуляризация генома через взаимодействие между РАВР и кеп-связывающими факторами eIF-4E/4G, присоединенным к противоположным концам молекулы вирусной (+)РНК. Здесь есть известное логическое неудобство — мостик РАВР – eIF-4E/4G используется для трансляционной активации мРНК, в то время как способы циклизации вирусных РНК, обеспечивающие трансляцию и репликацию, должны различаться (ср. главу 4.2.1). Высказывалось предположение, что репликативный комплекс садится

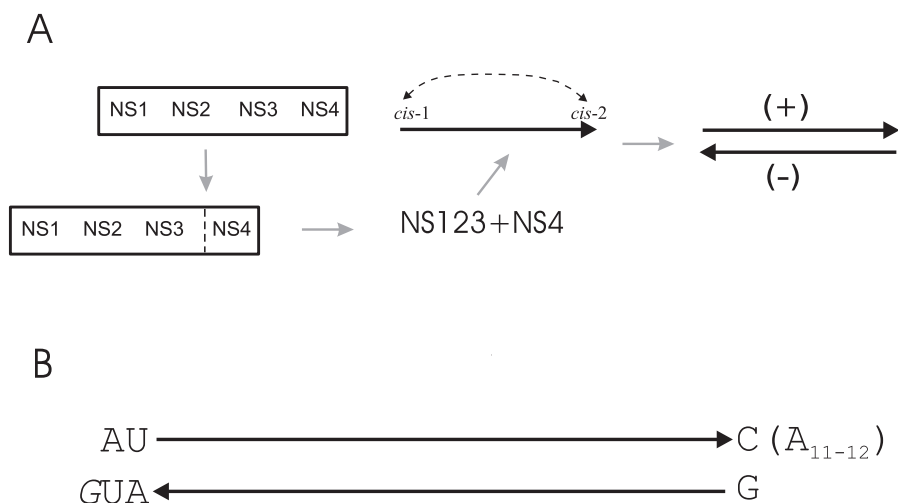


Рис. 20. А — процессинг предшественника неструктурных белков сопряжен с синтезом (–)РНК альфавирусов. Происходит циклизация (+)цепи (изогнутая стрелка указывает участки РНК, участвующие в РНК-белковых взаимодействиях). Отщепление NS4 протеиназой P^{Pro} создает репликативный комплекс NS123+NS4, синтезирующий (–)цепь. В — синтез негативной цепи РНК альфавируса начинается с включения остатка G и заканчивается добавлением нематричного остатка G (выделен курсивом).

на *cis*-1, препятствуя сканированию и трансляции геномной РНК. При этом репликации мог бы способствовать контакт NS2 – PABP, замещающий контакт eIF-4F – PABP.

Для инициации синтеза (–)цепи необходимы белки NS123 и NS4, образующиеся в результате частичного процессинга NS1234 протеиназой P^{Pro} *in trans*. Комплекс NS123+NS4 узнает сближенные *cis*-1 и *cis*-2 и синтезирует антигеномную цепь (рис. 20А).

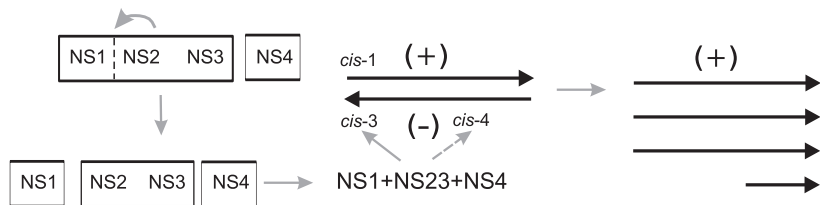
Инициация синтеза (–)цепи происходит на матричном остатке цитозина, примыкающем к поли(А) (рис. 20В). Поли(А), хотя и является необходимым элементом главного промотора *cis*-2, и ее длина должна быть как минимум 11–12 нт, игнорируется как матричная последовательность. После завершения элонгации к 3'-концу (–)цепи добавляется нематричный остаток гуанозина (рис. 20В).

Синтез дочерних позитивных цепей. Комбинация белков NS123+NS4 не может обеспечить эффективный синтез (+)цепи на матрице (–)цепи, входящей в состав RF РНК. Для этого необходимы комбинации NS1+NS23+NS4 или NS1+NS2+NS3+NS4, образующиеся в ходе дальнейшего процессинга цистеиновой протеиназой NS2. Сначала происходит автокаталитическое (*in cis*) выщепление NS1 из состава NS123. Комплекс NS1+NS23+NS4 узнает *cis*-3 на 3'-конце (–)цепи в составе дцРНК. Несколько хуже этот комплекс умеет узнавать субгеномный промотор *cis*-4, который становится доступен в результате преобразования RF в RI (рис. 21А). Время жизни комплекса NS1+NS23+NS4 составляет несколько секунд. Затем NS23 разрезается P^{Pro} *in trans*, и образуется комплекс NS1+NS2+NS3+NS4, предпочтительно узнающий субгеномный промотор в (–)цепи (рис. 21В).

Полноразмерная антигеномная РНК находится в дуплексе с геномной РНК (RF). Скорее всего, молекула геномной (+)РНК может служить матрицей для образования антигеномной молекулы только один раз. Иными словами, молекула RF используется только в качестве матрицы для синтеза дочерних (+)цепей РНК альфавирусов. Предлагалась модель инициации синтеза (+)цепи РНК, согласно которой в результате расплетания и перестройки «левого» конца RF образуются шпильки *cis*-1 и «симметричная» *cis*-3 (рис. 22). Инициация синтеза (+)цепи происходит в результате узнавания в (–)цепи динуклеотида UA и стебля шпильки *cis*-3, а в (+)цепи — *cis*-1.

3'-концевой гуанилат негативной цепи, добавленный нематричным способом, игнорируется репликазой (ср. репликацию РНК фага Q β , рис. 4, глава 4.1.1). Первым включается адениловый остаток, комплементарный предпоследнему 3'-нуклеотиду (–)цепи (рис. 22). 5'-концевой остаток аденозина на вновь синтезированных (+)РНК подвергается кепированию белком NS1.

А



В

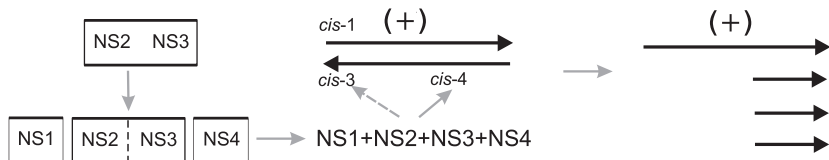


Рис. 21. А — протеолитическое отщепление NS1 создает комплекс NS1+NS23+NS4, способный синтезировать полноразмерные (+)цепи и, с меньшей эффективностью, сгРНК (сплошная и пунктирная стрелки указывают соответствующие промоторы в (-)цепи). В — разрезание NS23 создает комплекс NS1+NS2+NS3+NS4, предпочтительно синтезирующий сгРНК. Стрелки справа на схеме, продукты синтеза (+)РНК.

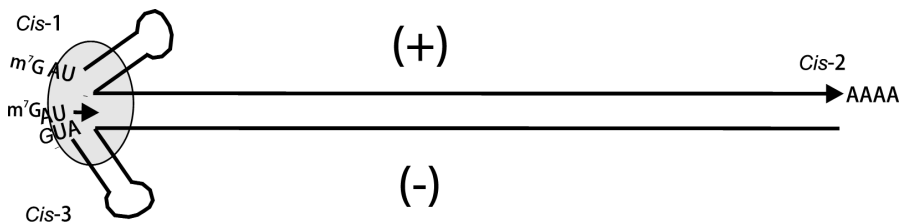


Рис. 22. Модель инициации и элонгации синтеза (+)цепи РНК альфавирусов. Затененный овал, репликативный комплекс.

Синтез (+)цепей на матрице (-)цепи, входящей в состав двуспиральной RF, предполагает расплетание дуплекса и вытеснение из него родительской позитивной цепи. Расплетание, вероятно, осуществляется при участии хеликазной активности NS2. Вытеснение (+)цепи сопровождается образованием ветвистых молекул репликативного интермедиата RI. На этой стадии репликативные комплексы могут узнавать субгеномный промотор *cis-4* и начать синтез сгРНК

Синтез полноразмерной (+)цепи и сгРНК завершается образованием поли(А)-последовательности, которая достраивается нематрично, очевидно, при участии активности TATase NS4 и клеточной поли(А)-полимеразы.

Регуляция синтеза РНК. Как и в других вирусных системах, синтез РНК у альфавирусов асимметричен — антигенной РНК синтезируется значительно меньше, чем (+)РНК и сгРНК. Вероятно, синтез цепей разной полярности регулируется за счет различной эффективности промоторов в (+) и (–)РНК матрицах. Синтез альфавирусной (–)РНК идет существенно интенсивнее при 39 °С, чем при 30 °С. Это может иметь биологическое значение, поскольку альфавирусы способны размножаться в организмах как теплокровных (млекопитающих и птиц), так и холоднокровных животных (насекомые). Возможно, этим объясняется то обстоятельство, что в организме позвоночных альфавирусы вызывают острые литические инфекции, а в кровососущих насекомых-векторах — бессимптомные персистентные инфекции.

Цитология репликации. Репликация альфавирусов происходит на мембранах клеточных эндосом и лизосом, которые трансформируются под действием вирусных неструктурных белков с образованием мембранных пузырьков (сферул) диаметром ~60 нм, имеющих «шейку» (канал в цитоплазму). Их размер определяется длиной реплицирующейся РНК. Так, при репликации 11.5-kB генома и 6-kB репликона альфавирусов (несущего делецию межгенного участка и гена структурных белков) образуются сферулы диаметром 58 и 40 нм, причем оба типа структур могут образовываться в одной клетке. По-видимому, ключевым белком, воздействующим на мембраны и организующим мембрано-связанный репликативный комплекс, является NS1, который уже в составе полипротеина NS1234 способен прикрепляться к мембранам. Сродство этого белка к мембранам поддерживается также ковалентным присоединением пальмитиновой кислоты к определенным цистеиновым остаткам молекулы, однако мутантный NS1, неспособный к такой модификации, сохраняет способность (хотя и более слабую) соединяться с мембранами, и вирус с соответствующей мутацией вполне жизнеспособен.

4.3.2. Альфа-подобные вирусы растений — бромовирусы

Общие сведения. Сем. *Bromoviridae* включает простые изометрические вирусы растений (диаметр капсиды 26–35 нм) — бромовирусы (вирус мозаики костра, BMV), кукумовирусы (вирус огуречной мозаики, CMV), альфамовирусы (вирус мозаики люцерны, AIMV), иларвирусы (вирус стрика табака, ToSV) и некоторые другие. Геном представи-

телей семейства разделен между тремя кепированными геномными сегментами и устроен сходным образом, за исключением некоторых деталей. Например, РНК бромовирусов и кукумовирусов несут 3'-концевую тРНК-подобную структуру (TLS), акцептирующую тирозин; РНК представителей других родов не имеют типичной TLS, способной аминокислотилироваться, хотя их 3'-UTR могут иметь третичную структуру, напоминающую TLS. Вирусы данного семейства реплицируются в цитоплазме зараженных растений.

Структура генома, репликативные белки и цис-сигналы вируса мозаики костра (BMV). Вирус мозаики костра наиболее хорошо изучен и является «классической моделью» молекулярной вирусологии. Геном BMV разделен между РНК-1 (кодирующей белок 1а с доменами MTR и HEL), РНК-2 (кодирующей белок 2а с доменом POL) и бицистронной РНК-3 (кодирующей транспортный белок и белок оболочки) (рис. 23). Ген белка оболочки экспрессируется с помощью субгеномной РНК-4. Смесь депротеинизированных РНК-1, РНК-2 и РНК-3 инфекционна.

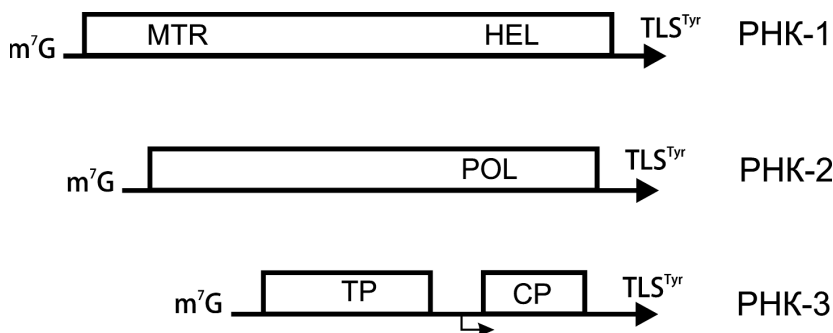


Рис. 23. Структура генома вируса мозаики костра (BMV). TLS^{Tyr}, 3'-концевая тРНК-подобная структура, акцептирующая тирозин; изогнутая стрелка, начало и направление синтеза субгеномной РНК для белка оболочки.

Белки 1а и 2а BMV взаимодействуют друг с другом и формируют репликативный комплекс, в который вовлечены также некоторые клеточные белки. РНК-1 и РНК-2 содержат два ключевых репликативных сигнала, *cis*-1 («B box», линейный участок ~30 нт на 5'-конце РНК) и *cis*-2 («шпилька C», SLC в составе тРНК-подобной структуры) (рис. 24). РНК-3 несет *cis*-1 сигнал со значительно измененной последовательностью («B-like box») и *cis*-2, идентичный таковому в РНК-1 и РНК-2. *Cis*-1 (B box и B-like box) «работает» как сигнал первичного узнавания

репликативным комплексом, *cis-2* является главным промотором синтеза (–)цепи РНК. Комплементарная *cis-1* последовательность на 3'-конце (–)РНК, *cis-3* (сВ box или сВ-like box), является главным промотором синтеза (+)цепей. Субгеномный промотор гена СР (*cis-4*) расположен в межгенной области РНК-3 (точнее, ее комплементарной цепи) и состоит из 4 ключевых остатков, находящихся в составе 20-нт регуляторной последовательности.

Инициация синтеза (–)цепи. На первом этапе белок 1a (MTR-HEL) узнает сигнал *cis-1*, что приводит к перемещению РНК в сферулы (мембранные сайты репликации), которые образуются на ранних стадиях репликации при участии 1a и клеточных белков ретикулонов (Rtn) и комплексов ESCRTIII и COPII (рис. 24, 27). Параллельно с этими процессами, белок 1a образует комплекс с белком 2a (POL), формируя активную репликазу. Репликаза узнает *cis-2*, вызывая циклизацию матрицы РНК, а затем 3'-конец вирусной РНК (ССА_{ОН}). Синтез антигеномной цепи начинается с включения остатка гуанозина, т.е. репликаза игнорирует терминальный остаток А_{ОН} матрицы (рис. 24).

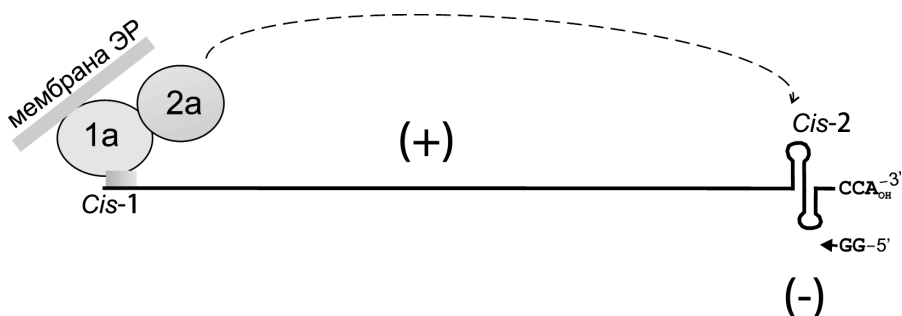


Рис. 24. Инициация синтеза (–)цепи РНК бромовируса. Белок 1a связывается с мембраной ЭР и с *cis-1* (В box, В-like box) на 5'-конце (+)РНК, и затем привлекает 2a (РНК-полимеразу). 2a связывается с сигналом *cis-2* (шпилька С в составе тРНК-подобной структуры) на 3'-конце РНК). Синтез антигеномной цепи начинается с включения остатка гуанозина.

То обстоятельство, что РНК-3 BMV содержит в значительной степени измененную последовательность *cis-1* (В-like box), может указывать на некоторые различия механизмов инициации синтеза (–)цепей РНК-1 и -2, с одной стороны, и РНК-3, с другой.

В результате элонгации синтезируются полноразмерные (–)цепи РНК-1, РНК-2 и РНК-3, входящие в состав двунитчатых RF.

Инициация и элонгация (+)цепей РНК. Комплекс репликативных белков 1а и 2а BMV узнает сигнал *cis*-3 (30 нт с 3'-конца антигеномных цепей РНК). Несмотря на существенные различия между последовательностями *cis*-3 в РНК-1 и -2 (сВ box), и РНК-3 (сВ-like box), все три антигеномные РНК имеют общую терминальную последовательность 3'-CGUU. Синтез начинается с первого нуклеотида матричных (–)РНК (рис. 25).

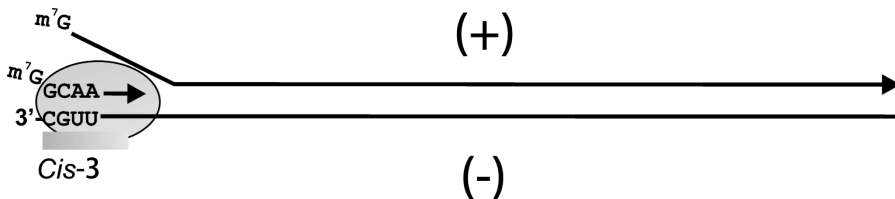


Рис. 25. Инициация синтеза дочерних (+)цепей РНК бромовируса. *Cis*-3 (затененный прямоугольник), главный промотор синтеза (+)цепей. Репликативный комплекс 1а–2а показан в виде затененного овала.

Неизвестно, узнается ли *cis*-3 в составе дуплекса, или же сначала происходит частичное расплетание RF (возможно, с участием РНК-хеликазной активности белка 1а). Так или иначе, на матрице (–)цепи начинается синтез дочерних (+)цепей с вытеснением родительской (+)цепи, и RF преобразуется в репликативный интермедиат (рис. 25). Геномные РНК кепируются при участии гуанилил- и метилтрансферазной активностей белка 1а, вероятно, еще до окончания элонгации синтеза.

В результате синтезируются полноразмерные молекулы (+)РНК, которые оканчиваются последовательностью 3'-СС_{ОН}. Репарация 3'-концов РНК (добавление терминального остатка аденозина) осуществляется клеточной СТР-АТР нуклеотидил-трансферазой тРНК, специфически узнающей TLS BMV. На этом основании ССА_{ОН} конец тРНК-подобной структуры иногда называют «примитивным теломером», а терминальную трансферазу — эквивалентом теломеразы.

Транскрипция. Репликативный комплекс узнает субгеномный промотор *cis*-4 в (–)цепи РНК-3 (по-видимому, когда промотор «обнажается» в структуре ветвистого RI), и синтезирует сРНК для гена белка оболочки. Субгеномная РНК кепируется вирусной метилтрансферазой, как и геномные РНК. Некоторые элементы субгеномного промотора у BMV и альфавирусов животных содержат сходные последовательности, указывающие на их эволюционное родство. Более того, репликаза BMV спо-

собна инициировать синтез (+)РНК на субгеномном промоторе SINV, хотя и с низкой эффективностью.

Вирус мозаики люцерны: вариация на тему инициации репликации. Вирус мозаики люцерны (AIMV) имеет трехкомпонентный геном, организация которого идентична таковой у BMV. Есть и существенное функциональное отличие: смесь геномных РНК-1, РНК-2 и РНК-3 AIMV неинфекционна. Инфекционность восстанавливается в присутствии свободного белка оболочки (CP) AIMV: CP специфически связывается с 3'-НТО РНК и активирует трансляцию.

Согласно одной из моделей инициации репликации AIMV, элементы вторичной структуры в 3'-НТО геномных РНК существуют в двух конформациях, «CPB» (CP-binding) и «TLS» (отдаленно напоминающей TLS бромовирусов). Конформация CPB представляет собой несколько шпилек, разделенных AUGC-повторами (рис. 26). Белок оболочки узнает CPB, что способствует циклизации РНК (формируется «мостик» CP – факторы инициации eIF4G/eIF4E – 5'-кеп) и включает трансляцию.

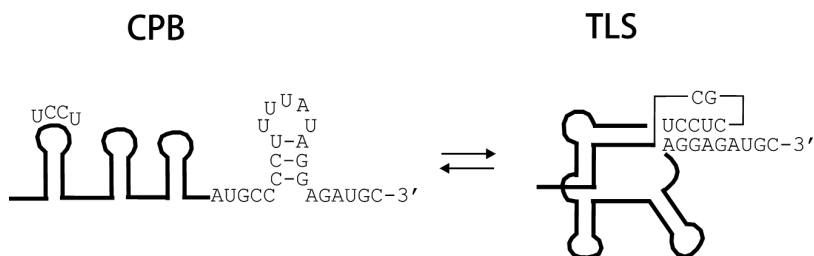


Рис. 26. 3'-концевая последовательность геномных РНК AIMV существует в двух конформациях, которые работают как «рибопереклюатель». Конформация CPB узнается белком оболочки вируса, и это взаимодействие активирует трансляцию. Конформация TLS является *cis*-сигналом для репликативного комплекса.

Конформация TLS представляет собой альтернативную третичную структуру с псевдоузлом, которая способна взаимодействовать с СТР-АТР нуклеотидил-трансферазой и с вирусной репликазой 1a/2a, но не с CP. Таким образом, TLS структура в РНК AIMV может служить главным промотором инициации синтеза (–)цепи, подобным *cis*-2 BMV.

Внутриклеточные сайты репликации. Репликацию и транскрипцию РНК бромовируса изучали в искусственной системе, дрожжах *Saccharomyces cerevisia*. Поскольку генетика дрожжей изучена доста-

точно основательно, и имеются коллекции разнообразных мутантов, такая система имеет очевидные преимущества. Ее использование позволило установить, в какой последовательности взаимодействуют между собой белки BMV и клеточные белки, принимающие участие в репликации. Было показано, что клеточные белки ретикулоны (Rtn, продукты дрожжевых генов *Rtn1*, *Rtn2* и *Yop1*), десатураза жирных кислот и ряд других клеточных белков участвуют в формировании сайтов репликации бромовирусной РНК.

Репликация BMV сопровождается включением репликативных комплексов в состав сферул, индуцируемых мембранных везикул диаметром ~70 нм. Заякоривание на мембране эндоплазматического ретикулула и индукция образования сферул осуществляются при участии белка 1a (MTR-HEL). По некоторым данным, «нацеливание» 1a BMV на мембраны ЭР осуществляется посредством белков комплекса COPII. Дальнейшее формирование сферул зависит от рекрутируемых белком 1a ретикулонов (Rtn) и белков комплекса ESCRTIII. В дрожжевых клетках, мутантных по одному из трех белков Rtn, белок 1a связывается с мембранами и формирует везикулы, но их диаметр примерно в два раза меньше, чем в клетках дикого типа. Мутанты дрожжей по всем трем белкам Rtn неспособны поддерживать репликацию вируса, и вирус-специфические везикулы в них не формируются. Другим важным условием образования везикул является поддержание текучести мембран (membrane fluidity), которое обеспечивается десатуразой жирных кислот.

Последовательность событий при формировании сайтов репликации бромовируса можно себе представить следующим образом (рис. 27). Белок 1a, за счет амфипатического альфа-спирального участка, присоединяется к поверхности мембраны ЭР и рекрутирует белки ESCRTIII (рис. 27A) (а также РНК полимеразу 2a и геномные РНК, которые не показаны на схеме). ESCRTIII формируют концентрические кольца, вызывающие изгибание мембраны (рис. 27A) и смыкание горлышка сферулы (рис. 27B). Затем 1a привлекает ретикулоны, которые поддерживают структуру горлышка и внутренней поверхности сферулы (рис. 27C). АТРаза Vps4p за счет энергии АТФ «разбирает» комплексы ESCRTIII, заканчивая формирование стабильной сферулы, внутреннюю поверхность которой выстилают несколько сотен молекул 1a (рис. 27D).

Синтез (–) и (+)РНК происходит внутри сферул с последующим экспортом (+)цепей в цитоплазму через горлышко.

Кроме того, обнаружена связь репликации BMV с мембранными Р-тельцами (processing bodies). В незараженной клетке Р-тельца аккумулируют мРНК, которые либо подвергаются деградации, либо хранятся в интактном состоянии и затем снова вовлекаются в трансляцию. Белки Р-телец (Lsm1, Lsm6, Lsm7, Pat1p и Dhh1p) участвуют как

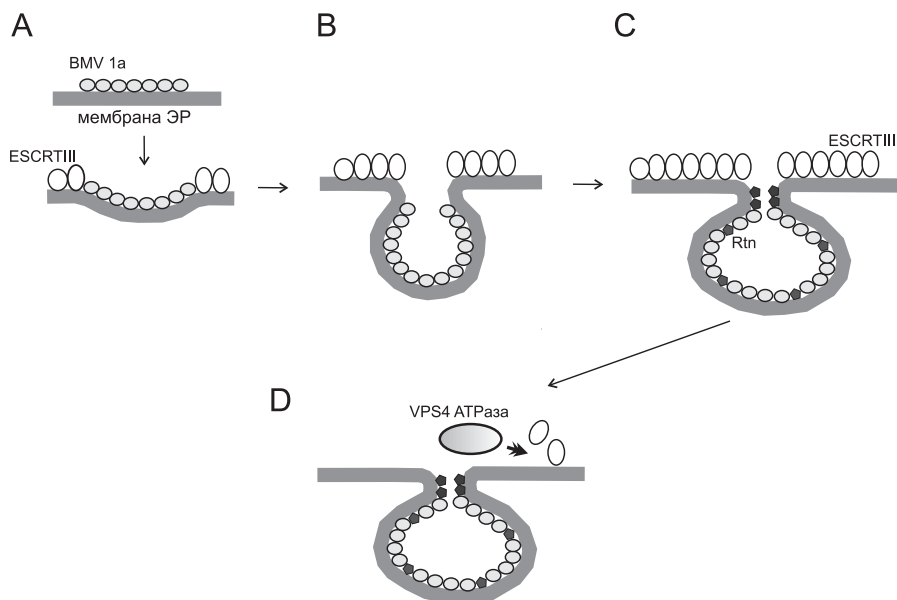


Рис. 27. Схема образования сайтов репликации бромовируса (сферул). А — белок 1a мультимеризуется на мембране эндоплазматического ретикулума, вызывает инвагинацию мембраны и привлекает белки ESCRTIII (светлые овалы). В — комплекс ESCRTIII формирует концентрические спиральные структуры, сжимающие края мембранного кольца и формирующие горлышко сферулы. С — 1a привлекает ретикулоны (затемненные многоугольники), стабилизирующие структуру сферулы и горлышка. D — АТРаза Vps4p вызывает диссоциацию комплекса ESCRTIII.

в трансляции вирусных РНК, так и в переключении с трансляции на репликацию. Гетерогептамерные комплексы Lsm1-Lsm6-Lsm-7 специфически взаимодействуют с TLS в РНК-1, РНК-2 и РНК-3 BMV и, дополнительно, с внутренними аденозин-богатыми участками в РНК-3. Определенная фракция Р-тельцев находится на мембранах эндоплазматического ретикулума в непосредственной близости от сайтов репликации бромовирусов. На основании этих данных было высказано предположение, что геномные РНК бромовируса сначала накапливаются в Р-тельцах, а затем переходят в мембранные везикулы. Согласно другим данным, комплекс Lsm белков влияет на трансляцию РНК BMV и на переключение с трансляции на репликацию, причем первый процесс связан с РНК-связывающей активностью Lsm комплекса, а второй осуществляется вне зависимости от этой активности.

Р-тельца и входящие в их состав белки универсальны для клеток растений и животных. По-видимому, сходный механизм с участием Lsm1–7 регулирует трансляцию и репликацию РНК вируса гепатита С и нидо-вирусов. Более того, Lsm1 гомологичен прокариотическому белку HFQ, фактору репликации бактериофага Q β (глава 4.1.1). Таким образом, белки, консервативные у прокариот и эукариот, оказываются вовлечены в репликацию (+)РНК бактериофагов и вирусов растений и животных. Можно допустить, что связь Lsm-подобных белков с репликацией и трансляцией (+)РНК геномов является неким «древним» и универсальным свойством.

4.4. Флавивирусы и вирус гепатита С

Вступительные замечания. Семейство *Flaviviridae* (от лат. *flavus*, желтый) включает около 70 представителей, в том числе собственно флавивирусы (вирус желтой лихорадки, вирус клещевого энцефалита, вирус западного Нила, вирус лихорадки Денге, вирус Зика), пестивирусы (вирус бычьей диареи, вирус классической лихорадки свиней) и вирус гепатита С. Представители рода *Flavivirus* переносятся комарами и клещами; некоторые из них не имеют естественного вектора. Многие из них представляют собой серьезную эпидемиологическую угрозу, и более половины человеческой популяции на Земле является мишенью по крайней мере для одного флавивируса. Вирус гепатита С (род *Hepacivirus*) вызывает хронические инфекции печени у человека, приводящие к гепатокарциноме и циррозу (170 млн. случаев заболеваний по всему миру). Икосаэдрические частицы представителей *Flaviviridae* имеют диаметр 40–50 нм и состоят из внутреннего нуклеопротеида, окруженного наружной мембраной. Вирусы реплицируются в цитоплазме. Репликация сопровождается преобразованием клеточных мембран в специфические везикулярные структуры, служащие местом сборки репликативных комплексов и синтеза РНК.

4.4.1. Флавивирусы

Особенности генома флавивирусов. Геном представителей рода *Flavivirus* представлен кепированной РНК (~11 000 нт), не содержащей 3'-концевой поли(А)-последовательности. 5'-концевая и 3'-концевая НТО (длиной ~100 нт и 350–700 нт, соответственно) фланкируют единую ORF, трансляция которой приводит к образованию полипротеина-предшественника (рис. 28). Полипротеин разрезается клеточными сиг-

нальными пептидазами и вирусной сериновой протеиназой NS3 на зрелые структурные и неструктурные белки.

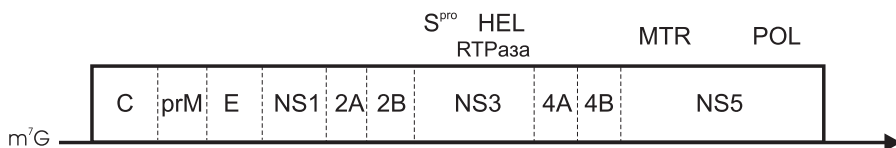


Рис. 28. Схематическое изображение структуры генома флавивирусов. Сайты разрезания полипротеина показаны пунктиром. Закодированные структурные белки: С — белок нуклеокапсида; prM — предшественник мембранного белка; E — гликопротеин наружной мембраны; неструктурные белки — NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. Основные консервативные домены в неструктурных белках: S^{Pro} — химо трипсин-подобная сериновая протеиназа; HEL — NTPаза/РНК хеликаза; RTPаза — гамма-фосфатаза (трифосфатаза) РНК; MTR — метилтрансфераза; POL — РНК-полимераза.

Ферментативный аппарат репликации. По-видимому, все неструктурные белки флавивирусов вовлечены в работу репликативных комплексов, хотя некоторые из них могут также выполнять функции, связанные с подавлением врожденного иммунитета, сборкой частиц и их переносом насекомыми-векторами.

NS1 — высококонсервативный гликопротеин, который в виде димера обнаруживается в составе мембрано-ассоциированных репликативных комплексов, а в виде гексамера — на внешней мембране зараженных клеток млекопитающих. NS1 необходим для синтеза вирусной РНК, однако его биохимические активности неизвестны. По-видимому, этот белок взаимодействует с другими неструктурными белками и способствует сборке активной репликазы флавивирусов. В частности, NS1 контактирует с NS4B, стабилизируя положение трансмембранного N-концевого домена NS4B в люмене ЭР, что способствует репликации РНК. NS1 участвует в ремоделировании мембран ЭР и создании сайтов репликации. Кроме того, NS1 колокализуется в клетке с 36 клеточными белками. Некоторые из этих контактов могут быть существенны для вирусной репликации, например, взаимодействие NS1 с белками гетерогенных ядерных нуклеопротеинов (hnRNP C1, C2 и K) и глицеральдегид-фосфатдегидрогеназой (GAPDH).

NS2A — небольшой гидрофобный трансмембранный белок. Для некоторых флавивирусов была показана способность NS2A прочно связываться с 3'-концом геномной РНК и вступать в специфические взаимодействия с белками NS3 (S^{Pro}-HEL) и NS5 (POL). Кроме того, NS2A

способен индуцировать изменения клеточных мембран и способствовать сборке вирусных частиц на поздних стадиях инфекции.

NS2B является кофактором вирусной протеиназы NS3.

NS3 содержит на N-конце домен химотрипсин-подобной сериновой протеиназы. Протеиназа S^{Pro} в составе NS3 осуществляет, при содействии кофактора NS2B, котрансляционное и посттрансляционное разрезание полипротеина по всем сайтам, кроме сайтов, фланкирующих белок E, которые процессируются сигнальными пептидазами клетки. На С-конце NS3 находятся домены НТРазы/РНК хеликазы и РНК-гамма-фосфатазы (РТРазы). РТРаза является компонентом кеппирующей системы флавивируса, осуществляющим отщепление гамма-фосфата от 5'-конца (+)РНК (т.е. реакцию pppA-РНК – ppA-РНК). NS3 взаимодействует с РНК полимеразой NS5 и привлекает ее в мембранные сайты репликации.

NS4A и NS4B представляют собой небольшие гидрофобные белки, выполняющие (вместе с NS1) функции ремоделирования мембран. Кроме того, эти белки входят в состав репликативных комплексов, где регулируют функции других неструктурных белков. Например, NS4A и NS4B являются аллостерическими кофакторами NS3, которые влияют на протеиназную, РНК-связывающую и РНК-хеликазную активности этого белка. В частности, было обнаружено, что NS4A снижает потребность NS3 хеликазы в АТФ, а NS4B способствует расплетанию цепей РНК.

NS5 содержит в N-концевой части домены метилтрансферазы/гуанилилтрансферазы (МТР) и 2'-О-метилены (2'-О-МТ), а в С-концевой — консервативный домен POL. Соответственно, этот белок выполняет функции кепп-синтезирующего белка и РНК-полимеразы. МТР флавивирусов, подобно клеточным кепп-синтезирующим ферментам, сначала присоединяет остаток гуанозина к РНК, а затем метилирует его. МТР флавивирусов и МТР альфа-подобных вирусов (см. главу 4.3) не родственны между собой и используют разные механизмы метилирования. 2'-О-МТ NS5 метилирует второй с 5'-конца нуклеотид по 2'-О-положению рибозы (m⁷GpppA...– m⁷GpppAm...)

Cis-элементы, циклизация молекул геномной РНК и синтез (–)РНК. В 5'-НТО генома флавивирусов находится консервативная шпильчатая структура, обозначаемая как 5'-SL (*cis*-1) (рис. 29). РНК-полимераза NS5 обладает высоким сродством к *cis*-1, которая, очевидно, является первым *цис*-сигналом, узнаваемым при синтезе (–)цепи. Небольшие делеции в *cis*-1 лишают вирус жизнеспособности. Точечные мутации, нарушающие вторичную структуру *cis*-1, не блокируют репликацию полностью, и в потомстве таких мутантов обнаруживаются компенсаторные мутации, восстанавливающие вторичную структуру *cis*-1. Есте-

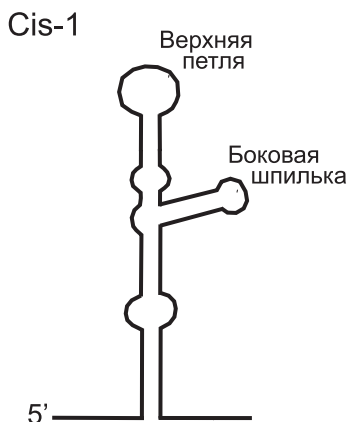


Рис. 29. Структура консервативной шпильки 5'-SL (*cis*-1) в 5'-НТО генома флавивирусов.

ственные шпильчатые участки *cis*-1 можно заменить на «чужеродные», но сохраняющие топологию этого участка РНК, и мутантный геном при этом сохраняет способность реплицироваться. При этом консервативная последовательность нуклеотидов в верхней петле (top-loop) *cis*-1 должна оставаться неизменной. Она необходима для узнавания белком NS5 и успешной репликации.

Высказывалось предположение, что присоединение репликативного комплекса к *cis*-1 блокирует трансляцию и делает молекулу геномной РНК компетентной матрицей для репликации. Необходимым условием репликации является циклизация геномной РНК и образование структур «ручки сковороды» (panhandle). Циклизация достигается взаимодействием двух пар комплементарных участков на 5'- и 3'-конце РНК (А-а и В-в, рис. 30). Элементы этих участков РНК входят в состав 5'- и 3'-концевых шпилек (5' SL и 3' SL), которые при циклизации подвергаются перестройке. Существенно, что именно вторичная структура, создаваемая взаимодействием А-а и В-в, а не последовательность этих участков, важна для инициации репликации. Компенсаторные замены в А-а и В-в, сохраняющие их способность к комплементарным взаимодействиям, не сказываются на активности репликации мутантных вирусов. Постулируется, что после циклизации РНК-полимераза перемещается на 3'-конец (+)цепи и начинает синтез комплементарной цепи РНК (рис. 30). Было бы естественным допустить, что 3'-концевая часть молекулы РНК содержит главный промотор синтеза антигеномной цепи (участок РНК с высоким сродством к репликазе), однако этот вопрос остается открытым. По данным рентгеноструктурного анализа, матричный канал РНК-полимеразы NS5 способен вместить только одонитевую РНК. При взаимодействии полимеразы с 3'-концом (+)РНК

должно происходить плавление дуплексных участков. По-видимому, в этом процессе участвует белок NS3 с предсказанной хеликазной активностью или дополнительные хозяйские факторы, входящие в состав репликативного комплекса.

