ВИРУСОЛОГИЯ

А. В. Пиневич
А. К. Сироткин
О. В. Гаврилова
А. А. Потехин

ВИРУСОЛОГИЯ



Издательский дом Санкт-Петербургского государственного университета

ВИРУСОЛОГИЯ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

А. В. Пиневич
А. К. Сироткин
О. В. Гаврилова
А. А. Потехин

ВИРУСОЛОГИЯ

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
ПРОФ. ВАСИЛЬЕВА Д.А.

УЧЕБНИК

ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ДОМ
Санкт-Петербургского государственного университета

ББК 28.3
П32

Рецензенты: д-р биол. наук, доц. *М. С. Раутиан* (С.-Петерб. гос. ун-т), канд. биол. наук, вед. науч. сотр. *В. В. Зарубаев* (НИИ гриппа СЗО РАМН)

Печатается по постановлению
Редакционно-издательского совета биолого-почвенного факультета
С.-Петербургского государственного университета

Пиневич А. В., Сироткин А. К., Гаврилова О. В., Потехин А. А.
П32 **Вирусология:** учебник. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2012. — 432 с.
ISBN 978-5-288-05328-3

Книга выходит на фоне острого дефицита отечественных и полного отсутствия переводных руководств по вирусологии. В ней вирусы предстают не только как болезнетворные агенты, но и как глобальный компонент биологического разнообразия, играющий огромную роль в биоценозах и занимающий ключевое место в органической эволюции.

Учебник содержит два раздела: в разделе общей вирусологии (гл. 1) рассматриваются: 1) история открытия и изучения вирусов; 2) концептуальное объяснение природы вирусов; 3) морфология и состав вирусных частиц; 4) онтогенез вирусов; 5) типы вирусных инфекций и естественная защита от них; 6) систематика вирусов; 7) экологическое значение, происхождение и эволюция вирусов.

Раздел частной вирусологии (гл. 2–6) дает представление о разнообразии вирусов; наряду с традиционными объектами вирусологии (бактериофагами, вирусами высших растений и животных), в нем впервые в учебной литературе рассматриваются вирусы архей, протистов, грибов и водорослей.

Учебник предназначен для студентов, аспирантов и преподавателей. Он также может быть полезен исследователям в разных областях биологии и других естественных наук, желающим пополнить и упорядочить свои знания в области вирусологии.

Табл. 25. Ил. 108.

ББК 28.3

Издание подготовлено при частичной финансовой поддержке
государственного фонда НШ грант № 5439.2010.4

Учебное издание

Александр Васильевич Пиневич, Алексей Константинович Сироткин
Ольга Владимировна Гаврилова, Алексей Анатольевич Потехин

ВИРУСОЛОГИЯ

Редактор *Т. Н. Пескова.* Корректор *Е. А. Стерлина.* Компьютерная верстка *А. М. Вейшторт*

Подписано в печать 30.08.2012. Формат $70 \times 100^{1}/_{16}$. Печать офсетная. Усл. печ. л. 35,1. Тираж 500 экз. Заказ № 177

Издательство Санкт-Петербургского университета. 199004, С.-Петербург, В.О., 6-я линия, 11/21.
Тел./факс (812)328-44-22 E-mail: editor@unipress.ru http://www.unipress.ru

Типография Издательства СПбГУ. 199061, С.-Петербург, Средний пр., 41.

© А. В. Пиневич, А. К. Сироткин,
О. В. Гаврилова, А. А. Потехин, 2012
© С.-Петербургский
государственный университет, 2012

ISBN 978-5-288-05328-3

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 6

ГЛАВА 1. **Общая вирусология** 9
1.1. История открытия и изучения вирусов ..... —
1.2. Что такое вирус с точки зрения биолога 20
1.3. Вирион 28
1.3.1. Размер и форма вириона 30
1.3.2. Состав вириона 35
1.4. Вирусный геном 38
1.5. Онтогенез вирусов 41
1.5.1. Прикрепление вириона к клетке-хозяину, или адсорбция 43
1.5.2. Транслокация вириона 49
1.5.3. Проникновение и раздевание вируса 51
1.5.4. Репродукция вируса 59
1.5.5. Морфогенез вириона и выход вирусного потомства из клетки-хозяина 64
1.6. Типы вирусных инфекций 69
1.7. Естественная защита от вирусных инфекций 71
1.7.1. Система рестрикции/модификации 72
1.7.2. Система CRISPR/*cas* 78
1.7.3. РНК-сайленсинг 80
1.7.4. Апоптоз, индуцированный вирусами 85
1.7.5. Антивирусное действие интерферона 88
1.8. Систематика и биоразнообразие вирусов 93
1.9. Роль вирусов в экосистемах 119
1.10. Происхождение и эволюция вирусов 132

ГЛАВА 2. **Вирусы бактерий (бактериофаги)** 137
2.1. Краткая история изучения бактериофагов ..... —
2.2. Основные особенности бактериофагов 139
2.3. Культивирование, количественный учет и препаративное получение бактериофагов 142
2.4. Онтогенез бактериофагов 143
2.4.1. Адсорбция бактериофагов 144
2.4.2. Проникновение бактериофагов 148
2.4.3. Размножение бактериофагов 152
2.4.4. Сборка и освобождение вирионов бактериофагов 158
2.5. Лизогения 161
2.5.1. Интеграция и эксцизия фага лямбда 162
2.5.2. Лизогенная конверсия 165
2.5.3. Псевдолизогения 167
2.6. Трансдукция ..... —
2.6.1. Общая трансдукция. Фаг P22 170
2.6.2. Специализированная трансдукция. Фаг мю 171

2.7. Биоразнообразие бактериофагов ... 175
2.7.1. Бактериофаги с геномной dsДНК ... 176
2.7.1.1. Семейство *Myoviridae*. Фаг T4 ... —
2.7.1.2. Семейство *Podoviridae*. Фаг T7 ... 179
2.7.1.3. Семейство *Siphoviridae*. Фаг лямбда ... 182
2.7.1.4. Семейство *Tectiviridae*. Фаг PRD1 ... 184
2.7.2. Бактериофаги с геномной ssДНК(+) ... 186
2.7.2.1. Семейство *Inoviridae*. Фаг M13 ... 187
2.7.2.2. Семейство *Microviridae*. Фаг ϕX174 ... 189
2.7.3. Бактериофаги с геномной dsРНК. Семейство *Cystoviridae* ... 191
2.7.4. Бактериофаги с геномной ssРНК(+). Семейство *Leviviridae* ... 193

ГЛАВА 3. **Вирусы архей** ... 196
3.1. Вирусы архей из филы *Euryarchaeota* ... 197
3.1.1. Вирусы экстремально галофильных архей ... —
3.1.2. Вирусы метаногенных архей ... 201
3.1.3. Вирус гипертермофила *Pyrococcus* ... 203
3.2. Вирусы архей из филы *Crenarchaeota* ... 204

ГЛАВА 4. **Вирусы протистов, грибов и водорослей** ... 215
4.1. Вирусы протистов и водорослей, содержащие геномную dsДНК ... 216
4.1.1. Семейство *Mimiviridae* ... —
4.1.2. Семейство *Phycodnaviridae* ... 221
4.2. Вирусы протистов, грибов и водорослей, содержащие геномную dsРНК ... 225
4.2.1. Семейство *Chrysoviridae* ... —
4.2.2. Семейство *Endornaviridae* ... —
4.2.3. Семейство *Hypoviridae* ... 226
4.2.4. Семейство *Partitiviridae* ... —
4.2.5. Семейство *Reoviridae* ... 228
4.2.6. Семейство *Totiviridae* ... —
4.3. Вирусы протистов и грибов, содержащие геномную ssРНК(+) ... 232
4.3.1. Вирусы грибов в семействах *Alphaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Barnaviridae* и *Narnaviridae* ... —
4.3.2. Вирусы протистов в семействе *Virgaviridae* ... 233

ГЛАВА 5. **Вирусы высших растений (фитовирусы)** ... 235
5.1. Основные особенности фитовирусов ... —
5.2. Методы культивирования фитовирусов ... 239
5.3. Симптомы фитовирусной инфекции ... 241
5.4. Способы заражения фитовирусами ... 243
5.5. Пути распространения фитовирусов в теле растения ... 247
5.6. Биоразнообразие фитовирусов ... 251
5.6.1. Фитовирусы с геномной ssДНК. Семейство *Geminiviridae* ... —
5.6.2. Фитовирусы с геномной dsРНК ... 253
5.6.3. Фитовирусы с геномной ssРНК(+) ... 254
5.6.3.1. Семейства *Alphaflexiviridae* и *Betaflexiviridae* ... 258
5.6.3.2. Семейство *Bromoviridae* ... 259
5.6.3.3. Семейство *Potyviridae* ... 260
5.6.3.4. Семейство *Virgaviridae* ... 262
5.6.4. Вироиды ... 264
5.6.5. Фитовирусы с геномной ssРНК(–) ... 271
5.6.5.1. Семейство *Bunyaviridae* ... 272
5.6.5.2. Семейство *Rhabdoviridae* ... 273

5.6.6. Фитовирусы с геномной dsДНК, имеющие стадию обратной транскрипции. Семейство *Caulimoviridae* ... 275
5.7. Борьба с фитовирусной инфекцией ... 278

ГЛАВА 6. **Вирусы животных** ... 280
6.1. Общие свойства вирусов животных ... —
6.1.1. Онтогенез вирусов животных ... 281
6.1.2. Специфичность вирусов животных ... 283
6.2. Систематика вирусов животных ... 285
6.3. Методы культивирования вирусов животных ... 289
6.4. Типы инфекций, вызываемых вирусами животных ... 295
6.5. Методы наблюдения и изучения строения вирусов животных ... 299
6.6. Биоразнообразие вирусов животных ... 303
6.6.1. Вирусы животных, содержащие геномную dsДНК ... 304
6.6.1.1. Семейство *Adenoviridae* ... —
6.6.1.2. Семейство *Herpesviridae* ... 312
6.6.1.3. Семейство *Papillomaviridae* ... 322
6.6.1.4. Семейство *Poxviridae* ... 328
6.6.2. Вирусы животных, содержащие геномную ssДНК ... 335
6.6.2.1. Семейства *Circoviridae* и *Anelloviridae* ... —
6.6.2.2. Семейство *Parvoviridae* ... 337
6.6.3. Вирусы животных, содержащие геномную dsРНК ... 339
6.6.3.1. Семейство *Birnaviridae* ... 340
6.6.3.2. Семейство *Reoviridae* ... 346
6.6.4. Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК(+) и не имеющие стадию обратной транскрипции ... 353
6.6.4.1. Семейство *Caliciviridae* ... 355
6.6.4.2. Семейство *Dicistroviridae* ... 360
6.6.4.3. Семейство *Nodaviridae* ... 363
6.6.4.4. Семейство *Picornaviridae* ... 366
6.6.5. Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК(–) ... 378
6.6.5.1. Семейство *Orthomyxoviridae* ... 379
6.6.5.2. Семейство *Paramyxoviridae* ... 392
6.6.5.3. Семейство *Rhabdoviridae* ... 399
6.6.5.4. Вирус гепатита D (вне семейства) ... 405
6.6.6. Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК(+) и имеющие стадию обратной транскрипции. Семейство *Retroviridae* ... 406
6.6.7. Вирусы животных, содержащие геномную dsДНК и имеющие стадию обратной транскрипции. Семейство *Hepadnaviridae* ... 418

Заключение ... 426

Предметный указатель ... 428

Victorious though taking no zeal,
Invincible albeit with Achilles' heel,
Rebel submissive to common law,
Unseen in the magnifying glass,
Sometimes a friend instead of foe*.

Anon

ВВЕДЕНИЕ

В основу учебника положен материал общего курса «Вирусология», который с начала 1980-х годов выдержал испытание ежегодным чтением на биолого-почвенном факультете С.-Петербургского (Ленинградского) государственного университета. В качестве остро востребованного руководства он призван помочь лучше усвоить данный предмет. Помимо студентов и аспирантов он может быть использован специалистами разных профилей, которые хотели бы пополнить багаж своих знаний о вирусах. Наконец, авторы ждут вопросы от всех интересующихся историей биологии, а также ее современными достижениями. Независимо от мотивации читателя учебник послужит проводником по миру вирусов, а также справочником по общей и частной вирусологии.

Вначале уточним место, которое занимает вирусология в ряду современных биологических дисциплин, а также обозначим задачи ее университетского преподавания. С этой целью напомним, что до того, как стать самостоятельной наукой, вирусология была одним из разделов микробиологии — учения о микроскопических живых существах.

В методическом плане микробиология по определению неразрывно связана с микроскопией, и естественно, что вирусологи так же изучают свои объекты, используя микроскопическую технику. Вирусология унаследовала от микробиологии и специфические методы культивирования объектов, в том числе с использованием питательных сред, а также приемы стерилизации посуды и инструментов.

То, что курсы по вирусологии в СПбГУ читают преподаватели кафедры микробиологии (слово «вирусология» в данный момент отсутствует в титульном перечне учебно-научных подразделений биолого-почвенного факультета), объясняется не только участием авторского коллектива в вирусологических исследованиях. Более глубокой причиной микробиологической «узурпации» вирусологии служит историческая связь между двумя науками, а также плодотворное сотрудничество между петербургскими микробиологами и вирусологами.

Тем не менее не исключен иной выбор носителей вирусологического знания; в частности, в ряде отечественных и зарубежных университетов курсы вирусологии читают генетики, физиологи и биохимики животных, молекулярные биологи, хотя

---

* Победу обретает без труда,
Неодолимый, но и уязвимый,
Мятежник, хоть блюдет закон всегда,
Под микроскопом тенью он незримой,
Взамен врага и друг он иногда.

это придает предмету специфическую системность изложения и одностороннее информационное наполнение. Порой чтение курса вирусологии доверяют физикам или химикам, которые зачастую игнорируют ее биологические аспекты. В высших медицинских учебных заведениях вирусология преподносится в качестве раздела патологии, а вирусы рассматриваются как болезнетворные агенты, с которыми следует вести непримиримую борьбу. Откровенный антропоцентризм противоречит ныне осознанному факту, что вирусы являются полноправными представителями разнообразия живого мира и неотъемлемой частью биоценозов, а также воздействуют на эволюционные процессы, в частности путем использования механизмов недарвиновой эволюции.

Вирусология конца XX в. — начала XXI в. находится на переходном этапе, когда с ее традиционными объектами (вирусами животных, растений и бактериофагами) начали тематически конкурировать вирусы, не актуальные для медицины и сельского хозяйства.

В настоящее время общепризнано, что вирусы не только исключительно разнообразны, но и поистине неисчислимы. В свободной акватории Мирового океана их популяция достигает астрономического размера — 10^{31}, что делает их крупнейшим резервуаром генов на нашей планете. В морях и океанах с участием вирусов ежесуточно возобновляется ~20% глобальной биомассы, что ставит их в один ряд с такими доминирующими функциональными компонентами водных экосистем, как пикоцианобактерии. Область распространения вирусов охватывает все типы экологических ниш — аэробные и анаэробные, олиготрофные и эвтрофные, комфортные и вызывающие физиологический стресс, в том числе ниши, характеризующиеся экстремальными значениями температуры, pH, солености и гидростатического давления. Концентрация вирусов в таких нишах, например в соленых озерах, достигает 10^9 частиц на 1 мл.

Концептуальный прорыв в современной синэкологии — доказательство того, что у представителей всех основных групп живых организмов (бактерий, архей, протистов, грибов, водорослей, высших растений и животных) имеются свои собственные вирусы.

Вторым концептуальным прорывом, основанным на результатах секвенирования клеточных геномов (>500), стало доказательство того, что в них широко представлены интегрированные вирусные последовательности. Иногда это значительная часть ДНК, например до 10% генома *Homo sapiens* составляют интегрированные последовательности ретровирусов, что косвенно свидетельствует об их роли в эволюции своих хозяев.

Оказалось, что вирусы исключительно важны для понимания ранней эволюции живой клетки. В контексте гипотез, основанных на результатах анализа вирусных нуклеиновых кислот и белков, вирусы сыграли ключевую роль в происхождении ДНК и механизма ее репликации, а также в эволюционном формировании клеточного ядра. Естественно, это ставит вопрос о происхождении и эволюции самих вирусов, который оставался без ответа до наступления «геномного» этапа развития вирусологии.

Таким образом, вирусы являются одним из важнейших компонентов биосферы и существуют везде, куда только проникает органическая жизнь. Перефразируя метафору известного английского вирусолога Дэниса Бэмфорда (D. Bamford), можно сказать, что глобальное древо клеточной жизни затеряно в океане вирусов.

Несколько слов о цели университетского преподавания вирусологии. Считается, что результатом высшего биологического образования в первую очередь должно стать знание живых объектов в их истинном разнообразии и объективном значении (вопреки ложному допущению исключительной ценности «социально близких» высших животных и растений). Если это так на самом деле, то трудно отрицать, что вирусы, которые являются одним из базовых элементов биоразнообразия и локомотивом биосферы, незаслуженно занимают маргинальное место в современных образовательных программах. Надеемся, что наш учебник внесет свою лепту в борьбу с этим анахронизмом.

Общебиологическая стратегия лекционного курса «Вирусология», разработанного еще в 1980-х годах заведующим кафедрой микробиологии проф. Б. В. Громовым (1933–2001), принципиально отличается от интерпретации вирусологических вопросов генетиками, биохимиками, физиологами или молекулярными биологами, а также от специфического подхода к этому предмету в высших учебных медицинских заведениях. Развитие этого курса на фоне катастрофического дефицита отечественных и переводных руководств по вирусологии потребовало создать учебник, который способствовал бы концептуальному пониманию вирусов, как молекулярных паразитов, размножающихся в живой клетке.

Поскольку биологию вирусов нельзя изучать в отрыве от биологии их хозяев, учебник рассчитан на подготовленного читателя. Иными словами, необходимо владеть азами цитологии, физиологии, молекулярной генетики и иммунологии.

Авторы учебника не претендуют на изложение всей классической и современной вирусологии. Тем не менее из-за необходимости дополнить фундаментальные темы важнейшими деталями под одним переплетом оказались два раздела вирусологии — общая и частная.

В главе 1 — «Общая вирусология» — рассказывается история открытия и изучения вирусов; приводится концепция вирусов как биологических объектов; описываются строение, онтогенез, разнообразие и систематика вирусов; объясняются их значение, происхождение и эволюция.

В главах 2–6, отведенных частной вирусологии, характеризуются специфические вирусы, хозяевами которых служат представители семи глобальных групп живых организмов — бактерии, археи, протисты, грибы, водоросли, высшие растения и животные.

Минимально необходимый набор иллюстраций позволит читателю разобраться в структуре и функциональных свойствах вирусов, а список рекомендуемой литературы совместно с перечнем важнейших вирусологических сайтов облегчат самостоятельные поиски расширенной информации.

Авторы глубоко признательны кандидатам биол. наук, доц. Е. Ю. Дмитриевой, И. А. Сизовой и И. Я. Худякову за содействие на критическом этапе становления курса «Вирусология» в начале 2000-х годов. Особая благодарность Т. В. Серговской, внимательно прочитавшей учебник в рукописи, за ценные критические замечания и внесенные исправления, а также кандидату биол. наук А. А. Пиневич за изготовление рисунков к главе 1 и тщательную подготовку иллюстративного материала к остальным главам.

Глава 1

ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

Современная вирусология располагает огромной информацией о разнообразии вирусов и специфике их взаимоотношений с хозяевами. Возникают новые идеи, концепции и обобщения; фактический материал пополняется; многие сведения критически переосмысливаются. Об этом свидетельствует история открытия вирусов и их изучения. С ее изложения начинается знакомство с общей вирусологией.

У большинства естественных наук открытие новых объектов предшествует изучению их свойств и особенностей. Вирусология — исключение из общего правила, поскольку открытие вирусов произошло намного позже описания и попыток объяснить непонятные инфекционные патологии растительных и животных организмов.

Обнаружение вирусов нельзя считать счастливой находкой (англ. serendipity) или сбывшимся научным предвидением (англ. prediction). Это был трудный, порой драматичный период наблюдений, экспериментов с живыми организмами (растениями, животными, бактериями), который сопровождался спорами, не утихающими и по сей день, о биологической природе вирусов. Он формально завершился электронно-микроскопическим визуальным наблюдением этих мельчайших существ, неразличимых под световым микроскопом.

1.1. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСОВ

Экскурс в историю вирусологии показывает, что у вирусов не было первооткрывателя. Ни одного из тех, кто проводил самые первые исследования вирусов и кого мы теперь называем классиками вирусологии, нельзя персонально назвать отцом этой науки. При попытке объяснить феномены, связанные с существованием и поведением вирусов, первопроходцы вирусологии опирались на ресурс идей и методов своего времени.

Вирусы представляют собой неклеточную форму жизни, и даже в наши дни прогресса биологии их происхождение и смысл существования остаются неясными. Вирусы — это не просто микробы, или микроскопические живые существа, которых

можно увидеть только с помощью микроскопа. Это ***ультрамикробы***, размер которых, как правило, не превышает 300 нм. Минимальная длина волны видимого света составляет 400 нм. Согласно законам оптики такие объекты не отражают видимый свет и потому не видны в его лучах.

Иными словами, для визуального наблюдения вируса недостаточно разрешающей способности светового микроскопа. В то же время электронный микроскоп, использующий волновые свойства пучка быстро разгоняемых электронов ($\lambda = 0{,}005$ нм), позволяет не только визуализировать вируса, но и различить детали его строения.

Таким образом, для прямого обнаружения вирусов потребовался электронный микроскоп. Поэтому формальной датой открытия вирусов можно считать 1939 г., когда в журнале «Естествознание» (die Naturwissenschaften) появилась публикация немецких вирусологов Густава Кауше (G. Kausche), Эдгара Пфанкуха (E. Pfankuch) и Гельмута Руски (H. Ruska), в которой было приведено морфологическое описание палочковидного вируса табачной мозаики размером 18×300 нм.

Тем не менее макроскопические проявления последствий вирусной инфекции отмечались многими ботаниками, зоологами и микробиологами задолго до изобретения электронного микроскопа (конец 1930-х годов).

Описание симптомов заразных болезней человека, в особенности натуральной оспы (которая, как мы теперь знаем, имеет вирусную этиологию), встречается уже в древнекитайских и санскритских трактатах, трудах римских историков и византийских хроницистов, а также в энциклопедических трактатах «отцов» медицины (в частности, Авла Корнелия Цельса и Авиценны).

Однако в специальной биологической литературе (прежде всего в ботанических трудах) патологические явления, вызываемые вирусной инфекцией, были впервые отражены лишь в эпоху Возрождения.

Классическим примером симптома вирусной инфекции служит пятнистость лепестков тюльпана. Первое описание этого феномена дал французский ботаник Шарль Делеклюз (Charles de l'Ecluse), вошедший в анналы биологии под латинизированным именем Каролус Клузиус (Carolus Clusius). В своей книге «История редкостных растений» (лат. Rariorum Plantarum Historia), изданной в Голландии в 1601 г., он привел удивительные свидетельства появления на однотонных лепестках тюльпана обесцвеченных участков в форме перистых полос, языков пламени и т. д. На волне увлечения селекцией тюльпанов появилась мода на подобные экземпляры, что, естественно, отразилось на их рыночной стоимости. К концу 1630-х годов голландские цветоводы научились искусственно передавать признак лепестковой пятнистости монохромным тюльпанам через прививку луковиц (аналогично выглядящие современные коммерческие сорта не инфицированы вирусами, а выведены генетически).

Не прошла незамеченной и симптоматика известных еще с античности вирусных болезней человека и животных — бешенства, кори, оспы, паралитического полиомиелита и т. д.

Медицинская вирусология сформировалась как ветвь инфекционной патологии, науки о заразных болезнях. Во второй половине XIX в. Луи Пастер (L. Pasteur), Роберт Кох (R. Koch) и Джозеф Листер (J. Lister) установили, что инфекционные заболевания человека и животных вызываются микробами, под которыми тогда понимали исклю-

чительно бактерий. Это доказывалось путем микроскопического выявления специфического возбудителя, его выращиванием на питательном бульоне и его нефильтруемостью, т.е. механической задержкой «свечой», или мелкопористым фарфоровым фильтром (рис. 1), который изобрел ученик Пастера Шарль Шамберлан (C. Chamberland).

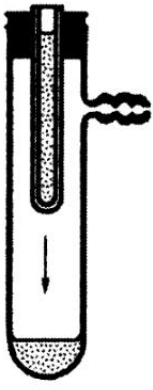


Рис. 1. Фильтр, или «свеча» Шамберлана (франц. la bougie Chamberland).

Объяснение в тексте.

Поскольку существование микроскопических болезнетворных агентов небактериальной природы даже в конце XIX в. не допускалось, Луи Пастер пришел к выводу, что возбудителем бешенства является мельчайший «фильтрующийся вирус» (вирусом тогда называли инфекционный агент, который по неизвестной причине ускользал от визуального наблюдения и не выделялся в культуру).

Термин ***вирус*** (лат. virus — нечто вообще ядовитое), который широко использовался в средневековой медицине, возник в античную эпоху, когда им обозначали все опасное, агрессивное или неприятное, например змеиный яд, солончаковую воду, нечистоты, грубую экстравертную эмоцию и т.д.

Незнание истинной природы вирусов не препятствовало эмпирической разработке способов борьбы с вирусными заболеваниями на основе природного иммунитета или искусственной ***иммунизации*** (лат. immunis — незатронутый; в *данном случае* — не подверженный болезни).

Иммунизация ослабленным возбудителем натуральной оспы использовалась с древнейших времен. После того, как английский врач Эдуард Дженнер (E. Jenner) предложил в 1796 г. профилактическую прививку коровьей оспы, с использованием в качестве ***вакцины*** (лат. vacca — корова) лимфы больного животного, вакцинация людей получила широкое распространение. В свою очередь, Луи Пастер в 1885 г. применил для иммунизации от бешенства «ослабленный вирус» (франц. virus fixe). Эта вакцина представляла собой высушенный и поэтому неинфекционный препарат мозга кролика, зараженного бешенством.

В условиях, когда визуальное наблюдение вирусов было еще невозможно и их еще не научились получать в виде препарата частиц, знание об их структурно-функциональных признаках (безотносительно к патологическим эффектам, которые они вызывают у макроорганизма) носило косвенный характер и сводилось не к фактам, а к общим предположениям.

Так, в 1886 г. немецкий химик Адольф Майер (A. Mayer), преподававший в университете г. Вагенинген (Голландия), заинтересовался патологией растений табака, которая выражалась в появлении на темно-зеленой листовой поверхности светло-зеленых пятен. Ему удалось выяснить, что болезнь, которую он назвал «мозаичной», имеет инфекционную природу: патологический признак передавался от растения к растению с соком мозаичных листьев. Хотя А. Майер не обнаружил возбудителя табачной мозаики (теперь мы знаем, что это вирус), он по косвенным признакам

установил, что последний инактивируется при 80°С, и предположил, что это бактерия.

Одной из ключевых фигур в истории открытия вирусов стал русский ботаник Д. И. Ивановский, который в 1892 г. показал, что возбудитель табачной мозаики задерживается свечой Шамберлана. Означает ли это, согласно традиции отечественной научной историографии, что приоритет в открытии вирусов принадлежит не Клузиусу, Майеру или Пастеру, а Д. И. Ивановскому? Отметим, что сам ученый был убежден, что имеет дело либо с фильтрующейся бактерией (и даже сообщил о заражении здорового растения ее культурой), либо с бактериальным токсином.

В действительности Д. И. Ивановский впервые связал феномен инфекционности с очень малым «эксклюзионным» диаметром болезнетворного агента. Иными словами, он обозначил верхний предел размера этого агента.

Таким образом, ***истинная и неоспоримая научная заслуга Д. И. Ивановского состоит в косвенном обнаружении факта существования ультрамикробов***, хотя он не смог описать их в качестве биологических объектов (теперь мы знаем, что одни из них относятся к вирусам, а другие — к ультрамикробактериям или ультрамикроархеям).

Поучительно сопоставить формулировку открытий Д. И. Ивановского и Антония ван Левенгука (последний описал внешний вид, размер и поведение обитателей мира микробов, в частности бактерий, хотя ошибочно принял их за микроскопических животных).

Таким образом, не следует приписывать славу первооткрывателя вирусов растений нашему соотечественнику Д. И. Ивановскому. Не являются первооткрывателями вирусов животных и немецкие микробиологи Фридрих Лефлер (F. Loeffler) и Пауль Фрош (P. Frosch), которые в 1898 г. установили, что ящур (англ. foot-and-mouth-disease, FMD), инфекционная болезнь крупного рогатого скота, симптомами которой служат эрозия межкопытной щели и спазм дыхательных мышц, передается с фильтратом через свечу Шамберлана. Поскольку возбудитель ящура не выявлялся микроскопированием и не размножался на питательных средах, Лефлер пришел к выводу, что этот возбудитель — не бактерия, а токсин. Так как эффективность воздействия фильтрата лимфы больного животного при многократных пассажах не уменьшалась, Лефлер предположил, что этот гипотетический токсин либо имеет необыкновенно высокую активность (даже при разведении $1:10^{10}$), либо ***размножается в теле жертвы***.

Подобно отечественной научной историографии, считающей Д. И. Ивановского отцом вирусологии, западная научная историография ошибается, объявляя первооткрывателем вирусов голландского микробиолога Мартинуса Бейеринка (M. W. Beijerinck). Тем не менее этот исследователь через шесть лет (1898) после публикации Д. И. Ивановского и, скорее всего, вначале не зная о ней (впоследствии он ссылался на труд своего предшественника), пришел к оригинальным выводам, принципиально важным для понимания природы вирусов. Он выяснил: во-первых, что инфекционный агент не просто фильтруется, а ***диффундирует*** через слой агарового геля; во-вторых, что заражаются только растущие ткани растения, и ***инфекционный агент размножается в клетках, но не in vitro***; в-третьих, что инфекционный агент сохраняет активность после замораживания или высушивания, однако ***инактивируется при кипячении***.

В итоге Бейеринк пришел к выводу, что возбудитель табачной мозаики представляет собой «заразную живую жидкость» (лат. contagium vivum fluidum) в отличие от бактериального, или «корпускулярного», инфекционного начала (лат. contagium vivum fixum). Иными словами, он считал этот возбудитель молекулой, которая диффундирует в агаре, теряет активность даже при таком слабом воздействии, как нагрев до точки кипения воды (тогда еще не знали, что биологические макромолекулы подвержены температурной денатурации); обладает инфекционностью и патогенностью, а главное — молекулой, которая размножается в живой клетке.

Таким образом, Бейеринк гениально угадал ***небактериальную природу*** возбудителя табачной мозаики, хотя ошибочно принял внеклеточную форму вируса за молекулу (в действительности вирусная частица является надмолекулярным образованием). Заслуга Бейеринка состоит в том, что он фактически предложил концепцию неклеточной формы жизни.

Объективно оценивая вклад Д. И. Ивановского и М. Бейеринка в вирусологию, подчеркнем, что размерный критерий, сыгравший решающую роль в косвенном обнаружении вирусов, вообще говоря, условен. Например, Ф. Лефлер в 1908 г. показал, что возбудитель ящура (впоследствии оказалось, что это вирус) имеет корпускулярную природу и задерживается особо мелкопористыми фарфоровыми фильтрами конструкции японского микробиолога Шибасатуро Китасато (S. Kitasato). Теперь мы знаем, что ультрамикробактерии, например риккетсии и микоплазмы, диаметр которых составляет около 300 нм, проходят через фильтры, задерживающие большинство бактерий. Следовательно, решающее значение для выяснения природы живого микроскопического объекта имеют не размеры, а строение.

Ивановский, Лефлер и Фрош, а также Бейеринк не располагали необходимым методическим арсеналом для того, чтобы отличить вирусов от облигатно-эндоцитобиотических ультрамикробактерий (он появился лишь в 1930–1940-е годы, когда изобрели электронный микроскоп и зародилась препаративно-аналитическая биохимия). Эти исследователи могли лишь теоретизировать о природе фильтрующегося возбудителя, причем, как позднее выяснилось, гипотеза Д. И. Ивановского о его бактериальной природе была ошибочной, а концепция М. Бейеринка — близкой к истине.

Актуальные для ветеринарии наблюдения Лефлера и Фроша получили широкий резонанс в мире медицины. Вскоре (1902) фильтруемость вируса (напомним, что так называли любой инфекционный возбудитель) была показана Уолтером Ридом (W. Reed) и Джеймсом Кэрролом (J. Carrol) на примере этиологического агента опасного заболевания человека — желтой лихорадки. С этого момента круг «фильтрующихся вирусов», или просто «вирусов», стал быстро расширяться.

Концепция Бейеринка о неклеточной жизни обрела мощную поддержку в результате открытия феномена бактериофагии в начале XX в. В 1915 г. английский врач-патолог Фредерик Туорт (F. W. Twart) описал «стекловидную трансформацию» колоний бактерии *Micrococcus* sp., вызванную трансмиссивным литическим агентом. Пытаясь объяснить этот феномен, Туорт предположил, что его вызывает вирус (в том смысле, который вкладывал в данный термин Бейеринк).

Вскоре после этого (1917) канадский микробиолог Феликс д'Эррель (F. H. d'Hérelle) описал феномен спонтанного лизиса жидкой культуры дизентерийной палочки, *Shi-*

gella dysenteriae. В отличие от Ф. Туорта, который сомневался в вирусной природе литического агента и упорно пытался размножить его на синтетических средах, он был убежден, что имеет дело с молекулой, способной не только разрушать бактерий, но и предварительно использовать их для собственного размножения.

Для обозначения агента, вызывающего лизис бактерий, д'Эррель предложил ныне общепризнанный термин ***бактериофаг*** (англ. bacteriophage, от греч. bacteria — палка; в *данном случае* — бактерия, и phagos — прожорливый; *здесь* — поедающий бактерий). Широко используется и редуцированный вариант этого термина — ***фаг*** (англ. phage).

Оба термина, безусловно, исключительно удачны. Вирусы растений и животных, как правило, вызывают лизис клеток специализированных тканей и органов; если инфицированный организм погибает, то это зависит от значения его функциональных частей и масштаба распространения патологии. В то же время цитолитическое воздействие вирусов на бактерию, или клетку-организм, приводит к ее тотальному разрушению. По этой причине система бактерия–бактериофаг служит простой и удобной экспериментальной моделью, которая используется с целью размножения и подсчета вирусов, а также для изучения свойств последних.

Д'Эррелю принадлежит приоритет в разработке метода количественного учета бактериофагов по зонам отсутствия роста, или ***бляшкам*** (англ. plaque), которые образуются после нанесения на бактериальный газон фаголизата жидкой культуры. Этот исследователь пришел к принципиально важному выводу, что в «негативных колониях», или зонах распространения лизиса бактерий, сосредоточены свободные частицы фага, способные к реинфекции и внутриклеточному размножению. Наконец, д'Эррель предложил использовать фагов для борьбы с бактериальными болезнями и назвал данный метод ***фаготерапией*** (англ. phage therapy). Заманчивые перспективы фаготерапии (впоследствии они не оправдались) вкупе с загадочной природой самих фагов заинтересовали ряд исследовательских групп, хотя вирусная природа этих инфекционных агентов была установлена с помощью электронного микроскопа только в 1940 г. (см. ниже).

На этом закончился первый, описательный, этап изучения вирусов, когда были обнаружены эффекты их взаимодействия с растениями, животными и бактериями.

Второй, аналитический, этап был связан с рождением биохимической вирусологии и электронной микроскопии. В 1935 г. американский вирусолог Уэндел Стэнли (W. M. Stanley) применил для изучения состава вирусов широко используемый в химии белка препаративный метод — фракционное осаждение сульфатом аммония. Таким способом он выделил из сока зараженных растений табака игольчатые кристаллы, оказавшиеся возбудителем мозаичной болезни (после их введения в здоровое растение развивалось характерное заболевание). Агент можно было многократно получать в кристаллическом виде, т. е. он размножался в серии пассажей. Элементный состав кристаллов был таким же, как у белка; они демонстрировали характерные качественные реакции на белок и денатурировались при нагревании. Таким образом, концепция Бейеринка о неклеточной форме жизни (в виде саморазмножающихся инфекционных молекул) получила экспериментальное подтверждение, и через десять лет за это открытие Стэнли был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине (1946).

Спустя год после первой публикации результатов У. Стэнли (1936) английские вирусологи Фредерик Боуден (F. C. Bawden) и Норман Пири (N. W. Pirie) выяснили, что помимо белка вирус табачной мозаики содержит около 5% РНК. Однако это открытие прошло незамеченным, поскольку субстратом наследственности тогда считали белок, а не нуклеиновую кислоту.

Еще раньше (1934) венгерский эмигрант Макс Шлезингер (M. M. Schlesinger) провел в Германии серию аналитических исследований бактериофага, вируса *Escherichia coli*. Он оценил размер вирусных частиц по скорости седиментации при ультрацентрифугировании, доказал их нуклеопротеиновую природу на основании положительной реакции Фельгена на ДНК и положительной ксантопротеиновой реакции на белок, наблюдал их в световом микроскопе с темнопольным конденсором (как светящиеся точки) и подсчитал их.

Однако оставался загадкой механизм репродукции вирусов из-за ультрамикроскопического размера и «простого» биохимического состава их частиц. Для ее решения следовало детализировать архитектуру вирусов и морфологическую картину их взаимоотношений с клеткой-хозяином, что потребовало прибегнуть к помощи электронного микроскопа.

Как уже говорилось, первое визуальное наблюдение относительно просто устроенного вируса табачной мозаики провел в 1939 г. Густав Кауше с сотрудниками (рис. 2). Вслед за этим (1940) они получили первое электронно-микроскопическое изображение бактериофага, имеющего более сложную морфологию (головка, хвостовой отросток и т. д.). Заметим, что в настоящее время морфологически охарактеризовано свыше 5000 бактериофагов, 96% которых оказались «хвостатыми».

Исследование кристаллов вируса табачной мозаики методом дифракции рентгеновых лучей, выполненное в 1941 г. английским физиком Джоном Берналом (J. D. Bernal), показало, что оболочка вирусной частицы состоит из повторяющихся белковых субъединиц. В 1955 г. американский вирусолог Хайнц Френкель-Конрат (H. Fraenkel-Conrat) установил, что очищенная РНК вируса табачной мозаики и его белковые

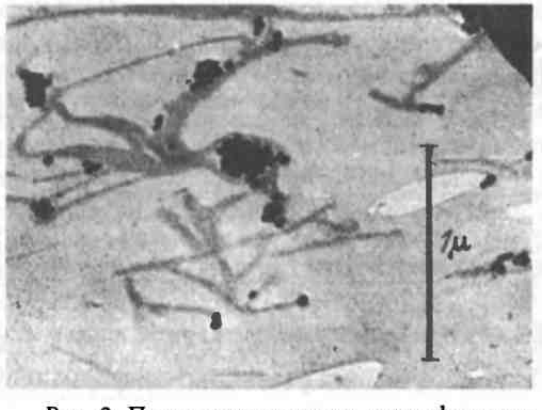


Рис. 2. Первая электронная микрофотография вируса табачной мозаики (из: Kausche et al., 1939).

субъединицы спонтанно воссоединяются в водном растворе, образуя полноценные инфекционные частицы, что теперь называется эффектом самосборки (англ. self assembly). Совместно с биохимиком Бриттой Сингер (B. Singer) Френкель-Конрат реконструировал гибридного вируса табачной мозаики из компонентов, полученных от разных штаммов (1957). Наконец, в 1957 г. английский кристаллограф Розалинда Франклин (R. E. Franklin), получив 3D-реконструкцию вируса табачной мозаики, показала, что молекула РНК свернута в спираль и окружена радиально уложенными белковыми субъединицами.

Мостом, связавшим ультраструктурное исследование вирусов с изучением механизмов их репродукции, стали результаты опытов, проведенных в 1952 г. американскими вирусологами Альфредом Херши (A. D. Hershey) и Мартой Чейз (M. K. Chase). Как выяснилось, при заражении *E. coli* бактериофагом T2 внутрь клетки проникает только вирусная ДНК, тогда как белковая оболочка остается снаружи. Таким образом, было установлено, что носителем генетической программы для репликации бактериофага служит не белок, а ДНК. Аналогичную роль РНК как альтернативного носителя генетической информации в 1956 г. доказали немецкие вирусологи Андреас Гирер (A. Gierer) и Герхард Шрамм (G. Schramm) и одновременно с ними Хайнц Френкель-Конрат на примере вируса табачной мозаики.

Третий этап истории вирусологии был связан с рождением ***молекулярной биологии вирусов***. Если большинство ранних публикаций по бактериофагам было посвящено проблеме терапевтического применения этих инфекционных агентов, то в конце 1930-х — начале 1940-х годов они начали привлекать внимание ученых как ключевые модельные объекты при изучении молекулярной природы наследственности и механизмов экспрессии генома.

Многоплановым исследованием бактериофагов занялось несколько европейских «фаговых» групп — в Париже (F. Jacob, A. Lwoff, J. Monod, E. Wollman), Копенгагене (N. Jerne, O. Maaløe), Кембридже (S. Brenner, F. Crick, J. Kendrew, M. Perutz), Лондоне (W. Hayes, N. Symonds) и Тюбингене (H. Friedrich-Freksa, W. Weidel).

Однако главный вклад в изучение бактериофагов, особенно их генетики, внесли американские исследователи из Колд-Спринг Харбора (Калифорния) — Макс Дельбрюк (M. Delbrück), Сальваторе Лурия (S. Luria) и Альфред Херши, которые в 1969 г. были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине. Выбрав в качестве модельных объектов разные штаммы фагов *E. coli* (Т-фаги 1–7), они изучили их цикл развития и популяционную динамику, в том числе используя мутантов. Совместно с Джоном Вейглом (J. Weigle) Макс Дельбрюк провел анализ лизогении (способ фаговой репродукции, альтернативный литическому) на примере фага лямбда, хотя основная заслуга в изучении этого феномена принадлежит французам Франсуа Жакобу, Андре Львову и Жаку Моно (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1969 г.).

Результаты исследования бактериофагов стали краеугольным камнем молекулярной биологии — науки, изучающей реализацию информационной структуры нуклеиновых кислот. В частности, анализ феномена рестрикции, или избирательного ограничения фаговой репродукции, привел к открытию швейцарцем Вернером Арбером (W. Arber) и американцами Дэниелом Натансом (D. Nathans) и Гамильтоном Сми-

том (H. Smith) эндонуклеаз рестрикции, или ***рестриктаз***, — главного инструмента молекулярной биологии и молекулярной генетики (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1978 г.).

Четвертый, текущий исторический этап связан с прогрессом ***медицинской вирусологии***. Начало 1940-х годов и последующий период ознаменовались выдающимися достижениями в области изучения вирусов животных. В итоге вирусология стала играть одну из ключевых ролей при решении проблем общественного здоровья.

Примечательно, что во второй половине XX в. за открытия в области изучения вирусов человека и животных было присуждено десять Нобелевских премий по физиологии и медицине (табл. 1).

Таблица 1. **Нобелевские премии 1951–2008 гг. по физиологии и медицине, присужденные за исследования в области медицинской вирусологии**

Год присуждения премии	Лауреаты	Результат исследования
1951	М. Тейлер (M. Theiler), ЮАР–США	Разработка вакцины против вируса желтой лихорадки
1954	Д. Эндерс (J. Enders), Ф. Роббинс (F. Robbins), Т. Веллер (T. Weller), США	Репродукция вируса полиомиелита в клеточной культуре
1966	П. Раус (P. Rous), Ч. Хиггинс (C. Higgins), США	Открытие онкогенных вирусов
1975	Д. Балтимор (D. Baltimore), Р. Дальбекко (R. Dulbecco), Г. Темин (H. Temin), США	Открытие обратной транскрипции
1976	Б. Блумберг (B. Blumberg), США	Открытие латентных вирусных инфекций
1978	В. Арбер (W. Arber), Швейцария–США; Д. Натанс (D. Nathans), Г. Смит (H. Smith), США	Открытие рестриктаз
1988	Г. Элион (G. Elion), Д. Блэк (J. Black), Д. Хитчингс (G. Hitchings), США	Создание ацикловира
1989	Д. Бишоп (J. Bishop), Г. Вармус (H. Varmus), США	Открытие ретровирусных онкогенов
1993	Р. Робертс (R. Roberts), Великобритания, Ф. Шарп (P. Sharp), США	Открытие сплайсинга РНК
2008	Ф. Барре-Синусси (F. Barré-Sinoussi), Л. Монтанье (L. Montagnier), Франция; Х. цур Хаузен (H. zur Hausen), Германия	Открытие вируса иммунодефицита человека; открытие вирусной этиологии рака матки

Одним из важнейших условий для проведения исследований в области медицинской вирусологии стало размножение инфекционного агента на соответствующем хозяине. Поскольку такие опыты нельзя проводить на людях, в качестве модели использовалась специально выведенная «швейцарская» порода белых мышей (англ. swiss mouse). Они устойчивы ко многим бактериальным возбудителям, но чувствительны к ряду вирусов — таким, как вирусы гриппа, бешенства, желтой лихорадки, энцефалита, энцефаломиелита и т. д.

Метод заражения мышей путем введения суспензии вирусных частиц в ткани и органы был разработан американским вирусологом Джейкобом Фертом (J. Furth)

в 1931 г. В отдельных случаях взамен белых мышей использовались другие мелкие лабораторные животные (крысы, морские свинки, кролики, хомячки), а также обезьяны.

В опытах на лабораторных животных их приходилось забивать, пораженные вирусами органы извлекать и гомогенизировать, гомогенат фильтровать или центрифугировать, а затем вводить полученный препарат здоровым животным. Будучи весьма трудоемкими и продолжительными, зачастую опасными и неизменно дорогостоящими, такие исследования приносили сравнительно мало информации о биологии вирусов.

В качестве более простого и экономичного способа репродукции вирусов животных с конца 1940-х годов стали практиковать заражение куриных эмбрионов с помощью метода, изобретенного в начале 1930-х годов английскими вирусологами Элис Вудраф (A. Woodruff) и Эрнестом Гудпасчером (E. Goodpasture). В данном случае суспензия вируса инъецируется в аллантоисную или амниотическую полости или наносится на хориоаллантоисную оболочку (рис. 3). После инкубации в течение нескольких суток при 35–37°С скорлупа яйца повторно вскрывается для извлечения вирусосодержащего материала (хориоаллантоисной жидкости или эмбриональной ткани).

Куриные эмбрионы используются для размножения разных вирусов, конечная концентрация, или титр, которых может достигать 10^9 частиц·мл$^{-1}$.

Однако подлинный расцвет медицинской вирусологии наступил после внедрения метода культивирования вирусов на клеточных культурах in vitro, разработанно-

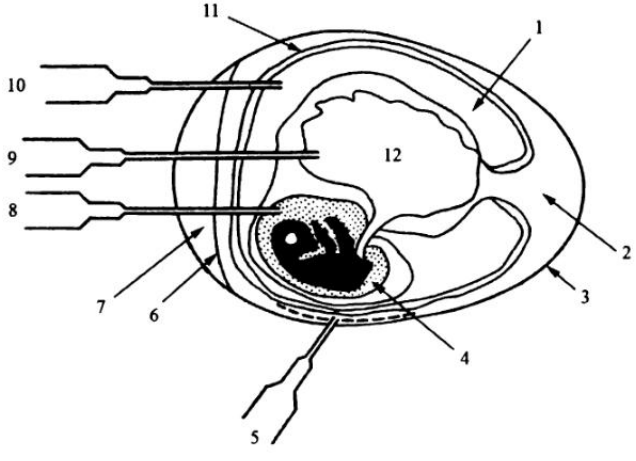


Рис. 3. Размножение вирусов в курином эмбрионе.

1 — аллантоис, 2 — белок, 3 — скорлупа, 4 — амниотическая полость с зародышем, 5 — заражение в хориоаллантоисную оболочку, 6 — подскорлуповая оболочка, 7 — воздушный мешок, 8 — заражение в амнион, 9 — заражение в желточный мешок, 10 — заражение в аллантоис, 11 — хориоаллантоисная оболочка, 12 — желточный мешок.

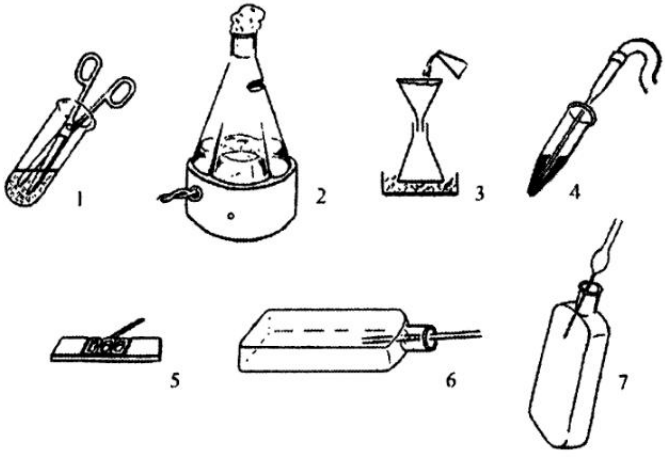


Рис. 4. Метод трипсинизации ткани для получения клеточной культуры (по: Товарницкий, 1976).

1 — механическое измельчение ткани, 2 — мацерация ткани посредством трипсинизации, 3 — фильтрование суспензии клеток перед центрифугированием, 4 — удаление надосадочной жидкости, 5 — подсчет клеток, 6 — высев клеток, 7 — добавление питательной среды.

го в 1948–1955 гг. американскими вирусологами Джоном Эндерсом (J. Enders), Фредериком Роббинсом (F. Robbins) и Томасом Уэллером (T. Weller).

Схема приготовления клеточной культуры путем трипсинизации ткани приведена на рис. 4. Подготовка питательной среды и посуды, выращивание клеточной культуры и ее инокуляция вирусом, а также культивирование зараженного хозяина в аксеничных условиях осуществляются с помощью классических приемов, используемых при культивировании бактерий.

Дальнейшее совершенствование этого метода привело к появлению клональных клеточных культур, впервые полученных в 1948 г. американскими цитологами Кэтрин Стэнфорд (K. Stanford) и Уилтоном Эрлом (W. Earle).