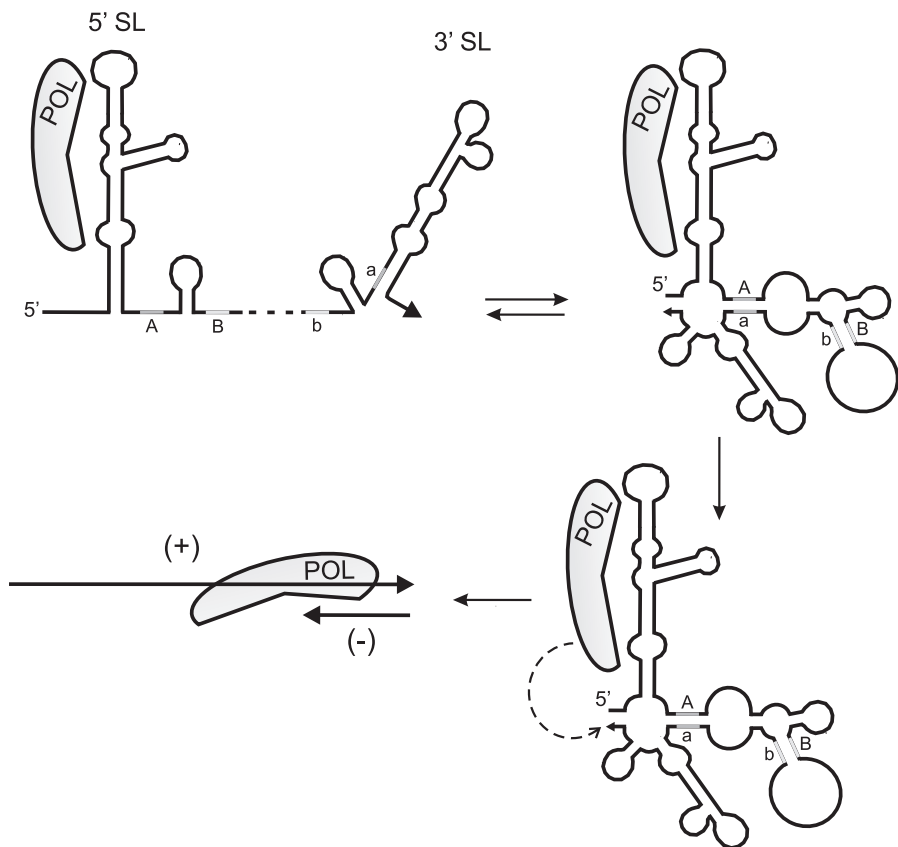


Рис. 30. Модель инициации синтеза (-)цепи у флавивирусов. На концах молекулы геномной РНК имеются консервативные шпилечные структуры 5' SL и 3' SL. РНК-полимераза специфически взаимодействует с 5' SL (*cis*-1). Циклизация РНК происходит за счет спаривания комплементарных участков А:а и В:б. РНК-полимераза узнает 3'-конец матричной цепи и начинает синтез комплементарной (-)цепи РНК.

Расположение репликативных *cis*-сигналов в молекуле (-)РНК и другие детали, относящиеся к механизму синтеза дочерних (+)РНК флавивирусов, неизвестны.

Цитология репликации. NS1, NS2A, NS4A и NS4B флавивирусов являются ключевыми «игроками», вызывающими модификации мембран ЭР и организующими репликативный комплекс. В результате ремоделирования мембран индуцируется несколько типов мембранных структур. По-видимому, основными сайтами репликации являются «везикулярные мешки» (vesicle packets, VP), которые построены из гладких мембран и представляют собой кластеры везикул (диаметром 50–100 нм), окруженных общей мембраной. Основные маркеры репликации — дцРНК, растущие цепи РНК, неструктурные белки — обнаруживаются именно в этих структурах. По некоторым данным, по крайней мере часть ремоделированных мембран в клетках, зараженных флавивирусами, представляют собой инвагинации в люмен ЭР, напоминающие сферулы (см. главу 4.3).

4.4.2. Вирус гепатита С

Структура генома. Геном вируса гепатита С (HCV; род *Hepacivirus*, сем. *Flaviviridae*) представлен молекулой РНК (~9600 нт), которая лишена концевых структур, типичных для многих других вирусов с (+) РНК-геномом: кепа, VPg и поли(A). 5'-НТО (~340 нт) содержит IRES, обеспечивающий кеп-независимую инициацию трансляции. В 3'-концевой НТО (~270 нт) выделяют три участка: варибельный район, следующий за стоп-кодоном ORF, внутренний поли(U) участок (~80 нт) и консервативный гетерополимерный 3'-концевой участок (так называемый «Х-хвост», 92 нт). 5'- и 3'-концевые НТО в высокой степени структурированы и содержат протяженные участки, первичная и вторичная структура которых консервативна у изолятов HCV.

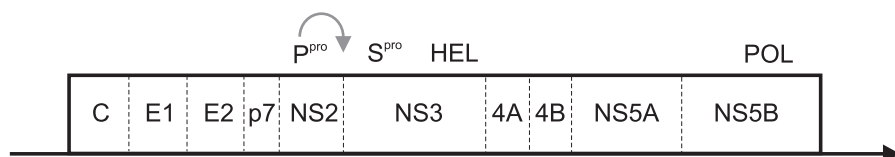


Рис. 31. Схематическое изображение генома вируса гепатита С. Сайты разреза полипротеина показаны вертикальными пунктирными отрезками. С — белок нуклеокапсид; E1, E2 — гликопротеины наружной мембраны; p7 — трансмембранный белок; NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B, неструктурные белки, участвующие в репликации. Обозначения консервативных доменов в белках: P^{pro} — папаин-подобная цистеиновая протеиназа; S^{pro} — химотрипсин-подобная сериновая протеиназа; HEL — NTPаза/хеликаза; POL — РНК полимераза.

Структурные и неструктурные белки HCV закодированы в единой ORF, трансляция которой приводит к образованию полипротеина-предшественника, состоящего из ~3000 аминокислотных остатков (рис. 31). Полипротеин разрезается клеточными и вирусными протеиназами с образованием интермедиатов и зрелых белков. Разрезание по сайтам C/E1, E1/E2, E2/p7 и p7/NS2 осуществляется клеточными протеиназами (сигнальными пептидазами), NS2/3 — цистеиновой протеиназой NS2, все остальные сайты «неструктурной области» — сериновой протеиназой NS3 (рис. 31).

Ферментативный аппарат репликации. Неструктурные белки HCV (кроме малого гидрофобного белка p7) имеют отношение к репликации РНК.

NS2 несет консервативный домен папаин-подобной цистеиновой протеиназы, расщепляющий полипротеин по сайту NS2/NS3 (рис. 31). Это расщепление необходимо для репликации вируса *in vivo*. NS2 обладает выраженными гидрофобными свойствами и способен прикрепляться к мембранам эндоплазматического ретикула. По другим данным, связь NS2 с мембранами определяет созревание и отпочковывание частиц вируса, и может иметь лишь косвенное отношение собственно к синтезу вирусных РНК.

NS3 содержит домены сериновой протеиназы и NTPазы/РНК-хеликазы, расположенные, соответственно, в N-концевом и С-концевом участках белка. Помимо функций, связанных с репликацией и процессингом полипротеина, NS3 участвует в подавлении защитных механизмов клетки, расщепляя некоторые белковые компоненты системы врожденного иммунитета клетки. РНК-хеликазная активность С-концевого домена NS3 была доказана экспериментально. NS3 способен расплетать дуплексы РНК и ДНК, причем реакция осуществляется прерывисто, с паузой после разделения каждого участка из трех пар остатков. Кроме того, NS3 (вместе с NS5A) обладает способностью связываться с микротрубочками и актиновыми филаментами, возможно, способствуя транслокации белков репликативного комплекса внутри клетки.

NS4A — небольшой белок (54 аминокислоты), направляющий NS3 в мембраны и являющийся кофактором его протеиназной активности.

NS4B — гидрофобный интегральный мембранный белок, локализуемый в эндоплазматическом ретикуле и способствующий созданию вирусных репликативных «фабрик».

NS5A — фосфопротеин и металлопротеин, имеющий Zn-связывающий домен и обладающий РНК-связывающими свойствами. Этот белок может взаимодействовать со многими клеточными белками, потенциальными партнерами вирусной репликации — микротрубочками, актиновыми филаментами, циклофилином А (CypA), аполипопротеином Е (ApoE), ассо-

цированным с везикулами белком А (VAPA) и другими. Прикрепление NS5A к мембранам обеспечивается амфипатической альфа-спиралью, расположенной на N-конце белка. Фосфорилирование NS5A влияет на уровень репликации вирусной РНК. Рентгеноструктурный анализ димера цинк-связывающего домена NS5A выявил «бороздку» из положительно заряженных аминокислот, экспонированную в цитозоль. Эта структура, по-видимому, играет роль РНК-связывающего сайта, регулирующего положение матричной цепи РНК в репликативном комплексе.

NS5B содержит консервативный домен POL и выполняет функции РНК-полимеразы. Этот белок также способен самостоятельно прикрепляться к мембранам посредством С-концевого трансмембранного домена.

Таким образом, все репликативные неструктурные белки HCV могут заякориваться в мембранах — либо напрямую (NS2, NS4B, NS5A и NS5B), либо с помощью белка-партнера (NS3-NS4A). В синтезе вирусной РНК принимают участие также некоторые клеточные белки, взаимодействующие с РНК и неструктурными белками HCV. Например, белковые факторы Lsm1-7 и РТВ участвуют в трансляции РНК HCV и в переключении с трансляции на репликацию РНК (см. главу 4.3.2). По некоторым данным, клеточная хеликаза DDX6 влияет на репликацию вируса. Однако, DDX6 не колокализуется с вирусными неструктурными белками и обладает плеiotропным действием в клетках. Вопрос о том, прямо или косвенно этот белок влияет на репликацию HCV, остается открытым.

Cis-элементы генома. В 5'-НТО генома HCV (~125 нт) есть две шпильчатые структуры, I и II (вместе составляющие *cis*-1; рис. 32), мутации которых блокируют репликацию. Введение компенсаторных замен, изменяющих последовательность, но поддерживающих структуру шпилек, восстанавливает репликативную активность. Интересно, что шпилька II является частью IRES элемента HCV, и таким образом в данной системе существует функциональное перекрытие сигналов, занятых в трансляции и репликации. Высказывалось предположение, что шпилька II может выполнять функцию «рибопереключателя» между процессами трансляции и репликации.

Другой регуляторный элемент, шпилька с двумя петлями (*cis*-2), расположен в кодирующей области NS5B (рис. 32).

Третий элемент, *cis*-3, находится в 3'-НТО и включает поли(U) (не менее 26 остатков) и «Х-хвост», несущий три шпильчатых структуры (рис. 32).

Между петлями *cis*-2 и участками РНК, находящимися выше и ниже в матричной цепи, осуществляется дальнейшее третичное взаимодействие (рис. 32). При этом создается сложная структура с псевдоузлами и «целующимися шпильками», необходимая для инициации синтеза (–)цепи РНК. Вирусная репликаза узнает этот сигнал, а затем устанавливает кон-

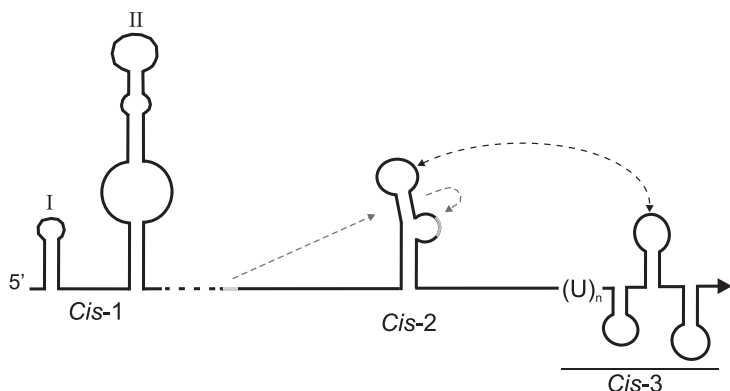


Рис. 32. Схематическое изображение репликативных *cis*-сигналов и взаимодействий между ними, на карте генома HCV. Сигнал *cis-1* включает шпильки I и II (последняя также входит в состав IRES). *Cis-2* представлен шпилькой с выпетливанием, которая образует сложный псевдоузел за счет взаимодействия комплементарных последовательностей (серые отрезки в выпетливании и вышележащем участке РНК) и «целующихся шпилек». *Cis-3* состоит из поли(U) и трех шпилек в 3'-концевой UTR.

такт с 3'-концом геномной РНК. По-видимому, это не единственное условие успешной инициации синтеза РНК. Вполне вероятно, что 5'-*cis-1* и 3'-*cis-3* взаимодействуют друг с другом, создавая циклическую форму геномной РНК, компетентную для репликации.

Цис-сигналы, обеспечивающие синтез дочерних (+)цепей, неизвестны.

Инициация и элонгация синтеза (–)цепи. Существенный прогресс в понимании инициации синтеза комплементарной цепи РНК HCV был достигнут в результате рентгеноструктурного анализа комплексов РНК полимеразы, РНК и гНТФ субстрата. Было установлено, что молекула РНК полимеразы NS5B до присоединения РНК и субстрата находится в «закрытой» конформации («аро form»), когда РНК-связывающая бороздка занята С-концевым участком и бета-петлей молекулы NS5B. Контакт с матричной цепью РНК вызывает перестройку (частичное «раскрытие») молекулы РНК полимеразы (рис. 33). Включение первых двух остатков гуанозина в (–)цепь происходит медленно. Синтез динуклеотидной затравки вызывает дальнейшие конформационные изменения РНК полимеразы — РНК-связывающая бороздка в молекуле фермента полностью открывается, и РНК полимеразы переходит в состояние, компетентное для процессивной элонгации синтеза (–)цепи (рис. 33).

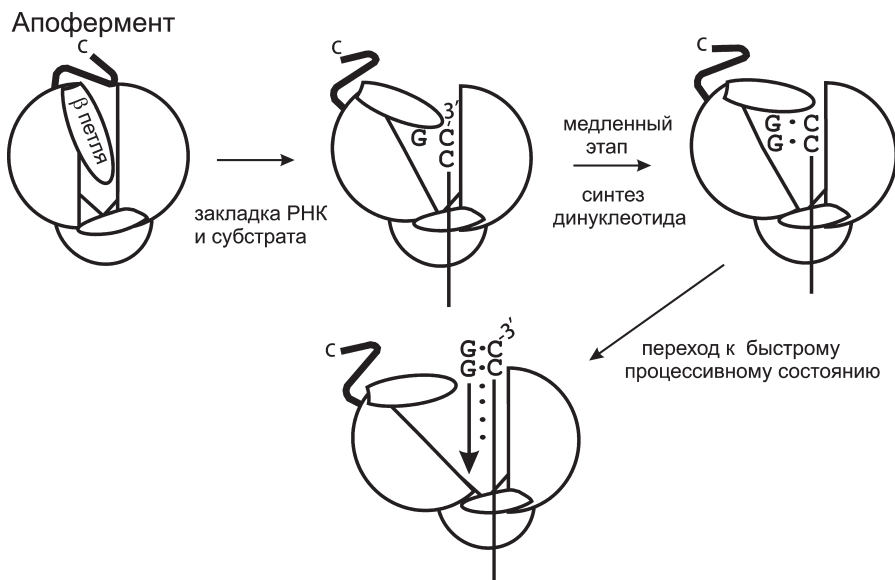


Рис. 33. Модель инициации синтеза (–)цепи РНК HCV.

Цитология репликации. Репликация HCV сопровождается преобразованием мембран эндоплазматического ретикулума и формированием так называемой «мембранной сети» (membrane web), состоящей из скоплений везикул, погруженных в мембранный матрикс. Эти везикулы содержат вирусные РНК, вирусные неструктурные белки и некоторые клеточные белки. Более детальное изучение мембранных сетей с помощью электронно-микроскопической томографии и конфокальной микроскопии показало, что их основными компонентами являются двуслойные мембранные везикулы (DMV), образованные из мембран ЭР под действием NS4A. DMV выступают в цитоплазму и часто соединены с ЭР узким каналом. Перестройка клеточных мембран, индуцируемая NS4B, создает минорную фракцию однослойных мембранных везикул. По-видимому, создание нативной мембранной сети требует взаимодействия всех компонентов репликазы HCV (NS3-5B) и клеточных белков-партнеров, например циклофилина А (CypA) и белка-2, связывающего пролин-серин-треонин фосфатазу (PSTIP2). Другая важная детерминанта биогенеза мембранных сетей HCV — локальный состав липидов, в частности, высокое содержание фосфатидил-инозитол-4-фосфата (PI4P) и холестерина в «точках роста» сайтов репликации. Интересно, что при вирусной инфекции липидкиназа PI4KIIIa, продуцирующая PI4P, переходит из аппарата Гольджи и плазматической мем-

браны (мест «постоянной дислокации» фермента в здоровой клетке) к сайтам возникновения DMV. Более того, переносу киназы способствуют вирусные белки NS5A и NS5B.

4.5. Томбусвирусы и диантовirusы

Вступительные замечания. Сем. *Tombusviridae* (включающее 13 родов, в том числе *Tombusvirus*, *Dianthovirus*, *Necrovirus* и *Carmovirus*), объединяет (+)РНК вирусы растений с мелкими икосаэдрическими частицами (диаметром 28–34 нм), не имеющие естественных векторов и размножающиеся в цитоплазме клеток растений. Представители семейства имеют компактные (+)РНК геномы (4.5–4.8 kb), не содержащие кеп-структуры, поли(А) или TLS. Трансляция РНК зависит от 3'-CITE (cap-independent translational enhancer), привлекающего факторы инициации или рибосомальные субчастицы. Репликаза лишена доменов MTR и HEL. Домен POL показывает лишь отдаленное сходство с эквивалентными доменами РНК полимераз пикорна-подобных и альфа-подобных вирусов, и более близкое — с полимеразами флавириусов.

4.5.1. Томбусвирусы

Особенности генома томбусвирусов. Однокомпонентный геном вируса кустистой карликовости томатов (TBSV, *Tombusvirus*) содержит ORF1 и ORF2 (кодирующие репликативные белки), ORF3 (белок оболочки) и перекрывающиеся ORF4 (белок межклеточного транспорта) и ORF5 (белок, участвующий во флоэмном транспорте и подавлении защитных реакций растения-хозяина) (рис. 34). Экспрессия ORF3 и ORF4/ORF5 происходит посредством сгРНК-1 и сгРНК-2.

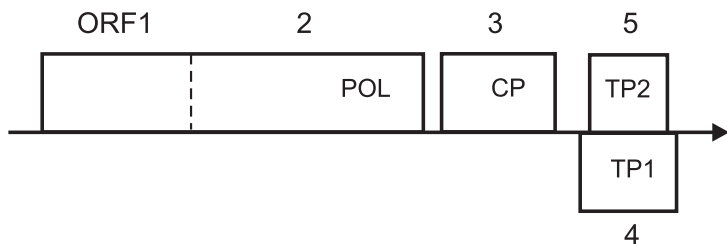


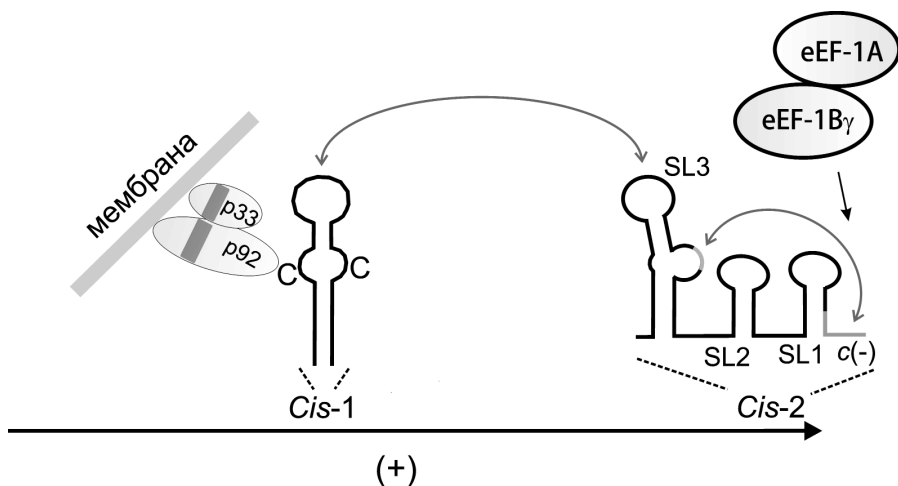
Рис. 34. Структура РНК генома TBSV. Вертикальный пунктирный отрезок, слабый стоп-кодон; CP — белок оболочки; TP1 — белок межклеточного транспорта; TP2 — белок дальнего (флоэмного) транспорта и репрессор сайленсинга.

Ферментативный аппарат репликации. Трансляция ORF1 и ORF2, разделенных слабым терминирующим кодоном UAG, приводит к синтезу р33 и р92 белков в соотношении 20:1. N-концевая область р33 и р92 содержит мембрано-связывающий домен, ближе к С-концу расположен домен димеризации, определяющий образование комплексов р33:р33 и р33:р92. На С-конце р92 расположен домен РНК полимеразы. В репликативный аппарат TBSV входят клеточные факторы элонгации eEF-1A и eEF-1B-гамма. Синтезу вирусной РНК ассистируют еще несколько клеточных белков, в том числе GAPDH и хеликазы разных классов.

Cis-элементы. Репликация генома томбусвирусов требует специфических дистальных взаимодействий *цис*-элементов РНК генома, которые обозначены здесь как *cis-1*, *cis-2*, *cis-3* и *cis-4* (в литературе — RI, RII, RIII и RIV, соответственно). Транскрипция (синтез сгРНК-1 и сгРНК-2) определяется взаимодействием нескольких комплементарных *цис*-элементов, так называемых активаторов (A) и рецепторов (R). Структура и взаимодействие *цис*-сигналов подробно рассмотрены ниже.

Синтез (–)цепи РНК. Основными сигналами, обеспечивающими синтез (–)цепи, являются *cis-1* и *cis-2* в составе геномной РНК (рис. 35). Димеры белков р33:р33 и р33:р92 узнают неспаренные остатки цитозина в стебле шпильки *cis-1*, расположенной в последовательности ORF2, после чего комплекс репликаза–РНК прикрепляется к клеточным мембранам (рис. 35). Таким образом, происходит изъятие (+)РНК томбусвируса из пула транслируемых мРНК и ее вовлечение в репликацию. Одновременно происходит встраивание в мембраны р33:р33 и р33:р92 за счет гидрофобного домена на N-конце белков. В ремоделировании мембран участвуют клеточные белки, в частности, ESCRT-I и ESCRT-III (см. главу 4.3.2), и уже на ранней стадии репликации начинается построение вирусных «фабрик».

Критическим условием для инициации репликации является синергическое действие *cis-1* и *cis-2*. Между комплементарными участками в петлях шпилек *cis-1* и SL3 осуществляется дальнейшее взаимодействие, и происходит частичная циклизация молекулы РНК (рис. 35). Когда *cis-1* и *cis-2* сближены, репликаза может «дотянуться» до главного промотора с(–) и инициировать синтез антигеномной цепи. Плотная третичная структура 3'-конца геномной РНК «раскрывается» присоединением фактора элонгации eEF-1B-гамма. Комплекс eEF-1A и eEF-1B-гамма обеспечивает правильное положение репликативного комплекса на промоторе синтеза (–)цепи.



Сигнал *cis-2* содержит дополнительные элементы, регулирующие синтез (–)цепи РНК. Комплементарное взаимодействие между главным промотором синтеза негативной цепи с(–) и выпетливанием на шпильке SL3, так называемым сайленсером («глушителем»), приводит к снижению уровня инициации синтеза (–)цепи. Дополнительным фактором «понижающей регуляции» синтеза (–)цепей в системе TBSV является клеточный белок GAPDH, который специфически взаимодействует с AU-богатым участком на 3'-конце (–)цепи РНК TBSV. Удаление AU-богатого участка РНК или использование хозяйских клеток, мутантных по GAPDH, приводит к синтезу (–) и (+)цепей РНК TBSV в соотношении 1:1 (при нормальном соотношении 1:20), однако механизм действия GAPDH на вирусную репликацию неизвестен.

При вирусной инфекции всегда требуется ограниченное число копий антигеномной РНК, и во всех исследованных системах реализуется асимметричный синтез (+) и (–)цепей РНК. Однако, система TBSV представляет собой единственный известный пример использования

«специальных средств», чтобы понизить уровень синтеза антигенной цепи. Скорее всего, это необходимо на уровне вторичной репликации, когда дочерние (+)РНК вовлекаются в повторный синтез РНК.

Синтез (+)цепей РНК томбусвируса. Сигналы *cis-3* и *cis-4* в (–)цепи также действуют синергически при синтезе (+)цепи. Двухцепочечная RF частично расплетается с обоих концов при участии клеточных хеликаз. Участок RF, содержащий *cis-3*, расплетается DDX3-подобными хеликазами (AtRH20/Ded1p), а участок *cis-4* — DEAD-box хеликазами (eIF4AIII и DDX5) (рис. 36). По-видимому, взаимодействие *cis-3* и *cis-4* осуществляется посредством РНК-полимеразы, имеющей сродство к главному промотору синтеза (+)цепи, *c*(+), и линейному участку *cis-4* (рис. 36). Формируется циркулярная структура, в которой (–)цепь будет служить матрицей для синтеза (+)цепей.

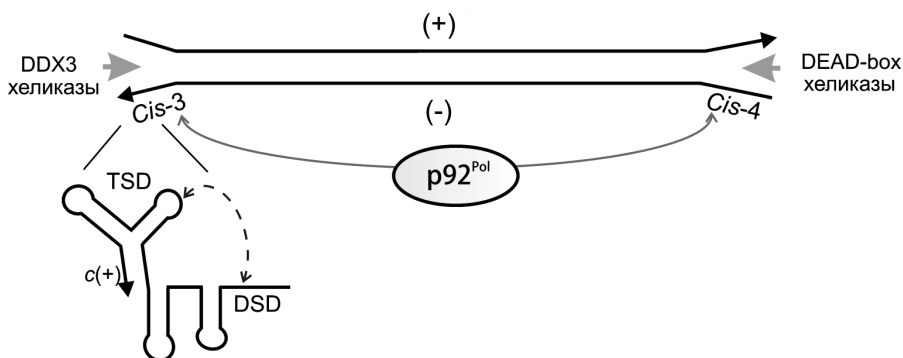


Рис. 36. Схема РНК-РНК и РНК-белковых взаимодействий при инициации синтеза (+)цепей РНК томбусвируса. Концы RF частично расплетаются DDX3 и DEAD box хеликазами клетки. РНК полимеразы p92 взаимодействует с сигналами *cis-3* и *cis-4* в составе негативной цепи РНК, приводя к циклизации RF. Сигнал *cis-3* содержит главный промотор синтеза позитивных цепей, *c*(+), и регуляторный элемент РНК, состоящий из доменов TSD и DSD. Между петлями шпильки TSD и линейным участком DSD (отмечены пунктирной линией со стрелками) осуществляется комплементарное взаимодействие. Образуется псевдоузел, служащий для «повышающей регуляции» синтеза дочерних (+)РНК.

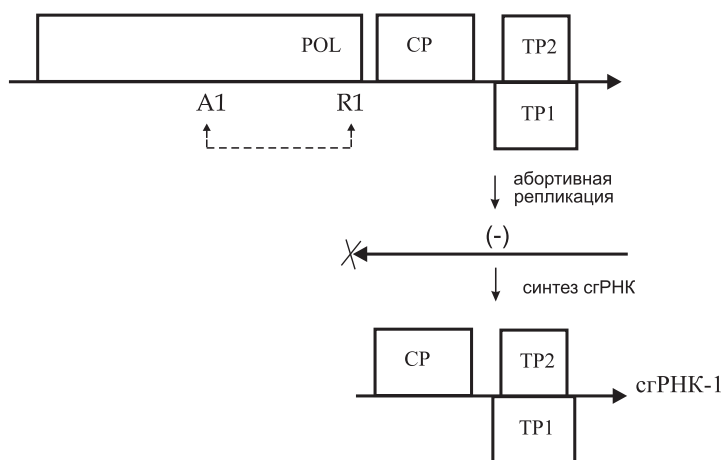
Еще один регуляторный элемент расположен на 3'-конце антигенной РНК. В него входят Т-образный шпильчатый домен TSD (T-shaped domain) и домен DSD (downstream domain). Комплементарное взаимодействие между петлями одной из шпилек TSD и линейным участком DSD необходимо для оптимальной репликации (рис. 36).

Транскрипция генома TBSV также зависит от специфических комплементарных *cis*-взаимодействий в молекуле (+)РНК. Синтез сгРНК-1 и сгРНК-2 TBSV осуществляется по механизму преждевременной термినации репликации (абортивной репликации). Комплементарное взаимодействие участков активатора 1 (A1) и рецептора 1 (R1) в (+)РНК создает «баррикаду» для продвижения репликазы к 5'-концу матрицы (+)РНК (заметим в скобках, что на самом деле РНК «протягивается» через репликативный комплекс, закрепленный на мембране) (рис. 37). Синтезируется укороченная (–)РНК (анти-субгеномная РНК), служащая матрицей для синтеза сгРНК-1 для белка оболочки (рис. 37А). *Cis*-взаимодействия в молекуле (+)РНК между парами элементов A2–R2 и A3–R3 создают эквивалентную «баррикаду» для синтеза укороченной (–)РНК, служащей матрицей для синтеза сгРНК-2 для TP1 и TP2 (рис. 37В).

Механизм регуляции репликации и транскрипции у *Tombusviridae* остается неясным. Если взаимодействия участков активаторов и рецепторов «запирают» продвижение репликазы по матрице (+)цепи, то каким образом синтезируется полноразмерная (–)РНК для дальнейшей репликации? Возможно, те или иные дальние взаимодействия РНК конкурентны, или же получают преимущество на разных стадиях инфекции — например, за счет привлечения дополнительных белковых факторов. Впрочем, объяснение может быть и более простым (механистическим). Репликативный комплекс может с определенной вероятностью преодолевать все «баррикады» и синтезировать полноразмерную (–)цепь, после чего RF вовлекается в синтез (+)цепей. Основная масса сгРНК, вероятно, синтезируется при вторичной транскрипции дочерних (+)РНК.

Цитология репликации. При репликации TBSV репликативные белки связываются с мембранами пероксисом клетки и образуют сферы (инвагинации с каналом в цитоплазму), внутренняя поверхность которых выстлана множеством копий белка р33. Эти структуры напоминают сферылы бромовирусов, рассмотренные в главе 4.3.2. Другие томбусвирусы могут использовать мембраны других органелл — например, митохондрий (carnation Italian ringspot virus). Сходные репликативные платформы формируются и в искусственной системе (дрожжах), и в растениях-хозяевах. В их биогенезе участвуют клеточные белки комплексов ESCRT-I, ESCRT-III и ORP (oxysterol-binding protein related proteins), которые в норме доставляют стеролы к точкам контакта мембран, увеличивая их гибкость. ORP действуют совместно с белком-партнером Scs2p (семейство VAP-белков), который в здоровой клетке заякоривается в ЭР и привлекают белки ORP. Считается, что совместное действие ORP и VAP создает мини-сайты мембран, обогащенные

А



В

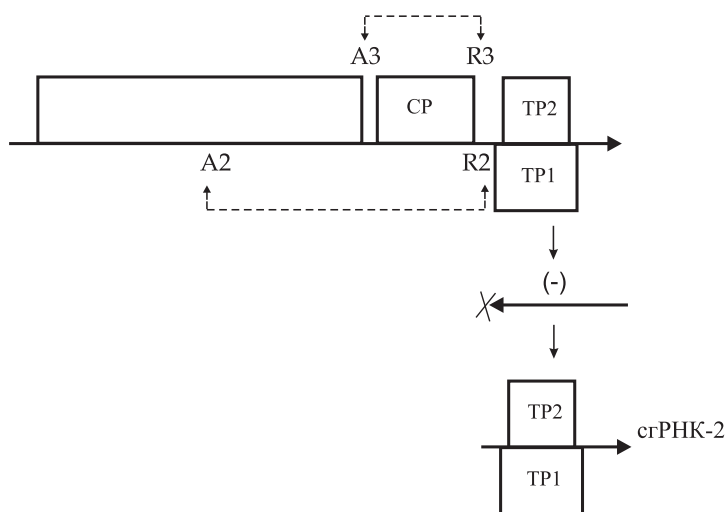


Рис. 37. Механизм синтеза субгеномных РНК томбусвируса. А — взаимодействие комплементарных участков активатора (A1) и рецептора (R1) создает препятствие для синтеза (-)цепи РНК. Абортивная репликация приводит к синтезу антисубгеномной РНК, на матрице которой синтезируется сгРНК-1 для экспрессии белка оболочки. В — взаимодействие A2–R2 и A3–R3 приводит к остановке репликации и синтезу укороченной (-)РНК, транскрипция которой дает сгРНК-2 для экспрессии TP1 и TP2.

стеролами. По-видимому, только такие модифицированные мембраны могут быть организованы в репликативные везикулы. Репликаза том-бусвирусов рекрутирует еще около 10 клеточных белков к строящимся репликативным платформам, но их функции неизвестны.

4.5.2. Диантовирусы

РНК Геном вируса некротической мозаики клевера (RCNMV, *Dianthovirus*) разделен между РНК-1 (кодирующей репликазу и СР) и РНК-2 (кодирующую транспортный белок). Репликация компонентов генома диантовируса требует *cis*-взаимодействий элементов в составе (+) и (–)цепей и напоминает систему репликации TBSV, рассмотренную выше. Однако, система транскрипции РНК-1 диантовируса уникальна. Синтез сгРНК для СР требует комплементарного взаимодействия *in trans* между последовательностью транс-активатора (ТА), экспонированной в петле шпильки на (+)цепи РНК-2, и сайта присоединения трансактиватора (ТА binding site, TABS) в (+)цепи РНК-1. Это взаимодействие «запирает» продвижение репликазы по цепи РНК-1, приводя к синтезу укороченной (–)РНК. Субгеномный промотор в составе этой матрицы узнается репликазой, в результате чего синтезируется сгРНК для СР.

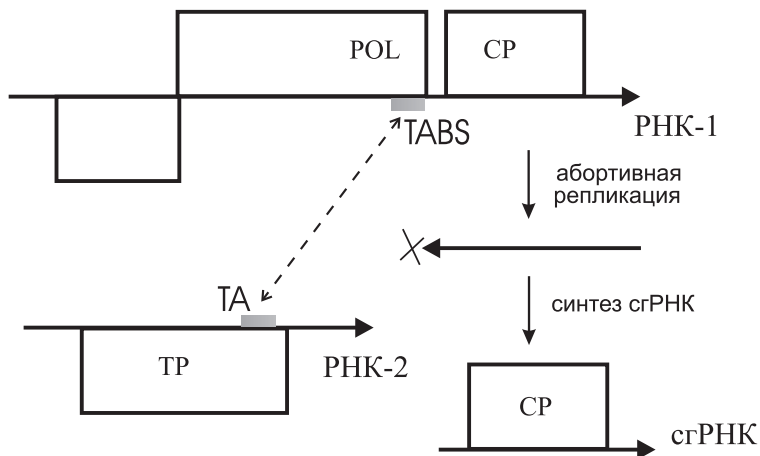


Рис. 38. Комплементарное взаимодействие между участком трансактиватора (ТА) в РНК-2 и участком присоединения ТА (TABS) в РНК-1 останавливает синтез (–)цепи РНК-1 диантовируса. Антисубгеномная РНК служит матрицей для транскрипции и синтеза сгРНК для белка оболочки.

Являются ли способы синтеза сгРНК у томбусвирусов и диантоввирусов, основанные на *cis*- и *trans*-взаимодействиях, принципиально разными механизмами? Предок этих вирусов, имел ли он однокомпонентный или разделенный геном, мог использовать механизм «запираания» репликазы на матрице (+)РНК за счет комплементарного спаривания участков цепи (здесь уместно вспомнить, что *Tombusviridae* не кодируют РНК-хеликазу). При разделении или слиянии генома в результате рекомбинации, породившей геномы TBSV и RCNMV, элементы, обеспечивающие механизм преждевременной терминации репликации и транскрипции укороченных (–)РНК, могли сохраниться. Таким образом, с эволюционной точки зрения, эти вирусы скорее всего используют схожий механизм транскрипции.

4.6. Нидовирусы

Общие сведения. Порядок *Nidovirales* включает семейства *Arteriviridae* (вирус артрита лошадей, EAV; вирус респираторно-репродуктивного синдрома свиней (PRRSV), *Coronaviridae* (вирус инфекционного бронхита, IBV; вирус атипичной пневмонии, SARS; бычий торовирус, BToV), *Roniviridae* (ассоциированный с жабрами вирус, GAV, и другие возбудители инфекций морских креветок) и *Mesoniviridae* (вирус Нам Динх, NDiV, и другие вирусы комаров). Нидовирусы реплицируются в цитоплазме зараженных клеток. Некоторые из них вызывают опасные заболевания человека (атипичная пневмония) и животных (респираторно-репродуктивный синдром, потери от которого в животноводстве США оцениваются в 560 млн. долларов в год). Название порядка происходит от лат. *nidus*, гнездо, и отражает 3'-котерминальные наборы субгеномных РНК (nested sets), образующиеся в клетке при вирусных инфекциях (рис. 39).

Наиболее хорошо изучены системы репликации и транскрипции артеривирусов и коронавирусов. Геномные РНК артеривирусов состоят из 13–15 тыс. нт и упакованы в икосаэдрические нуклеокапсиды (45–60 нм). Коронавирусы, мезонивирусы и ронивирусы, обладающие самыми большими геномами среди всех известных РНК-содержащих вирусов (от 20 до 41,1 тыс. нт), имеют спирально-симметричные (вытянутые) нуклеокапсиды. Частицы нидовирусов окружены мембранной оболочкой. В литературе коронавирусы, ронивирусы и мезонивирусы иногда называют «большими нидовирусами», в противоположность «малым нидовирусам» — артеривирусам. Структура, механизмы репликации и способ экспрессии геномов больших и малых нидовирусов принципиально сходны. Геномные и субгеномные РНК всех нидовирусов кепированы и полиа-

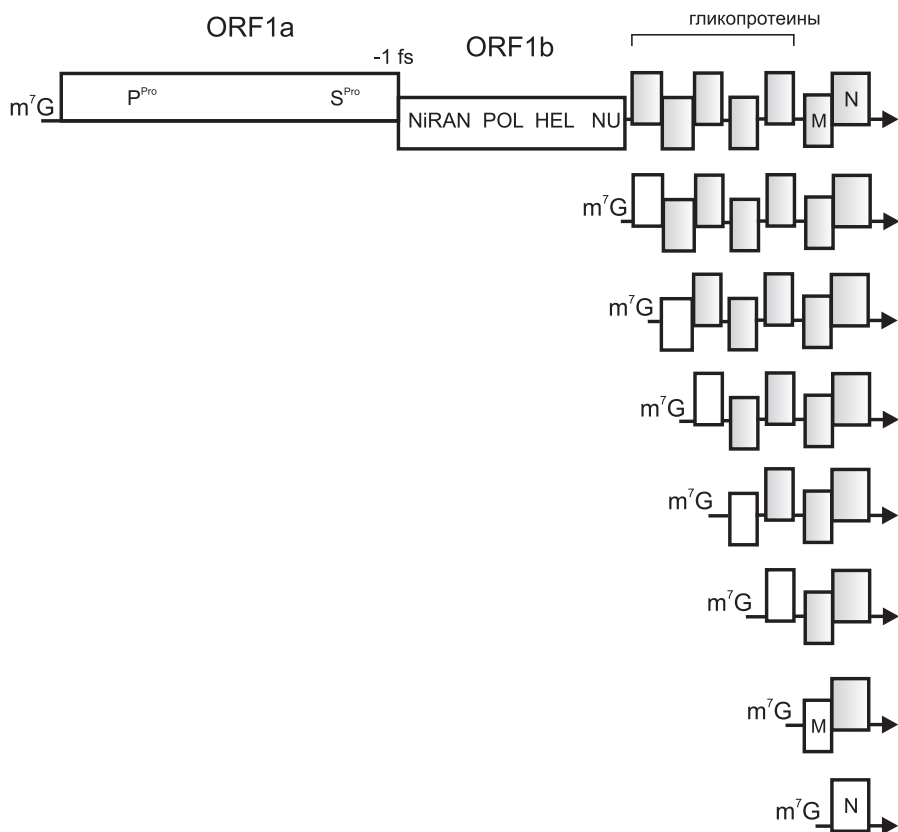


Рис. 39. Общий план структуры генома и субгеномных РНК нидовирусов. –1 fs — сигнал –1 рибосомального сдвига рамки считывания. Отмечены консервативные домены папаин-подобной протеиназы (P^{Pro}), химотрипсин-подобной протеиназы (S^{Pro}), нуклеотидилтрансферазы (NiRAN), РНК полимеразы (POL), хеликазы (HEL) и уридилат-специфической эндорибонуклеазы (NU). Субгеномные РНК служат для экспрессии генов гликопротеинов наружной мембраны (изображено условное число генов), матричного белка (М) и белка нуклеокапсиды (N). Гены, недоступные для трансляции в составе индивидуальных мРНК, показаны затененными прямоугольниками.

денилированы. Экспрессия полипротеинов-предшественников неструктурных белков, участвующих в репликации, происходит при трансляции 5'-концевых ORF1a и ORF1b с участием механизма –1 рибосомального сдвига рамки считывания (фреймшифтинга) (рис. 39). Процессинг полипротеинов происходит с участием лидерных папаин-подобных проте-

иназ (P^{Pro}) и химотрипсин-подобной протеиназы (S^{Pro}) — «главной протеиназы», осуществляющей гидролиз большинства сайтов. Репликативные домены артеривирусов, коронавирусов и ронивирусов близкородственны. В репликации РНК нидовирусов участвует существенно большее число вирус-специфических белков, чем в любой из других известных вирусных систем. Некоторые из них несут консервативные домены, имеющие гомологи в других вирусных системах (POL, HEL, домены протеиназ), другие характерны для представителей *Nidovirales* (домен нуклетидилтрансферазы, NiRAN) или для большого подмножества нидовирусов (домен уридилат-специфической эндорибонуклеазы, EndoU или NU) (рис. 39). Основные различия между большими и малыми нидовирусами касаются размера РНК генома и присутствия экзонуклеазы (ExoN), ответственной за корректировку репликации, у больших нидовирусов. Транскрипция геномных РНК приводит к синтезу набора 3'-котерминальных сгРНК, служащих для экспрессии генов структурных белков (рис. 39). Геномы некоторых больших нидовирусов (коронавирусов) кодируют «вспомогательные» неструктурные белки. Функции некоторых из них связаны с подавлением защитных реакций хозяйского организма, и их инактивация приводит к атенюированным вирусным фенотипам. Иногда эти гены называют несущественными, поскольку они не влияют на размножение вируса в культуре клеток.

4.6.1. Артеривирусы

Структура генома артеривирусов. ORF 1a и 1b, кодирующие компоненты репликазы артеривирусов, занимают 5'-концевую область (примерно две трети) генома (рис. 40). Трансляция этих генов с помощью рибосомального фреймшифтинга приводит к синтезу полипротеинов 1a и 1ab в молярном соотношении 4:1. Полипротеины 1ab артеривирусов включают 3–4 тыс. аминокислотных остатков. Процессинг pp1a и pp1ab вирусными протеиназами приводит к образованию до 14 неструктурных белков (NS).

Гены структурных белков — гликопротеинов (E, GP2, GP3, GP4 и GP5), матричного белка (M) и нуклеокапсидного белка (N) — находятся в 3'-концевой части генома и экспрессируются с помощью 3'-котерминальных сгРНК. Геномная и субгеномные РНК несут на 5'-конце идентичную лидерную последовательность (L), длина которой составляет от 170 до 210 нт у разных представителей *Arteriviridae* (рис. 39).

Ферментативный аппарат репликации. По-видимому, все неструктурные белки артеривирусов нужны для репликации, хотя не для каждого доказана или предсказана определенная функция. Вероятно, репликативный комплекс включает также некоторые клеточные белки.

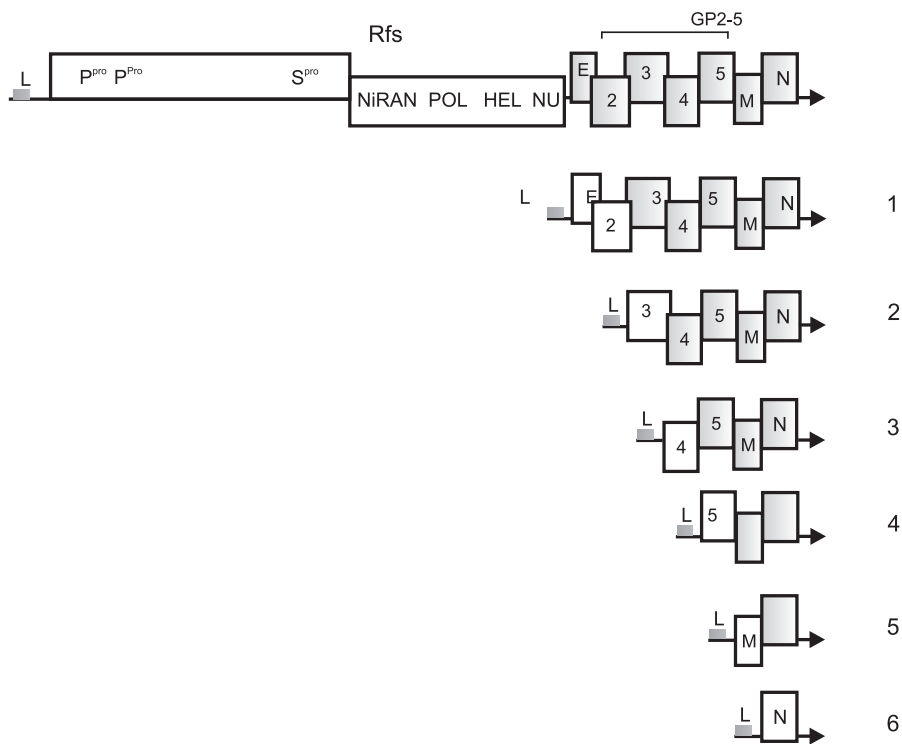


Рис. 40. Структура генома и субгеномных РНК артеривируса EAV. L — лидерная последовательность в геномной и субгеномных РНК. Rfs — сигнал -1 рибосомального сдвига рамки считывания. NU — домен уридилат-специфической эндорибонуклеазы. E — GP2-5, гликопротеины наружной мембраны. M — матриксный белок. N — белок нуклеокапсида.

Молекулярная биология артеривирусов наиболее хорошо изучена на модели EAV. Автокаталитическое выщепление NS1 и NS2 EAV происходит с помощью двух доменов папаин-подобных протеиназ, находящихся в составе этих белков (рис. 41). Количество лидерных протеиназ в полипротеине 1а у разных видов артеривирусов может отличаться. Так, в геноме PRRSV закодированы три активных лидерных P^{pro}, что позволяет получить дополнительный неструктурный белок из N-концевой области полипротеина 1а. Зрелый белок NS1 EAV и других артеривирусов содержит домен цинкового пальца. Он регулирует вирусную транскрипцию, участвует в формировании вирионов, влияет на клеточную транскрипцию и реакцию врожденного иммунитета. Часть NS1 посту-

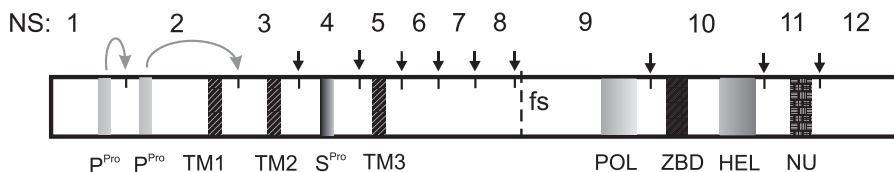


Рис. 41. Схематическое изображение репликативного полипротеина 1ab EAV (вертикальный пунктирный отрезок, граница 1a и 1b в слитном белке, синтезируемом в результате рибосомального фреймшифтинга). Неструктурные белки (NS) пронумерованы над схемой. Сайты разрезания P^{Pro} отмечены изогнутыми стрелками, сайты разрезания «главной протеиназы» S^{Pro} — вертикальными стрелками, границы между белками — короткими отрезками. Закодированные домены показаны затененными и заштрихованными прямоугольниками: TM — трансмембранные домены; ZBD — цинк-связывающий домен; NU — нидовирусная уридилат-специфическая эндорибонуклеаза.

пает в ядро зараженной клетки. Этот белок не имеет собственного сигнала ядерной локализации и доставляется в ядро посредством белка-партнера, клеточного транскрипционного активатора p100.

Белок NS2, кроме домена P^{Pro} , содержит трансмембранный домен. Вместе с NS3 и NS5 (также несущих TM домены; рис. 41), NS2 выполняет функции закрепления репликативного комплекса в мембранах и создания мембранных ультраструктур (сайтов репликации). Кроме того, NS2 является кофактором протеиназы NS4.

Протеолиз большинства сайтов разрезания полипротеинов 1a и 1ab осуществляется NS4 (S^{Pro}).

Белок NS9 содержит домен нуклеотидилтрансферазы (NiRAN; функция неизвестна) на N-конце и домен РНК полимеразы на С-конце. Белок NS10 содержит цинк-связывающий домен и домен NTPазы/хеликазы. Белок NS11 несет консервативный домен уридилат-специфичной эндонуклеазы (NU), характерный для нидовирусов и не имеющий гомологов среди белков других РНК-содержащих вирусов. Этот белок образует гексамеры с шестью независимыми активными сайтами. Механизм действия NU при репликации не выяснен, но, как и прочие неструктурные белки из состава полипротеина 1ab, NS11 играет важную роль в синтезе РНК. Аминокислотные замены в домене NU артеривирусов оказывают ингибирующее действие на синтез РНК, причем некоторые мутации почти полностью блокируют синтез всех типов РНК, а другие в большей степени подавляют транскрипцию, чем репликацию. Этот белок также является антагонистом интерферона бета.

Функции NS6, NS7, NS8 и NS12 неизвестны, хотя есть указания на их вспомогательную роль в репликации вирусной РНК. С другой стороны, «белым пятном» остаются гипотетические ферменты, участвующие в кепировании артеривирусных (+)РНК. Полипротеин 1ab артеривирусов не содержит аминокислотных последовательностей, гомологичных метилтрансферазам.

Cis-элементы генома артеривирусов. Сигналы синтеза антигеномной и антисубгеномных РНК артеривирусов представлены шпильчатыми структурами в 5'- и 3'-UTR геномной РНК, которые здесь условно обозначены как *cis-1* и *cis-2*, соответственно. *Cis-1* представлен простой шпилькой с выпетливаниями, расположенной вблизи 5'-конца генома. *Cis-2* — 3'-концевыми шпильками SL4 и SL5, между петлями которых осуществляется комплементарное взаимодействие («kissing interaction») (рис. 42). Последовательность ACC в основании SL5 и прилегающая последовательность поли(А) также являются важными компонентами сигнала *cis-2*. Хотя 3'-концевая поли(А) игнорируется как матрица (рис. 42), ее удаление приводит к снижению эффективности репликации артеривируса на несколько порядков. Очевидно, поли(А) обеспечивает компетентное для репликации состояние геномной РНК артеривируса, возможно, как часть «платформы» для посадки репликативного комплекса или клеточных белков. Тот факт, что для инициации репликации и транскрипции генома артеривирусов необходимо узнавание сигналов *cis-1* и *cis-2*, намекает на возможное взаимодействие концов РНК (циклизацию) (рис. 42).

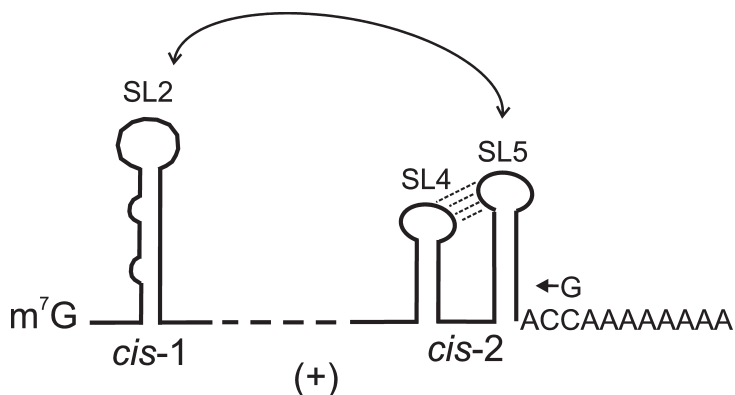


Рис. 42. Сигналы *cis-1* (шпилька SL2) и *cis-2* (шпильки SL4, SL5) на 5'- и 3'-концах геномной РНК артеривируса. Возможное взаимодействие *cis-1* и *cis-2* показано изогнутой линией со стрелками. Синтез (–)цепи начинается с включения гуанилового остатка.

Синтез антисубгеномных (–)РНК (транскрипция) направляется сигналами регуляции транскрипции (TRS, transcription regulatory sequence), которые представляют собой консервативные участки из 6–8 нт, расположенные перед генами структурных белков (body TRS, B-TRS) и в петле шпильки на 3'-конце последовательности L в геномной РНК (leader TRS, L-TRS) (рис. 40).

Cis-3, сигнал инициации синтеза дочерних (+)цепей находится в пределах последовательности (–)L в полноразмерной антигеномной цепи и в антисубгеномных РНК. Его точные границы и детерминанты не определены.

Синтез антисубгеномных РНК: механизм прерывистой транскрипции. При инфекции EAV образуются шесть 3'-котерминальных сгРНК, у других артеривирусов их число может меняться в зависимости от количества генов структурных белков.

Как отмечалось выше, геномная РНК и индивидуальные сгРНК имеют общую 5'-концевую лидерную последовательность. Для объяснения этого феномена был сформулирован принцип «прерывистой транскрипции» и предложена модель, согласно которой синтез цепи (–)РНК с некоторой вероятностью может задерживаться на B-TRS в геномной РНК (рис. 43). Затем синтезированный фрагмент (–)цепи либо «перескакивает» на 5'-конец (+)РНК, либо участки сближаются в результате выпетливания (+)РНК (последнее кажется более вероятным, поскольку часть матрицы и

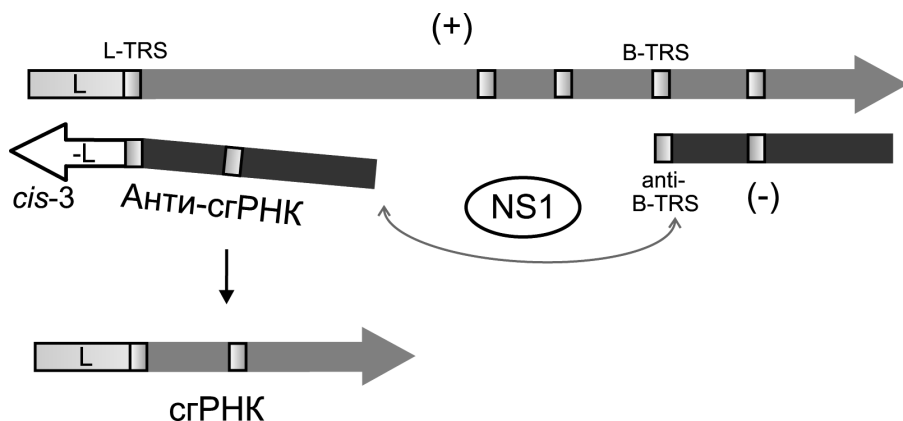


Рис. 43. Модель прерывистой транскрипции сгРНК артеривирусов с помощью синтеза антисубгеномных (–)цепей РНК. «Перескок» анти-сгРНК и отжиг anti-B-TRS на L-TRS (показаны прямоугольниками) могут регулироваться белком NS1. Кодрующие и некодирующие участки изображены не в масштабе.

растущая (–)цепь находится в дуплексе). Происходит отжиг анти-B-TRS и L-TRS и достройка фрагмента (–)РНК на матрице (+)L (рис. 43). В результате получают антисубгеномные РНК, которые содержат промотор *cis-3* и служат матрицами для образования набора сгРНК. В данной модели B-TRS рассматриваются как сигналы задержки транскрипции. Синтез укороченных (антисубгеномных) РНК был подтвержден экспериментально для нескольких артеривирусов. Совокупность данных позволяет считать данную модель транскрипции доказанной.

Регуляция транскрипции. Индивидуальные антисубгеномные РНК артеривирусов синтезируются в неодинаковых количествах, и таким образом регулируется экспрессия генов структурных белков. Возможно простое механистическое объяснение: если «заминки» на последовательно расположенных B-TRS преодолеваются с некоторой вероятностью, должен возникать простой градиент — чем короче антисубгеномная РНК, тем выше должно быть её относительное молярное содержание в клетке. Однако наблюдаемые при артеривирусной инфекции соотношения индивидуальных антисубгеномных РНК отклоняются от «градиентного» правила. Эффективность остановки синтеза (–)цепи на каждом B-TRS зависит от его контекста, включающего регуляторные элементы первичной и вторичной структуры. Ключевым «игроком», поддерживающим и регулирующим артеривирусную транскрипцию, является лидерный белок NS1. В опытах с инфекционными кДНК было показано, что точечные мутации в цинк-связывающем домене NS1 приводят либо к нарушению баланса антисубгеномных РНК, либо к полной остановке транскрипции, но не влияют на образование полноразмерных антигеномных цепей. Можно предположить, что NS1 связывается с участками, фланкирующими индивидуальные TRS, способствуя задержке синтеза (–)цепи и/или спариванию анти-B-TRS и L-TRS. Возможно, в регуляции транскрипции у артеривирусов также принимают участие белки NS10 (хеликаза) и NS11 (эндорибонуклеаза NU).

Переключение процессов транскрипции и репликации. В литературе обсуждалась возможность параллельного прохождения процессов репликации и транскрипции на одной матрице. Репликативный комплекс артеривируса, инициировав синтез на 3'-конце (+)цепи, может либо прерывать его на B-TRS, в результате чего синтезируются антисубгеномные РНК, либо довести до конца, построив полноразмерную (–)цепь. В эту простую схему не укладывается тот факт, что на ранних стадиях инфекции предпочтительно синтезируются антисубгеномные (и субгеномные) РНК, а на более поздних — полноразмерная антигеномная РНК. Если эти процессы разведены во времени, следует допустить

существование регуляторного механизма, переключающего транскрипцию и репликацию. Гипотетически, в его основе может быть изменение репликативного комплекса на поздних стадиях инфекции — например, удаление из его состава или инактивация белка NS1.

Цитология репликации/транскрипции. Репликативные комплексы и РНК артеривирусов накапливаются в перинуклеарных гранулах и везикулах диаметром около 80 нм, являющихся производными эндоплазматического ретикулюма. Эти структуры ограничены двойной мембраной (double membrane vesicles, DMV) и, по-видимому, образуются в результате выпячивания мембран ER. В индукции везикул принимают участие белки NS2, NS3 и NS5, несущие трансмембранные домены. По-видимому, эти белки служат площадкой для прикрепления других неструктурных белков и организуют сборку репликативного комплекса. DMV не имеют видимых каналов в цитоплазму, подобных «горлышкам» сферул альфа-подобных вирусов (глава 4.3.2) и томбусвирусов, и механизм обмена вирусных фабрик с цитоплазмой (импорта rNTP и экспорта мРНК) неизвестен.

4.6.2. Коронавирусы

Структура вирионов и структура генома. Представители сем. *Coronaviridae* — плейоморфные вирусы, имеющие спирально-симметричный капсид и липопротеидную оболочку (диаметр частиц 80–130 нм). На поверхности оболочки располагаются гликопротеиновые отростки, напоминающие зубцы короны.

Строение и экспрессия генома коронавирусов принципиально схожи с таковыми у других нидовирусов (рис. 39, 40). Продукты генов 1a и 1b, экспрессируются в результате трансляции геномной РНК с участием механизма рибосомального фреймшифтинга. Полипротеины 1a и 1ab состоят из ~4 и 7 тыс. аминокислотных остатков, соответственно. 3'-концевые гены кодируют гликопротеины наружной мембраны S (spike glycoprotein) и E, матриксный белок (M), белок нуклеокапсиды (N) и некоторые дополнительные белки. Эти гены экспрессируются с помощью набора сгРНК. При инфекции коронавирусов может синтезироваться от 5 до 9 сгРНК, каждая из которых имеет общую с геномной РНК 5'-концевую лидерную последовательность L длиной от 55 до 92 нт.

Ферментативный аппарат репликации. В состав репликативного комплекса коронавирусов входит до 16 неструктурных белков — продуктов процессинга полипротеинов 1a и 1ab (рис. 44). У вируса мышинного гепатита (MHV) выщепление NS1, NS2, NS3 и, частично, NS4 про-

исходит под действием двух доменов P^{Pro} (рис. 44). У других коронавирусов (например, вируса инфекционного бронхита, IBV) за эти реакции ответственна единственная протеиназа, а белок NS1 отсутствует. Следует подчеркнуть, что неструктурные белки коронавирусов неродственны NS1 артеривирусов, который регулирует транскрипцию РНК. Специфические функции NS1 и NS2 коронавирусов недостаточно изучены. Искусственные мутации, блокирующие разрезание сайта NS1/NS2 и даже делеции С-концевой части NS1 и всей последовательности NS2 лишь незначительно влияют на репликацию MHV в культуре клеток. Эти данные указывают, что коронавирусные полипротеины содержат «несущественные» области, которые могут давать селективные преимущества при определенных условиях.

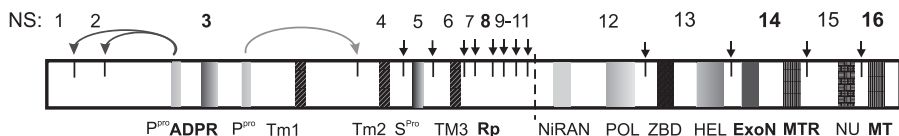


Рис. 44. Структура репликативного полипротеина 1ab коронавируса MHV. Вертикальный пунктирный отрезок, граница 1a и 1b в слитном белке. Белковые домены обозначены внизу диаграммы (P^{Pro} , папаин-подобная протеиназа; ADPR — ADP-рибозо-1'-фосфатаза; S^{Pro} — химотрипсин-подобная протеиназа; TM — трансмембранные домены; Rp — гипотетическая праймаза; POL — РНК полимеразы; ZBD — цинк-связывающий домен; HEL — NTPаза/хеликаза; ExoN — 3'-5' экзонуклеаза; MTR — гуанил-N7-метилтрансфераза; NU — нидовирусная уридилат-специфичная эндорибонуклеаза; MT — рибозил-2'-О-метилтрансфераза). Жирным шрифтом выделены номера неструктурных белков и сокращения названий доменов, которые закодированы в геномах коронавирусов, но не в геномах «малых нидовирусов». Белковые домены показаны затененными и заштрихованными прямоугольниками.

Многофункциональный белок NS3 MHV несет два домена папаин-подобной протеиназы (осуществляющих разрезание 1a по трем точкам; рис. 44), трансмембранный домен и домен ADP-рибозо-1'-фосфатазы (ADPR). ADPR может быть удален из полипротеина без ущерба для репликации и, вероятно, служит для ингибирования механизмов врожденного иммунитета. Было установлено, что именно ADPR влияет на развитие симптомов энцефалита и гепатита у зараженных MHV мышей. Трансмембранные домены обеспечивают встраивание NS3, NS4 и NS6 (рис. 44) в мембраны и образование везикулярных сайтов репликации.

Протеиназа NS5 осуществляет процессинг большинства сайтов в полипротеинах 1a и 1ab (рис. 44). Зрелый белок NS5 входит в состав репликативного комплекса.

Функции малых белков NS7–NS11 так или иначе связаны с синтезом РНК, и все они необходимы для репликации. Уникальным свойством коронавирусов (впервые обнаруженным у SARS) является участие в репликации вспомогательной РНК-полимеразы (Rp), белка NS8 (рис. 44), который использует в качестве матриц последовательности с консенсусом 5'-(G/U)CC и синтезирует короткие (до 6 нт) комплементарные РНК. Помимо низкой процессивности, NS8 является самой неточной РНК полимеразой из всех известных ферментов данного типа (одна ошибка на 10 нт). Предполагается, что Rp выполняет функции праймазы при репликации РНК коронавирусов. По другой модели, этот белок повышает процессивность РНК полимеразы (POL). NS7 и NS8 формируют цилиндрический комплекс из 8 субъединиц каждого белка, в котором положительно заряженные аминокислотные остатки экспонированы в центральной полости. Этот комплекс способен «окольцовывать» цепь РНК.

NS9 и NS10 являются РНК-связывающими белками. NS10 также взаимодействует с NS14, помогая E_хoN в коррекции синтеза РНК.

Белок NS12 несет домены нуклеотидилтрансферазы и РНК полимеразы. NS13 содержит цинк-связывающий и хеликазный домены; последний обладает также РНК-трифосфатазной активностью.

NS14 содержит на N-конце домен 3'-5' экзонуклеазы (E_хoN), а на C-конце домен гуанил-N7-метилтрансферазы (MTR). Предсказанные с помощью методов биоинформатики активности E_хoN и MTR были подтверждены экспериментально. Роль MTR в кепировании коронавирусных мРНК вполне очевидна (домен другого кепирующего фермента, гуанилилтрансферазы, в полипротеинах коронавирусов пока не был обнаружен). Репликативные функции экзонуклеазы, уникального фермента «больших нидовирусов», совсем не тривиальны. Родственные клеточные ферменты семейства DEDD участвуют в «вычитывании гранок» (proofreading), репарации и рекомбинации нуклеиновых кислот. NS14 выполняет роль «редактирующего» фермента, повышающего точность копирования цепей РНК — эта функция уникальна для мира РНК-содержащих вирусов.

NS15 несет доменуридилат-специфичной экзонуклеазы (NU) (рис. 44). Коронавирусная NU, как и в случае артеривирусных систем, необходима для репликации и транскрипции, а также является антагонистом интерферона. Кроме того, NS15 контактирует с ретинобластомным белком pRb, причем это взаимодействие усиливает рибонуклеазную активность вирусного белка.

Белок NS16 содержит домен рибозил-2'-О-метилтрансферазы (MT), осуществляющего метилирование второго остатка с 5'-конца коронавирусных мРНК по 2'-О-положению рибозы (m⁷GpppAm). 2'-О-метилирование кепы позволяет клетке дискриминировать «свои» и «чужие» мРНК с помощью интерферон-индуцируемых IFIT-белков.

Цис-элементы репликации и транскрипции. В 5'-UTR генома коронавируса расположены шпильки SLI, SLII, SLIII и SLIV, совместно формирующие сигнал инициации синтеза негативной цепи (здесь — *cis-1*). На 3'-конце генома шпильки SL1, SL2, SL3 и псевдоузел PK1 составляют главный промотор синтеза негативной РНК (здесь — *cis-2*). Поли(А) также необходима для инициации репликации и транскрипции. Постулировалась необходимость взаимодействия между концами матрицы коронавиральной РНК, которое достигается посредством РНК-белковых и белок-белковых контактов. Сигналы *cis-1* и *cis-2* в коронавирусных геномах взаимодействуют с клеточными белками, и такие взаимодействия существенны для репликации. Белок гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов A1 (hnRNP A1), присутствующий в клеточном ядре и цитоплазме, и РТВ способны специфически связываться с *cis-1* и *cis-2* коронавирусного генома и, предположительно, создавать «мостик» между ними.

Комплемент последовательности L в полноразмерной негативной цепи, вероятно, является сигналом инициации синтеза дочерних (+) РНК (*cis-3*).

На 3'-конце лидерной последовательности и перед генами структурных белков коронавируса находятся короткие консервативные участки L-TRS и B-TRS, соответственно (см. раздел 4.3.1). Как и в случае артеривирусов, в геноме коронавируса L-TRS расположен в петле шпильки (SLII), а B-TRS в линейных участках молекулы (+)РНК. Нуклеотидный контекст B-TRS влияет на эффективность транскрипции.

Синтез антисубгеномных РНК и прерывистая транскрипция. Репликативный комплекс узнает главный промотор синтеза (–)цепи *cis-2* и начинает синтез антигеномной РНК. При этом поли(А) частично копируется, и синтезируется 5'-олиго(U) в (–)РНК. При инфекции коронавируса, как и артеривирусов, образуются наборы 3'-котерминальных антисубгеномных РНК за счет временной задержки синтеза (–)РНК на участках B-TRS (см. рис. 42). На каждом B-TRS с определенной вероятностью реализуется один из двух сценариев — либо продолжение синтеза (–)РНК, либо «перескок» недостроенной (–)цепи и отжиг анти-B-TRS с L-TRS. Затем антисубгеномная РНК достраивается, приобретая анти-лидерную последовательность с сигналом *cis-3*. Наборы анти-

субгеномных РНК служат матрицами для синтеза сгРНК, имеющих общую 5'-концевую лидерную последовательность (см. рис. 42). У коронавируса не обнаружен белок, функционально эквивалентный регулятору транскрипции NS1 артеривирусов. Очевидно, аттенуация (ослабление) сигналов В-TRS происходит с участием свободного белка нуклеокапсида (см. ниже).

Регуляция транскрипции и переключение процессов транскрипции и репликации. Аттенуация В-TRS в (+)цепи РНК происходит на поздних стадиях инфекции, когда накапливается свободный белок нуклеокапсида (N^0). Белок N^0 обнаруживается в составе репликативных комплексов, и его постоянная экспрессия является необходимым условием оптимальной репликации коронавирусов. Димеры N^0 специфически связываются с В-TRS и anti-B-TRS и способны плавить дуплекс этих участков. Вероятно, что и синтез набора антисубгеномных РНК происходит не в результате случайного «проскока» В-TRS репликазой, а регулируется белком N. Ген N расположен на 3'-конце генома, и соответствующая моноцистронная сгРНК синтезируется первой в результате задержки репликативного комплекса на 3'-проксимальном В-TRS. Трансляция сгРНК и накопление N^0 вызывают аттенуацию первого и последующих В-TRS и синтез полного набора антисубгеномных РНК, а при достижении достаточно высокой концентрации N^0 — синтез полноразмерной антигеномной РНК.

По некоторым данным, не только геномная РНК, но и субгеномные мРНК коронавирусов могут служить матрицами для репликации; это представляется вполне логичным, поскольку каждая сгРНК несет концевые сигналы для узнавания репликазой.

При инициации синтеза геномных РНК коронавирусов репликативный комплекс узнает промотор *cis-3* в антигеномной цепи и начинает синтез комплементарной (+)цепи с вытеснением материнской цепи из дуплекса RF и его преобразованием в репликативный интермедиат. В результате синтезируются полноразмерные кепированные и полиаденилованные (+)РНК. Неясно, каким образом на матрице олиго(U) в антигеномной РНК синтезируется полидисперсная (гетерогенная по длине) 3'-поли(А) в (+)РНК; предположительно, это происходит в результате проскальзывания репликативного комплекса на олигоуридиловом участке.

Цитология репликации/транскрипции. При коронавирусной инфекции образуются двойные мембранные везикулы (DMV) до 200 нм в диаметре, а также мультивезикулярные комплексы, в индукции которых главная роль принадлежит белкам NS3, NS4 и NS6. Обсуждалась воз-

возможность происхождения этих структур из мембран аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума, эндосом и аутофагосом. Вирусные неструктурные белки и дцРНК ассоциированы с этими структурами. Мультивезикулярные комплексы и DMV коронавирусов не имеют каналов в цитоплазму, различимых с помощью электронной микроскопии, и механизмы поступления в эти структуры молекул субстрата и экспорта из них коронавирусных мРНК остаются неизвестными.

4.6.3. Другие нидовирусы

Представители родов *Torovirus* (сем. *Coronaviridae*) и *Okavirus* (сем. *Roniviridae*) с точки зрения структуры генома близко напоминают коронавирусы. Существенные различия между ними касаются механизмов синтеза субгеномных РНК. Так, все сгРНК GAV (*Roniviridae*) образуются в результате преждевременной терминации синтеза (–)РНК на В-TRS-подобных участках геномной РНК (‘TRS’). Синтезируются антисубгеномные РНК, которые служат матрицами для синтеза сгРНК (рис. 45А). Поскольку этап «прерывистой транскрипции» не реализуется, сгРНК ронивируса не имеют общей с геномной РНК лидерной последовательности (рис. 45А).

Торовирусы используют смешанную стратегию транскрипции. Синтез самой длинной антисубгеномной РНК происходит в результате задержки синтеза антигеномной цепи на шпильке в геномной цепи, вероятно, выполняющей роль «баррикады» для репликативного комплекса (рис. 45В). Затем происходит отжиг анти-В-TRS и L-TRS и дотраивание антисубгеномной РНК на матрице лидерной последовательности длиной 18 нт. Остальные антисубгеномные РНК синтезируются в результате преждевременной терминации репликации на TRS-подобных участках геномной РНК, последовательность которых отличается от L-TRS (рис. 45В). В результате синтезируется набор 3'-котерминальных сгРНК, из которых только сгРНК-1 содержит лидерную последовательность генома торовируса.

Заключительные замечания. Эволюция нидовирусов, приведшая к созданию самых крупных РНК геномов, сопровождалась усложнением репликативного аппарата и приобретением новых функций и способов синтеза РНК. Репликация больших нидовирусов напоминает репликацию ДНК, поскольку в этом процессе используется экзонуклеазная активность, повышающая точность копирования цепей РНК. Кроме того, при дивергенции малых и больших нидовирусов была решена проблема упаковки — очевидно, спирально-симметричный нуклеокапсид позволяет упаковать РНК значительно большего размера, чем икосаэдри-

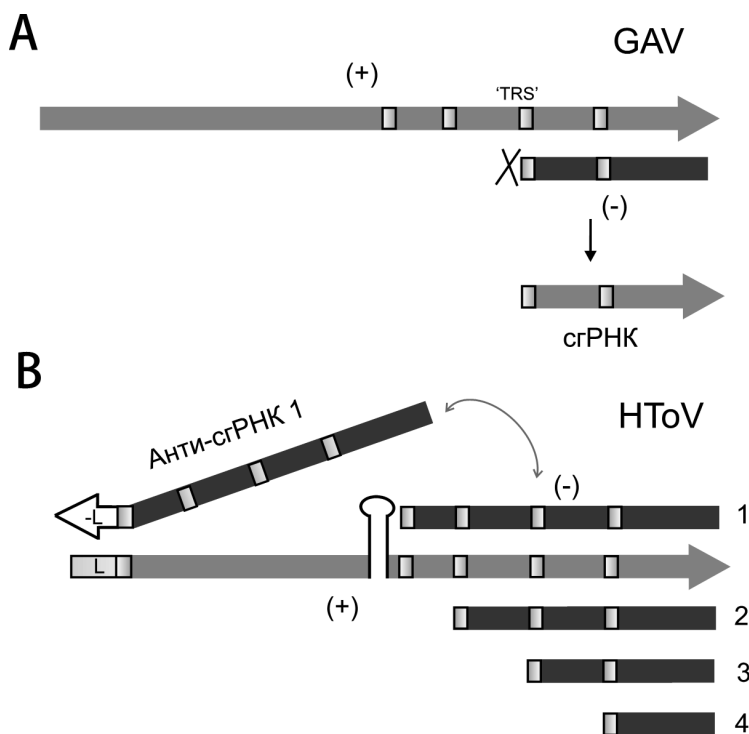


Рис. 45. Стратегии синтеза сгРНК у GAV (*Roniviridae*) (A) и HToV (*Torovirus*, *Coronaviridae*) (B).

ческий нуклеокапсид. Коронавирусы, торовирусы и артеривирусы используют уникальный механизм прерывистой транскрипции, не имеющий аналогов у других вирусов. Ключевым этапом прерывистой транскрипции у нидовирусов является синтез укороченных (–)цепей (антисубгеномных РНК), напоминающий механизм транскрипции у томбусвирусов. Параллель между нидовирусами и томбусвирусами подкрепляется тем обстоятельством, что торовирусы используют смешанную стратегию транскрипции для синтеза индивидуальных сгРНК, а рони-вирусы и вовсе обходятся без «прерывистой транскрипции».

5. Вирусы с негативным РНК геномом

В последующих разделах будет рассматриваться репликация и транскрипция вирусов, геном которых представлен негативной РНК (группа (с), глава 3). При инфекции (–)РНК вирусов первым этапом является транскрипция, образование субгеномных (+)РНК и синтез вирусных белков. Затем происходит синтез антигеномной (+)РНК, служащей матрицей для воспроизводства дочерних (–)РНК. Все вирусы с негативным РНК геномом обладают следующими общими свойствами:

(1) В состав вириона входит РНК-зависимая РНК полимераза, которая попадает в клетку вместе с геномной РНК.

(2) Матрицей для синтеза всех типов РНК (геномной, антигеномной, субгеномных) является не свободная РНК, а нуклеопротеид (РНК, одетая белком нуклеокапсида).

(3) На концах геномной РНК имеются короткие комплементарные последовательности, и это обстоятельство существенно для репликации и упаковки РНК.

Вирусы с (–)РНК-геномом включают порядок *Mononegavirales* (вирусы с непрерывным РНК геномом) и несколько семейств вирусов с разделённым геномом. К *Mononegavirales* относят семейства *Rhabdoviridae* (вирусы бешенства, везикулярного стоматита, рабдовирусы растений), *Paramyxoviridae* (вирусы парагриппа, кори, свинки), *Filoviridae* (вирусы Эбола и Марбург) и *Bornaviridae* (вирус Борна). Геном, разделенный между несколькими компонентами (–)РНК, имеют представители семейств *Orthomyxoviridae* (вирусы гриппа), *Bunyaviridae* (хантавирусы, буньявирусы, тосповирусы, флебовирусы) и *Arenaviridae*. Аренавирусы и некоторые представители *Bunyaviridae* имеют «двусмысленные» (амбисенсные) геномы, содержащие участки РНК позитивной и негативной полярности.

Несмотря на значительные различия морфологии (–)РНК вирусов, существует общий план строения частицы. Геномная РНК заключена в спиральный нуклеокапсид, сформированный из белка нуклеопротеида N. С нуклеокапсидом ассоциирована репликаза L и фосфопротеин Р. Матриксный белок М находится в вирионе между нуклеопротеидом и наружной мембраной и взаимодействует с ними. Гликопротеин (или гликопротеины) G встроен в наружную мембрану, экспонирован в рас-

твор и участвует в процессах узнавания клеточных рецепторов, проникновения в клетку и отпочковывания вирионов.

5.1. Рабдовирусы

Общие сведения. Представители семейства *Rhabdoviridae* поражают позвоночных и беспозвоночных животных и высшие растения. Наиболее хорошо изученные вирусы этого семейства — вирус бешенства (rabies virus, RabV) и вирус везикулярного стоматита (vesicular stomatitis virus, VSV) — имеют пулевидные частицы длиной 100–300 нм и диаметром 75 нм, окруженные наружной липопротеидной оболочкой. Субъединица нуклеокапсидного белка N взаимодействует примерно с 9 нт РНК RabV и VSV. Геномные РНК VSV и RabV состоят из 11 и 12 т.н., соответственно. Инфекции рабдовирусов развиваются в цитоплазме хозяйской клетки.

Структура генома. В направлении 3'-5', геном рабдовирусов содержит «лидерную» последовательность (*l*, ~60 нт), комплементы генов N, P, M, G, L, и «трейлерную» последовательность (*t*, ~70 нт). Последовательности *l* и *t* обогащены остатками А и U. На концах геномной РНК имеются комплементарные участки (8 нт в геноме VSV, 11 нт в геноме RabV).