Методический прорыв — возможность размножения вирусов на клеточных культурах — избавил вирусологов от необходимости пассировать их на животных. В свою очередь, возможность получать вирусные препараты с высоким «выходом» способствовала быстрому развитию биохимической вирусологии, которая в дальнейшем переросла в молекулярную вирусологию.

Вирусное заражение клеточной культуры приводит к разнообразным последствиям: лизису клеток; слиянию клеток в симпласт; образованию специфических включений и т. д.

Использование клеточных культур позволило не только изучать патогенные последствия вирусной инфекции, но и открыть новых представителей вирусов, а также исследовать молекулярные механизмы их репродукции.

Имея в распоряжении достаточное количество материала, вирусологи выяснили структурные особенности и генетическую стратегию вирусов. Они расшифровали механизмы репликации, транскрипции и трансляции, используемые при размножении вирусов, а также изучили способность некоторых вирусов переходить в латентное состояние вследствие встраивания их генома в геном клетки-хозяина. Было показано, что такой переход не только обеспечивает персистенцию вирусов, но и может приводить к трансформации зараженной клетки, в том числе к ее малигнизации.

В последние годы в вирусологию, а также в другие разделы биологии пришло понимание конструктивной роли вирусов в эволюции органической жизни на планете и их глобального значения. В частности, осознано огромное влияние бактериофагов на экосистемы. По приблизительным подсчетам в биосфере содержится ~10^{31} фаговых особей, что делает их самыми многочисленными обитателями нашей планеты.

В верхнем слое морской воды концентрация вирусов достигает 10^{10} частиц·мл$^{-1}$, а в морских, озерных и речных илах содержится 10^{7}–10^{9} частиц·г$^{-1}$.

В Мировом океане литические бактериофаги служат главным регулятором обновления популяций бактерий; они концентрируют в своих частицах такие биогенные элементы, как азот и фосфор, а также являются важнейшими векторами — трансдуцирующие фаги ежегодно переносят 10^{25}–10^{28} п.н. ДНК.

Как естественные регуляторы численности природных популяций микробов и макроорганизмов вирусы берутся на вооружение при решении практических задач сельского хозяйства, в частности, как эффективные биоинсектициды (примером служат коммерческие препараты бакуловирусов).

Путь, пройденный вирусологией за последнее столетие, отмечен чередой исторических вех (табл. 2).

1.2. ЧТО ТАКОЕ ВИРУС С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ БИОЛОГА

В настоящее время слово «вирус» крайне популярно из-за растущей глобализации, наложившейся на информационную революцию. В обыденном сознании вирусы — это виновники эпидемий и пандемий, хотя несведущий человек вряд ли представляет себе, чем вирус (например, вирус гриппа) отличается от бактерий (скажем, от кишечной палочки).

По мере распространения персональных компьютеров биологический термин вышел за исходные рамки. «Компьютерным вирусом» (англ. computer virus), или просто «вирусом», называется программа, которая не только размножается (реплицируется) путем внедрения в операционную систему все новых и новых компьютеров, но и дает несанкционированные команды, в том числе наносящие вред оборудованию или пользователю. Нельзя не признать, что этот термин идеально подходит к такой программе — подобно живому вирусу, компьютерный вирус обладает чертами генотипа (способность информации к самокопированию) и проявляется фенотипически (эксплуатирует функциональное устройство с нанесением, в той или иной степени, вреда).

В отличие от неспециалистов, биологи как профессионалы обязаны иметь научное представление о живых вирусах. Однако биологическая концепция вируса, дающая ответ на не риторический вопрос: *что такое вирус* (лат. quid est virus), нетри-

Таблица 2. **Исторические вехи вирусологии**

Годы	Исследователи	Результат исследования
1892; 1898	Д. И. Ивановский, М. Бейеринк (M. Beijerinck)	Обнаружение фильтруемости возбудителя табачной мозаики
1898	Ф. Леффлер (F. Loeffler), П. Фрош (P. Frosch)	Обнаружение фильтруемости возбудителя ящура
1901; 1902	У. Рид (W. Reed), Д. Кэррол (J. Carrol)	Обнаружение фильтруемости возбудителя желтой лихорадки; доказательство переноса этого возбудителя москитами
1915; 1917	Ф. Туорт (F. Twart), Ф. д'Эррель (F. d'Herelle)	Открытие бактериофагии; разработка метода количественного учета фагов
1931	Д. Ферт (J. Furth)	Разработка метода размножения вирусов на мышах
1931	А. Вудраф (A. Woodruff), Э. Гудпасчер (E. Goodpasture)	Изобретение метода размножения вирусов на куриных эмбрионах
1934; 1937	М. Шлезингер (M. Schlesinger), Ф. Боуден (F. Bawden) и др.	Обнаружение ДНК в составе бактериофага и РНК в составе вируса табачной мозаики
1935	У. Стэнли (W. Stanley)	Получение кристаллического препарата вирионов (вируса табачной мозаики)
1939	Г. Кауше (G. Kausche) и др.	Первая визуализация вирионов (вируса табачной мозаики)
1948–1955	Д. Эндерс (J. Enders) и др.	Изобретение метода размножения вирусов в клеточных культурах
1954–1961	Д. Солк (J. Salk) и др.	Создание антивирусной вакцины (против полиомиелита)
1957	А. Айзекс (A. Isaacs), Д. Линденманн (J. Lindenmann)	Открытие интерферона
1950–1960	Б. Блумберг (B. Blumberg) и др.	Открытие латентных вирусных инфекций
1950–1970	В. Арбер (W. Arber), Д. Балтимор (D. Baltimore), С. Бензер (S. Benzer), Р. Дальбекко (R. Dulbecco), М. Дельбрюк (M. Delbrück), Ж. Моно (J. Monod), А. Херши (A. Hershey) и др.	Создание основ молекулярной биологии и молекулярной вирусологии
1962	М. Холлингс (M. Hollings)	Открытие вирусов грибов
1969–1976	Р. Хюбнер (R. Huebner) и др.	Открытие онкогенных вирусов
1972	Л. Дайамонд (L. Diamond) и др.	Открытие вирусов протистов
1974	Т. Торсвик (T. Torsvik), А. Дандес (I. Dundas)	Открытие вирусов архей
1978–1985	С. Харрисон (S. Harrison) и др.	Первая рентгеноструктурная 3D-реконструкция вириона вируса высших растений (карликовой кустистости томата) и вируса животных (полиовируса)
1979	Д. Майер (J. Mayer), Ф. Тэйлор (F. Taylor)	Открытие вирусов водорослей
1980	Б. Пойеч (B. Poiesz), Ф. Ручетти (F. Ruscetti)	Открытие человеческого ретровируса
1981	Д. Скеэль (J. Skehel) и др.	Молекулярный анализ гемагглютинина вируса гриппа
1984–2000	М. Хилльмен (M. Hilleman) и др.	Создание рекомбинантной вирусной вакцины (против гепатита В)

виальна даже для биологов. Понять и оценить, чем вирусы отличаются от бактерий, и какова их естественная природа, можно только владея основами цитологии, биохимии и молекулярной биологии.

В чем состоит специфика вирусологии, и какое определение можно дать этой науке?

Вирусология (англ. virology) ***изучает строение, функциональные свойства, экологию, филогению и систематику живых существ, которые называются вирусами.***

Характеризуя предмет вирусологии, мы должны дать развернутое определение вирусов и ответить на вопрос: соблюдает ли эта дисциплина принцип единства объекта или это синкретическая (сборная) наука, которая занимается разными по происхождению объектами?

Монофилетичное происхождение вирусов в настоящее время отрицается (см. раздел 1.10). Кроме того, биологические свойства отдельных групп вирусов неразрывно связаны с цитологической организацией хозяев — живых организмов, относящихся к трем доменам глобального филогенетического древа (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*) и инфицируемых специфическими вирусами.

Таким образом, вирусология — это система дисциплин, которые изучают полифилетичных живых существ — внутриклеточных молекулярных паразитов организмов разного эволюционного происхождения и разного цитологического строения. Иными словами, частные разделы вирусологии представляют собой патологическую цитологию хозяев.

По логике вещей вирусами бактерий должна заниматься бактериология, вирусами архей — археотология, протистов — протистология, грибов — микология, водорослей — альгология, высших растений — ботаника, животных — зоология. Тем не менее из-за своего фенотипического сходства (ультрамикроскопический размер, неклеточное строение) все вирусы остаются объектами общей науки — вирусологии. Аналогичным образом прокариотное строение бактерий и архей делает их объектами общей науки — микробиологии.

Концептуальное определение вирусов. Научный спор о сущности вирусов начался с момента косвенного обнаружения этих объектов (конец XIX в.), обострился после их прямого наблюдения (первая половина XX в.) и не закончен до сих пор.

Сформулированные в первой половине XX в. афористические альтернативы: «*вирусы — это вещество или существо*?» и «*вирусы — это живое или неживое*?», а также расплывчатая формулировка «*вирусы — это пограничные объекты между живой и неживой материей*» не могли пролить свет на истинную природу вирусов.

Однако даже в наши дни очень трудно найти лаконичное определение для вирусов, которое учитывало бы специфику их строения и жизнедеятельности (в частности, различия в стратегии существования вирусов в виде внеклеточных частиц и на внутриклеточной репродуктивной стадии).

Отдавая должное определению, предложенному французским генетиком Андре Львовым (A. Lwoff): «*вирусы — это вирусы*», и понимая, что это лишь афористический уход от прямого ответа, попробуем рассмотреть концепцию вирусов, прибегая к минимальной детализации. Попытаемся также выяснить, решают ли проблему

сущности вирусов определения, которые опираются на фактические данные о свойствах этих биологических объектов.

Одно из них принадлежит также Андре Львову (1956): «*Вирусы — это внутриклеточные, потенциально патогенные агенты, обладающие инфекционной фазой, содержащие лишь один тип нуклеиновой кислоты, репродуцирующиеся в форме генетического материала, неспособные к бинарному делению и лишенные ферментативных систем, участвующих в производстве энергии*». Нетрудно заметить, что данное определение сводится к перечислению разных аспектов биологии вирусов.

Другое широко известное определение вирусов приведено в классическом учебнике Сальваторе Лурия и Джорджа Дарнела (Общая вирусология, 1970): «*Вирусы — это объекты (организмы), геном которых представлен ДНК или РНК. Эти нуклеиновые кислоты репродуцируются в живых клетках и, используя их синтетический аппарат, синтезируют специализированные частицы (вирионы), содержащие геном вируса и способные передавать его в другие клетки*». В данном случае на первый план выдвигается механизм размножения вирусов.

В «Биологическом энциклопедическом словаре» (1986) вирусы определяются как «*неклеточная форма жизни, способная проникать в определенные живые клетки и размножаться только внутри этих клеток*». Данная лаконичная формулировка в первую очередь связывает вирусы с органической жизнью и ее основой, живой клеткой.

Анализируя процитированные определения, мы видим, что они так или иначе отсылают нас к вопросу о природе органической жизни.

Вирусы и природа органической жизни. Попытки определить сущность органической жизни предпринимались с позиций термодинамики, информатики, химии и теории конкурентной эволюции.

Так, советский эволюционист Л. С. Берг (1922) определил жизнь, исходя из соображений целесообразности действия: *живыми можно назвать физические тела, адекватно отвечающие на внешнее раздражение.*

Основоположник теоретической биологии, советский математик Э. С. Бауэр (1935) дал термодинамическое определение жизни, как *неравновесного термодинамического процесса, при котором эндогенная упорядоченность системы создается благодаря увеличению энтропии в окружающей среде.*

Информационное определение жизни принадлежит немецкому физику Эрвину Шредингеру (E. Schrödinger, 1933): в ее основе лежит *линейная анизотропия органических макромолекул, играющих роль носителей наследственной информации.*

Джон Бернал (1960) рассматривал жизнь как *самоподдерживающуюся систему сопряженных химических реакций между органическими молекулами при участии эндогенных органических катализаторов.*

Наконец, в экзобиологической программе NASA (1984) жизнь определяется в свете теории конкурентной эволюции как *автономная физико-химическая система, функционирующая на основе принципа естественного отбора.*

Во всех приведенных определениях упускается из вида то, что жизнь представляет собой конкретный этап химической эволюции Вселенной и что ее уникальные особенности суть:

— индивидуальное развитие, или онтогенез, центральная стадия которого — размножение путем самовоспроизведения клетки-микрокомпартмента;

— адаптивное взаимодействие с окружающей средой;

— существование в составе популяций (совокупностей родственных особей);

— историческое развитие биоразнообразия, или филогения.

Главный вклад в понимание информационных основ жизни внесли американский вирусолог Джеймс Уотсон (J. Watson) и английский молекулярный биолог Френсис Крик (F. Crick). На основе предложенной ими в 1953 г. структурной модели ДНК было показано, что полинуклеотиды автокопируются (реплицируются), а также служат источником команд для образования энзиматических систем, обеспечивающих процесс матричного копирования по принципу обратной связи.

Структура полинуклеотидных матриц такова, что они не только реплицируются, но и способны:

— к репарации (устранению повреждений);

— мутации (локальному наследуемому изменению структуры в результате неадекватной репарации);

— рекомбинации (редислокации эндогенных блоков или включению в свой состав экзогенных блоков);

— амплификации (увеличению числа элементов).

Данные изменения протекают на конкурентной основе, с закономерным увеличением гетерогенности матриц и объема закодированной в них информации. Химической основой этого процесса служит реакция гетерополимеризации, которую катализируют белки (продукты матричного копирования на альтернативный полипептидный носитель).

Существенно, что все известные полинуклеотидные матрицы используют один и тот же (универсальный) генетический код.

Копирование матриц осуществляется биосинтетическими системами, которые состоят из потребляющих энергию фермент-субстратных комплексов. Ферменты, субстраты и энергия также используются для защиты геномов от повреждений, которые искажают или блокируют процесс матричного копирования. В частности, ДНК должна структурно стабилизироваться и при необходимости репарироваться.

Для осуществления полимеразных реакций нужно локально концентрировать органические субстраты и биологически доступную энергию. Согласно традиционным представлениям на заре биологической эволюции в полимеразных реакциях участвовали невозобновляемые продукты абиотического синтеза (так называемый «первичный бульон»), однако, по мере истощения этих ресурсов, окружающая среда становилась все более олиготрофной. Поэтому примитивные живые системы с целью преобразования энергии и строительного материала начали их концентрировать внутри себя.

На современном этапе биологической эволюции матричное копирование может осуществляться только в изолированном пространстве (микрокомпартменте), внутренняя среда которого находится в устойчивом неравновесии с окружающей средой. Чтобы такая ситуация постоянно воспроизводилась, микрокомпартмент должен обладать свойством квазистационарности, т. е. представлять собой открытую систему.

Данному требованию отвечает живая клетка, окруженная полупроницаемой билипидной мембраной. По сути, это биохимический реактор, в котором протекает нуклеотид-полимеразная реакция. В принципе, копирование матриц представляет собой бесконечный процесс благодаря постоянному их освоению потенциально доступных ресурсов энергии и конструктивных материалов.

Из сказанного вытекает определение органической жизни как *пространственно-временной экспансии полинуклеотидных матриц, которые копируются в клетках, или мультивариантных самореплицирующихся мембранных микрокомпартментах* (см.: Пиневич, 2007).

Клетка способна копировать и эндогенную матрицу (собственный геном), и экзогенную матрицу (чужой геном), которая может принадлежать либо гетерологичной клетке, либо ***живому существу с неклеточным строением, т. е. вирусу***.

Вирусная матрица копируется только в «приютившей» ее живой клетке, которая играет роль хозяина (англ. host cell).

Вирусы как особи и как живые существа. Вирус может существовать в форме упакованной или неупакованной матрицы. В обоих случаях речь идет об особи вируса (в терминах логики особь соответствует материальному объекту, локализованному в пространстве и времени).

Однако в некоторых случаях вирусная матрица может утратить признак особи, перестав быть пространственно-временной отдельностью. Речь идет о феномене периодической или постоянной интеграции генома вируса в хромосому клетки-хозяина.

Бывают и такие случаи, когда геном вируса распределяется между разными особями. Имеется в виду феномен ***партитности*** вируса, когда разные части (сегменты) генома вируса упаковываются по отдельности (в частности, это происходит у мультипартитных представителей семейств *Bromoviridae*, *Caulimoviridae*, *Comoviridae* и *Virgaviridae*).

Упакованная матрица представляет собой микрокомпартмент — компактизованную геномную нуклеиновую кислоту, одетую белковой или более сложной оболочкой.

Для обозначения упакованной матрицы используется термин ***элементарное тело*** (англ. elementary body), или ***вироспора*** (англ. viral spore). Однако чаще всего встречаются термины ***вирусная частица*** (англ. viral particle) и ***вирион*** (англ. virion; от лат. virus и греч. ontos — сущее; *нечто, представляющее собой вируса*). Автором последнего термина является Андре Львов (1966).

Вирион не обнаруживает признаков жизни; его задача — диссеминация вирусного генома, т. е. его доставка в клетки популяции хозяина.

Вектор для межклеточного переноса вириона может отсутствовать, и тогда последний диффундирует в окружающей среде, пока случайно не столкнется с хозяином. Однако возможен и направленный перенос вириона от хозяина к хозяину — горизонтальный (с помощью организмов-переносчиков, например насекомых или птиц) и вертикальный (при размножении клеток, которые в отсутствии вирусиндуцированного лизиса несут в своем ядре или цитоплазме скопление зрелых вирионов).

Способность образовывать вирионы отличает вирусов от внехромосомных генетических элементов (плазмид), а также от мобильных генетических элементов (транспозонов).

Неупакованная матрица, или вирусная нуклеиновая кислота, соответствует стадии внутриклеточной репликации генома вируса. Это может быть самостоятельный репликон или часть общего репликона с хромосомой хозяина, а также репликативный интермедиат. Кроме того, это может быть временно не реплицирующийся экстрахромосомный генетический элемент — вирусная плазмида или эписома (плазмида, способная к интеграции в хромосомную ДНК).

Копирование генома вируса осуществляется только в клетке-хозяине — отдельно от ее хромосомы или после интеграции в ее состав.

Обладание геномом, отвечающим за такие фундаментальные биологические свойства, как наследственность, изменчивость и участие в селекционном процессе, а также за адаптивное размещение в экологической нише, дает основание считать вируса живым существом.

Однако стратегии, которые используют вирусный и клеточный геномы, существенно различаются. Это связано с тем, что клетка всегда содержит нуклеиновые кислоты двух типов — ДНК и РНК.

ДНК, точнее dsДНК (сокр. англ. double-stranded — двунитевая) является геномной нуклеиновой кислотой клетки, т. е. хранителем всех ее генов. Содержащаяся в ДНК наследственная информация передается клеточному потомству (вертикальное наследование) или участвует в генетической рекомбинации (горизонтальное наследование).

РНК, точнее ssРНК (сокр. англ. single-stranded — однонитевая), которая подразделяется на мРНК, рРНК и тРНК, участвует в транскрипции и трансляции, т. е. в процессах реализации наследственной информации в ходе онтогенеза клетки.

В отличие от клетки, где ДНК служит монопольным носителем информации, геномной нуклеиновой кислотой вируса может быть либо ДНК, либо РНК (второй вариант уникален и у современных клеточных живых существ не встречается). Кроме того, геномная нуклеиновая кислота вируса может быть представлена dsДНК, ssДНК, dsРНК или ssРНК (см. табл. 3).

Поскольку, как и у всех живых существ, экспрессия генома вируса осуществляется через стадию мРНК, вирусные геномы подразделяются на транскрибируемые и нетранскрибируемые. В первом случае мРНК синтезируется на матрице геномной ДНК или геномная РНК сама служит мРНК (т. е. она колинеарна мРНК). Во втором случае геномная нуклеиновая кислота не колинеарна, а комплементарна мРНК, и для транскрипции генома требуется ее комплементарная нить.

Пути внутриклеточного синтеза мРНК определяют разнообразие стратегий вирусного генома (см. раздел 15.4).

В особых случаях вирусные частицы наряду с геномной нуклеиновой кислотой могут «заранее» содержать РНК, необходимую на ранних этапах репродукции вируса.

Как и подобает геному облигатного паразита, геном вируса за редкими исключениями кодирует только операционные системы собственного воспроизведения, а также структурные (а иногда ферментные) белки вириона.

Хотя в субстратном и информационном отношении вирусы, несомненно, являются живыми существами, это — неклеточная форма жизни, лишенная атрибутов живого организма (см. ниже). В связи с этим вспоминается название романа немец-

кого беллетриста Эриха Марии Ремарка (E. M. Remarque; 1952) «Der Funke Leben» (нем. — проблеск жизни), и по аналогии с ним можно сказать, что в вирусах виден только проблеск жизни. Любопытно, что русский перевод названия романа («Жизнь взаймы») искажает смысл оригинала, однако точнее «характеризует» вирусов.

Вирусы как живые существа, не имеющие клеточного строения. Из-за необходимости поддерживать интегральную структуру цитоплазматического компартмента клетка размножается интегрально, т. е. путем деления (цитокинеза).

В то же время вирус лишен генеральных атрибутов клетки — цитоплазматической мембраны (некоторые типы вирионов окружены билипидной мембраной, однако она метаболически инертна и соответствует участку цитоплазматической или ядерной мембраны, захваченному при выходе из клетки-хозяина), рибосомного аппарата (хотя в вирусном геноме иногда закодированы тРНК), а также цитоскелета. Поэтому он может размножаться одним из двух способов.

В первом случае реплицируется только вирусная ДНК, встроенная в хромосому хозяина или существующая в виде экстрахромосомного цитоплазматического генетического элемента.

Во втором случае инфекционный вирион разбирается на геномную нуклеиновую кислоту и сопровождающие структуры. Эти части раздельно копируются, а затем собираются в новые вирионы. Данный способ репродукции называется неинтегральным, или ***дисъюнктивным*** (от лат. disjunctio — обособление). Он принципиально отличается от ***интегрального*** способа репродукции — путем деления материнской клетки.

Таким образом, если в онтогенезе клетки (клеточном цикле) имеется фаза синтеза ДНК и фаза деления, жизненный цикл вируса соответствует либо промежутку между двумя репликациями вирусного генома, либо последовательности этапов разборки, дисъюнктивной репродукции и сборки нового вириона.

Вирусы как живые существа, не являющиеся организмами. Из-за неклеточного строения вирус лишен транспортных систем, обеспечивающих субстратное питание, и не обладает метаболизмом, т. е. совокупностью регулируемых внутриклеточных процессов превращения энергии и конструктивного материала.

Во-первых, он не способен ассимилировать свободную энергию в форме трансмембранного протонного градиента и обратимо конвертировать ее в свободную энергию АТФ. Во-вторых, из-за отсутствия рибосом он не может синтезировать белки и полипептиды.

Таким образом, вирус лишен главного атрибута живого организма — питания (транспорта в сочетании с метаболизмом), несмотря на то, что в отдельных случаях вирусный геном может кодировать ферменты, необходимые для инфицирования клетки-хозяина.

Вирусы как облигатные внутриклеточные паразиты. Поскольку вирусы размножаются, используя метаболизм клетки-хозяина, они относятся к синэкологической категории облигатных внутриклеточных паразитов. Как таковые они в большинстве случаев вредят клетке-хозяину, а при литическом выходе вирионов вызывают ее гибель.

Рассматривая вирусов как облигатных внутриклеточных паразитов, мы должны подчеркнуть их принципиальное отличие от таких облигатно эндоцитобиотических

бактерий, как риккетсии и хламидии, которые, несмотря на потерю метаболической автономии, сохраняют атрибуты бактериальной клетки.

Вирусная инфекция реориентирует клеточный метаболизм с выполнения внутренних задач на деструктивное воспроизводство вирусов, хотя в некоторых случаях выход вирионов осуществляется особым, нелитическим путем, т. е. сохраняется целостность оболочки клетки.

В то же время вирусная инфекция не всегда связана с аномальной нагрузкой на метаболизм клетки-хозяина. Уже отмечалось, что вирус может реплицироваться без образования вирионов — как интегральная часть хромосомы или как экстрахромосомный генетический элемент.

Вирусы как паразиты паразитов. Некоторые вирусы не только рекрутируют для собственной репродукции метаболические ресурсы клетки-хозяина, но и паразитируют на других вирусах, используя продукты метаболизма, необходимые тем для собственного размножения. Такие вирусы фактически являются паразитами «в квадрате».

Примерами служат дефектные интерферирующие вирусы и вирусы-сателлиты, которые используют, за неимением собственных, продукты генов вируса-помощника (см. раздел 1.5.4), а также недавно открытый вирус-вирофаг, паразитирующий на вирусе хлореллы (см. раздел 4.3.2).

Собрав воедино все перечисленные соображения, попытаемся дать **новое определение вируса**.

Вирус — это неклеточное живое существо с РНК- или ДНК-геномом без генов рРНК и генов системы ассимиляции энергии; размножается только в клетке-хозяине и способно существовать в трех формах: в форме геномной нуклеиновой кислоты, репликативного интермедиата и вириона — содержащего геномную нуклеиновую кислоту микрокомпартмента собственного и/или гетерологичного кодирования.

1.3. ВИРИОН

Вирион представляет собой упакованную матрицу — одну из форм существования особи вируса (см. раздел 1.2). Эта ультрамикроскопическая частица идеально приспособлена для транспортировки компактно уложенной геномной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) из одной клетки в другую. Вирион можно рассматривать как паракристаллический мембранный микрокомпартмент, в котором нуклеиновая кислота защищена от механического, физико-химического и энзиматического повреждения.

Вирион специфически прикрепляется к клетке-хозяину и в той или иной мере способствует доставке инфекционной нуклеиновой кислоты к сайтам репликации.

В соответствии с типом строения вириона выделяют две основные группы вирусов — ***безоболочные вирусы*** (англ. nonenveloped virus) и ***оболочные вирусы*** (англ. enveloped virus). Они различаются механизмом проникновения в клетку, а также способом выхода из нее потомства вирионов.

Вирион безоболочных вирусов состоит из геномной нуклеиновой кислоты, заключенной в белковый футляр (англ. coat; shell), или ***капсид*** (англ. capsid; от лат. cap-

sa — коробочка и греч. eidos — вид). В некоторых случаях, например у представителей семейства *Reoviridae*, геномная нуклеиновая кислота окружена не одним, а двумя капсидами — внутренним и внешним.

Совместно с геномной нуклеиновой кислотой капсид образует ***нуклеокапсид*** (англ. nucleocapsid), или ***сердцевину*** (***кор***) вируса.

Вирион оболочных вирусов представляет собой нуклеокапсид, окруженный внешней оболочкой, или ***суперкапсидом***.

Большинство оболочных вирусов приобретает суперкапсид — двойной липидный слой с интегрированными в него белками — на этапе созревания вириона при прохождении через соответствующую клеточную мембрану путем отпочкования. Чаще всего такой мембранной структурой является цитоплазматическая мембрана, хотя в некоторых случаях источником оболочки вируса служит мембрана перинуклеарной цистерны, цистерны комплекса Гольджи или цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума. Внутренние компоненты оболочных вирусов либо закономерно занимают свое место путем самосборки, либо случайно захватываются в процессе отпочкования.

Дискретной, регулярно повторяющейся морфологической единицей капсида является ***капсомер*** (от лат. capsa — коробочка и греч. meros — часть). Основу капсомера составляют белковые структурные блоки, которые называются ***протомерами*** (от греч. protos — первый и meros — часть). Протомеры, в свою очередь, состоят из ***полипептидных субъединиц***.

Выступы капсомеров, экспонированные на наружной поверхности вириона, называются ***пепломерами*** (от греч. peplos — покрывало и meros — часть). Иногда, в частности у аденовирусов, пепломеры имеют форму нити с расширением на дистальном конце (рис. 5).

Пепломеры связываются с рецепторами на поверхности клетки-хозяина и участвуют в ранних этапах инфекции — проникновении и раздевании вируса.

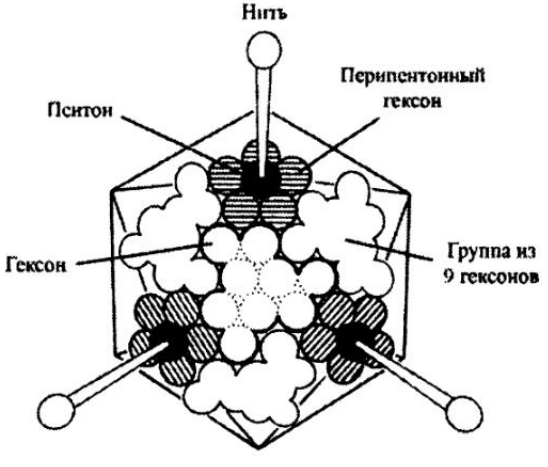


Рис. 5. Капсид аденовируса. Нитевидные пепломеры (по: Ginsberg, 1979).

1.3.1. РАЗМЕР И ФОРМА ВИРИОНА

Для визуального наблюдения вирионов, а тем более оценки их формы и размера, необходим электронный микроскоп, обладающий увеличением в десятки и сотни тысяч раз и разрешающей силой до 2Å.

Как показывают сводные результаты морфометрии, линейный размер большинства вирионов лежит в пределах 20–400 нм. Таким образом, вирусы могут сильно различаться размерами, и среди них встречаются «карлики» и «гиганты» (рис. 6).

Диаметр самых мелких вирусов, например возбудителей полиомиелита, энцефалитов или ящура, составляет примерно 20 нм. Это меньше диаметра особо крупных белковых молекул, в частности гемоглобина или гемоцианина (30 нм). Мельчайшим из известных вирусов, по-видимому, является вирус-сателлит вируса некроза табака (*Satellite tobacco necrosis virus*, STNV); диаметр его икосаэдрического вириона составляет 18 нм (180Å).

В свою очередь, очень крупные вирусы, примером которых служат возбудители герпеса или натуральной оспы, имеют диаметр 200–400 нм, что приближается к размеру таких ультрамикробактерий, как риккетсии, хламидии или микоплазмы.

Размер «гигантских» сферических мимивирусов (см. раздел 4.1.1) или спиральных парамиксовирусов достигает, соответственно, 750 и 1000 нм.

Для электронно-микроскопического анализа наиболее крупных вирионов, например вируса натуральной оспы, может использоваться метод ультратонких срезов, однако минимально достижимая толщина последних (30 нм) и грубые способы окрашивания снижают уровень разрешения до 50–75Å.

Более эффективен метод негативного контрастирования, при котором препараты вирионов обрабатываются ацетатом уранила, цитратом свинца или фосфовольфраматом калия, а также другими отражающими электроны солями тяжелых металлов. Поскольку контрастирование проходит по всей поверхности и в объеме вириона, это снижает качество и точность интерпретации изображения.

Лучшие результаты дает метод криоэлектронного микрофотографирования, когда вирионы быстро замораживают в жидком азоте и рассматривают без применения дополнительного контрастирования.

Однако детали, которые выявляются с помощью электронной микроскопии, не позволяют перейти на (суб)молекулярный уровень строения вирионов. Такую задачу позволяет решить метод дифракции рентгеновых лучей на кристаллах (рентгеноструктурная кристаллография). Первые случаи его успешного применения для анализа структуры кристаллизуемых вирусов растений и животных относятся к 1930–1950 гг.

3D-реконструкция структуры вириона вируса карликовой кустистости томата (англ. *Tomato bushy stunt virus*, TBSV) с уровнем разрешения 2,9 Å была осуществлена лишь в 1978 г. американским вирусологом Стивеном Харрисоном (S. C. Harrison). Позднее была реконструирована структура ряда патогенных вирусов животных, в том числе полиовируса (1985), риновируса (1985) и вируса ящура (1989).

Еще на этапе применения метода негативного констрастирования выяснилось, что вирионы, подобно кристаллам, обладают структурной симметрией.

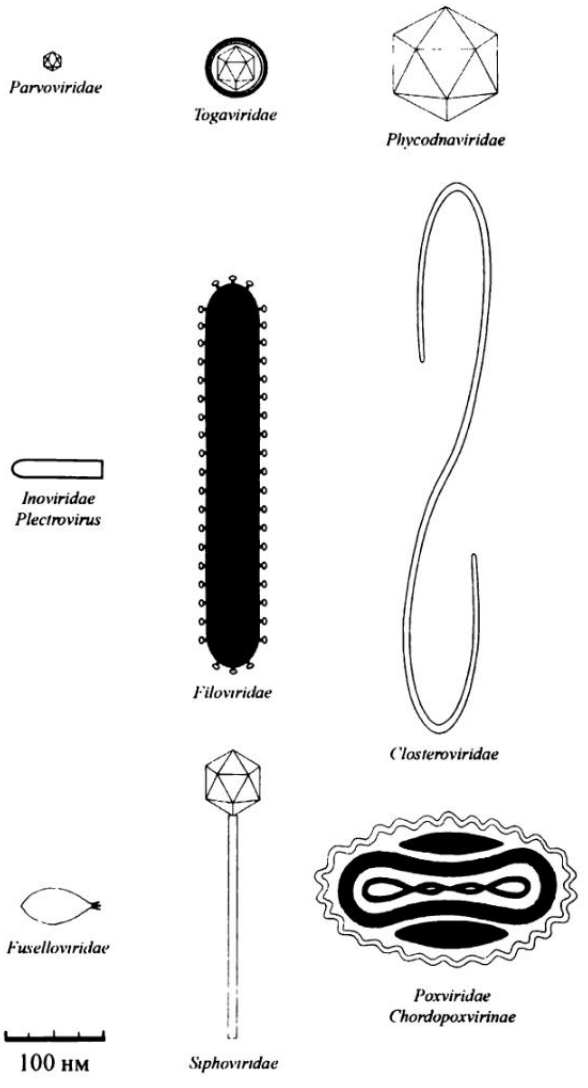


Рис. 6. Вирионы разных размеров и формы.

Верхний ряд — вирионы с икосаэдрической симметрией, средний — со спиральной, нижний — со сложной симметрией.

Поскольку капсид собирается из субъединиц, закодированных в геноме вируса, принцип генетической экономии требует, чтобы они представляли собой идентичные копии одного или нескольких белков. В свою очередь, интерфейс повторяющихся субъединиц обеспечивает их укладку в структуру с определенным типом симметрии.

По признаку симметрии капсида вирионы подразделяются на три типа: 1) с икосаэдрической симметрией; 2) со спиральной симметрией; 3) со сложной симметрией (рис. 6).

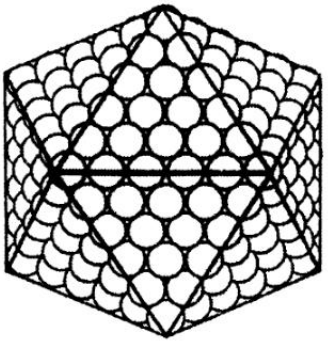


Рис. 7. Икосаэдрический капсид с 252 капсомерами.

Примеры разнообразия морфологии вирионов у вирусов с разным типом геномной нуклеиновой кислоты приводятся в таблице 3.

Вирионы с икосаэдрической симметрией, или изометрические вирионы. В данном случае геномная нуклеиновая кислота свернута в клубок, и капсид окружает его плотным чехлом.

Безоболочные «сферические» вирусы на самом деле имеют форму икосаэдра — одного из пяти так называемых «платоновых» тел, или правильных многогранников, к которым относятся тетраэдр, куб, октаэдр, додекаэдр и икосаэдр.

Икосаэдр (от греч. eikosi — двадцать и hedra — основание) имеет 20 равносторонне-треугольных граней, 30 ребер и 12 вершин, в каждой из которых сходятся углы пяти граней (рис. 7). Икосаэдр обладает симметрией второго порядка (относительно оси, проходящей через середину любого ребра), третьего порядка (относительно оси, проходящей через центр любой треугольной грани) и пятого порядка (относительно оси, проходящей через любую вершину).

Если грань икосаэдра, в свою очередь, разбить на меньшие равносторонние треугольники, то получится многогранник — ***икосадельтаэдр***. Число таких треугольников называется ***триангуляционным числом*** (англ. triangulation number, T; от лат. triangulum — треугольник). Триангуляционное число не может быть произвольным; оно рассчитывается по формуле: $T = h^2 + hk + k^2$ (где h и k — ноль или любые целые числа). Таким образом, триангуляционный ряд составят числа 1, 3, 4, 7, 9, 12, 16, 27 и т. д.

Поскольку капсид — это не геометрическая фигура, а мультимерная биологическая структура, имеющая внешнюю форму икосаэдра, его ребра и грани образованы морфологическими единицами-капсомерами.

У разных вирусов на ребре икосаэдра могут находиться 2, 3, 4, 5 или больше капсомеров. Общее число капсомеров, образующих капсид, рассчитывается по формуле: $10(n-1)^2 + 2$, где n — число капсомеров, расположенных на ребре икосаэдра, а зависимость между количеством капсомеров и триангуляционным числом: $N = 60 \cdot T$.

Вирион может состоять либо только из «пятиугольных» капсомеров — ***пентонов*** (англ. penton), либо одновременно из пентонов и «шестиугольных» капсомеров, или ***гексонов*** (англ. hexon).

Если на каждом ребре расположены два капсомера (n = 2), капсид состоит только из 12 пентонов; примером служит мелкий бактериофаг φX174 (его диаметр составляет 22,2 нм). В данном случае пентон состоит из пяти белковых субъединиц; таким образом, в состав капсида входят всего 60 белковых субъединиц.

Если на каждом ребре находятся три капсомера (n = 3), это будут два пентона и один гексон. В этом случае капсид построен из 42 капсомеров, одновременно образующих ребра и грани (30 гексонов, состоящих из шести белковых субъединиц, и 12 пентонов, состоящих из пяти белковых субъединиц; всего в состав капсида

Таблица 3. **Разнообразие морфологии вирионов у вирусов с разным типом геномной нуклеиновой кислоты**

Симметрия капсида	Геномная нуклеиновая кислота	Семейство
Безоболочные вирусы		
Икосаэдрическая	dsДНК	*Papillomaviridae*
	ssДНК	*Parvoviridae*
	dsРНК	*Reoviridae*
	ssРНК	*Picornaviridae*
Спиральная	ssДНК	*Inoviridae*
	ssРНК	*Closteroviridae*
Сложная	dsДНК	*Myoviridae*
Оболочные вирусы		
Икосаэдрическая	dsДНК	*Herpesviridae*
	ssРНК	*Togaviridae*
Спиральная	dsДНК	*Lipothrixviridae*
	dsРНК	*Hypoviridae*
	ssРНК	*Filoviridae*
Сложная	dsДНК	*Polydnaviridae*

входят 240 белковых субъединиц). Примером служит вирус полиомы (сем. *Polyomaviridae*).

Если на каждом ребре находятся четыре капсомера (n = 4; два пентона и два гексона), то капсид состоит из 92 капсомеров (80 гексонов, расположенных как на ребрах, так и на гранях, и 12 пентонов). Как пример можно назвать представителей семейства *Reoviridae.*

Когда на каждом ребре размещаются пять капсомеров (n = 5; два пентона и три гексона), капсид состоит из 162 капсомеров (150 гексонов и 12 пентонов). Пример — вирус простого герпеса (сем. *Herpesviridae*).

В том случае, когда на каждом ребре находятся шесть капсомеров (n = 6; два пентона и четыре гексона), капсид состоит из 252 капсомеров (240 гексонов и 12 пентонов). Примерами служат аденовирусы (сем. *Adenoviridae*); их вирионы имеют диаметр около 70 нм (см. рис. 7).

Капсид радужного вируса долгоножки, принадлежащего к семейству *Iridoviridae* (n = 10), состоит из 812 капсомеров; более громоздкие капсиды крайне редки.

Чем выше триангуляционное число, тем больше капсомеров входит в состав капсида, и тем больше он «округляется». Поэтому термин «икосаэдрическая симметрия» распространяется преимущественно на мелких вирусов; более крупных вирусов лучше называть «сферическими».

Вирионы со спиральной симметрией. В то время как у капсида с икосаэдрической симметрией 10 осей вращения (5 из них проходят через противоположные вершины, 3 — через противоположные грани, 2 — через середины противоположных ребер), капсид со спиральной симметрией имеет только одну ось вращения.

В данном случае геномная нуклеиновая кислота образует палочковидную или нитевидную спираль. Ее витки покрыты тесно прижатыми друг к другу капсомера-

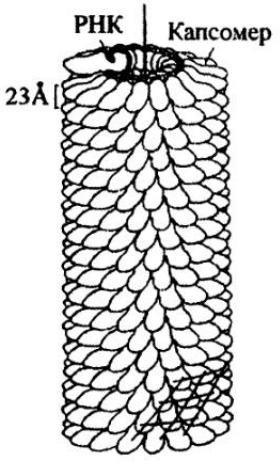


Рис. 8. Вирион со спиральной симметрией. Вирус табачной мозаики (по: Klug, 1979).

ми. Каноническим примером служит вирион вируса табачной мозаики, относящегося к семейству *Virgaviridae* (рис. 8).

Количественными параметрами вирионов со спиральной симметрией служат:

— диаметр спирали и ее длина;

— шаг спирали;

— число капсомеров, приходящихся на один оборот спирали.

В частности, у возбудителя парагриппа 1 — вируса Сендай (сем. *Paramyxoviridae*) спиральный капсид размером 20×1000 нм образован 2400 капсомерами; шаг спирали равен 5 нм, а число капсомеров на один оборот составляет 11–13.

Вирионы со сложной симметрией. В данном случае вирион состоит из нескольких частей, каждая из которых имеет собственный тип симметрии.

Например, многие бактериофаги подразделяются на собственно капсид, или ***головку*** (англ. head) сферической, эллипсоидной, палочковидной либо многогранной формы, и палочковидный ***хвостовой отросток*** (англ. tail). Головка имеет кубическую или сферическую симметрию, а симметрия хвостового отростка большей частью спиральная. У некоторых бактериофагов структура вириона усложняется за счет базальной пластинки с хвостовыми нитями, а также таких придатков, как воротничок и сократимый чехол (рис. 9); у каждого из перечисленных структурных элементов свой собственный тип симметрии.

Сложную симметрию в сочетании с чрезвычайно сложным внутренним строением имеет оболочный вирус натуральной оспы (сем. *Poxviridae*). Кор-структура вириона представлена нуклеопротеиновым «S-телом», которое одето внутренним капсидом

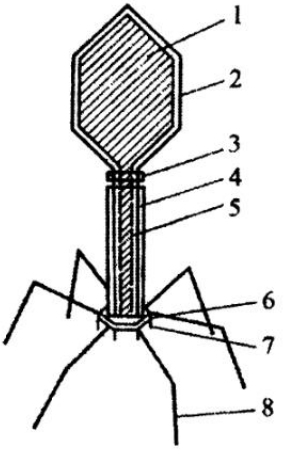


Рис. 9. Вирион со сложной симметрией. Бактериофаг Т-четной серии.

1 — ДНК, 2 — головка, 3 — воротничок, 4 — чехол стержня хвостового отростка, 5 — стержень хвостового отростка, 6 — базальная пластинка, 7 — зубец базальной пластинки, 8 — нить хвостового отростка.

и окружено белковыми «боковыми телами». Комплекс нуклеокапсида и боковых тел погружен в «виоплазму» и окружен двойным внешним капсидом. Снаружи такое образование покрыто мембранной оболочкой (см. рис. 6).

1.3.2. СОСТАВ ВИРИОНА

Напомним, что структурной основой вириона служит нуклеокапсид, который состоит из геномной нуклеиновой кислоты, упакованной в белковый капсид. Оболочные вирусы дополнительно упаковываются в суперкапсид.

Для препаративного получения вирионов с начала 1960-х годов применяется метод центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия, а для анализа их белкового состава — аналитический гель-электрофорез.

Если на раннем этапе изучения состава вирионов использовались методы химии белка, то с начала 1970-х годов к ним добавились молекулярно-биологические методы, позволяющие анализировать нуклеиновые кислоты.

Геномная нуклеиновая кислота. Как мы уже подчеркивали, функцию геномной нуклеиновой кислоты у вирусов вместо ДНК может выполнять РНК. Соответственно в состав вирионов входит только одна из этих нуклеиновых кислот (см. табл. 3).

К числу ДНК-содержащих вирусов, в частности, относятся аденовирусы, поксвирусы (вирус натуральной оспы) и большинство бактериофагов. Примером РНК-содержащих вирусов служат ортомиксовирусы (вирус гриппа), пикорнавирусы (вирус полиомиелита) и реовирусы (энтеровирусы).

Относительное содержание ДНК или РНК в разных типах вирионов может различаться — от 1% (у вируса гриппа) до 50% (у некоторых бактериофагов). Молекулярная масса вирусной ДНК колеблется в пределах 1–200 мДа, а вирусной РНК — в пределах 2–15 мДа.

Геномные нуклеиновые кислоты вирусов разнообразны по нуклеотидному составу. В частности, у ДНК-содержащих вирусов животных мол. % GC варьирует в широком диапазоне (35–75%). Даже у представителей одного рода, например у герпесвирусов, мол. % GC может сильно различаться (45–75%).

Вирусная ДНК, особенно у бактериофагов, часто содержит минорные азотистые основания. Примером служит группа гидроксиметилцитозина, например 5-гидроксиметилцитозин (в случае Т-четных бактериофагов *E. coli*). Кроме того, с целью защиты от рестриктаз хозяина обычные пуриновые и пиримидиновые основания модифицируются посредством ферментативного метилирования в положении 2 и положении 5, соответственно.

ДНК чаще всего бывает двунитевой (dsДНК), хотя встречаются вирусы с однонитевой ДНК (ssДНК; в качестве примера можно назвать некоторых бактериофагов). РНК-вирусы, напротив, чаще всего содержат ssРНК; вирусы с dsРНК, в частности реовирусы, более редки.

По контурной конфигурации геномная нуклеиновая кислота может быть линейной (большинство dsДНК-вирусов) или кольцевой (сем. *Circoviridae*).

Геномная нуклеиновая кислота вируса обычно представлена единственной молекулой (сем. *Picornaviridae*). Такой геном называется ***монолитным***. В более редких

случаях несколько неидентичных молекул РНК, своего рода хромосомы, заключены в общий капсид; примерами служат представители семейств *Orthomyxoviridae* и *Reoviridae*. Геномы таких вирусов называются ***сегментированными*** (см. ниже). Еще реже, в частности у некоторых представителей семейства *Virgaviridae*, неидентичные молекулы геномной нуклеиновой кислоты упакованы в разные капсиды; это так называемые ***партитные*** геномы (см. ниже).

Для генетической полноценности вирусу необходимо и достаточно обладать полной копией генома. Однако сборка вириона, которая обеспечивает инкапсидирование геномной нуклеиновой кислоты, не всегда приводит к такому результату. Иногда в капсид попадает сразу несколько копий генома (примерами служат бактериофаг лямбда и парамиксовирусы), иногда, напротив, в капсиде оказывается неполная копия генома. Наконец, из-за ненадежного или дефектного механизма сборки вируса могут образовываться абортивные вирионы, представляющие собой не заполненные геномной нуклеиновой кислотой, т. е. «пустые» капсиды.

Хромосомные белки. В некоторых случаях геномная нуклеиновая кислота вируса образует нуклеопротеиновый комплекс с нейтральным или слабо катионным белком, который обеспечивает ее компактизацию и стабилизирует ее структуру.

Такие комплексы часто называют ***вирусными хромосомами***, а входящие в их состав белки — хромосомными белками вируса.

Иногда к ДНК-белковым или РНК-белковым комплексам присоединяются ферменты, участвующие в копировании вирусного генома (примером служат обратная транскриптаза и интеграза вируса иммунодефицита человека HIV-1).

Белки капсида. Как мы уже отмечали, согласно стратегии генетической экономии вирусный капсид состоит из субъединиц (капсомеров) одного или, гораздо чаще, двух-трех типов. Они служат не только моноблоками капсида, но и играют роль рецепторов, которые распознают комплементарные им рецепторные структуры на поверхности клетки-хозяина.

Благодаря различию аминокислотных последовательностей, особенно в антигендетерминирующих участках (эпитопах), белки капсида обладают структурной индивидуальностью, степень которой оценивается с помощью иммунологического метода ***серотипирования*** вирусов.

Число белковых субъединиц, образующих капсид, может сильно различаться (см. выше); широко варьирует и их молекулярная масса (10–150 кДа).

В частности, капсид одного из наиболее охарактеризованных вирусов — вируса табачной мозаики (***Tobacco mosaic virus***, TMV), состоит из 2130 капсомеров, каждый из которых представлен единственной полипептидной субъединицей (158 аминокислот суммарной массой 17,5 кДа).

У одного из наиболее крупных и многокомпонентных реовирусов — вируса «синего языка овец» (***Blue tongue virus***, BTV) — капсид подразделяется на внутренний слой, состоящий из 120 копий белковых субъединиц VP3 (молекулярной массой 100 кДа каждый), и наружный слой из 780 копий белковых субъединиц VP7 (молекулярной массой по 37 кДа).

Белки суперкапсида. В ходе созревания оболочных вирусов (см. раздел 1.5.5) нуклеокапсид окружается суперкапсидом, или дополнительной мембранной оболочкой,

липиды которой клеточного, а белки — вирусного происхождения. Они выполняют рецепторную, ферментативную или смешанную, рецепторно-ферментативную, функцию.

Белки матрикса. Помимо белков, входящих в состав капсида или суперкапсида, вирионы безоболочных и оболочных вирусов могут содержать так называемые ***белки матрикса*** (англ. matrix protein). Матрикс безоболочных вирусов находится внутри капсида; у оболочных вирусов — внутри капсида, между капсидом и суперкапсидом или в обоих компартментах.

Белки матрикса выполняют каркасную или ферментативную функции; иногда их роль неизвестна.

Белки сложных вирионов. Сложносимметричные вирионы, например у некоторых бактериофагов, помимо собственно капсида (головки) снабжены хвостовым отростком, базальной пластинкой, прикрепительными нитями и т. д.; все эти структуры имеют белковую природу и кодируются вирусным геномом.

Ферменты вириона. Наряду со структурными белками капсида в состав вирионов могут входить некоторые ферменты, которые кодируются геномом вируса.

Вирусные ферменты функционируют на разных этапах онтогенеза вируса: при прикреплении к клетке-хозяину; заражении клетки-хозяина; размножении; сборке вирионов; выходе вирионов из клетки-хозяина.