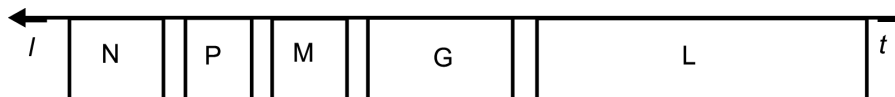


Рис. 46. Структура генома рабдовируса. Лидерная (*l*) и трейлерная (*t*) последовательности обозначены утолщенными отрезками. Прямоугольники, комплементы генов нуклеокапсидного (N), фосфопротеина (P), матриксного белка (M), гликопротеина (G) и РНК полимеразы (L).

Общая схема транскрипции и репликации генома. При попадании нуклеокапсид рабдовирусов в цитоплазму репликаза L в комплексе с кофактором P и клеточными белками осуществляют транскрипцию генома, в результате которой образуются моноистронные субгеномные мРНК для генов N, P, M, G и L, каждая из которых имеет кеп и полиадениловую последовательность.

Транскрипция идет линейно и прерывисто, причем эффективность синтеза каждого транскрипта убывает по градиенту (подробнее см. ниже).

Репликация требует выполнения по крайней мере двух условий: синтеза белка нуклеокапсидного *de novo* и изменений в составе репликативно-

го комплекса. Синтезируется полноразмерная цепь антигеномной РНК, одетая белком N. На матрице (+)РНК синтезируется потомство геномных (–)РНК.

Ферментативный аппарат репликации и транскрипции. Белок L обладает активностями РНК-зависимой РНК полимеразы и кепирующего фермента, гуанилилтрансферазы (GT) и метилтрансферазы (MTR). Следует отметить, что метилтрансфераза рабдовирусов способна осуществлять две биохимические реакции: метилирование концевого остатка гуанозина по 7-му положению азотистого кольца и 2'-О-метилирование рибозного кольца второго нуклеотидного остатка с 5'-конца мРНК. Области белка L, ответственные за каталитическую активность РНК полимеразы, гуанилилтрансферазы и метилтрансферазы, были картированы (рис. 47). Домен VI также обеспечивает взаимодействие L с кофактором Р (рис. 47). Белок L также обладает активностью GТРазы; соответствующий домен не был картирован.

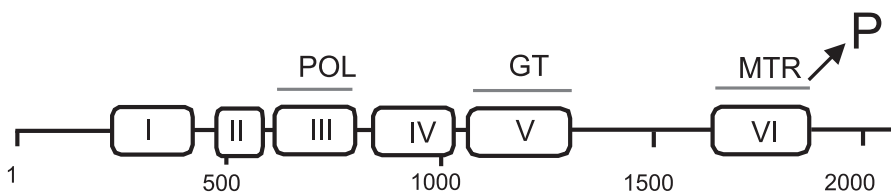


Рис. 47. Доменная структура белка L рабдовирусов. Арабские цифры указывают нумерацию аминокислотных остатков с N-конца, римскими цифрами обозначены домены белка (POL — РНК полимеразы; GT — гуанилилтрансфераза; MTR — метилтрансфераза). Стрелкой указана область белка L (домен VI), взаимодействующая с фосфопротеином Р.

Фосфопротеин Р выполняет функции кофактора транскрипции и репликации. Этот белок формирует гомодимеры, которые взаимодействуют с белками L и N, а также с нуклеопротеином N-РНК и клеточным белком динеином. Белок Р активируется в результате фосфорилирования Akt (протеинкиназой В). Специфическое фосфорилирование N-конца Р казеин-протеинкиназой II влияет на его способность экранировать белок нуклеокапсида от контактов с клеточными РНК. Примечательным свойством Р является наличие доменов с выраженной вторичной структурой на концах и в середине полипептидной цепи, и слабоструктурированных участков между ними (рис. 48). Эти «бесформенные» участки приобретают вторичную структуру при контактах с другими белками-

партнерами. «Распорядительские» функции димера Р многообразны: он взаимодействует с L как кофактор транскрипции и репликации; со свободным N — как шаперон, предупреждающий слипание субъединиц и их взаимодействия с клеточными РНК; с вирусным нуклеопротеином — для сближения репликазы и матрицы (рис. 48). Функциональный смысл взаимодействия Р с клеточным белком динеином не выяснен; гипотетически, оно может опосредовать перемещение репликативного комплекса по цитоскелету.

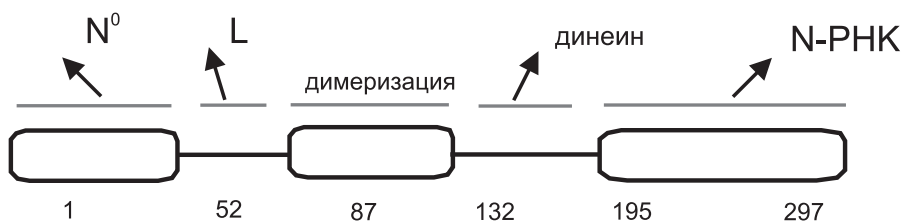


Рис. 48. Доменная структура белка Р рабдовирусов. Цифры указывают нумерацию аминокислотных остатков с N-конца (показаны границы доменов и слабоструктурированных участков). Стрелками указаны участки фосфопротеина, обеспечивающие его димеризацию и взаимодействие со свободным белком N (N⁰), L, динеином и вирусным нуклеопротеином (N-РНК).

Взаимодействия L и Р вызывают характерные изменения третичной структуры репликазы L, которые были выявлены с помощью электронной микроскопии. Свободный белок L состоит из нескольких глобулярных доменов. Домен РНК полимеразы имеет форму кольца с «хвостом» из глобулярных доменов, ответственных за гуанилирование и метилирование мРНК (рис. 47, 49). Присоединение димера Р вызывает перестройку молекулы L, так что глобулярные домены GT и MTR сливаются и формируют структуру «завитка» (рис. 49). Предполагается, что именно такая структура «кольца с завитком» обеспечивает компетентность репликативного комплекса в инициации транскрипции и репликации.

Белковые комплексы, используемые при транскрипции и репликации генома рабдовирусов, отличаются по составу. В транскрипционный комплекс входят белки L, Р и три хозяйских белка: фактор элонгации трансляции EF1A, шаперон HSP60 и гуанилилтрансфераза. Соотношение белков L, Р, EF1A и HSP60 в очищенном комплексе составляет примерно 1:2:3:1, а клеточная гуанилилтрансфераза присутствует в субмолярных количествах. Ее ассоциация с транскрипционным комплексом (при наличии собственной вирусной GT) представляется интригующим обстоятельством. В состав репликативного комплекса, осу-

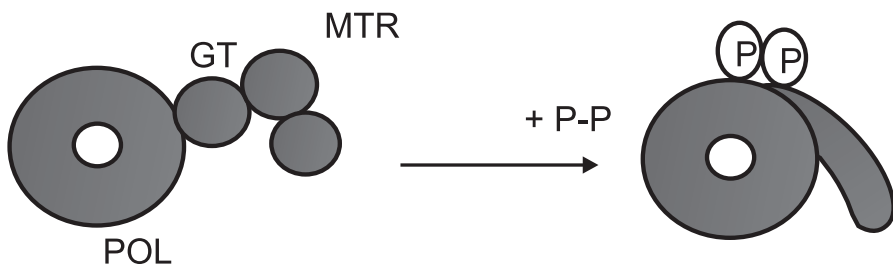


Рис. 49. Изменения структуры белка L при контакте с димером P (условное изображение на основе данных электронной микроскопии) .

ществляющего синтез полноразмерной антигеномной и геномной РНК, входят белки L, P и N⁰ в эквимоларных количествах. Таким образом, N, хотя и является структурным белком, выполняет функцию субъединицы репликазы.

Cis-элементы генома рабдовирусов. Главный промотор синтеза антигеномной цепи рабдовирусов (*cis-1*) находится в пределах 3'-концевой нетранслируемой области *l* (~50 нт с 3'-конца геномной РНК; рис. 50). Если первые 8–11 нт с 3'-конца входят в состав *cis-1*, то комплементарные им 8–11 нт на 5'-конце РНК являются сигналом упаковки (инкапсидации РНК белком N).

Цис-сигналы инициации транскрипции находятся в (–)цепи перед комплементом каждого гена и имеют консенсус 3'-UUGUCDNUAG (D — A, U или G; N — любой нуклеотид). Межгенные участки N/P, P/M, M/G и G/L в молекуле (–)РНК содержат консенсусную последовательность 3'-A/CUACUUUUUUU (стоп-сигнал транскрипции). *Цис-сигналы* терминирования и инициации транскрипции в межгенных участках совмещены в конфигурации 3'-A/CUACUUUUUUU(N_n)UUGUCDNUAG (в скобках нетранскрибируемая последовательность). В межгенных участках N/P, P/M и M/G у рабдовирусов нетранскрибируемые последовательности состоят из 2–6 нт, а в межгенном участке G/L — из 18–29 нт.

Cis-2, главный промотор синтеза геномной цепи, находится в пределах 3'-концевой последовательности анти-трейлера в антигеномной (+) цепи (рис. 50).

Инициация транскрипции. Транскрипция генома рабдовирусов не обязательно требует взаимодействия транскрипционного комплекса с *cis-1* на 3'-конце геномной РНК, и может начинаться с *цис*-сигнала перед комплементом гена N. Здесь есть известное логическое затруднение. Можно себе представить, как происходит узнавание 3'-конца РНК в ну-

клеокапсиде (например, транскрипционный или репликативный комплекс мог бы сначала взаимодействовать с определенным образом ориентированной концевой субъединицей белка N, а затем узнавать *cis-1*). Однако, как распознается сигнал инициации транскрипции внутри нуклеокапсиде, остается непонятным. Тем не менее, экспериментальные данные свидетельствуют том, что транскрипция может начаться с двух точек: на 3'-конце геномной РНК и перед геном N (рис. 50). Узнавание транскрипционным комплексом главного промотора на 3'-конце приводит к транскрипции области *l* и синтезу короткой нетранслируемой «лидерной РНК», лишенной кепа и поли(А) (рис. 50).

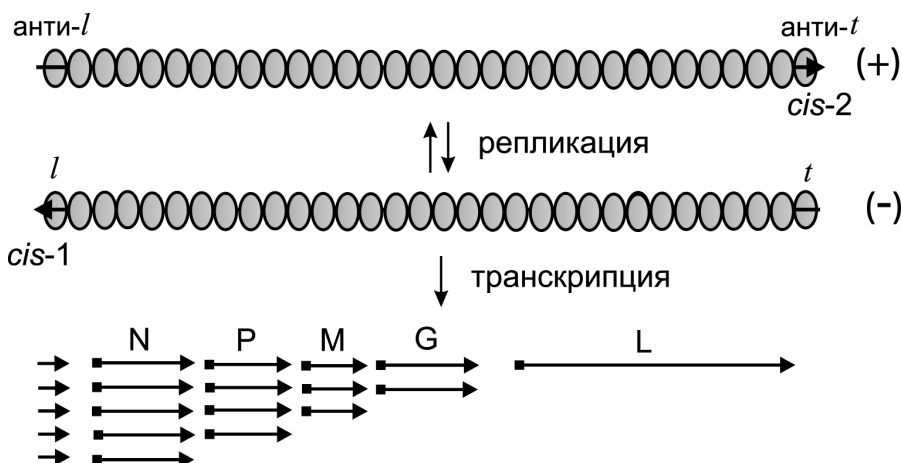


Рис. 50. Схема транскрипции и репликации генома рабдовирусов. Градиент транскриптов лидерной РНК (*l*), N, P, M, G и L изображен внизу схемы условно (без соблюдения их реальных количественных соотношений). Кепа структура показана темным квадратом на левом конце стрелок, обозначающих мРНК.

Инициация транскрипции гена N (и последующих вирусных генов) сопровождается кепированием транскрипта 5'-ААСА... (рис. 51). Этот процесс включает несколько стадий: во-первых, это реакция отщепления гамма-фосфата от GTP (образование GDP под действием GTPазной активности L). Во-вторых, отщепление гамма- и бета-фосфата от 5'-конца РНК (источник пирофосфатазной активности неизвестен), формирование интермедиата L-РНК и перенос GDP на L-РНК (под действием гуанилилтрансферазной активности L).

Далее активность MTR белка L метилирует концевой остаток гуанозина (синтезируя m⁷G) и следующий остаток аденозина (синтези-

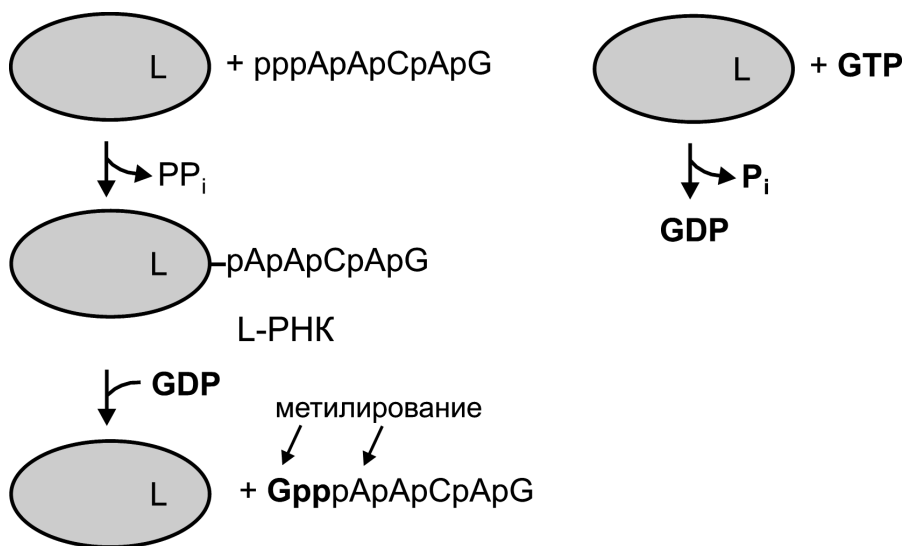


Рис. 51. Схема синтеза кеп-структуры белком L рабдовирусов. PP_i — неорганический пирогосфат; P_i — неорганический фосфат.

руа m-2'-О-рибозу). Механизм кепирования у рабдовирусов отличается от такового в клетке и в других вирусных системах. В клетке гамма-фосфатазная активность отщепляет 5'-концевой фосфатный остаток мРНК (с образованием ppРНК), а гуанилилтрансфераза формирует комплекс с GMP и переносит гуанозин-монофосфат на ppРНК. В системах альфа-подобных вирусов вирусная МТ метилирует свободный GTP, который гуанилилтрансфераза затем присоединяет через пирофосфатную связь к 5'-концевому нуклеотиду РНК (глава 4.3.1).

Общей проблемой транскрипции и репликации вирусов с негативным РНК геномом является то обстоятельство, что матрица покрыта белком нуклеокапсид. Считается, что при инициации транскрипции (и последующих стадиях) димер белка Р в составе транскрипционного комплекса, взаимодействуя с N-РНК, временно смещает одну или две субъединицы N, делая участок матрицы свободным для копирования. Другое важное обстоятельство связано с тем, что кепированные и полиаденилированные мРНК рабдовирусов не одеваются белком нуклеокапсид (даже если свободный белок N доступен). Это объясняется тем, что ни одна из мРНК, как вытекает из схемы их синтеза, не содержит сигнала упаковки, расположенного на 5'-конце геномной и антигеномной РНК (рис. 50). Транскрипт *l* содержит такой сигнал и одевается белком N (рис. 50).

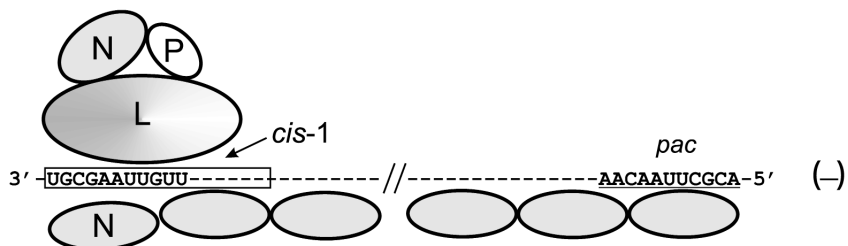
Элонгация и терминация транскрипции. Элонгация синтеза мРНК продолжается до тех пор, пока транскрипционный комплекс не начнет копировать олигоуридиловый участок в стоп-сигнале транскрипции. Полиаденилирование транскрипта гена N на матрице олиго(U) происходит с помощью механизма «проскальзывания» или «повторного копирования», который подразумевает случайное прекращение транскрипции после синтеза поли(A) длиной 20–80 нт и отделение транскрипционного комплекса от матрицы.

Сигнал терминации транскрипции лидерной РНК неизвестен. Поскольку этот короткий транскрипт не полиаденилирован, очевидно, сигнал терминации транскрипции лидера должен отличаться от стоп-сигналов в межгенных областях.

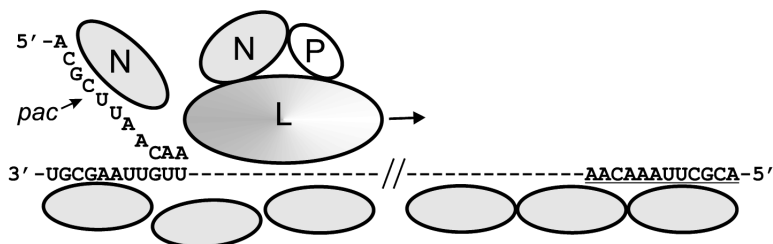
Регуляция транскрипции. Регуляцию транскрипции рабдовирусов объясняют с помощью модели прерывистой транскрипции («эстафетной гонки», relay race). Следует вспомнить, что в межгенных участках РНК рабдовирусов стоп-сигнал транскрипции и сигнал инициации транскрипции находятся рядом в последовательности 3'-A/CUACUUUUUUU---UUGUCDNUAG. После терминации транскрипции гена N транскрипционный комплекс с вероятностью около 70% может пересечь на соседний *cis*-сигнал инициации и начать синтез мРНК для гена Р. Подобным образом осуществляется прерывистая транскрипция генов М, G и L. В итоге синтезируется набор транскриптов по убывающему молярному градиенту: N>P>M>G>L (рис. 50). Такая регуляция отражает неодинаковую потребность в каждом вирусном белке: так, белок N требуется в стехиометрических количествах (для формирования нуклеопротеина нужно около 1300 субъединиц N на молекулу РНК), а РНК полимеразы — в энзиматических (одна или несколько молекул L на молекулу РНК). Интересно, что успешная транскрипция зависит от реакции кепирования вирусных мРНК. Кеп-дефицитные мутанты VSV *in vitro* эффективно продуцировали лидерную РНК, но создавали абберантные варианты мРНК гена N за счет узнавания «криптических» старт- и стоп-сигналов транскрипции в этом гене. Такие мутанты были нежизнеспособны в культуре клеток.

Репликация генома рабдовирусов. На определенной стадии вирусная система должна переключиться на процесс репликации и создать полноразмерную антигеномную матрицу, пригодную для синтеза геномных (–)цепей РНК (рис. 50, 52). Для этого синтез должен начаться с самого 3'-конца (–)РНК (на сигнале *cis*-1) и осуществляться таким образом, чтобы РНК-полимераза игнорировала стоп-сигналы транскрипции. Это происходит при условии трансляции генов N и Р. Образуется

A



B



C

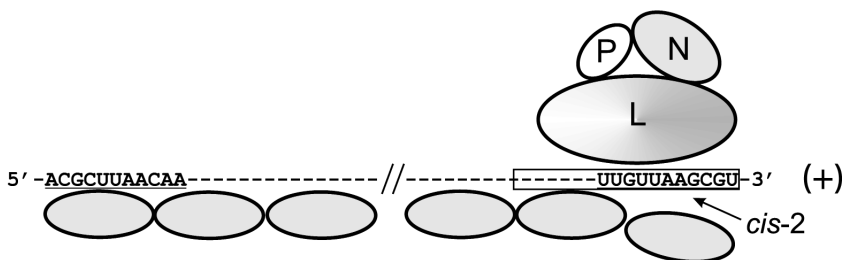


Рис. 52. Модель синтеза антигеномной (+)РНК и геномной (-)РНК рабдовирусов. Показаны комплементарные участки на концах РНК, входящие в состав сигналов репликации (*cis-1* и *cis-2*, взяты в прямоугольные рамки) и сигнала упаковки (*pac*, последовательность в геномной цепи подчеркнута). А — репликативный комплекс L-P-N узнает сигнал *cis-1* в геномной (-)цепи РНК. В — синтез 5'-концевого участка антигеномной цепи воссоздает сигнал *pac*, и строящаяся цепь (+)РНК одевается белком N. С — полноразмерная антигеномная цепь содержит на 3'-конце сигнал *cis-2*, который узнается репликативным комплексом с последующим синтезом дочерних геномных РНК.

репликативный комплекс, состоящий из белков L, P и N⁰. Возможно, именно такой состав репликазы способствует беспрепятственной элонгации репликации. Другой важный фактор, влияющий на переключение с транскрипции на репликацию — это накопление свободного белка N⁰), узнающего сигнал инкапсидации в растущей (+)цепи и немедленно одевающего эту цепь РНК (рис. 52). Поскольку транскрипционный комплекс также способен узнавать главный промотор на 3'-конце генома и транскрибировать область «лидера» *l*, его «профнепригодность» для синтеза антигеномной цепи проявляется именно на стадии элонгации, а не инициации синтеза РНК.

При элонгации репликативный комплекс игнорирует сигналы терминирования транскрипции и включает на матрице (U)₇ в антигеномную цепь (A)₇. Приводилось такое простое объяснение — «заикание» репликазы на межгенном участке олиго(U) (и, как следствие, полиаденилирование и терминация транскрипции) требует ее движений назад и вперед на матрице (–)РНК, которые возможны, если строится «голая» мРНК, но физически затруднены, если комплементарная (+)РНК одевается белком N. Итак, репликативная элонгация проходит до конца матрицы. Синтезируется полноразмерная антигеномная цепь, несущая на концах такие же комплементарные участки, как и геномная РНК (рис. 52).

Полноразмерная (+)РНК используется в качестве матрицы для образования потомства геномных (–)РНК по сходной модели (рис. 52). В этом процессе также участвует репликативный комплекс L-P-N. Как и в других вирусных системах, рассмотренных ранее, синтез антигеномной и геномной РНК у рабдовирусов ассиметричен — на одну молекулу (+)РНК синтезируется около 50 молекул (–)РНК. По-видимому, это объясняется различиями в силе промоторов *cis*-1 и *cis*-2. Хотя 3'-концевые участки из 8–11 нт геномной и антигеномной РНК идентичны, прилегающие последовательности, входящие в состав промоторов, отличаются друг от друга. Это обстоятельство скорее всего определяет различия в эффективности сигналов на 3'-концах геномной и антигеномной РНК.

Цитология репликации. Инфекция RabV в клетках мозга сопровождается образованием сферических телец включения диаметром 2–10 мкм, так называемых «телец Негри». Тельца образуются из двойной мембраны эндоплазматического ретикулума и содержат мРНК, геномную и антигеномную РНК, белки N, P и L, но не M и G. РНК вируса не выявляются в каких-либо других компартментах и цитоплазме. Таким образом, тельца Негри являются специфическими компартментами, индуцируемыми вирусной инфекцией, в которых происходит синтез РНК.

При инфекции VSV также образуются тельца сходной морфологии. Локализация РНК в клетке меняется во времени — первичная транс-

крипция происходит в цитоплазме, и только накопление вновь синтезированных белков индуцирует образование сферических мембранных телец, в которых происходит вторичная транскрипция и репликация. Возможно, такой ранний этап цитоплазматической транскрипции существует и при инфекции RabV (было бы логично допустить, что это так), но наблюдать его не пока удалось.

Существует важное различие между тельцами включения рабдовирусов и мембранными везикулами, в которых происходит репликация вирусов с (+)РНК геномом. В первом случае, очевидно, тельца образуются после этапа первичной транскрипции в цитоплазме, и на ранней стадии геномная РНК достаточно надежно защищена белком нуклеокапсида от нуклеаз и рецепторов механизмов врожденного иммунитета. При инфекции вирусов с (+)РНК геномом мембранные везикулы образуются сразу после трансляции и экспрессии репликативных белков, которые модифицируют мембраны. Вполне возможно, что репликативные комплексы рабдовирусов находятся в тельцах включения «в свободном плавании», без непосредственного контакта с мембраной. Эти вопросы заслуживают дальнейшего изучения.

5.2. Парамиксовирусы

Общие сведения. Представители сем. *Paramyxoviridae* являются возбудителями болезней теплокровных животных — человеческого, бычьего и мышинного парагриппа, кори, свинки и др. Парамиксовирусы имеют сферические или полиморфные вирионы 150–350 нм в диаметре, окруженные липопротеидной оболочкой. Внутри содержится спиральный нуклеопротеид, построенный из белка N и геномной РНК (15–19 т.н.) С нуклеопротеидом связаны репликаза L, фосфопротеин Р и матриксный белок М. Внешняя оболочка содержит гликопротеины HN (или G) и F (fusion protein). Как и в случае рабдовирусов, инфекционный цикл парамиксовирусов происходит в цитоплазме клетки.

Структура генома. Геном парамиксовирусов содержит лидерную и трейлерную области (несущие на концах комплементарные участки) и комплементы генов N, P, M, HN, F и L (рис. 53). Несмотря на сходство устройства геномов, между рабдовирусами и парамиксовирусами есть существенные различия. Во-первых, геном парамиксовирусов содержит не один, а два гена гликопротеинов наружной мембраны — F (отвечающий за слияние вируса с клеткой) и HN (вирусный рецептор, обладающий активностями нейраминидазы и гемагглютинирина). Во-вторых, транскрипция гена P парамиксовирусов сопровождается «редактирова-

нием РНК» и синтезом дополнительных мРНК. Наконец, в отличие от рабдовирусов, у которых белок N контактирует *в среднем* с 9 нт РНК, у большинства парамиксовирусов субъединица белка N взаимодействует строго с 6 нт РНК. Соблюдается так называемое «правило шести»: число остатков в геномной, антигеномной или дефектной интерферирующей РНК всегда кратно шести, и только такая РНК может быть компетентной матрицей для репликации.

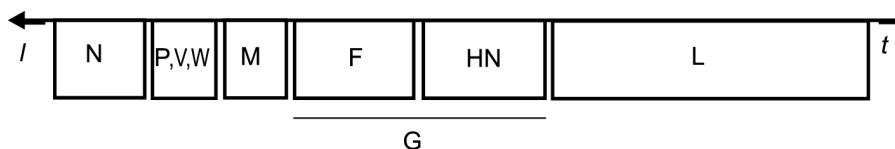


Рис. 53. Структура генома парамиксовируса (на примере вируса мышинного парагриппа; синоним — вирус Сендай, SeV). Показаны компоненты генов белка нуклеокапсиды N, фосфопротеина Р (редактирование этого гена дает мРНК для белков V и W), матричного белка M, гликопротеинов F и HN, РНК полимеразы L. Утолщенные отрезки, лидерная и трейлерная последовательности на концах РНК.

Ферментативный аппарат репликации и транскрипции. Как и в системах рабдовирусов, белок L парамиксовирусов имеет активности РНК-зависимой РНК полимеразы и кепирующего фермента (GT и MTR). Репликативный комплекс состоит из одной субъединицы L и тетрамера фосфопротеина Р. Сведений о клеточных белках, входящих в состав репликативных или транскрипционных комплексов парамиксовирусов, получено не было. Однако функционирование репликативных комплексов непрямым образом связано с некоторыми хозяйскими белками. В частности, тубулин взаимодействует с репликазой SeV и вируса кори (measles virus, MeV). Эти взаимодействия необходимы для успешной репликации и транскрипции. Высказывалось предположение, что белки цитоскелета служат физическим «якорем» для вирусной репликазы. Протеин киназа В (Akt) также влияет на эффективность транскрипции и репликации парамиксовирусов. Фосфорилированный посредством Akt вирусный Р белок входит в состав репликативного комплекса и регулирует его работу.

Cis-элементы генома. Главные промоторы синтеза антигеномной и геномной РНК (*cis-1* и *cis-2*) парамиксовирусов состоят из двух частей. Во-первых, это последовательности 30 нт с 3'-конца геномной РНК и антигеномной РНК. Во-вторых, тройные повторы, взаимодействующие субъединицами белка N 13–16 (рис. 54). Повторы имеют консенсус

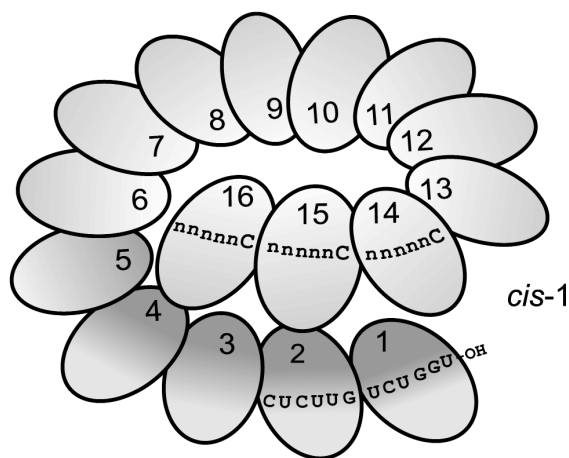
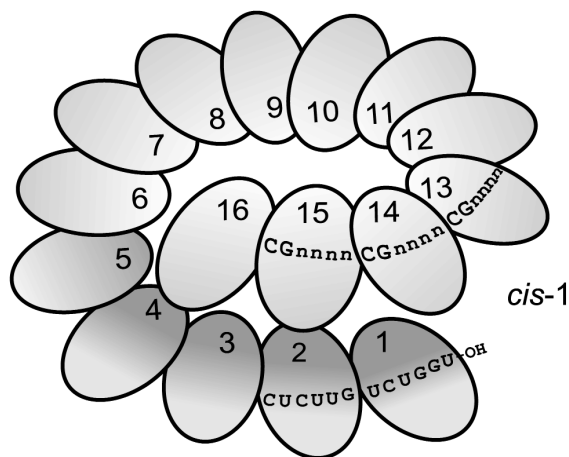
A**B**

Рис. 54. Структура главного промотора синтеза антигеномной цепи (*cis-1*) в геноме парамиксовирусов: **A** — SeV, MeV, HPIV1 и HPIV3; **B** — MuV, SV5, HPIV2 и HPIV4. Показаны полтора витка спирали нуклеопротейна (нумерация субъединиц N с 3'-конца геномной РНК). Промотор состоит из двух частей — последовательности 30 нт с 3'-конца (показана консервативная последовательность первых 12 нт) и повторов 3'-(C>NNNNN)₃ или 3'-(N>NNNGC)₃.

3'-(C₄N₄)₃ в геномах SeV, MeV и вирусов человеческого парагриппа 1 и 3 (HPIV1 и HPIV3) (рис. 54А), или 3'-(NNNNGC)₃ в геномах вируса свинки (MuV), человеческого парагриппа 2 и 4 (HPIV2 и HPIV4), и обезьяньего вируса 5 (SV5) (рис. 54В). Повторы 3'-(C₄N₄)₃ и 3'-(NNNNGC)₃ находятся в контакте с субъединицами N 14–16 и 13–15, соответственно. Первый и второй элементы промотора сближены в структуре нуклеопротеида, что позволяет их одновременное распознавание репликативным комплексом (рис. 54). Дистанция между ними и точное взаимодействие повторов с субъединицами N (гексамерная фаза) являются критическими для репликации.

Инициация, элонгация и терминация транскрипции. Репликативный комплекс L-P₄ узнает главный промотор синтеза антигеномной цепи и начинает транскрипцию области «лидера». Синтезируется короткая РНК I, лишенная кепа и поли(А). Репликативный комплекс реиницирует синтез мРНК на сигнале инициации транскрипции перед геном N (для этого и последующего генов сигналы инициации значительно отличаются). Затем L-P₄ кепирует транскрипт и завершает его синтез на сигнале терминации транскрипции, включающем олигоуридилат, с помощью механизма повторного копирования. При этом на 3'-конце мРНК N синтезируется гетеродисперсная поли(А) (до 100 нт). Далее репликативный комплекс либо диссоциирует от матрицы, либо, пропуская нетранскрибируемый участок (от 3 до 30 нт), иницирует синтез мРНК на следующем сигнале инициации транскрипции по такому же механизму: кепирование, элонгация, синтез поли(А) на матрице олигоуридилата, терминация. В результате синтезируется градиент парамиксовирусных мРНК N> P> M> HN> F> L.

Особенности терминации транскрипции гена М. Многие парамиксовирусы используют дополнительный элемент регуляции синтеза мРНК — проскок сигнала терминации транскрипции между генами М и F, приводящий к снижению синтеза моноцистронной мРНК для белка F. В системе HPIV1 игнорирование сигнала терминации транскрипции гена М зависит от соседних участков нуклеотидной последовательности в межгенном участке, репрессирующих терминацию. Возможно, подавление синтеза белка F (а также продуктов «нижележащих генов HN и L) приводит к снижению титра вирусных частиц и повышению персистенции парамиксовирусной инфекции.

Редактирование РНК. В системах парамиксовирусов используется механизм «редактирования РНК» (или транскрипционный сдвиг рамки считывания) при транскрипции гена Р, в результате которого синтезиру-

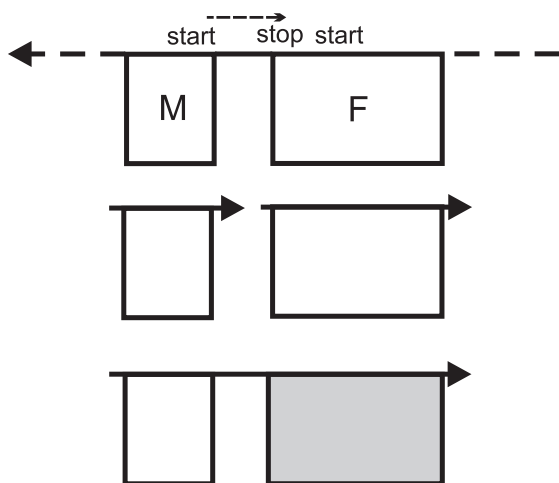


Рис. 55. Супрессия тер-минации транскрипции гена М парамиксовирусов (тонкая пунктирная стрелка), приводящая к синтезу фракции бици-стронных мРНК М-Ф, в которых ген F (затемнен-ный прямоугольник) не-доступен для трансляции. В результате concentra-ция активных мРНК для F (и, как следствие, также мРНК для HN и L) снижа-ется.

ются 2 или 3 формы белка с идентичными N-концевыми последовательностями и отличающимися С-концевыми последовательностями. У вируса Сендай транскрипция гена Р дает три типа мРНК в соотношении 70:25:5, направляющих синтез Р, V и W белков (рис. 56). При синтезе мРНК V в сайте редактирования 3'-UUUUUCCС напротив матричного остатка С-2784 (подчеркнут) вставляется дополнительный остаток G, что приводит к +1 сдвигу рамки считывания, а при синтезе мРНК W в этом сайте включаются два дополнительных остатка G (+2 или -1 сдвиг рамки считывания) (рис. 56). Белок V, имеющий идентичную с белком Р N-концевую последовательность и уникальную С-концевую последовательность, блокирует клеточные защитные механизмы, связанные с индукцией интерферона, но не является необходимым белком для репликации и не включается в вирусные частицы. Белок W представляет собой N-концевой домен Р; его функции неизвестны.

Сигналы редактирования в генах Р парамиксовирусов содержат консервативные пиримидин-богатые последовательности. В РНК-полимеразы вирусов с негативным РНК геномом заложена способность двигаться по матрице назад и вперед (в частности, объясняющая синтез поли(А) на матрице олигоуридилата при транскрипции). Очевидно, при этом сдвигается и участок цепи РНК транскрипта, находящийся в дуплексе с матрицей геномной РНК.

При транскрипции гена Р SeV возникает пауза на сигнале редактирования (UUUUUCCС). Сдвиг участков цепей на один шаг (нуклеотид) назад создаёт достаточно стабильный дуплекс, в котором занята одна неканоническая G-U пара, и поэтому в 25% мРНК может вклю-

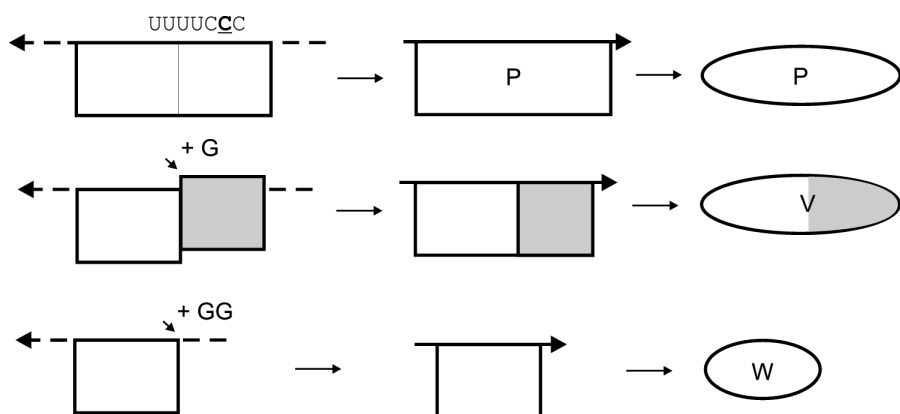


Рис. 56. Редактирование РНК в гене Р вируса Сендай. Каноническая транскрипция продуцирует мРНК для гена Р. Фосфопротеин показан овалом. Включение дополнительного остатка гуанозина на матричной последовательности UUUUCC (остаток С в точке редактирования подчеркнут и отмечен вертикальной линией) дает мРНК, в которой реализуется транскрипционный сдвиг рамки считывания, создавая мРНК для гена V. Включение двух остатков гуанозина в этой точке создает мРНК для укороченной версии Р (белка W).

SeV	3' – GAGUUGUUUUUCC	+1 G
NDV	UUACGAUUUUUCC	
SV5	CUAAAAUUCUCCCC	
MuV	CUAAAAUUCUCCCC	+2 G
HPIV2	UAUAAAUUCUCCCCC	
HPIV4	UAUAAAUUCUCCCCC	
BPIV4	CCUAAAUUUUUUCCCC	от +1 до +6 G

Рис. 57. Последовательности (–)РНК гена Р, предвещающие сайт редактирования, и варианты редактирования мРНК у парамиксовирусов Сендай (SeV), вируса болезни Ньюкасла (NDV), обезьяньего вируса 5 (SV5), вируса свинки (MuV), вирусов человеческого парагриппа 2 и 4 (HPIV2, HPIV4) и вируса бычьего парагриппа 3 (BPIV3).

чаться один нематричный остаток G. По-видимому, сдвиг на два шага назад, при котором должны образоваться две G-U пары, создает менее стабильный дуплекс, и включение двух остатков гуанозина происходит с вероятностью до 5%. В гене Р вируса свинки (MuV), напротив, сдвиг на «скользящей» последовательности на один шаг назад «запрещен» (образуется некомплементарная пара A-C), а на два шага — возможен (образуется одна пара G-U). Однако, не всё так просто. У вируса бычьего парагриппа 3 «скользящая последовательность» направляет включение в комплементарную цепь мРНК от одного до шести остатков гуанозина, и при этом сдвиги при смещении цепей предполагают создание нескольких пар G-U. В результате синтезируется около 35% «неотредактированной» мРНК Р и 65% мРНК, несущих вставки от 1 до 6 дополнительных остатков гуанозина.