К таким ферментам относятся:

— гемолизин (у парамиксовирусов);

— комплекс транскриптазы, состоящий из РНК-полимеразы, а также кэпирующего и метилирующего фермента (у вирусов, имеющих ssРНК(–), в частности у вируса осповакцины, реовирусов и вируса везикулярного стоматита);

— лизоцим (у некоторых бактериофагов);

— нейраминидаза (у ортомиксовирусов, в частности вируса гриппа, и парамиксовирусов);

— протеаза (у аденовирусов):

— протеинкиназа (у рабдовирусов);

— репликаза, она же РНК-зависимая ДНК-полимераза, она же ревертаза (у ретровирусов);

— эндолизины (у некоторых бактериофагов).

Компоненты клетки-хозяина, «позаимствованные» вирусом. Размножение вируса в большинстве случаев связано с инкапсидированием геномной нуклеиновой кислоты и выходом нуклеокапсида из клетки-хозяина.

Поскольку капсид представляет собой микрокомпартмент, внутрь его иногда попадают (или с его поверхностью связываются) «позаимствованные» компоненты клетки-хозяина, включенные в состав вириона при его сборке.

Это может быть часть генеральных атрибутов клетки (хромосом, рибосомного аппарата, мембранной системы), часть содержимого цитоплазмы или фрагменты цитоскелета.

ДНК клетки включается в состав вириона у представителей семейства *Papillomaviridae*, а также у бактериофагов (при фаговой трансдукции).

Редкая ситуация, когда в вирион попадают хозяйские рибосомы, которые в дальнейшем не участвуют в размножении вируса, известна у представителей семейства

Arenaviridae (лат. arena — песок; *внутри вирусных частиц на ультратонких срезах в электронном микроскопе видно множество рибосом, что напоминает россыпь песчинок*).

Способность включать в состав вириона часть мембранной системы клетки-хозяина — свойство оболочных вирусов. При этом белки клеточной мембраны вытесняются вирусным «мембранным» белком, а также пепломерами капсида (последние представляют собой гликопротеины, белковый домен которых детерминируется геномом вируса, а углеводная часть достраивается клеткой-хозяином).

В числе захваченных суперкапсидом растворимых компонентов цитоплазмы известны, в частности, полиамины: путресцин, спермидин или спермин. Они наблюдаются у ряда вирусов животных (аденовирусов, вируса герпеса, вируса гриппа, вируса Ньюкаслской болезни, вируса осповакцины, вируса энцефаломиокардита), у вируса желтой мозаики турнепса, а также у Т-четных бактериофагов. У всех перечисленных вирусов полиамины нейтрализуют 4–60% отрицательных зарядов фосфатных групп геномной нуклеиновой кислоты, что стабилизирует ее и способствует ее компактизации.

Наконец, материал цитоскелета (актин) попадает в нитевидные вирионы вируса гриппа при их отпочковании от цитоплазматической мембраны.

1.4. ВИРУСНЫЙ ГЕНОМ

Под вирусным геномом обычно подразумевается геном вириона. В данном случае он находится в латентном состоянии, т. е. не транскрибируется и не реплицируется.

На внутриклеточной стадии онтогенеза геном вируса переходит в активное репликативное состояние. При этом изменяются молекулярные характеристики геномной нуклеиновой кислоты: сменяется ее тип; ss-форма превращается в ds-форму; линейная конфигурация заменяется кольцевой; геном амплифицируется. Описание репликативных состояний генома вируса, или его стратегии, — одна из основных тем вирусологии, а анализ этих состояний — одна из главных задач вирусологического исследования (см. раздел 1.5.4).

Размер вирусного генома. Особенность вирусного генома — его относительно малый размер, чаще всего в пределах 5–190 тыс. п.н. (при минимуме 3 тыс. п.н. и максимуме 1200 тыс. п.н.). Для сравнения, минимальный размер генома прокариотов составляет 580 тыс. п.н. (у паразитической бактерии *Mycoplasma genitalium*).

Размер вирусного генома не коррелирует с размером генома клетки-хозяина. В частности, самые большие вирусные геномы у вирусов протистов — симбиотических хлорелл (330 тыс. п.н.) и амеб (1200 тыс. п.н.). В то же время геном вируса человеческой оспы имеет размер «всего» 190 тыс. п.н., а геном бактериофага Т4 еще меньше — 169 тыс. п.н.

У вирусов, имеющих минимальный размер генома, однако еще способных самостоятельно реплицироваться и образовывать вирионы, геномной нуклеиновой кислотой, как правило, служит ssРНК.

Информационная емкость вирусного генома. Малый размер вирусного генома отражает его незначительную информационную емкость, что неудивительно, по-

скольку биологическая задача вируса ограничивается внутриклеточным копированием геномной нуклеиновой кислоты, а также ее доставкой в другую клетку.

Соответственно вирусы обладают малым числом генов по сравнению с наиболее редуцированными клеточными геномами (~500 генов).

Например, у бактериофага MS2 (3,5 тыс. п.н.) всего четыре гена; столько же открытых рамок считывания выявлено в геноме вируса гепатита B (3,2 тыс. п.н.). В данном случае малая информационная емкость генома частично компенсируется перекрыванием рамок считывания. Например, у вируса гепатита B перекрываются все рамки считывания; каждый нуклеотид входит в состав кодона более чем одного белка.

Использование перекрывающихся рамок считывания позволяет разместить максимально возможный объем информации в матрице малого размера, а также использовать разные стратегии экспрессии генома, что обеспечивает баланс продуктов транскрипции.

Минимальный набор вирусных генов. В то время как самые крупные вирусы имеют несколько сотен генов, геномы самых мелких вирусов кодируют лишь несколько белков.

В минимальный набор вирусных генов прежде всего входят те гены, которые отвечают за репликацию генома. Между прочим, присутствие нуклеотидной последовательности гена репликазы служит четким критерием различия между репликативной формой вируса и плазмидой, которая полностью зависит от систем репликации клетки-хозяина.

Нуклеотидная последовательность гена репликазы представляет собой филогенетический маркер вирусов с одинаковыми типом и стратегией генома.

Перекрывающиеся вирусные гены. Геномы многих вирусов содержат перекрывающиеся гены (англ. overlapping gene), когда два или больше белков кодируются одной и той же нуклеотидной последовательностью. Иными словами, такие последовательности транскрибируются по множественным рамкам считывания. Как правило, белковые продукты перекрывающихся генов выполняют вспомогательную роль в распространении вируса или в реализации его патогенных свойств. Смысл этого явления до конца не ясен. Считается, что благодаря этому в ходе эволюции вирусные геномы не выходят за размерный предел, обозначенный вместимостью капсида. Из-за высокой стабильности и геометрического совершенства икосаэдра именно такая форма капсида оказалась предпочтительной. Однако белковый кристалл, в отличие от неорганического, редко достигает крупной величины без потери стабильности, что лимитирует размер капсида и, соответственно, размер геномной нуклеиновой кислоты, которая может поместиться в капсид.

Альтернативным решением проблемы стало распределение сегментов вирусного генома, аналогичных хромосомам, по разным вирионам. В данном случае это называется партитностью генома (см. ниже).

Сегментированность вирусного генома. Физическое состояние клеточного генома в виде того или иного числа неидентичных групп сцепления называется партитностью. Монолитным, или унипартитным (англ. unipartite; от лат. unus — один и pars — часть), называется геном, представляющий собой одну группу сцепления, т.е. ассоциированный с одной хромосомой. В свою очередь, мультипартитным (англ. multipartite; от лат. multus — многочисленный и лат. pars — часть) называется геном,

рассредоточенный между несколькими неидентичными хромосомами либо между хромосомой и одной или несколькими мегаплазмидами.

Геном РНК-содержащих вирусов также может распределяться между несколькими неидентичными молекулами, упакованными в общий капсид. Однако в данном случае такое физическое состояние генома обозначается не термином «партитный», а термином «***сегментированный***». Альтернативой сегментированного генома выступает ***монолитный*** геном.

Для сравнения, у ДНК-содержащих вирусов никогда не бывает сегментированных геномов, и их геном содержится в одной молекуле или нескольких идентичных (плоидных) молекулах.

Только полный набор сегментов генома позволяет осуществить «полноценную» инфекцию и воспроизводство вируса.

Сегментированность генома свойственна dsРНК-бактериофагам (сем. *Cystoviridae*) и dsРНК-вирусам животных (сем. *Reoviridae*), хотя она встречается и у вирусов с геномными нуклеиновыми кислотами других типов.

При одновременном инфицировании клетки родственными, но не идентичными вирусами, обладающими сегментированными геномами, между ними возможен реципрокный обмен сегментами, приуроченный к этапу сборки вириона. Характерным примером служит вирус гриппа (сем. *Orthomyxoviridae*). Такой механизм, названный ***реассортацией*** (англ. reassortment — пересортировка), лежит в основе быстрой эволюции РНК-содержащих вирусов и объясняет высокую эпидемиологическую опасность соответствующих инфекционных заболеваний человека и животных.

Партитность вирусного генома. Если отдельные сегменты вирусного генома входят в состав разных вирионов, то он называется ***партитным*** (лат. pars — часть). Инфекционность вируса сохраняется только при наличии полного набора таких вирионов.

Вирусы, обладающие партитным геномом, распространяются путем ***плазмогамии*** (англ. plasmogamy), т.е. слияния гамет-хозяев в ходе полового процесса, из которых хотя бы одна уже инфицирована. Такой механизм используют, в частности, вирусы грибов (сем. *Partitiviridae*).

Альтернативный механизм заражения, заключающийся в переносе и инъекции вируса насекомыми-векторами, используют многие вирусы растений (например, сем. *Geminiviridae*).

Различие эволюционных стратегий РНК- и ДНК-содержащих вирусов. Как уже отмечалось, сегментированные геномы, встречающиеся у РНК-содержащих вирусов, способны к реассортации.

Использование данного механизма генетической рекомбинации — одна из причин более быстрой эволюции РНК-содержащих вирусов, по сравнению с эволюцией ДНК-содержащих вирусов.

Вторая причина быстрой эволюции РНК-содержащих вирусов состоит в нестабильности их генома, поскольку в природе отсутствуют репарационные системы, исправляющие мутационные изменения этой нуклеиновой кислоты. Поэтому ошибки, совершаемые РНК-репликазами в процессе матричного копирования, сохраняются (в отличие от ошибок ДНК-репликаз) и накапливаются, что создает более широкий, чем у ДНК-содержащих вирусов, ресурс эволюционной изменчивости.

1.5. ОНТОГЕНЕЗ ВИРУСОВ

В жизненном цикле, или онтогенезе, вируса прослеживаются пять основных этапов:

— прикрепление вириона к клетке-хозяину, или адсорбция;
— проникновение в клетку-хозяина;
— раздевание;
— репликация;
— морфогенез, созревание и выход потомства вирионов из клетки-хозяина.

Поскольку у некоторых вирусов, в частности у большинства бактериофагов, проникновение вируса в клетку-хозяина сопряжено с его раздеванием, мы рассмотрим оба этапа в одном разделе. Кроме того, мы выделяем дополнительный этап — транслокацию, или перемещение вириона между компартментами клетки-хозяина. Он крайне важен для бактериофагов, а также наблюдается у некоторых вирусов животных и вирусов высших растений.

Результаты изучения онтогенеза бактериофагов легли в основу понимания неинтегрального (дисъюнктивного) механизма репродукции вирусов. В 1939 г. Макс Дельбрюк и Эмори Эллис (E. Ellis) построили «одноступенчатую» кривую репродукции бактериофага (рис. 10). Для этого суспензию *E. coli* заражали бактериофагом, через регулярные промежутки времени производили высев на чашки Петри и после выращивания зараженной культуры определяли титр вируса — число «негативных колоний», или ***бляшкообразующих единиц*** (англ. plaque forming unit; PFU), в расчете на клетку исходной суспензии (см. также раздел 2.2). Как оказалось, в латентный период, соответствовавший первым 20 мин инкубации, титр вируса оставался постоянным. Затем он увеличивался, и после 40 мин инкубации кривая выходила на плато, т. е. достигался максимальный «урожай» инфекционных вирусных частиц. На основе этих

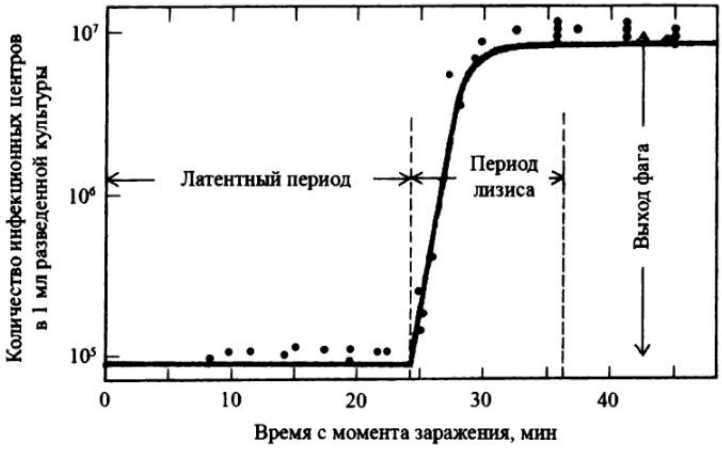


Рис. 10. «Одноступенчатая» кривая репродукции фага T4 (по: Doermann, 1952).

Объяснение в тексте.

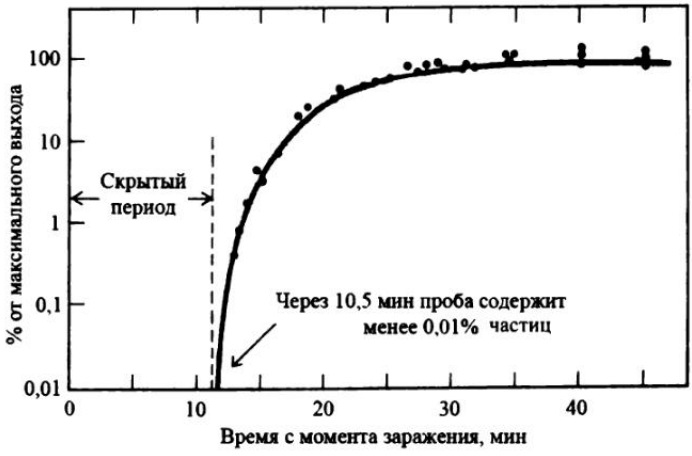


Рис. 11. Изменение суммарного титра внутриклеточных и свободных частиц фага Т4 (по: Doermann, 1952).

Объяснение в тексте.

данных было высказано предположение, что в ходе латентного периода бактериофаг остается внутри клеток.

Усложнив опыт, Дельбрюк и Эллис перед высевом стали мягко разрушать бактерии, что позволяло определить суммарный титр внутриклеточных и свободных вирусных частиц. Хотя при этом продолжительность латентного периода сократилась, в течение 12 мин инфекционные частицы вообще не обнаруживались, что дало повод назвать это время ***эклипс-периодом*** (греч. eclipsis — исчезновение). Этот, на первый взгляд, странный феномен был объяснен тем, что на раннем этапе онтогенеза фага его частицы демонтируются и теряют инфекционность (рис. 11).

В настоящее время нетрудно соотнести одноступенчатую кривую развития с отдельными этапами онтогенеза бактериофага. На протяжении эклипс-периода происходят адсорбция и проникновение вируса, а также начинается его репродукция. К концу латентного периода, по мере накопления копий геномной нуклеиновой кислоты и структурных белков, начинается сборка вирионов. Начало выхода зрелых вирионов из клетки-хозяина совпадает с увеличением титра вируса в окружающей среде.

Общая продолжительность онтогенеза вируса колеблется от 20 мин до 10 ч. Она зависит от типа вируса, физиологического состояния хозяина и внешних условий. Самые короткие жизненные циклы наблюдаются у бактериофагов (20–40 мин) в оптимальных условиях культивирования хозяев; при использовании стандартной модели вирус–хозяин продолжительность отдельных этапов постоянна и является индивидуальной характеристикой штамма вируса.

1.5.1. ПРИКРЕПЛЕНИЕ ВИРИОНА К КЛЕТКЕ-ХОЗЯИНУ, ИЛИ АДСОРБЦИЯ

Чтобы дать потомство, вирион должен встретиться с хозяином и вступить с ним сперва в физическое, а затем в информационное взаимодействие. Однако вирионы не обладают собственными локомоторными системами и не могут активно изменять свое местоположение в окружающей среде. Поэтому встреча с будущим хозяином происходит в основном в ходе пассивной диффузии, т. е. ненаправленного стохастического процесса.

Поскольку риск потерять инфекционность и способность к внутриклеточной репродукции возрастает по мере увеличения периода, в течение которого вирус находится во внеклеточной среде, вирион приспособлен к тому, чтобы его случайное взаимодействие с клеткой-хозяином стало максимально эффективным.

Жизненный цикл вируса начинается с ***прикрепления*** (англ. attachment), или ***адсорбции*** (англ. adsorption), вириона на поверхности клетки-хозяина. Успешное прикрепление служит предпосылкой проникновения вируса в цитоплазму (см. ниже), за которым следует его размножение и, в конечном счете, выход зрелых вирионов из клетки-хозяина.

Из-за разнообразия индивидуальных свойств каждого из партнеров не существует как «универсального» вируса, так и «универсального» хозяина. Партнерство носит избирательный характер и для его установления используется общебиологический принцип взаимного узнавания, который называется ***рецепцией вируса*** (англ. viral reception), а способность вируса внедряться в клетки специфического типа и реплицироваться в них называется ***тропизмом вируса*** (англ. viral tropism).

В роли ***рецептора вируса*** (англ. virus receptor), или ***распознающего рецептора*** (англ. cognate receptor), выступают разные молекулы или надмолекулярные структуры, которые постоянно и в достаточном количестве экспонируются на поверхности клетки-хозяина. В большинстве случаев рецепторы вирусов представляют собой клеточные белки, которые, в дополнение к своим нормальным функциям, специфически связывают вирионы, в результате чего последние прикрепляются к клетке, т. е. адсорбируются на ней.

Со стороны вируса в адсорбции участвуют ***белки прикрепления вируса*** (англ. virus attachment protein, VAP), входящие в состав нуклеокапсида или суперкапсида. В частности, оболочные вирусы прикрепляются к клеточным рецепторам с помощью одного или нескольких гликопротеинов мембраны суперкапсида. В настоящее время наиболее охарактеризован рецептор VAP-белка вируса гриппа — ***гемагглютинин*** (англ. hemagglutinin, HA), который связывается с терминальным остатком сиаловой (N-ацетил-нейраминовой) кислоты, входящим в состав олигосахаридного домена гликопротеина или гликолипида на поверхности клетки-мишени.

Вирус может адсорбироваться за один этап, который называется ***первичным связыванием*** (англ. initial binding), или в два этапа, когда следом за первичным связыванием наступает ***вторичное связывание***, или ***усиление адгезии*** (англ. secondary binding; adhesion strengthening). В первом случае связывания VAP-белка с рецептором достаточно, чтобы запустить механизм доставки в клетку интактного вириона, частично разобранного вириона или геномной нуклеиновой кислоты. Во втором случае рецептор

не только связывается с вирионом, но и вызывает в нем конформационные изменения, которые способствуют дальнейшему развитию инфекции. Иногда при двухэтапной адсорбции вирус связывается с двумя рецепторами, один из которых адсорбирует вирион, а другой (корецептор) — участвует в механизме проникновения вириона в клетку-хозяина. Примером служит вирус иммунодефицита человека (HIV-1).

Рецепторы, которые распознаются вирусами и обеспечивают адсорбцию, существенно различаются у прокариотов и ядерных клеток. Более того, эти структуры разнятся по своему ассортименту и специфичности (как между отдельными группами прокариотов, так и между разными типами ядерных клеток).

В ходе коэволюции гены рецепторов и антирецепторов постоянно мутировали, что повлияло на характер специфичности вируса. Участие рецепторов в вирусной инфекции подразумевает, что перед проникновением в цитоплазму вирион предварительно контактирует с поверхностью клетки-хозяина; но это не всегда обязательно. В частности, вирусы мицелиальных грибов прибегают к стратегии персистентной инфекции (см. ниже) и никогда не покидают клетки хозяина. Понятно, что при этом они не нуждаются в рецепторах.

Аналогичным образом вирионы вирусов растений попадают непосредственно в цитоплазму через повреждение клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. Здесь также нет необходимости в рецепторах.

Вирусы архей, в том числе напоминающие бактериофагов (см. раздел 3.1), вряд ли используют «бактериальные» рецепторы. Дело в том, что поверхностные структуры архей (цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка, жгутики, фимбрии) не гомологичны их бактериальным аналогам. Хотя рецепторное взаимодействие между партнерами, несомненно, имеет место и в данном случае, мы не знаем, как оно происходит в реальности.

Рецепторы вирусов, несомненно, имеются и у протистов. Однако их молекулярная природа также не выяснена.

Таким образом, информация о рецепторах вирусов ограничивается сведениями о рецепторах бактериофагов, а также о рецепторах оболочных и безоболочных вирусов животных.

Рецепторы бактериофагов. Бактериофагам свойственна относительно узкая специфичность, т.е. способность инфицировать какой-нибудь один вид или даже штамм бактерий (в виде исключения, некоторые бактериофаги способны инфицировать ряд штаммов бактерий одного вида и штаммы разных видов).

В основе специфичности бактериофага лежит избирательность прикрепления, или адсорбции вириона на бактериальной клетке.

В свою очередь, эффективность адсорбции зависит от степени сродства между ***рецептором бактериофага*** (англ. bacteriophage receptor), ассоциированным с поверхностью клетки, и ***антирецептором*** (англ. antireceptor), находящимся на поверхности вириона.

Для эффективной адсорбции фага также важно расположение рецепторов, их общее число и локальная концентрация.

Рецепторы бактериофагов могут находиться в цитоплазматической мембране, в наружной мембране грамотрицательных бактерий и в клеточной стенке грамполо-

жительных бактерий. Они могут входить в состав S-слоев, капсул, жгутиков и фимбрий как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (табл. 4).

Таблица 4. **Примеры рецепторов бактериофагов**

Локализация рецептора	Рецептор	Бактериофаг // хозяин
Цитоплазматическая мембрана	Липогликановый адгезин	MVL2 // *Acholeplasma laidlawii*
	Липотейхоевая кислота	LL-H // *Lactobacillus delbrueckii*
Наружная мембрана грамотрицательных бактерий	Структурный белок OmpA (порин «общего назначения»)	TulB // *Escherichia coli*
	Порин OmpC	T4 // *E. coli*
	Порин OmpF	T2 // *E. coli*
	Порин LamB	λ // *E. coli*
	Порин TonA (FhuA)	T7 // *E. coli*
	Транспортный белок TonB	ϕ80 // *E. coli*
	Протеаза OmpT	M1 // *E. coli*
	Протеаза OmpX	Ox2 // *E. coli*
	Кор-олигосахарид липополисахарида	ϕX174 // *Salmonella typhi* серовар Typhimurium
	О-специфичная боковая цепь липополисахарида	Ω8 // *E. coli*
Клеточная стенка грамположительных бактерий	Муреин–тейхоатный комплекс	μ // *Bacillus subtilis*
	«Свободный» гликолипид квазинаружной мембраны	D4 // *Mycobacterium smegmatis*
	Транспортный белок GamR	γ // *B. cereus*
S-слой	Субъединичный белок	M // *B. sphaericus*
Капсула	Vi-антиген	Vi-II // *E. coli*
Нить жгутика	Флагеллин	PBS2 // *B. licheniformis*
Фимбрия	Пилин TraA	F4 // *E. coli*

Рецепторы бактериофагов, локализованные в цитоплазматической мембране, относительно редки и имеют разную природу.

У лишенных клеточной стенки микоплазм эту роль выполняет фактор иммобилизации клеток — липогликановый адгезин. У имеющих клеточную стенку грамположительных микобактерий рецепторами служат заякоренные в цитоплазматической мембране липотейхоевые кислоты (мембранные тейхоевые кислоты), длинные цепи которых пронизывают клеточную стенку и выдаются над ее поверхностью.

Наиболее многочисленны и разнообразны рецепторы, локализованные в наружной мембране грамотрицательных бактерий.

К первой группе таких рецепторов относятся ***белки наружной мембраны*** (англ. outer membrane protein; Omp). В частности, главный структурный белок наружной мембраны, или неспециализированный порин «общего назначения» OmpA, служит рецептором фагов TulB и K3. Из двух других поринов «общего назначения», OmpC и OmpF, первый играет роль рецептора фагов Hy2, ss4, TulB и T4, а второй — рецептора фага T2. Антирецептором у фага T4 является белок нитей хвостового отростка gp37, антирецептором у фага T2 — ассоциированный с белком gp37 белок gp38.

В свою очередь, специализированный транспортер мальтозы, «мальтопорин» LamB, служит рецептором фага лямбда (антирецептором — белок gpJ). Два компонента системы импорта железа — высокоаффинный порин TonA (FhuA) и транспортный белок TonB — являются рецепторами фагов T5, T7 и ϕ80. Наконец, рецепторами могут быть два ферментных белка наружной мембраны — протеаза OmpT (для фага M1) и протеаза OmpX (для фага Ox2).

Ко второй группе рецепторов наружной мембраны относятся липополисахариды. Углеводная часть их молекулы состоит из двух доменов — ***кор-олигосахарида*** (англ. core oligosaccharide) и ***О-специфичной полисахаридной боковой цепи*** (англ. O-specific side chain). Первый домен высококонсервативен и служит рецептором относительно широкого круга фагов (в частности, F0, ϕX174, S13 и 6SR). Второй домен вариабелен, что и определяет более узкий круг хозяев фагов H-F6S, ϕ1, Ω8 и Sf6.

В случае грамположительных бактерий наиболее распространенным рецептором бактериофагов является главный структурный компонент клеточной стенки — муреин-тейхоатный комплекс. Данный рецептор используется фагами μ, ϕ1, ϕ25, ϕ29, SP3, SP10 и SP02 (*B. subtilis*), а также фагами 52A, 3C, 71, 77, 79 и 80 (*Staphylococcus aureus*).

У грамположительных бактерий группы «mycolata», в состав клеточной стенки которых входит так называемая квазинаружная мембрана (ее внутренний полумембранный листок состоит из миколовых кислот, а наружный — из набора «свободных» липидов); одним из рецепторов бактериофагов служит гликолипид.

Наконец, к числу стеночных рецепторов ряда грамположительных бактерий относится белок GamR, входящий в систему транспорта кобальта; его использует фаг γ (*B. cereus*).

Вспомогательной, а иногда и альтернативной ригидной структурой клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных бактерий служит поверхностный S-слой, состоящий из уложенных в паракристаллическую решетку белковых субъединиц. Он также может использоваться в качестве рецептора бактериофагов, хотя данных об этом крайне мало.

Для специфической адсорбции бактериофагов может использоваться материал капсулы (хотя обычно капсула, напротив, препятствует контакту вириона с рецепторами клеточной стенки). В качестве примера назовем капсульный Vi-антиген, который служит рецептором фага Vi-II (*E. coli*). Способностью адсорбироваться на капсульных полисахаридах обладают также фаги K29 (*E. coli*), K2 (*Aerobacter aerogenes*) и K11 (*Klebsiella pneumoniae*). Во всех случаях с хвостовым отростком бактериофага связаны ферменты, нарушающие структуру капсульного полисахарида, что способствует контакту вириона с вторичным рецептором на поверхности клеточной стенки.

Фаги грамотрицательных и грамположительных бактерий могут в качестве рецептора использовать нить жгутика (флагеллу). Примерами служат фаги χ (*E. coli*, *Serratia* sp. и *Salmonella* sp.), фаг PBS7 (*B. licheniformis*, *B. pumilus* и *B. subtilis*) и фаг 7–7–1 (*Rhizobium lupini*). После того, как нити хвостового отростка свяжутся с дистальным концом флагеллы, вирионы передислоцируются по направлению к базальному телу жгутика.

Наконец, рецепторами «мужских» бактериофагов служат половые фимбрии, относящиеся к альтернативному IV типу фимбрий. Примерами служат

РНК-содержащие икосаэдрические фаги f2, f4, fr, M12, P17 и Qβ (*E. coli*), а также ДНК-содержащие нитчатые фаги Ff и If (*E. coli*). В первом случае фимбрия адсорбирует множество вирусных частиц, а во втором случае — только несколько. В обоих случаях в результате сокращения фимбрии бактериофаги доставляются к поверхности наружной мембраны донорной («мужской») клетки.

Рецепторы вирусов животных. Среди рецепторов безоболочных вирусов преобладают гликопротеины гликокаликса (табл. 5).

Таблица 5. **Примеры рецепторов безоболочных вирусов животных**

Тип белка	Рецептор	Вирус
Интегрины	Фактор 1 межклеточной адгезии	Риновирус (сем. *Picornaviridae*)
	Интегринподобный рецептор	Вирус ящура (сем. *Picornaviridae*)
Гликофорин А	Сиаловая кислота	Вирус энцефаломиокардита (сем. *Picornaviridae*)
Белки гликокаликса	Гликопротеины 24, 30–40, 50 и 95 кДа	Вирус полиомы (сем. *Polyomaviridae*)
	Гликопротеины 34, 42 и 78 кДа	Аденовирус типа 2 (сем. *Adenoviridae*)
	Гликопротеин 49 кДа	Вирус Коксаки В (сем. *Picornaviridae*)
	Гликопротеин 54 кДа	Реовирус типа 1 (сем. *Reoviridae*)

В свою очередь, оболочные вирусы животных могут использовать в качестве рецепторов компоненты цитоплазматической мембраны клетки-хозяина.

Первое место среди них занимают гликопротеины, представленные несколькими типами белков (табл. 6).

Одни из них (в частности, члены суперсемейства иммуноглобулинов) участвуют в сигналинге; другие играют роль мембранных транспортеров; третьи служат факторами клеточной адгезии; четвертые являются иммуномодуляторами; пятые образуют надмембранный комплекс (гликокаликс); функция шестых неизвестна.

Рецепторы оболочных вирусов животных представляют собой интегральные однодоменные белки (например, CD4), интегральные мультидоменные транспортеры (например, переносчик аминокислот ecoR) или заякоренные с помощью гликофосфатидил-инозитола белки, подобные рецептору липопротеина низкой плотности (англ. **l**ow **d**ensity **l**ipoprotein **r**eceptor; LDLR).

Значительно реже рецепторами выступают гликолипиды и анионные фосфолипиды. В качестве примеров можно назвать, соответственно, галактозилцерамид (альтернативный рецептор ретровируса HIV-1) и фосфатидилсерин (рецептор рабдовируса везикулярного стоматита).

Еще реже рецептором оболочных вирусов служит не мембранный белок или липид, а компонент внеклеточного матрикса — гликоаминогликан гепарансульфат.

Как видно из таблиц 5 и 6, для вирусов одного и того же семейства используются разные типы рецепторов и, наоборот, один и тот же тип рецептора может распознаваться вирусами из разных семейств. Иными словами, отсутствует корреляция между выбором рецептора и таксономической принадлежностью вируса.

Кроме того, некоторые вирусы могут использовать не один, а два или даже несколько разных рецепторов.

Таблица 6. **Примеры рецепторов оболочных вирусов животных**

Тип белка	Рецептор	Вирус
Суперсемейство иммуноглобулинов (Ig)	CD4 (сокр. англ. cluster of differentiation antigen)	Вирус иммунодефицита человека (HIV-1) (сем. *Retroviridae*)
	CEA (сокр. англ. carcinoembryonic antigen)	Вирус гепатита мышей (сем. *Coronaviridae*)
	MHC класса I (сокр. англ. major histocompatibility complex)	Вирус леса Семлики (SFV) (сем. *Togaviridae*)
	MHC класса II	Вирус Висна (Maedi—Visna *lentivirus*) (сем. *Retroviridae*)
Мультидоменные мембранные транспортеры	Переносчик фосфата GlvR-1	Вирус лейкемии обезьяны гиббона (GALV) (сем. *Retroviridae*)
	Переносчик фосфата Ram-1	Вирус А лейкемии мышей (MLV-A) (сем. *Retroviridae*)
	Семейство 4-доменных белков; переносчик ecoR катионных аминокислот	Вирус Е лейкемии мышей (MLV-E) (сем. *Retroviridae*)
	Семейство 4-доменных белков; CD9	Вирус иммунодефицита кошек (FIV) (сем. *Retroviridae*)
	Белок G-ассоциированные рецепторы; хемокиновый рецептор CCR-5 (сокр. англ. chemokine cell receptor 5)	Вирус иммунодефицита человека (HIV-1) (сем. *Retroviridae*)
Интегрины	Высокоаффинный рецептор ламинина	Вирус Синдбис (сем. *Togaviridae*)
Регуляторы активации комплемента	CR2 (сокр. англ. complement receptor 2)	Вирус Эпштейна—Барр (EBV) (сем. *Herpesviridae*)
	CD46	Вирус кори (сем. *Paramyxoviridae*)
Семейство рецепторной тирозинкиназы (RTK)	Рецептор EGF (сокр. англ. epidermal growth factor)	Вирус осповакцины (сем. *Poxviridae*)
	Гомолог рецепторов TNF/NGF (сокр. англ. tumor necrosis factor/nerve growth factor)	Вирус простого герпеса (HSV) (сем. *Herpesviridae*)
Цинкзависимые протеазы	Аминопептидаза CD13	Вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV) (сем. *Coronaviridae*)
Трансмиттерзависимые ионные каналы	Рецептор ацетилхолина	Вирус бешенства (сем. *Rhabdoviridae*)
Белки гликокаликса	Сиаловая кислота	Вирусы гриппа A, B и C (сем. *Orthomyxoviridae*)

У вируса гепатита С (***Hepatitis C virus***; HCV; сем. *Flaviviridae*) имеются два рецептора: 4-доменный трансмембранный белок CD81 и амфипатичный рецептор липопротеина низкой плотности LDLR. У вируса ящура (FMDV; сем. *Picornaviridae*) также два рецептора: интегрин (основной) и гепарансульфат (альтернативный).

Коронавирусы, являющиеся патогенами человека и животных, могут использовать несколько разных рецепторов, благодаря чему они проявляют тропизм по отношению к клеткам разных тканей.

1.5.2. ТРАНСЛОКАЦИЯ ВИРИОНА

В структуре вириона нашел отражение компромисс между паракристаллической стабильностью и участием в динамичном инфекционном процессе. Соответственно в ходе онтогенеза вируса вирион решает две, на первый взгляд противоположные, задачи:

— на внеклеточной стадии он позволяет вирусу сохранить геном неповрежденным до момента заражения очередного хозяина;

— на инфекционной стадии дает вирусу возможность внедрить свой геном в клетку-хозяина, чтобы презентировать его системам транскрипции и трансляции.

В предыдущем разделе уже отмечалось, что вирус не обладает локомоторными системами. Каким же образом он добирается до своего хозяина?

Иногда расстояние, отделяющее свободный вирион от клетки, бывает столь незначительным, что оно преодолевается с помощью пассивной диффузии. Однако при очень большом, относительно диффузионного радиуса, расстоянии нельзя полагаться только на диффузию. В этом случае вирион переносится конвекционными потоками и водными течениями, на частицах ила или пыли, в аэрозольных каплях, а также с помощью природных векторов или техногенных транспортных средств.

Однако даже если встреча с хозяином состоялась и вирус прикрепился к клетке, для проникновения и раздевания (см. ниже) необходимо преодолеть расстояние, отделяющее его от цитоплазмы. Эта задача решается с помощью разных механизмов и условно может быть названа ***транслокацией вириона.***

Транслокация вириона через клеточную стенку. Живые клетки, имеющие разное эволюционное происхождение или принадлежащие к разным генеральным типам строения (морфотипам), различаются по структуре клеточной оболочки. Помимо цитоплазматической мембраны она часто содержит вспомогательные барьеры, комплекс которых называется клеточной стенкой. Стенка есть у большинства прокариотов, растений и грибов, тогда как у животных она отсутствует.

Клеточная стенка имеет различное строение у разных организмов и, как правило, ее структурно-функциональные особенности определяют круг потенциальных хозяев вируса. Вирусы разными путями преодолевают этот барьер.

У бактерий грамотрицательного морфотипа клеточная стенка представляет собой саккулус (молекулярный мешок), состоящий из одного или нескольких слоев пептидогликана суммарной толщиной 2,5–7,5 нм, в то время как у бактерий грамположительного морфотипа саккулус многослойный и имеет толщину порядка 25 нм. Размер (эксклюзионный диаметр) пор пептидогликана не превышает 50 кДа; для пориновых комплексов, расположенных в наружной мембране бактерий грамотрицательного морфотипа, он на два порядка меньше (~0,6 кДа). Помимо клеточной стенки, прокариоты часто окружены дополнительными покровами в виде чехлов и капсул.

Археи, как правило, не имеют пептидогликана. В большинстве случаев их клеточная стенка представляет собой мешковидный паракристалл, образованный белковыми субъединицами (поверхностный S-слой).

Главный компонент клеточной стенки всех сосудистых растений — целлюлоза; у водорослей наряду с ней (или вместо нее) имеются разнообразные структурные полисахариды, в частности пектинаты и альгинаты.

Основой клеточной стенки всех мицелиальных грибов служит хитин.

Протисты, или содержащие ядро одноклеточные организмы, либо имеют клеточную стенку «растительного» или «грибного» типа, либо не имеют, как у клеток животных.

Вирусы бактерий, архей и некоторых протистов, проходящие внеклеточную фазу онтогенеза, в большинстве случаев активно преодолевают клеточную стенку.

Например, в геноме бактериофагов содержатся гены разрушающих пептидогликан ферментов — мурамидаз, которые не обладают трансгликозилазной активностью (лизоцимов), а также трансгликозилаз и эндопептидаз. Продукты этих генов могут непосредственно входить в состав вириона, например, с базальной пластинкой «хвостатого» фага T4 ассоциирован белок gp5, который обладает лизоцимной активностью и позволяет хвостовому отростку пройти через ригидный пептидогликановый слой клеточной стенки. В свою очередь, с нуклеокапсидом оболочного фага ϕ6 (*Pseudomonas syringae*) связана эндопептидаза P5, которая локально повреждает клеточную стенку, что обеспечивает доступ нуклеокапсида к цитоплазматической мембране. Аналогичную роль играют трансгликозилаза фага T7, входящая в состав короткого хвостового отростка, и трансгликозилаза Gp16 фага PRD1, ассоциированная с пепломерами.

В геноме вируса PBCV-1, инфицирующего одноклеточную водоросль *Chlorella* sp., закодированы амидаза, β-глюканаза, две хитиназы и хитозаназа. Два последних фермента входят в состав вириона и лизируют клеточную стенку в месте его прикрепления.

Если же вирус по той или иной причине не способен транслоцироваться через клеточную стенку, он использует обходной путь инфекции, не связанный с ферментативным разрушением этого барьера.

Например, в геноме вирусов мицелиальных грибов не закодированы ферменты, способные разрушить сложно устроенную, ригидную клеточную стенку хозяина. Поэтому они прибегают к персистентной инфекции (см. ниже), т. е. никогда не покидают клетку; инфекция осуществляется при слиянии гамет в ходе полового процесса.

У большинства вирусов растений геномы чересчур малы, чтобы кодировать ферменты для разрушения массивной клеточной стенки хозяина. Поэтому они не транслоцируются через нее, а идут обходными путями; их, как минимум, три.

Первый путь, очень редкий, использует вирус бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* (***Ectocarpus siliculosus virus-1***, EsV-1). Он не способен попасть в окруженные стенкой вегетативные клетки и инфицирует только подвижные гаметы, у которых стенка отсутствует.

Во втором случае инфекционный агент передается с цитоплазмой при вегетативном или семенном размножении.

В третьем случае вирус вводится непосредственно в цитоплазму в зоне повреждения или отсутствия клеточной стенки. Поскольку вирусы растений, подобно вирусам мицелиальных грибов, не имеют собственного механизма для разрушения клеточной стенки, за них это делают жалящие или грызущие растительноядные беспозвоночные, которые одновременно играют роль векторов. Кроме того, локальное разрушение клеточной стенки может произойти при случайном механическом воздействии, в том числе при трении листьев друг о друга.

В отличие от прокариотов, грибов и растений, ядерные клетки (например, некоторые протисты) часто лишены ригидной стенки. Поэтому макромолекулярные комплексы, такие, как вирусы, могут практически беспрепятственно контактировать с поверхностью цитоплазматической мембраны. Однако поскольку ядерные клетки содержат сложную систему внутренних мембран, последние могут стать дополнительным барьером на пути вируса в тот компартмент, где он будет репродуцироваться. Особенно это касается тех вирусов животных и растений, которые размножаются в клеточном ядре.

Внутриклеточный транспорт между цитоплазмой и нуклеоплазмой обычно осуществляется через комплекс ядерной поры, однако ее диаметр составляет ~25 нм, что значительно меньше диаметра большинства капсидов. Поэтому, например, некоторые ретровирусы не способны проникнуть в ядро и остаются в цитозоле до тех пор, пока ядерная оболочка не будет разобрана в прометафазе митоза.

Транслокация вириона с помощью локомоторных систем хозяина. Поскольку вирион не может самостоятельно передвигаться, иногда он использует локомоторные системы клетки-хозяина. В результате индуцированной вирусом перестройки поверхностных придатков (фимбрий у бактерий) или цитоскелета (у эукариотов) обеспечиваются контакт вириона с поверхностью клетки, его внутриклеточный таргетинг и даже его транслокация между клетками ткани.

В частности, вирионы ряда бактериофагов (икосаэдрические фаги, содержащие ssРНК, например Qβ и MS2; нитчатые фаги, содержащие ssДНК, например fd и M13; оболочный фаг ϕ6 *Pseudomonas syringae*) адсорбируются на «сократимой» фимбрии, которая осуществляет докинг вириона к поверхности наружной мембраны. Икосаэдрические ssРНК-фаги и фаг ϕ6 прикрепляются к боковой поверхности адгезионной фимбрии, а нитчатые фаги — к дистальному концу половой F-фимбрии.

В обоих случаях благодаря проксимальной разборке субъединиц фимбрии вирион как бы подтягивается к поверхности наружной мембраны.

Местом размножения почти всех ДНК-содержащих, а также некоторых РНК-содержащих вирусов животных (в частности, вируса гриппа) служит клеточное ядро. Однако на пути к нему находится цитоплазма, которая обладает высокой вязкостью, что препятствует дистанционной диффузии вириона. Чтобы справиться с этой проблемой, вирион образует комплекс с цитоскелетными микротрубочками или микрофиламентами, энергозависимая перестройка которых обеспечивает его перемещение и таргетинг.

Вирусы растений отчасти сами отвечают за свою транслокацию по тканям хозяина. Их геном кодирует так называемые ***белки движения*** (англ. movement protein), которые вступают во взаимодействие с микротрубочками цитоскелета растительной клетки. Благодаря этому размножающиеся вирионы транслоцируются от клетки к клетке по цитоплазме, попутно проходя через просветы плазмодесм (см. главу 5).

1.5.3. ПРОНИКНОВЕНИЕ И РАЗДЕВАНИЕ ВИРУСА

Репродукция вируса осуществляется по его собственной генетической программе, но в результате эксплуатации метаболических систем клетки-хозяина, в частности ее рибосомного аппарата.

Вирусы передаются от клетки к клетке чаще всего в форме вириона. Для этого вирусный геном должен упаковаться, выйти из инфицированной клетки, в упакованном виде достигнуть неинфицированной клетки, вступить с ней в контакт, проникнуть в нее и распаковаться. Поэтому перед экзогенным вирусом стоят две сопряженные задачи:

— преодолеть клеточные барьеры, которые служат преградой для доступа вирусного генома в цитоплазму;

— преодолеть собственный барьер в виде капсида (у безоболочных вирусов) или капсида/суперкапсида (у оболочных вирусов), который изолирует вирусный геном от окружающей среды.

Решение первой задачи осуществляется путем проникновения вируса, или просто ***проникновения*** (англ. entry). Для решения второй задачи необходимо раздевание вируса, или просто ***раздевание*** (англ. uncoating).

Проникновение и раздевание позволяют осуществить ***презентацию вирусного генома*** (англ. viral genome delivery) и его оперативное взаимодействие с аппаратом транскрипции и репликации клетки-хозяина. В конечном счете это приводит к размножению инфекционного агента.

При контакте с клеткой-хозяином до этого безжизненный вирус активируется, что связано с конформационными изменениями капсомеров, а иногда — со структурной перестройкой вириона в целом. Стимулирующий сигнал по своей природе не является эндогенным и исходит не от вируса, а от клетки-хозяина. Точнее сказать, он связан с рецепцией вириона, с изменением физико-химического окружения (pH, ионной силы и т. д.) или с воздействием протеолитических ферментов клетки-хозяина.

Вирус должен преодолеть цитоплазматическую мембрану, при этом не повреждая ее. В противном случае клетка-хозяин может преждевременно погибнуть, или ее метаболические системы придут в нерабочее состояние, и тогда вирус не сможет репродуцироваться.

В зависимости от строения вириона и особенностей архитектуры клетки-хозяина возможны два основных способа проникновения и раздевания.

В первом случае проникновение сопряжено с полным раздеванием вириона на уровне цитоплазматической мембраны. Во втором случае проникновению предшествует частичное раздевание, когда удаляется суперкапсид; это происходит при взаимодействии вириона либо с цитоплазматической мембраной, либо с мембраной эндосомы.

Проникновение, сопровождающееся полным раздеванием, характерно для безоболочных вирусов прокариотов. При этом в цитоплазму попадает, или ***интернализуется***, только инфекционная нуклеиновая кислота, а опустевший капсид остается в экзоплазме.

Проникновение, которому предшествует частичное раздевание, характерно для оболочных вирусов животных. При этом нуклеокапсид выходит из суперкапсида либо на поверхности клетки, либо в полости эндосомы. В обоих случаях интернализованный нуклеокапсид транслоцируется в тот компартмент, где в дальнейшем произойдет размножение вируса.

У оболочных вирусов за интернализацией следует полное раздевание. Оно осуществляется путем декапсидирования геномной нуклеиновой кислоты в одном из клеточных компартментов — в цитоплазме, в полости цитоплазматической везикулы, в перинуклеарной цистерне или в нуклеоплазме.

В исключительных случаях раздевание вообще не происходит (вирусы, содержащие dsРНК, в частности фаг ϕ6 *Pseudomonas syringae* и представители семейства *Reoviridae*). При этом геном экспрессируется и реплицируется в изоляции от цитоплазмы или нуклеоплазмы, оставаясь внутри интернализованного капсида. Это позволяет избежать нежелательного контакта генетического аппарата хозяина с dsРНК.

Полное раздевание вируса на цитоплазматической мембране. Вирусы бактерий имеют слишком крупный размер по сравнению с диаметром пор в наружной мембране, муреиновом саккулусе и S-слое. Кроме того, у их хозяев, как правило, отсутствуют механизмы для интернализации надмолекулярных структур.

В данном случае геномная молекула поступает в цитоплазму клетки-хозяина через транспортную пору, расположенную в цитоплазматической мембране. Иногда такой механизм образно называют ***впрыскиванием,*** или ***инъецированием, нуклеиновой кислоты*** (англ. nucleic acid injection) (рис. 12).

Перед этим геномная нуклеиновая кислота декапсидируется путем образования специализированного канала на одной из вершин икосаэдрического капсида, реже посредством полной разборки капсида на капсомеры. Такой сценарий типичен для бактериофагов и похожих на них вирусов архей из филы *Euryarchaeota*.

В большинстве случаев капсид остается на наружной поверхности клеточной оболочки, а геномная нуклеиновая кислота покидает его через ***геномпрезентирующий аппарат*** (англ. genome delivery apparatus), расположенный на одной из вершин икосаэдра.

Такой механизм раздевания используют, в частности, все «хвостатые» dsДНК-фаги (лямбда, T4, T7 и др.), «бесхвостый» dsДНК-фаг PRD1, икосаэдрические ssРНК-фаги (MS2, Qβ и др.), а также фагоподобные «хвостатые» вирусы архей (ϕH, ψM1 и др.).

В случае «хвостатых» dsДНК-бактериофагов нуклеиновая кислота покидает капсид через кольцевой портал (одновременно служащий местом прикрепления хвостового отростка к головке) и по каналу в клеточной оболочке поступает в цитоплазму.

Этот канал может иметь разную природу. В первом случае белок хвостового отростка перфорирует клеточную оболочку (примером служит фаг T5). Во втором случае используется резидентная транспортная пора клетки-хозяина (способ, характерный для фага лямбда). В третьем случае транспортная пора имеет вирусное происхождение и формируется из капсидных белков (что свой-

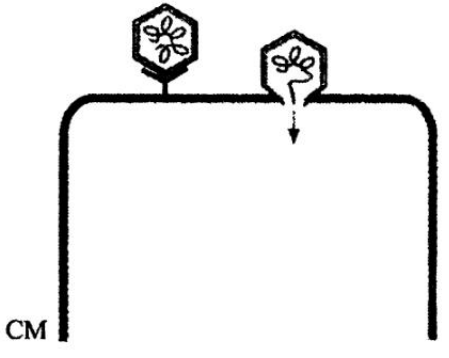


Рис. 12. Проникновение безоболочного вируса (с полным раздеванием на уровне цитоплазматической мембраны).

СМ — цитоплазматическая мембрана.

ственно фагу T7). В четвертом случае вирус индуцирует образование зоны адгезии между двумя мембранами клеточной оболочки — наружной и цитоплазматической; внешне это напоминает связку Байера (так поступает фаг T4).

Отдельная стратегия проникновения бактериофага связана с механизмом слияния мембран, как у оболочных вирусов животных. Примером является «бесхвостый» dsДНК-фаг PRD1, геномная нуклеиновая кислота которого изолирована от капсида билипидным слоем. При адсорбции вириона одна из вершин капсида сбрасывает пепломер, открывая отверстие диаметром ~15 нм. В этом месте билипидный слой с интегрированными в него белками образует трубчатый вырост, который пронизывает наружную мембрану и локально лизирует пептидогликановый саккулус с помощью гидролаз P7/P15. Дойдя до цитоплазматической мембраны, трубчатый вырост сливается с ней, высвобождая в цитоплазму геномную нуклеиновую кислоту. Аналогичным образом раздевается вирус PBCV-1, инфицирующий клетки *Chlorella* sp.

Другим примером, когда вирусная мембрана сливается с мембраной клетки-хозяина, служит фаг ϕ6 (сем. *Cystoviridae*), хозяином которого является *Pseudomonas syringae*. В данном случае нуклеокапсид, содержащий комплекс dsРНК и РНК-полимеразы, окружен суперкапсидом. После адсорбции вириона на фимбрии IV типа (в качестве антирецептора выступает VAP-белок P3) суперкапсид сливается с наружной мембраной клетки-хозяина, в результате чего капсид проникает в периплазматическое пространство. Затем ассоциированная с капсидом эндопептидаза P5 локально разрушает муреиновый саккулус, и нуклеокапсид достигает цитоплазматической мембраны. На заключительной стадии нуклеокапсид интернализуется в результате инвагинации цитоплазматической мембраны, что напоминает интернализацию вирусов животных посредством эндоцитоза. Способ поступления нуклеокапсида в цитоплазму и раздевания в данном случае не выяснен.

Хотя большинство вирусов животных использует механизм частичного раздевания (см. ниже), ряд мелких икосаэдрических ssРНК-вирусов (семейства *Nodaviridae* и *Picornaviridae*) идет по «прокариотному» пути — капсид остается снаружи клетки, и в цитоплазму поступает только геномная нуклеиновая кислота. При адсорбции вириона капсид разрыхляется; специфически изменяется конформация одного из капсидных белков, в результате чего он индуцирует образование трансмембранной поры, через которую геномная нуклеиновая кислота поступает в цитоплазму.

Все описанные случаи объединяет то, что вершина икосаэдрического вириона, особенно при размещении на ней хвостового отростка или пепломеров, представляет собой метастабильную зону (из-за нарушения общей симметрии частицы), которая активируется при рецепторном взаимодействии с клеткой-хозяином и структурно модифицируется, создавая сайт для экспорта геномной нуклеиновой кислоты.

К сказанному добавим, что аналогичный механизм раздевания используют представители семейства *Herpesviridae*. В данном случае интернализованный нуклеокапсид адсорбируется на комплексе ядерной поры, что приводит к переносу геномной ДНК в нуклеоплазму.

Частичное раздевание вируса на цитоплазматической мембране. В отличие от прокариотов ядерные клетки способны интернализовать надмолекулярные комплексы, в том числе такие относительно крупные, как вирионы (рис. 13).

Оболочные вирусы интернализуются путем ***слияния мембран*** (англ. membrane fusion). В этом процессе принимают участие две мембраны — мембрана суперкапсида и один из компонентов мембранной системы клетки-хозяина.

Слияние мембран является универсальным свойством ядерных клеток и происходит как при их взаимном объединении (например, при оогамии), так и на внутриклеточном уровне, в частности, при образовании и утилизации транспортных везикул. Таким образом, в целях своей интернализации и таргетинга вирус эксплуатирует нормальный механизм клеточного транспорта.

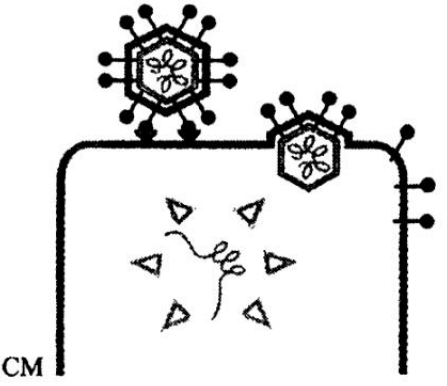


Рис. 13. Проникновение оболочного вируса (с частичным раздеванием на уровне цитоплазматической мембраны и последующим декапсидированием).

СМ — цитоплазматическая мембрана.

В случае частичного раздевания для интернализации вируса используется оболочка вириона. На ее поверхности находятся олигомерные белковые выступы длиной 100–150Å, или рецептор-связывающие ***шипы*** (англ. spike). В основании шипов расположены гликопротеины, которые называются ***белками слияния*** (англ. fusion protein; fusogenic protein).

Белки слияния, индуцирующие одноименный процесс, пребывают в метастабильном состоянии, осциллируя от неактивной формы к активной. Важным, но не обязательным фактором активизации является кислотная среда. Соответственно слияние мембран может быть «pH-зависимым» или «pH-независимым».

Частичное раздевание вируса на цитоплазматической мембране не зависит от pH. В данном случае (семейства *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae* и *Retroviridae*) слияние мембран индуцируется взаимодействием между белками оболочки вируса и рецепторами, расположенными в цитоплазматической мембране. В качестве примера можно назвать вирус приобретенного иммунодефицита человека (HIV-1). Первичный рецептор CD4 связывается с белком шипа gp120. В результате изменения конформации белка gp120 в нем открывается ранее скрытый корецептор-связывающий сайт, который взаимодействует с хемокиновым корецептором. В результате рецепторного взаимодействия активируется белок слияния gp41, который индуцирует pH-независимое слияние оболочки вируса с цитоплазматической мембраной.

Механизм поверхностного слияния мембран с целью частичного раздевания могут использовать не только оболочные вирусы животных, но и некоторые оболочные бактериофаги, в частности фаг ф6. Подобно вирусу HIV-1, он содержит рецептор-связывающий белок шипа (P3) и белок слияния (P6). Как уже отмечалось, рецептором этого бактериофага служит фимбрия. Сброс шипа в результате сокращения фимбрии активирует белок P6, что приводит к pH-независимому слиянию оболочки вируса с наружной мембраной бактериальной клетки.

Хотя цитоплазматическая мембрана служит главным барьером для вируса, это не единственное препятствие для интернализации путем частичного раздевания.

В большинстве типов ядерных клеток непосредственно под цитоплазматической мембраной расположен слой кортикального цитоскелета, который имеет толщину до 100 нм и образован актиновыми микрофиламентами и актин-связывающими белками. Он служит физическим барьером и для цитоплазматических органелл (в частности, рибосом), и для вирусных нуклеокапсидов.

До сих пор неизвестно, каким образом вирусы, частично раздевающиеся на цитоплазматической мембране, преодолевают второй барьер — кортекс. Возможно, что определенную роль в этом играют ассоциированные с вирионом протеазы (примером служит вирус HIV-1).

Более эффективно кортекс преодолевается с помощью механизма эндоцитоза, хотя этот путь потенциально опасен для вируса из-за способности эндосомы сливаться с энзиматически агрессивной лизосомой.

Существуют оболочные вирусы, например ретровирус HIV-1 и герпесвирус Эпштейна—Барр (EBV), которые используют две стратегии частичного раздевания — на цитоплазматической мембране и после эндоцитоза, в кислой среде эндосомы.

Частичное раздевание вируса внутри эндосомы. В данном случае, в частности у представителей семейств *Orthomyxoviridae* и *Rhabdoviridae*, вирус интернализуется посредством эндоцитоза. При этом вирион попадает в полость везикулы, отпочкованной от цитоплазматической мембраны. В топологическом плане он остается снаружи цитоплазмы.

При частичном раздевании на мембране эндосомы слияние мембран обычно является pH-зависимым. В качестве фактора, активирующего белки слияния, в первую очередь выступает закисление полости эндосомы. Оно происходит в результате энергозависимого действия протон-транслоцирующей «вакуолярной» АТФазы (V-АТФазы). У разных вирусов слияние мембран осуществляется в «ранней» (pH 5,5–6,5) или «поздней» (pH 5–6) эндосоме.

Существует несколько механизмов эндоцитоза.

Первый из них, ***рецептор-опосредованный эндоцитоз*** (англ. receptor-mediated endocytosis), связан с образованием ***окаймленного углубления*** (англ. coated pit) на поверхности цитоплазматической мембраны. Оно дает начало ***окаймленной везикуле*** (англ. coated vesicle), которая сливается с эндосомой (рис. 14).

Окаймленная везикула, она же ***клатрин-окаймленная везикула*** (англ. clathrin-coated vesicle), диаметром около 100 нм, образуется из участка цитоплазматической мембраны, «огороженного» комплексами белка клатрина с адапторным белком AP2. Вначале этот участок прогибается внутрь под воздействием АТФ-зависимой полимеризации/деполимеризации клатрина. Затем обладающий ГТФазной активностью цитоскелетный белок динамин индуцирует отпочкование инвагинации в виде клатрин-окаймленной везикулы. В неинфицированных ядерных клетках разного типа постоянно образуется множество везикул, которые участвуют в таких динамических процессах, как обновление мембран и рецептор-опосредованный эндоцитоз. После отпочкования клатриновое окаймление удаляется под воздействием АТФазы, и везикула сливается с «ранней» эндосомой. Из-за малого размера окаймленной везикулы в ней может разместиться только относительно небольшая вирусная частица, в частности продолговатый вирион с главной осью длиной ~150 нм.

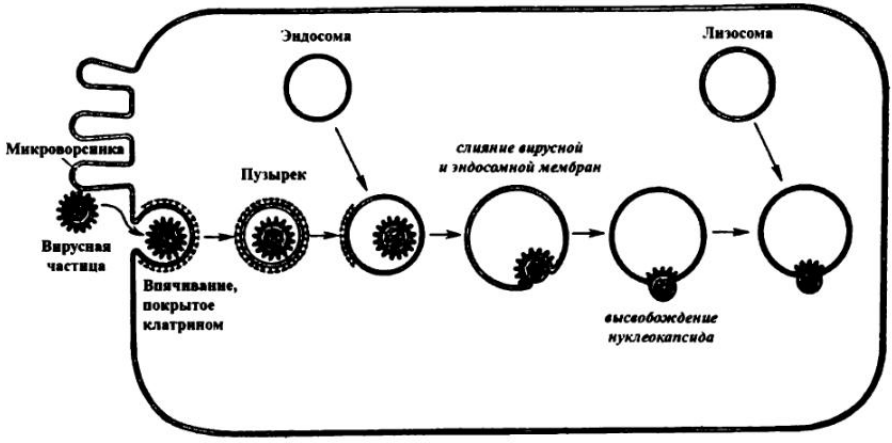


Рис. 14. Проникновение оболочного вируса путем эндоцитоза (с последующим частичным раздеванием на уровне мембраны эндосомы).

Вариантом рецептор-опосредованного эндоцитоза является ***потоцитоз*** (англ. potocytosis; от лат. poto — всасывать). В данном случае небольшие молекулы-лиганды, например витамины и липиды, доставляются в цитоплазму при помощи ***кавеолей*** (англ. caveole; от лат. caveola — пустотка). Кавеоли представляют собой небольшие (~50 нм) колбовидные инвагинации цитоплазматической мембраны у разных типов клеток, в частности у клеток капиллярного эндотелия. По аналогии с клатрин-окаймленными углублениями, кальвеоли могут рассматриваться как ***кавеолин-окаймленные везикулы*** (англ. calveolin-coated vesicle), способные к актинзависимой инвагинации с образованием ***кавеосом*** (англ. caveosome). Роль кавеолей в вирусной инфекции в полной мере еще не выяснена, хотя с их помощью, вероятно, осуществляется транслокация безоболочного вируса SV40 (сем. *Polyomaviridae*) в комплекс гладкого эндоплазматического ретикулума с ядерной оболочкой.

Участие в проникновении оболочных вирусов неокаймленных везикул, внешне похожих на мелкие фагосомы (см. ниже), остается под вопросом.

Второй механизм эндоцитоза, ***фагоцитоз*** (англ. phagocytosis), который используется, в частности, моноцитами и нейтрофилами, также обусловлен рецепторным взаимодействием. Под контролем сигнального реле с участием тирозиновых киназ на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны начинается АТФ-зависимая полимеризация актина, в результате чего образуется инвагинация, в полость которой попадает экзогенный корпускулярный материал. Образовавшаяся фагосома сливается с «поздней» эндосомой, а затем — с лизосомой. Путем фагоцитоза могут захватываться более крупные частицы, чем при использовании клатрин-окаймленных везикул. Возможно, что данный механизм действует при pH-зависимом раздевании некоторых крупных вирусов, в частности представителей семейства *Orthomyxoviridae*.

Третий механизм эндоцитоза, или ***макропиноцитоз*** (англ. macropinocytosis), который используют макрофаги и дендритные клетки с целью презентации антигена, имеет некоторое сходство с фагоцитозом. В этом случае на внутренней поверхности

цитоплазматической мембраны также происходит АТФ-зависимая полимеризация актина, и отпочковавшаяся везикула доставляет материал экзогенной фазы в «позднюю» эндосому и лизосому. Макропиноцитоз связан с отпочкованием больших везикул в отдельных участках цитоплазматической мембраны; в принципе, он мог бы способствовать частичному раздеванию особо крупных вирусов. Однако этот процесс не обусловлен рецепторным взаимодействием, и его роль в вирусной инфекции неизвестна.

Декапсидирование. Благодаря слиянию мембраны оболочного вируса с цитоплазматической мембраной или мембраной эндосомы нуклеокапсид попадает в цитоплазму. Это «ядро» вириона представляет собой геномную нуклеиновую кислоту, нековалентно связанную с одним или несколькими структурными белками. Оно образуется путем самосборки в инфицированной клетке, а при реинфицировании разбирается на составные части.

Как происходит переключение с разборки нуклеокапсида на его сборку?

В первую очередь декапсидирование может осуществляться в результате активации цитоплазматических органелл и клеточных факторов, локализованных в цитоплазме; при размножении вируса они, напротив, инактивируются.

Важную роль в декапсидировании играют транслирующие рибосомы. Как показано на примере РНК-содержащего оболочного вируса леса Семлики (англ. *Semliki forest virus*, SFV; сем. *Togaviridae*), интернализованный капсид прочно связывается с большой субъединицей рибосомы, предположительно с сайтом 28S-рРНК, который является гомологом «упаковочного» сайта вирусного генома. В результате этого взаимодействия капсомеры теряют связь с РНК, что позволяет вирусному геному приступить к репликации. По мере синтеза капсомеров рибосомный сайт связывания капсида насыщается и начинается самосборка новых нуклеокапсидов из свободных капсомеров и дочерних геномных молекул.

Декапсидирование ssРНК(+)-содержащего безоболочного вируса табачной мозаики (*Tobacco mosaic virus*, TMV; сем. *Virgaviridae*) осуществляется с помощью котрансляционного механизма. По мере трансляции вирусной РНК в направлении 5′→3′ капсомеры сбрасываются на участке ~75% генома; оставшиеся 25% декапсидируются в направлении 3′→5′ сопряженно с репликацией.

В случае РНК-содержащего вируса гриппа А (сем. *Orthomyxoviridae*), который размножается в клеточном ядре, решающая роль в противоположно направленных процессах декапсидирования и сборки вириона принадлежит главному белку капсида (M_1). Интернализованный нуклеокапсид разбирается в цитоплазме, и вирусная РНК проникает в нуклеоплазму. При сборке вириона направление транспорта вирусной РНК сменяется на противоположное, и она экспортируется из нуклеоплазмы в цитоплазму. В данном случае регулирующая роль принадлежит белку M_1. При сборке вириона новые молекулы M_1 поступают в ядро. Там M_1 связывается с покидающими ядро копиями геномной нуклеиновой кислоты, что предотвращает их реимпортирование.

Проникновение безоболочных вирусов. При размножении и сборке безоболочных вирусов геномная нуклеиновая кислота капсидируется в цитоплазме или нуклеоплазме, а инфицированная клетка обычно лизируется.

При заражении нового хозяина капсид безоболочного вируса должен интернализоваться, однако в данном случае механизм слияния мембран использоваться не может, поскольку суперкапсид отсутствует.

В настоящее время механизм проникновения безоболочных вирусов еще плохо изучен; по-видимому, он может быть разным.

У представителей семейства *Picornaviridae* клеточные рецепторы связываются с глубокими ***ложбинами*** (англ. canyon-like depression), расположенными на поверхности вириона, что запускает механизм эндоцитоза. Попав в эндосому, вирион, по-видимому, образует поры в ее мембране и частично перестраивается с образованием геном-презентирующего аппарата. Это позволяет экспортировать вирусную РНК в цитоплазму без разрушения мембраны эндосомы и без разборки капсида.

В свою очередь, у вирусов семейства *Adenoviridae* после рецепции и адсорбции вириона он интернализуется путем эндоцитоза с использованием клатрин-окаймленной везикулы. Внутри эндосомы под воздействием кислотной среды активируется вирусный фермент-лизин, разрушающий мембрану органеллы, в результате чего вирион переходит в цитоплазму, где капсид и разбирается.

1.5.4. РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСА

Вирус размножается на внутриклеточной стадии онтогенеза. При этом происходят три взаимосвязанных события: репликация геномной нуклеиновой кислоты, биосинтез вирусных структурных белков и сборка нуклеокапсида.

Вирусный геном копируется либо непосредственно на матрице геномной нуклеиновой кислоты, либо на промежуточной копии, которая называется ***репликативным интермедиатом*** (англ. replicative intermediate).

При репликации геномной нуклеиновой кислоты могут использоваться три варианта репликаз (ДНК-полимераз или РНК-полимераз):

— хозяйские, закодированные в клеточном геноме;

— вирусные, закодированные в вирусном геноме и синтезированные после его проникновения в клетку-хозяина;

— вирусные, закодированные в вирусном геноме и доставленные в клетку совместно с геномной нуклеиновой кислотой.

Вирусные белки синтезируются на двойственной основе. С одной стороны, вирус эксплуатирует хозяйский аппарат трансляции; с другой стороны, используется вирусная РНК(+) (смысловая РНК, мРНК).

Транскрипционно-репликативный цикл вируса; стратегии вирусного генома. Транскрипция и репликация вирусного генома подразделяются на три фазы — пререпликативную, репликативную и пострепликативную.

При репродукции вирусов регулируются как тип и количество синтезируемых вирусных белков, так и очередность их появления.

Сразу же после раздевания начинается транскрипция группы вирусных генов, которые называются ***самыми ранними генами*** (англ. immediate-early gene, IE). Для их активации не требуются продукты других вирусных генов, хотя они могут активироваться структурными белками вириона.

С промоторами IE-генов взаимодействуют транскрипционные факторы хозяина. Продукты IE-генов активируют ***ранние гены*** (англ. early gene), которые также используют хозяйский аппарат транскрипции. Продуктами ранних генов являются ***ранние белки*** (англ. early protein); они служат вспомогательными регуляторными факторами, которые инициируют и координируют репликацию генома вируса. После ее начала активируются ***поздние гены*** (англ. late gene), которые кодируют ***поздние белки*** (англ. late protein), необходимые для морфогенеза вириона. Подобно ранним генам, поздние гены регулируются вирусными и хозяйскими транскрипционными факторами.

Вирусная информационная РНК представляет собой продукт транскрипции геномной нуклеиновой кислоты вируса, а в случае ssРНК(+)-вирусов в этой роли выступает геномная РНК.

Участвующие в репродукции вириона транскриптазы, так же как и репликазы, могут быть хозяйскими или вирусными.

Вирусная транскрипция и репликация в первую очередь определяются типом геномной нуклеиновой кислоты.

В случае dsДНК-содержащих вирусов на минус-нити ДНК с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы синтезируется комплементарная нить РНК(+), или мРНК.

У ssРНК(–)-вирусов, или вирусов с так называемым «негативным» геномом, на геномной минус-нити РНК с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы синтезируется комплементарная нить РНК(+), или мРНК.

В случае ssРНК(+)-вирусов, или вирусов с так называемым «позитивным» геномом, геномная РНК(+) исходно колинеарна мРНК. Поэтому этап транскрипции не требуется, и геном непосредственно транслируется.

За репликацию генетического материала ДНК-содержащих вирусов в основном отвечает репликативная система клетки, которая взаимодействует с клеточными системами репарации, исправляющими ошибки копирования.

В то же время для репликации генетического материала dsРНК-содержащих вирусов и ssРНК(+)-содержащих вирусов необходимы ферменты, которые кодируются вирусным геномом, поскольку в живых клетках нет собственных РНК-зависимых РНК-полимераз. Во втором случае для окончательного получения колинеарной ssРНК(+) используется комплементарный ей репликативный интермедиат — ssРНК(–).

Для репликации генетического материала ssРНК(–)-содержащих вирусов вирион должен доставить в инфицируемую клетку вирусоспецифичную РНК-зависимую РНК-полимеразу, причем для окончательного получения колинеарной ssРНК(–) используется комплементарный ей репликативный интермедиат — ssРНК(+).

Поскольку в живых клетках отсутствуют системы, которые могут реплицировать молекулы dsРНК или ssРНК(–), соответствующие вирусы не только презентируют свои геномы, но и вынуждены для их матричного копирования предоставлять клетке собственные репликазы и транскриптазы. Дело может дойти до того, что вирусы, содержащие dsРНК, не высвобождают ее в цитозоль, и геном вируса транскрибируется и реплицируется внутри капсида.

Конкретизируя сказанное, отметим, что простейшая геномная стратегия наблюдается у dsДНК-вирусов (см. табл. 7), в частности у аденовирусов, бакуловирусов,

вируса папилломы человека, вируса простого герпеса и вируса Эпштейна—Барр. Этой простоте можно дать элементарное объяснение: геномная dsДНК вируса в целом сходна по структуре с хромосомной dsДНК, благодаря чему для ее репликации и транскрипции может использоваться ферментативный аппарат клетки-хозяина.

Матричное копирование dsДНК обычно осуществляют клеточные ферменты (ДНК-полимераза, топоизомеразы и лигазы); вирусоспецифичные белки могут играть вспомогательную роль на этапе инициации репликации. Собственная ДНК-полимераза имеется только у сложных ДНК-содержащих вирусов. Что касается транскрипции, то ее осуществляет клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза (в частности, «главная» РНК-полимераза II ядерных клеток, активность которой регулируется вирусными белками, играющими роль транскрипционных факторов).

Сложную геномную стратегию используют ssРНК(+)-вирусы (см. табл. 7), примером которых служит вирус полиомиелита. В данном случае «позитивный» геном представляет собой смысловую (кодирующую) молекулу, которая может использоваться в качестве мРНК. Линейная ssРНК — несегментированная у вирусов животных или обычно сегментированная у вирусов растений — транслируется в полипротеин. В результате его протеолитического процессинга образуются вирусные белки, в том числе РНК-зависимая РНК-полимераза. Для копирования вирусного генома на матричной нити ssРНК(+) образуется репликативный интермедиат — комплементарная ей нить ssДНК(–).

Сложную геномную стратегию также используют dsРНК-вирусы, в частности реовирусы и ротавирусы (см. табл. 7). В данном случае геномная нуклеиновая кислота представлена 10–12 моноцистронными, т. е. кодирующими по одному белку линейными сегментами. На нити ssРНК(–) таких сегментов с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы, входящей в состав вириона, синтезируются комплементарные им нити ssРНК(+). Транскрипты выполняют роль информационной РНК, а также роль репликативного интермедиата для синтеза новых молекул геномной dsРНК. С помощью вирусной гуанилилтрансферазы происходит посттранскрипционное кэпирование нитей ssРНК(+), не препятствующее их использованию в качестве матрицы. В то же время из-за отсутствия полиА-полимеразы у вируса эти транскрипты не подвергаются полиаденилированию.

Напомним, что кэпирование и полиаденилирование, наряду с редактированием транскрипта, являются механизмами посттранскрипционного процессинга мРНК.

Кэпирование (англ. cap — колпачок) заключается в присоединении к 5′-концу первичного транскрипта, через 5′–5′ трифосфатный мостик, 7-метилгуанилового нуклеотида. Кэпирование влияет на дальнейший процессинг информационной РНК, защищает ее 5′-конец от экзонуклеаз, а также дает возможность рибосомному фактору инициации трансляции узнать информационную РНК.

Полиаденилирование заключается в последовательном присоединении нескольких остатков аденилата к 3′-концу первичного транскрипта. Благодаря полиаденилированию увеличивается стабильность мРНК и повышается ее сродство к малой субъединице рибосомы.

Сложной геномной стратегией также пользуются ssРНК(–)-вирусы (см. табл. 7). Их геном может быть монолитным или сегментированным. Геномная нуклеиновая

Таблица 7. **Стратегии вирусного генома***

Репликация	Транскрипция
dsДНК-вирусы	
dsДНК → dsДНК	dsДНК → ssРНК(+) → трансляция
dsДНК-параретровирусы	
dsДНК → [ssРНК(+)] → [ssДНК(–)] → dsДНК	dsДНК → ssРНК(+) → трансляция
ssДНК-вирусы	
ssДНК → [dsДНК] → ssДНК	ssДНК → [dsДНК] → ssРНК(+) → трансляция
dsРНК-вирусы	
dsРНК → [ssРНК(+)] → dsРНК	dsРНК → ssРНК(+) → трансляция
ssРНК(+)-вирусы	
ssРНК(+) → [ssРНК(–)] → ssРНК(+)	ssРНК(+) → трансляция
ssРНК(–)-вирусы	
ssРНК(–) → [ssРНК(+)] → ssРНК(–)	ssРНК(–) → ssРНК(+) → трансляция
ssРНК(+)-ретровирусы	
ssРНК(+) → [ssДНК(–)] → [dsДНК] → ssРНК(+)	ssРНК(+) → [ssДНК(–)] → [dsДНК] → ssРНК(+) → трансляция

* В квадратных скобках приведены репликативные интермедиаты.

кислота с помощью вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (транскриптазы) транскрибируется в серию линейных моноцистронных ssРНК(+). Эти РНК полиаденилируются по 3′-концу и кэпируются по 5′-концу.

Продукты трансляции, в том числе РНК-зависимая РНК-полимераза, участвуют в репликации вирусного генома. Для этого на ssРНК(–)-матрице вначале синтезируется репликативный интермедиат — комплементарная ей нить ssРНК(+) (у вирусов с монолитным геномом) или несколько некэпированных и неполиаденилированных комплементарных ей нитей ssРНК(+) (у вирусов с сегментированным геномом). В обоих случаях репликативный интермедиат используется в качестве матрицы для синтеза геномной нуклеиновой кислоты — ssРНК(–).

Наиболее сложную геномную стратегию используют реплицирующиеся в клеточном ядре ssРНК(+)-ретровирусы и dsДНК-параретровирусы (см. табл. 7).

Ретровирусами (англ. retrovirus; от лат. retro — в обратном направлении; в *данном случае* — вирус, кодирующий обратную транскриптазу, или ревертазу) называются ssРНК(+)-вирусы, репликативными интермедиатами которых служат ssДНК и dsДНК. В качестве примеров можно назвать онкогенных ретровирусов типов B, C и D (вирус рака молочной железы мышей, вирус саркомы Рауса цыплят, вирус Мезон—Пфайзера обезьян), а также неонкогенных ретровирусов (вирус Т-клеточного лейкоза человека, спумавирусы и лентивирусы, в частности, вирусы типов I и II иммунодефицита человека).

Местом репликации ретровирусов является клеточное ядро. Поскольку в данном случае вирус не обладает собственной РНК-зависимой РНК-полимеразой, а клетка-хозяин в принципе не может иметь такого фермента, для репликации вирусного генома используется обходной маневр. По ходу транслокации вирусного генома из цитоплазмы в ядро на матрице линейной ssРНК(+) с помощью вирусной РНК/ДНК-зависимой

ДНК-полимеразы, или ***обратной транскриптазы*** (англ. reverse transcriptase; revertase), последовательно синтезируются два транскрипционных интермедиата — ssДНК(–) и dsДНК. Второй из них при помощи вирусной интегразы включается в состав хромосомной ДНК клетки-хозяина, превращаясь в ***провирус*** (англ. provirus). В таком интегрированном состоянии геном ретровируса мимикрирует под элемент генома клетки-хозяина и приобретает способность транскрибироваться клеточной РНК-полимеразой II. Продуктами транскрипции являются геномная ssРНК(+) ретровируса, а также набор мРНК, которые используются для трансляции ретровирусных белков.

В свою очередь, ***параретровирусами*** (англ. pararetrovirus; от греч. para — в стороне; в *данном случае* — подобные ретровирусам) называются dsДНК-содержащие вирусы, репликативными интермедиатами которых служат ssРНК и ssДНК. В качестве примера назовем гепаднавирусов, допустим, вируса гепатита В человека (*Hepatitis B virus*) и колимовирусов, в частности, вируса мозаики цветной капусты (***Cauliflower mosaic virus***, CMV). Из-за разрывов, имеющихся в обеих комплементарных нитях, геномная ДНК параретровируса не могла бы реплицироваться с помощью собственной ДНК-полимеразы или хозяйской ДНК-полимеразы (которая к тому же отсутствует), что заставляет использовать обходную стратегию репликации генома. В данном случае геномная dsДНК, имеющая кольцевую форму, транскрибируется при помощи клеточной РНК-полимеразы II. Часть транскриптов представляет собой мРНК, которые транслируются в вирусные белки. Наряду с такими «частичными» транскриптами синтезируется молекула «прегеномной» вирусной РНК, размер которой превышает размер геномной вирусной ДНК. Этот транскрипт играет роль мРНК (в том числе для трансляции обратной транскриптазы), а также служит репликативным интермедиатом для синтеза новых кольцевых молекул геномной dsДНК путем обратной транскрипции.

Дефектные вирусные геномы. Общая генетическая «дефектность» вирусов выражается в их неспособности репродуцироваться вне организма-хозяина.

Однако термин «дефектный вирус» используется не для глобального противопоставления неклеточной и клеточной форм жизни, а отражает генетическую неполноценность по сравнению с «недефектным» вирусом. Другими словами, имеется в виду ситуация, когда один или несколько генов, ответственных за образование полноценных вирионов, по той или иной причине теряют активность или отсутствуют.

От собственно дефектных вирусов следует отличать «условно-дефектных» мутантных вирусов (термочувствительные мутанты, мутанты по спектру хозяев и т. д.), которые проявляют свою дефектность только в непермиссивных условиях. Не относятся к разряду дефектных и «псевдовирионы» фагов (которые образуются при общей трансдукции, когда фрагмент хозяйской хромосомы полностью замещает геномную нуклеиновую кислоту).

Дефектные геномы имеются у четырех групп вирусов: 1) вирусов, интегрированных в хромосому клетки-хозяина; 2) вирусов-плазмид; 3) дефектных интерферирующих вирусов; 4) вирусов-сателлитов.

В силу очевидности двух первых ситуаций остановимся только на вирусах, зависящих от вирусов-помощников, и на вирусах-сателлитах. В обоих случаях клетка-хозяин одновременно инфицируется разными вирусами, причем размножение и/или сборка вирионов одного вируса осуществляются за счет ферментов и/или структур-

ных белков другого вируса. Вирус, компенсирующий своими генами дефектность генома другого вируса, называется ***вирусом-хелпером*** (от англ. help — помогать).

Дефектные интерферирующие вирусы (англ. defective interfering virus) размножаются с помощью гомологичного, или родственного, вируса-хелпера. Они представляют собой делеционные мутанты, утратившие от сравнительно малой части до 90% генома дикого типа. Используя в своих целях продукты генов инфекционного вируса-хелпера, такие дефектные вирусы мешают его собственной репродукции (англ. interfere — служить помехой). Дефектный вирус обычно самостоятельно кодирует структурные белки, а его конкуренция с хелпером происходит на уровне репликации.

Феномен интерференции неинфекционного, но сохранившего гемагглютинирующую активность вируса гриппа, с инфекционным вирусом впервые (1954) описал немецкий вирусолог Пребен фон Магнус (P. von Magnus).

Вирусы-сателлиты (англ. satellite virus) также паразитируют на продуктах генов вируса-хелпера и также интерферируют с ним. Однако, в отличие от дефектных интерферирующих вирусов, они не являются делеционными мутантами, и их геном зачастую не содержит участков гомологии с геномом вируса-хелпера. Вирусы-хелперы помогают вирусам-сателлитам, предоставляя им свои репликазы и транскриптазы, а также свои мРНК, в том числе мРНК структурных белков. Таким образом, вирусы-сателлиты еще в большей степени, чем дефектные интерферирующие вирусы паразитируют на других вирусах.

Растительные вирусы-сателлиты являются ярко выраженными молекулярными паразитами, и их репликация полностью зависит от вируса-хелпера. Соответственно такие сателлиты активно интерферируют с вирусом-хелпером, что видоизменяет проявление симптомов вирусного заболевания.

Классическим примером растительного вируса-сателлита служит вирус-сателлит некроза табака (***Tobacco necrosis satellite virus***, TNSV). Его геном содержит информацию для синтеза белков капсида, который отличается по морфологии от капсида вируса-хелпера.

Однако существуют и такие вирусы-сателлиты, которые не кодируют собственный капсид и поэтому используют капсомеры вируса-хелпера; их иногда называют ***сателлитной РНК*** (англ. satellite RNA). В этом случае морфология капсида вируса-сателлита повторяет морфологию вируса-хелпера, хотя по молекулярной массе они различаются.

Гены капсидного белка отсутствуют и у некоторых бактериофагов-сателлитов, в частности у ДНК-содержащего фага P4 (11,6 тыс. п.н.). Поэтому для инкапсидирования он использует капсомеры, принадлежащие другому представителю семейства *Myoviridae* — фагу P2.

1.5.5. МОРФОГЕНЕЗ ВИРИОНА И ВЫХОД ВИРУСНОГО ПОТОМСТВА ИЗ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

При размножении вируса компоненты вириона вначале копируются независимо друг от друга и только затем собираются воедино.

Как уже отмечалось, ***сборка*** (англ. assembly), или способ репродукции неклеточного живого существа путем «центростремительного» объединения частей, принци-

пиально отличается от ***деления*** (англ. fission), или способа репродукции живой клетки путем «центробежной» фрагментации особи, обладающей, как минимум, удвоенным комплектом незаменимых частей.

В результате процесса, который формально противоположен раздеванию путем декапсидирования, при морфогенезе вируса нуклеиновая кислота инкапсидируется, т.е. упаковывается в капсид. Инкапсидирование нуклеиновой кислоты — это центральный этап морфогенеза вируса. Вопреки, казалось бы, очевидному механизму, когда нуклеиновая кислота служит каркасом для сборки капсомеров, инкапсидирование чаще всего заключается в самосборке первоначально пустого капсида с его последующим заполнением нуклеиновой кислотой.

Сборка капсида. Капсид образуется путем самосборки капсомеров, или главных поздних белков (см. выше). Их качественный состав и количественное соотношение регулируются на этапе размножения вируса.

Вновь синтезированные капсомеры приобретают свою окончательную конформацию при взаимодействии с шаперонами клетки-хозяина, а также по ходу включения в состав капсида.

Важная роль при сборке капсида большинства dsДНК-содержащих бактериофагов, а также некоторых вирусов животных, в частности вируса герпеса, принадлежит ***каркасным белкам*** (англ. scaffolding protein), входящим в состав внутрикапсидного матрикса. Их молекулы имеют продолговатую форму и содержат специфический С-концевой домен, предназначенный для взаимодействия с капсомерами. Хотя каркасные белки сами по себе не образуют структуру с определенным типом симметрии, они влияют на симметричную сборку капсомеров, а также определяют окончательный размер капсида.

Сборка икосаэдрического капсида начинается с образования ***затравочного комплекса*** (англ. nucleation complex), который состоит из «вершинного» пентона, примыкающих к нему «реберных» гексонов и нескольких копий каркасных белков. В некоторых случаях гексон-гексонное взаимодействие на гранях икосаэдра стабилизируется другими белками матрикса. Квазикристаллическая решетка разрастается вширь до тех пор, пока не приобретет окончательную форму и размер.

Инкапсидирование нуклеиновой кислоты. Эффективность и специфичность ***инкапсидирования***, или ***упаковки*** (англ. package), геномной нуклеиновой кислоты определяется соотношением объема капсида и размера последней, а также характером нуклеотидной последовательности, взаимодействующей с капсидными белками.

При ***сайзспецифичном инкапсидировании*** (англ. size — размер) внутреннее пространство капсида не только предоставляется для размещения копии генома (синтезируемой непосредственно при размножении вируса или образующейся в результате расщепления ***конкатемера*** (англ. concatemer), т.е. цепочки из нескольких молекул геномной нуклеиновой кислоты), но и обладает некоторой объемной избыточностью. Благодаря этому вирионы некоторых вирусов, например РНК-содержащих вирусов растений, приобретают дополнительные сегменты генома, в частности, сателлитные РНК (см. главу 5).

При ***сайтспецифичном инкапсидировании*** (англ. site — участок) один или несколько участков нуклеотидной последовательности вирусного генома обладают

сродством к структурным белкам капсида, т. е. нуклеиновая кислота включается в состав вириона неслучайным образом. Например, капсидный белок РНК-содержащего фага MS2 распознает последовательность протяженностью 19 нуклеотидов, содержащую старт-кодон гена репликазы, что обеспечивает двойной контроль инкапсидирования и трансляции.

Сайз- и сайтспецифичное инкапсидирование сосуществуют у некоторых трансдуцирующих бактериофагов (в частности, у фага лямбда). Такие бактериофаги широко используются в качестве генетических векторов, поскольку практически любая последовательность в составе конструкции, содержащей «упаковочный» *pac*-сайт, может инкапсидироваться, если только этому не препятствует ее слишком большой размер.

Сайз- и сайтспецифичное инкапсидирование сочетаются и при общей трансдукции. Благодаря участкам гомологии с упаковочными *pac*-сайтами, а также из-за избыточного внутрикапсидного пространства взамен нуклеиновой кислоты бактериофага в капсид может включиться больший по размеру случайный фрагмент хозяйской ДНК.

Критический этап инкапсидирования — проникновение нуклеиновой кислоты в капсид — наименее изучен. В частности, не известен источник энергии, используемый при этом виде транспорта; возможно, что его природа не одинакова у разных вирусов.

Созревание безоболочных вирусов. В некоторых случаях нуклеокапсид проходит этап созревания прокапсида, что связано с конформационными изменениями капсомеров и морфологическими преобразованиями всего икосаэдра. В частности, при созревании фага P22 прокапсид вначале имеет округлый вид, а затем принимает граненую форму; зазоры между капсомерами смыкаются, в результате чего вирусный геном оказывается внутри непроницаемой защитной упаковки.

Созревание икосаэдрических вирусов, в частности аденовируса человека, связано с процессингом капсомеров с помощью вирусной протеазы, кофактором которой служит вирусная ДНК. Аналогичная протеаза, от действия которой зависит образование инфекционных вирионов с нормальной морфологией, имеется у некоторых оболочных вирусов, например у вируса HIV-1 иммунодефицита человека.

Созревание оболочных вирусов. Вирионы оболочных вирусов проходят особый этап созревания, в ходе которого нуклеокапсид окружается суперкапсидом — специфически модифицированным фрагментом мембранной системы клетки-хозяина.

Мембрана, окружающая нуклеокапсид, приобретается на позднем этапе сборки вируса в ходе морфогенетического процесса, который называется ***отпочкованием*** (англ. budding).

Механизм отпочкования заключается в том, что зрелый вирион отделяется, или ***отрывается*** (англ. pinch-off), от клеточной мембраны. Процедура отделения состоит из двух последовательных этапов — образования ***перетяжки с порой внутри*** (англ. budding pore) и ***разделения мембран*** (англ. membrane fission). Перетяжка с порой внутри представляет собой водный канал, соединяющий полость будущего суперкапсида с цитоплазмой (при этом основная хозяйская мембрана структурно непрерывна). В ходе разделения мембран билипидные слои вокруг поры вначале гибридизуются,

а потом взаимно сегрегируются. Предполагают, что разделение мембран происходит при активном участии вирусных белков.

При отпочковании нуклеокапсид не просто упаковывается в клеточную мембрану. Напротив, ее белковый состав модифицируется путем вытеснения хозяйских белков с их заменой специфическими гликопротеинами оболочки вируса.

Эти гликопротеины (одного или нескольких типов) кодируются вирусным геномом. Они имеют молекулярную массу 50–200 кДа и обычно содержат трансмембранный домен; короткий эпимембранный С- или N-концевой домен выступает в полость суперкапсида, а длинный эпимембранный домен экспонирован на его поверхности.

Напомним, что гликопротеины суперкапсида играют роль белков прикрепления (VAP) и участвуют в слиянии мембран при интернализации вируса.

Вирусные гликопротеины синтезируются на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума и подвергаются посттрансляционному гликозилированию в диктиосомах комплекса Гольджи. В отличие от них негликозилируемые вирусные белки (капсомеры и белки матрикса) синтезируются в цитоплазме, а затем связываются с цитоплазматической поверхностью «почкующейся» мембраны.

Вирус может созревать путем отпочкования либо на цитоплазматической мембране, либо на мембранах внутриклеточных органелл.

Примером вирусов, созревающих на цитоплазматической мембране, служат представители семейств *Orthomyxoviridae* и *Rhabdoviridae*. Вирион приобретает оболочку одновременно с выходом из клетки. У представителей семейства *Coronaviridae*, а также у всех членов семейства *Bunyaviridae* нуклеокапсид собирается на мембране цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума и отпочковывается в их полость. Зрелый вирион попадает внутрь транспортной везикулы и доставляется ею в цис-цистерну комплекса Гольджи. После гликозилирования белков суперкапсида вирион попадает в транс-цистерну комплекса Гольджи, доставляется секреторной везикулой к цитоплазматической мембране и окончательно покидает клетку путем экзоцитоза.

Наконец, у представителей семейства *Herpesviridae* нуклеокапсид собирается в нуклеоплазме и созревает путем отпочкования от внутренней мембраны ядерной оболочки. Через серию интрацитоплазматических мембранных цистерн и везикул генерального секреторного пути, пройдя гликозилирование в комплексе Гольджи, вирус покидает клетку с помощью экзоцитоза.

Морфогенез сложных вирионов. Сложные вирионы, например вирионы бактериофагов, собираются по частям: головки образуются независимо от хвостового отростка, базальной пластинки и т. д. Все части вириона, обладающие разным типом симметрии, окончательно объединяются перед выходом из клетки.

Выход вирусного потомства из клетки. Выход созревшего вириона из клетки происходит либо по сценарию цитолиза, либо по сценарию экзоцитоза.

Безоболочные вирусы, вирионы которых полностью собираются в цитоплазме или ядре (точнее, на внутренней мембране ядерной оболочки), как правило, используют сценарий цитолиза (рис. 15).

Таким вирусам часто достаточно одного-двух ферментов, чтобы вызвать индуцированный лизис клетки-хозяина. Например, ДНК-содержащий фаг ϕX174 кодирует бе-

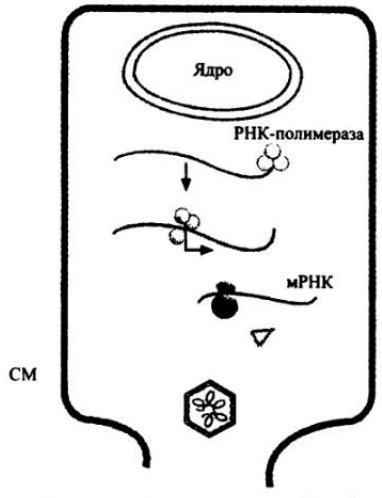


Рис. 15. Репродукция безоболочного вируса и выход вириона путем лизиса клетки-хозяина.

СМ — цитоплазматическая мембрана.

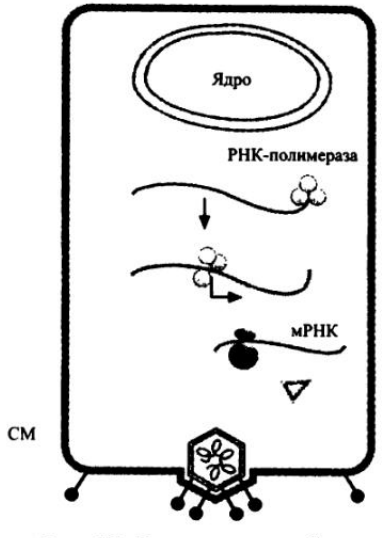


Рис. 16. Репродукция оболочного вируса и выход вириона путем отпочкования от цитоплазматической мембраны.

СМ — цитоплазматическая мембрана.

лок лизин (англ. lysin; от lysis — лизис; *не путать с аминокислотой лизином*), который блокирует транслокацию субъединиц муреина через цитоплазматическую мембрану, что приводит к нарушению структурной целостности клеточной стенки.

Крупные бактериофаги, в частности фаг T4, обладают бинарной ферментной системой, предназначенной для лизиса клетки-хозяина. Первый фермент, холин (англ. holin; от hole — отверстие; *не путать с аминоспиртом холином*), образует поры в цитоплазматической мембране; второй фермент, мурамидаза (лизоцим), фрагментирует гликановые цепи муреинового саккулуса.

В том случае, когда вирус использует сценарий лизиса клетки-хозяина, он блокирует важнейшие механизмы ее жизнедеятельности, в первую очередь репликацию, транскрипцию и трансляцию, что дезорганизует генеральный метаболизм и прекращает обновление клеточных структур. Процессы деградации, в том числе под воздействием индуцибельных протеаз, начинают преобладать над репаративными процессами. При этом в ядерных клетках разрушается мембрана лизосом, и литический комплекс вступает в губительный контакт с цитоплазмой. В конечном счете это приводит к некротическому разрушению мембранных барьеров, и вирионы оказываются на руинах клетки.

В отличие от безоболочных вирусов оболочные вирусы, как правило, используют сценарий экзоцитоза (рис. 16). При этом они выходят из клетки-хозяина не ценой лизиса, а покидают ее, не нарушая целостность цитоплазматической мембраны.

Этап выхода из клетки зрелых вирионов, при всей его важности для одних вирусов, не обязателен для других вирусов, которые могут вообще не покидать клетку-хозяина. В одних случаях они размножаются как интегрированные в хромосому или как экстрахромосомные генетические элементы, в других — могут инфицировать клетки в обход внеклеточного пространства; примером служат вирусы растений и грибов.

Наличие или отсутствие этапа выхода из клетки, а также его специфика во многом определяют разнообразие типов вирусных инфекций.

1.6. ТИПЫ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Вирусная инфекция — это процесс проникновения вируса в хозяйскую клетку, завершающийся образованием вирусного потомства.

Существуют разные алгоритмы классификации вирусных инфекций. В медицине чаще всего учитывается характер симптомов, проявляющихся на уровне макроорганизма. В фитопатологии регистрируется локальное распределение и форма поражений в вегетативных органах растения.

Однако в общем случае инфекционный процесс рассматривается на уровне клетки, и типы вирусных инфекций классифицируются в зависимости от картины завершающей стадии онтогенеза вируса.

Вирусная инфекция «с точки зрения» вируса. Стратегической задачей вируса является репликация геномной нуклеиновой кислоты; все остальное относится к области тактики. В свою очередь, эффективность репликации определяется отношением числа образовавшихся копий вирусного генома (n_2) к инфекционной дозе (n_1).

В случае, когда $n_2/n_1 >> 1$ (100–1000), инфекция является ***продуктивной***, а цикл размножения вируса — ***литическим***. Если $n_2/n_1 \cong 1$, инфекцию называют ограниченной, или ***рестриктивной***. При $n_2/n_1 < 1$ инфекция становится ***абортивной***.

Литическая инфекция связана с разрушением (лизисом) клетки и высвобождением вирусного потомства во внешнюю среду. Как уже указывалось, геном литических вирусов кодирует ферменты, разрушающие цитоплазматическую мембрану и/или клеточную стенку хозяина. Таких вирусов еще называют ***вирулентными***.

Литическая инфекция сопряжена со значительным риском для самого вируса, поскольку свободный вирион может просуществовать в интактном виде сравнительно недолго. Внешняя среда потенциально агрессивна, и вирионы дестабилизируются, теряя инфекционность по экспоненциальной кривой под влиянием таких физико-химических факторов, как: 1) высокая температура; 2) экстремальная концентрация кислот, щелочей и солей; 3) ультрафиолетовое излучение; 4) свободные радикалы; 5) катионы тяжелых металлов; 6) поверхностно-активные соединения; 7) хаотропные агенты; 8) протеолитические и липолитические ферменты.

Для тех вирусов, которым после длительного пребывания вне клетки все-таки удалось избежать повреждения, вероятность встретить нового хозяина (особенно при малой плотности его популяции) ничтожно мала. Риск потерять инфекционность компенсируется многочисленностью вирионов, которые клетка образует в результате продуктивной инфекции.

Рестриктивная инфекция связана с полной или частичной дезактивацией репликативного комплекса (который копирует вирусный геном, что, в конечном счете, приводит к литической инфекции). В такой ситуации клетки становятся ***непермиссивными*** (англ. non-permissive — не дозволяющие; в *данном случае* — препятствующие образованию вирионов), и геном вируса чаще всего интегрируется в их собственный геном. Однако возможна и такая ситуация, при которой клетки становятся частично пермиссивными, т. е. зрелые вирионы образуются лишь незначительной частью популяции хозяина. В итоге вирус сохраняется в инфицированных клетках в отсутствие

интенсивного размножения. Применительно к хозяину это выражается в том, что инфекция становится персистентной, в частности латентной (см. ниже).

Абортивный сценарий является следствием борьбы организма с вирусной инфекцией. В данном случае клетки, еще не успевшие образовать вирусное потомство, погибают, т. е. инфекция прерывается раньше времени. Существуют три основных механизма данного сценария: 1) запрограммированная самостоятельная смерть инфицированной клетки, или апоптоз; 2) умерщвление инфицированной клетки-мишени, которое осуществляют компоненты системы клеточного иммунитета — цитотоксические клетки-«киллеры» (Т-лимфоциты); 3) индукция антивирусного состояния в инфицированных клетках, опосредованная интерфероном. Более детально эти механизмы рассматриваются в разделе 1.7.

Вирусная инфекция «с точки зрения» хозяина. В клиническом аспекте можно говорить о нескольких типах вирусных инфекций — в зависимости от степени и динамики выявления вируса в организме человека или животных, а также от времени наступления первого пика болезни или ее рецидива (рис. 17).

Наиболее драматично протекают ***острые инфекции*** (англ. acute infection), примером которых служат такие заболевания, как грипп, корь, полиомиелит и натуральная оспа (рис. 17, а). Попав в организм, обычно через эпителиальную ткань, вирус размножается в первоначальной зоне инфекции, а затем распространяется с током крови или лимфы. После инкубационного периода (от 2 дней до 2–3 недель) начинается интенсивное размножение вируса с повреждением клеток и тканей, чему сопутствуют острые фебрильные (лихорадочные) симптомы на фоне мобилизации (не)специфических защитных систем хозяина. Спустя 2–3 недели после проявления первых симптомов при благоприятном ходе заболевания литическая инфекция сменяется абортивной («с точки зрения» вируса), и вирус перестает выявляться в крови и/или телесных выделениях.