Возможно, количество включаемых остатков гуанозина зависит не только от прочности дуплексов, образуемых при смещении цепей, но и от последовательности, находящейся выше сайта редактирования. По одной из предложенных моделей, в системах SeV, MuV и большинства других парамиксовирусов пауза в сайте редактирования возникает один раз, разрешается включением 1 или 2 остатков G, и далее происходит процессивное копирование (–)цепи. В сайте редактирования BPIV3 пауза, напротив, может возникать с высокой вероятностью несколько раз.

Репликация генома парамиксовирусов. Репликативный комплекс L-P₄ узнает главный промотор синтеза антигеномной цепи *cis-1* (рис. 54) и инициирует синтез антигеномной цепи. При наличии свободных белков N и Р растущая цепь одевается комплексом N–Р, подобно тому, как это происходит при репликации рабдовирусов; рис. 52). При этом игнорируются стоп- и старт-сигналы транскрипции и сигнал редактирования в гене Р. Элонгация синтеза антигеномной цепи идет процессивно до конца матрицы геномной РНК.

При инициации синтеза потомства геномных РНК репликативный комплекс узнает главный промотор *cis-2* на 3'-конце антигеномной РНК (или, вернее, нуклеопroteина антигеномной РНК). Очевидно, *cis-2* является более сильным промотором, чем *cis-1*. В результате реализуется асимметричный синтез (+) и (–)цепей (примерно 1:100).

Одевание строящейся цепи белком N не только ограничивает «возвратно-поступательные» движения репликативного комплекса на матрице. «Правило шести» исключает делеции и вставки в полно-размерные (+) и (–)цепи РНК. Компетентная матрица для репликации должна быть покрыта белком N от первого до последнего нуклеотида. Если произойдет вставка или делеция 1–5 нт в цепь, то матрица РНК не пройдет своего рода «технический контроль». «Правило шести» исклю-

чает из репликации не только молекулы РНК, несущие случайные делеции и вставки, но и уравнивает заложенную в систему возможность направленного мутагенеза (редактирования) и повторного копирования олигоуридилатов.

5.3. Филовирусы

Представители семейства *Filoviridae*, вирусы Эбола (EboV) и Марбург (MarV), являются возбудителями геморрагических лихорадок приматов — и одними из наиболее опасных вирусов человека. Вирусные частицы имеют вытянутую бацилловидную форму диаметром ~80 нм и длиной 670–800 нм (морфология может варьировать — встречаются нитевидные, кольцевые и U-образные типы частиц). Как и в случае других *Mononegavirales*, внутренний нуклеопротеид окружен липидной оболочкой. Репликация происходит в цитоплазме.

Геном филовирусов (~19 000 нт) несет в направлении 3'-5' комплементы генов N (белок нуклеопротеина), Р (кофактор РНК полимеразы), М1 (основной матриксный белок), G (гликопротеин), VP30 (активатор транскрипции), М2 (минорный матриксный белок) и L (РНК полимеразы, возможно, также выполняющая функции МТ и GT). Геном фланкирован нетранслируемыми областями *l* и *t*, имеющими комплементарные участки на концах.

Механизмы транскрипции и репликации геномов филовирусов, по имеющимся данным, принципиально сходны с подобными механизмами в системах рабдовирусов и парамиксовирусов. Транскрипция филовирусов происходит линейно, по каскадному механизму, и управляется стартом и стоп-сигналами транскрипции. В результате синтезируется градиент кепированных и полиаденилированных мРНК N>P>M1>G>V30>M2>L. Репликация требует синтеза белка N⁰. Единственным отличием является механизм синтеза полноразмерного белка G EboV, требующий редактирования и включения дополнительного остатка аденозина на «скользящей последовательности» 3'-AUUUUUUU. В системе MarV редактирование при транскрипции гена G или других генов не используется.

5.4. Борнавирусы

Общие сведения. Представители сем. *Bornaviridae* вызывают заболевания нервной системы у птиц, лошадей и овец, и, возможно, имеют отношение к некоторым психиатрическим патологиям у человека. Типовой представитель — вирус болезни Борна, BDV (от нем. «Bornasche

Krankheit» — болезнь была впервые обнаружена близ города Борна в Германии). В культуре клеток и организме высших животных размножение развивается по нелитическому и персистентному пути. Сферические частицы BDV (диаметр 90–100 нм) построены из спирального нуклеопротеида, с которым ассоциированы репликативные белки, и внешней липопротеидной мембраны, содержащей вирусный гликопротеин. Репликация и транскрипция борнавирусов происходит в ядре зараженной клетки. Борна-подобные элементы встроены в ДНК позвоночных и беспозвоночных животных. При репликации РНП борнавирусов тесно ассоциированы с хроматином, транскрипция зависит от белка HMGB1 (ремоделирующий белок хроматина), и при митозе вирусные нуклеопротеины переходят в ядра дочерних клеток. Таким образом, борнавирусы выработали уникальный хромосомо-зависимый жизненный цикл, обеспечивающий стабильную внутриядерную инфекцию.

Особенности структуры генома. Геном BDV представлен одноцепочечной линейной (–)РНК, состоящей из 8900 нт и несущей, в направлении 3′-5′, комплементы генов белка нуклеокапсид (N), регуляторного белка (X), фосфопротеина (P), матриксного белка (M), гликопротеида наружной мембраны (G) и РНК полимеразы (L) (рис. 58). На 3′- и 5′-концах геномной РНК имеются комплементарные последовательности из 18 нт. 99,4% генома BDV транскрибируются и представлены в составе субгеномных мРНК. Существенной особенностью генома BDV является перекрывание (комплементов) генов (в геномах рабдовирусов и парамиксовирусов гены разделены нетранскрибируемыми участками, рис. 46 и 53).

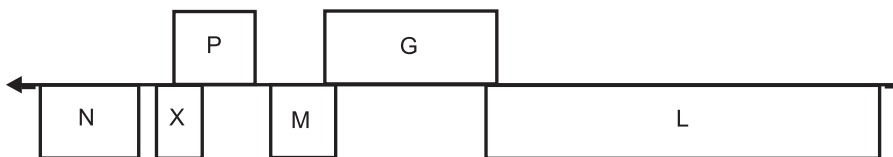


Рис. 58. Структура РНК генома борнавируса.

Общая схема транскрипции и репликации генома. После попадания в клетку нуклеопротеид BDV транспортируется в ядро. Ассоциированные с нуклеопротеидом белки L и P транскрибируют геномную РНК. Часть транскриптов подвергается сплайсингу с участием клеточных белков. Кепированные и полиаденилированные мРНК экспортируются в цитоплазму и транслируются. Белки N, X, P и L импортируются в ядро. Репликация начинается при условии накопления в ядре опреде-

ленной концентрации вновь синтезированного N⁰. Синтезируется полноразмерная антигеномная цепь, служащая матрицей для синтеза потомства геномных РНК. Нуклеопротеиды геномной РНК в комплексе с белками Р и L экспортируются в цитоплазму, где происходит созревание вирионов.

Ферментативный аппарат репликации. Репликация и транскрипция осуществляются комплексом белков L и Р. Белок L является РНК-зависимой РНК полимеразой и содержит обширные области гомологии с L белками рабдовирусов и парамиксовирусов. О кепирующей активности L BDV, или о присутствии в его аминокислотной последовательности консервативных мотивов MT и GT, сведений нет. Фосфопротеин Р, как и в системах других представителей *Mononegavirales*, входит в состав репликативного комплекса и необходим для транскрипции и репликации. Белок Р BDV содержит два сигнала ядерной локализации (NLS). По некоторым данным, на транскрипцию борнавирусов также влияет белок ремоделирования хроматина HMGB1.

Белок N BDV не является собственно «компонентом репликативного комплекса». Он оказывает косвенное, но существенное влияние на репликацию — одевает растущую антигеномную и геномную цепь, что позволяет супрессировать стоп-сигналы транскрипции. Белок N несет сигналы ядерной локализации и ядерного экспорта (NES). X, небольшой белок из 87 аминокислот, взаимодействует с белком Р и способствует его олигомеризации; регулирует работу РНК полимеразы L; влияет на ядерный импорт и экспорт РНК и/или нуклеопротеидов. Кроме того, X специфически связывается с мембранами митохондрий и подавляет апоптоз по каспазному пути.

Инициация, элонгация и терминация транскрипции. Как и в системах рабдовирусов и парамиксовирусов, транскрипция борнавирусов происходит по каскадному механизму. В геномной РНК имеется три промотора (S) и четыре терминатора транскрипции (T), направляющие синтез индивидуальных мРНК за счет альтернативной инициации и терминации транскрипции (рис. 59). Сигналы терминации транскрипции T1-T4 представлены последовательностью A(U)₆ или A(U)₇.

Транскрипция генов G и L, как и M, иницируется на промоторе S3, но, в отличие от M, регулируется механизмом сплайсинга (рис. 59). Проскок сигналов терминации T1, T2 и T3 характерен для борнавирусной системы, в отличие от других *Mononegavirales*, где подобное событие реализуется лишь у некоторых вирусов (глава 5.2) и не для всех генов. Аттенуация стоп-сигналов снижает эффективность синтеза мРНК для всех генов, кроме N, и может быть одним из факторов, определя-

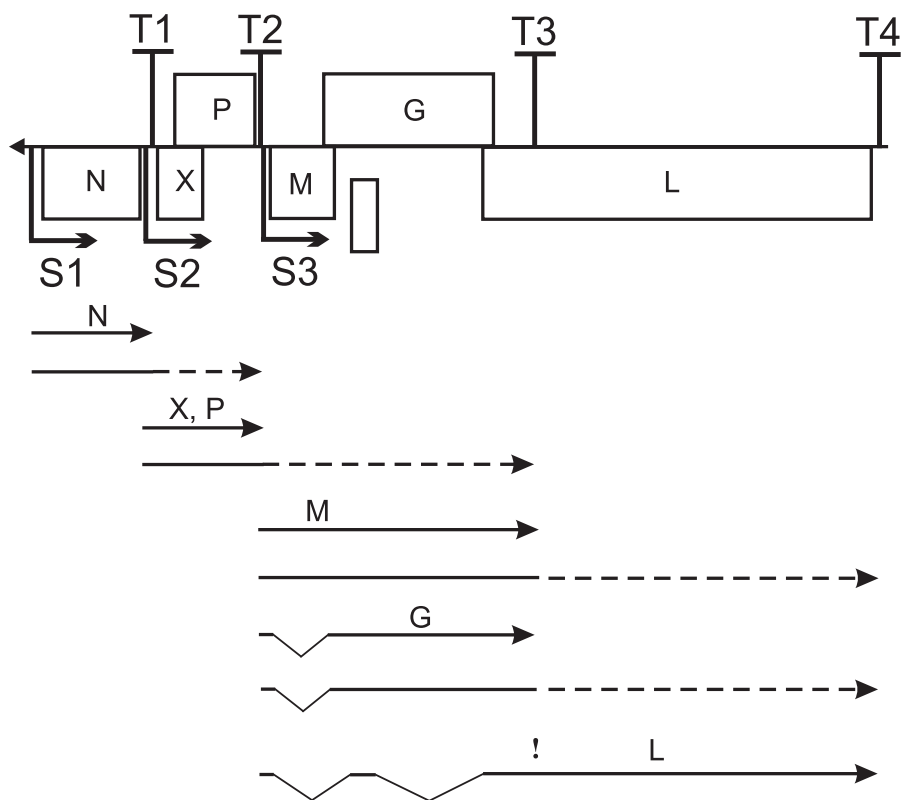


Рис. 59. Схема транскрипции генома борнавируса. S1–3, T1–4 — сигналы инициации и терминации транскрипции, соответственно. Внизу схемы показаны транскрипты мРНК. 3'-концевые «довески», образуемые в результате аттенюации T1, T2 и T3, изображены пунктирными линиями, за исключением мРНК для L, синтез которой требует инвариантного проскока T3 (отмечен восклицательным знаком).

ющих персистентный характер инфекции BDV. Однако, аттенюация стоп-сигналов в борнавирусной системе не всегда «одна из возможностей». Синтез мРНК для L обязательно включает проскок сигнала терминации транскрипции T3 (рис. 59).

Репликация РНК борнавирусов. Рассматривая репликацию генома борнавирусов, следует иметь в виду два интригующих обстоятельства. Во-первых, на 3'-конце геномной и антигеномной РНК BDV содержится «выступающая» последовательность ACAА, не имеющая матрично-

го аналога на 5'-конце противоположной цепи. Во-вторых, «утопленные» 5'-концевые остатки гуанозина обеих цепей несут монофосфат, а не трифосфат (рис. 60А).

А

геномная (-) РНК

3' -ACAACGCAAUUGUUGU ... ACAACAUCGCGp-5'

5' -pGCGUUAACAACA ... UGUUGUAGCGCAACA-3'

антигеномная (+) РНК

В



Рис. 60. А — структура концов геномной и антигеномной РНК BDV. В — синтез антигеномной цепи. Инициация происходит на втором с 3'-конца остатке С матрицы (подчеркнут). После завершения синтеза (+)РНК происходит перестроение ее 3'-конца, достройка цепи на внутреннем мотиве 5'-UGUU-3' (выделен жирным шрифтом) и терминация синтеза. На 5'-конце три нуклеотидных остатка удаляются эндонуклеазой с образованием 5'-монофосфата.

Репликация генома BDV происходит при условии накопления свободного белка N^0 и его импорта в ядро. При репликации комплекс L–P инициирует синтез антигеномной РНК на 3′-концевом главном промоторе (*cis*-1), начиная с включения остатка G на втором матричном остатке с 3′-конца геномной РНК (рис. 60B).

Синтезируется полноразмерная антигеномная цепь (рис. 60B). Далее происходит «перестроение» (realignment) 3′-конца антигеномной РНК, в результате которого копируется внутренний мотив 5′-UGUU, и на 3′-конце антигеномной РНК возникает «довесок» ААСА-3′. На 5′-конце три остатка удаляются гипотетической эндонуклеазой, и образуется 5′-монофосфат (рис. 60B).

Инициация синтеза дочерней геномной РНК происходит в результате узнавания сигнала *cis*-2 на 3′-конце антигеномной РНК. Поскольку репликация у борнавирусов, как и в других вирусных системах, асимметрична (синтез геномных цепей существенно превышает синтез антигеномных), следует допустить, что *cis*-2 является более сильным промотором, чем *cis*-1. Хотя оба сигнала содержат идентичные 3′-концевые участки (рис. 60А), вышележащие последовательности в них различаются, что может определять разницу в эффективности. Полноразмерная геномная РНК синтезируется по сходному механизму и подвергается таким же модификациям, что и антигеномная РНК (рис. 60B) — в результате перестроения и копирования мотива 5′-UGUU к 3′-концу добавляется «довесок» 3′-ААА, а 5′-конец процессируется эндонуклеазой с образованием терминального монофосфата.

Данная модель (частично подтвержденная экспериментально) дает изящное объяснение появлению четырех «лишних» остатков на 3′-конце геномной и антигеномной цепей, а также возникновению монофосфорилированного остатка гуанозина на 5′-конце. Вместе с тем, ряд вопросов пока остается без ответа. Неизвестна природа эндонуклеазы (обладает ли этой активностью L или другой вирусный или хозяйский белок?) Что определяет остановку синтеза после перестроения и копирования тетрануклеотидного мотива? Занят ли в этом процессе комплекс L–P, или его осуществляют (или принимают в нем участие) клеточные ядерные белки?

Синтез антигеномной и геномных РНК, несущих 5′-концевой монофосфат, позволяет борнавирусам избежать включения механизмов врожденного иммунитета, опосредуемых клеточным рецептором RIG-1. Известно, что специфическое связывание RIG-1 с РНК, несущими 5′-трифосфат (к которым относятся и РНК рабдовирусов и парамиксовирусов), включает промотор интерферона-бета. Было экспериментально показано, что RIG-1 не взаимодействует с 5′-монофосфорилированной РНК борнавируса. Это обстоятельство, наряду с уже упоминавши-

мися транскрипционными механизмами снижения уровня экспрессии вирусных генов, может объяснять «скрытый» (персистентный) характер инфекции BDV.

Цитология репликации. Инфекция BDV вызывает характерные цитопатологические изменения в ядрах нейронов, в частности образование телец Йоста-Дегена (Joest-Degen), паракристаллических агрегатов и нитевидных пучков. В тельцах Йоста-Дегена была обнаружена вирусная РНК. Эти данные могут указывать на их связь с репликацией борнавирусов.

5.5. Ортомиксовирусы

Общие сведения. Семейство *Orthomixoviridae* включает семь родов, четыре из которых представлены, соответственно, вирусами гриппа А, В, С и D, вызывающими острые инфекции человека и теплокровных животных. Представители трех других родов поражают рыб (*Isavirus*) или являются арбовирусами, способными реплицироваться и в клетках насекомых-переносчиков, и теплокровных (*Thogotovirus*, *Quarantavirus*). Репликация генома ортомиксовирусов происходит в ядре зараженной клетки. Ортомиксовирусы имеют полиморфные вирионы диаметром 80–120 нм, состоящие из внутреннего нуклеопротеина и внешней липопротеидной оболочки. Частицы содержат от 6 до 8 сегментов геномных (–) РНК. Наиболее детально изучен вирус гриппа А (*influenza A virus*, IAV), который будет далее рассматриваться в этой главе.

Структура генома. Геном IAV состоит из восьми (–)РНК длиной от 900 до 2300 нуклеотидов, которые кодируют не менее 12 белков. Дополнительные продукты образуются в результате альтернативного сплайсинга (на уровне транскрипции), а также реинициации и «слабого сканирования» (на уровне трансляции). 5'-концы всех восьми геномных РНК IAV несут идентичные последовательности длиной 12 нуклеотидов, а 3'-концы — комплементарные им участки. Каждый геномный сегмент является моноцистронным, т.е. содержит комплемент одного вирусного гена (рис. 61).

Геномные сегменты 1–3 кодируют компоненты вирусной репликазы PB1, PB2 и PA (от англ. protein basic и protein acidic).

НА (гемагглютинин, сегмент 4) и NA (нейраминидаза, сегмент 6) — гликопротеиды наружной мембраны, выполняющие роль вирусных рецепторов. Белок NP (сегмент 5) по своим функциям эквивалентен белку N у *Mononegavirales*. Он формирует спиральный нуклеокапсид и участвует в переключении процессов транскрипции и репликации.

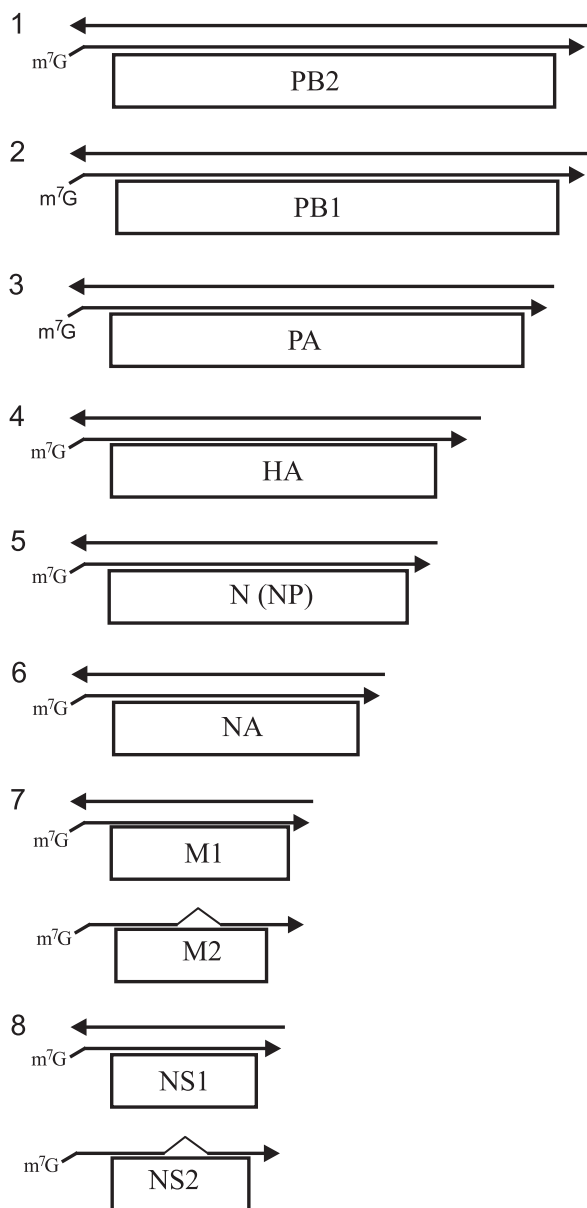


Рис. 61. Структура генома вируса гриппа А. Показаны геномные РНК (с соблюдением принятой нумерации сегментов) и мРНК, кодирующие структурные и неструктурные белки.

М1 (сегмент 7) — матриксный белок, выстилающий липидную мембрану вириона изнутри (считается, что это придает мембране необходимую жесткость) и взаимодействующий с нуклеопротеидом. Белок М2 синтезируется с помощью сплайсинга, который требует участия NS1 белка. М2 является интегральным белком вирионной мембраны и имеет активность ионного канала, необходимую для эффективного внедрения вируса в клетку.

Неструктурный белок NS1 (сегмент 8) синтезируется в значительных количествах и обнаруживается в основном в ядре, где регулирует процессинг и сплайсинг вирусных мРНК (по-видимому, во взаимодействии с кофактором, клеточной РНК хеликазой А). NS1, совместно с клеточными РНК-хеликазами UAP56 and URH49, также участвует в экспорте из ядра зрелых вирусных мРНК. Белок NS2, синтезируемый за счет альтернативного сплайсинга (рис. 61), влияет на вирусную транскрипцию и репликацию, способствует экспорту из ядра вирусных нуклеопротеинов, а также взаимодействует с белком М1 и участвует в созревании вирионов.

Общая схема транскрипции и репликации генома. Геномные нуклеопротеиды IAV за счет сигналов ядерной локализации транспортируются в ядро, где происходит транскрипция с участием ассоциированного репликативного комплекса. Вирусные мРНК, некоторые из которых подвергаются сплайсингу, транспортируются в цитоплазму и транслируются. Вновь синтезированные вирусные белки транспортируются в ядро. На этой стадии может происходить переключение с транскрипции на репликацию и синтез полноразмерных антигеномных и геномных цепей РНК.

Ферментативный аппарат транскрипции и репликации. Репликативный комплекс IAV состоит из вирусных белков PA, PB1 и PB2. Белок PB1 обладает активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы и является ядром репликативного комплекса, взаимодействующим с PA и PB2. Белок PA является эндонуклеазой, отрезающей кепированные фрагменты клеточных мРНК (12–15 нт), которые затем используются как затравки для транскрипции (см. ниже). Белок PB2 осуществляет функции узнавания кеп-структуры клеточных мРНК, что необходимо для включения эндонуклеазной активности PA. Как и другие (неродственные) кеп-узнающие белки, PB2 связывает кеп-структуру с помощью механизма, в котором важную роль играют два остатка ароматических аминокислот, между которыми, как в сэндвиче, размещается 7-метилгуанозин. PA, PB1 и PB2 взаимодействуют между собой, влияя на конфор-

мацию друг друга, функции их переплетены, и каждый белок необходим для транскрипции и репликации. Репликативный комплекс вируса гриппа способен взаимодействовать с большим количеством клеточных белков, однако их функции в репликации не ясны.

Транскрипция генома ортомиксовирусов с использованием кепированных затравок. Понимание механизма транскрипции вируса гриппа пришло после долгих поисков. В 1963–64 гг. в работах Говарда Тёмина было показано, что репликация вируса саркомы Рауса угнетается актиномицином D (ингибитор РНК-полимеразы II). Тёмин высказал предположение, в те времена встреченное со значительным скепсисом, что репликация РНК RSV идет через образование ДНК-предшественника (открытие обратной транскрипции через несколько лет было отмечено Нобелевской премией). В то же время было показано подавление актиномицином D и репликации РНК вируса гриппа, на основании чего также выдвигалось предположение о существовании ДНК-предшественника в жизненном цикле ортомиксовирусов. Это объяснение оказалось неверным, хотя сам феномен не был артефактом. Для транскрипции вируса гриппа нужен постоянный синтез клеточных мРНК, угнетение которого приводило к ингибированию синтеза вирусных мРНК. Если у парамиксовирусов и рабдовирусов транскрипция может успешно осуществляться *in vitro* в присутствии нуклеопротеина, рибонуклеозидтрифосфатов и S-аденозилметионина, для транскрипционной системы вируса гриппа этих компонентов недостаточно. Синтез удается запустить добавлением динуклеотидной затравки рGrApprp-5' (все 8 сегментов генома IAV оканчиваются последовательностью рCpU_{OH}-3'), и в результате реакции синтезируется некепированная (+)РНК. Однако, при добавлении в систему интактной клеточной мРНК синтезируется кепированная вирусная мРНК. Разгадка состояла в том, что транскрипция генома вируса гриппа сопровождается «молекулярным канныбализмом» — от клеточных мРНК отрезаются кепированные фрагменты из 12–15 нуклеотидов, которые используются в качестве затравки для синтеза вирусных матриц.

Cis-элементы генома. РНК IAV, за счет комплементарности 5'- и 3'-концевых последовательностей, способны формировать структуру «ручки сковороды» (panhandle) или, по уточненным данным, структуру «штопора» (corkscrew) (рис. 62). В геномных РНК эта структура является консервативной частью промотора транскрипции и репликации IAV, который включает 26 нт с 3'-конца и 22 нт с 5'-конца каждой РНК (здесь: *cis*-1; рис. 62A). В антигеномных РНК создается сходная структура, выполняющая роль главного промотора синтеза геномных РНК

(*cis*-2; рис. 62В). Здесь возникает очевидное логическое неудобство — если геномные и антигеномные РНК покрыты белком NP, то каким образом возможны комплементарные взаимодействия? Возможное объяснение состоит в том, что оба конца «штопора» связаны с репликативным комплексом, который способен замещать белок нуклеопротеина на концевых участках РНК. Другое объяснение следует из данных по неравномерному одеванию РНК IAV белком NP — оказалось, что геномные сегменты содержат участки, способные взаимодействовать с белком с разной эффективностью. Определенные участки (включая терминальные последовательности) обладают низкой NP-связывающей способностью.

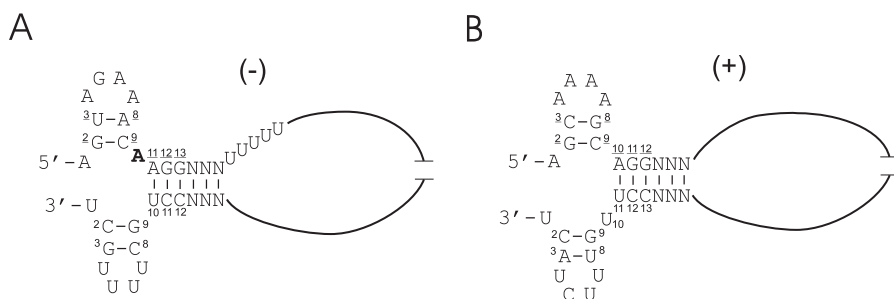


Рис. 62. «Штопорная структура» консервативной части промотора транскрипции и репликации *cis*-1 в геномных РНК (А) и промотора репликации *cis*-2 в антигеномных РНК (В) вируса гриппа. Ангулярный остаток аденозина выделен жирным шрифтом. N, нуклеотидные остатки, специфичные для индивидуальных сегментов генома. UUUUUU, сигнал полиаденилирования и терминации транскрипции. Нумерация остатков показана с 3'- и 5'-конца генома, для 5'-концевых остатков цифры подчеркнуты.

Последовательность *cis*-1 можно условно разделить на три части: (1) проксимальный элемент (первые 9 нуклеотидов с обоих концов РНК), (2) так называемый ангулярный нуклеотид (неспаренный А-10) и (3) дистальный элемент, состоящий из 6 пар нуклеотидов (рис. 62). Ангулярный остаток аденозина необходим для транскрипции, но не для репликации (если его удалить или поставить напротив него уридин, создав комплементарную пару, то транскрипция блокируется при сохранении нормального уровня синтеза антигеномной РНК). Интересно, что остановка транскрипции в таких мутантах происходит вследствие изменения конформации репликазы, в результате которой РВ2 утрачивает способность узнавать кеп-структуру мРНК, и система лишается за-

травки. Следует иметь в виду, что *cis*-1 и *cis*-2 в индивидуальных геномных (и антигеномных) сегментах РНК IAV не идентичны. Помимо консервативной части (штопорной структуры), они включают вариабельные последовательности. Очевидно, *cis*-1 и *cis*-2 в составе каждого из восьми сегментов РНК имеют разную аффинность к репликативному комплексу.

Транскрипция. После проникновения вирусных рибонуклеопротеинов в ядро происходит узнавание клеточных мРНК репликативным комплексом, PB2 связывает кеп-структуру, и эндонуклеазный домен PA отрезает короткий кепированный фрагмент мРНК. Эти процессы происходят на всех 8 сегментах генома, но с несколько разной интенсивностью. Кепированный фрагмент мРНК заканчивается остатком пурина, который комплементарен 3'-концевому остатку уридина в вирусной РНК. Синтез вирусной мРНК начинается с включения остатка гуанозина, комплементарного следующему остатку цитозина в вирусной РНК (рис. 63).

(-)

3' -UCGCUUUUCGUCC ... (U)₅₋₇(N)₂₋₇GGAACAAAGAUGAppp

5' -m⁷GpppXm -10-13 нт -A₁**G**

Рис. 63. Инициация транскрипции РНК IAV с помощью кепированной затравки. Концы геномной РНК представлены в виде нуклеотидной последовательности, без учета сближения 3'- и 5'-концов за счет вторичной структуры «штопора» и постоянного контакта репликазы с 5'-концом РНК. Первый остаток, включаемый в транскрипт, отмечен стрелкой и выделен жирным шрифтом. X — пурин; N — сегмент-специфические нуклеотидные остатки.

Транскрипция останавливается на расстоянии 15–22 нт от 5'-конца геномной РНК. В этом месте находится олигоуридиловая последовательность, на которой полимераза «проскальзывает», синтезируя поли(А) (рис. 62, 63). Физическим барьером для транскрипции, способствующим повторному копированию олиго(У), может быть сам репликативный комплекс, сохраняющий прочную связь с 5'-концом геномной РНК. Полиаденилирование завершает процесс транскрипции, и вирусная мРНК экспортируется в цитоплазму.

Следует иметь в виду, что описанные выше процессы происходят при первичной транскрипции, когда зрелые нуклеопротеины с репликазой, присоединенной к *cis*-1, попадают в ядро. Вторичной транскрипции предшествует новая сборка репликазы из белков PB1, PB2 и PA, поступивших из цитоплазмы в ядро, а затем репликативного комплекса с за-

травкой. Каждый из этих этапов сопровождается изменением конформации репликативных белков и активирует транскрипционный комплекс.

Регуляция синтеза вирусных белков на уровне транскрипции осуществляется количественно, что можно объяснить разной силой промоторов на индивидуальных геномных РНК, так и во времени, что объяснить несколько сложнее. Каким образом репликазный комплекс ведет себя по отношению к собственным кефированным мРНК? Оказывается, комплекс РА, РВ1 и РВ2 садится на 5'-концевой участок вирусной мРНК, но не гидролизует его, а защищает и, более того, может способствовать инициации трансляции вирусных мРНК. Вирусный белок NS1 взаимодействует с белками, занятыми в процессинге мРНК, замедляя экспорт клеточных пре-мРНК из ядра. В этом есть определенная логика, поскольку мРНК нужны вирусу как строительный материал для собственных матриц. Синтез некоторых мРНК ортомиксовирусов происходит с помощью клеточных механизмов сплайсинга. Этот процесс также может регулировать NS1. На поздних этапах инфекции NS1, связываясь со сплайсосомами, препятствует завершению сплайсинга и ингибирует синтез мРНК для NS2. Более того, на этой стадии инфекции NS1 препятствует также экспорту собственной мРНК из ядра. Выход из ядра мРНК NS1/NS2 и M1/M2 регулируется также клеточными белковыми факторами. Так, например, экспорт мРНК M2 требует участия факторов UAP56, EJC и Aly, тогда как экспорт несплайсированных мРНК NS1 и M1 нуждается лишь в факторе UAP56 (в дополнение к NXF1, который участвует в экспорте всех вирусных мРНК, включая кодируемые генами без интронов). Ряд работ указывают также на существенную роль клеточной РНК-полимеразы II в экспорте вирусных мРНК из ядра. Вирусный репликазный комплекс способен взаимодействовать с РНК-полимеразой II при содействии клеточных белков циклина T1 и CDK9.

Репликация генома ортомиксовирусов. Очевидно, кефированные и полиаденилированные мРНК, в которых геномные последовательности представлены не полностью, не могут служить матрицей для синтеза потомства геномных РНК. При переходе к репликации полимеразный комплекс должен, во-первых, переключиться с праймер-зависимого на праймер-независимый синтез (+)РНК и, во-вторых, «игнорировать» сигнал олиго(U) в вирионной РНК. Модель перехода от транскрипции к репликации генома вируса гриппа предполагает существенную роль свободного белка NP, как и в других вирусных системах, рассмотренных выше. Молекулы белка NP^o, накопленные в результате трансляции, поступают в ядро и одевают растущие антигеномные цепи, обеспечивая полноценную репликацию. Сигнал упаковки NP находится на 5'-конце антигеномных и геномных РНК.

Согласно «транс-модели» репликации вируса гриппа, синтез комплементарных цепей осуществляется не резидентным комплексом PA-PB1-PB2, связанным с *cis*-1, а свободным комплексом. Резидентный комплекс, ассоциированный с 5'-концами геномных сегментов, способен лишь к транскрипции, так как сам же создает стерический барьер для продолжения синтеза за пределы олигоуридиловой последовательности. Свободный комплекс PA-PB1-PB2 после инициации синтеза на 3'-конце геномной РНК доводит синтез антигеномной цепи до конца, вытесняя резидентный комплекс.

После того, как образовалась антигеномная (+)РНК, одетая белком нулеокапсида, происходит синтез полноразмерных дочерних (-)РНК. Синтез ассиметричен — геномные цепи РНК синтезируются в больших количествах, чем антигеномные — очевидно, за счет более сильного промотора на 3'-конце (+)цепи (рис. 62).

Мутации в белке PA могут существенно снижать синтез полноразмерной геномной РНК. Некоторые мутации в белке PB2 влияют на репликацию, но не затрагивают транскрипцию. Эти факты служат дополнительной иллюстрацией сложности механизмов синтеза РНК у ортомиксовирусов. Более того, механизмы инициации репликации на плюс-и минус-цепях РНК IAV существенно отличаются. При синтезе антигеномных (+)цепей инициация происходит непосредственно на 3'-конце геномных РНК. Однако при синтезе геномных (-)цепей на матрице (+)цепи РНК-полимераза сначала синтезирует динуклеотид 5'-pppApG на внутреннем 3'-UpC (позиции 4–5 с 3'-конца; рис. 62В). Затем происходит «перестроение», и динуклеотид используется как затравка непосредственно на 3'-конце (+)РНК (рис. 62В).

Недавно в зараженных вирусом гриппа клетках был обнаружен набор коротких РНК, последовательность которых соответствует 22–27 нт с 5'-конца геномных сегментов. Синтез этих РНК, по размерам сходных с регуляторными siРНК и miРНК клетки, происходит с участием вирусного репликативного комплекса. Хотя механизм образования коротких РНК вируса гриппа не совсем ясен, была предложена модель, в которой коротким РНК отводилась роль специфических кофакторов репликации. Учитывая, что лишь свободные (не занятые в комплексе с геномной РНК) молекулы репликазы ассоциированы с короткими РНК, специфичными для каждого из сегментов генома, можно допустить участие коротких РНК в репликации в рамках «транс-модели». Механизм их влияния на репликацию предстоит выяснить.

Движение рибонуклеопротеидов и белков в зараженной клетке. Упаковка РНК в вирионы. Жизненный цикл ортомиксовирусов включает ряд транспортных проблем, связанных с движением молекул белков и

макромолекулярных комплексов. При заражении клетки вирусный нуклеопротеид поступает в ядро благодаря сигналам ядерной локализации белков, входящих в его состав. Происходит транскрипция, затем экспорт мРНК в цитоплазму и трансляция. Вновь синтезированные белки импортируются в ядро, где происходит репликация и накопление геномных нуклеопротеинов, которые должны выйти в цитоплазму и отпочковаться через клеточную мембрану, в которую включаются НА и НА. Эти процессы у вирусов гриппа довольно основательно изучены. Известно, что крупные нуклеокапсиды и белки IAV, снабженные сигналами NLS и NES, импортируются в ядро и экспортируются из него через ядерные поры путем взаимодействия со специфическими клеточными белками.

Каким образом обеспечивается упаковка 8 сегментов РНК в одну вирусную частицу? Согласно имеющимся данным, упаковка специфична и подчиняется правилу «1+7», т.е. вокруг центрального нуклеопротеина располагаются остальные семь. Очевидно, упаковка происходит последовательно благодаря взаимодействиям определенных участков (–) РНК с низкой NP-связывающей способностью. В результате каждая из восьми РНП занимает определенное место в вирионе. Предполагается, что сегмент PB2 инициирует процесс сборки, выступая в качестве «затравочного элемента» при укладке и правильном позиционировании геномных РНП. Вирусные белки М1 и М2 координируют оптимальную укладку сегментов генома в вирион и размещение созревающего вириона на плазматической мембране. Такой механизм обеспечивает сохранение целостности сегментированного вирусного генома при повторяющихся раундах инфекции.

5.6. Буньявирусы

Общие сведения. Семейство *Bunyaviridae* (от названия города Буньямвера в Уганде) объединяет ортобуньявирусы, хантавирусы, найровирусы, флебовирусы, тосповирусы и еще несколько родов (всего около 350 представителей). Это вирусы с полиморфными частицами диаметром 80–120 нм, состоящими из спирального нуклеокапсиды (с которым ассоциирована репликаза L), окруженного липопротеидной оболочкой. Некоторые представители семейства являются возбудителями опасных геморрагических лихорадок теплокровных животных и человека, передаваемых членистоногими. Тосповирусы (от англ. *tomato spotted wilt virus*, вирус пятнистого увядания томатов) вызывают экономически важные заболевания культурных растений. Тосповирусы реплицируются в растительных клетках и в клетках насекомых-переносчиков (трип-

сов), являясь таким образом вирусами и растений, и животных. Транскрипция и репликация *Bunyaviridae* происходят в цитоплазме клетки.

Геном представителей *Bunyaviridae* разделен между тремя сегментами РНК, РНК S (~1000 нт), М (~3000 нт) и L (~7000 нт), каждый из которых несет 5'- и 3'-концевые комплементарные участки. С точки зрения полярности РНК семейство *Bunyaviridae* делится на две принципиально различающиеся группы: буньявирусы, найровирусы и хантавирусы имеют (–)РНК геномы, а флебовирусы и тосповирусы — «двусмысленные» (амбисенсные) геномы.