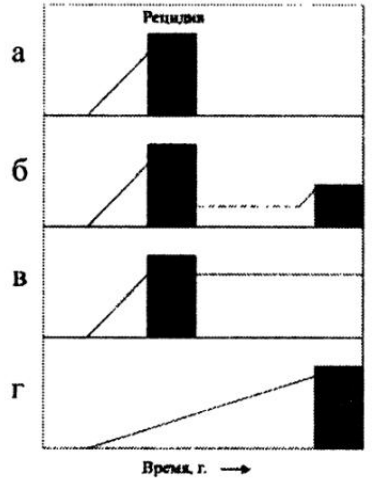


Рис. 17. Типы вирусных инфекций. Проявление на уровне организма.

а — острая инфекция; б — персистентная латентная инфекция; в — персистентная хроническая; г — персистентная медленная инфекция.

Гораздо чаще, чем острые инфекции, встречаются ***персистентные инфекции*** (англ. persistent infection; от persist — продолжать существовать). Они имеют иной характер: развиваются на протяжении более долгого периода, измеряемого месяцами (и даже годами), и более разнообразны по клиническому проявлению, а также патогенезу.

Существуют разные механизмы персистентной инфекции:

— вирусы размножаются и выходят из клетки-хозяина, не нарушая ее целостности и нормальных функций (примерами служат вирусы лейкемии птиц и мышей). Такие инфекции характерны для вирусов животных и связаны со способностью к экзоцитозу. Хотя часть метаболических ресурсов используется для размножения вируса, его цикл развития может

происходить многократно в одном хозяине. Интересно, что у некоторых бактериофагов выход вирионов также осуществляется без нарушения целостности цитоплазматической мембраны клетки-хозяина (см. главу 2);

— вирус проходит литический инфекционный цикл, однако в конкретный момент лизируется лишь часть популяции клеток хозяина;

— с большой частотой образуются дефектные вирусные частицы, которые обладают нормальными структурными белками, но лишены части генома;

— вирусные частицы могут длительно сохраняться в дифференцированных клетках, например в нейронах спинальных ганглиев в случае вируса простого герпеса;

— наконец, основным механизмом длительного носительства вируса служит интеграция вирусного генома в геном макроорганизма, наподобие вирусной лизогении у бактерий.

В клиническом плане персистентные инфекции подразделяются на ***латентные инфекции*** (англ. latent infection), ***хронические инфекции*** (англ. chronic infection) и ***медленные инфекции*** (англ. slow infection).

При латентной, или бессимптомной (замаскированной), инфекции, в частности при заболевании герпесом, гриппом, полиомиелитом, энцефаломиелитом и т. д. (рис. 17, б), после острого периода или в промежутках между рецидивами заболевания вирус с трудом выявляется или вообще не обнаруживается в крови и/или телесных выделениях.

При хронической инфекции (рис. 17, в) после острого периода болезни специфические симптомы быстро идут на убыль; затем они либо вообще не проявляются, либо связаны с иммунологическими осложнениями; при этом вирус постоянно выявляется в крови и/или телесных выделениях. В отличие от латентной инфекции уровень сопротивляемости организма при хронической инфекции снижается. В качестве примера хронической инфекции можно назвать лимфоцитарный менингит, поражающий мышей.

При медленной инфекции (рис. 17, г) изначально латентный период затягивается на месяцы и годы. Концентрация вируса в крови и/или телесных выделениях постепенно нарастает. В конечном счете развиваются острые симптомы заболевания с летальным исходом. Классическим примером служит вирус иммунодефицита человека.

1.7. ЕСТЕСТВЕННАЯ ЗАЩИТА ОТ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Между вирусами, которые в известном смысле ведут себя как хищники, и их хозяевами — жертвами, идет постоянная борьба.

Так, бактериофаги, которые по численности на порядок превышают бактерий, уничтожают 5–50% их популяции. Хотя последствия вирусной инфекции млекопитающих, в частности человека, в относительном выражении не столь масштабны (при последней пандемии гриппа погибло до 500 тыс. человек, т. е. ~0,01% популяции), они в высшей степени трагичны.

И бактерии, и млекопитающие (равно как и все другие организмы) активно противостоят вирусной инфекции благодаря наследственному или приобретенному иммунитету. У людей он дополняется искусственной защитой, в частности лекарственной терапией.

Вирусы разнообразнее своих хозяев по строению генома и чаще мутируют, лидируя в процессе коэволюции. Чтобы противостоять тотальному уничтожению, хозяева приобрели и постоянно совершенствуют множественные системы антивирусной защиты.

В частности, у бактерий на первый план выходит борьба с адсорбцией вируса путем удаления или маскировки части фаговых рецепторов (сделать клетки универсально иммунными в принципе невозможно, поскольку они не могут существовать без рецепторных структур, которые в норме выполняют жизненно важные функции). В некоторых случаях задействуется вторая линия защиты — и блокируется инъекция фаговой ДНК. На третьем рубеже, в цитоплазме, фаговая ДНК подвергается воздействию со стороны системы рестрикции/модификации хозяина. Если дело все же доходит до репродукции фага, мобилизуются системы, препятствующие репликации и упаковке фагового генома. Хотя при этом клетка часто погибает, защищая остальных членов популяции хозяина, инфекция становится абортивной.

Системы естественной антивирусной защиты разнообразны. Наличие наследуемых или адаптивных иммунных систем, направленных против экзогенных нуклеиновых кислот (фаговой, плазмидной или транспозонной природы), определяется эволюционной историей организма.

У прокариотов (бактерий и архей) антивирусный иммунитет в первую очередь обеспечивают система рестрикции/модификации и система CRISPR/*cas*. У растений аналогичную роль выполняет система сайленсинга РНК.

Распространению инфекции у животных препятствует индуцированный вирусом апоптоз, а также система интерферона.

Механизмы антивирусного иммунитета у протистов, грибов и водорослей пока неизвестны, что объясняется слабой изученностью соответствующих групп вирусов.

1.7.1. СИСТЕМА РЕСТРИКЦИИ/МОДИФИКАЦИИ

Хотя данный способ защиты от вирусной инфекции используют бактерии в отношении ДНК-содержащих бактериофагов, он служит частным проявлением общебиологической стратегии — защиты от чужеродной генетической информации, чтобы не допустить пагубных изменений регуляторного, метаболического и репродукционного характера.

Смысл рестрикции заключается в том, чтобы путем ферментативного расщепления обезвредить чужеродную ДНК; смысл модификации — в том, чтобы придать собственной ДНК устойчивость к рестрикции.

Феномен ***рестрикции*** (англ. restrict — ограничивать) открыли в 1952 г. американские генетики Сальвадоре Луриа (S. E. Luria) и Мэри Хьюмен (M. L. Human); они установили, что бактериофаги слабо размножаются на одних штаммах бактерий (как будто им что-то мешает), и беспрепятственно на других. Спустя десять лет швейцарский вирусолог Вернер Арбер (W. Arber; Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1978 г.) выяснил, что в основе феномена рестрикции лежит фрагментация вирусной ДНК под воздействием сайтспецифичных эндонуклеаз клетки-хозяина. Одновременно выяснилось, что рестрикция не является неизбежной; к ней можно приобрести

устойчивость посредством ***модификации*** (англ. modification) — специфического метилирования нуклеотидов в сайтах рестрикции.

Ферменты рестрикции, или ***рестриктазы*** (англ. restrictase), подавляют репродукцию бактериофагов с немодифицированной ДНК; напротив, при отсутствии этих ферментов или при наличии собственной системы модификации вирусы свободно размножаются. Модификация, приобретенная от хозяина, бактериофагом не наследуется и воспроизводится только при размножении на штаммах бактерий, обладающих полноценной системой рестрикции/модификации.

Системы ***рестрикции/модификации*** (англ. restriction/modification; R/M) представляют собой бифункциональные комплексы, проявляющие «противоположно направленные» ферментативные активности. Одна из них — эндо-ДНКазная, или рестриктазная, другая — ДНК-метилазная (точнее, ДНК-метилтрансферазная). Субстратом для рестриктазы служит чужеродная ДНК, которая расщепляется на крупные фрагменты; субстратом для метилазы (англ. methylase) является ДНК хозяина, которая в результате модификации приобретает устойчивость к собственным рестриктазам.

Ферменты в составе конкретной системы рестрикции/модификации обладают одинаковой сайтспецифичностью, т.е. они распознают один и тот же участок dsДНК, реже — ssДНК. Процесс распознавания вызывает конформационные изменения и ферментов, и ДНК, что активизирует каталитические центры. Сайты распознавания обычно имеют длину 4–8 п.н.; они могут быть сплошными или прерывистыми, симметричными или асимметричными, уникальными или вырожденными. Обе активности — рестриктазную и метилазную — может проявлять один и тот же бифункциональный мультисубъединичный фермент, однако чаще всего это два разных фермента.

«Парные» (англ. cognate — из одного источника) рестриктазы и метилазы не гомологичны друг другу. Более того, эндонуклеазы одного и того же типа и даже рестриктазы-изошизомеры (см. ниже) зачастую не являются взаимными гомологами. Метилазы, напротив, взаимно гомологичны.

Рестриктазы. Рестриктаза производит ds-разрезы ДНК. Однако она не может сделать это, если нуклеотиды в сайте узнавания подверглись пострепликативной модификации путем метилирования с помощью метилтрансферазы.

ДНК в обладающих R/M-системой клетках специфически модифицирована по сайтам узнавания собственных рестриктаз, что предотвращает ее «самоубийственное» эндонуклеазное расщепление. Напротив, чужая (принадлежащая бактериофагу или конъюгативной плазмиде) немодифицированная dsДНК становится субстратом рестрикции. В то же время R/M-системы, как правило, не воздействуют при генетической трансформации на экзогенную ДНК, которая переходит из ds-формы в ss-форму и в таком виде может беспрепятственно рекомбинировать с хозяйской хромосомой.

Рестриктаза (эндо-ДНКаза) производит только один ds-разрез, так что в каждой нити сайта рестрикции без затраты энергии гидролизуется по одной сахарофосфатной связи. При разрезании образуются концевые 5′-фосфатные и 3′-OH группы. Сайт рестрикции находится либо внутри сайта узнавания, либо поблизости от него. Гораздо реже они взаимно дистанцированы; при этом положение сайта рестрикции строго не задано.

Кофактором известных в настоящее время рестриктаз является Mg^{2+} или другой дивалентный катион; дополнительными кофакторами (*не путать с расходуемыми субстратами*) могут служить АТФ и S-аденозил-L-метионин.

Метилазы. «Модифицирующая» ДНК-метилтрансфераза присоединяет метильную группу к двум одинаковым нуклеотидам, расположенным в комплементарных нитях ДНК внутри сайта узнавания. Универсальным донором метильной группы служит S-аденозил-L-метионин (англ. S-adenosyl-L-methionine, SAM), превращающийся в S-аденозил-L-гомоцистеин (англ. S-adenosyl-L-homocysteine, SAH). Помимо выполнения функции субстрата он служит аллостерическим эффектором при связывании с сайтом узнавания как метилаз, так и рестриктаз типов I или III (см. ниже).

Мишенью для метилаз служат аденин (A) и цитозин (C), которые превращаются, соответственно, в N^6-метиладенин и N^4-метилцитозин или 5-метилцитозин. Метилазы типов I и III метилируют только аденин с образованием N^6-метиладенина, в то время как метилазы типов II и IIS могут метилировать цитозин с образованием N^4-метилцитозина или 5-метилцитозина, а также аденин с образованием N^6-метиладенина.

Метилирование не мешает каноническому спариванию азотистых оснований; поскольку метильные группы размещаются в большой борозде двойной спирали. В то же время метилирование нарушает стерическое соответствие между рестриктазой и сахарофосфатным скелетом ДНК, препятствуя работе этого фермента.

Таким образом, хотя метилированные основания можно формально рассматривать в качестве дополнительной 5-, 6- и 7-й букв генетического алфавита, паттерн метилирования не закодирован с помощью триплетов ДНК (пример эпигенетического наследования).

В то время как метилирование C в дуплетах GC у эукариотов обеспечивает распределение метильных групп вдоль молекулы ДНК и служит основным средством контроля экспрессии генов, у бактерий метилирование A с помощью метилтрансферазы Dam (сокр. англ. **D**NA **a**denine **m**ethylase) способствует распознаванию своей и чужой ДНК.

R/M-системы. Распространение R/M-систем ограничено миром прокариотов, главным образом бактериями. Аналогичные системы существуют у архей (например, *Mwo*I — система типа II *Methanobacterium wolfei*), хотя они более редки и изучены намного хуже, чем у бактерий. «Автометилирующие» метилтрансферазы типа II (см. ниже) закодированы в геномах ряда вирулентных и умеренных бактериофагов, а также, в виде исключения, представлены у вирулентных вирусов *Chlorella* sp. Но даже в случае бактерий они выявлены только у 25% изученных штаммов, что может объясняться упущениями при анализе. Зато половина этих штаммов обладает сразу несколькими R/M-системами. Селективная выгода, которую дают бактериям разные R/M-системы, обусловливает их широкое распространение и разнообразие (>3 тыс. вариантов).

В настоящее время описано несколько типов R/M-систем, которые выполняют одну и ту же биологическую функцию, но разными способами. Их особенности касаются субъединичного состава, используемых кофакторов, а также структуры сайта узнавания и местоположения сайта рестрикции (табл. 8).

Таблица 8. **Свойства бактериальных R/M-систем**

Тип системы	Соотношение реакций рестрикции и модификации; состав ферментов	Сайт узнавания	Положение сайта рестрикции	Кофакторы реакции рестрикции
I	Альтернативные реакции; осуществляются бифункциональным ферментом из трех субъединиц	Специфические последовательности (3 и 4 п.н.), разделенные спейсером (6–8 п.н.)	На большом расстоянии (≥1 тыс. п.н.) от сайта узнавания	Mg^{2+}
II и IIS	Параллельно протекающие реакции; катализируются разными ферментами; рестриктаза из двух субъединиц (тип II) или одной субъединицы (тип IIS), метилтрансфераза — из одной субъединицы	Специфическая последовательность, в большинстве случаев палиндром (4–8 п.н.)	Совпадает с сайтом узнавания (тип II) или по одну сторону от него на расстоянии 1–20 п.н. (тип IIS)	Mg^{2+}
III	Параллельные реакции; катализируются бифункциональным ферментом из двух субъединиц	Специфическая асимметричная последовательность (5–6 п.н.)	На расстоянии 24–26 п.н. от 3′-конца сайта узнавания	Mg^{2+}

* S-аденозил-L-метионин.

Для обозначения R/M-систем используются трехбуквенные сокращения названия их обладателя; первая буква обозначает род, вторая и третья вид; иногда за ними следует индекс штамма, а римская цифра указывает на тип системы (например, *Eco*RII — это R/M-система *E. coli* штамма R, тип II).

Гены, кодирующие компоненты R/M-систем, обозначаются либо как *hsd* (сокр. от англ. host-specifity of DNA), либо по конкретной субъединице, например, *mod* (сокр. от англ. modification). Они входят в состав хромосомного генома (например, в случае системы *Eco*A), плазмидного генома (например, в случае системы *Eco*RI) или вирусного генома (например, в случае системы *Eco*P1) и часто сцеплены.

R/M-системы типа I. Системы данного типа имеются у энтеробактерий *Citrobacter* sp., *E. coli* и *Salmonella* sp. Они наиболее сложны и состоят из трех субъединиц: R (135 кДа; ген *hsdR*) — рестрицирующей; M (62 кДа; ген *hsdM*) — модифицирующей и S (55 кДа; ген *hsdS*) — обеспечивающей специфическое распознавание сайта метилирования. Комплекс субъединиц, представленных в разном стехиометрическом соотношении (например, 2:2:1 в случае *Eco*K), является мультифункциональным ферментом, играющим роль рестриктазы, метилазы, АТФазы и ДНК-топоизомеразы.

В присутствии SAM субъединица R связывается с сайтом узнавания независимо от того, метилирован он или нет. Если сайт узнавания был полностью метилирован, голофермент диссоциирует от ДНК; если он был полуметилирован, субъединица M метилирует вторую нить; если он не был метилирован, голофермент выступает в роли топоизомеразы и, благодаря принудительному изгибу ДНК, наносит разрез в разном положении на значительном удалении от сайта узнавания. Первые две реакции стимулируются связыванием АТФ, а третья использует энергию гидролиза АТФ.

R/M-системы типа II. Они самые распространенные; вместе с изошизомерами их насчитывается до 3000. Напомним, что ***изошизомерами*** (англ. isoschizomer; от греч. isos — равный, schizo — раскалывать и meros — часть) называются рестриктазы у разных объектов, которые разрезают в одном и том же месте одинаковую последовательность (например, для рестриктаз *Bam*HI и *Pae*177I это последовательность G↑GATCC). Они проще других, поскольку два фермента по отдельности катализируют рестриктазную и метилазную реакции.

Главный признак R/M-системы типа II — это то, что рестриктаза наносит разрез в пределах сайта узнавания или близко к нему; кроме того, для нуклеолитической реакции не требуется гидролиз АТФ. Рестриктаза представляет собой гомодимер субъединиц молекулярной массой ~30 кДа.

Сайт узнавания обычно палиндромный, со сплошной структурой, например GAATTC, или с прерывистой структурой, например GANTC или $CCAN_9TGG$ (где N — один из четырех канонических нуклеотидов). Встречаются уникальные сайты узнавания, например GTCGAC, и вырожденные сайты, например GTYRAC (где Y — C или T, а R — A или G).

Рестриктазы типа II наносят разрез внутри комплементарных последовательностей сайта узнавания; классическим примером служит рестриктаза *Escherichia coli* R *Eco*RI:

5′G↓AATTC
CTTAA↑G5′.

Поскольку сайт рестрикции представляет собой палиндром, в ds-ДНК делаются симметричные разрезы с образованием коротких одноцепочных липких концов (в приведенном примере это AATT). Такое замечательное свойство продуктов рестрикции широко используется в молекулярной биологии при конструировании гибридных ДНК.

R/M-систем подтипа IIS насчитывается на порядок меньше, чем R/M-систем типа II. Они распознают асимметричную сплошную последовательность длиной 4–7 п.н. и наносят разрез по одну сторону от сайта узнавания, обычно на фиксированном расстоянии 1–20 п.н. от него. Примером служит рестриктаза *Flavobacterium okeanokoites Fok*I:

5′GGATGNNNNNNNNN↓NNNN–NN…
CCTACNNNNNNNNN–NNNN↑NN…5′.

Иными словами, рестриктазы подтипа IIS содержат домен сродства к сайту узнавания, и домен, отвечающий за распознавание сайта рестрикции (в этом отношении они сходны с рестриктазами класса III; см. ниже).

В отличие от канонических R/M-систем типа II, в системах подтипа IIS 5′–3′-последовательности в комплементарных нитях сайта узнавания различаются (в приведенном примере это GGATG и CATCC), т. е. он имеет асимметричную структуру.

Наконец, в отличие от димерных рестриктаз типа II, рестриктазы подтипа IIS представляют собой мономеры молекулярной массой 50–110 кДа.

Помимо канонической R/M-системы типа II и R/M-системы подтипа IIS, в настоящее время описаны R/M-системы подтипов IIB, IIE, IIF, IIG, IIM и IIT. Они имеют разный субъединичный состав и различаются по количеству, а также местоположению сайтов рестрикции.

R/M-системы типа III. Они встречаются гораздо реже остальных и обнаружены только в четырех случаях — у профага P1 (*Eco*P1), у плазмиды P15 *E. coli* (*Eco*P15), а также у бактерий *Haemophilus influenzae* серотип f (*Hin*fIII) и *Salmonella enterica* штамм LT (*Sty*LTI). Все они состоят из двух субъединиц: рестрицирующей R (~110 кДа; ген *hsdR* или *res*) и MS (~75 кДа; ген *hsdMS* или *mod*) с двойной функцией узнавания и модифицирования.

Уникальным свойством данных R/M-систем является то, что при модификации метилируется только одна нить ДНК. Но поскольку при репликации метилирование сохраняется только в одной сестринской молекуле ДНК, встает вопрос, что позволяет другой, полностью неметилированной молекуле ДНК избежать рестрикции? Предполагается, что в данном случае для рестрикции требуются два модифицированных сайта противоположной ориентации. В свою очередь, два сайта прямой ориентации устойчивы к рестрикции, но могут модифицироваться. А поскольку после репликации немодифицированные сайты оказываются в прямой ориентации, они не рестрицируются.

Рестрикция, требующая модификации. До сих пор речь шла только о рестрикции, которая блокируется метилированием. В настоящее время установлено, что к рестрикционным системам относятся:

— классические R/M-системы типов I–III (клеточная ДНК защищается от рестрикции путем модификационного метилирования по A и C, расположенным внутри сайта узнавания);

— неклассические R/M-системы (которые расщепляют только специфически модифицированную ДНК).

Примером неклассических R/M-систем служат имеющиеся у *E. coli* системы McrA и McrBC (сокр. англ. **m**odified **c**ytosine **r**estriction), а также система Mrr (сокр. англ. **m**odified adenine **r**ecognition and **r**estriction). Они кодируются плазмидами и разрезают сайты фаговой ДНК, содержащие 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, N^4-метилцитозин или N^6-метиладенин. Такие системы используют в качестве кофакторов катионы Mg^{2+}, а также ГТФ (в случае McrBC) и не обладают модифицирующей активностью. Предполагается, что неклассические R/M-системы служат для целенаправленной борьбы с теми бактериофагами, ДНК которых содержит модифицированные основания. Иными словами, клетке выгоднее иметь упрощенную систему рестрикции, чем расходовать метаболические ресурсы на биогенез более громоздких классических R/M-систем.

Хотя R/M-системы высоко эффективны, они не гарантируют абсолютную защиту; в ходе коэволюции со своими хозяевами бактериофаги «научились» преодолевать их действие.

1.7.2. СИСТЕМА CRISPR/*CAS*

В последние годы огромное внимание привлечено к механизму приобретенного антивирусного иммунитета, которым обладают бактерии и археи, и который основан на использовании системы CRISPR/*cas* и аналогичной, но менее изученной системы CRISPR/*cmr*.

Локус CRISPR и его окружение. В 1987 г. при компьютерном анализе генома *E. coli* группа японских исследователей во главе с Йошицуми Ишино (Y. Ishino) обнаружила специфический хромосомный локус, позднее получивший название CRISPR (сокр. англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats).

В настоящее время он выявлен в составе 40% секвенированных геномов бактерий и 90% секвенированных геномов архей. Обычно в геноме имеется единственный локус CRISPR, хотя их может быть несколько (до двух десятков).

Локус CRISPR (рис. 18) состоит из коротких прямых повторов, разделенных спейсерами. Число элементов повтор/спейсер, приходящихся на отдельный локус, составляет от одного до ~400 (в среднем 25).

Повторы конкретного локуса имеют практически стандартную длину (у разных видов она варьирует в пределах 21–47 п.н.) и одинаковые нуклеотидные последовательности. Хотя у родственных видов могут быть сходные повторы, в целом и они, и спейсеры чрезвычайно разнообразны. Большинство повторов содержит палиндромные последовательности, на основе которых могут образовываться структуры типа шпилек.

Спейсеры конкретного локуса также имеют стандартную длину (у разных видов она составляет 20–72 п.н.), однако сильно различаются по нуклеотидным последовательностям.

К одной из сторон локуса CRISPR примыкает некодирующая «лидерная» последовательность (англ. leader sequence; несколько сотен пар нуклеотидов). Как и сами повторы, она на 80% идентична у локусов одного генома, но различается у разных видов.

Бактериальный локус CRISPR окружен консервативными белок-кодирующими генами *cas1–7* (сокр. англ. CRISPR-associated gene). Они различаются порядком расположения и направлением считывания, и не весь их набор обязательно ассоциирован с конкретным локусом.

Наряду с генами *cas* или вместо них с локусом CRISPR могут быть ассоциированы гены *cmr1–6* (сокр. англ. CRISPR-mysterious), или RAMP (сокр. англ. repeat-associated mysterious proteins). Эти гены расположены либо вплотную к повторам, либо на некотором удалении от них. Они образуют «RAMP-модуль» (англ. RAMP module), или «полимеразную кассету» (англ. polymerase cassette), и чаще встречаются у архей, чем у бактерий.

Функциональная роль системы CRISPR/*cas*. В результате компьютерного анализа было установлено, что последовательности спейсеров не имеют хромосомных гомологов за пределами локусов, однако сходны с участками внехромосомных элементов — фагов и плазмид. При этом оказалось, что виды, имеющие спейсер, устойчивы (иммунны) к инфекционному бактериофагу, но не содержат соответствующего профага, что говорило бы о ранее перенесенной инфекции. В то же время виды без спейсера иммунитетом не обладали. Отсюда следовало, что локус CRISPR обеспечи-

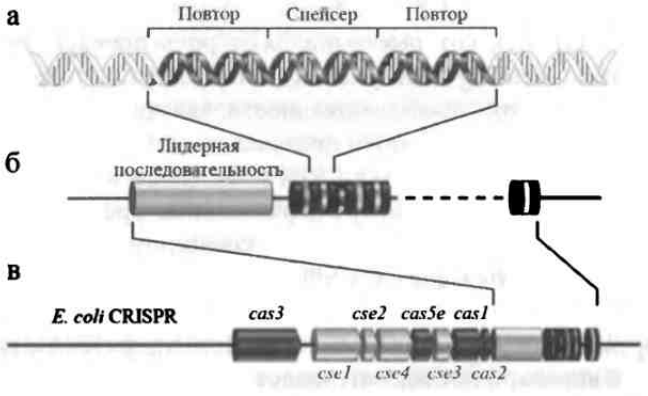


Рис. 18. Локус CRISPR (по: Karginov, Hannon, 2010).

а — повторы (32 п.н.), чередующиеся со спейсерами; б — лидерная последовательность на одной стороне кластера, состоящего из вариабельного числа блоков повтор/спейсер/повтор; в — гены *E. coli*, ассоциированные с локусом CRISPR.

вает защиту от чужеродных генетических элементов и что избирательность действия этой иммунной системе придает структура спейсеров.

Согласно консенсусной модели для приобретения устойчивости к конкретному бактериофагу в состав локуса CRISPR должен быть включен новый специфический спейсер. Источником этого спейсера служит сам бактериофаг. Набор старых спейсеров является рудиментом защиты от предыдущих инфекций; дистальный конец локуса содержит более «старые» спейсеры, в то время как «новые» спейсеры накапливаются на проксимальном конце рядом с «лидерной» последовательностью.

Поскольку в отсутствие «лидерной» последовательности локусы CRISPR не способны включать новые спейсеры, очевиден вывод, что она играет ведущую роль в эволюции, полярном росте и функции этой системы приобретенного иммунитета.

Как клетка-хозяин распознает чужеродный генетический элемент на основе его сходства со спейсером? Каким образом этот спейсер был ею приобретен? Каков молекулярный механизм антивирусного иммунитета, основанного на системе CRISPR/*cas*?

Механизм действия системы CRISPR/*cas*. По современным представлениям, клетка-хозяин «крадет» протоспейсер (англ. protospacer) из геномной ДНК бактериофага и в качестве спейсера включает ее в локус CRISPR. При этом последовательность протоспейсера выбирается из генома бактериофага не случайно, а путем узнавания «мотива, примыкающего к протоспейсеру» (англ. **p**rotospacer **a**djacent **m**otif, PAM), расположенного в downstream-положении от протоспейсера и имеющего консенсусную структуру NNAGAAW (W обозначает A или T(U), N — одно из четырех нуклеотидных оснований).

Неизвестно, каким образом информация передается от бактериофага системе CRISPR/*cas*, как узнается PAM, как «крадется» протоспейсер, и как он интегрируется. Имеются отдельные намеки на то, что роль нуклеазы/геликазы/интегразы играет продукт гена *cas1*.

В фазе процессинга локус CRISPR транскрибируется с образованием молекул CRISPR-РНК (англ. crRNA), которые выполняют роль прокариотных сайленсинг-РНК (англ. **p**rokaryotic **si**lencing **RNA**, psiRNA) (см. раздел 1.7.3). Транскрипция начинается на участке «лидерной» последовательности, действующей как промотор, или вблизи нее, в результате чего образуется предшественник пре-сайленсинг-РНК, равный по длине полноразмерному локусу CRISPR. Затем первичный транскрипт подвергается эндонуклеазному процессингу с образованием фрагментов, длина которых соответствует двум повторам с промежуточным спейсером. Процессинг осуществляется комплексом Cascade (сокр. англ. **C**RISPR-**as**sociated **c**omplex for **a**ntiviral **de**fence), состоящим из генов *cse1*, *cse2*, *cse4*, *cas5e* и *cse3*. На окончательном этапе процессинга образуется зрелая молекула сайленсинг-РНК (crRNA/psiRNA), которая состоит из 8-нуклеотидной концевой последовательности (англ. tag — конец), оставшейся от реплики повтора, и реплики спейсера.

В эффекторной фазе зрелая молекула сайленсинг-РНК загружается на комплекс неидентифицированных эндонуклеазных белков (продуктов *cas*-генов). Благодаря тому, что она комплементарна участку проспейсера и мотиву PAM, осуществляется эффективный таргетинг этого комплекса, и происходит расщепление фаговой ДНК.

В то время как иммунная система CRISPR/*cas* распознает и расщепляет фаговую ДНК, система CRISPR/*cmr* выполняет аналогичную роль в отношении РНК-содержащих бактериофагов.

Избегание бактериофагом действия системы CRISPR/*cas*. Наиболее эффективный способ защиты — это мутация в участке протоспейсера или в области мотива PAM.

В заключение раздела отметим, что система CRISPR/*cas*, обеспечивающая приобретенный иммунитет и обладающая «памятью», парадоксально укладывается в эволюционную парадигму Жана Батиста Ламарка.

Действительно, в данном случае приспособляемость достигается не за счет случайных мутаций, а в результате ассимиляции специфической генетической информации из окружающей среды («кража» фрагмента нуклеиновой кислоты у потенциального патогена и включение его в программируемый сайленсинг-локус).

Этот процесс очень динамичен и способствует адаптивной эволюции и паразита (на которого оказывается сильное селективное давление), и хозяина (у которого на нее накладывается «вторичная» вертикальная и горизонтальная передача признака устойчивости).

По ряду важнейших признаков (реакция на чужеродный генетический элемент, процессинг РНК с образованием малых фрагментов и связывание этих фрагментов с нуклеазами) система CRISPR/*cas* сходна с эукариотной системой РНК-интерференции, обеспечивающей РНК-сайленсинг (см. раздел 1.7.3).

1.7.3. РНК-САЙЛЕНСИНГ

РНК-сайленсинг (англ. RNA silencing; от англ. silencing — принуждение к молчанию, затыкание рта) играет главную роль в индуцибельной защите клеток растений от паразитического проникновения чужеродных генов, в частности вирусных. Этот регуляторный процесс приводит к подавлению экспрессии вирусных генов и основан

на системе РНК-интерференции с участием малых некодирующих РНК — продукта нуклеолитического процессинга dsРНК (см. ниже).

В норме РНК-интерференция обеспечивает широкий круг явлений, связанных с регуляцией активности резидентных генов. Экспериментальное доказательство того, что субстратом интерференции служит dsРНК, было впервые получено в 1998 г. английским генетиком Эндрью Файром (A. Fire) и американо-португальским генетиком Крейгом Мелло (C. Mello) (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 2006 г.). Они установили, что инъекция нематоде *Caenorhabditis elegans* только мРНК или только антисмысловой РНК не блокирует экспрессию гена-мишени, однако эффект достигается при введении dsРНК.

Система РНК-интерференции имеется у большинства эукариотов; она отсутствует только у некоторых протистов, аскомицетов и базидиомицетов, видимо, в результате вторичной потери.

РНК-сайленсинг (общие сведения). Появляясь в цитоплазме эукариотной клетки эндогенная или экзогенная dsРНК расщепляется на ***малые РНК, или sРНК*** (англ. small **RNA**, sRNA), — короткие фрагменты длиной 21–24 п.н., на 3′-концах обеих нитей которых имеются 2-нуклеотидные «навесы».

Эндонуклеазное расщепление осуществляется с помощью ***дайсер-фермента*** (англ. Dicer enzyme; от англ. dice — нарезать кубиками), который относится к молекулярному семейству РНКазы III. РНК-связывающий эффекторный белок RDE-4 или R2D2 доставляет одну из нитей малой РНК к комплексу RISC (сокр. англ. **R**NA-**i**nduced **s**ilencing **c**omplex), который обеспечивает ее взаимодействие с комплементарной последовательностью РНК или ДНК.

Результатом такого взаимодействия становится изменение активности генов, или ***РНК-интерференция*** (RNA-interference, RNAi; от англ. interference — вмешательство, препятствие).

Таким образом, РНК-сайленсинг — это комплекс процессов, при которых dsРНК вызывает РНК-интерференцию. РНК-сайленсинг может осуществляться как на уровне РНК, так и на уровне ДНК. В первом случае нарушается стабильность транскрипта или подавляется трансляция (посттранскрипционный сайленсинг; англ. **p**ost-**t**ranscriptional **g**ene **s**ilencing, PTGS); во втором случае происходит эпигенетическая модификация ДНК (транскрипционный сайленсинг; англ. **t**ranscriptional **g**ene **s**ilencing, TGS; **R**NA-induced **t**ranscriptional **s**ilencing, RITS).

Малые РНК, которые могут быть как эндогенного, так и экзогенного происхождения, подразделяются на две группы — ***малые интерферирующие РНК, или siРНК*** (англ. small **i**nterfering **RNA**, siRNA), и ***микро-РНК, или miРНК*** (англ. **mi**cro**RNA**, miRNA). Они различаются способом образования и спецификой механизма интерференции, хотя используются одним и тем же комплексом RISC.

Посттранскрипционный сайленсинг (PTGS); малые интерферирующие РНК. Малые интерферирующие РНК являются продуктом процессинга длинных, полностью спаренных молекул dsРНК (рис. 19).

По своему происхождению это: 1) репликативные интермедиаты РНК-содержащих вирусов; 2) продукты двунаправленной транскрипции повторяющихся последовательностей хромосомной ДНК или повторяющихся последовательностей

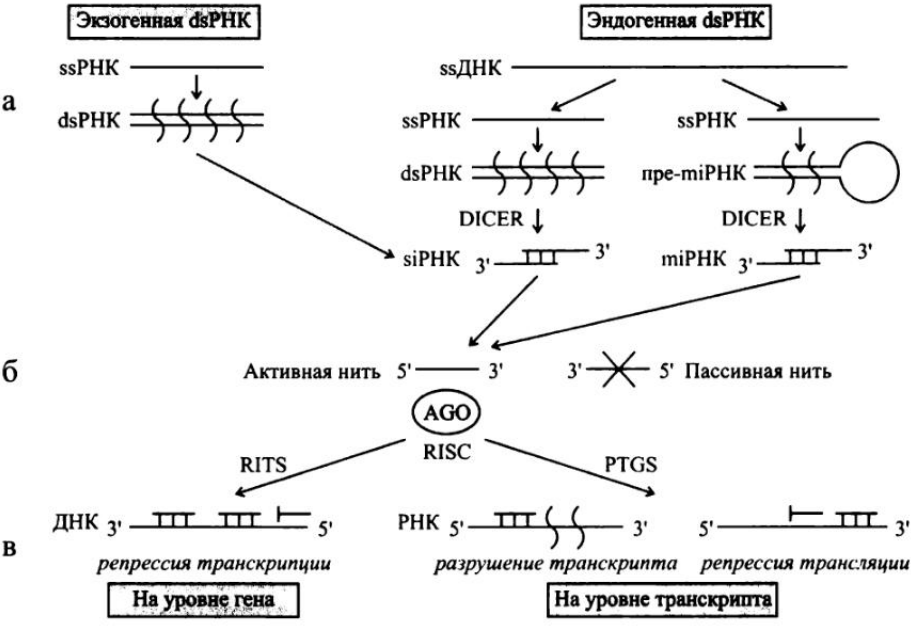


Рис. 19. РНК-сайленсинг.

а — образование малых интерферирующих РНК; б — загрузка активной нити на белок AGO; в — РНК-интерференция.

Объяснение в тексте.

транспозонов; 3) продукты РНК-зависимых РНК-полимераз, которые синтезируют комплементарные нити клеточных РНК; 4) продукты комплементарного объединения резидентных транскриптов и трансгенных транскриптов.

После нарезания дайсер-ферментом дуплексы siРНК метилируются по 2-нуклеотидным «навесам» с помощью метилтрансферазы HEN1 (сокр. англ. **h**ua **en**hancer; *мутации по гену hua, что по-китайски значит «цветок», замедляют цветение арабидопсиса*). Смысл данной модификации заключается в том, чтобы предохранить малые РНК от полиуридилирования и разрушения нуклеазами.

Затем ds-siРНК расплетается на одиночные нити — «активную» (англ. guide strand) и «пассивную» (англ. passenger strand); у первой из них 5′-конец слабее спарен с комплементарной нитью и менее стабилен. «Пассивная» нить разрушается, а «активная» нить связывается с ферментативным компонентом комплекса RISC — цитоплазматическим белком AGO1 (сокр. англ. **argo**naute — аргонавт; *название происходит от фенотипа «argonaute» мутантов Arabidopsis thaliana, которые по форме напоминают осьминога Argonauta* sp.).

С помощью еще не выясненного механизма комплекс RISC доставляет «активную» нить к комплементарной ей последовательности мРНК. После образования дуплекса белок AGO1, обладающий слайсерной активностью (от англ. slice — нарезать ломтиками), осуществляет эндонуклеазное расщепление мРНК.

В альтернативном варианте siРНК доставляется к последовательности-мишени, чтобы выступить в качестве негативного регулятора (репрессора) трансляции.

Посттранскрипционный сайленсинг (PTGS); микро-РНК. Первая микро-РНК была обнаружена у нематоды *C. elegans* в 1993 г.; в настоящее время множество таких малых РНК описано у растений (у одного только *Arabidopsis thaliana* их несколько сотен, и все они уникальны) и животных.

Микро-РНК являются продуктом процессинга пре-miРНК — одноцепочных транскриптов хромосомных генов MIR (сокр. англ. **mi**cro **i**nterfering **R**NA). Такие транскрипты содержат внутренние взаимно комплементарные участки, благодаря чему образуется вторичная структура в виде частично спаренного стебелька (англ. stem) и петли (англ. loop).

У *A. thaliana* первичный транскрипт miРНК вначале разрезается дайсер-ферментом DCL1 на относительно короткие (70–200 н.) пре-miРНК. Затем с помощью DCL1 из stem-loop структуры вырезается дуплекс miРНК, имеющий 2-нуклеотидные 3′-«навесы», которые, как и в случае siРНК, метилируются метилтрансферазой HEN1.

Зрелый дуплекс miРНК транспортируется из ядра в цитоплазму с помощью аналога экспортина 5 — белка HST (сокр. англ. **hasty**; *ген дрозофилы*).

В цитоплазме дуплекс miРНК расплетается, и «активная» нить загружается на белок AGO1 комплекса RISC. У растений комплекс RISC (miРНК с высокой степенью комплементарности к мРНК) преимущественно осуществляет эндонуклеазное разрушение транскрипта, тогда как у животных (miРНК с низкой степенью комплементарности к мРНК) он главным образом связывается с нетранслируемым 3′-концом мРНК (англ. untranslated region, UTR) и репрессирует трансляцию.

Транскрипционный сайленсинг (TGS, RITS). Помимо регуляции трансляции компоненты системы РНК-интерференции могут подавлять экспрессию генов на уровне ДНК, т. е. осуществлять РНК-индуцированный транскрипционный сайленсинг.

Механизм этого процесса до конца не выяснен. Предполагается, что он носит эпигенетический характер и заключается в метилировании промоторных участков ДНК, а также метилировании гистонов (с образованием транскрипционно инертных участков гетерохроматина). Во втором случае имеет место «сайленсинг хроматина» (англ. chromatin silencing).

В обоих случаях мишенями РНК-интерференции служат гомологичные им генные локусы; малые интерферирующие РНК в данном случае называются «*cis*-действующими». Комплекс RITS, ответственный за эти процессы, содержит белок AGO, а также ряд белков, контролирующих структуру гетерохроматина.

Роль РНК-сайленсинга в антивирусном иммунитете. Как уже указывалось, источником siРНК могут быть репликативные интермедиаты РНК-содержащих вирусов. В случае ДНК-содержащих вирусов это продукты двунаправленной транскрипции повторяющихся геномных последовательностей.

Аппарат сайленсинга распознает dsРНК и обеспечивает синтез малых РНК, которые вызывают вирус-индуцированный сайленсинг генов (англ. **virus-induced gene silencing**, VIGS). Это приводит к подавлению размножения инфекционного агента; в случае вирусов растений — по причине эндонуклеазного расщепления РНК с помощью комплекса RISC (рис. 20).

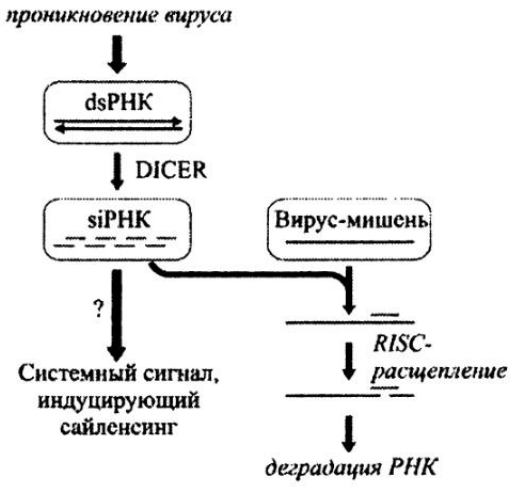


Рис. 20. Инактивация фитовируса с помощью системы РНК-сайленсинга.

Антивирусный РНК-сайленсинг у растений. Еще задолго до объяснения механизма РНК-интерференции было установлено, что индуцированный вирусной РНК сайленсинг вирусных генов распространяется по растению из зоны первичного заражения, а также может быть передан при прививке. В настоящее время показано, что после образования siPHK передается между клетками по плазмодесмам. Наряду с этим существует еще не идентифицированный сигнал для запуска сайленсинга, обеспечивающий его системное распространение.

Малые интерферирующие РНК растений могут образовываться не только путем расщепления вирусной dsPHK (как siPHK), но и из тех вирусных ssPHK(+), которые способны к внутримолекулярному свертыванию в stem-loop структуру (по аналогии с miPHK).

Многие растения, в частности *A. thaliana*, образуют серию гомологов дайсер-фермента, что позволяет адаптивно реагировать на инфицирование разными вирусами.

Антивирусный РНК-сайленсинг у растений можно подразделить на две стадии — инициацию и поддержание. Для инициации необходимо появление dsPHK, которая распознается дайсер-ферментом с последующим рекрутированием комплекса RISC, что приводит к образованию siPHK. Поддержание связано с отсутствием dsPHK в качестве триггера; siPHK амплифицируются с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы. При этом ранее образованная siPHK служит праймером, а гомологичная ей клеточная РНК — матрицей.

РНК-сайленсинг находит практическое применение при защите растений от вирусной инфекции. Путем введения генетических конструкций, инициирующих PTGS, трансгенные культивируемые растения удается защитить от широкого круга вирусных инфекций. В частности, так было спасено производство папайи (*Carica papaya*) на Гавайских о-вах, которое ранее несло значительный ущерб от фитовируса ***Papaya ringspot virus*** (PRSV; сем. *Potyviridae*).

Антивирусный РНК-сайленсинг у животных. В отличие от растений, животные образуют меньше вариантов дайсер-ферментов; тем не менее, у некоторых животных антивирусный иммунитет также связан с РНК-интерференцией. Примером служит иммунитет личинок и взрослых особей дрозофилы против вируса X (***Drosophila X virus***, DXV; сем. *Birnaviridae*).

Участие РНК-интерференции в антивирусном иммунитете у млекопитающих окончательно не доказано. В то же время существует возможность использования РНК-интерференции при лечении ряда вирусных заболеваний человека (гепатитов, гриппа, приобретенного иммунодефицита и др.).

Вирусная супрессия РНК-сайленсинга. Для противодействия защитному механизму РНК-интерференции большинство вирусов растений образует белки-супрессоры РНК-сайленсинга, которые позволяют их обладателю беспрепятственно размножаться в специфическом хозяине.

Супрессоры РНК-сайленсинга, которые используют как РНК-содержащие, так и ДНК-содержащие вирусы растений, весьма разнообразны по структуре кодирующей последовательности и механизму действия, что свидетельствует об их независимом эволюционном происхождении.

К числу изученных супрессоров сайленсинга у вирусов растений относятся: 1) белок P1/HC-Pro вирусов рода *Potyvirus* (сем. *Potyviridae*), влияющий на сборку комплекса RISC; 2) белок 2b вирусов рода *Cucumovirus* (сем. *Bromoviridae*) и белок p25 вирусов рода *Potexvirus* (сем. *Alphaflexiviridae*), препятствующие распространению сигнала сайленсинга; 3) белок p19 вируса рода *Tombusvirus* (сем. *Tombusviridae*), непосредственно связывающий siРНК; 4) белок CP вирусов рода *Carmovirus* (сем. *Tombusviridae*), препятствующий процессингу dsРНК.

Первый супрессор сайленсинга у вирусов животных, белок B2, был обнаружен у вируса насекомых — ***Flock house virus*** (FHV; сем. *Nodaviridae*). Позднее к нему добавились белок E3L вируса *Vaccinia virus* (сем. *Poxviridae*), белок NS1 вируса *Influenzavirus A* (сем. *Orthomyxoviridae*) и белок Tas вируса ***Primate foamy virus type 1*** (PFV-1; сем. *Retroviridae*).

1.7.4. АПОПТОЗ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ВИРУСАМИ

Самоубийство клетки, или ее запрограммированная смерть (англ. programmed cell death), — это цитологический феномен, при котором избирательному разрушению подвергаются клетки, по той или иной причине оказавшиеся дефектными, в том числе в результате заражения вирусами.

Апоптоз (общие сведения). Запрограммированная смерть клетки сопровождается комплексом морфологических изменений, который называется апоптозом (греч. apoptosis — устранение). Вопреки обычному мнению, выражение «запрограммированная смерть клетки» и термин «апоптоз» не являются взаимозаменяемыми, поскольку в первом случае речь идет о более широком круге явлений.

Термин «апоптоз», предложенный в 1972 г. английским физиологом Джоном Керром (J. F. R. Kerr), традиционно используется применительно к запрограммированной смерти клетки у ядерных организмов, особенно многоклеточных.

К числу морфобиохимических признаков апоптоза относятся: 1) изменение размера клетки, которая разбухает или, наоборот, сморщивается; 2) образование хроматиновых конгломератов на периферии нуклеоплазмы; 3) дегенерация цитоплазмы, сопровождающаяся усиленной грануляцией; 4) блеббинг, или отпочкование везикул от цитоплазматической мембраны; 5) разрушение хромосомной ДНК с образованием «лестницы» фрагментов, длина которых кратна размеру нуклеосомного участка, т.е. 180–200 п.н. Важно отметить, что деградация ДНК не служит причиной смерти клетки, поскольку апоптозу могут подвергаться и клетки с удаленным ядром.

Апоптоз не является реакцией на экзогенное повреждение клетки; иными словами, он соответствует физиологической, или эндогенной, смерти клетки. Этим он отличается от некроза (греч. necrosis — смерть), или патологической смерти, вызванной внешним повреждающим воздействием. Мембраны при апоптозе, в частности мембрана лизосомы, остаются интактными, и его завершающей фазой служит распад клетки с образованием «апоптозных телец», которые поглощаются макрофагами; содержимое мертвой клетки не выходит наружу, что исключает развитие воспаления. При некрозе, напротив, лизосомы разрушаются; содержимое клетки выходит наружу, вызывая воспаление. Таким образом, в отличие от апоптоза, при некрозе повреждаются соседние клетки.

Апоптоз — это альтруистический процесс, позволяющий устранять отдельные клетки ради эффективного функционирования или выживания многоклеточного организма. Он неразрывно связан с дифференцировкой, гистогенезом и органогенезом, а также избирательно уничтожает «заминированные» клетки (мутантные, неопластические, инфицированные вирусами и т.д.).

Индукторами апоптоза служат как внутриклеточные, так и внеклеточные сигналы, в частности цитокины (интерфероны, интерлейкины, факторы некроза опухолей и др.), а также гормоны.

Апоптоз включает в себя четыре основные фазы: 1) поступление проапоптозного сигнала эндогенной либо экзогенной природы, или рецепторная фаза; 2) процессинг сигнала с запуском регуляторного ответа, или фаза принятия решения о смерти (англ. commitment); 3) осуществление характерных морфобиохимических изменений, или эффекторная фаза; 4) деградация генетического материала и распад клетки с образованием апоптозных телец, которые поглощаются макрофагами, или постмортальная фаза.

Каспазы. Центральную роль в механизме апоптоза на стадии принятия решения о смерти играют «цистеиновые» киллерпротеазы, принадлежащие семейству каспаз (англ. caspase; от **c**ysteinyl **a**spartate-specific **p**roteina**se**). У млекопитающих имеется десять ферментов данного семейства с консенсусным мотивом Glu–Ala–Cis–X–Gli (где X = Arg, Glu или Gli) в активном центре.

Для каспаз характерна строгая специфичность в отношении остатка Asp в расщепляемой связи субстрата (–Asp– ↓ –X–). В соответствии с характером фланкирующих последовательностей выделяют две группы каспаз: 1) ICE-каспазы (сокр. англ. (mammalian) **i**nterleukin-1-beta-**c**onverting **e**nzyme), которые преимущественно участвуют в развитии воспаления; 2) CED-каспазы (сокр. англ. *Caenorhabditis elegans* cell **d**eath), преимущественно участвующие в апоптозе.

Каспазы синтезируются в виде 3-доменного препротеина (прокаспазы; 35–50 кДа), который активируется в результате автокаталитического отщепления N-концевого домена; оставшиеся домены дают начало большой и малой субъединицам тетрамерного комплекса.