5.6.1. Ортобуньявирусы, хантавирусы и найровирусы

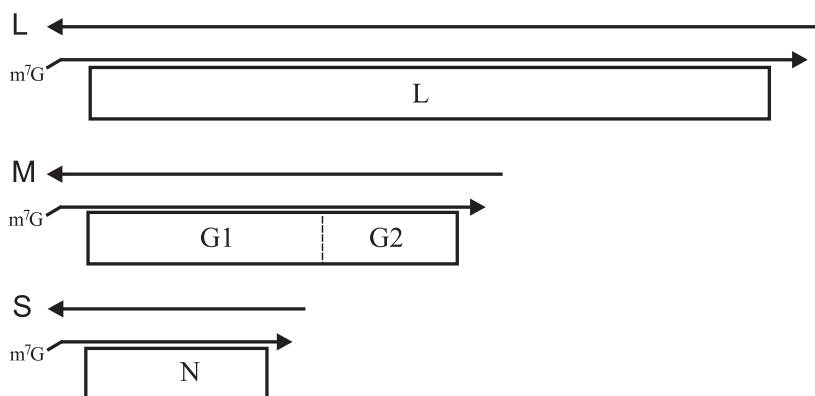
Особенности структуры генома. Хантавирусы и найровирусы имеют наиболее просто устроенные негативные РНК геномы в семействе *Bunyaviridae*: РНК S содержит комплемент гена белка нуклеокапсида, РНК М — предшественника гликопротеидов наружной мембраны, РНК L — репликативного белка L с активностями РНК полимеразы и эндонуклеазы (рис. 64). У ортобуньявирусов (типовой представитель — вирус Буньямвера, BunV) РНК S и М несут дополнительные гены неструктурных белков NSs и NSm (рис. 64). Трансляция мРНК S буньявирусов с помощью механизма слабого сканирования приводит к образованию белка нуклеокапсида N и неструктурного белка NSs (7 кДа), который ингибирует индукцию интерферона в клетке. Белок NSm (21 кДа) образуется при процессинге полипротеина — продукта РНК М — клеточными протеиназами. NSm участвует в сборке и созревании вирионов, а также в формировании мембранных сайтов репликации.

Ферментативный аппарат репликации и транскрипции. Единственным идентифицированным компонентом репликативного аппарата ортобуньявирусов, найровирусов и хантавирусов является белок L, обладающий активностями РНК полимеразы, кеп-связывающего белка и эндонуклеазы. Таким образом, L обладает набором «узнающих» и каталитических свойств, которые разделены между белками PA, PB1 и PB2 ортомиксовирусов (глава 5.5). В процессе транскрипции белок L присоединяется к кеп-структуре клеточных мРНК и отрезает короткий фрагмент 5'-НТО, который затем используется в качестве затравки для транскрипции геномных нуклеопротеидов. При репликации белок L начинает синтез РНК de novo без участия фрагмента клеточной мРНК. Репликация зависит от накопления свободного белка N⁰.

Cis-элементы генома. На концах геномных сегментов S, М и L буньявирусов, хантавирусов и найровирусов расположены консерватив-

A

Hantavirus, Nairovirus



B

Orthobunyavirus

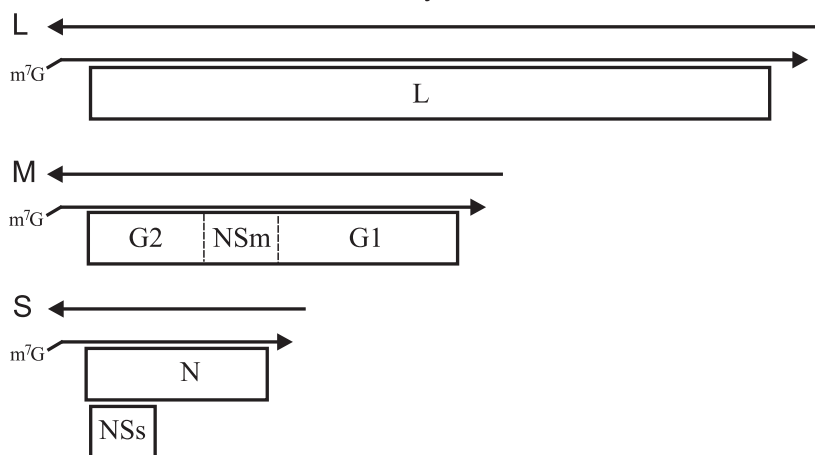


Рис. 64. Структура геномов хантавирусов, найровирусов (A) и ортобуньявирусов (B). Показаны геномные (–)РНК и мРНК. Сайты протеолиза в продуктах мРНК М обозначены пунктирными отрезками. Масштаб соблюден приблизительно.

ные комплементарные участки из 11–15 нт. РНК способны образовывать шпильчатые структуры «штопора», как и в случае ортомиксовирусов (рис. 65). По-видимому, формирование таких структур в составе нуклеопротеидов поддерживается репликазой L, которая взаимодействует с концами РНК. На модели BunV было показано, что сигнал транскрипции/репликации *cis*-1 включает 25 нт с 3'- и 5'-конца геномной РНК S. Последовательность первых 15 нт (за некоторыми исключениями) консервативна во всех трех геномных РНК BunV (рис. 65).

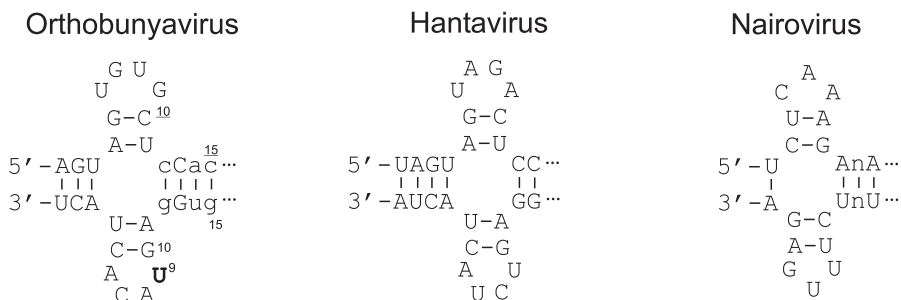


Рис. 65. Вторичные структуры «штопора», входящие в состав промоторов *cis*-1 в геномных РНК ортобуньявирусов, хантавирусов и найровирусов. N — сегмент-специфические нуклеотидные остатки (для ортобуньявируса приведены для РНК S и обозначены строчными буквами). Нумерация нуклеотидных остатков показана с 3'- и 5'-конца генома, для 5'-концевых остатков цифры подчеркнуты.

Очевидно, эквивалентные структуры воспроизводятся на концах антигеномных РНК и играют роль главных промоторов (*cis*-2) синтеза геномных РНК S, М и L. Поскольку синтез геномных и антигеномных цепей, как и в других вирусных системах, асимметричен, следует допустить, что некоторые элементы 3'-концевых участков геномной и антигеномной цепи влияют на эффективность *cis*-1 и *cis*-2. Действительно, двойная замена в РНК S BunV GGUG/CCAC и CCAC/GGUG, сохранявшая структуру шпильки, но менявшая последовательность 3'-12-15 и 5'-12-15 (рис. 65), создавала мутант, способный транскрибироваться и реплицироваться. Следовательно, сохранение вторичной структуры данного участка имело первостепенное значение для инициации синтеза РНК. Однако асимметричный синтез дикого типа (преобладание геномных РНК) нарушался — при репликации этого мутанта антигеномных цепей синтезировалось больше, чем геномных.

Детерминанты сигналов инициации транскрипции и репликации BunV различаются, хотя и те, и другие входят в состав терминаль-

ных участков РНК. Для эффективной транскрипции первостепенное значение имеет первичная структура концевых областей РНК. Одним из ключевых остатков промотора РНК S BunV, влияющих на синтез мРНК, является U-9 (рис. 65). Любые замены U-9 блокируют транскрипцию, но не влияют на репликацию. В 5'-концевом участке РНК S BunV критическими для транскрипции являются остатки в положениях 16, 17, 18 и 20.

Сигналы терминации транскрипции в геномных РНК не содержат олигоуридилатов, что согласуется с отсутствием 3'-поли(А) в мРНК *Bunyaviridae*. Например, в РНК S BunV сигнал Т1 расположен на расстоянии около 100 нт от 5'-конца РНК. Экспериментально показано, что критическим элементом Т1 является пентануклеотид 3'-UGUCG. Терминация транскрипции на матрицах РНК М и L BunV происходит на сигналах, отличных от Т1, и расположенных на расстоянии 40 нт от 5'-конца РНК.

Транскрипция. Транскрипция хантавирусов, найровирусов и буньявирусов происходит в цитоплазме и, в отличие от «ядерной» транскрипции ортомиксовирусов, не угнетается актиномицином D. Вирусные транскрипты РНК синтезируются с помощью механизма «отрывания кепы». Донором кепированных 12–17-нуклеотидных фрагментов

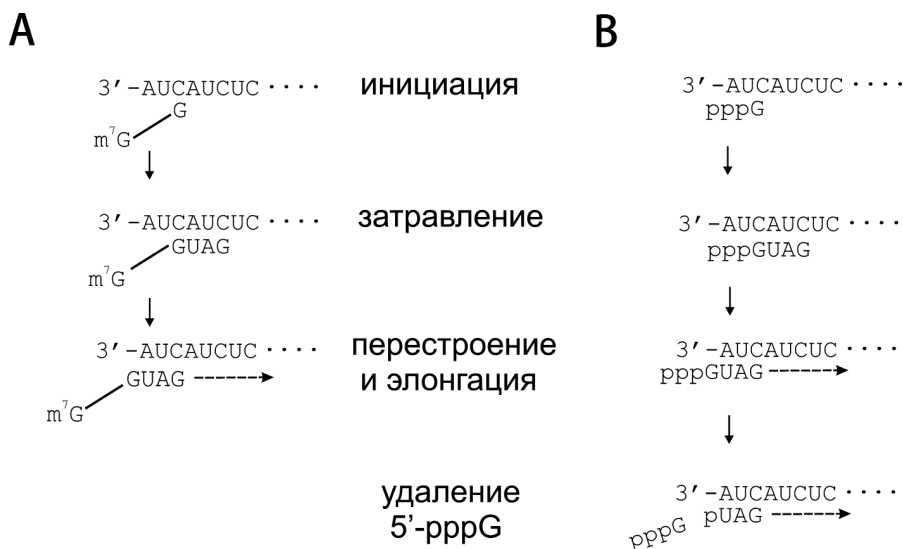


Рис. 66. Механизм «затравления – перестроения» при транскрипции (А) и репликации (В) РНК хантавируса HtnV.

являются цитоплазматические мРНК. Отрезание фрагмента мРНК осуществляется кеп-узнающей и эндонуклеазной активностями репликативного белка L.

Транскрипция РНК ортобуньявирусов, найровирусов и хантавирусов происходит с помощью механизма «затравления – перестроения» («prime – realign»), который направляется тринуклеотидными или динуклеотидными повторами на 3'-концах геномных РНК (рис. 65). Например, на 3'-конце РНК S, M и L вируса Хантаан (HtnV) находятся AUC-повторы. Инициация транскрипции происходит на третьем остатке цитозина с 3'-конца (рис. 66A). Кепированный фрагмент клеточной мРНК удлиняется включением комплементарного G. Затем синтезируется тетрануклеотид GUAG, который сдвигается и отжигается на терминальный триплет так, что остаток G остается вне дуплекса.

На свойства мРНК повторы в нетранслируемой области существенно не влияют, и для их синтеза затравление и перестроение не имеет очевидного смысла. Однако этот механизм несет функциональную нагрузку при репликации (см. ниже). После «затравления-перестроения» транскрипция продолжается процессивно, без остановок, пока репликаза не встретит сигнал терминации в геномной цепи.

Инициация репликации. Переключение с транскрипции на репликацию ортобуньявирусов, хантавирусов и найровирусов, как и у других вирусов с (–)РНК геномом, зависит от синтеза белка N⁰ de novo. Инициация синтеза антигеномной цепи требует узнавания белком L сигнала *cis*-1 в геномной РНК. В геномной и антигеномной РНК 5'-концевой уридилловый остаток монофосфорилирован, что объясняется работой механизма «затравления-перестроения» (рис. 66B). В геномных РНК хантавируса репликаза узнает третий с 3'-конца остаток цитозина и синтезирует комплементарный тетрануклеотид 5'-GUAG. Затравка затем сдвигается и отжигается на тринуклеотиде 3'-AUC матрицы, так что 5'-концевой остаток гуанозина «свешивается». Затем он удаляется (по-видимому, эндонуклеазной активностью L), так что на 5'-конце антигеномной цепи оказывается уридин-монофосфат (рис. 66B).

Поскольку, в силу комплементарности концов, участки на 3'-конце геномной и антигеномной РНК хантавирусов идентичны, сходный механизм будет работать и при синтезе копий геномных РНК на матрице антигеномной РНК. Предполагается, что механизм «затравления – перестроения» способствует репарации концов вновь синтезированных РНК. Кроме того, создание молекул РНК с 5'-монофосфатом позволяет избежать индукции механизма врожденного иммунитета, опосредуемой рецептором RIG-1 (как и в случае вируса бо-

лезни Борна, глава 5.4). Экспериментально установлено, что геномная РНК хантавирусов и найровирусов, в отличие от РНК рабдовирусов и парамиксовирусов, не взаимодействует с RIG-1 и не активирует промотор бета-интерферона.

Элонгация репликации. Вновь синтезируемая молекула антигеномной или геномной РНК одевается свободным белком нуклеокапсида, поскольку сигнал упаковки расположен на 5'-концах цепей. По-видимому, это обстоятельство, как и в других системах (–)РНК вирусов, позволяет игнорировать сигналы терминции транскрипции в геномных РНК и осуществлять процессивный синтез комплементарной цепи до конца матрицы.

Цитология репликации. Если первичная транскрипция и репликация представителей *Bunyaviridae*, по-видимому, происходит в цитоплазме вне связи с ультраструктурами клетки, то на поздних стадиях инфекции образуются «вирусные фабрики», обеспечивающие все ключевые стадии вирусного жизненного цикла: транскрипцию, репликацию, внутриклеточный транспорт рибонуклеопротеинов и белков и созревание вирионов. Например, при репликации BunV в зараженной клетке формируются тубулярные и глобулярные структуры, связанные в единый комплекс (рис. 67).

Тубулярные структуры (трубки) длиной 0,2–0,5 мкм формируются из мембран аппарата Гольджи и содержат вирусный белок NSm, актин, тубулин, миозин I, рибосомальные белки S4, S16, L18a, ретинобластомо-подобный белок 2 и фактор элонгации трансляции eEF-2. В некоторых зараженных клетках формируется свыше 50 таких трубок. Глобулярные структуры образуются за счет изгибания конца трубок. Вирусная РНК и белок L ассоциированы с внутренней поверхностью таких структур, в то время как их внешняя поверхность контактирует с митохондриями и элементами грубого ЭР (рис. 67). Возможно, из митохондрий и ЭР поступают клеточные факторы, необходимые для репликации и созревания вирусных частиц. Кроме того, рибосомы, ассоциированные с грубым ЭР, могут использоваться для трансляции мРНК BunV. Клеточные моторы (динеин и кинезин) переносят вирусные нуклеопротеиды внутри клетки по актомиозиновым трубкам к сайтам в мембранах Гольджи, где накапливаются гликопротеины G1 и G2. РНП взаимодействуют с экспонированными в цитоплазму доменами гликопротеинов, происходит инвагинация мембраны и созревание вирионов (рис. 67).

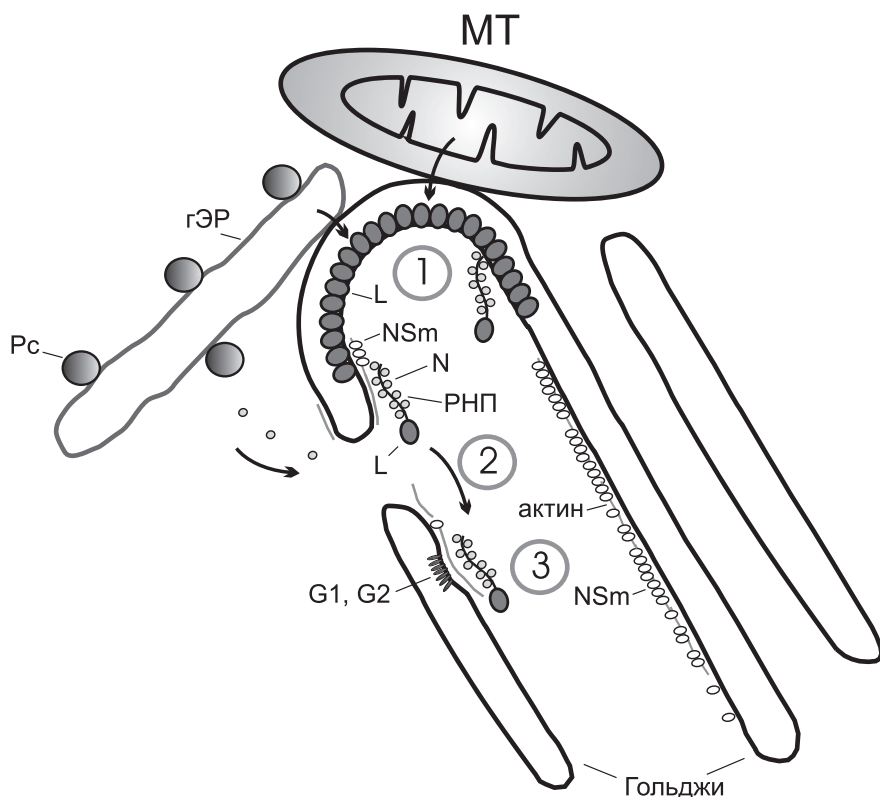


Рис. 67. Схема функционирования «вирусных фабрик» при инфекции буньявируса. Тубулярные структуры собираются из мембран аппарата Гольджи под действием эндогенного актина и полимеризованного белка NSm. (1) Глобулярный домен, образующийся в результате изгиба трубки, контактирует с митохондриями (MT) и грубым эндоплазматическим ретикулюмом (гЭР), откуда поступают факторы для репликации и сборки BunV. Рс, рибосома. Репликаза L и белок N⁰ концентрируются внутри глобулярного домена. (2) В процессе репликации геномная РНК одевается белком N, и РНП транспортируются с помощью актин-миозиновых моторов к сайтам созревания на мембранах Гольджи. (3) РНП взаимодействуют с вирусными гликопротеинами G, и происходит формирование вирусных частиц.

5.6.2. Флебовирусы и тосповирусы

Структура генома. Структура генома флебовирусов (вирус Уукунгеми, UukV, вирус лихорадки долины Рифт, RVFV) в первом приближении очень похожа на структуру генома других *Bunyaviridae*. РНК S, М и L несут на концах комплементарные участки, РНК М и L имеют негативную полярность и кодируют, соответственно, предшественник гликопротеидов и репликазу L. РНК S у флебовирусов длиннее, чем у найро-, ханта- и буньявирусов, и содержит гены нуклеокапсидного белка N и неструктурного белка NSs (антагонист интерферона). При этом РНК S имеет амбисенсную («двусмысленную») структуру — часть цепи имеет негативную полярность, а другая часть — позитивную, соответствующую мРНК (рис. 68). Сигналы узнавания белком N расположены на 5'-конце геномной и антигеномной цепи каждого сегмента РНК.

У тосповирусов (вирус пятнистого увядания томатов, ToSWV) амбисенсными являются два геномных сегмента, S и М. РНК S кодирует белки N и NSs (ингибитор сайленсинга), РНК М — мембранные гликопротеины и белок межклеточного транспорта (TP) (рис. 68).

Ферментативный аппарат транскрипции и репликации флебовирусов. Основным репликативным белком флебовирусов является L, выполняющий функции эндонуклеазы, отрезающей кепированные фрагменты 5'-НТО цитоплазматических мРНК, и РНК полимеразы. Неструктурный белок NSs служит энхансером репликации и транскрипции вирусного генома, а также подавляет индукцию интерферона в зараженной клетке. NSs также влияет на способность вируса размножаться в клетках одних хозяев, не будучи при этом нужным для репликации в клетках других, т.е. определяет круг хозяев.

Cis-элементы генома. 3'- и 5'-концевые участки геномных РНК флебовирусов способны формировать структуры «ручек сковородки», но не альтернативную структуру «штопора». Спаренные участки 10 нт с 3'- и 5'-конца молекул РНК S, М и L UukV составляют сердцевину главного промотора транскрипции и репликации (*cis-1*). Сохранение вторичной структуры промотора существенно для его активности, как и определенные нуклеотидные остатки в составе дуплекса (рис. 69). Например, в РНК М UukV замены 3'-концевых остатков 2, 3, 4, 8 и 5'-концевых 3, 4, 5, 8 (рис. 69), включая компенсаторные мутации, поддерживающие вторичную структуру «ручки», ингибируют транскрипцию и репликацию.

Очевидно, в силу комплементарности 3'- и 5'-концевых участков, такая же шпильчатая структура в составе антигеномных РНК должна

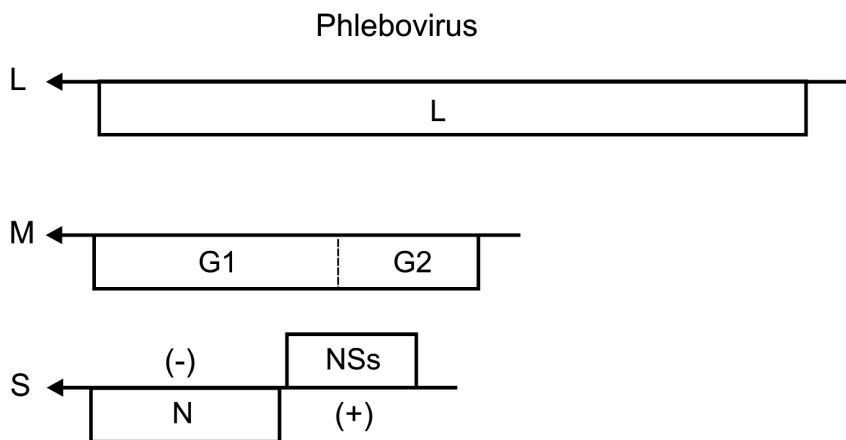
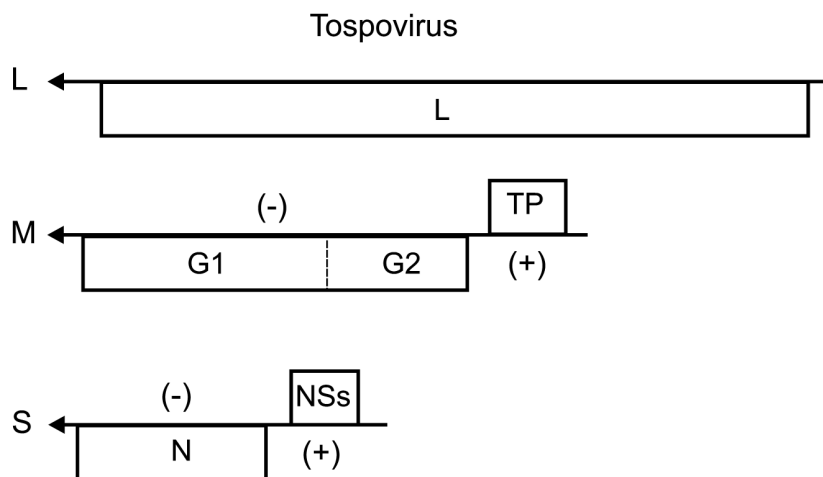
A**B**

Рис. 68. Структура геномов (А) флебовируса и (В) тосповируса. Сайт разрезания предшественника гликопротеинов показан пунктирным отрезком. Отмечены участки геномных РНК разной полярности.

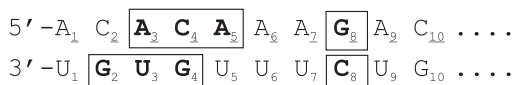


Рис. 69. Структура главного промотора транскрипции и репликации в РНК М UukV. Нуклеотидные остатки, наиболее существенные для активности промотора, выделены жирным шрифтом и обведены рамками.

составлять основу промотора синтеза геномных РНК (*cis*-2). Вместе с тем, *cis*-1 и *cis*-2 включают также 3'- и 5'-концевые последовательности, соседствующие с сердцевинной промотора и специфичные для каждой из трех РНК. Очевидно, эти неконсервативные участки определяют эффективность промоторов *cis*-1 в индивидуальных сегментах РНК, которая возрастает по градиенту М>L>S. Можно предположить, что вариабельные участки в составе РНК S, М и L, примыкающие к *cis*-1 и *cis*-2, также влияют на эффективность этих промоторов, поскольку синтез геномных и антигеномных цепей асимметричен.

Транскрипция у флебовирусов. Белок L отрезает короткие кепированные фрагменты цитоплазматических мРНК, узнает сигнал транскрипции на 3'-конце геномного сегмента и начинает синтез вирусной мРНК. Вирусные мРНК не одеваются белком N (возможно, этому препятствует гетерологичный кепированный фрагмент на 5'-конце). Схема транскрипции РНК М и L флебовирусов принципиально не отличается от таковой у бунья-, ханта- и найровирусов (рис. 70). Амбисенсная РНК S транскрибируется по другой схеме — мРНК для гена N синтезируется на матрице геномной цепи, а мРНК для NSs — на матрице антигеномной цепи (рис. 70). Транскрипция РНК S и М тосповирусов осуществляется по такому же принципу.

Сигналом терминирования транскрипции в S сегменте флебовирусов ранее считалась прочная шпилька в межгенной области. Этой модели противоречил тот факт, что картированные 3'-концы мРНК для генов N и NSs перекрываются примерно на 100 нт. Впоследствии выяснилось, что во внутренней области РНК S флебовируса RVFV имеются два линейных сигнала терминирования, содержащих ключевую последовательность 3'-CGUCG-5' (рис. 70). Такой же сигнал терминирования транскрипции находится в 5'-концевой области РНК М RVFV. Следует отметить, что эти сигналы консервативны у представителей рода *Phlebovirus*. РНК L RVFV несет измененный сигнал терминирования, сердцевинной которого является 3'-CGAUG-5' (рис. 70).

Считалось, что транскрипция гена NSs является «отложенным событием» - в клетку попадает геномная РНК S, и инициация транскрипции

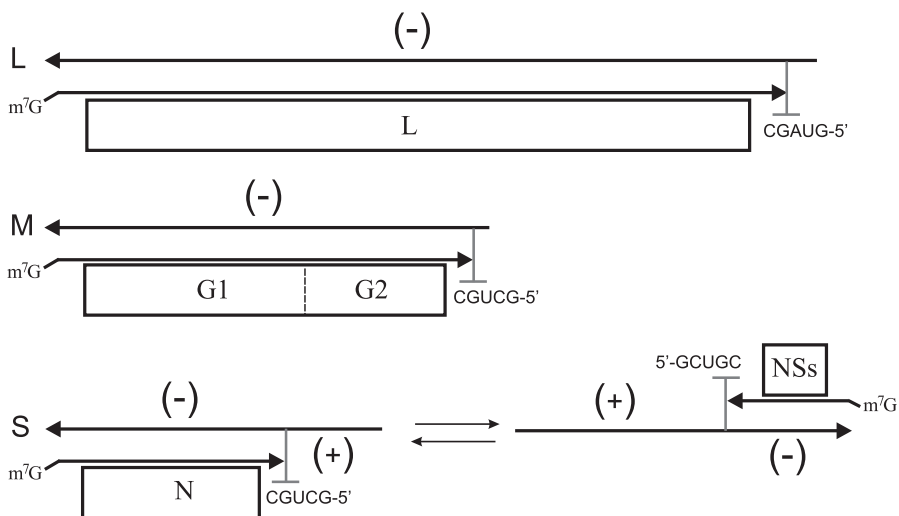


Рис. 70. Схема транскрипции генома флебовируса RVFV. Показаны мРНК и сигналы терминации транскрипции в геномных РНК M и L, а также в геномной и антигеномной РНК S (изображены слева и справа в нижней части схемы).

ее позитивной части становится возможна только после синтеза антигеномной цепи. Однако NSs является ранним белком, что плохо согласуется с такой схемой. Действительно, были получены экспериментальные доказательства того, что в вирионы флебовирусов упаковывается и геномная, и антигеномная РНК S. На ранних этапах инфекции на этих матрицах происходит инициация транскрипции, соответственно, гена N и гена NSs. Этот феномен заставляет задать неудобный, но резонный вопрос — не являются ли и геномная, и антигеномная РНК S (рис. 70) в равной степени «геномными»? Однако, во избежание недоразумений, кажется разумным следовать традиции и считать «геномным» сегмент 3'(-)N/(+)NSs (рис. 68 и 70).

В результате транскрипции синтезируются кепированные мРНК, не имеющие 3'-поли(A).

Репликация генома флебовирусов. Необходимым условием для синтеза антигеномной РНК является накопление достаточных количеств белка N⁰. Синтез начинается с 3'-конца геномной РНК, и строящаяся антигеномная цепь одевается с 5'-конца нуклеокапсидным белком. Возможно, как и в рассмотренных выше системах (-)РНК вирусов, ин-

капсидация строящейся цепи позволяет игнорировать сигналы термినации транскрипции и синтезировать полноразмерные антигеномные РНК. По-видимому, при репликации реализуется механизм «затравления – перестроения» за счет концевых повторов (например, 3'-UGUG; рис. 69). Однако, на 5'-конце геномных и антигеномных РНК RVFV находится трифосфосфорилированный остаток, и они узнаются фактором RIG-1. Очевидно, выступающий остаток в системе флебовирусов не отрезается эндонуклеазой, в отличие от других вирусных систем, рассмотренных выше (главы 5.4 и 5.6.1).

5.7. Аренавирусы

Общие сведения. Представители сем. *Arenaviridae* были выделены от млекопитающих и являются потенциально опасными возбудителями геморрагических лихорадок у человека. Аренавирусы имеют полиморфные частицы диаметром от 50 до 300 нм, состоящие из нуклеопротеида и липопротеидной оболочки. Иногда в состав оболочки включаются рибосомы, придавая им зернистую структуру при наблюдении под электронным микроскопом (отсюда и название семейства — от лат. *arenosus*, «песчаный»). Функциональной роли в вирусном цикле рибосомы не играют, представляя скорее побочный эффект сборки вирионов. Можно выделить вирионы на ранних (острых) стадиях инфекции, лишенные адсорбированных рибосом, но полностью сохраняющие инфекционность.

Особенности структуры генома. Геном состоит из двух амбисенсных компонентов, S (~3000 нт) и L (~7000 нт) (рис. 71). РНК S накапливается в наибольших количествах и кодирует белок нуклеокапсида (N) и предшественник мембранных гликопротеидов (G1 и G2). РНК L кодирует РНК репликазу L, а также матриксный и регуляторный белок Z. Концы молекул РНК комплементарны и могут образовывать шпильчатые структуры («ручки сковороды»). В межгенных областях РНК S и L образуются прочные шпильки (рис. 71).

Ферментативный аппарат репликации. Транскрипция генома аренавирусов, как и у других вирусов с разделенным (–)РНК геномом, осуществляется с помощью механизма «отрывания кеп», который включает узнавание кеп-структуры, отрезание кепированного фрагмента клеточной мРНК и его достраивание РНК полимеразой. Функция узнавания кеп мРНК у аренавирусов уникальна — ее выполняет мультифункциональный белок нуклеокапсида. Кеп узнается N-концевым до-

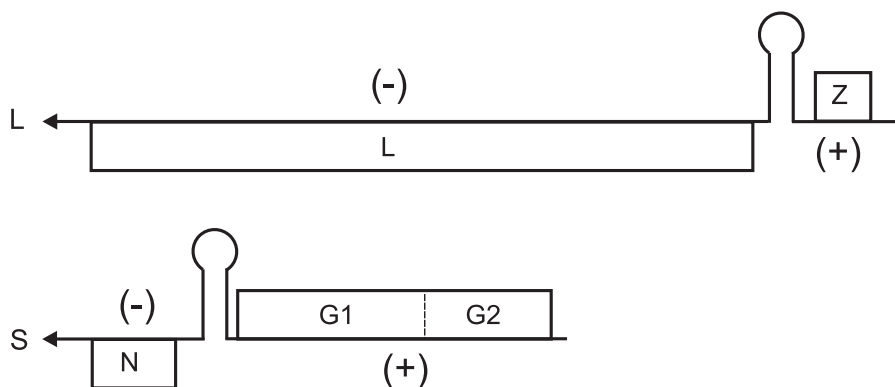


Рис. 71. Структура генома аренавируса. Отмечены участки геномных РНК разной полярности.

меном этого белка. Расположенная между N- и С-концевым доменами белка «бороздка» (groove), обогащенная положительно заряженными аминокислотами, взаимодействует с вирусной РНК. С-концевой домен белка N обладает активностью 3'-5'-экзонуклеазы, участвующей в подавлении индукции интерферона.

Транскрипция и репликация нуклепротеиновых матриц РНК аренавирусов осуществляются белком L, обладающим активностями эндонуклеазы и РНК полимеразы. Эти активности ассоциированы с N-концевым и центральным доменами L, соответственно. Белок L формирует олигомеры, что, возможно, связано с выполнением репликативных (транскрипционных) функций.

Z, небольшой белок (около 100 аминокислот), обладающий цинк-связывающим доменом, ранее считался регуляторным белком или «кофактором репликации». Данные последних лет свидетельствуют, что он не является компонентом репликативного аппарата. Напротив, Z подавляет репликацию и транскрипцию, что связано с инициацией сборки и отпочковывания частиц аренавирусов, в которых Z является «ключевым игроком». Кроме того, Z ингибирует процессы трансляции клеточных мРНК и индукции апоптоза в зараженной клетке. С-концевой домен белка Z связывается с несколькими белками-партнерами — клеточным фактором созревания Tsg101, фактором инициации трансляции eIF4E, гомеодомен-содержащими пролин-богатыми белками и другими. В зрелых вирионах Z выполняет функцию матриксного белка.

Для аренавируса Юнин (Junin virus, JunV) было показано участие в репликации и транскрипции клеточного фактора, гетерогенного белка

ток в 10 раз, делеция нт 26–100 с 3'-конца существенно не влияет на титр, а двойная делеция 5'-29–54 + 3'-26–100 снижает титр в 30 раз.

Роль сигнала терминации транскрипции у аренавирусов выполняют прочные шпильки в межгенных областях РНК S и L. Следует отметить, что первичная и вторичная структура шпилек в РНК S и РНК L существенно различаются.

Сигнал инкапсидации в РНК аренавирусов находится на 5'-конце (в пределах консервативной 19-нт последовательности) геномной и антигеномной РНК.

Инициация транскрипции. После узнавания кепа белком нуклеокапсида, белок L отрезает очень короткие 5'-фрагменты клеточных мРНК, содержащие кеп и 1–4 остатка (по другим данным, 4–5 остатков), которые используются РНК полимеразой L как затравки при инициации транскрипции. Инициация транскрипции включает механизм «затравления – перестроения». Синтез транскрипта начинается на втором остатке С матрицы геномной РНК S или L. Затравка удлиняется на два остатка (GC; рис. 73А). Затем мини-затравка смещается к 3'-концу матрицы, после чего транскрипция вступает в фазу процессивной элонгации.

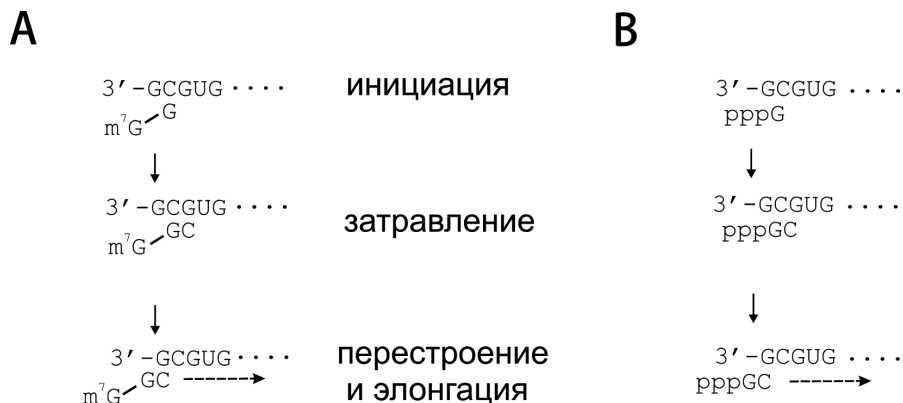


Рис. 73. Механизм «затравления – перестроения» при транскрипции (А) и репликации (В) РНК аренавируса LasV.

Считается, что на первом этапе инфекции транскрибируются гены N и L (рис. 74). Инициация транскрипции генов G и Z происходит на матрицах антигеномных РНК S и L, соответственно. Эта схема логична — экспрессия белков G и Z, направляющих сборку вирионов, таким образом, откладывается. Однако нельзя исключить и гипотетическую

возможность упаковки в вирионы антигеномных РНК, что позволило бы включить в раннюю транскрипцию все вирусные гены.

Элонгация и терминация транскрипции. Синтез транскриптов аренавирусов terminates на прочных шпильках внутри геномных и антигеномных РНК (рис. 74). Эти шпильки скорее всего не являются физическими «баррикадами» на пути репликазы, поскольку 3'-концы аренавирусных мРНК были картированы в 5'-проксимальной области шпильки.

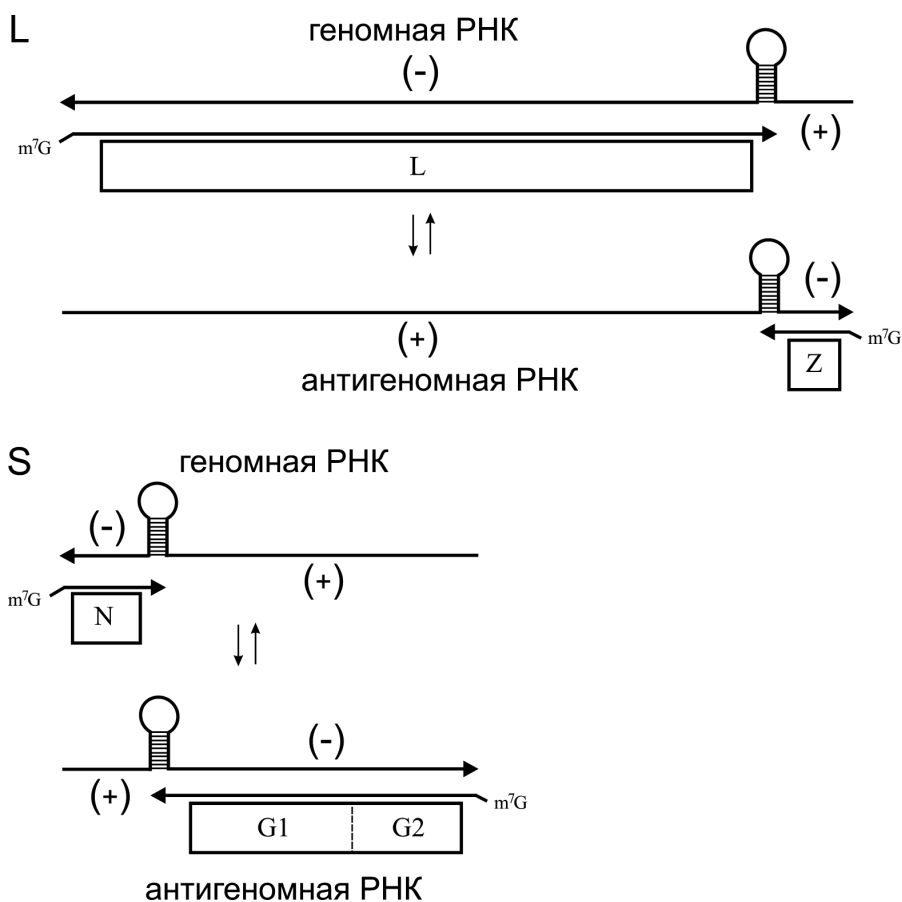


Рис. 74. Схема транскрипции и репликации генома аренавируса. Показаны мРНК и сигналы терминации транскрипции в геномных и антигеномных РНК S и L.