К числу мишеней, которые разрушаются каспазами на эффекторной фазе апоптоза, относятся белки ядерной ламины и цитоплазматического цитоскелета; белки сплайсосомы; белки, отвечающие за репарацию и прохождение клеточного цикла, и другие.

Апоптоз клеток, зараженных вирусом. В отдельных случаях в зараженных клетках (в цитоплазме или в протеасомах) происходит протеолиз вирусных белков. Образовавшиеся пептиды связываются транспортными белками TAP (сокр. англ. **t**ransporter **a**ssociated with **a**ntigen **p**rocessing). Комплекс TAP/пептид поступает в эндоплазматический ретикулум, где пептид передается молекуле главного комплекса гистосовместимости MHC-I. В ассоциации с MHC пептид покидает эндоплазматический ретикулум и через аппарат Гольджи доставляется к цитоплазматической мембране, в результате чего вирусные эпитопы презентируются на ее наружной поверхности (рис. 21).

Затем в дело вступают цитотоксические Т-лимфоциты $CD8^+$. Их поверхностные TCR-рецепторы (сокр. англ. **T** cell **r**eceptor) распознают вирусные эпитопы на клетке-мишени, что служит стимулом для образования двух лимфоцитарных белков — GraA/B (сокр. англ. granzyme; от granule enzyme — фермент цитоплазматических гранул) и перфорина (англ. perforin).

В отличие от гранзима А, который не связан с апоптозом, гранзим В является «сериновой» протеазой и, подобно каспазам, избирательно расщепляет связи (–Asp–↓–X–). В клетку-мишень он проникает путем эндоцитоза после связывания с неидентифицированными поверхностными рецепторами.

Перфорин в клетку не проникает, однако посылает с ее поверхности сигнал, в ответ на который GraB выходит из эндосомы в цитоплазму, а затем транспортируется в ядро. В результате попадания GraB в ядро клетки-мишени начинается эффекторная фаза апоптоза.

При связывании комплекса MCH-I/пептид с поверхностным рецептором TCR в ядро Т-лимфоцита поступает регуляторный сигнал для синтеза белка FasL (сокр. англ. **Fas l**igand; 40 кДа). Белок-лиганд FasL встраивается в цитоплазматическую мембрану Т-лимфоцита, а затем вступает во взаимодействие с рецептором Fas (сокр. англ. **f**actor of **a**poptosis **s**timulus; CD95), расположенным на поверхности клетки-мишени.

Когда белок-лиганд FasL связывается с мембранным рецептором Fas, в клетке-мишени запускается сигнальный каскад, который приводит к превращению прокаспазы в каспазу (рис. 21). В нем участвуют DD-домены рецептора (сокр. англ. **d**eath **d**omain — домен смерти), DD-домены цитоплазматического адапторного белка FADD (сокр. англ. **F**as-**a**ssociated **d**eath **d**omain) и прокаспаза.

N-концевой домен белка FADD играет роль «эффекторного домена смерти» (англ. **d**eath **e**ffector **d**omain, DED). Такие же DED-домены имеются в составе удаляемого фрагмента прокаспазы. В результате гетеродимеризации этих доменов прокаспаза иммобилизуется на цитоплазматической мембране и автокаталитически превращается в каспазу.

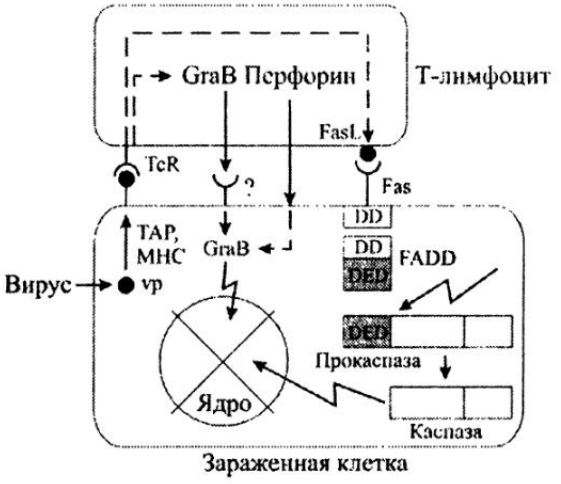


Рис. 21. Апоптоз зараженной клетки при посредстве Т-лимфоцита.

Объяснение в тексте.

Помимо вышеописанной существует менее изученная система запуска апоптоза с участием митохондрий. Неидентифицированные проапоптозные «сигналы о смерти» поступают к наружной митохондриальной мембране, что приводит к коллапсу протонного градиента и высвобождению белковых факторов проапоптоза, в частности растворимого цитохрома *c*. Последний совместно с «адаптором» Apaf (сокр. англ. **ap**optosis **a**ssociated **f**actor) способствует превращению прокаспазы в каспазу.

Противодействие вирусов апоптозу. Апоптоз инфицированных клеток препятствует локальному размножению вирусов (в частности, разрушается не только клеточная, но и вирусная ДНК) и ограничивает их распространение. Поэтому вирусы, со своей стороны, используют ряд стратегий для борьбы с апоптозом:

— подавление самыми ранними белками экспрессии генов MCH-I (в случае онкогенных аденовирусов);

— блокировка самыми ранними белками белков TAP (в случае вируса простого герпеса);

— ингибирование каспаз вирусными белками из семейства серпинов (англ. **ser**ine **p**rotease **in**hibitor) (в случае вируса коровьей оспы);

— блокирование сигнального Fas-каскада путем синтеза белков, связывающих адапторный белок FADD (в случае герпервирусов).

1.7.5. АНТИВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНТЕРФЕРОНА

Одной из форм ответа на вирусную инфекцию служит изменение паттерна транскрипции хозяйских генов. Это происходит либо в результате прямой активации транскрипционных факторов, либо опосредованно — когда в ответ на вторжение вируса клетки позвоночных (в частности, млекопитающих и птиц) синтезируют низ-

комолекулярные регуляторные белки ***интерфероны*** (англ. interfere — служить препятствием; *имеется в виду, что эти белки мешают вирусу размножаться*).

Помимо вирусов индукторами интерферона могут быть патогенные микроорганизмы, злокачественные клетки, а также некоторые химические вещества, прежде всего полианионы (dsРНК, сульфатированные полисахариды, полиакрилаты и др.).

Под регуляторным воздействием интерферонов происходят комплексные изменения на уровне клеточной регуляции и метаболизма, в результате чего нарушается пролиферативная активность и дифференцировка, изменяется спектр поверхностных антигенов, а также подавляется репродукция РНК-содержащих и ДНК-содержащих вирусов.

Интерфероны воздействуют на клетку извне. Обязательной предпосылкой регуляторного процесса служит их секреция, после чего они проявляют себя как «автокринные» эффекторы (активирующие продуцента) или «паракринные» эффекторы (активирующие другие клетки).

История открытия интерферона. В 1957 г. английский вирусолог Элик Айзекс (A. Isaacs) и швейцарский вирусолог Жан Линденманн (J. Lindenmann) проводили на куриных эмбрионах опыты по одновременному заражению инактивированным вирусом гриппа и неповрежденным гомологичным вирусом. Вопреки ожиданиям, размножение вируса не усиливалось, а подавлялось; т. е. наблюдаемая интерференция вызывалась не вирусными частицами, а другим ингибитором. Тщательно проанализировав обнаруженное явление, Айзекс и Линденманн пришли к выводу, что агент, названный ими «интерфероном», имеет белковую природу, отличается по антигенным свойствам от вирусных белков и приводит клетку в состояние резистентности, препятствующее размножению в ней ряда вирусов.

Активное изучение молекулярной природы и функций интерферонов с середины 1970-х гг. показало, что они являются продуктами трех дивергентных семейств архаичных генов, и что их антивирусная функция второстепенна; в первую очередь они регулируют размножение, дифференцировку и иммунный ответ в организме позвоночных животных.

Жан Линденманн не был удостоен Нобелевской премии, что, конечно, несправедливо. Элик Айзекс умер в 1967 г., когда значение интерферона еще не было осознано в полной мере.

Классификация интерферонов. Интерфероны принадлежат к большой и гетерогенной группе секретируемых белков ***цитокинов*** (англ. cytokine; от греч. kitos — клетка и kinos — движение; *имеется в виду не подвижность, а придание стимула*), которые участвуют в межклеточном сигналинге и, в частности, выполняют роль иммуномодуляторов. В отличие от гормонов, цитокины синтезируются разными типами клеток, действуют в более низкой концентрации и проявляют широкий спектр биологического действия.

Интерфероны подразделяются на три типа (или класса) в соответствии с вариантом используемого ими рецептора.

Интерфероны I типа связываются с поверхностным рецепторным комплексом IFNAR (сокр. англ. **i**nterfero**n** **a**lpha **r**eceptor), который состоит из субъединиц IFNAR1 и IFNAR2. К этому типу, в частности, относятся человеческие интерфероны IFN-α, IFN-β и IFN-ω.

Интерфероны II типа связываются с поверхностным рецептором IFNGR (сокр. англ. **interferon gamma receptor**). Примером служит человеческий интерферон IFN-γ.

Иногда дополнительно обособляют «интерлейкиновые» интерфероны III типа, которые связываются с гетеротетрамерным рецепторным комплексом, состоящим из димера субъединиц IFNL R1 (сокр. англ. **interferon/interleukin receptor 1**; *синоним* — CRF2–12; сокр. англ. **cell resistance factor 2–12**) и димера субъединиц IL-10 R2 (сокр. англ. **interleukin-10 receptor 2**; *синоним* — CRF2–4; сокр. англ. **cell resistance factor 2–4**).

Группа из 20 генов IFNA (кодируют интерфероны IFN-α) и соседствующий с ней ген IFNB (кодирует IFN-β) находятся у человека в 9-й хромосоме в участке размером 400 тыс. п.н. Две копии гена IFNG (кодирует IFN-γ) находятся в 12-й хромосоме. Гены интерферонов кодируют препротеины (~170 а.о.), на их N-конце расположена сигнальная последовательность (~20 а.о.), которая отщепляется в ходе секреции. Молекулярная масса зрелых IFN-α, IFN-β и IFN-γ составляет, соответственно, 16–24 кДа, 20 кДа и 20–25 кДа (~150 а.о.); на Т-конце они содержат сайт для связывания с рецептором.

Хотя вырабатывать интерферон могут практически любые клетки позвоночных, эта способность зависит от типа ткани или клеточной культуры, возраста клеток и ряда других факторов. В частности, IFN-α преимущественно синтезируется В-лимфоцитами, макрофагами, моноцитами и нейтрофилами; синтез IFN-β осуществляется преимущественно фибробластами, IFN-γ — Т-лимфоцитами, активированными антигенами или митогенами (в отличие от IFN-α и IFN-β, он не индуцируется вирусами). В отсутствие биологического или химического индуктора клетки, как правило, не синтезируют заметного количества интерферона. Еще раз напомним, что важнейшим индуктором интерферона служит вирусная инфекция.

Антивирусный сигналинг, приводящий к синтезу интерферона. Как уже отмечалось, интерфероны образуются главным образом при вирусной или бактериальной инфекции, а также под влиянием микробных продуктов.

У млекопитающих в результате вирусной инфекции развивается иммунный ответ, при котором активируется синтез интерферонов, ограничивающих вирусную репродукцию (см. ниже).

Антивирусный сигнальный путь начинается с того, что клетка-хозяин регистрирует событие инфекции по присутствию «визитной карточки» вируса — вирусной нуклеиновой кислоты (dsДНК, ssРНК или dsРНК). За это отвечают хозяйские ***паттерн-распознающие рецепторы*** (англ. **p**attern **r**ecognition **r**eceptor, PRR), которые связаны с клеточными мембранами или имеют цитоплазматическую локализацию (рис. 22).

TLR-зависимый сигнальный путь. Типичным примером рецептора, связанного с цитоплазматической мембраной или с мембраной эндосомы, служат **TLR-рецепторы** (сокр. англ. **t**oll **l**ike **r**eceptor; *название происходит от сходства с белком дрозофилы, который кодируется геном Toll; мутация по этому гену придает крыльям насекомого причудливый вид; исследователи эмоционально комментировали это явление по-немецки: «Das ist ja toll!», т. е. «Это же круто!»*).

Эндосомные рецепторы TLR3 и TLR7/8 распознают, соответственно, dsРНК и ssРНК. После связывания лиганда эти рецепторы вступают во взаимодействие с «адапторами» **MyD88** (сокр. англ. **my**eloid **d**ifferentiation primary response gene **88**)

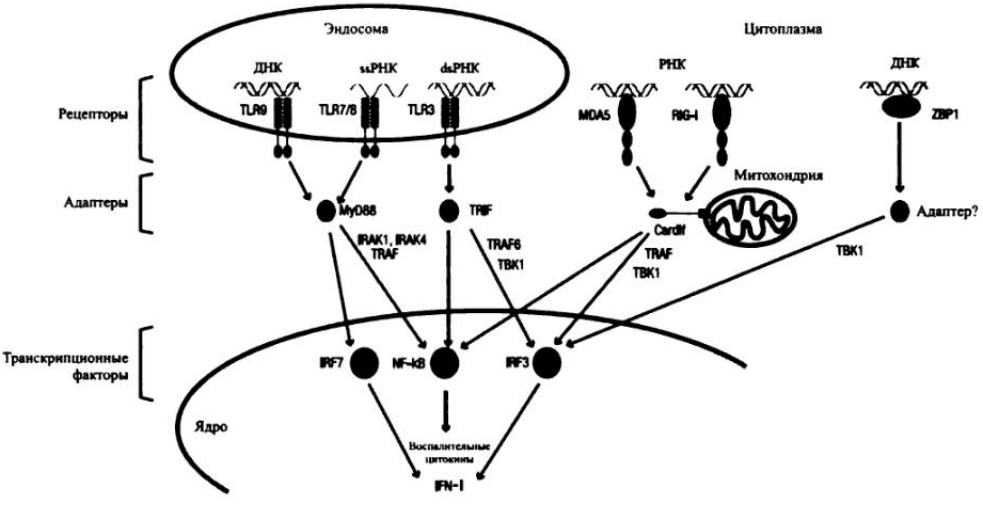


Рис. 22. Клеточные сигнальные пути, приводящие к биосинтезу интерферона.

Объяснение в тексте.

и **TRIF** (сокр. англ. **TIR**-domain-containing adapter **i**nducing inter**f**eron; в *свою очередь*, TIR — **T**oll/**i**nterleukin-1 **r**eceptor).

С данного момента запускается сигнальный каскад, в котором участвуют четыре регуляторных фактора:

— **TRAF6** (сокр. англ. **T**NF **r**eceptor-**a**ssociating **f**actor 6; в *свою очередь*, TNF — **t**umor **n**ecrosis **f**actor);

— **TBK1** (сокр. англ. **T**ANK-**b**inding **k**inase **1**; в *свою очередь*, TANK — **T**RAF family member-**a**ssociated **N**F-**κ**B activator; в *свою очередь*, TRAF — **t**umor necrosis factor **r**eceptor-**a**ssociated **f**actor);

— **TRAF/IRAK1** (сокр. от англ. **i**nterleukin-1 **r**eceptor-**a**ssociated **k**inase-**1**);

— **TRAF/IRAK2**.

Этот сигнальный каскад активирует транскрипционные факторы **IRF** (сокр. от англ. **i**nterferon **r**egulated **f**actor) и **NF-κB** (сокр. англ. **n**uclear **f**actor **k**appa-light-chain-enhancer of activated **B** cells). В результате синтезируются, соответственно, интерфероны IFNα/β и провоспалительные цитокины.

RLR-зависимый *(сокр. англ. RIG-like receptor)* ***сигнальный путь.*** К числу цитоплазматических рецепторов относятся два сенсора для dsРНК — сенсор **RIG-I** (сокр. от англ. **r**etinoic acid-**i**nducible **g**ene **I**) и сенсор **MDA5** (сокр. англ. **m**elanoma **d**ifferentiation-**a**ssociated **a**ntigen **5**). В качестве адаптора они используют фактор **Cardif** (сокр. от англ. **ca**spase **r**ecruitment **d**omain **i**mmune **f**actor).

Фактор Cardif содержит терминальный трансмембранный домен, который заякоривает его на митохондриальной мембране. В свою очередь, его CARD-домен взаимодействует с CARD-доменом рецепторов MDA5 и RIG-1; такая CARD–CARD ассоциация активирует транскрипционные факторы IRF3 и NF-κB.

Цитоплазматическим рецептором для dsДНК служит **ZBP1** (сокр. от англ. **Z**-DNA **b**inding **p**rotein **1**). Взаимодействующий с ним адаптор не установлен, однако в итоге активируется транскрипционный фактор IRF3.

Механизм антивирусного действия интерферонов. Следует еще раз подчеркнуть, что интерферон не токсичен для клеток и не является антивирусным агентом прямого действия, а вызывает в клетке «антивирусное состояние» за счет индукции защитных механизмов.

Будучи сигнальными молекулами, интерфероны обладают исключительно высокой биологической активностью; для того, чтобы привести клетку в «антивирусное состояние» достаточно нескольких десятков молекул этого эффектора.

При связывании интерферонов I типа с димерным рецептором IFNAR1/IFNAR2 его цитоплазматические домены активируют «нерецепторные» протеинкиназы JAK1 и JAK2. Сокращенные английские названия этих ферментов имеют две расшифровки: **j**ust **a**nother **k**inase — очередная киназа (*т. е. представитель большого числа киназ, выявленных с помощью PCR-реакции*) и **J**anus **k**inase — Янус-киназа (*ссылка на двуликого римского бога Януса; фермент содержит два почти идентичных фосфат-связывающих домена, первый обладает киназной активностью, второй ее регулирует*).

Протеинкиназы, активированные путем автофосфорилирования по остаткам Tyr, фосфорилируют цитоплазматические транскрипционные факторы STAT1 и STAT2 (сокр. англ. **s**ignal **t**ransducer and **a**ctivator of **t**ranscription **1** & **2**).

Фосфорилированные факторы STAT1~P и STAT2~P образуют гомо- и гетеродимеры, к которым дополнительно присоединяется транскрипционный фактор IRF9 (сокр. англ. **i**nterferon-**r**egulated **f**actor **9**; *синоним* — ISGF3γ). Образовавшийся тройственный комплекс, получивший название ISGF3 (сокр. англ. **i**nterferon-**s**timulated **g**ene **f**actor, **3**-meric), переносится из цитоплазмы в клеточное ядро.

Благодаря взаимодействию между отдельными комплексами ISGF3 и консенсусными хромосомными последовательностями ISRE (сокр. англ. **I**FN-**s**timulated **re**sponse **e**lement), расположенными в промоторных участках >100 генов группы ISG (сокр. англ. **I**FN **s**timulated **g**ene), эти гены начинают транскрибироваться. Комбинированные димеры STAT-факторов также связываются с GAS-элементами (сокр. англ. **g**ene-**a**ctivating **s**ite) в промоторных участках других хромосомных генов.

Антивирусные белки, образующиеся в результате стимуляции интерферонами. Среди белковых продуктов, синтез которых значительно повышается в результате стимуляции генов ISG, наиболее важны протеинкиназа PKR и олигоаденилатсинтаза OAS.

Серин-треониновая протеинкиназа PKR (сокр. англ. **p**rotein **k**inase **R**, 550 а.о.; ген Pkr, 50 тыс. п.н.) активируется путем автофосфорилирования по остаткам Tre и Ser; кофактором активации служит dsРНК. Важнейшим субстратом активированной PKR служит субъединица «а» эукариотного фактора инициации трансляции IF-2e (сокр. англ. **I**nitiation **F**actor-**2e**), которая фосфорилируется по остатку Ser51. В результате такой модификации фактор IF-2e инактивируется, что приводит к прекращению трансляции всех белков (в том числе, вирусных).

Олигоаденилатсинтаза OAS 2′–5′ (сокр. англ. **o**ligo**a**denylate **s**ynthase 2′–5′) также подавляет трансляцию и также зависит от dsРНК, однако она действует другим пу-

тем. После активации с помощью dsРНК она полимеризует АТФ в олиго(А)нуклеотиды с 2′–5′-связями между мономерами. Подобные олигонуклеотиды обладают повышенной устойчивостью к нуклеазам и служат активаторами латентной РНКазы L. После активации она начинает неспецифически фрагментировать с 3′-конца все РНК (в том числе, вирусные).

Предполагается, что источником dsРНК в эукариотной клетке служат РНК-содержащие вирусы, хотя конкретный механизм ее образования и презентации недостаточно ясен. В свою очередь, у ДНК-содержащих вирусов это могут быть аномальные продукты транскрипции.

Наряду с негативной регуляцией интерферон позитивно стимулирует синтез белков главного комплекса гистосовместимости — MHC I и MHC II. В результате их накопления вирусные белки активнее презентируются цитотоксическим Т-лимфоцитам, натуральным киллерам и Т-хелперам.

Чувствительность к интерферону варьирует в зависимости от природы вируса и продуцента; кроме того, интерфероны проявляют видовую специфичность действия (они более эффективны по отношению к гомологичным клеткам).

Сопротивление вирусов интерферонной системе. Для борьбы с антивирусным состоянием инфицированной клетки вирусы используют разнообразные механизмы:

— блокируется сигнальный JAK-STAT каскад, который был запущен после связывания интерферона с рецептором;

— предотвращается дальнейшее образование интерферона;

— подавляются функции белков, индуцированных интерфероном.

В частности, подавляется протеинкиназа PKR, что позволяет свободно осуществлять трансляцию вирусных белков. С этой целью вирусы кодируют белки, конкурентно связывающие dsРНК (примерами служат белок NS1 вируса гриппа, белок E3L вируса осповакцины и белок NSP3 ротавирусов).

И в завершение темы — при использовании интерферона в качестве лекарственного препарата необходимо помнить о том, что он (особенно при парентеральном введении) может вызвать серьезные побочные эффекты со стороны центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, систем кроветворения, органов чувств и т. д. Поэтому его следует применять с осторожностью и только по назначению врача.

1.8. СИСТЕМАТИКА И БИОРАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ

Биосистематика, или биотаксономия, занимается построением иерархической классификационной системы живых существ, элементами которой служат группы взаимно родственных особей.

Систематика вирусов формулирует критерии фенотипического и генотипического сходства или различия вирусов; на основе этих критериев распределяет вирусы по классификационным группам, или ***таксонам***; устанавливает степень родства вирусов внутри таксонов и между таксонами; присваивает вирусным таксонам категории и дает им имена.

Помимо решения этих фундаментальных задач систематика вирусов преследует практические цели, поскольку позволяет идентифицировать вирусов, вызывающих заболевания у человека, а также у одомашненных животных и культурных растений.

Краткая история систематики вирусов. В начале XX в. единственным физико-химическим критерием, который можно было применить по отношению к вирусам, служила фильтруемость. Неудивительно, что в отсутствие сведений о других имманентных свойствах вирусов Феликс д'Эррель (1918) считал, что бактериофаги представлены единственным видом — *Bacteriophagum intestinale.*

Болезнетворных вирусов первоначально классифицировали по характеру инфекционного процесса и ответной реакции хозяина. В первую очередь учитывали генерализованный характер патогенеза (вирусы, вызывающие гепатит), органный тропизм (вирусы респираторных заболеваний) и способ передачи (так называемые «арбовирусы», которых переносят насекомые).

На первом Вирусологическом конгрессе, проходившем в Кембридже в 1930 г., и на первом Микробиологическом конгрессе, который состоялся в том же году в Париже, был формально дан старт международному сотрудничеству в области таксономии и номенклатуры вирусов. Однако главная цель — создание таксономической системы и разработка кодекса номенклатуры вирусов, тогда еще не ставилась.

В середине 1950-х годов, когда были получены первые данные о физико-химических свойствах вирионов, вирусов стали классифицировать на их основе. В частности, Кристофер Эндрюс (C. H. Andrews), Френк Бэнг (F. B. Bang) и Френк Бернет (F. M. Burnet) охарактеризовали семейства герпесвирусов и миксовирусов (1955), а Френк Феннер (F. Fenner) и Френк Бернет — семейство поксвирусов (1957).

В 1940–1966 гг., по мере открытия и описания новых вирусов, было предложено несколько взаимно противоречащих классификационных систем, ни одна из которых не устроила международное научное сообщество. В частности, в шестом издании «Определителя бактерий Берги» (1948) вирусы были отнесены к порядку *Virales.* В него вошло несколько подпорядков, которые, в свою очередь, подразделялись на семейства и рода. Ведущими дискриминирующими признаками послужили симптомы вирусного заболевания.

На международном симпозиуме в Колд-Спринг-Харборе (США), проходившем в 1962 г., Андрэ Львов, Роберт Хорн (R. Horne) и Поль Турнье (P. Tournier) предложили иерархическую систему вирусов: отдел/подотдел/класс/порядок/подпорядок/семейство. В качестве ведущих критериев они использовали тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), а также строение капсида (тип симметрии; присутствие или отсутствие оболочки; размер).

В 1966 г. в Москве состоялся IX Международный микробиологический конгресс. На нем Международная ассоциация микробиологических обществ (International Union of Microbiological Societies, IUMS) учредила постоянный Международный комитет по номенклатуре вирусов (International Committee on Nomenclature of Viruses, ICNV), позднее преобразованный в **Международный комитет по таксономии вирусов** (International Committee for Taxonomy of Viruses, ICTV).

Одной из центральных тем московского конгресса стала система Львова—Хорна—Турнье. После критического обсуждения ICNV ее безоговорочно отверг. Основ-

ными контраргументами стали: отсутствие филогенетической базы для объективной классификации; произвольность в выборе и оценке значения дискриминирующих признаков; скудность сведений о свойствах большинства вирусов.

На московском конгрессе 1966 г. ICNV принял **Международный кодекс классификации и номенклатуры вирусов** (International Code of Virus Classification and Nomenclature, ICVCN). Он включает в себя ряд принципиально важных положений:

— кодекс номенклатуры вирусов не зависит от других кодексов биологической номенклатуры, в частности от кодекса номенклатуры бактерий;

— международный кодекс номенклатуры вирусов распространяется на всех вирусов;

— при описании вирусов не требуется соблюдать принцип сохранения приоритета;

— названия вирусов нельзя производить от личных имен;

— вирусам желательно в перспективе давать бинарные латинизированные названия.

В 1998 г. первоначальная редакция ICVCN подверглась ревизии; в частности, официальным для вируса становилось только бинарное название (курсивом), причем первое слово должно начинаться с заглавной буквы.

В организационном плане ICTV является Вирусологической секцией (Virology Division) IUMS и структурно подразделяется на подкомитеты с рабочими группами, которые занимаются отдельными группами вирусов — вирусами позвоночных, вирусами беспозвоночных, вирусами растений, бактериофагами и т.д. Вопросы таксономии вирусов обсуждаются в международных журналах Intervirology, Archives of Virology и Journal of General Virology.

Современная систематика вирусов. Согласно решению ICTV в систематике вирусов используются четыре основных таксона: порядок, семейство, род и вид. В некоторых случаях вводится промежуточный таксон — подсемейство. Этим таксонам официально присваиваются латинские, греческие или латинизированные имена, которые оканчиваются, соответственно, на *-virales*, *-viridae*, *-virineae* и *-virus*. Они пишутся с заглавной буквы курсивом.

Выше уровня порядка вирусы официально не классифицируются, несмотря на ряд авторитетных предложений применить к ним категорию класса (classis), а также такую глобальную категорию, как царство (regnum).

На момент написания учебника (2010–2011) своим решением ICTV формально признавал шесть порядков вирусов.

Порядок ***Caudovirales*** (от лат. cauda — хвост; у *представителей данного порядка вирионы обладают хвостовым отростком*) объединяет семейства *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae*.

Порядок ***Herpesvirales*** (от греч. herpeton — пресмыкающееся; *в частности, к трем подсемействам семейства Herpersviridae, типового семейства данного порядка, принадлежат вирусы герпеса человека*) объединяет семейства *Alloherpesviridae*, *Herpesviridae* и *Malacoherpesviridae*.

Порядок ***Mononegavirales*** (от греч. monos — один и лат. negativus — отрицательный; *представители данного порядка содержат ssРНК(–)*) объединяет семейства *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae*.

Порядок ***Nidovirales*** (от лат. nidus — гнездо; у *представителей данного порядка в геномной ssРНК(+) нуклеотидные последовательности, используемые в качестве мРНК, сгруппированы и образуют «гнездо»*) объединяет семейства *Arteriviridae*, *Coronaviridae* и *Roniviridae*.

Порядок ***Picornavirales*** (от итал. piccolo — маленький и RNA; *представители типового семейства Picornaviridae образуют относительно небольшие, около 25 нм, вирионы и содержат ssРНК(+)*) объединяет семейства *Caliciviridae*, *Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Picornaviridae*, *Potyviridae* и *Secoviridae*.

Порядок ***Tymovirales*** (сокр. англ. turnip yellow mosaic; *представитель типового семейства вызывает желтую мозаику турнепса*) содержит семейства *Alfaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae* и *Tymoviridae*.

Во всех перечисленных случаях очевидно взаимное родство вирусов, проявляемое на таксономическом уровне выше семейства.

Центральным таксоном у вирусов служит семейство; неслучайно в отсутствие порядков роль таксона высшего ранга принимают на себя семейства. Ведущими критериями семейства служат тип нуклеиновой кислоты и морфология вириона.

Тем не менее категория семейства применяется не универсально; около 10% родов не отвечает критериям принадлежности к какому-либо семейству, поскольку из-за недостатка информации не определена степень их родства с другими родами. Поэтому их рассматривают вне семейства.

Представители семейства объединяются прежде всего на основе общего типа нуклеиновой кислоты и сходной морфологии вирионов.

Разные семейства вирусов могут очень сильно различаться по числу представителей. Например, в семейство *Cystoviridae* входит только один вид, тогда как семейство *Siphoviridae* содержит более 1200 видов.

Семейства вирусов подразделяются на рода, рода — на виды. Ниже видового уровня вирусы не классифицируются, и такие практически значимые категории, как серогруппа (в случае вирусов животных) или патовар (в случае вирусов растений), не являются таксономически легитимными.

До тех пор, пока не были обнаружены вирусы, инфицирующие и растения, и животных (теперь их относят, в частности, к семействам *Rhabdoviridae* и *Reoviridae*), вирусологи растений игнорировали таксономические категории семейство и род, используя вместо этого термин «группа». В настоящее время систематика вирусов носит унифицированный характер, и природа хозяев играет в ней хотя и важную, но подчиненную роль.

Главными критериями классификации вирусов служит тип геномной нуклеиновой кислоты (ДНК; РНК; однонитевая; двунитевая) и способ репликации генома. Согласно предложению Дэвида Балтимора («Baltimore classification»; 1971 г.), вирусы подразделяются на семь так называемых «классов»:

«класс» I — вирусы, содержащие dsДНК;
«класс» II — вирусы, содержащие ssДНК;
«класс» III — вирусы, содержащие dsРНК;
«класс» IV — вирусы, содержащие ssРНК(+);
«класс» V — вирусы, содержащие ssРНК(–);

«класс» VI — вирусы, содержащие ssРНК(+), геном реплицируется через стадию ДНК (РНК-ретровирусы);

«класс» VII — вирусы, содержащие dsДНК, геном реплицируется через стадию РНК (ДНК-ретровирусы).

Следует иметь в виду, что «классы» Дэвида Балтимора формально не признаются ICTV и поэтому не должны восприниматься как таксоны. Дело в том, что логичная и удобная классификация Балтимора не отражает эволюционных взаимоотношений вирусов (в частности, dsДНК-вирусы полифилетичны). Кроме того, вирусы с разными типами геномной нуклеиновой кислоты могут находиться на разных таксономических уровнях (например, все dsДНК-вирусы таксономически не эквивалентны всем dsРНК-вирусам).

Тем не менее квазитаксоны, предложенные Дэвидом Балтимором, широко используются на практике в силу своей биологической очевидности. Действительно, из-за отсутствия клеточного строения фенотип вируса ограничен свойствами капсида, выполняющего, в сущности, второстепенную роль по защите и доставке геномной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина (тем более, что тип капсида не обнаруживает строгую корреляцию с типом генома и его стратегией).

С тех пор, как была отвергнута иерархическая система Андрэ Львова и стала неофициально использоваться классификация Дэвида Балтимора, ICTV не пытался разработать единую систему вирусных таксонов на уровне выше семейства. Основной причиной этого служит все еще не решенная проблема реконструкции филогении вирусов, которые явно полифилетичны (см. раздел 1.10). Однако из практических соображений, особенно при составлении каталогов, вирусов чаще всего группируют в соответствии с природой хозяев, а на втором месте указывается тип геномной нуклеиновой кислоты.

Как и большинство современных биологов, вирусологи убеждены в том, что вирусов нужно объединять в таксоны на филогенетической основе. Однако до появления методов генетического анализа вирусов, а также молекулярного секвенирования вирусных белков и нуклеиновых кислот филогенетическая таксономия вирусов носила умозрительный характер.

В настоящее время важнейшим способом установления родственных связей между вирусами является сравнение инфраструктур геномов (состав, нуклеотидная последовательность и взаимное расположение генов). В качестве маркерных генов или их продуктов в первую очередь используются гены репликаз и транскриптаз, а также гены белков капсида. Недостаток этого подхода заключается в том, что эволюционная история отдельного гена не обязательно должна отражать (или вообще не отражает) эволюционную историю вируса.

Филогенетическая таксономия вирусов испытывает особые трудности в случае РНК-содержащих вирусов с регулярно рекомбинирующими «модульными» геномами. Напротив, крупные вирусы, содержащие dsДНК (в частности, герпесвирусы), долго эволюционировали совместно со своими хозяевами и поэтому высоко консервативны.

Определение для вида у вирусов. Биологический вид — это общепринятая категория, обозначающая нижний уровень таксономического объединения живых су-

ществ. Концепция вида, в случае животных и растений, использует такие критерии, как общий пул генов и репродуктивная изоляция.

По классической формулировке, которую в 1969 г. предложил американский зоолог Эрнст Майр (E. Mayr), *вид у размножающихся половым путем макроорганизмов — это группа инбредных природных популяций, репродуктивно изолированная от других аналогичных групп.* Иными словами, это надпопуляционная система, генетически изолированная и занимающая отдельный ареал.

В отличие от высших ядерных организмов, большинство микроорганизмов (в частности, все прокариоты) размножается только вегетативным способом и не замыкается внутри ареала. Из-за отсутствия полового размножения, а также по причине горизонтального переноса генов между неродственными объектами из определения вида у прокариотов исключен классический критерий репродуктивной изоляции. В то же время ведущим критерием стал комплекс фенотипических и генотипических признаков, на основе которых взаимно родственные особи распознаются как отдельная группа.

Согласно консенсусной формулировке, *вид у прокариотов — это совокупность генетически родственных и фенотипически сходных популяций, клонально размножающихся в разных природных местообитаниях и лабораторных культурах.* Мера внутреннего родства и сходства для представителей вида оговаривается отдельно, также на консенсусной основе.

Вирусологи долго противились использованию категории вида применительно к своим объектам, аргументируя это тем, что на вирусов, которые размножаются клональным способом, не распространяется классическая концепция биологического вида (хотя видовой критерий репродуктивной изоляции не применяется и в случае прокариотов).

Основной довод в пользу использования категории вида в таксономии вирусов состоит в том, что это живые существа, которые имеют реплицирующиеся гены, эволюционируют и адаптируются к экологической нише. Но в то же время это неклеточные живые существа, функционально не активные вне живой клетки, молекулярные паразиты.

В 1991 г. ICTV пришел к выводу о необходимости сформулировать определение вида у вирусов и добавить эту таксономическую единицу к роду, подсемейству, семейству и порядку (которые уже использовались при их классификации).

Формальное определение, вошедшее в ICTV (Правило 11), гласит: *вид у вирусов — это группа штаммов, полученных из разных источников, или ряд штаммов, полученных из отдельного источника, которые имеют общий набор стабильных свойств, обособляющих ее от другой группы штаммов.* Напомним, что термином «штамм» (англ. strain), или «изолят» (англ. isolate), обозначается популяция микроба, ставшая объектом хранения или исследования в результате однократного выделения из природного материала.

Более конкретная формулировка вида у вирусов была предложена в 1990 г. французским вирусологом Мишелем ван Регенмортелем (M. H. V. van Regenmortel). Она одобрена ICTV и звучит следующим образом: *вид у вирусов — это клонально размножающаяся (англ. replicating lineage) и имеющая ряд общих признаков группа (англ. polythetic class) вирусов, занимающая отдельную экологическую нишу.*

Важнейшей частью этого определения служит то, что таксономические различия отражают эволюцию вирусов (англ. replicating lineage); как уже отмечалось, взаимное родство внутри вида и дистанция между отдельными видами объективно оцениваются по результатам молекулярного секвенирования.

Бросается в глаза сходство формулировок вида для прокариотов и для вирусов, хотя во втором случае особое значение придается экологической нише — географической локализации, вектору-переносчику и спектру хозяев, а также таким биологическим характеристикам, как характер патогенеза и т. д.

Таксономическая формулировка вида не обязательно означает, что у всех его представителей геном должен быть совершенно одинаковым. Это можно продемонстрировать на примере РНК-содержащих вирусов. Поскольку геномы таких вирусов реплицируются в отсутствие репарационных систем, они очень быстро эволюционируют (частота мутирования составляет $10^{-5} - 10^{-3}$); в результате этого в клональной популяции геном вируса дикого типа сосуществует с множеством геномов взаимно конкурирующих природных мутантов. В генетическом отношении такая популяция представляет собой «квазивид», хотя, по определению, она является таксономическим видом.

Согласно положениям ICTV разграничение видов вирусов требует их раздельной идентификации по диагностическим признакам, к которым относятся: 1) нуклеотидная последовательность геномной нуклеиновой кислоты; 2) морфология и состав вириона; 3) перекрестная антигенная реактивность; 4) круг хозяев; 5) способ передачи; 6) клеточный и тканевый тропизм; 7) общая патогенность и цитопатология. Таким образом, для классификации вирусов используется любое генотипическое или фенотипическое свойство, которое удается определить и оценить.

Следует отметить, что при разграничении видов в разных родах и семействах вирусов значение того или иного признака может различаться.

У родов, официально признанных ICTV, обязательно имеется ***типовой вид*** (англ. type species). Его ни в коем случае не следует рассматривать как наиболее типичный (репрезентативный) вид, отражающий свойства всех видов данного рода. На самом деле это обычно описанный первым или наиболее изученный вид.

Видовые названия вирусов. Названия вирусов могут быть научными, а также тривиальными, т. е. профессионально-жаргонными (англ. vernacular name); последние правилами ICVCN не признаются.

Тривиальные названия вирусов производят от биологических хозяев, типа вызываемого заболевания, места открытия и прочих специфических признаков; такие имена записываются строчными латинскими буквами (например, measles virus — вирус кори). Исключениями являются случаи, когда в тривиальное имя вируса входит географическое название места обнаружения, латинское или латинизированное родовое имя хозяина, а также личное имя первооткрывателя (например, Epstein—Barr virus; в данном случае первооткрывателей двое).

Согласно Правилам Номенклатуры, сформулированным в ICVCN, ***научные названия*** новых вирусов должны быть отличительными (Правило 14) и легко запоминающимися (Правило 12); не должны ассоциироваться с чьим-либо именем или фамилией (Правило 11) и не должны быть абсурдными или оскорбительными ни на одном из живых или мертвых языков (Правило 19).

Из-за уникального положения вирусов в мире живых существ на них не переносятся автоматически принципы номенклатуры микроорганизмов, в частности бактерий.

В линнеевой бинарной номенклатуре название вида состоит из родового имени, начинающегося с заглавной буквы, и видового эпитета, начинающегося со строчной буквы, например *Escherichia coli*.

Названия видов у вирусов звучат непривычно, поскольку родовое имя либо вообще не входит в его состав, либо следует за видовым эпитетом.

Во всех случаях, согласно рекомендации ICNV, официальное название вида вируса является: 1) бинарным; 2) английским, частично латинизированным.

Первым элементом бинарного видового названия вирусов растений или животных является тривиальное английское обозначение вызываемого заболевания; вторым, стандартным элементом служит слово «*virus*» (*Tobacco mosaic // virus*, *Foot-and-mouth disease // virus* и др.). Для бактериофагов первым элементом служит таксономическое название хозяина, а вторым, стандартным элементом слово «*phage*» в сопровождении числового кода (*Enterobacteria // phage T4* и др.).

Наряду с этим для обозначения вирусов может использоваться неофициальная нелатинизированная бинарная номенклатура (англ. non-latinized binary system; NLBS). В данном случае следом за тривиальным английским обозначением вызываемого заболевания идет название рода, например *Tobacco mosaic // **tobamo**virus*, *Foot-and-mouth disease // **aptho**virus* и др. Такая номенклатура более информативна и особо популярна среди вирусологов растений. Однако, во избежание раскола в рядах вирусологов, ICTV не распространяет ее на всех вирусов.

В разных областях вирусологии неофициальные названия вирусам даются по традиции. Например, бактериофаги, которые часто не имеют морфологических различий и могут заражать одного и того же хозяина, специфически обозначаются комбинацией из буквы и числового кода (например, *Enterobacteria phage T4*). В название вирусов растений обычно может входить название хозяина и симптом заболевания (например, *Tobacco mosaic virus*). В свою очередь, название вируса животных может отражать как имя хозяина и симптом заболевания (например, *Human respiratory syncytial virus*), так и место первоначального обнаружения (например, *Bunyamwera virus*).

Биоразнообразие вирусов. Объектом систематики вирусов служит их биоразнообразие. В настоящее время оно охарактеризовано крайне неравномерно, в частности, из-за непропорционального финансирования исследований «высоко актуальных» и «мало актуальных» групп вирусов.

По этой утилитарной причине лучше всего охарактеризованы вирусы человека и животных, а также бактериофаги, которые используются в молекулярной биологии в качестве одного из модельных объектов. Примером слабоизученных вирусов могут служить вирусы грибов (за исключением нескольких промышленно выращиваемых съедобных видов), вызывающие латентные инфекции.

Сфера выявленного разнообразия вирусов расширяется так быстро, что указать точное число официально признанных таксонов практически невозможно. Тем не менее на период написания учебника (2010–2011) ICTV формально признал 6 порядков, 87 семейств, 19 подсемейств, 348 родов и 2285 видов вирусов.

В настоящее время общее количество видов вирусов (в том числе, формально признанных) превышает 8 тыс. Примерно половина из них содержит ДНК, остальные — РНК. Самой представительной группой вирусов являются бактериофаги (5,3 тыс. видов).

Перечень основных семейств и родов с типовыми видами по состоянию на 2005–2011 гг. приводится в таблицах 9–15. Каждой из них соответствует отдельный «класс» согласно системе Балтимора. Внутренняя структура таблиц отражает современную таксономию вирусов, принятую ICTV.

Таблица 9. **Вирусы, содержащие dsДНК**

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Adenoviridae (от греч. aden — железа)	*Adenovirus // Fowl adenovirus A*	Позвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 50 нм	Линейная; 28–45 тыс. п.н.
	Atadenovirus // Ovine adenovirus, isolate 28			
	Mastadenovirus // Human adenovirus C			
	Siadenovirus // Frog adenovirus			
Alloherpesviridae (от греч. allos — другой и греч. herpeton — пресмыкающееся)	*Ictalurivirus // Ictalurid herpesvirus 1* (IcHV-1)	Животные (лягушки и рыбы)	Оболочный сферический или плеоморфный; капсид икосаэдрический; 150–200 нм	Линейная; 134 тыс. п.н.
Ascoviridae (от греч. ascos — мешок)	*Ascovirus // Spodoptera frugiperda ascovirus1a*	Беспозвоночные	Оболочный; капсид икосаэдрический с добавочной липидной мембраной; 130×300 нм	Кольцевая; 156–186 тыс. п.н.
Asfarviridae (сокр. от англ. African swine fever and related viruses)	*Asfavirus // African swine fever virus* (ASFV)	Позвоночные	Оболочный сферический; капсид икосаэдрический; 200 нм	Линейная; 170–190 тыс. п.н.
Baculoviridae (от лат. baculum — палка)	*Granulovirus // Cydia pomonella granulovirus*	Беспозвоночные	Оболочный; капсид палочковидный; 125×325 нм	Кольцевая; суперспирализованная; 80–180 тыс. п.н.
	Nucleopolyhedrovirus // Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus			
Corticoviridae (от лат. cortex — кора)	*Corticovirus // Pseudoalteromonas phage PM2* (PM2)	Бактерии	Безоболочный; капсид икосаэдрический двухслойный с промежуточным липидным слоем; 75 нм	Кольцевая; суперспирализованная; 9,5–12 тыс. п.н.

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Fuselloviridae (от лат. fusus — веретено)	*Fusellovirus // Sulfolobus spindle-shaped virus 1* (SSV-1)	Археи	Оболочный; капсид лимоновидный; 35×75 нм	Кольцевая; суперспирализованная; 15 тыс. п.н.
Guttaviridae (от лат. gutta — капля)	*Guttavirus // Sulfolobus newzealandicus droplet-shaped virus* (SNDV)	—"—	Безоболочный; капсид каплевидный; 90×180 нм	Кольцевая; 20 тыс. п.н.
Herpesviridae (от греч. herpeton — пресмыкающееся), подсемейство ***Alphaherpesvirineae***	*Iltovirus // Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1)	Позвоночные	Оболочный, капсид икосаэдрический; 100 нм	Линейная; 125–240 тыс. п.н.
	Mardivirus // Gallid herpesvirus 2 (GaHV-2)			
	Simplexvirus // Human herpesvirus 1 (HHV-1) (вирус простого герпеса)			
	Varicellovirus // Human herpesvirus 3 (HHV-3) (*Varicella/zoster virus*) (вирус ветрянки/ опоясывающего лишая)			
Herpesviridae, подсемейство ***Betaherpesvirineae***	*Cytomegalovirus //Human herpesvirus 5* (HHV-5)			
	Muromegalovirus // Murine herpes cytomegalovirus 1 (MuHV-1)			
	Proboscivirus // Elephantid herpesvirus 1 (ElHV-1)			
	Roseolovirus // Human herpesvirus 6 (HHV-6) (вирус экзантемы, или детской краснухи)			
Herpesviridae, подсемейство ***Gammaherpesvirineae***	*Lymphocryptovirus // Human herpesvirus 4* (HHV-4) (вирус Эпштейна—Барр)			
	Macavirus // Alcelaphine herpesvirus 1 (AlHV-1)			
	Percavirus // Equid herpesvirus 2 (EHV-2)			
	Rhadinovirus // Saimiriineae herpesvirus 2 (SaHV-2)			

Продолжение табл. 9

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Iridoviridae (от лат. iridescens — радужный)	*Chloriridovirus // Invertebrate iridescent virus 3*	Беспозвоночные; позвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 100 нм	Линейная; 140–383 тыс. п.н.
	Iridovirus // Invertebrate iridescent virus 1			
	Lymphocystivirus // Fish lymphocystic disease virus			
	Megalocystivirus // Infectuous spleen and kidney necrosis virus			
	Ranavirus // Frog virus 3			
Lipothrixviridae (от греч. lipos — толстый и thrichos — волос)	*Alphalipothrixvirus // **Thermoproteus tenax virus 1*** (TTV1)	Археи	Оболочный; капсид палочковидный; 35×350 нм	Линейная; 16 тыс. п.н.
	*Betalipothrixvirus // **Sulfolobus islandicus filamentous virus*** (SIFV)			
	*Gammalipothrixvirus // **Acidianus filamentous virus 1*** (AFV1)			
Malacoherpesviridae (от греч. malakion — моллюск и herpeton — пресмыкающееся)	*Ostreavirus // **Ostreid herpesvirus 1*** (OsHV-1)	Беспозвоночные (двустворчатые моллюски)	Оболочный; капсид икосаэдрический; 150–200 нм	Линейная; 134 тыс. п.н.
Mimiviridae (от греч. mimos — подражатель)	***Acanthamoeba polyphaga mimivirus*** (APMV)	Протисты	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 400 нм	Кольцевая; 1200 тыс. п.н.
Myoviridae (от греч. mis — мышь)	«Mu-like viruses» // *Enterobacteria phage **Mu*** (Mu)	Бактерии; археи	Безоболочный; икосаэдрическая или вытянутая головка, длинный сократимый отросток; 50×200 нм	Линейная; 39–169 тыс. п.н.
	«P1-like viruses» // *Enterobacteria phage **P1*** (P1)			
	«P2-like viruses» // *Enterobacteria phage **P2*** (P2)			
	«PBS1-like viruses» // *Bacillus phage **PBS1*** (PBS1)			
	«SPO1-like viruses» // *Bacillus phage **SPO1*** (SPO1)			
	«T4-like viruses» // *Enterobacteria phage **T4*** (T4)			
	«ΦH-like viruses» // *Halobacterium phage **ΦH*** (ΦH)			

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Nimaviridae (от лат. nima — нить)	*Whispovirus// White spot syndrome virus 1* (WSSV-1)	Беспозвоночные (ракообразные)	Оболочный; капсид овоидный с нитевидным придатком на конце; 275×120 нм	Кольцевая; 300 тыс. п.н.
Papillomaviridae (от лат. papilloma)	*Alphapapillomavirus // Human papillomavirus 32*	Позвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 30 нм	Кольцевая; 7–8 тыс. п.н.
	Betapapillomavirus // Human papillomavirus 5			
	Gammapapillomavi-rus // Human papillomavirus 32			
	Deltapapillomavirus // European elk papillomavirus			
	Epsilonpapillomavi-rus // Bovine papillomavirus 5			
	Zetapapillomaviruis // Equine papillomavirus 1			
	Etapapillomavirus // Fringilla coelebs papillomavirus			
	Thetapapillomavirus // Psittacus erithacus timneh papillomavirus			
	Iotapapillomavirus // Mastomys natalensis papillomavirus			
	Kappapapillomavirus // Cottontail rabbit papillomavirus			
	Lambdapapilloma-virus // Canine oral papillomavirus			
	Mupapillomavirus // Human papillomavirus 1			
	Nupapillomavirus // Human papillomavirus 41			
	Xipapillomavirus // Bovine papillomavirus 3			
	Omikronpapillomavi-rus // Phocoena spinipinnis papillomavirus			

Продолжение табл. 9

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Papillomaviridae	*Pipapillomavirus // Hamster oral papillomavirus*	Позвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 30 нм	Кольцевая; 7–8 тыс. п.н.
Phycodnaviridae (от греч. phycos — водоросль и DNA)	*Chlorovirus // Paramecium bursaria-Chlorella virus* (PBCV)	Одноклеточные водоросли	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 100 нм	Линейная; 160–380 тыс. п.н.
	Coccolithovirus // Emiliania huxleyi virus 86 (EHV 86)			
	Phaeovirus // Ectocarpus siliculosus virus 1 (ESV 1)			
	Prasinovirus // Micromonas pusilla virus SP1 (MPV SP1)			
	Prymnesiovirus // Chrysochromulina brevifilum virus PW1 (CBV PW1)			
	Raphidovirus // Heterosigma akashiwo virus 01 (HAV 01)			
Plasmaviridae (от лат. *Mycoplasma*)	*Plasmavirus // Acholeplasma phage L2*	Бактерии	Оболочный; капсид плеоморфный; 75 нм	Кольцевая; суперспирализованная; 12 тыс. п.н.
Podoviridae (от греч. podos — нога)	«N4-like viruses» // *Enterobacteria phage N4* (N4)	—"—	Безоболочный; икосаэдрическая головка, короткий хвостовой отросток; 50 нм	Линейная; 19–44 тыс. п.н.
	«P22-like viruses» // *Enterobacteria phage P22* (P22)			
	«T7-like viruses» // *Enterobacteria phage T7* (T7)			
	«ϕ29-like phages» // *Bacillus phage ϕ29* (ϕ29)			
Polydnaviridae (от греч. poly — много и DNA)	*Bracovirus // Cotesia melanoscela bracovirus*	Беспозвоночные	Оболочный; капсид палочковидный; 60–75×200–250 нм	Линейная; сегментированная; 150–250 тыс. п.н.
	Ichnovirus // Campoletis sonorensis ichnovirus			
Polyomaviridae (от лат. polyoma)	*Polyomavirus // Simian virus 40* (SV40)	Позвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 30 нм	Кольцевая; 5 тыс. п.н.

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Poxviridae (от англ. pock — оспина), подсемейство ***Chordopoxvirineae***	*Avipoxvirus* // *Fowlpox virus* (FWPV)	Позвоночные	Оболочный; капсид сложного устройства; 150×275 нм	Линейная; 130–375 тыс. п.н.
	Capripoxvirus // *Sheeppox virus* (SPPV)			
	Leporipoxvirus // *Myxoma virus* (MYXV)			
	Molluscipoxvirus // *Molluscum contagiosum virus* (MOCV)			
	Orthopoxvirus // *Vaccinia virus* (VACV) (вирус осповакцины)			
	Parapoxvirus // *Orf virus* (ORFV) (вирус орфа, или инфекционного пустулезного дерматита)			
	Suipoxvirus // *Swinepox virus* (SWPV)			
	Yatapoxvirus // *Yaba monkey tumor virus* (YMTV)			
Poxviridae, подсемейство ***Entomopoxvirineae***	*Alphaentomopoxvirus* // *Melontha melontha entomopoxvirus* (MMEV)	Беспозвоночные	Оболочный; капсид сложного устройства; 125×225 нм	Линейная; 130–375 тыс. п.н.
	Betaentomopoxvirus // *Amsacta moorei entomopox virus "L"* // AMEV)			
	Gammaentomopoxvirus // *Chironomus luridus tetans entomopoxvirus* (CLEV)			
Rudiviridae (от лат. rudis — палочка)	*Rudivirus* // *Sulfolobus islandicus rod-shaped virus 1* (SIRV1)	Археи	Безоболочный; капсид палочковидный с нитями на концах; 23×850 нм	Линейная; 32–35 тыс. п.н.
Siphoviridae (от греч. siphō — трубка)	«c2-like viruses» // *Lactococcus phage c2* (c2)	Бактерии	Безоболочный; икосаэдрическая головка, длинный несократимый хвостовой отросток; 50×275 нм	Линейная; 22–121 тыс. п.н.
	«L5-like viruses» // *Mycobacterium phage L5* (L5)			
	«N15-like viruses» // *Enterobacteria phage N15* (N15)			
	«T1-like viruses» // *Enterobacteria phage T1* (T1)			

Окончание табл. 9

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Siphoviridae	«T5-like viruses» // *Enterobacteria phage **T5*** (T5)	Бактерии	Безоболочный; икосаэдрическая головка, длинный несократимый хвостовой отросток; 50×275 нм	Линейная; 22–121 тыс. п.н.
	«λ-like viruses» // *Enterobacteria phage **λ*** (λ)			
	«ΦC31-like viruses» // *Streptomyces bacteriophage **ϕC31*** (phiC31)			
	«ΨM1-like viruses» // *Methanobacterium phage **ΨM1*** (psiM1)			
Tectiviridae (от лат. tectus — одетый)	*Tectivirus // Enterobacteria phage **PRD1*** (PRD1)	— " —	Безоболочный; капсид икосаэдрический двуслойный; 50 нм	Линейная; 15 тыс. п.н.
Вне семейства	*Rhizidiovirus // **Rhizidiomyces virus*** (RZV)	Грибы	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 60 нм	Линейная; 25,5 тыс. п.н.

Таблица 10. **Вирусы, содержащие ssДНК**

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Anelloviridae (от лат. anellus — колечко)	*Alphatorquevirus // Torque Teno virus 1–29* (TTV)	Позвоночные (млекопитающие и птицы)	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 30 нм	Кольцевая; 4 тыс. н.
	Betatorquevirus // Torque Teno virus 1–9			
	Gammatorquevirus // Torque Teno midi virus			
	Deltatorquevirus // Torque Teno Tupaya virus			
	Epsilontorquevirus // Torque Teno Tamarin virus			
	Zetatorquevirus // Torque Teno Douroucouli virus			
	Etatorquevirus // Torque Teno Felis virus			
	Thetatorquevirus // Torque Teno Canis virus			
	Iotatorquevirus // Torque Teno Sus virus 1&2			

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Circoviridae (от лат. circus — кольцо)	*Circovirus // Porcine cyrcovirus 1*	Позвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 20 нм	Кольцевая; 2 тыс. н.
	Gyrovirus // Chicken anemia virus			
Geminiviridae (от лат. geminus — парный)	*Begomovirus // Bean golden yellow mosaic virus*	Растения	Безоболочный, капсид икосаэдрический; 20 нм	Кольцевая; 3–6 тыс. н.; геном (не) партитный
	Curtovirus // Bean curly top virus			
	Mastrevirus // Maize streak virus			
	Topocuvirus // Tomato pseudo-curly top virus			
Inoviridae (от греч. inavos — большой)	*Inovirus // Enterobacteria phage **M13*** (M13)	Бактерии	Безоболочный; капсид палочковидный (17×90 нм) или нитчатый (7×470 нм)	Кольцевая; 7–9 тыс. н.
	*Plectrovirus // Acholeplasma phage **MV-L51*** (MV-L51)			
Microviridae (от греч. micros — маленький)	*Bdellomicrovirus // Bdellovibrio phage **MAC 1*** (MAC1)	—"—	Безоболочный, икосаэдрический; 20 нм	Кольцевая; 4–6 тыс. н.
	Chlamydiamicrovirus // Chlamydia phage 1			
	*Microvirus // Enterobacteria phage **ϕX174*** (ϕX174)			
	Spiromicrovirus // Spiroplasma phage 4			
Nanoviridae (от греч. nanos — карлик)	*Nanovirus // Subterranean clover stunt virus*	Растения	Безоболочный, икосаэдрический; 20 нм	Кольцевая; 6–9 тыс. н.; геном сегментированный
	Babuvirus // Banana bunchy top virus			
Parvoviridae (от лат. parvus — маленький), подсемейство ***Densovirineae***	*Brevidensovirus // Aedes aegypti densovirus*	Беспозвоночные	Безоболочный, икосаэдрический; 20 нм	Кольцевая; 4–6 тыс. н.
	Densovirus // Junonia coenia densovirus			
	Iteravirus // Bombyx mori densovirus			
	Pefudensovirus // Periplaneta fuliginosa densovirus			

Окончание табл. 10

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Parvoviridae, подсемейство ***Parvovirineae***	*Amdovirus // Aleutian mink disease virus*	Беспозвоночные	Безоболочный, икосаэдрический; 20 нм	Кольцевая; 4–6 тыс. н.
	Bocavirus // Bovine parvovirus			
	Dependovirus // Adeno-associated virus 2			
	Erythrovirus // B19 virus			
	Parvovirus // Murine minute virus			

Таблица 11. **Вирусы, содержащие dsРНК**

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Birnaviridae (сокр. от англ. **bi**segmented и **RNA**)	*Aquabirnavirus // Infectious pancreatic necrosis virus* (IPNV)	Беспозвоночные; позвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 40 нм	Линейная; 6 тыс. п.н.; геном сегментированный
	Avibirnavirus // Infectious bursal disease virus (IBDV)			
	Entomobirnavirus // Drosophila X virus (DXV)			
Chrysoviridae (от греч. chrysos — желто-зеленый)	*Chrysovirus // Penicillium chrysogenum virus* (PcV)	Грибы	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 40 нм	Линейная; 12,3 тыс. п.н.; геном сегментированный мультипартитный
Cystoviridae (от греч. kistis — коробочка)	*Cystovirus // Pseudomonas phage φ6* (Φ6)	Бактерии	Оболочный; капсид икосаэдрический; 50 нм	Линейная; 13 тыс. п.н.; геном сегментированный
Endornaviridae (от англ. endogenus и RNA)	*Endornavirus // Vicia faba endornavirus* (VFV)	Растения	Не образует вирионы	Линейная; 14 тыс. п.н.
Hypoviridae (от англ. hypovirulence)	*Hypovirus // Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1)	Грибы	Плеоморфный, не образует капсид; нуклеопротеин находится внутри хозяйской вакуоли; 50–80 нм	Линейная; полиА на 3'-конце; 10–13 тыс. п.н.

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Partitiviridae (от лат. partitus — разделенный)	*Alphacryptovirus // White clover cryptic virus 1* (WCCV-1)	Растения; грибы	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 25–40 нм	Линейная; 3–10 тыс. п.н.; геном сегментированный мультипартитный
	Betacryptovirus // White clover cryptic virus 2 (WCCV-2)			
	Partitivirus // Atkinsonella hypoxylon virus (AhV)			
Picobirnaviridae (от исп. pico — маленький, сокр. англ. bisegmented и RNA)	*Picobirnavirus // Human picobirnavirus*	Животные (млекопитающие)	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 35 нм	Линейная; 4 тыс. п.н.; геном сегментированный
Reoviridae (от сокр. англ. respiratory–enteric–orphan)	*Aquareovirus // Aquareovirus A*	Растения; беспозвоночные; позвоночные	Безоболочный; капсид двойной икосаэдрический; 70 нм	Линейная; 18–30 тыс. п.н.; геном сегментированный
	Coltivirus // Colorado tick fever virus (CTFV)			
	Cypovirus // Cypovirus 1 (CPV 1)			
	Fijivirus // Fiji disease virus			
	Idnoreovirus // Idnoreovirus 1			
	Mycoreovirus // Mycoreovirus 1			
	Orbivirus // Bluetongue virus			
	Orthovirus // Mammalian orthoreovirus			
	Oryzavirus // Rice ragged stunt virus			
	Phytoreovirus // Rice dwarf virus			
	Rotavirus // Rotavirus A			
Totiviridae (от лат. totus — неразделенный)	*Giardiavirus // Giardia lamblia virus* (GLV)	Протисты; грибы	Безоболочный, изометрический; 30 нм	Линейная; 5–7 тыс. п.н.
	Leishmaniavirus // Leishmania RNA virus 1-1 (LRV 1-1)			

Окончание табл. 11

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Totiviridae	*Totivirus // Saccharomyces cerevisiae virus L-A* (ScVLA)	Протисты; грибы	Безоболочный, изометрический; 30 нм	Линейная; 5–7 тыс. п.н.
	Trichomonasvirus // Trichomonas vaginalis virus 1 (TVV1)			
	Victorivirus // Helminthosporium victoriae virus 190S			
Вне семейства	*Varicosavirus* (от лат. varix — варикозное расширение сосуда) // *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV)	Растения	Безоболочный, палочковидный; 20×250 нм	Линейная; 13 тыс. п.н.; геном сегментированный

Таблица 12. **Вирусы, содержащие ssРНК(+)**

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Alphaflexiviridae (от лат. flexilis — гибкий)	*Allexivirus // Shallot virus X* (SVX)	Растения; грибы	Безоболочный; капсид нитевидный; 10×500 нм	Линейная; 6–9 тыс. н.; 5'-конец кэпирован; полиА на 3'-конце
	Botrexvirus // Botrytis virus X			
	Lolavirus // Lolium latent virus (LoLV)			
	Mandarivirus // Indian citrus ringspot virus (ICRV)			
	Potexvirus // Potato virus X (PVX)			
	Sclerodarnavirus // Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus			
Arteriviridae (от лат. arteria — горло)	*Aterivirus // Equine arteritis virus*	Позвоночные	Оболочный; капсид сложного строения; 65 нм	Линейная; 13–16 тыс. н.
Astroviridae (от лат. astra — звезда)	*Astrovirus // Turkey astrovirus*	—"—	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 20 нм	Линейная; 7–8 тыс. н.
Barnaviridae (от сокр. англ. baciliform и RNA)	*Barnavirus // Mushroom baciliform virus* (MBV)	Грибы	Безоболочный; капсид икосаэдрический вытянутый; 20×50 нм	Кольцевая; 4 тыс. н.

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Betaflexiviridae (от лат. flexilis — гибкий)	*Capilloviruis // Apple stem grooving virus* (ASGV)	Растения	Безоболочный; капсид нитевидный; 12×800 нм	Линейная; 6–9 тыс. н.; 5'-конец кэпирован; полиА на 3'-конце
	Carlavirus // Carnation latent virus (CLV)			
	Citrivirus // Indian citrus ringspot virus (ICRSV)			
	Foveavirus // Apple stem pitting virus (ASPV)			
	Trichovirus // Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)			
	Vitivius // Grapevine virus A (GVA)			
Bromoviridae (от сокр. англ. — broad bean mottle)	*Alfamovirus // Alfalfa mosaic virus* (AMV)	—"—	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 25 нм	Линейная; 8–9 тыс. н.; 5'-конец кэпирован; геном мультипартитный
	Bromovirus // Brome mosaic virus (BMV)			
	Cucumovirus // Cucumber mosaic virus (CMV)			
	Ilarvirus // Tobacco streak virus (TSV)			
	Oleavirus // Olive latent virus 2 (OLV-2)			
Caliciviridae (от греч. calyx — чашечка цветка)	*Lagovirus // Rabbit hemorrhagia disease virus*	Позвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 20 нм	Линейная; 7–8 тыс. н.
	Norovirus // Norwalk-like virus			
	Sapovirus // Sapporo-like virus (SV)			
	Vesivirus // Vesicular exanthema of swine virus			
Closteroviridae (от греч. kloster — веретено)	*Ampelovirus // Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3)	Растения	Безоболочный, капсид нитевидный; 10×1000 нм	Линейная; 15–19 тыс. н.; 5'-конец кэпирован; геном партитный
	Closterovirus // Beet yellows virus (BYV)			
	Crinivirus // Lettuce infectuous yellows virus (LIYV)			
Coronaviridae (от лат. corona — венец)	*Coronavirus // Infectuous bronchitis virus*	Позвоночные	Безоболочный; капсид сферический; 60 нм	Линейная; 27–31 тыс. н.
	Torovirus // Equine torovirus			

Продолжение табл. 12

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Dicistroviridae (от сокр. англ. dicistronic)	*Cripavirus // **Cricket paralysis virus*** (CrPV)	Беспозвоночные	Безоболочный; капсид сферический; 27 нм	Линейная; 8,5–10,2 тыс. н.; полиА на 3'-конце
Flaviviridae (от лат. flavus — желтый)	*Flavivirus // **Yellow fever virus*** (вирус желтой лихорадки)	Беспозвоночные; позвоночные	Оболочный; капсид икосаэдрический; 40 нм	Линейная; 10–12 тыс. н.
	*Hepacivirus // **Hepatitis C virus***			
	*Pestivirus // **Bovine viral diarrhea virus 1***			
Gammaflexiviridae	*Mycoflexivirus // **Botrytis virus F*** (BotV-F)	Грибы	Безоболочный; капсид нитевидный; 12×720 нм	Линейная; 7 тыс. н.; 5'-конец кэпирован; полиА на 3'-конце
Hepeviridae (сокр. англ. **Hep**atitis **E** virus)	***Hepatitis E virus*** (HEV)	Позвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 30 нм	Линейная; 7 тыс. н.; полиА на 3'-конце
Iflaviridae (от сокр. англ. infectuous **flacherie**)	*Iflavirus // **Infectuous flacherie virus*** (IFV)	Беспозвоночные (насекомые)	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 30 нм	Линейная; 8,8–9,7 тыс. н.; полиА на 3'-конце
Leviviridae (от лат. levis — небольшой)	*Allolevivirus // **Enterobacteria phage Qβ*** (Qβ)	Бактерии	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 20 нм	Линейная; 3–4 тыс. н.
	*Levivirus // **Enterobacteria phage MS2*** (MS2)			
Luteoviridae (от лат. luteus — желтый)	*Enamovirus // **Pea enation mosaic virus-1*** (PEMV-1)	Растения	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 30 нм	Линейная; 6 тыс. н.
	*Luteovirus // **Barley yellow dwarf virus-PAV*** (BYDV-PAV)			
	*Polerovirus // **Potato leafroll virus*** (PLRV)			
Marnaviridae (от лат. mare — море и RNA)	*Marnavirus // **Heterosigma akashiwo RNA virus*** (HaRNAV)	Протисты	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 25 нм	Линейная; 8 тыс. н.; полиА на 3'-конце
Narnaviridae (от сокр. англ. naked и RNA)	*Narnavirus // **Saccharomyces cerevisiae narnavirus 20S*** (ScNV-20S)	Грибы	Не образует капсида	Линейная; 2–3 тыс. н.
	*Mitovirus // **Cryphonectria mitovirus 1*** (CMV1)			

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Nodaviridae (от лат. nodus — узловатый)	*Alphanodavirus // Nodamura virus*	Беспозвоночные	Безоболочный; икосаэдрический; 30 нм	Линейная; 4,5 тыс. н.; кэп на 5'-конце; геном сегментированный
	Betanodavirus // Striped jack nervous necrosis virus			
Picornaviridae (от итал. piccolo — маленький и RNA)	*Cardiovirus // Encephalomyocarditis virus*	Позвоночные	Безоболочный; икосаэдрический; 25 нм	Линейная; 7–8 тыс. н.; геном сегментирован
	Enterovirus // Poliovirus (PV)			
	Hepatovirus // Hepatitis A virus			
	Parechovirus // Human parechovirus			
	Rhinovirus // Human rhinovirus 1A			
Potyviridae (от сокр. англ. potato, Y-type)	*Bymovirus // Barley yellow mosaic virus* (BaYMV)	Растения	Безоболочный; капсид нитевидный; 7×500 нм	Линейная; 8–12 тыс. н.; геном сегментированный
	Ipomovirus // Sweet potato mild mottle virus (SPMMV)			
	Macluravirus // Maclura mosaic virus (MacMV)			
	Potyvirus // Potato virus Y (PVY)			
	Rymovirus // Ryegrass mosaic virus (RGMV)			
	Tritimovirus // Wheat streak mosaic virus (WSMV)			
Roniviridae (от сокр. англ. rod-shaped nidovirus)	*Okavirus // Gill-associated virus*	Беспозвоночные	Оболочный; капсид палочковидный; 50×175 нм	Линейная; 26 тыс. н.
Secoviridae (от сокр. названий упраздненных семейств ***Sequiviridae*** и ***Comoviridae***), подсемейство ***Sequivirineae***	*Cleravirus // Cherry rasp leaf virus* (CRLV)	Растения	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 25–30 нм	Линейная; 10–15 тыс. н.; полиА на 3'-конце; геном 2-сегментный (м.б. бипартитный)
	Sadwavirus // Satsuma dwarf virus (SDV)			
	Sequivirus // Parsnip yellow fleck virus (PYFV)			

Продолжение табл. 12

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Secoviridae, подсемейство ***Sequivirineae***	*Torradovirus // Tomato torrado virus* (ToTV)	Растения	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 25–30 нм	Линейная; 10–15 тыс. н.; полиА на 3'-конце; геном 2-сегментный (м.б. бипартитный)
	Waikivirus // Rice tungro spherical virus (RTSV)			
Secoviridae, подсемейство ***Comovirineae*** (сокр. от англ. cowpea mosaic)	*Comovirus // Cowpea mosaic virus* (CPMV)			
	Fabavirus // Broad bean wilt virus 1 (BBWV-1)			
	Nepovirus // Tobacco ringspot virus (TRSV)			
Tetraviridae (от греч. tetra — четыре; *число осей симметрии икосаэдра*)	*Betatetravirus // Nudaurelia capensis tetravirus*	Беспозвоночные	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 40 нм	Линейная; 6–8 тыс. н.
	Omegatetravirus // Nudaurelia capensis ω virus			
Togaviridae (от лат. toga — покров)	*Alphavirus // Sindbis virus*	Позвоночные	Оболочный; капсид икосаэдрический; 65 нм	Линейная; 10–12 тыс. н.
	Rubivirus // Rubella virus (вирус краснухи)			
Tombusviridae (от сокр. англ. tomato bushy stunt)	*Aureusvirus // Pothos latent virus* (PolV)	Растения	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 35 нм	Линейная, 4–5 тыс. н.; геном партитный
	Avenavirus // Oat chlorotic stunt virus (OCSV)			
	Carmovirus // Carnation mottle virus (CarMV)			
	Dianthovirus // Carnation ringspot virus (CRSV)			
	Machlomovirus // Maize chlorotic mottle virus (MCMV)			
	Necrovirus // Tobacco necrosis virus A (TNV-A)			
	Panicovirus // Panicum mosaic virus (PMV)			
	Tombusvirus // Tomato bushy stunt virus (TBSV)			
Tymoviridae (от сокр. англ. turnip yellow mosaic)	*Maculavirus // Grapevine fleck virus* (GFV)	—"—	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 50 нм	Линейная; 6–7 тыс. н.; 5'-конец кэпирован; полиА на 3'-конце

Окончание табл. 12

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Tymoviridae	*Marafivirus // Maize rayado fino virus* (MRFV)	Растения	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 50 нм	Линейная; 6–7 тыс. н.; 5'-конец кэпирован; полиА на 3'-конце
	Tymovirus // Turnip yellow mosaic virus (TYMV)			
Virgaviridae (от лат. virga — палка)	*Furovirus // Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV)	—"—	Безоболочный; капсид палочковидный; 15×45–225 нм	Линейная; 6–16 тыс. н.; 5'-конец кэпирован; геном у некоторых видов мультипартитный
	Hordeivirus // Barley stripe mosaic virus (BSMV)			
	Pecluvirus // Peanut clump virus (PCV)			
	Pomovirus // Potato mop-top virus (PMTV)			
	Tobamovirus // Tobacco mosaic virus (TMV)			
	Tobravirus // Tobacco rattle virus (TRV)			
Вне семейства	*Idaeovirus // Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV)	—"—	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 50 нм	Линейная; 8 тыс. н.; 5'-конец кэпирован; геном партитный
	Ourmiavirus // Ourmia melon virus (OMV)	—"—	—"—	Линейная; 5 тыс. н.; геном сегментированный
	Sobemovirus // Southern bean mosaic virus (SBMV)	—"—	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 30 нм	Линейная; 4 тыс. н.
	Umbravirus // Carrot mottle virus (CmoV)	—"—	Безоболочный; капсид икосаэдрический; 25 нм	—"—

Таблица 13. **Вирусы, содержащие ssРНК(–)**

Семейство	Род // вид (пример)	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Arenaviridaee (от лат. arena — песок)	*Arenavirus // Lymphocytic choriomeningitis virus*	Позвоночные	Оболочный; капсид сферический; 75 нм	Кольцевая; 11 тыс. н.; геном сегментированный
Bornaviridae (от назв. города Борна в Германии)	*Bornavirus // Borna disease bornavirus*	Позвоночные	Оболочный; капсид сферический; 70–130 нм	Линейная; 6 тыс. н.
Bunyaviridae (от назв. поселения Буньямвера в Уганде)	*Hantavirus // **Hantaan virus*** (HNTV)	Растения, беспозвоночные; позвоночные	Оболочный; капсид сферический; 90–105 нм	Линейная; 11–19 тыс. н.; геном сегментированный
	*Nairovirus // **Dugbe virus*** (DUGV)			
	*Orthobunyavirus // **Bunyamwera virus*** (BUNV)			
	Phlebovirus // Rift Valley fever virus			
	Tospovirus // Tomato spotted wilt virus (TSWV)			
Filoviridae (от лат. filum — нить)	*Ebolavirus // Zaire Ebola virus*	Позвоночные	Оболочный; капсид палочковидный; 30×375 нм	Линейная; 19 тыс. н.
	Marburgvirus // Marburg virus			
Orthomyxoviridae (от греч. ortho — прямой и муха — слизь; *настоящие ортомиксовирусы*)	*Influenzavirus A // Influenza A virus*	—"—	Оболочный; капсид сферический; 75 нм	Линейная; 10–15 тыс. н.; геном сегментированный
	Influenzavirus B // Influenza B virus			
	Influenzavirus C // Influenza C virus			
	Thogotovirus / Thogoto virus			
Paramyxoviridae (от греч. para — в стороне и муха — слизь; *отличающиеся от настоящих миксовирусов*), подсемейство ***Paramyxovirineae***	*Morbillivirus // Measles virus* (вирус кори)	—"—	Оболочный; капсид спиральный; 1000 нм	Линейная; 15 тыс. н.
	Respirovirus // Sendai virus			
	Rubulavirus // Mumps virus (вирус свинки)			
Paramyxoviridae, подсемейство ***Pneumovirineae***	*Metapneumovirus // Avian pneumovirus*			
	Pneumovirus // Human respiratory syncytial virus			

Окончание табл. 13

Семейство	Род // вид (пример)	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Rhabdoviridae (от греч. rhabdos — палка)	*Cytorhabdovirus // Lettuce nevrotic yellows virus* (LNYV)	Растения; беспозвоночные; позвоночные	Оболочный; капсид палочковидный; 75×200 нм	Линейная; 11–15 тыс. н.
	Ephemerovirus // Bovine ephemeral fever virus (BEFV)			
	Lyssavirus // Rabies virus (RABV) (вирус бешенства)			
	Novirhabdovirus // Infectuous hematopoietic necrosis virus (IHNV)			
	Nucleorhabdovirus // Potato yellow dwarf virus (PYDV)			
	Vesiculovirus // Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV)			
Вне семейства	*Deltavirus // Hepatitis delta virus* (HDV)	Животные	Оболочный; капсид сферический; 36 нм	Колцевая; 1,7 тыс. н.

Таблица 14. **Ретровирусы, содержащие ssРНК(+)**

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Metaviridae (от греч. meta — измененный)	*Errantivirus // Drosophila melanogaster Gypsy virus*	Растения; грибы; беспозвоночные	Оболочный; капсид сферический, нерегулярного размера	Линейная, 4–10 тыс. н.
	Metavirus // Saccharomyces cerevisiae Ty3 virus			
	Semotyvirus // Ascaris lumbricoides Tas virus			
Pseudoviridae (от лат. pseudo — мнимый)	*Hemivirus // Drosophila melanogaster copia virus*	—"—	Безоболочный; капсид сферический; 50 нм	Линейная, 4,2–9,7 тыс. н.
	Pseudovirus // Saccharomyces cerevisiae Ty1 virus			
	Sirevirus // Glycine max SIRE1 virus			
Retroviridae (от лат. retro — обратно)	*Retrovirus // Human immunodeficiency retrovirus* (HIV)	Позвоночные	Оболочный; капсид неправильной формы; 75 нм	Линейная; 7–12 тыс. н.; геном сегментированный

Таблица 15. **Ретровирусы, содержащие dsДНК**

Семейство	Род // типовой вид	Хозяева	Морфология и усредненный размер вириона	Геномная нуклеиновая кислота
Caulimoviridae (сокр. от англ. **cauli**flower и **mo**saic)	*Badnavirus // Commelina yellow mottle virus*	Растения	Безоболочный; капсид изометрический; 30 нм	Кольцевая или линейная; 8 тыс. п.н.; геном трипартитный
	Caulimovirus // Cauliflower mosaic virus (CMV)			
	Cavemovirus // Cassava vein mosaic virus			
	Petuvirus // Petunia vein clearing virus			
	Soymovirus // Soybean chlorotic mottle virus			
	Tungrovirus // Rice tungro bacilliform virus			
Hepadnaviridae (сокр. от греч. hepar — печень и DNA), подсемейство ***Avihepadnaviridae***	*Avihepadnavirus // Duck hepatitis B virus*	Позвоночные	Оболочный; капсид изометрический; 35 нм	Кольцевая, частично одноцепочная; 3 тыс. п.н.
Hepadnaviridae, подсемейство ***Orthohepadnavirineae***	*Orthohepadnavirus // Hepatitis B virus*			

Конкретные данные о хозяевах, морфологии и усредненном размере вирионов, а также о свойствах геномной нуклеиновой кислоты почерпнуты, в частности, из базы данных ICTV (http://www.ncbi.nlm.nih.gov//ICTVdb). Дополнительную информацию, в том числе схематические изображения вирионов, можно найти на сайте ViralZone.

1.9. РОЛЬ ВИРУСОВ В ЭКОСИСТЕМАХ

Еще недавно вирусов считали лишь болезнетворными агентами, которые могут приносить только вред (традиционные аспекты вирусологии, медицинский и сельскохозяйственный, рассматриваются в главах 3 и 6). Соответственно, изучение вирусов долго не выходило за рамки анализа симптомов и механизмов вызываемых ими болезней. Позднее взаимоотношения вирусов с хозяевами стали интерпретировать как «гонку вооружений», в которой конфликтующие стороны расширяют арсеналы средств нападения и защиты, чтобы одержать верх в борьбе за существование.

Поначалу из-за отсутствия фактического материала ничто не указывало на фундаментальную роль вирусов в биологической эволюции и экосистемах, и только результаты исследований последних 15–20 лет позволили правильно расставить акценты в общей и частной вирусологии.

Методологический прогресс молекулярной биологии, в частности широкое применение ДНК-технологий, в корне изменил представления о роли и месте вирусов в живой природе. Они уже не могут восприниматься только с негативной стороны;

их положительная роль доказывается ранее неизвестными фактами и новыми концепциями.

Экологическое разнообразие вирусов. Результаты глобальных исследований биологии Мирового океана, предпринятых в конце XX в., ускорили развитие морской вирусологии. Из прикладной дисциплины, изучавшей заболевания объектов аквакультуры (в частности, креветок и морских черепах), она превратилась в один из важнейших разделов океанологии.

Насколько велико разнообразие вирусов в Мировом океане? Стандартный подход, используемый при анализе биоразнообразия микробов, — лабораторное культивирование и секвенирование анонимных нуклеотидных последовательностей — нельзя универсально адаптировать к вирусам, хозяева которых часто оказываются некультивируемыми и которые не содержат обязательные для живого организма консервативные гены (в частности, гены рРНК).

Поэтому в основе метагеномики вирусов лежит извлечение тотальной ДНК и/или РНК из природных образцов и их высокопроизводительное секвенирование (рис. 23).

По мере пополнения банков нуклеотидных последовательностей выяснилось, что морские вирусы удивительно разнообразны. На литр морской воды в среднем приходится ~5000 вирусных генотипов (которые, возможно, могут быть приравне-

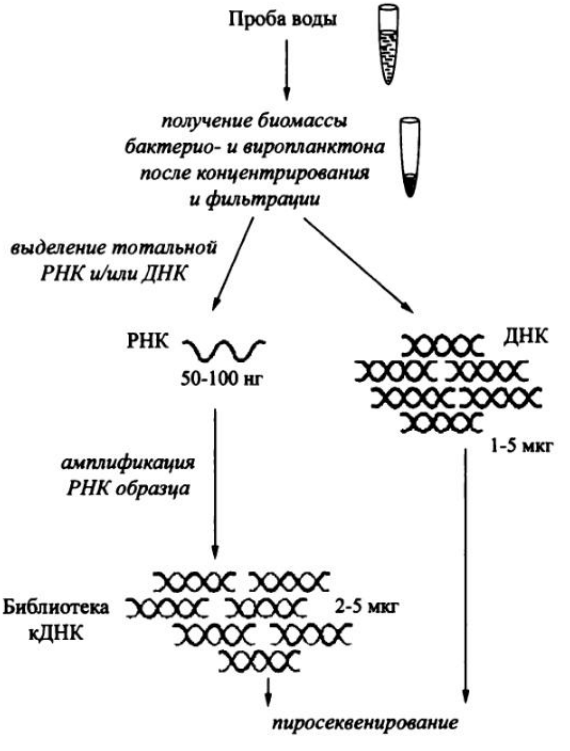


Рис. 23. Схема проведения метагеномного анализа водного микробного сообщества.

ны к видам), а на один килограмм донных отложений — до 10^6. Общее число видов вирусов в Мировом океане составляет, как минимум, несколько сотен тысяч (напомним, что число вирусных частиц на Земле оценивается астрономической цифрой — 10^{31}).

Поскольку 80% метагенома морских вирусов обнаруживается в географически удаленных друг от друга местах Мирового океана, можно говорить о природном генетическом банке вирусов, которые распространены во всех морях — согласно классической формуле голландского микробиолога Мартинуса Бейеринка (англ. «everything is everywhere, but the environment selects»; *имеется в виду, что для микробов не существует географических барьеров, хотя возможность их размножения зависит от локальных экофизиологических условий*). Главный фактор, определяющий их количество в данном месте и в данный момент, — это численность хозяев.

Естественно, что разнообразие вирусов зависит от условий окружающей среды, определяющих большее или меньшее видовое разнообразие хозяев. Так, самое представительное вирусное сообщество (~129 тыс. генотипов) обнаружено в Атлантическом океане у берегов Британской Колумбии. По-видимому, это объясняется тем, что в данном регионе находится восходящее морское течение (апвеллинг), которое выносит на поверхность биогенные элементы, стимулирующие развитие богатейшего разнообразия хозяев. В свою очередь, один из самых скудных комплексов вирусов (532 генотипа) выявлен в водах Северного Ледовитого океана.

Почвенные вирусы изучены гораздо хуже морских. Традиционные методы исследования (культивирование хозяев, электронная микроскопия, пульс-электрофорез геномной нуклеиновой кислоты, амплификация консервативных последовательностей и др.), которые приносили локальный успех в изучении морских вирусов, в данном случае оказались бесполезными. Из всех существующих методов оценки микробного биоразнообразия почвы эффективен только метагеномный анализ, однако его стали использовать сравнительно недавно.

Установлено, что каждый тип почвы характеризуется собственным, порой уникальным, набором ранее неизвестных вирусов (в отличие от локально перекрывающихся ассортиментов морских вирусов). Оказалось, что численность разных вирусов в почвах дождевых лесов на порядки выше, чем в пустынях и прериях. При этом не более 35% последовательностей метагенома вирусов из почвенных образцов имеет сходство с последовательностями, хранящимися в базах данных. Это означает, что почвы содержат богатейшее разнообразие вирусов, в геномах которых множество генов, функцию которых еще предстоит выяснить.

Концептуальным прорывом в глобальной экологии стало понимание роли вирусов в круговороте углерода — одного из элементов так называемой микробной петли (рис. 24).

Участие вирусов в микробной петле. Экологическая концепция, которую мы теперь называем концепцией ***микробной петли*** (англ. microbial loop), была коллективно сформулирована в конце 70-х годов XX в., хотя сам термин был предложен только в 1983 г. индо-американским микробиологом Файзулом Азамом (F. Azam) и его соавторами. Она заключается в том, что первичную продукцию в Мировом океане обеспечивают автотрофные бактерии, автотрофные протисты и микроскопические во-

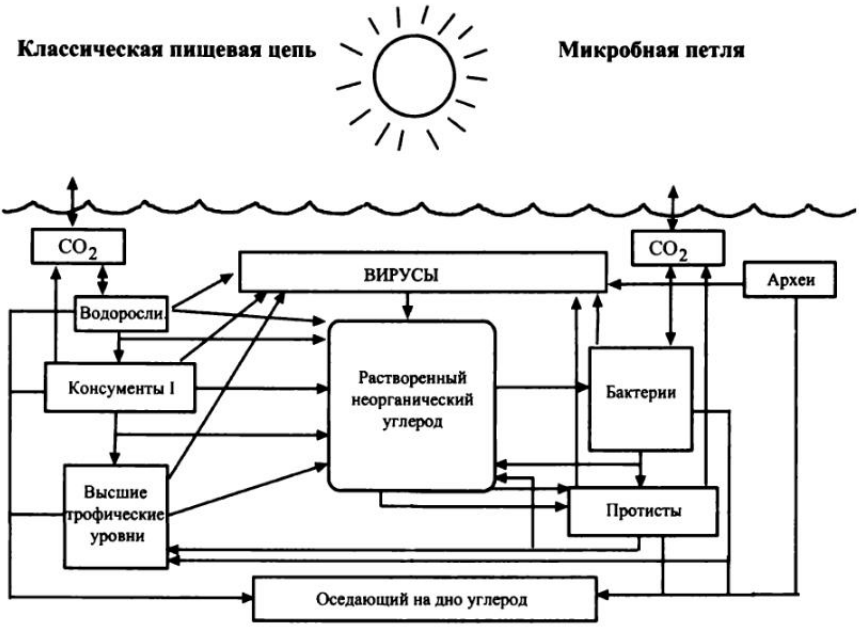


Рис. 24. Классическая пищевая цепь и микробная петля.

Объяснение в тексте.

доросли. Гетеротрофные бактерии и гетеротрофные протисты используют органические продукты, которые выделяют эти первичные продуценты, а также их мортмассу. Минерализованные биогенные элементы в составе $CO_2/HCO_3^-/CO_2^{2-}$ (англ. dissolved inorganic carbon, DIC), нитрата, сульфата и фосфата переходят в окружающую среду и вновь ассимилируются автотрофами. Таким образом, круг замыкается.

Концепция микробной петли объясняет, почему органическое вещество не захоранивается в донных отложениях, а биогенные элементы не покидают биологический круговорот. Долгое время считалось, что микробная петля адекватно отражает основу биогеохимических превращений в Мировом океане. Однако при моделировании потока субстратов и энергии между автотрофами и гетеротрофами парадоксально «пропадало» до 30% циркулирующей органики, что указывало на присутствие ранее неизвестного звена микробной петли.

Претендентами на эту роль оказались выявленные к тому времени, причем в очень большом количестве, анонимные литические вирусы. Именно они ответственны за гибель 10–50% морских бактерий, а также, вероятно, микроскопических водорослей и протистов. В отдельных биотопах, в частности в глубоководной микроаэробной зоне, этот показатель приближается к 100%. Массовая гибель хозяев от вирусной инфекции в кратчайшие сроки высвобождает компоненты биомассы бактерио- и фитопланктона в пул растворенного органического вещества и минеральных элементов. В частности, показана главенствующая роль вирусов в прерывании массового «цветения» водоемов (см. главу 4).

Таким образом, микробная петля дополнилась вирусной составляющей. Иными словами, основная экологическая роль вирусов заключается в участии в перераспределении потоков органического вещества. Именно они способствуют поддержанию огромного количества углерода и других биогенных элементов в растворенном состоянии, в котором они доступны автотрофному бактериопланктону.

По расчетам в Мировом океане ежедневно происходит ~10^{29} актов продуктивной вирусной инфекции, в результате чего в растворимое состояние переходит ~10^8–10^9 т углерода.

По всей видимости, аналогичную роль выполняют вирусы сухопутных экосистем; однако экологическая вирусология почвы пока находится в зачаточном состоянии.

Регулирование вирусами численности их хозяев. Другой важной ролью вирусов в экосистемах является активное регулирование ими численности организмов-хозяев. В частности, это происходит в морских экосистемах, где подавляющая часть биомассы приходится на микроорганизмов. Ежесекундно вирусы инфицируют ~10^{23} микробных клеток, половина из которых повергается лизису. Таким путем регулируется состав бактериопланктона, в первую очередь пикопланктона. В основном эту роль выполняют бактериофаги, а также «гигантские» вирусы, содержащие dsДНК.

Вирусы являются основным элементом экологической модели «убей победителя» (англ. kill the winner), предложенной в 1997 г. норвежским микробиологом Троном Тингстадом (T. F. Thingstad) с соавторами. Согласно ей в каждом биотопе сосуществует несколько доминирующих видов, которые конкурируют за одни и те же трофические ресурсы. В популяции победителя немедленно вспыхивает вирусная инфекция, что позволяет другому виду прийти ему на смену. Сукцессия видов позволяет поддерживать высокое биоразнообразие в морских экосистемах, поскольку каждый вид получает возможность временно доминировать, после чего основная часть его особей уничтожается специфическим вирусом.

Коэволюция с хозяевами — важный аспект экологии вирусов. В результате длительного взаимодействия они адаптируются друг к другу. Часть хозяев приобретает устойчивость к вирусу (именно поэтому при вспышках вирусных инфекций не все они погибают); в свою очередь, вирусы должны постоянно изменяться, всякий раз опережая хозяев в совершенствовании защитных систем. Процесс обновления вирусами их природной «базы данных» в результате: 1) интенсивного мутирования; 2) рекомбинации геномов; 3) приобретения генов от хозяев служит главным средством защиты от появления «демона Дарвина» (англ. Darwinian demon) — гипотетического суперорганизма, доминирующего в любых экосистемах. Как только тот или иной вид начинает доминировать в данной экосистеме, он немедленно становится объектом атаки со стороны вирусов, которые ранее его уже инфицировали или заново к нему приспособились.

Вирусы в качестве генетических векторов. В последние годы выяснилось, что значительная часть клеточных генов неизвестной функции имеет вирусное происхождение. Однако при этом остается вопрос, как и когда сами вирусы приобрели эти гены.

При горизонтальном переносе генов между хозяевами вирусы играют роль генетического вектора. С их помощью геномы объединяются в информационную сеть, своего рода «биологический интернет».

Способность умеренных бактериофагов осуществлять трансдукцию (общую и специализированную; см. раздел 2.4) оказывает прямое или косвенное влияние на эволюцию всех форм живых существ. Как правило, вирусная ДНК не сохраняется в клетке-реципиенте, если только она не придает своему новому обладателю каких-то полезных свойств (хотя в некоторых случаях приобретенные гены могут его ослабить).

Так или иначе, в эволюционном масштабе гены, привнесенные вирусами, часто закрепляются естественным отбором. Например, вирусы обеспечивают бактерий факторами патогенности. Как показал метагеномный анализ, в хромосомной или плазмидной ДНК содержится много генов вирусного происхождения, продукты которых являются факторами патогенности и обеспечивают своему обладателю устойчивость к антибиотикам, биосинтез токсинов и адгезию к клеткам-мишеням (с целью проникновения и последующего паразитического развития).

Бактериофаги могут обмениваться с хозяевами практически любыми генами; при этом бактерии, приобретшие потенциально опасные для человека и животных гены, расширяют свою экологическую нишу, что может стать причиной вспышек заболеваний.

Хрестоматийным примером можно считать безвредную бактерию *Vibrio cholerae*, обитающую в тонком кишечнике человека и с фекалиями попадающую в речную или озерную воду. Она становится вирулентной за счет островка патогенности, который содержится в интегрированном геноме трансдуцирующего бактериофага и отвечает за синтез и секрецию холерного токсина.

У разных энтеробактерий гены островков патогенности взаимно гомологичны и фланкированы последовательностями вирусного происхождения, что указывает на роль последних в их горизонтальном распространении.

Бактериофаги, геномы которых содержат «вирусные» гены токсинов, обнаружены также у стрептококков, стафилококков, коринебактерий и ряда других болезнетворных бактерий.

Анализ физиологии бактерий, содержащих профагов, с одновременным выявлением продуктов экспрессии «вирусных» генов показал, что в некоторых случаях вирусная инфекция повышает адаптационный потенциал хозяина. В частности, у профагов выявлено несколько групп генов, которые называются «факторами лизогенной конверсии», или «моронами» (англ. morone; сокр. от more DNA; *имеется в виду избыточная ДНК, которая не нужна самому вирусу для прохождения инфекционного цикла*).

Мороны являются факторами, создающими конкурентные преимущества (англ. fitness factor). Они отвечают за: 1) образование хромосомных локусов с активным мутированием и рекомбинацией генов; 2) сайленсинг ненужных генов в результате интеграции профага; 3) устойчивость к суперинфекции путем приобретения невосприимчивости к заражению гомологичными бактериофагами; 4) способность ослаблять конкуренцию со стороны близкородственных штаммов бактерий посредством стимуляции их лизиса.

Ярким примером служат вирусы Мирового океана. Интенсивность трансдукции в морской воде очень высока, по существующим оценкам ~10^{24} генов ежегодно перемещается таким путем от одних хозяев к другим.

Вирусный метагеном содержит обширный пул генов, которые могут значительно повысить физиологическую активность бактерий, новых их обладателей.

Парадоксально присутствие в геномах некоторых цианофагов генов фотосистемы II. В составе вирусного вектора эти гены мигрируют между разными экотипами важнейших первичных продуцентов — морских цианобактерий *Synechococcus* sp. и *Prochlorococcus marinus*, которые обеспечивают до 25% глобального фотосинтеза.

P. marinus служит хозяином для содержащих dsДНК(+)-цианофагов, относящихся к двум семействам — *Myoviridae* и *Podoviridae*. Геномы цианомиовирусов относительно большого размера, 150–210 тыс. п.н.; геномы цианоподовирусов меньше, порядка 44 тыс. п.н. Цианофаги семейства *Myoviridae* способны инфицировать не только все адаптированные к низкой освещенности (англ. low light, LL) штаммы *P. marinus*, но и ряд штаммов *Synechococcus* sp. В отличие от них цианоподовирусы характеризуются относительно узким спектром хозяйской специфичности и развиваются только на отдельных, адаптированных к высокой освещенности (англ. high light, HL), штаммах *P. marinus*. Следует отметить, что приведенные факты могут отражать лишь эффективность обнаружения вирусов той или иной группы и не указывают на их истинное распространение.

Геномы цианофагов, относящихся к семействам *Myoviridae* и *Podoviridae*, в частности геном фага S-PM2, содержат генетические детерминанты фотосинтетического аппарата. Среди них гены *psbA и psbD* (кодируют кор-белки D1 и D2 реакционного центра второй фотосистемы), гены *hli* (кодируют «стрессовую» антенну, образующуюся на ярком свету), а также гены *petE* и *petF* (кодируют компоненты электронтранспортной цепи — пластоцианин и ферредоксин).

Как показал филогенетический анализ, вирусные белки D1, D2 и HLIP не только гомологичны соответствующим хозяйским белкам, но и имеют цианобактериальное происхождение. Более того, распределение белков D1 и D2 в протеоме разных кластеров *P. marinus* свидетельствует о том, что кодирующие их гены неоднократно передавались от хозяина к бактериофагу.

Продуктами экспрессии полноразмерных фотосинтетических вирусных генов являются функциональные белки, которые позволяют хозяину сохранять метаболическую активность в ходе инфекции.

В неинфицированных клетках *P. marinus* быстро возобновляемые полипептиды D1 и D2 участвуют в репарации фотосинтетического аппарата на ярком свету. Таким образом, вирусные гены D1 и D2 играют положительную роль, защищая клетки хозяев от фотоингибирования. Аналогичную защитную функцию выполняют вирусные гены *hli*, *petE* и *petF*. В ходе инфекции рано или поздно снижается уровень обновления хозяйского белка D1, а поскольку размножение бактериофага зависит от фотосинтеза, этот спад компенсируется экспрессией вирусного гена.

Ген *psbA* содержится в геномах миовирусов, хозяевами которых служат *Synechococcus* sp. и *P. marinus*. По одним данным, он обнаружен у 60% цианофагов, происходящих из разных этажей эуфотической зоны. По другим сведениям, этот ген универсален для изолятов миовирусов, а также подовирусов, инфицирующих *P. marinus*, однако он отсутствует у подовирусов *Synechococcus* sp. В свою очередь, ген *psbD* встречается лишь у миовирусов и только вместе с геном *psbA*.

Как правило, цианофаги, одновременно содержащие гены *psbA* и *psbD*, инфицируют широкий круг хозяев. Предполагается, что присутствие или отсутствие гена *psbA* в геноме вируса определяется длительностью латентного периода инфекционного цикла. В частности, цианофагам с коротким латентным периодом ген *psbA* не нужен, в то время как цианофаги с продолжительным латентным периодом чувствительнее к фотоингибированию хозяев и поэтому содержат этот ген.

Мультикопийная кластеризация HLIP-белков позволяет предположить, что цианофаги могут диссеминировать *hli*-гены путем обратного переноса к хозяевам после временного пребывания в составе вирусного генома. Такая миграция может играть существенную роль для оптимального распределения цианофагов и их хозяев в природных экосистемах.

Структурные различия между генами *psbA* хозяина и вируса позволили сконструировать таксоноспецифичные праймеры, которые используются в PCR-реакции в режиме реального времени для выявления экспрессии генов цианофага P-SSP7 по ходу его репродукции в клетках *P. marinus*. Установлено, что в середине цикла копийность транскриптов вирусного гена *psbA* превышает таковую генов хозяина и что параллельно с этим растет число копий вирусного белка D1. Вероятно, вирусные гены *psbA* служат фактором эволюции прохлорококков, повышая их адаптационный потенциал в изменяющихся условиях окружающей среды.

Помимо генов фотосинтетического аппарата в геноме вирусов прохлорококков содержатся гены, продукты которых участвуют в метаболизме углерода и фосфора. В частности, это гены семейства *mipB/talC*, которые кодируют трансальдолазу — один из ключевых ферментов окислительного пентозофосфатного цикла. Судя по реконструированной аминокислотной последовательности продуктов этих генов, они могут быть функционально активными и участвовать в метаболизме инфицированных клеток.