Иными словами, репликаза проходит большую часть последовательности геномной или антигеномной РНК, образующей центральную шпильку (включая петлю) и терминирует синтез «внутри», а не «до» этой структуры (рис. 74). Детали механизма терминации неизвестны. В результате синтезируются кепированные транскрипты, не имеющие поли(А).

Инициация репликации. На 5'-конце геномных и антигеномных РНК аренавирусов обнаруживается нематричный, «лишний» остаток G. Он появляется за счёт уже описанной способности РНК полимеразы начинать синтез не на первом, а на втором остатке матричной цепи РНК. На 3'-концах геномных и антигеномных РНК аренавирусов имеются последовательности GCG или повторы GC. Синтез РНК начинается с включения гуанозина на втором цитозиновом остатке с 3'-конца матричной цепи (рис. 73В). Синтезируется динуклеотид CG, который перемещается к 3'-концу матрицы, так что на 5'-конце геномной или антигеномной РНК остается выступающий гуаниловый остаток (рис. 73В).

В отличие от систем хантавирусов и борнавирусов, где выступающие остатки удаляются, в аренавирусной системе выступающий гуанозинтрифосфат остается на 5'-конце РНК. На модели аренавируса Ласса было показано, что вирусная геномная РНК взаимодействует с RIG-1 и является индуктором интерферона при трансфекции культуры клеток. Таким образом, механизм «затравления-перестроения» не обязательно связан с функцией маскировки генома от рецептора системы врожденного иммунитета. У аренавирусов подавление индукции интерферона происходит иначе, с помощью экзонуклеазной активности белка нуклеокапсида.

Элонгация синтеза антигеномных и геномных цепей осуществляется процессивно, РНК полимеразы L игнорирует сигналы терминации транскрипции (центральные шпильки в геномных РНК) и доводит копирование до конца матричной цепи. В роли антитерминатора выступает белок N⁰. По-видимому, как и в других системах (–)РНК вирусов, описанных выше, свободный белок N⁰ одевает строящуюся цепь с 5'-конца, ограничивая способность РНК полимеразы реагировать на сигналы терминации транскрипции.

Главный промотор репликации *cis-2* в антигеномной цепи, очевидно, включает те же элементы, что и промотор синтеза антигеномной РНК — из-за комплементарности концов они будут воспроизводиться на 3'-конце антигеномной РНК. Однако, из-за некомплементарных остатков в составе «ручки» (рис. 72) последовательности нуклеотидов, образующих *cis-1* и *cis-2*, будут отличаться. Возможно, эти различия, а также сегмент-специфические последовательности, примыкающие к «ручке», влияют на эффективность промоторов и определяют преобладающий синтез геномных цепей РНК у аренавирусов.

6. Вирусы с двунитчатым РНК-геномом

Вирусы с дцРНК геномом представлены семействами *Cystoviridae* (фаг ф6 и родственные фаги псевдомонад с 3-компонентным геномом), *Reoviridae* (вирусы животных, растений, грибов и простейших с 10-компонентными геномами), *Birnaviridae* (вирусы позвоночных и беспозвоночных с 2-компонентным геномом), *Totiviridae* (вирусы дрожжей и простейших с однокомпонентным геномом), *Partitiviridae* (вирусы грибов и криптовирусы растений с 2-компонентным геномом) и *Hypoviridae* (вирусы грибов с однокомпонентным геномом). Все эукариотические дцРНК вирусы размножаются в цитоплазме.

С точки зрения эволюции полимераз (которую часто рассматривают как маркер эволюции генома), дцРНК вирусы, очевидно, имеют полифилетическое происхождение. Некоторые из них родственны разным группам (+)РНК вирусов. Например, представитель *Hypoviridae*, агент гиповирулентности увядания конского каштана (HAV), близок к пикорна-подобным вирусам растений (сем. *Potyviridae*), а представители *Partitiviridae* близки к кармовирусам растений (сем. *Tombusviridae*).

6.1. Цистовирусы

Общие сведения. Семейство *Cystoviridae* включает ф6 и родственные бактериофаги псевдомонад. Несмотря на общую тенденцию в современной науке изучать преимущественно вирусные патогены, опасные для человека или вызывающие экономически значимые болезни животных и растений, бактериофаг ф6 был изучен достаточно детально. Цистовирусы имеют двуслойные икосаэдрические капсиды, окруженные наружной липопротеидной оболочкой (рис. 75). Вирионы содержат РНК-зависимую РНК полимеразу. Геном разделен между тремя компонентами дцРНК: L (6400 п.н.), M (4000 п.н.) и S (3000 п.н.), упакованными в одну частицу (рис. 75).

Структура генома. РНК L несет гены белков, участвующих в формировании субвирусных частиц (СЧ; рис. 75) и репликации РНК — основного структурного белка капсида ($P1^{PC}$), РНК полимеразы P2 ($P2^{Pol}$),

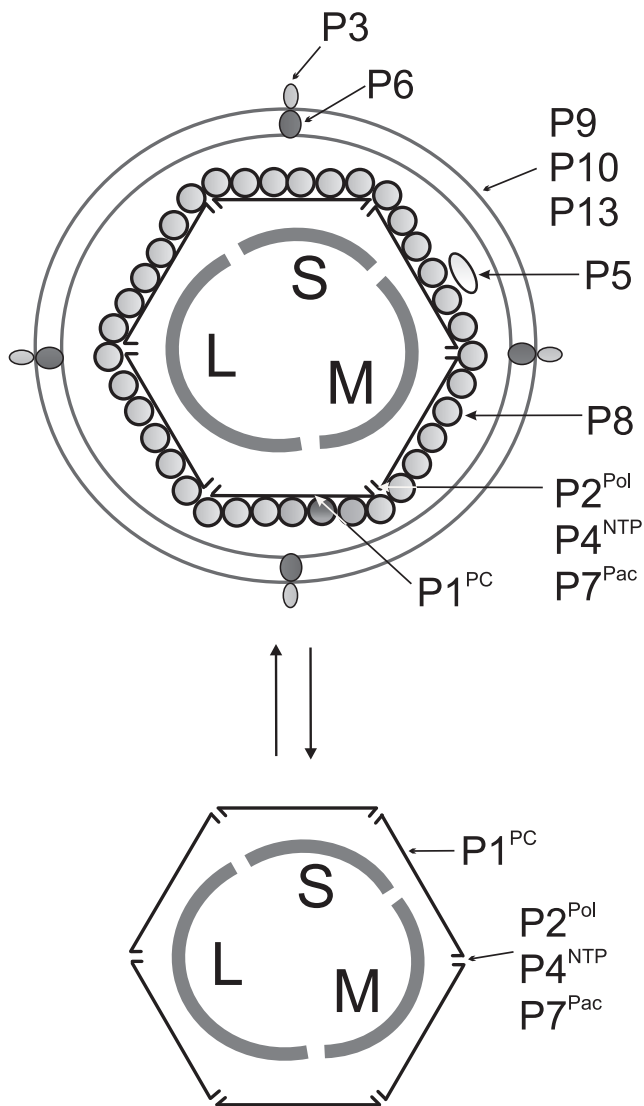


Рис. 75. Структура зрелого вириона и субвирусной частицы (СЧ) бактериофага ф6. В вирионе внутренний капсид, содержащий геномные дцРНК S, М и L, окружен слоем белка Р8 и внешней мембраной, несущей вирусные мембранные белки. Белок лизиса Р5 находится между мембраной и Р8. В клетку поступает только внутренний капсид (СЧ), построенный из белков Р1^{PC}, Р2^{Pol}, Р4^{NTP} и Р7^{Pac}. СЧ имеет каналы выхода в цитоплазму.

НТРАЗЫ P4 ($P4^{NTP}$) и вспомогательного белка ($P7^{Pac}$), участвующего в синтезе и упаковке РНК. РНК S и М содержат гены структурных белков, ассоциированных с внешней мембраной, белка нуклеокапсида P8 и белка лизиса P5 (рис. 76).

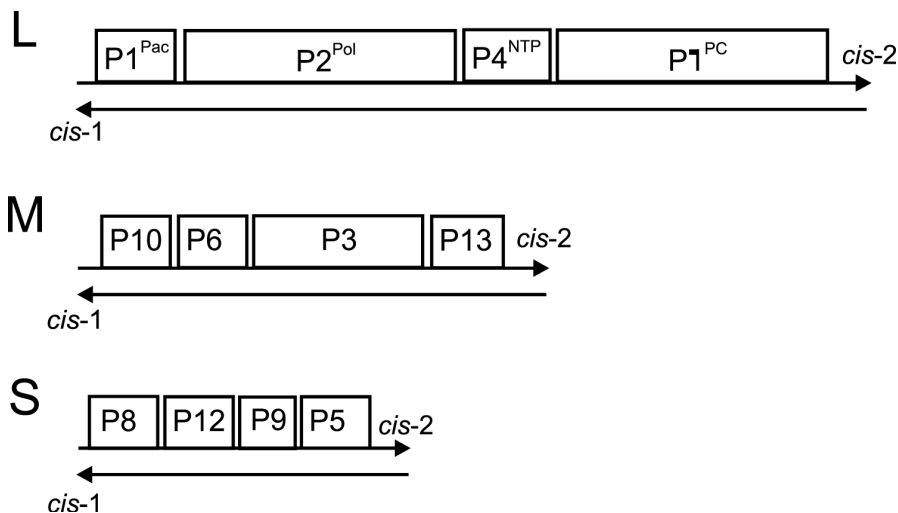


Рис. 76. Структура дцРНК генома бактериофага $\phi 6$. Показаны гены вирусных белков прокапсида (РНК L), структурных белков и белка лизиса (РНК М и S). Отмечено положение промоторов репликации на 3'-концах (–)цепей ($cis-1$) и (+)цепей РНК ($cis-2$).

Общая схема репликации и упаковки генома. Фаг $\phi 6$ прикрепляется к пиям бактериальной клетки с помощью белков наружной мембраны. При слиянии с клеткой мембранные белки фага P8 и P5 диссоциируют, и в цитоплазме остаются только СЧ, проницаемые для молекул субстрата (рибонуклеозидтрифосфатов) и одноцепочечных РНК (рис. 75). В СЧ происходит транскрипция и экспорт фаговых мРНК в цитоплазму. Синтез *de novo* вирусных белков $P1^{PC}$, $P2^{Pol}$, $P4^{NTP}$ и $P7^{Pac}$ приводит к сборке пустых прокапсидов, в которые «затягиваются» мРНК S, М и L. На матрице (+)РНК в новых СЧ синтезируются двуцепочечные геномные РНК. При созревании вирионов СЧ покрываются слоем P8, а затем липидной оболочкой, содержащей фаговые белки. В результате лизиса, завершающего инфекционный цикл, из одной клетки высвобождается около 300 частиц $\phi 6$.

Ферментативный аппарат репликации и транскрипции. Ключевым ферментом репликации фага $\phi 6$ является РНК полимеразы $P2^{Pol}$. Белок

$P7^{Pac}$ стимулирует репликацию и, вероятно, является кофактором РНК полимеразы (кроме того, $P7^{Pac}$ способствует упаковке РНК). Синтез РНК фага происходит исключительно внутри СЧ, и входящие в их состав белки $P1^{PC}$ и $P4^{NTP}$ принимают косвенное, но существенное участие в транскрипции и репликации. Для транскрипции РНК L ф6 (но не РНК S и M) необходим также хозяйский белок YajQ (консервативный белок грамотрицательных бактерий с неизвестной функцией).

Цис-сигналы транскрипции, репликации и упаковки РНК. Молекулы (+)РНК S, M и L содержат почти идентичные последовательности 18 нт на 5'-конце и консервативные последовательности 74 нт на 3'-конце. Главный промотор синтеза (+)РНК (*cis*-1) находится на 3'-конце (-)цепей. Его границы не установлены. Главный промотор инициации синтеза (-)РНК (*cis*-2) находится на 3'-конце (+)РНК (рис. 76). Его границы точно не определены, но известно, что участок 12 нт с 3'-конца дает ~30% активности репликации РНК. На матрице дцРНК ф6 полимеразы $P2^{Pol}$ предпочтительно синтезирует (+)РНК, следовательно, промотор *cis*-1 сильнее, чем *cis*-2.

Сигнал упаковки находится в 5'-концевой области (+)РНК S, M и L и включает консервативную последовательность 5'-G(G/U)AAAAAACUUUAUAUA (элемент 1) и расположенную ближе к 3'-концу уникальную (сегмент специфическую) последовательность ~200 нт (элемент 2). Элементы 1 и 2 разделены спейсером из 50 нт, последовательность которого не влияет на упаковку РНК.

Транскрипция. Репликация и транскрипция в системе фага ф6 идентичны, поскольку вновь синтезированные мРНК колинеарны с (+)цепью геномных дцРНК. Поэтому термин «транскрипция» применяется здесь условно. Синтез РНК фага происходит внутри СЧ, состоящей из 120 молекул $P1^{PC}$. СЧ также содержат 120 молекул $P4^{NTP}$ (формирующих гексамеры, расположенные на внешнем конце каналов), 60 молекул $P7^{Pac}$ и до 20 молекул $P2^{Pol}$ (оба этих белка находятся на внутреннем конце каналов) (рис. 75 и 77). РНК полимеразы при содействии $P7^{Pac}$ узнают промотор *cis*-1 на 3'-конце негативных цепей РНК и осуществляют синтез (+)РНК S, M и L по полуконсервативному механизму с вытеснением цепей (рис. 77).

Выше отмечалось, что последовательности 18 нт с 3'-конца негативных цепей РНК M, S и L (включающие промотор синтеза (+)цепей или его существенную часть) «почти идентичны». Разница состоит в том, что (-)РНК S и M начинаются с 3'-СС, а (-)РНК L — с 3'-СА. РНК полимеразы фага обладают строгим предпочтением к включению гуанозина во второе положение строящейся цепи, и поэтому неспособна транс-

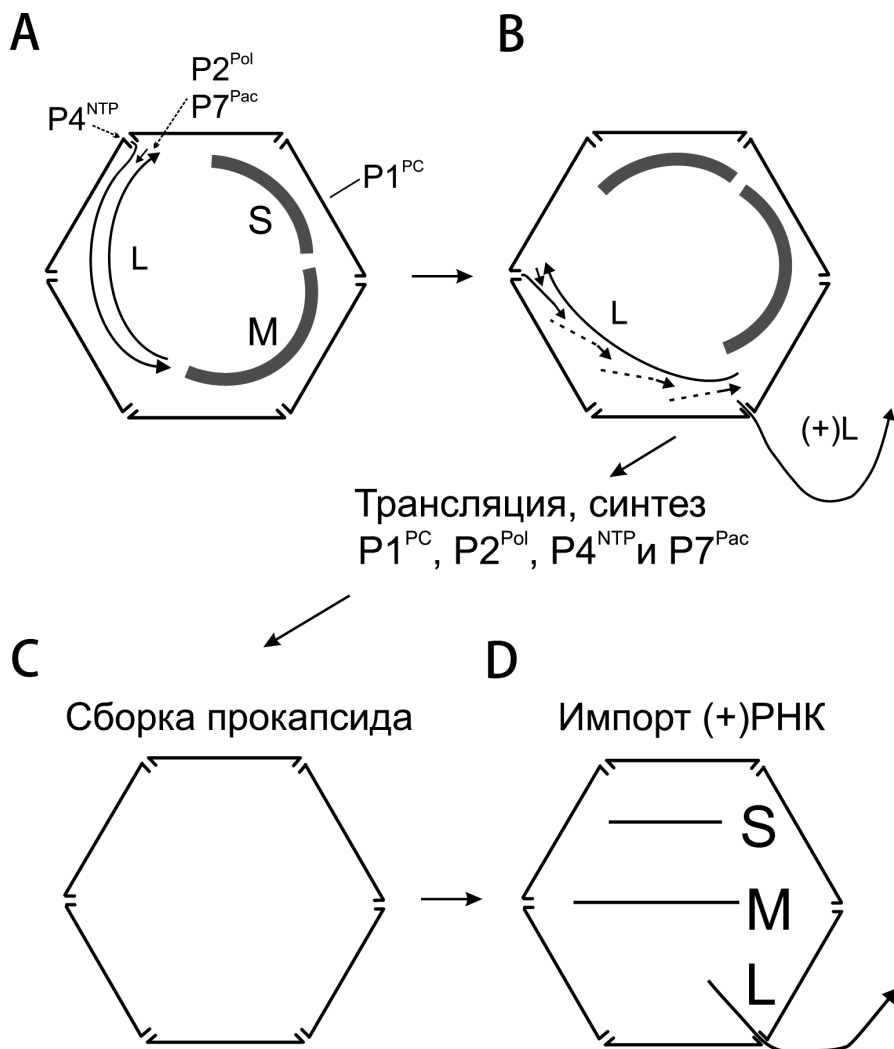


Рис. 77. Схема транскрипции и сборки субвирусных частиц фага ф6 (для простоты показана для РНК L; аналогичные процессы происходят с РНК S и M). А — инициация транскрипции в СЧ. Вытесняемая (+)цепь поступает в канал. В — после завершения синтеза (+)цепь выходит цитоплазму и транслируется с образованием четырех белков СЧ. С — белки формируют пустой прокапсид. D — в прокапсид последовательно импортируются (+)РНК S, M и L, в результате чего создается СЧ, компетентная для транскрипции и репликации.

крибировать (–)РНК L. Этот недостаток компенсируется клеточным белком YajQ, который проникает в прокапсиды и связывается с P1^{PC}. Мутантные по YajQ штаммы *Pseudomonas* spp. не поддерживают репликацию РНК L, и размножения фага ф6 в них не происходит. Однако, зависимость репликации РНК L ф6 от бактериального белка не абсолютна — так, были получены мутанты фага с точечными заменами в P1^{PC} и P2^{Pol}, которые нормально размножались в клетках YajQ[–]. Транскрипция РНК других цистовирусов не зависит от YajQ, но нельзя исключить, что в ней участвуют другие бактериальные белки.

Регуляция транскрипции и репликации. На ранних стадиях инфекционного цикла преобладает синтез (+)РНК S, M и L (примерно в эквимольных количествах), а синтез (–)цепей почти не выявляется. Экспрессия генов РНК L, связанных с транскрипцией и репликацией, определяет формирование de novo пустых прокапсид (рис. 77). На поздних стадиях инфекции синтезируется в 10–20 раз больше транскриптов S и M, чем L. Механизм временной и количественной регуляции транскрипции ф6, вероятно, связан с различным белковым составом прокапсид, в которых происходит первичная и вторичная транскрипция. Заполненные прокапсиды, попадающие в клетку в начале инфекции, взаимодействуют с белком YajQ, и только при этом условии возможна транскрипция РНК L (см. выше). В результате первичная транскрипция приводит к эквимольному синтезу (+)РНК S, M и L. Поскольку количество YajQ в клетке ограничено, его дефицит может приводить к преобладающему синтезу транскриптов S и M на поздних стадиях.

Сборка прокапсид de novo является подготовительным этапом репликации. Прокапсиды последовательно заполняются (+)РНК S, M и L, поступающими из цитоплазмы, и приобретают «репликативную компетентность» (рис. 77). Репликация включает узнавание РНК полимеразой главных промоторов *cis-2* на 3'-конце (+)РНК и синтез (–)цепей, в результате чего внутри прокапсида образуются дцРНК S, M и L. Далее заполненные прокапсиды (СЧ) либо участвуют в процессе вторичной транскрипции (синтезе и экспорте (+)РНК), либо одеваются белком нуклеокапсида Р8, в результате чего блокируется доступ гNTP и синтез РНК и начинается созревание фаговых частиц.

Модель упаковки РНК в прокапсид. В составе белка P1^{PC} имеется рецептор, который узнает специфичный сигнал упаковки в РНК S. Адсорбированная РНК затягивается внутрь частицы за счет работы белка Р4^{NTP}, сопряженной с гидролизом АТР. После заполнения прокапсида РНК S рецептор для этой РНК «закрывается», и активируется рецептор для РНК M. Подобным образом затем происходит выключение

рецептора для РНК М и активация рецептора для РНК L (рис. 77D). Были получены мутанты, в которых порядок упаковки (+)РНК S, М и L был нарушен. В частности, точечная мутация в P1^{PC} приводила к нарушению «порядка живой очереди» и хаотическому вводу (+)РНК в прокапсид. Возможно, рецепторы для импорта РНК S, М и L активируются последовательно вследствие изменения структуры P1^{PC} вблизи каналов. Эта модель, получившая экспериментальное обоснование, изящно объясняет феномен упаковки полного набора (+)РНК в одну частицу бактериофага ф6.

6.2. Реовирусы

Общие сведения. Представители семейства *Reoviridae* — икосаэдрические вирусы эукариот, не содержащие внешней липопротеидной оболочки. Вирион имеет двуслойную или трехслойную структуру и состоит из внутреннего капсида (диаметром 50 нм) и внешнего капсида (диаметром 75–85 нм). Геном представлен 9–12 сегментами линейной двучепочечной РНК. *Reoviridae* поражают широкий круг хозяев — позвоночных, беспозвоночных, растений, грибов и простейших.

Структура генома и функции белков. Двуслойный капсид реовируса млекопитающих (mammalian orthoreovirus, MRV) содержит 10 сегментов дцРНК длиной от 1200 до 3900 п.н. (суммарный геном — около 23 500 п.н.) (рис. 78). В ранних работах сегменты генома были разделены центрифугированием в градиенте сахарозы на три фракции, обозначенные как L, М и S (large, medium и small). Традиционно, геномные сегменты обозначаются буквой и цифрой (L1 – S4), а закодированные в них белки — буквой греческого алфавита и цифрой (рис. 78). В литературе продукт L1 обозначают как λ3, а продукт L3 — как λ1 (это против логики, но автор вынужден применять эти обозначения на рис. 78, чтобы облегчить читателю сопоставление текста этой главы с научной периодикой).

В дцРНК реовирусов (+)цепи РНК кепированы и не имеют 3'-поли(А) последовательностей. В геномных сегментах М и S закодированы структурные белки внешней капсиды (μ1, σ1, σ1s и σ3) и прокапсиды (σ2), а также вспомогательные неструктурные белки (μNS, μNSc, σNS, σ1s) (рис. 78). Белок μ2 является кофактором репликации, в которой основная роль принадлежит λ-белкам. Геномные сегменты моноцистронны, за исключением РНК М3 и РНК S1 (рис. 78), каждая из которых транслируется посредством механизма слабого сканирования с образованием двух белков.

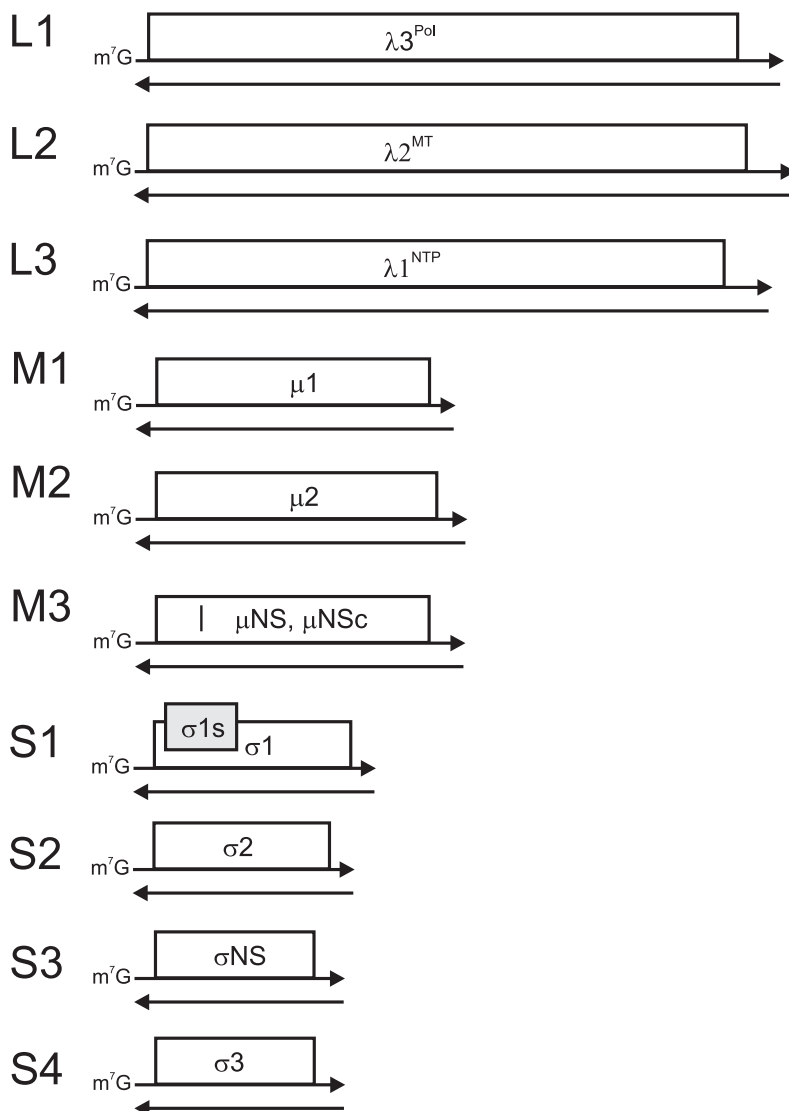


Рис. 78. Структура генома реовируса млекопитающих (MRV). Геном состоит из 10 двунигчатых РНК. РНК L1- L3 кодируют белки репликативного комплекса $\lambda 3^{Pol}$, $\lambda 2^{MT}$ и $\lambda 1^{NTP}$. РНК M и S кодируют структурные и неструктурные (NS) белки. РНК M3 и S1 с помощью слабого сканирования направляют синтез двух белков — μNS и μNSc в одном гене (второй AUG показан вертикальным отрезком), и $\sigma 1$ и $\sigma 1s$ в перекрывающихся генах.

На 3'-концах (+) и (–)РНК содержатся консервативные (но не идентичные) последовательности, возможно, формирующие промоторы синтеза комплементарных РНК. Картирование промоторов не проводилось.

Ферментативный аппарат репликации. Репликативный комплекс MRV представлен белками $\lambda 1$, $\lambda 2$ и $\lambda 3$.

$\lambda 2^{\text{MT}}$ обладает активностями гуанилилтрансферазы, $m^7\text{G}$ -метилтрансферазы и 2'-О-метилтрансферазы, то есть является кеп-синтезирующим белком. $\lambda 2^{\text{MT}}$ формирует пентамеры на внешней стороне каналов субвирусной частицы.

$\lambda 1^{\text{NTP}}$ имеет активности РНК фосфатазы и РНК хеликазы: он способен удалять гамма-фосфат с 5'-конца первого остатка гуанозина в (+) цепи РНК (подготавливая РНК к кепированию) и расплетать дуплексы РНК АТР-зависимым образом. Кроме того, $\lambda 1$ содержит мотив «цинкового пальца», расположенный в районе N-конца, и связывает ионы цинка и дцРНК. По некоторым данным, этот белок, вместе с $\sigma 2$, также выполняет роль структурного белка внутреннего капсида.

$\lambda 3^{\text{Pol}}$ — вирусная РНК полимеразы, способная узнавать реовирусные матрицы дцРНК и (+)РНК, и синтезировать (+)РНК и (–)РНК. РНК полимеразная активность стимулируется кофактором $\mu 2$. По некоторым данным, $\mu 2$ обладает РНК-связывающей и РНК-фосфатазной активностями.

Транскрипция и репликация. При попадании вириона в клетку происходит диссоциация наружного белкового слоя и открывание каналов на вершинах икосаэдра внутреннего капсида (СЧ). Каналы в составе СЧ реовирусов — это сложные структуры, построенные из λ -белков (рис. 79). В присутствии четырех гНТР и S-аденозилметионина, СЧ способны синтезировать *in vitro* кепированные цепи (+)РНК. При анализе очищенных препаратов СЧ с помощью электронной микроскопии, из каналов на вершинах икосаэдра в течение двух суток можно наблюдать выход цепей мРНК в раствор, что свидетельствует о значительной стабильности системы.

В зараженной клетке, доступ субстрата внутрь СЧ запускает синтез кепированных (+)РНК, которые затем экспортируются в цитоплазму. По одной из моделей, канал устроен как конвейер: $\lambda 3$ строит (+)цепь, $\lambda 1$ отщепляет гамма-фосфат с 5'-конца РНК и, возможно, способствует расплетанию цепей, $\lambda 2$ синтезирует кеп-структуру. Следует заметить, что в некоторых работах активность НТРазы/хеликазы $\lambda 1$ не упоминается, и этот белок считается структурным компонентом СЧ ортореовируса. Транскрипция и репликация у реовирусов осуществляется с помощью консервативного механизма с вытеснением вновь синтезируемой цепи РНК (рис. 80).

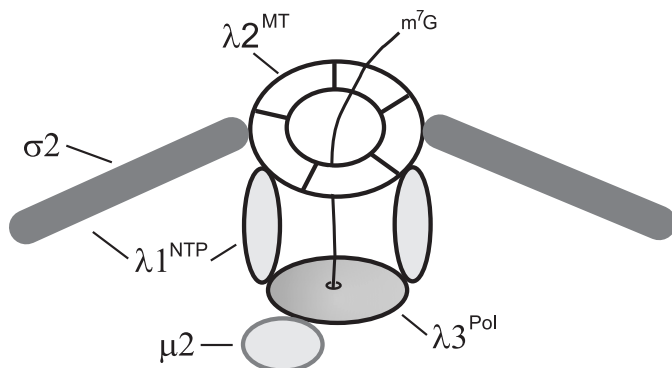


Рис. 79. Схематическое изображение фрагмента икосаэдрической структуры СЧ ортореовируса, построенной из основного структурного белка $\sigma 2$. Канал на вершине СЧ образован комплексом репликативных белков — пентамера $\lambda 2^{MT}$ (метилтрансфераза/гуанилилтрансфераза), $\lambda 1^{NTP}$ (NTPаза/γ-фосфатаза), $\lambda 3^{Pol}$ (РНК полимеразы) и $\mu 2$ (кофактор полимеразы). Показана кепированная (+) цепь РНК, экспортируемая в цитоплазму.

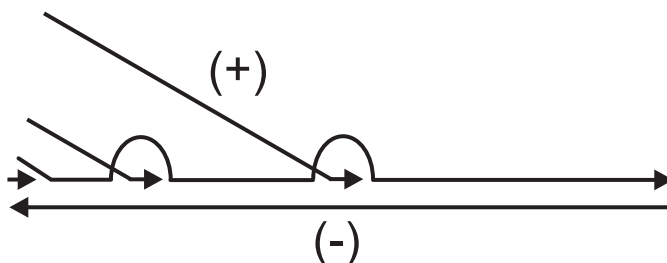


Рис. 80. Схема консервативного механизма синтеза (+)РНК на матрице (-)РНК в составе двухцепочечного сегмента генома реовируса.

Трансляция реовирусных мРНК L1-3 и М3 дает набор белков, из которых формируются пустые прокапсиды. Они заполняются молекулами (+)РНК, после чего происходит синтез (-)цепей и образование дцРНК. На последующих этапах, как и в системе фага ф6, СЧ могут вовлекаться во вторичную транскрипцию или, по мере накопления структурных белков, приобретать внешний белковый слой. При созревании частиц каналы блокируются, и репликация РНК завершается. Однако, процессы, происходящие внутри и снаружи СЧ не синхронизированы, и после блокирования каналов внутри зрелого вириона могут продолжаться процессы синтеза РНК вплоть до исчерпания субстратов гNTP. Поэтому

в препаратах суммарной вирионной РНК обнаруживается некоторое количество недостроенных 5'-концевых фрагментов (–)РНК.

Неясно, каким образом обеспечивается упаковка всех десяти (+)РНК в одну субвирусную частицу реовируса. Возможно, используется механизм, подобный описанному выше для бактериофага ф6.

Цитология репликации реовирусов. Синтез реовирусных РНК, происходящий внутри субвирусных частиц, полностью автономен и, на первый взгляд, не нуждается в экранировании вирус-специфическими ультраструктурами — по крайней мере, в той степени, в какой в них нуждается репликация (+)РНК вирусов (главы 4.2–4.6). Действительно, на ранних стадиях инфекции транскрипция в СЧ успешно осуществляется в цитоплазме зараженной клетки. Однако, на поздних стадиях в зараженной клетке возникают «вирусные фабрики» (вироплазмы), от которых зависит эффективность синтеза РНК и сборки вирионов. Они представляют собой крупные мембранные структуры (иногда организованные в так называемую «мембранную сеть»), которые содержат вирусные дцРНК, пустые прокапсиды, СЧ и микротрубочки. Вироплазмы граничат с митохондриями и грубым ЭР. Можно отметить некоторое сходство вирусных фабрик реовирусов и буньявирусов (ср. с рис. 67, глава 5.6).

При инфекции MRV создание подобных ультраструктур (вероятно, из модифицированных мембран ЭР и аппарата Гольджи) стимулируют неструктурные белки — в частности, σ NS и μ NS. Более того, экспрессия этих белков в клетках вне контекста вирусной инфекции приводит к индукции изменений мембран и образованию ультраструктур, напоминающих вироплазмы. По некоторым данным, построение вирусных фабрик также стимулируется белком μ 2.

6.3. Бирнавирусы

Семейство *Birnaviridae* включает дцРНК вирусы теплокровных, рыб, моллюсков и насекомых — вирус инфекционного заболевания бursы кур (IBDV), вирус инфекционного панкреатического некроза рыб, вирус Х дрозофилы и другие. Бирнавирусы имеют однослойные икосаэдрические капсиды диаметром 60–70 нм, лишённые наружной мембраны. Геном IBDV, наиболее изученного представителя *Birnaviridae*, представлен двумя сегментами, РНК 1 (3000–3300 п.н.) и РНК 2 (2800 п.н.) РНК 1 содержит ген неструктурного белка VP5 и полипротеина-предшественника VP2-VP4^{Pro}-VP3, который разрезается протеиназой VP4^{Pro} с образованием основного (VP2) и минорного (VP3) белков капсида. VP3 — мультифункциональный белок, способный связываться с

дцРНК, формируя нуклеопротеины, и привлекать к ним РНК полимеразу. Кроме того, VP3 является анти-апоптотическим фактором и ингибитором сайленсинга. Белок VP1 (РНК полимеразы) закодирована в РНК 2. VP1 обнаруживается внутри вириона в свободном виде и, кроме того, в виде геномного белка, ковалентно присоединенного к 5'-концам (+) и (–)цепей. Полимераза способна сама себя гуанилировать (формируя фосфодиэфирную связь гуанилового остатка с остатком серина) и выполняет функции белок-нуклеотидной затравки.

Транскрипция и репликация генома бирнавирусов осуществляется в цитоплазме на матрице свободных рибонуклеопротеинов, содержащих дцРНК, VP3 и РНК полимеразу, но не в субвирусных частицах. Возможно, на более поздних стадиях инфекции репликация вирусных РНК происходит в вирус-индуцируемых везикулах, ассоциированных с эндосомами и аппаратом Гольджи. Синтез дочерних (+)РНК, их трансляция и последующий процессинг полипротеина VP2-VP4^{Pro}-VP3 создают условия для репликации (синтеза (–)РНК и дцРНК) и созревания частиц бирнавирусов.

6.4. Тотивирусы и гиповирусы

Тотивирусы (сем. *Totiviridae*) имеют икосаэдрический капсид диаметром около 40 нм, содержащий однокомпонентный дцРНК геном (4600 п.н.). Тотивирусы реплицируются в клетках дрожжей и простейших. Иногда говорят, что вирусами их можно называть условно — будучи неспособны заразить клетку извне, экзогенным путем, и передаваясь по наследству при делении клеток и почковании, они скорее напоминают РНК-плазмиды. Вместе с тем, их геном кодирует собственный белок оболочки и РНК-полимеразу, которая экспрессируется в результате рибосомального сдвига рамки считывания в гене СР в виде С-концевой части слитного белка. Иногда изометрические частицы тотивирусов содержат дополнительную дцРНК, кодирующую экскретируемый токсин. Такая РНК, или плазида, встречается только у тех штаммов, которые устойчивы к данному токсину, и служит для подавления штаммов дрожжей, конкурирующих с штаммом хозяина.

(+)РНК синтезируется внутри частицы на матрице негативной цепи дцРНК. При упаковке в прокапсиды действует своеобразный репликативный head-full механизм (напоминающий механизм упаковки ДНК в капсиды Т-четных бактериофагов) — импортируются (+)РНК и происходит синтез (–)РНК, пока дцРНК не заполнит капсиду. После этого происходит только транскрипция и экспорт (+)РНК, и процесс таким образом возобновляется. Синтез РНК у тотивирусов *Saccharomyces*

консервативный, хотя у тотивирусов других организмов он может быть полуконсервативным.

Представители семейства *Hypoviridae* — это своеобразные агенты, вызывающие снижение вирулентности грибкового заболевания увядания конского каштана (*Cryphonectria hypoviruses* 1–4). Они также напоминают РНК-плазмиды, и даже в большей степени, чем тотивирусы. Гиповирусы не кодируют белков оболочки и не образуют вирионы. Геном представлен дцРНК, состоящей из ~13 000 п.н., содержащей поли(А)-последовательность в составе (+)цепи. В двух перекрывающихся генах закодированы домены папаин-подобных протеиназ, РНК полимеразы и РНК хеликазы, родственные эквивалентным репликативным доменам в геноме *Potyviridae* (пикорна-подобных вирусов растений). Высказывалось предположение, что геном гиповируса произошел от (+)РНК вируса растений, в процессе эволюции лишился гена белка оболочки, но сохранил, помимо консервативных репликативных доменов, еще одно свойство, характерное для (+)РНК вирусов — способность реплицироваться в индуцируемых мембранных везикулах. Гиповирусная дцРНК неинфекционна, но препаратами (+)РНК при определенных экспериментальных условиях можно заразить клетки грибка-хозяина. РНК лишена VPg, и синтез комплементарных цепей, очевидно, осуществляется без использования белок-нуклеотидной затравки. Цис-сигналы и детали механизма репликации гиповирусов неизвестны.

Поскольку гиповирусы не формируют частиц, в последнее время ставилась под сомнение «двухцепочечная» природа их генома, и некоторые исследователи считают их (+)РНК вирусами. Эти соображения вполне резонны. Однако имеющиеся данные формально позволяют в равной степени принять версии дцРНК или (+)РНК генома у данной вирусной группы.

7. Вироиды и вирус гепатита дельта

Вироиды, вирусоиды и вирус гепатита дельта (HDV) представляют собой небольшие РНК-репликоны, имеющие кольцевую ковалентно замкнутую структуру. Иногда их называют представителями «субвирусного мира», имея в виду, что эти инфекционные агенты устроены еще проще, чем РНК-вирусы, и лишены ключевых вирусных функций (собственной РНК полимеразы, белков оболочки и других). Их репликация базируется на совершенно иных принципах, чем репликация РНК вирусов, и скорее напоминает репликацию вирусов с геномной кольцевой ДНК, использующих механизм «катящегося кольца» (бактериофаг ϕ X174, геминивирусы, вирусы папилломы и др.) Вместе с тем, виroidы и HDV используют механизмы, не имеющие аналогов в мире «настоящих» вирусов, например, разрезание РНК посредством эндорибонуклеаз или рибозимов, и сшивание с помощью РНК лигаз. Механизмы репликации и процессинга РНК варьируют у разных представителей субвирусного мира. Их рассмотрению будут посвящены следующие разделы.

7.1. Вироиды

Общие сведения. Вироиды и вирусоиды (см. раздел 7.2) — самые миниатюрные из известных инфекционных агентов нуклеиновой природы. Вироидные РНК (240–400 нт) намного меньше самых малых вирусных геномов, и они не кодируют каких-либо белков. Вироиды являются возбудителями около 20 опасных болезней растений. За последние пятьдесят лет виroid каданг-каданг стал причиной гибели миллионов кокосовых пальм на Филиппинах, а виroid задержки роста нанес существенный урон промышленному разведению хризантем в США.

В 1966 г. Динер и Рэймер предположили, что виroid веретеновидности клубней картофеля (potato spindle tuber viroid, PSTVd) является вирусом малых размеров. Только через несколько лет напряженной работы Теодор Динер и коллеги установили, что PSTVd представляет собой кольцевую оцРНК, состоящую из 359 нт, которая лишена белковой оболочки и автономно реплицируется клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой.

После попадания виroidной РНК в растительную клетку происходит ее транспорт в ядро (в случае представителей *Pospiviroidae*) или хлоропласты (в случае *Avsunviroidae*). В этих органеллах осуществляется репликация РНК, а затем ее транспорт в цитоплазму, откуда виroid транспортируется через плазмодесмы в соседние клетки. При попадании во флоэму возможен дальний транспорт виroidной РНК в незараженные листья и корни растения, где происходит процесс ее «выгрузки» и последующая репликация в окружающей ткани.

Структура виroidов. Идентификация и классификация виroidов основаны в первую очередь на анализе их нуклеотидных последовательностей. Таксономическое значение имеют также способ и место репликации РНК в клетке. Выделяют два семейства виroidов — *Pospiviroidae* и *Avsunviroidae*, от названий potato spindle tuber viroid и avocado sunblotch viroid (ASBVd).

Виroidные РНК обозначают как «плюс» и «минус», но это обозначение условно, в силу отсутствия у виroidов кодирующих свойств и белковой оболочки; «(+)РНК» — это преобладающий тип молекул в препаратах, выделенных из зараженных растений.

Кольцевая (+)РНК PSTVd, типового представителя *Pospiviroidae*, в растворе имеет форму палочки длиной около 50 нм. Вторичная структура молекулы образована набором двуцепочечных участков, разделенных петлями (рис. 81).

В молекуле РНК PSTVd выделяют пять структурных доменов — центральный домен (CD), домен патогенности, вариабельный домен, терминальный левый (TL) и терминальный правый (TR) домены (рис. 81). В центральном домене расположена наиболее консервативная область генома *Pospiviroidae*.

У представителей семейства *Avsunviroidae* отсутствует центральная консервативная область РНК. Палочковидная структура характерна только для виroidа солнечного ожога авокадо (ASBVd), имеющего РНК из 250 нт (рис. 81). Для других виroidов этого семейства характерна сложная разветвленная форма вторичной структуры кольцевой РНК, напоминающая цветок ромашки.

Ферментативный аппарат репликации РНК. Все связанные с репликацией виroidов функции (кроме автокаталитического разрезания РНК у *Avsunviroidae*) выполняют клеточные белки. Клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза II участвует в репликации виroidов семейства *Pospiviroidae*. У PSTVd (+)РНК конкатемер разрезается в ядрышке с помощью РНКазы III, в результате чего получают мономеры генома, несущие 5'-монофосфат и 3'-гидроксил. Циклизация РНК происходит с помощью ядерных РНК-лигаз.

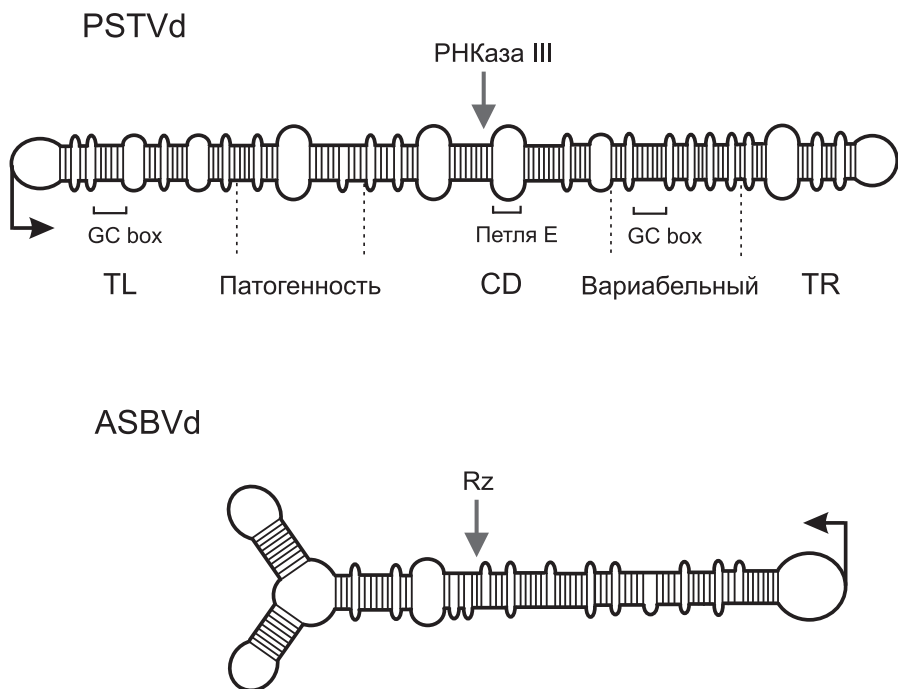


Рис. 81. Структура (+)РНК PSTVd и ASBVd с указанием функционально важных участков генома, связанных с инициацией репликации РНК и разрезанием РНКазой III или рибозимом (Rz). Точки инициации и направление синтеза комплементарной цепи показаны ломаными стрелками. Для PSTVd отмечены также домен, определяющий патогенность, центральный домен (CD), вариабельный домен, терминальный левый (TL) и терминальный правый (TR) домены, и функционально важные элементы РНК (GC боксы и петля E).

Репликация РНК представителей *Avsunviroidae* происходит в хлоропластах. Существуют разные точки зрения на то, какой фермент участвует в их репликации — ДНК-зависимая РНК полимеразы бактериального типа, кодируемая хлоропластным геномом, или ядерная РНК полимеразы, импортируемая в хлоропласты. Как (+)РНК, так и (–)РНК этих вироидов формируют энзиматически активные структуры рибозимов типа «головки молотка» (hammerhead, HH). Был обнаружен белок хлоропластов PARBP33, который заметно повышает активность виroidных рибозимов *in vitro*, возможно за счет стабилизации их структуры. Не до конца ясно, как происходит сшивание мономерных (+) и (–) РНК после расщепления. Этот процесс может происходить *in vitro* в от-

существование белков. Однако линейные мономеры оканчиваются 5'-ОН и циклическим 2',3'-фосфодиэфиром, что указывает на вероятную роль РНК лигазы в их сшивании.

Цис-элементы вирионного генома. Левый терминальный домен РНК PSTVd (рис. 81) обеспечивает эффективное связывание РНК-полимеразы II и инициацию репликации на матрице (+)РНК, которая происходит на уридине-359 или цитозине-1. По-видимому, главный промотор репликации состоит из терминальной шпильки и трех прилежащих петель в TL. Дестабилизация шпильчатой структуры при мутагенезе GC-богатого участка TL (рис. 81) полностью ингибирует репликацию. Для инициации репликации на матрице (-)РНК существенными элементами являются петля E в центральном домене и GC-богатая область в вариабельном домене.

В РНК ASBVd (рис. 81) стартовые точки репликации локализованы на уридилате-121 в (+)цепи и уридилате-119 в (-)цепи, которые находятся в AU-богатых терминальных шпильках. Очевидно, именно эти участки являются промоторами репликации. Автокаталитическое разрезание (+)цепи НН-рибозимом происходит между остатками C55 и U56. Сшивание мономеров генома РНК лигазой зависит от последовательностей РНК, находящихся за пределами НН-рибозима, что свидетельствует об ином структурном обеспечении центра лигирования по сравнению с центром рибозимного гидролиза.

Репликация генома. РНК PSTVd реплицируется в ядре по асимметричной схеме «катящегося кольца» (рис. 82). На первом этапе, проходящем в нуклеоплазме, (+)цепь РНК служит матрицей для синтеза конкатемерных линейных (-)цепей, которые служат матрицами для синтеза дочерних конкатемерных (+)цепей. После миграции в ядрышко (+)конкатемеры разрезаются на мономерные (+)РНК с помощью клеточной РНКазы III. Лигирование 5'- и 3'-концов создает кольцевые (+)РНК, завершая цикл репликации (рис. 82).

РНК представителей *Avsunviroidae* реплицируется в хлоропластах по симметричной схеме катящегося кольца, которая отличается от репликационной модели PSTVd. На первом этапе (+)цепь РНК служит матрицей для конкатемерных линейных (-)цепей (рис. 82В). Однако последние не способны напрямую служить матрицами для конкатемерных (+)цепей. Сначала происходит их автокаталитическое расщепление на мономерные (-)РНК с помощью НН-рибозима и сшивание клеточной лигазой. Образовавшиеся кольцевые (-)РНК, как и плюс-цепи, являются матрицами для синтеза конкатемерных линейных (+)цепей, которые также автокаталитически разрезаются на мономеры, сшиваются и образуют потомство дочерних кольцевых (+)РНК (рис. 82).

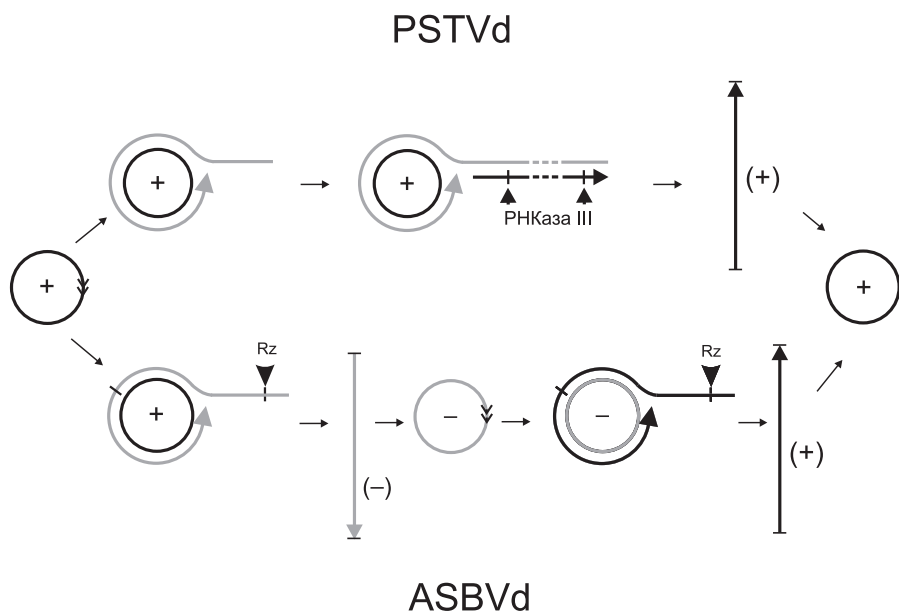


Рис. 82. Схема репликации *Pospiviroidae* и *Avsunviroidae* (верхняя и нижняя части изображения, соответственно). Поперечными отрезками обозначены сайты разрезания и границы мономеров (+) и (-)РНК, двойной стрелкой в кольцевой РНК — 5'-3' полярность цепи. Rz — рибозим.

Происхождение вироидов. Существует концепция, согласно которой вироиды являются патогенами растений, возникшими относительно недавно в ходе эволюции. Однако вироиды скорее всего не столь «молоды», и лишь получили широкое распространение с изменением культуры земледелия в новейшей истории. В пользу этого говорит обнаружение в дикорастущих растениях *Solanum caripophyllum* Lindl. вироида мексиканской стеркулии (MPVd), вызывающего бессимптомную инфекцию. MPVd близок по структуре РНК к PSTVd и другим «ядерным» вироидам. Нельзя исключить, что MPVd-подобный агент был предком PSTVd и других вироидов, вызывающих эпидемии у культурных растений.

Высказывалась точка зрения, что вироиды представляют собой следы очень древней «РНК цивилизации», когда рибонуклеиновые кислоты полимеризовались, разрезались и сшивались с помощью рибозимов и других РНК-ферментов. Наконец, существует предположение, что вироиды являются «взбесившимися интронами». В пользу этого приводят

тот факт, что виroidные РНК способны к формированию структур, напоминающих интроны.

С точки зрения эволюции весьма интересна и так называемая ретровиroidная система. Следует отметить, что в начале изучения виroidов активно дискутировалась гипотеза, согласно которой виroidы могут подвергаться обратной транскрипции и существовать в промежуточной ДНК форме. Эта гипотеза не получила подтверждения для PSTVd и других «классических» виroidов. Однако в растениях гвоздики была обнаружена неинфекционная кольцевая РНК, состоящая из 275 нт и имеющая встроенный рибозим НН-типа. Эта РНК существует только в клетках, инфицированных параретровирусом кольцевой гравировки гвоздики, кДНК которого способна внедряться в хозяйский геном. Вместе с копией параретровирусной ДНК в геноме растения была обнаружена и ДНК, соответствующая конкатемеру ретровиroidа. Транскрипция вставки ДНК клеточной РНК-полимеразой приводила к синтезу кольцевых мономеров ретровиroidной РНК.

7.2. Вирусоиды

Вирусоиды, или сателлитные кольцевые виroid-подобные РНК (здесь: satcРНК, от *satellite circular RNA*), сопровождают инфекции некоторых (+)РНК-содержащих вирусов растений — неповирусов (вируса кольцевых пятен табака, ToRSV), лютеовирусов (вируса желтой карликовости злаковых, CYDV-RPV) и собомовирусов (вируса желтой крапчатости риса, RYMV). Вирусоиды представляют собой кольцевые РНК длиной от 220 до 400 нт, которые реплицируются в присутствии вируса-помощника и упаковываются в его частицы (в кольцевой или линейной форме). Таким образом, вирус-помощник предоставляет вирусоиду и РНК-полимеразу, и структурный белок. Вирусоиды не кодируют белков, за исключением satcРНК RYMV. Этот парадоксальный наногеном из 220 нт, узнаваемый рибосомами в виде линейных конкатемеров РНК, направляет синтез 17-кДа белка с помощью неканонических механизмов трансляции.

Вирусоиды реплицируются с помощью механизма катящегося кольца и используют рибозимы для процессинга конкатемеров генома. Различные satcРНК несут шпильчатые рибозимы или НН-рибозимы, которые могут находиться в составе (+)цепи или в обеих цепях РНК. Некоторые рибозимы вирусоидов могут осуществлять разрезание и лигирование, другие — только разрезание (в этом случае геном сшивается клеточными РНК лигазами). Эти примеры иллюстрируют пластичность и вариабельность satcРНК.

Интересно, что хотя вироиды используют РНК-зависимую РНК полимеразу вируса-помощника, их геномы могут не иметь сходных структурных элементов (*cis*-сигналов). Более того, могут различаться и принципиальные механизмы репликации. Так, неповирусный геном имеет VPg на 5'-конце и реплицируется по VPg-зависимому механизму. Вироидная РНК лишена геномного белка, но способна узнаваться и реплицироваться неповирусной РНК полимеразой без белковой затравки. Эта способность, возникшая в процессе эволюционного приспособления satc-РНК к РНК полимеразе помощника, служит еще одним примером многофункциональности биологических макромолекул.

7.3. Вирус гепатита дельта

Общие сведения. HDV инфицирует клетки печени человека в присутствии гепаднавируса-помощника (вируса гепатита В, HBV), предоставляющего структурные белки, связанные с внешней мембраной, для упаковки HDV. Эти белки HBV определяют гепатотропизм (способность проникать в клетки печени) вируса гепатита дельта. Таким образом, HDV является сателлитом HBV, и единственная помощь, которую оказывает гепаднавирус — это предоставление «верхней одежды». Оба вируса реплицируются в ядре зараженной клетки. Частицы HDV окружены липидной мембраной, в которой закорены три белка HBV. Внутри находится изометрический нуклеокапсид, построенный из большого дельта антигена (L-DAg) и содержащий геномную РНК HDV. После проникновения в клетку, нуклеокапсид HDV транспортируется по микротрубочкам к ядерным порам и проникает в ядро, где происходит транскрипция и репликация кольцевой РНК.

Структура генома и функции изоформ белка HDV. Геном вируса гепатита дельта представлен кольцевой РНК, состоящей из 1700 нт. РНК содержит примерно 70% спаренных остатков, формирующих двучепочечные участки, и образует палочковидную структуру с выпетливаниями. Геномная РНК имеет негативную полярность и содержит сайт саморазрезания рибозимом (рис. 83). Существует гипотеза, что РНК HDV претерпевает динамические конформационные изменения, влияющие на активность рибозима, репликацию и редактирование. Комплементарная антигеномная (+)РНК содержит ген дельта антигена, сигнал редактирования, сайт полиаденилирования и сайт саморазрезания (рис. 83). Матричные РНК HDV кепированы и полиаденилированы. Трансляция двух форм мРНК, одна из которых образуется с помощью редактирования (см. ниже), дает малый

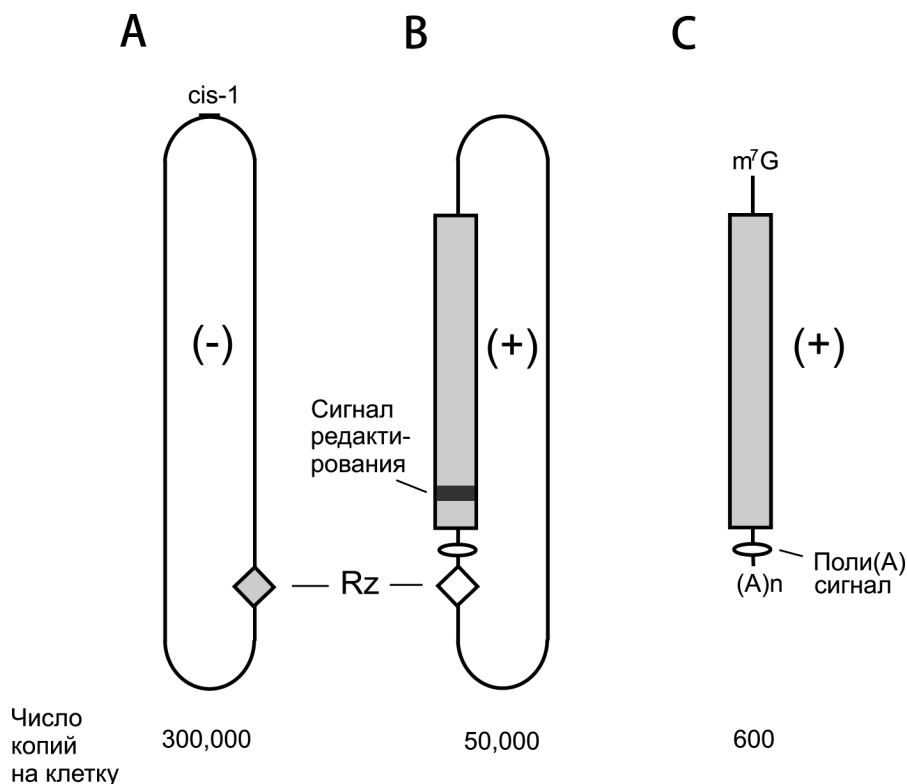


Рис. 83. Структура трех форм РНК HDV — (А) геномной, (В) антигеномной и (С) мРНК. Указано приблизительное число копий каждой формы РНК в зараженной клетке. *Cis-1*, промотор транскрипции в геномной РНК. Геномная и антигеномная РНК содержат сайты саморазрезания рибозимами (Rz). Сайт редактирования в антигеномной РНК показан темным прямоугольником. Антигеномная РНК и мРНК несут ген дельта антигена и сайт полиаденилирования.

и большой дельта антигена HDV (S-Dag, 195 aa, и L-Dag, 214 aa). L-Dag отличается от S-Dag наличием С-концевого «довеска» из 19 aa, который определяет присоединение к мембране и сборку частиц. Оба антигена несут РНК-связывающие мотивы, сигнал ядерной локализации и другие домены. Малый антиген необходим для репликации РНК HDV, большой антиген формирует нуклеокапсид и направляет созревание частиц.

Транскрипция. Транскрипция генома HDV осуществляется клеточной ДНК-зависимой РНК полимеразой II (Pol II). Фермент узнает промотор транскрипции (*cis-1*) в составе геномной РНК и синтезирует кепированную и полиаденилированную мРНК из 800 нт (рис. 83). Есть сведения, что полимераза сначала синтезирует короткие кепированные фрагменты, которые могли бы использоваться в качестве затравок (по другой версии, затравками служат короткие фрагменты клеточных РНК), однако «затравочная» транскрипция HDV пока не получила надежного экспериментального подтверждения.

Часть транскриптов HDV синтезируются с участием механизма редактирования РНК, который включается на поздних стадиях инфекции. Редактирование происходит на определенном сайте антигеномной РНК (рис. 83), имеющем в своем составе две шпильчатые структуры, и включает реакцию аденозиндезаминазы. В результате дезаминирования аденозина в составе терминирующего UAG кодона в гене DAg получается инозин-содержащий триплет. При синтезе геномной (–)РНК напротив остатка инозина включается цитозин и возникает триплет 3'-ACC, а при транскрипции такой РНК получается мРНК с триптофановым UGG кодоном (вместо терминирующего UAG), которая направляет синтез дельта антигена с «довеском» из 19 аминокислот на С-конце — белка нуклеокапсида L-DAg. В принципе, на матрице «отредактированной» геномной РНК могла бы идти и репликация, приводящая к накоплению мутаций. Однако этого не происходит. Начавшись с сайта редактирования, дезаминирование затрагивает и другие остатки аденозина, в том числе и в промоторе РНК полимеразы, переводя матрицу в состояние, непригодное для репликации.

Транскрипция генома терминируется на сигнале полиаденилирования (рис. 83).

Репликация. На поздних стадиях инфекционного цикла HDV включается процесс синтеза антигеномной РНК и дочерних геномных РНК. Поскольку синтез мРНК DAg происходит на протяжении всего инфекционного цикла, следует допустить, что транскрипция и репликация в данной системе должны конкурировать. Если это так, то каким образом репликативный механизм игнорирует сигналы терминации/полиаденилирования и редактирования? По одной из моделей, репликация происходит в отдельном «боксе» (ядрышке) и с участием другого фермента, РНК полимеразы I. Экспрессия S-Dag de novo также может подавлять активность рибозима и сайта полиаденилирования, в результате чего синтезируется антигеномная РНК. Дополнительным фактором могут быть посттрансляционные модификации S-Dag (метилование, ацетилование и фосфорилирование) и различные конформационные состояния матрицы геномной РНК при транскрипции и репликации.

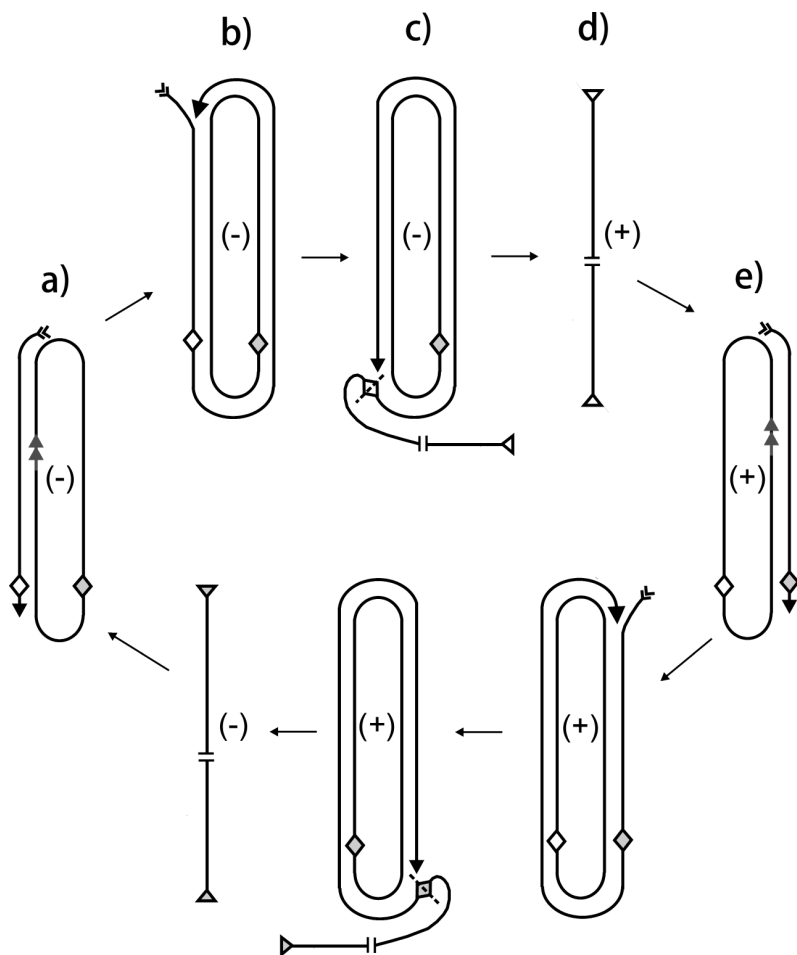


Рис. 84. Механизм двойного катящегося кольца при репликации РНК вируса гепатита дельта. Сдвоенная стрелка внутри кольцевой РНК указывает ее 5'-3' полярность, значок «оперение стрелы» и стрелка обозначают, соответственно, 5'- и 3'-концы растущей комплементарной цепи. На матрице геномной (-)РНК инициируется синтез антигеномной цепи (а). В ходе элонгации растущая (+)цепь вытесняет собственный 5'-концевой фрагмент (b), и затем полноразмерная антигеномная цепь расщепляется рибозимом (светлый ромб) (c) с образованием линейной (+)РНК (d). После сшивания молекулы РНК в кольцо образуется кольцевая форма антигеномной (+)РНК (e), на которой матрице которой синтезируются геномные (-)РНК с помощью аналогичного механизма (внизу схемы).

Промотор синтеза антигеномной РНК HDV, вероятно, находится на вершине палочковидной структуры матрицы геномной РНК и совпадает, по крайней мере частично, с промотором транскрипции (рис. 83). Координаты промотора синтеза геномных РНК в антигеномной цепи неизвестны. Судя по многократному избытку геномной РНК над антигеномной РНК и мРНК в зараженной клетке, промотор синтеза геномной РНК является наиболее сильным в данной вирусной системе.

Репликация на матрицах геномной и антигеномной РНК HDV происходит с помощью механизма двойного катящегося кольца (рис. 84), напоминающего механизм репликации *Avsunviroidae* (рис. 82). Кольцевая РНК копируется с образованием конкатемеров, которые разрезаются рибозимами в составе геномной и антигеномной РНК с образованием линейных цепей (рис. 82). Эти РНК затем сшиваются (по-видимому, клеточными РНК лигазами), после чего кольцевая (+) и (–)РНК могут вовлекаться в повторный цикл репликации. На определенном этапе геномная (+)РНК экспортируется в цитоплазму, где происходит ее упаковка и созревание вирионов.

8. Заключение

РНК-содержащие вирусы представляют широкий спектр вариантов организации, экспрессии и репликации генома. Вирусы с (+)РНК геномами используют относительно простой вариант стратегии размножения, при котором, теоретически, инфекцию в клетке может вызвать единственная молекула геномной РНК без участия вирусных белков. Однако такая РНК должна избежать деградации, выиграть конкуренцию с клеточными мРНК, послужить матрицей для синтеза репликазы и затем матрицей для репликации. Можно предположить, что в системах РНК-содержащих бактериофагов эти проблемы решаются с помощью плотной вторичной структуры РНК, защищающей ее от нуклеаз, и высокоэффективного копирования геномной РНК. Вирусы эукариот с (+)РНК геномом на самых ранних этапах репликации образуют мембранные везикулы, в которых РНК защищена от нуклеаз и рецепторов механизмов врожденного иммунитета. Эти ультраструктуры проницаемы для импортируемых молекул субстратов гNTP и экспортируемых молекул (+)РНК. Вопрос, который не обсуждается в современной литературе, но представляется существенным, касается способа обмена вирусных фабрик с цитоплазмой — является ли он пассивным, основанным на диффузии, или активным, с участием неких механизмов доставки субстрата и выгрузки вирусных мРНК? Их существование представляется вероятным, поскольку цитоплазма является вязким матриксом, в котором затруднена диффузия макромолекул. Поиск таких потенциальных механизмов транспорта представляет интересную задачу для будущих исследований.

Вирусы с негативным РНК геномом, в силу каких-то неясных причин, используют в качестве хозяев исключительно высших эукариот. РНК этих вирусов поступает в клетку в виде рибонуклеопротеина, с которым ассоциирована РНК полимеразы. В составе нуклеопротеина РНК достаточно хорошо защищена от деградации, но негативная цепь не может обеспечить немедленную экспрессию генов — для этого должен осуществиться синтез мРНК (транскрипция). Каким образом репликативный комплекс может копировать РНК, одетую белком нуклеокапсида? Имеющиеся модели постулируют способность репликазы и фосфопротеина-кофактора обратимо сдвигать субъединицы белка N на

небольшом участке матричного нуклеопротеида, где строится комплементарная (+)цепь. Вторая общая черта всех (–)РНК вирусов — присутствие комплементарных участков на концах цепей РНК, имеющих значение для транскрипции, репликации и упаковки. (–)РНК вирусы делятся на две филогенетические группы, представители которых имеют однокомпонентные и многокомпонентные геномы. Наиболее существенное различие между ними заключается не в количестве геномных сегментов, а в структуре нуклеопротеидов. У вирусов первой группы они имеют линейную структуру, а у вирусов второй группы — кольцевую. Кольцевая структура РНП ортомиксовирусов, буньявирусов и аренавирусов образуется за счет спаривания 3'- и 5'-концевых комплементарных участков, присутствующих как в геномной, так и в антигеномной РНК. Здесь еще одна загадка: каким образом реализуются комплементарные взаимодействия, если РНК экранирована белком? Возможно, вирусная репликаза способствует контактам РНК-РНК, присоединяясь к концам нуклеопротеина. Линейная и кольцевая организация нуклеопротеинов напрямую связана со структурой промоторов транскрипции и репликации. У *Mononegavirales* промоторы репликации находятся на 3'-конце геномной и антигеномной РНК. У (–)РНК вирусов с многокомпонентным геномом промотор репликации и транскрипции имеет структуру «ручки сковороды» или «штопора», образованную взаимодействием комплементарных концов вирусной РНК.

Некоторые вирусы с двуцепочечным РНК геномом (например, цистовирусы и реовирусы) представляют собой особые системы, в которых транскрипция и репликация происходят в субвирусных частицах. Такой вариант защищенного синтеза РНК отдаленно напоминает репликацию (–)РНК вирусов, матричные цепи которых находятся в составе РНП, и (+)РНК вирусов, репликация которых происходит внутри мембранных везикул. Реовирусы, несмотря на сложность организации вирионов (или благодаря ей), весьма устойчивы к внешним воздействиям. Ограничения, накладываемые такой организацией генома и вириона, неочевидны. Вместе с тем, дцРНК вирусы эукариот и прокариот не являются преобладающей группой — среди известных вирусов гораздо более часто встречаются (+)РНК вирусы. Возможно, существуют некие факторы, ограничивающие разнообразие и распространенность дцРНК вирусов.

Свои выгоды и недостатки есть в циклах размножения вирусов с однокомпонентным и многокомпонентным геномом. Для первых проблемой является обеспечение и регуляция синтеза нескольких типов мРНК с одной РНК матрицы. В случае многокомпонентного генома эта проблема снимается, по крайней мере частично, но возникает новая — как упаковать все сегменты генома в одну частицу, или определенным образом разложить их по нескольким частицам.

Примеры, приведенные выше, призваны проиллюстрировать следующие соображения. Эволюция не отбирает идеальные биологические машины, и любое изменение не является универсально значимым улучшением. Существует несколько вариантов для решения той или иной проблемы репликации и экспрессии, которые сочетаются, потому что «решать» приходится не одну задачу, а сразу несколько. Естественно, мы знаем способы репликации и экспрессии не всех вирусов, существующих в природе. Будет ли расти число новых принципов репликации вместе с открытием и изучением новых сотен и тысяч вирусов? Этот вопрос остается открытым, хотя уже известные базовые принципы достаточны для создания огромного разнообразия реплицирующихся генетических систем.

Существуют парадоксальные черты сходства между РНК-содержащими вирусами и ДНК-содержащими вирусами (и невирусными ДНК-системами), между которыми, казалось бы, не должно быть ничего общего с точки зрения хранения и реализации информации. Некоторые элементы, например, тРНК или тРНК-подобная структура (TLS), являются своего рода молекулярными лейтмотивами, «звучащими» в далеких друг от друга вирусных системах. Они используются при репликации (+)РНК-содержащих вирусов растений и насекомых, ретровирусов, параретровирусов и некоторых автономных клеточных ДНК. Двухцепочечная кольцевая ДНК плазида *Mauriceville* из митохондрий *Neurospora* spp., кодирующая обратную транскриптазу, транскрибируется с образованием мРНК, которая несет тРНК-подобную структуру с 3'-концевым ССА_{ОН}. Эта структура используется как сигнал для обратной транскриптазы, причем фермент способен начать синтез кДНК *de novo* без затравки, начиная с предпоследнего нуклеотидного остатка (подобно РНК полимеразам бактериофага Q β и некоторых вирусов эукариот). Таким образом, TLS-промотор обратной транскриптазы *Mauriceville* служит своего рода эволюционным мостиком между РНК полимеразами (+)РНК вирусов и обратными транскриптазами ретровирусов и параретровирусов, использующих в качестве затравок клеточные тРНК, или, если рассматривать проблему шире, между мирами реплицируемых РНК и ДНК. Сходным образом, принципиально один и тот же механизм репликации с использованием нуклеотид-белковой затравки используется такими эволюционно далекими вирусами, как (+) РНК-содержащие пикорна-подобные вирусы, дцРНК-содержащие бирнавирусы и ДНК-содержащие вирус гепатита В и аденовирусы. Еще один пример далекой параллели представляют нидовирусы с самыми большими (+)РНК геномами, которые кодируют экзонуклеазу с активностью «вычитывания гранок», не встречающуюся у других РНК-вирусов, но характерную для процесса репликации ДНК. Схожесть

способов инициации и элонгации репликации может отражать «независимые изобретения» эволюции, или же некий переход между мирами РНК и ДНК, повлекший наследование этих механизмов.

Особенностью РНК полимераз некоторых вирусов является склонность начинать синтез комплементарной цепи РНК близко к 3'-концу матрицы, но не на первом нуклеотиде с 3'-конца. У (–)РНК вирусов (борнавирусов, буньявирусов и аренавирусов) при этом синтезируется короткая затравка, которая затем сдвигается вместе с ферментом к 3'-концу матричной цепи. Механизм затравления-перестроения (prime-realign) может использоваться для синтеза 5'-монофосфорилированных РНК, которые не распознаются RIG-1 рецептором механизма врожденного иммунитета. В системах РНК бактериофагов и некоторых (+)РНК вирусов эукариот также игнорируется 3'-концевой матричный нуклеотид, но без синтеза затравки. Способность полимеразы сдвигаться назад по матричной цепи или узнавать внутренний нуклеотидный остаток матрицы связано с репарацией 3'-конца вирусной РНК полимеразой (фаг Q β) или клеточной терминальной трансферазой тРНК (вирусы растений с 3'-TLS). Очевидно, РНК полимеразы этих вирусов устроены таким образом, что им «удобнее» начать синтез внутри цепи РНК, а не на самом её конце. Возможно, таким образом был устроен гипотетический прафермент, и это свойство сохранилось в процессе эволюции.

Вирусные РНК полимеразы склонны к «возвратно-поступательным» движениям и на определенных внутренних участках РНК матрицы. Эта способность определяет терминацию транскрипции (скольжение на олигоуридиловых участках, которое используется во многих системах вирусов с негативным РНК геномом) и транскрипционное редактирование генов (у парамиксовирусов и филовирусов). При этом РНК полимеразы способны решать проблему процессивного копирования — на определенном этапе она может синтезировать не мРНК, а полноразмерную антигеномную цепь, служащую исключительно для синтеза копий геномных (–)РНК. Такая способность является решающим фактором в переключении с транскрипции на репликацию. У (–)РНК вирусов несомненна роль свободного белка нуклеокапсида в этом процессе — одевание белком вновь синтезируемой цепи неким образом ограничивает свободу передвижения РНК полимеразы, способствуя процессивному копированию. Следует отметить, что переключение с транскрипции на репликацию с помощью свободного белка нуклеокапсида реализуется и при инфекции (+)РНК-содержащих коронавирусов.

Вирусы с «двузначными» (+/–)РНК геномами на первый взгляд могут показаться совершенной экзотикой. Однако внимательное рассмотрение их свойств (и в первую очередь механизмов транскрипции и репликации) не оставляет сомнений, что они являются вариантами (–)

РНК вирусов, а не промежуточным звеном между (+)РНК и (–)РНК вирусами. Можно представить себе эволюционные сценарии образования двусмысленного генома за счет рекомбинации геномной и антигеномной цепей РНК при репликации предкового (–)РНК генома.

Вирусные белки и РНК, а также клеточные белки, привлекаемые для репликации некоторых вирусных геномов, иногда показывают поразительные примеры эволюционного приспособления к молекулярному партнеру или использования скрытых возможностей макромолекул. Такие «криптические» свойства белков аппарата трансляции Tu, Ts и S1 эубактерий, очевидно, используются репликативной системой бактериофага Q β . Система неповирус – вирусоид демонстрирует приспособление кольцевой сателлитной РНК к РНК полимеразе вируса-помощника, причем если репликация неповирусной РНК требует белок-нуклеотидной заправки, то репликация вирусоида в заправке не нуждается. Сходным образом, вириды и вирус гепатита дельта адаптировались к репликации с помощью клеточной ДНК-зависимой РНК полимеразы. Одним из наиболее впечатляющих примеров пластичности взаимодействия вируса и клетки является способность некоторых вирусов растений и насекомых давать полноценное вирусное потомство в дрожжевых клетках, не являющихся их естественными хозяевами. Удивительно, что в репродукцию вирусов в этой системе вовлекаются дрожжевые белки, которые не являются гомологами клеточных белков, поддерживающих вирусную инфекцию в организмах, на которых эти вирусы паразитируют. Эти примеры указывают, что биологические макромолекулы не обязательно приспособлены к выполнению узкого круга функций; иногда они могут вовлекаться в совершенно новые процессы.

Многие РНК-содержащие вирусы являются опасными патогенами человека, борьба с которыми вряд ли потеряет актуальность или станет простой задачей в будущем. Об этом свидетельствуют вспышки новых вирусных эпидемий на разных континентах и продолжающееся распространение некоторых уже известных инфекций. Изучение репликации РНК вирусов не является только лишь вариантом «игры в бисер». Данная область молекулярной вирусологии имеет значение как для прогресса фундаментальной науки, так и для разработки эффективных антивирусных препаратов, мишенью которых являются консервативные элементы синтеза вирусных РНК.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность И.Г. Атабекову, В.И. Аголу, А.Б. Вартапетяну, А.Е. Горбалене, С.Ю. Морозову и А.Б. Четверину за обсуждение проблем репликации РНК и ценные критические замечания по тексту этой книги.