Прохлорококки обитают в олиготрофной зоне Мирового океана с низким содержанием фосфатов, и неудивительно, что в геномах миовирусов присутствует прокариотный ген *phoH*, который, в частности, индуцируется у *E. coli* при фосфорном стрессе. По данным биоинформатики он принадлежит к обширному семейству генов с разнообразными функциями, среди которых можно назвать метаболизм фосфолипидов, посттрансляционный процессинг РНК, β-окисление жирных кислот и т. д. Второй ген фосфорного метаболизма — *pstS* кодирует периплазматический связывающий белок, участвующий в импорте фосфатов. Вероятно, в инфицированной клетке продукт экспрессии вирусного гена *pstS* может выполнять аналогичную функцию.

У фага P-SSP7, инфицирующего *P. marinus* MED4, имеется ген сайтспецифичной рекомбиназы (*int*), которая обеспечивает интеграцию вирусной ДНК в хромосому хозяина, хотя для других фагов T7-группы характерен литический путь инфекции. Этот фаг был выделен из поверхностного слоя морской воды на исходе периода летней стратификации, когда истощается пул минеральных элементов. В таких условиях интеграция в хозяйскую хромосому для фага, несомненно, выгодна.

Хотя в настоящее время отсутствуют данные об индукции умеренных бактериофагов в культурах пресноводных и морских цианобактерий, полевые наблюдения на штаммах *Synechococcus* sp. косвенно свидетельствуют о такой возможности.

Вышеперечисленные вирусные гены постоянно перераспределяются между цианобактериями. По грубым оценкам более 60% вариантов генов *psbA* и *psbD*, обнаруженных в морской воде, содержится в вирусном метагеноме, и ~10% глобального фотосинтеза обеспечивается генами, перенесенными бактериофагом. Им не обязательно надолго встраиваться в геном цианобактерии — они экспрессируются по ходу инфекционного цикла.

Распространяя полезные гены в популяции хозяев, вирусы коэволюционируют с ними.

К вышеизложенному следует добавить важную деталь, связанную со способностью некоторых вирусов размножаться в разных хозяевах.

До недавнего времени считалось, что вирусы узкоспецифичны и не могут переносить гены между неродственными организмами. Однако несколько лет назад было показано, что вирусоподобные частицы (англ. virus-like particle, VLP), обнаруженные в морской воде и термальных источниках, могут играть роль вектора между археями, бактериями и эукариотами. В настоящее время получены доказательства существования генов, которые кочуют по популяциям филогенетически дистанцированных хозяев.

Горизонтальный перенос таких генов наблюдается, например, при симбиозе морского слизня *Elysia chlorotica* с хлоропластами пищевой водоросли *Vaucheria litorea*. При переваривании ее клеток эти органеллы не разрушаются, а накапливаются в тканях моллюска, сохраняя фотосинтетическую активность. Налицо парадокс — хлоропласт, который генетически и метаболически зависит от растительной клетки (~90% генов, ответственных за фотосинтез, содержится не в пластидном геноме, а в геноме ядра), казалось бы, не должен функционировать в клетке животного. Тем не менее часть генов, продукты которых нужны хлоропласту, обнаруживается в ядре взрослых особей слизня. Единственный способ, с помощью которого они могли туда попасть, — это горизонтальный перенос от водоросли, т. е. миграция генов между представителями разных царств живых организмов. Механизм такого «межрегнального» (лат. regnum — царство) переноса оставался загадочным, пока не заметили, что незадолго до смерти слизня (он живет лишь один год, в конце которого откладывает яйца) в его цитоплазме появляются частицы ретровируса. Судя по тому, что в период размножения слизня активируется обратная транскриптаза, жизненный цикл последнего контролируется эндогенным латентным вирусом. Вирусные частицы обнаруживались и в непереваренном хлоропласте, что указывает на их роль переносчика генов между водорослью и моллюском.

Наконец, вирусы могут переносить гены из одной экосистемы в другую — некоторые нуклеотидные последовательности, характерные для бактериофагов, широко распространены и в морских, и в наземных биоценозах.

Таким образом, вирусы выступают в качестве главного переносчика генов в биосфере, объединяя геномы в общий пул, или ***пангеном***.

Мутуализм вирусов и их хозяев. При изучении микробного разнообразия молекулярно-биологическими методами был обнаружен ряд примеров партнерства между вирусами и их хозяевами, позволяющего освоить новые ниши и победить в борьбе с конкурентами.

Киллерство. Данное явление описано на примере нескольких родов дрожжей-аскомицетов (*Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* и *Williopsis*), а также головневых грибов (*Ustilago*) и инфузорий (*Paramecium*).

Дрожжи и *Ustilago*, инфицированные вирусами семейства *Totiviridae*, синтезируют токсины, гены которых содержатся в сателлитной вирусной РНК. Линии грибов и инфузорий, инфицированные тотивирусом, не чувствительны к собственным токсинам и токсинам того же типа, которые синтезируются другими линиями, хотя они сохраняют чувствительность к токсинам других типов. У штаммов-киллеров гены гликопротеиновых рецепторов для собственных токсинов и гены ферментов, обеспечивающих гликозилирование при созревании этих рецепторов, представлены нефункциональными рецессивными аллелями. В то же время у штаммов с доминантными аллелями этих генов на клеточной мембране и стенке имеются полноценные рецепторные гликопротеины, которые взаимодействуют с токсинами и запускают процессы, приводящие к гибели жертвы.

В случае инфузории *P. tetraurelia* феномен киллерства первоначально связывали с цитоплазматическими каппа-частицами — симбиотическими бактериями *Caedibacter taenospiralis*. Позднее было высказано иное предположение: инфузория-убийца выделяет токсин, смертельный для инфузории, не содержащей симбионтов. Киллерство и устойчивость к воздействию токсина одновременно исчезают, если инфузорию искусственно (с помощью антибиотиков) освободить от присутствия бактерий. Выяснилось также, что инфузории постоянно и в небольшом количестве исторгают клетки *Caedibacter* sp., которые вместе с пищевыми бактериями попадают в пищеварительные вакуоли других инфузорий. Там токсин активируется и через вакуолярную мембрану проникает в цитоплазму. Источником токсина является не бактерия, а вирус Rbv (сокр. от англ. ***Refractile body virus***), дефектные частицы которого выявляются в цитоплазме при электронном микроскопировании. Хотя геном *Caedibacter* sp. еще не секвенирован, предполагается, что в нем содержится профаг Rbv, способный активироваться, не вызывая лизиса бактерии-хозяина. Характерным ультраструктурным признаком *Caedibacter* sp. служит R-тело (сокр. от англ. refractory body), или цитоплазматическое включение с сильным светопреломлением, наблюдаемое в световом микроскопе. Оно состоит из белков, которые кодируются несколькими генами вирусного происхождения, и образуется в цитоплазме бактерий, содержащих вирусы, путем самосборки при пониженной кислотности и под воздействием гидролитических ферментов. Сами R-тела не токсичны, однако они способствуют транспорту еще не идентифицированного токсина через вакуолярную мембрану в цитоплазму инфузории. Таким образом, вирус вооружает хозяина против незараженных конкурентов, попутно обеспечивая собственное размножение и распространение.

Бактерии-паразиты тлей. Вирусы, контролирующие размножение паразитических бактерий, могут косвенно приносить пользу макроорганизму. Хрестоматийным примером служит бактерия *Wolbachia* sp., которая паразитирует на 20% видов членистоногих и филариевых нематод. Она поселяется в половой системе самки и проникает в яйцеклетки. В результате у потомства развивается половая несовместимость зараженных и незараженных особей, изменяется численное соотношение

полов и даже происходит потеря половых хромосом. Соответственно вольбахия служит фактором микроэволюции своих хозяев, хотя ее чрезмерное развитие снижает их жизнеспособность.

Wolbachia sp. — хозяин трех профагов, один из которых (WO-1) лизогенизирует эту бактерию и таким образом контролирует ее развитие у членистоногих. Интересно, что у филариевых нематод вольбахия является облигатным мутуалистом; в данном случае у нее нет профага, поскольку гибель микросимбионта не выгодна хозяину.

Для симбиологии *Wolbachia* sp. важно, что в геноме профага содержатся гены эукариотного происхождения. Они кодируют белки с анкириновыми доменами, взаимодействующие с цитоскелетными и сигнальными белками; это крайне важно для внутриклеточного развития вольбахий, высокая инвазивность которых способствует встрече разных штаммов бактерий в одном хозяине. Присутствие родственных профагов облегчает горизонтальный перенос генов между такими штаммами. Это ускоряет эволюцию бактерий, повышает их адаптационный потенциал путем заражения разных хозяев и обогащает репертуар генов профага.

Тройственная симбиотическая система растение/гриб/вирус. Известны и другие примеры мутуализма между вирусами и их хозяевами. В частности, недавно обнаружена симбиотическая система, состоящая из *Dichanthelium lanuginosum* (близкий родственник проса), эндофитного гриба *Curvularia protuberata* (отдел *Ascomycota*) и вируса этого гриба.

У злака *D. lanuginosum* нетривиальная экологическая ниша, он растет на геотермальных почвах в Йеллоустоунском Национальном парке (США). Несмотря на то, что температура в корневой зоне достигает 65°C, растение и эндофитный гриб толерантны к ней, хотя по отдельности они не растут при температуре выше 38°C. В клетках термотолерантных грибов содержится dsРНК латентного вируса; хотя ее сходство с геномной РНК миковирусов не установлено, по ряду признаков этот вирус принадлежит к семейству *Partitiviridae*. В отсутствие вирусной инфекции эндофитный гриб не выдерживает высокой температуры и не сообщает термоустойчивости растению. Искусственно инфицированный вирусом гриб *Curvularia* sp. оказался термоустойчивым, а экспериментальный симбиоз между *Lycopersicon esculentum* (томат) и вирусоносителем *Curvularia* sp., в свою очередь, позволил этому двудольному растению переносить неблагоприятную температуру.

Хищники-наездники и их жертвы. Вирусы влияют на сложные взаимоотношения между перепончатокрылыми наездниками (сем. *Ichneumonidae*) и насекомыми-жертвами, в тело которых они откладывают яйца, и которые становятся питательным субстратом для личинок хищника. Хищники и жертвы, в частности тли (надсем. *Aphidoidea*), приспособились использовать вирусов в борьбе за выживание.

В хромосому эндосимбионта тлей, бактерии «*Hamiltonella defensa*» (сем. *Enterobacteriaceae*), интегрирован профаг. В число его генов входят гены энтеротоксинов, которые синтезируются в клетках бактерии-хозяина и выделяются в гемолимфу насекомого с помощью секреторной системы III типа. Тли относительно устойчивы к этим токсинам, однако наездники, их естественные враги, к ним чувствительны. Постоянное присутствие токсинов в гемолимфе тлей препятствует развитию эмбрионов наездника.

Однако наездники в ходе эволюции «одомашнили» вирусов из семейства *Polydnaviridae* (PDV), используя их для колонизации своих жертв — гусениц бабочек. Это семейство включает в себя рода *Bracovirus* и *Ichnovirus* (названные так по семействам хозяев-наездников) и ряд аффилиированных вирусов, не имеющих ранга вида. Вирусы постоянно инфицируют наездника; почти во всех его органах клетки содержат ДНК профага, однако вирионы образуются только в яичниках. Когда наездник откладывает яйца, вместе с ними в гусеницу бабочки попадают и вирусные частицы (рис. 25).

В тканях гусеницы начинают экспрессироваться вирусные гены, в основном гены вирулентности, продукты которых извращают иммунный ответ, в первую очередь блокируя фагоцитоз у гемоцитов. Кроме того, они замедляют развитие гусеницы и как бы консервируют ее, так что у личинки наездника достаточно времени, чтобы пройти полный цикл развития.

В тканях гусеницы вирус PDV не размножается. Что касается вирионов, образующихся в яичниках наездника, то в их геномной ДНК отсутствует большинство

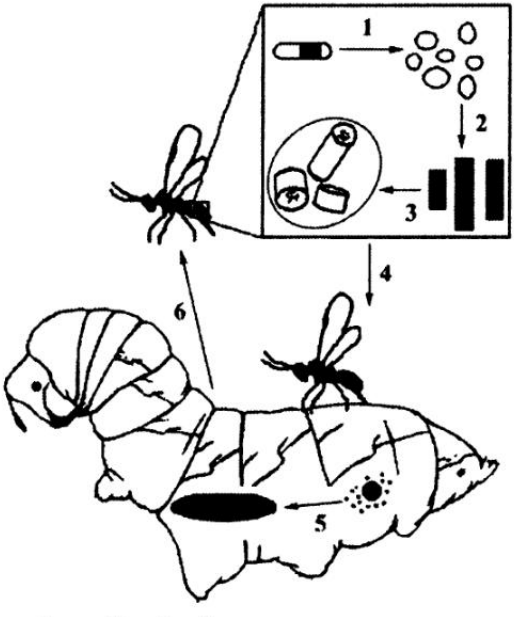


Рис. 25. Симбиоз насекомого-наездника и вируса из семейства *Polydnaviridae* (стадии 1–3 формирования вириона протекают в клетках яичников).

1 — амплификация провируса, интегрированного в хромосому клетки-хозяина; 2 — упаковка вирусной ДНК в капсиды; 3 — заключение группы нуклеокапсидов в мембранную оболочку; 4 — откладывание яиц; попадание вирусных частиц в ткани гусеницы-жертвы; 5 — выживание развивающейся личинки наездника в присутствии не размножающегося вируса; 6 — метаморфоз личинки наездника.

генов, кодирующих структурные белки вириона. Зато в ней есть набор генов, необходимых для того, чтобы личинка наездника могла питаться своей жертвой. Скрининг в банках данных показал, что большинство этих генов исходно принадлежало как самим наездникам, так и бакуловирусам или асковирусам, которые специфически поражают чешуекрылых.

Таким образом, наездники используют вирус PDV в качестве биологического оружия, вводя в его геном собственные гены агрессии. Сохранение вируса в популяции наездника гарантируется тем, что его геном встраивается в одну из хромосом хозяина и передается по вертикали. Паразитирование на гусенице-жертве обеспечивает эволюционный успех вируса, поскольку цепь его поколений не прерывается.

Таким образом, роль вирусов не всегда сводится к негативному влиянию на хозяев; напротив, их присутствие часто дает преимущества:

— без участия вирусов не смог бы установиться ряд сложных симбиотических ассоциаций;

— вирусы являются элементом природного механизма регуляции численности их хозяев;

— без горизонтального переноса генов с помощью вирусов невозможно представить себе биологическую эволюцию.

Крупным экологическим событием и одновременно важным механизмом эволюции вирусов является преодоление видового барьера. Чтобы новый хозяин не отторгал вируса, последний должен обладать способностью к адаптации. Она зависит от того, насколько эффективно вирус проходит инфекционный цикл (в качестве примера успешной адаптации можно назвать вирусов гриппа), и гарантирована тем, что геномная нуклеиновая кислота интегрируется в хромосому хозяина (переход в состояние профага в случае ДНК-содержащих вирусов или эндогенизация у ретровирусов). В подтверждение этого отметим, что геномы многих бактерий на 10–20% состоят из последовательностей ДНК профагов, и даже происхождение ~10% генома человека объясняется ретровирусной инфекцией.

Примером осуществляющейся на наших глазах эндогенизации вируса служит судьба ретровируса, который вызывает патологию лимфатической системы у австралийских сумчатых медведей коала (*Phascolarctos cinereus*). При эпидемии, охватившей природные популяции и зоопарки, в крови животных были обнаружены вирионы ретровируса KoRV (сокр. от англ. ***Koala retrovirus***). Копии генома этого ретровируса встроены в хромосомы не только соматических, но и половых клеток, т. е. они гарантированно наследуются. Интегрированные, или эндогенные ретровирусы со временем теряют способность образовывать вирионы и проявлять патогенные свойства. Примечательно, что в популяциях коал, переселенных на острова у побережья Австралии в начале XX в., не был обнаружен ни экзогенный, ни эндогенный вирус KoRV, т. е. он встретился с хозяином не ранее, чем 100–200 лет назад. Согласно реконструкции филогении вируса KoRV его ближайшим родственником и наиболее вероятным предком служит экзогенный ретровирус GALV (сокр. от англ. ***Gibbon ape latent virus***) из Юго-Восточной Азии, вызывающий лейкемию у гиббонов.

Степень сходства геномов вирусов KoRV и GALV составляет 78%. От обезьян к сумчатым медведям вирусов могли передавать мелкие грызуны, завезенные в Ав-

стралию (оба вируса способны инфицировать несколько видов мышей и крыс, а предком вируса GALV был ретровирус, поражающий азиатских мышей). Чтобы ретровирус смог эндогенизироваться, он должен потерять свою вирулентность и патогенность. Действительно, в генах *gag*, *pol* и *env* вируса KoRV обнаружено до двадцати нуклеотидных замен по сравнению с ортологами у вируса GALV. Все они при введении в геном вируса GALV снижают его способность инфицировать культуру лимфоцитов.

Эндогенизация ретровируса в данном случае происходит с участием промежуточного хозяина, т.е. вирусы KoRV и GALV являются ценными модельными объектами для изучения коэволюции ретровирусов и их хозяев, в данном случае высших животных.

1.10. ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ

Как возникли вирусы? Какими путями они эволюционируют?

Очевидно, что эволюция вирусов в основном сводится к эволюции их геномных нуклеиновых кислот. Также очевидно, что не существует геномов, сильнее подверженных изменчивости, чем геномы вирусов.

Изменчивость геномов вирусов. Эволюция геномов РНК-содержащих вирусов и геномов ДНК-содержащих вирусов подчиняется разным закономерностям.

Главный механизм изменчивости генома РНК-содержащих вирусов определяется склонностью РНК-полимераз к ошибкам копирования и отсутствием у этих ферментов корректирующей функции. Установлено, что частота ошибок при биосинтезе РНК составляет $1 \cdot 10^{-3}$. При геноме >30 тыс. н. (сем. *Coronaviridae*) вероятность возникновения летальных мутаций слишком высока, и именно этот размер пределен для РНК-геномов — на два порядка меньше максимального размера генома ДНК-содержащих вирусов (1200 тыс. п.н. у сем. *Mimiviridae*).

Высокая скорость мутирования в сочетании с огромным числом образуемых вирионов обеспечивают разнообразие генов РНК-содержащих вирусов. Некоторые из этих генов повышают адаптационный потенциал своего обладателя, вплоть до приобретения им способности инфицировать другой вид хозяина (что, несомненно, является эволюционным успехом).

ДНК-содержащие вирусы проявляют гораздо меньшую мутационную изменчивость; одним из главных механизмов их эволюции служит рекомбинация родственных геномов (понятие родственности довольно условно, поскольку одинаковых вирусных геномов практически не бывает).

Разнообразие вирусных генов невозможно объяснить только мутациями и гомологической рекомбинацией; вероятно, большинство новых генов появляется в результате незаконной рекомбинации (между негомологичными последовательностями). Естественно, этот процесс имеет очень низкий КПД, и большинство химерных последовательностей не закрепляется в геномах, хотя в ходе эволюции достаточно часто возникают выгодные варианты новых генов и новых комбинаций генов.

Как показывают результаты молекулярного секвенирования, геномы «хвостатых» бактериофагов мозаичны. Одинаково расположенные (выровненные) участки

двух геномов могут иметь идентичную последовательность, хотя встречаются совершенно разные последовательности, а также участки с низким уровнем взаимного сходства. Они имеют собственную эволюционную историю, которая сводится к серии горизонтальных обменов. Такие участки называются «модулями» (англ. module); считается, что каждый из них кодирует минимальную функциональную единицу — домен белковой молекулы, белок или группу сопряженно функционирующих белков.

При горизонтальном обмене модули имеют возможность закрепиться в геноме, поскольку новый хозяин приобретает функцию, которая может быть поддержана естественным отбором. В результате обмена модулями возникают химерные гены и геномы; в частности, химерную природу имеют геномы всех бактериофагов. Реконструировать филогенетическую связь между ними — почти невыполнимая задача. Например, считающиеся родственными фаг лямбда и фаг HK97 имеют практически идентичные гены белков хвостового отростка, однако совершенно разные гены структурных белков головки вириона. В геномах многих бактериофагов очень трудно выявить протяженные участки взаимного сходства; еще труднее обнаружить сходство между генами бактериофагов и генами ДНК-содержащих вирусов эукариотов. Зато геном любого бактериофага имеет собственный, зачастую уникальный набор генов, которые не встречаются в базах данных и, естественно, не аннотируются. Такие гены называются ***орфанами*** (англ. orfan; *игра слов* — ORF, сокр. **o**pen **r**eading **f**rame — открытая рамка считывания, и orphan — сирота). Интересно, что орфаны, как правило, экспрессируются и, следовательно, они нужны вирусам для выполнения каких-то функций. Скорее всего, они кодируют вспомогательные белки, играющие роль квазишаперонов. При связывании с белками клетки-хозяина они модифицируют их структуру с целью оптимального взаимодействия с главными вирусными белками.

Происхождение и филогения вирусов. Эволюционные аспекты вирусологии — самые проблемные, хотя результаты анализа вирусных генов и белков дают повод надеяться, что в будущем удастся объяснить происхождение вирусов, их филогению и коэволюцию с хозяевами. В свою очередь, на основе реконструированной филогении вирусов можно будет разработать их объективную классификацию. Поскольку филогения вирусов относится к сфере макроэволюции, ее невозможно моделировать опытным путем. Косвенными подходами к решению этой проблемы служат секвенирование и сравнительный анализ геномов у максимально возможного числа вирусов.

В настоящее время господствует мнение, что вирусы полифилетичны, и их филогения имела разный сценарий. Поэтому невозможно реконструировать единую филогению вирусов; более того, невозможно реконструировать филогению вирусов на уровне отдельных классов или даже семейств. Графическая схема, отражающая эволюцию вирусов, не похожа на однокорневое древо клеточной жизни. В отличие от более или менее убедительной реконструкции протоклетки (англ. progenote; last universal common ancestor), давшей начало трем стволам глобального древа живых организмов — *Bacteria*, *Archaea* и *Eucarya*, невозможно реконструировать гипотетического протовируса.

В настоящее время обсуждаются три гипотезы происхождения вирусов; их доказательная база сильно различается.

Гипотеза 1 (вирусы как потомки деградировавших клеток). В упрощенном виде она сводится к тому, что современные вирусы произошли от эндопаразитов с исходно клеточным строением, которые потеряли большинство информационных и операционных генов, однако частично сохранили механизмы, обеспечивающие инфицирование хозяина и репродукцию в его клетках. Очевидно, что эта гипотеза мало убедительна, поскольку ей противоречат богатейшее разнообразие вирусов и отсутствие кандидата на роль протовируса.

Гипотеза 2 (вирусы как потомки субклеточных структур). Согласно ей, вирус — это обладающая наследственной информацией органелла (хромосома или рибосома), которая приобрела способность к паразитической репликации в сочетании с горизонтальной и/или вертикальной трансмиссивностью. Эта гипотеза более правдоподобна, по крайней мере в отношении ДНК-содержащих вирусов. Однако она не может объяснить происхождение РНК-содержащих вирусов из-за отсутствия сходства между их геномами и рибосомной РНК.

Гипотеза 3 (вирусы как самостоятельно возникшие живые существа, альтернатива живой клетке). В настоящее время эта гипотеза самая популярная и наиболее аргументированная. Она постулирует, что вирусы эволюционировали совместно с клетками с момента возникновения органической жизни. Ее более радикальный вариант предполагает, что вирусы возникли раньше клеток и даже могли быть их предками.

Основанием для таких предположений в первую очередь служат результаты анализа геномов «гигантских» ядерно-цитоплазматических ДНК-содержащих вирусов (англ. **n**ucleo-**c**ytoplasmic **l**arge **D**NA **v**iruses; NCLDV). У одного из семейств этой группы — *Mimiviridae*, самые крупные (для вирусов) геномы, и продукты некоторых генов даже участвуют в трансляции.

К группе NCLDV принадлежат семейства *Ascoviridae* (вирусы насекомых, в основном чешуекрылых), *Asfarviridae* (вирус африканской лихорадки свиней), *Iridoviridae* (вирусы насекомых, рыб и земноводных), *Mimiviridae* (вирусы амеб и жгутиконосцев), *Nimaviridae* (представители этого семейства вызывают летальную инфекцию у креветок), *Phycodnaviridae* (вирусы водорослей) и *Poxviridae* (наиболее известным представителем этого семейства служит вирус натуральной оспы).

Максимальный размер генома у вирусов NCLDV составляет 1200 тыс. п.н. Для сравнения — у бактерий самый маленький геном, 145 тыс. п.н., имеет облигатный симбионт цикадок «Candidatus *Hodgkinia cicadicola*». Число кодируемых белков у них приближается к 1000 (в то время как протеом облигатной патогенной бактерии *Mycoplasma genitalium* насчитывает 470 белков).

Группа NCLDV служит редким примером монофилетичности у вирусов; несмотря на значительную внутреннюю дивергенцию (ее представители различаются по многим признакам и инфицируют взаимно удаленных хозяев), наличие высококонсервативных генов позволяет реконструировать их эволюцию.

Установлено, что геном общего предка вирусов NCLDV содержал 47 «обязательных» генов, которые отвечали за основополагающие функции: репликацию ДНК, транскрипцию и сборку вирионов. Дальнейшая судьба данных генов в разных эволюционных линиях (подгруппах) оказалась различной.

Все вирусы группы NCLDV имеют 9 кор-генов (группа I); еще 22 гена (группа II) обнаружены у представителей, по крайней мере, трех семейств. Анализ инфраструктуры этих генов позволяет проследить эволюцию данной группы вирусов и оценить степень их взаимного эволюционного родства.

Как показывает филогенетический анализ, отдельные подгруппы в группе NCLDV дивергировали раньше, чем родоначальники основных эволюционных ветвей (царств) ядерных организмов, т.е. 2–3 млрд лет назад. Интересно, что у всех NCLDV кор-гены расположены в центральном участке геномной ДНК, а гены, приобретенные путем горизонтального переноса, — преимущественно на флангах.

Точки зрения на эволюцию этих вирусов противоречивы. Существуют альтернативные, в равной степени обоснованные гипотезы: 1) дивергентная потеря генов из состава исходно большого предкового вирусного (или даже клеточного) генома, 2) приобретение исходно небольшим предковым геномом все новых и новых генов от разных доноров путем горизонтального переноса.

С эволюционной точки зрения очень важно, что отдельные гены вирусов NCLDV обладают низким сходством с их ортологами у эукариота-хозяина, но зато хорошо группируются друг с другом. Следовательно, роль горизонтального переноса генов от хозяина относительно невелика, что противоречит сценарию эволюции этих вирусов путем приобретения эукариотных генов. В то же время многие гены в геномах фиковирусов и, особенно, мимивирусов имеют явно бактериальное происхождение. Хозяева мимивирусов (амебы) — природный реактор, в котором фагоцитируемые микроорганизмы интенсивно обмениваются генами. Внутри фагосом мимивирусы постоянно встречаются с бактериями, что создает предпосылку для эволюции вирусных геномов благодаря горизонтальному переносу бактериальных генов.

Независимо от того, будем ли мы считать вирусов потомками клеток, генетически обособившимися частями клетки или альтернативными живыми существами, следует признать, что их экологическая роль и значение в эволюции клеточных организмов огромны.

Рекомендуемая литература

Атабеков И. Г. (Ред.). Практикум по общей вирусологии. М.: Изд-во Моск. ун-та. 1981. 191 с.

Ивановский Д. И. О двух болезнях табака. Мозаичная болезнь табака. М.: Гос. Изд-во Мед. Лит. 1949. 171 с.

Калинин В. Л. Введение в молекулярную вирусологию. СПб.: Изд-во СПбГТУ. 2002. 301 с.

Пиневич А. В. Микробиология, биология прокариотов. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та. Т. 1. 2006, Т. 2. 2007. Т. 3. 2009. 351+330+456 с.

Стэнли У., Вэленс Э. Вирусы и природа жизни. М.: Изд-во «Мир». 1963. 264 с.

Товарницкий В. И. Повесть о вирусах. М.: Изд-во «Советская Россия». 1976. 224 с.

Феннер Ф., Мак-Ослен Б., Сэмбрук Дж., Уайт Д. Биология вирусов животных. М.: Изд-во «Мир». 1977. Т. 1–2. 447+624 с.

Филдс Б. Н., Найп Д. М., Мэрфи Ф. А. и др. Вирусология. М.: Изд-во «Мир». 1989. Т. 1–3. 492–496–452 с.

Abedon S. T., Calendar R. L. The Bacteriophages. Oxford University Press. Oxford, NY (USA). 2006. 768 pp.

Ackerman H.-W. Bacteriophage observations and evolution // Res. Microbiol. 2003. Vol. 154. P. 245–251.

Baranovsky E., Ruiz-Jarabo C. M., Domongo E. Evolution of cell recognition by viruses // Science. 2001. Vol. 292. P. 1102–1105.

Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.-D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. Vol. 68. P. 560–602.

Carter J., Saunders V. Virology (Principles and Application) // Wiley & Sons. Chichester (UK). 2007. 358 pp.

Casjens S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? // Mol. Microbiol. 2003. Vol. 49. P. 277–300.

Comeau A. M., Hatfull G. F., Krisch H. M. et al. Exploring the prokaryotic virosphere // Res. Microbiol. 2008. Vol. 159. P. 306–313.

Forterre P., Prangishvili D. The great billion-year war between ribosome- and capsid-encoding organisms (cells and viruses) as the major source of evolutionary novelties // An. N. Y. Acad. Sci. 2009. Vol. 1178. P. 65–77.

Fuhrman J. A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects // Nature. 1999. Vol. 399. P. 541–548.

Garoff H., Hewson R., Opstelten D.-J. E. Virus maturation by budding // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. Vol. 62. P. 1171–1190.

Horzinek M. C. The birth of virology // Ant. Van Leeuwenhoek. 1997. Vol. 71. P. 15–20.

Hull R. Matthews' Plant Virology (4 ed.) // Elsevier/Academic Press. San Diego, CA (USA). 2004. 1056 pp.

Van Kammen A. Beijerinck's contribution to the virus concept — an introduction // Arch. Virol. 1999. Vol. 15 (Suppl.). P. 1–8.

Karginov F. V., Hannon G. J. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea // Mol. Cell. 2010. Vol. 37. P. 7–19.

Kellenberger E. History of phage research as viewed by a European // FEMS Microbiol. Rev. 1995. Vol. 17. P. 7–24.

Klasse P. J., Bron R., Marsh M. Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells // Adv. Drug Delivery Rev. 1998. Vol. 34. P. 65–91.

Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E. et al. Fields' Virology (5 ed.) // Wiliams & Wilkins. Philadelphia, Pennsylvania (USA). 2006. Vol. I–II. 3312 pp.

Mahy B. W. J., van Regenmortel M. H. V. Encyclopedia of Virology (3 ed.) // Academic Press. San Diego, CA (USA). 2008. Vol. I–V. 3680 pp.

Mettenleiter T. C. Brief overview on cellular virus receptors // Virus Res. 2002. Vol. 82. P. 3–8.

Moreira D., Lopez-Garcia P. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life // Nat. Rev. Microbiol. 2009. Vol. 7. P. 306–311.

Mossman K. (Ed.). Viruses and Interferon: Current Research // Caister Acad. Press. Norfolk (UK). 2011. 266 pp.

Poranen M. M., Daugelavičius R., Bamford D. H. Common principles of viral entry // An. Rev. Microbiol. 2002. Vol. 56. P. 521–538.

Rakhuba D. V., Kolomiets E. I., Szwajcer Dey E. et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell // Polish J. Microbiol. 2010. Vol. 59. P. 145–155.

Regenmortel M. H. V., van, Mayo M. A., Faquet C. M. et al. Virus nomenclature: consensus versus chaos // Arch. Virol. 2000. Vol. 145. P. 2227–2232.

Sompayrac L. How Pathogenic Viruses Work // Jones & Bartlett. London (UK). 2002. 128 pp.

Suttle C. A. Marine viruses — major players in the global ecosystem // Nat. Rev. Microbiol. 2007. Vol. 5. P. 801–812.

Webster R. G., Granoff A. (Eds.). Encyclopedia of Virology // Academic Press. St. Louis, Missouri (USA). 1999. 1997 pp.

ГЛАВА 2

ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ (БАКТЕРИОФАГИ)

Бактериофаги поначалу вызвали интерес как потенциальное средство борьбы с патогенными бактериями, однако вскоре отошли на задний план, поскольку магистральным направлением вирусологии было изучение вирусов животных.

И только с расцветом генетики в 1940–1960-х годах они, в первую очередь фаги *E. coli* («колифаги»), заняли достойное место в ряду ключевых объектов, на которых проводились исследования основ строения, воспроизведения, передачи и функционирования генов.

Позднее, в 1970–1980-х годах, с зарождением, а затем быстрым прогрессом молекулярной биологии бактериофагов стали широко использовать при клонировании генов и анализе их инфраструктуры.

2.1. КРАТКАЯ ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

Бактериофаги были открыты случайно, в 1910-х годах при клинических исследованиях, которые Фредерик Туорт и Феликс д'Эррель проводили на микрококках и дизентерийной палочке (см. раздел 1.1).

Сперва интерес исследователей, прежде всего участников «фаговой» группы в Колд-Спринг Харборе (см. раздел 1.1), привлекли бактериофаги T1–T7, размножающиеся в клетках *E. coli* штамм B и обозначенные как «четные» (T2, T4 и T6) и «нечетные» (T1, T3, T5 и T7). Они различаются по свойствам и объединены в T-серию (сокр. от англ. **t**ype) только согласно хронологической последовательности их выделения (табл. 15).

Выбор в качестве модельных объектов именно T-фагов, которые осуществляют литическую инфекцию, на время отвлек внимание исследователей от такого исключительно важного феномена, как вирусная лизогения. Он был открыт в 1921 г. Жюлем Борде (J. Bordet) у *Salmonella typhi* и подробно изучен на примере фага лямбда в 1930–1950-х годах Андре Львовым, Франсуа Жакобом и Эстер Ледерберг (E. M. Lederberg), а также Эженом, Элие и Элизабет Вольманами (Wollman).

Таблица 15. **Свойства бактериофагов Т-серии**

Фаг	Семейство	Линейные размеры (нм)		Размер генома	Латентный период (мин)	Вирулентность	Выход частиц на клетку	Размер бляшек
		головки	хвостового отростка					
T1	*Siphoviridae*	50	150×15	40 тыс. п.н.	13	Зависимо вирулентный*	180	Средний
T2	*Myoviridae*	65×80	120×20	165 тыс. п.н.	21	Автономно вирулентный**	120	Мелкий
T3	*Podoviridae*	45	Не выражен	40 тыс. п.н.	13	Зависимо вирулентный	300	Крупный
T4	*Myoviridae*	65×80	120×20	169 тыс. п.н.	23,5	Автономно вирулентный	300	Мелкий
T5	*Siphoviridae*	100	Слабо выражен	120 тыс. п.н.	40	То же	300	—"—
T6	*Myoviridae*	65×80	120×20	170 тыс. п.н.	25,5	—"—	200	—"—
T7	*Podoviridae*	45	Не выражен	40 тыс. п.н.	13	Зависимо вирулентный	300	Крупный

* Хозяйский метаболизм не прекращается в ходе литического цикла;
** Хозяйский метаболизм прекращается в ходе литического цикла.

Тем не менее при изучении инфекционного цикла Т-фагов были совершены крупнейшие открытия в области молекулярной генетики. В 1952 г. Альфред Херши и Марта Чейз доказали, что роль генетического материала выполняет ДНК; в 1956 г. Элиот Волькин (E. Volkin) и Лазарус Астрахан (L. Astrachan) открыли мРНК; в 1959 г. Сеймур Бензер (S. Benzer) впервые доказал, что гены имеют кодирующую структуру.

Позднее, в 1984 г. Мэрлин Белфорт (M. Belfort) и ее сотрудники открыли у фага Т4 интрон I группы (он удаляется путем автосплайсинга); это был первый случай, когда интроны были обнаружены у неэукариотов. Наконец, многокопийная плазмида pTZ со встроенным промотором фага Т7 стала широко применяться в качестве вектора при разнообразных молекулярно-генетических исследованиях. В свою очередь, модифицированная ДНК-полимераза фага Т7 («Sequenase») стала ферментом, который часто используется при молекулярном секвенировании генов.

Помимо представителей Т-серии, молекулярно-генетические исследования проводят еще с тремя типами бактериофагов.

Во-первых, это умеренные бактериофаги, которые способны развиваться по двум сценариям — литическому и лизогенному. В первом случае при заражении бактерии они осуществляют продуктивный цикл, во втором — интегрируются в хозяйскую хромосому и переходят к скрытому существованию в качестве профага. При определенных условиях, в частности при УФ-облучении, происходит индукция профага с переходом к литическому сценарию. Наиболее известным умеренным бактериофагом является фаг лямбда, инфицирующий *E. coli*; он широко используется при изучении механизмов регуляции генной активности, а также в качестве вектора для клонирования генов. Наряду с ним к числу умеренных относятся фаги P1, P4, P22 и мю.

Во-вторых, это бактериофаги, которые содержат ssДНК, однако размножаются с использованием dsДНК-репликативных интермедиатов. К ним относятся сферические фаги G4, S13 и ϕX174(PhiX), а также нитчатые фаги fd, fl и M13. Геном сферического фага ϕX174 был первым секвенированным геномом (это осуществила в 1976 г. группа Фреда Сэнджера; F. Sanger). На примере данного бактериофага было также впервые обнаружено явление взаимного перекрывания генов (англ. overlapping genes). Особенностью нитчатых бактериофагов является то, что они избирательно инфицируют «мужские» клетки *E. coli*, поскольку вирионы адсорбируются на половых F-фимбриях. Из-за того, что репликативный dsДНК-интермедиат у таких бактериофагов перед инкапсидированием переходит в одноцепочную форму, они (в частности, фаг M13) используются в качестве вектора с целью получения ssДНК, удобной для секвенирования.

В-третьих, это бактериофаги, содержащие РНК. К ним относятся фаги f2, MS2, R17 и Qβ(Q-beta). Во всех четырех случаях геномной нуклеиновой кислотой является линейная ssРНК. Поэтому такие фаги используются в качестве модельных объектов при изучении механизмов трансляции и регуляторных процессов, опосредованных РНК.

Таким образом, бактериофаги в свое время были и, видимо, надолго останутся объектами фундаментальных исследований в области молекулярной биологии и пограничных с ней дисциплин. Велика их роль в экосистемах и глобальной эволюции (см. разделы 1.9 и 1.10), а также в микроэволюционных процессах (см. ниже).

Необходимо в очередной раз отметить, что бактериофаги могут использоваться в качестве агентов борьбы с болезнетворными бактериями (при фаготерапии). В то же время они могут наносить урон тем биотехнологическим процессам, где продуцентами служат бактерии.

2.2. ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ

Бактерии заселяют разнообразные ниши, в том числе экстремальные; они могут, с одной стороны, быстро размножаться, с другой стороны, дифференцироваться в резистентные формы, сохраняющиеся в агрессивных условиях окружающей среды. По меньшей мере два свойства бактерий — активный метаболизм и высокая численность — делают их объектами эксплуатации со стороны бактериофагов.

Специфика хозяев бактериофагов. Особенности индивидуального цикла развития бактериофагов определяются спецификой клеточной организации хозяев (напомним, что бактерии, как правило, содержат ригидную клеточную стенку и неспособны к эндоцитозу).

Заражение происходит при случайном столкновении вириона с клеткой хозяина. На фоне высокой локальной численности бактерий и вирусных частиц (например, в эвтрофных водоемах концентрация бактерий составляет $10^6 \cdot л^{-1}$, а вирусных частиц — $10^{10} \cdot л^{-1}$) это происходит очень часто. Дальнейшее зависит от наличия и плотности размещения рецепторов на клеточной поверхности. В ходе проникновения бактериофаги (за исключением оболочных) полностью раздеваются, и в цитоплазму поступает «голая» нуклеиновая кислота.

Бактерии постоянно имеют дело с чужеродной ДНК, которая инактивируется системой рестрикции/модификации, и чтобы уцелеть, бактериофаг эксплуатирует клеточные механизмы рекомбинации и репарации ДНК, что привело к широкому распространению феномена лизогении (см. ниже).

Отсутствие у бактерий мембранной компартментализации, имеющейся у эукариотов, снимает проблему внутриклеточного транспорта бактериофагов, однако создает другую проблему — необходимость обеспечения высокой локальной концентрации структурных белков на этапе сборки вирионов. Она решается путем использования вирусных морфогенетических белков (см. ниже), а также хозяйских шаперонов, роль которых впервые была показана на примере фага лямбда.

Относительная простота культивирования бактерий позволяет без особого труда размножать бактериофагов в лабораторных условиях. Благодаря усилиям американской «фаговой» группы в 40–60-х годах XX в. они сделались одним из модельных объектов молекулярной генетики. Знание молекулярных свойств бактериофагов необходимо генным инженерам, использующим результаты фундаментальных исследований при конструировании геномов и для гетерологичной экспрессии генов.

Распространение и численность бактериофагов. Методами электронной микроскопии в природных популяциях бактерий постоянно и в большом количестве выявляются вирионы бактериофагов, что свидетельствует о широчайшем распространении этих вирусов и косвенно указывает на их глобальную роль в биосфере.

Суммарная биомасса бактериофагов не уступает биомассе их хозяев, т. е. в качестве резервуара органического вещества и аккумулятора биогенных элементов они служат важным, хотя и слабо изученным, звеном биологического круговорота (см. главу 1).

Как и в случае бактерий-хозяев, истинные масштабы разнообразия бактериофагов неизвестны; знание о них в основном базируется на изучении видов, инфицирующих модельные объекты микробиологии, в частности *E. coli*. В то же время ДНК-содержащие бактериофаги, фаги-плазмиды и профаги косвенно обнаруживаются по присутствию свободных или интегрированных вирусных последовательностей в «природной» ДНК (анонимной ДНК, экстрагированной из разнообразных сред и образцов).

Генетическая роль бактериофагов. В настоящее время установлено, что бактериофаги — один из ключевых факторов эволюции бактерий. В отсутствие полового процесса у хозяев они отвечают за горизонтальный перенос их генов путем трансдукции. Напомним, что общая трансдукция представляет собой неспецифический перенос фрагмента хромосомы хозяина дефектной частицей вирулентного бактериофага. В свою очередь, специализированной трансдукции предшествует интеграция/эксцизия умеренного бактериофага с помощью тех же рекомбинационных механизмов, которые используются мобильными генетическими элементами. Трансдуцирующие бактериофаги (см. раздел 2.6) способствуют распространению плазмид, а присутствие в конъюгативных транспозонах гомологов нуклеотидных последовательностей фага лямбда дополнительно указывает на универсальность бактериофагов в качестве генетического вектора.

Два других механизма горизонтального переноса, генетическая трансформация и конъюгация, непосредственно не связаны с вирусами, однако вирусное заражение

популяции бактерий может оказать существенное влияние и на их эффективность. В частности, при литической инфекции в окружающей среде накапливаются фрагменты хромосомной и/или плазмидной ДНК, потенциально способные трансформировать компетентные клетки.

Сходство бактериофагов с такими мобильными элементами, как транспозоны и интегроны, проявляется в использовании аналогичных интеграз, а также одинаковых механизмов транспозиции, что может в равной мере свидетельствовать в пользу гипотезы о происхождении бактериофагов от мобильных элементов и «симметричной» гипотезы о происхождении мобильных элементов от бактериофагов.

Бактериофаги, осуществляющие лизогенные инфекции (см. раздел 2.5), используют для интеграции в хромосому белки хозяина или белки собственного кодирования. В результате интеграции профага в хромосому бактерия приобретает новые, в том числе полезные, свойства. Такая ***лизогенная конверсия*** часто связана с образованием факторов патогенности, например токсинов (см. раздел 2.5.2). В свою очередь, при эксцизии бактериофаг захватывает гены, соседствующие с сайтом интеграции, и передает их новому хозяину.

Особенности систематики бактериофагов. Бактериофаги обладают разнообразным, нередко сложным строением, что позволяет использовать их морфологию в качестве одного из критериев семейства или рода.

Напомним, что в 1962 г. Андре Львов предложил классифицировать вирусов на основе особенностей морфологии вириона и по типу геномной нуклеиновой кислоты. В 1967 г. английский вирусолог Дэвид Брэдли (D. E. Bradley) применил этот алгоритм к бактериофагам, подразделив их на шесть основных групп, или морфотипов. В группу A вошли dsДНК-фаги с сократимым хвостовым отростком, в группу B — dsДНК-фаги с длинным несократимым хвостовым отростком; в группу C — dsДНК-фаги с коротким несократимым хвостовым отростком; в группу D — ssДНК-фаги без хвостового отростка, с крупными капсомерами; в группу E — ssРНК-фаги без хвостового отростка, с мелкими капсомерами; в группу F — ssДНК-фаги с нитевидным капсидом. Принадлежность к той или иной группе, по Брэдли, не коррелирует с таким важным признаком, как клеточная специфичность бактериофага. В частности, *Escherichia* sp. инфицируется фагами всех шести групп; *Pseudomonas* sp. — бактериофагами пяти групп (за исключением группы D); *Bacillus* sp. — четырех групп (кроме групп D и F); *Staphylococcus* sp. — только бактериофагами групп A и B. Упрощенная и уже устаревшая классификация Брэдли время от времени применяется до сих пор.

Хотя для нетаксономической классификации вирусов в основном используется генетическая система Дэвида Балтимора (см. раздел 1.8), применительно к бактериофагам по-прежнему актуален морфологический критерий. Даже в тех случаях, когда они содержат один и тот же тип нуклеиновой кислоты и используют одинаковую стратегию генома, их относят к разным семействам в соответствии со строением хвостового отростка.

Общие критерии рода у бактериофагов не разработаны, и в данном случае эта таксономическая категория носит условный характер (см. раздел 1.8). Внутри рода бактериофаги различаются по кругу хозяев, по чувствительности к абиотическим факторам (температуре, солености и т. д.), по модификации генов (вставки, делеции

и т. д.), по вторичной структуре нуклеиновой кислоты (линейная, кольцевая, суперспирализованная и т. д.), а также по инфраструктуре генома.

Проблематичность разграничения видов у бактерий не могла не отразиться на демаркации видов у бактериофагов. Чаще всего статус вида получают только те штаммы-изоляты, которые инфицируют референтные штаммы бактерий. Когда имеется много штаммов-изолятов, их объединяют в группы по способности инфицировать близкородственных хозяев, и эти группы соответствуют кластерам подобия геномов.

Официально признанные названия видов бактериофагов включают в себя названия хозяев и, как правило, наборы цифр, а также сочетания латинских или греческих букв, отражающие рабочие обозначения штаммов-изолятов. Эти названия пишутся курсивом, например *Enterobacteria phage P22*. Тривиальные названия бактериофагов, а также их аббревиатуры курсивом не обозначаются, например фаг λ, фаг P22 и т. д.

В отличие от симптомов вирусной инфекции растений и животных, внешние признаки инфекции у бактериофагов не имеют таксономического значения. За исключением феномена лизогенной конверсии (см. выше) единственным фенотипическим «проявлением» инфекции служат зоны лизиса или участки угнетения роста на газоне чувствительной бактерии, а также просветление суспензионной культуры, обусловленное лизисом клеток.

2.3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ И ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Главный метод культивирования и количественного учета бактериофагов, использующий способность образовывать негативные колонии на «газоне» чувствительных бактерий, был предложен в начале XX в. Феликсом д'Эррелем. Он до сих пор применяется в рутинной работе с этими вирусами.

Культивирование бактериофагов. Поскольку бактериофаги размножаются в клетках специфического хозяина, ему необходимо обеспечить оптимальные условия роста и инфицировать его в период активного развития культуры, обычно в логарифмической фазе.

Бактериофагов можно культивировать:

— в жидкой погруженной культуре хозяина;

— на плотной питательной среде с поверхностным газоном бактериальных клеток;

— по «двухслойной» методике, когда пластина твердого агара (2–5%) заливается смесью частиц вирусов и клеток хозяина в питательной среде с полужидким агаром (0,3–0,9%); смысл этой процедуры состоит в иммобилизации будущих зон лизиса.

Количественный учет бактериофагов. Через определенное время после заражения (~3 ч для жидкой культуры и ~20 ч для культуры на агаризованной среде) вирусная инфекция проявляется визуально: в первом случае культура становится прозрачной, во втором случае на поверхности агара образуются бляшки.

Лизогенные бактериофаги обнаруживают себя при спонтанном переходе к литическому циклу, а также при индукции под воздействием УФ-облучения (~1 мин) или ингибитора синтеза ДНК (митомицина С; ~1 мкг/мл).

Самый распространенный способ количественного учета бактериофагов — это титрование, основанное на подсчете числа бляшек, которые образуются в «двухслойной» культуре. Для достоверного подсчета перед высевом готовят серийные 10-кратные разведения вирусной суспензии или фаголизата. Принято считать, что отдельная бляшка соответствует инфекционной частице, или бляшкообразующей единице (англ. plaque forming unit, PFU). Число PFU на определенный объем (обычно 1 мл) исходной суспензии указывает титр фага; он выражается произведением цифры первого разряда на степень десяти, например $3 \cdot 10^6$, или округленным десятичным логарифмом этой величины (в данном случае 6).

Бактериофаги, вызывающие хронические и лизогенные инфекции, не образуют характерных бляшек, хотя на плотных средах появляются зоны угнетенного роста, которые можно рассматривать как количественный эквивалент бляшек.

Прямой визуальный подсчет бактериофагов производится с помощью электронного микроскопа. При подготовке препарата используется методика негативного или позитивного контрастирования; для получения достоверных результатов необходимо стандартизировать процедуру подготовки материала и просматривать участки равной площади. Данный метод трудоемок и отнимает много времени, однако вполне оправдывает себя, поскольку позволяет получать данные о количестве вирусных частиц, оценивать их качественный состав и по внешнему виду вирионов идентифицировать объект до семейства. Попутно можно определить размер вириона, используя в качестве калибратора латексные шарики стандартного диаметра.

Сравнение результатов (количества PFU и числа вирионов, подсчитанных под электронным микроскопом) позволяет оценить эффективность высева бактериофага; этот показатель колеблется и обычно не превышает 50%, что зависит не только от стабильности вирионов, но и от физиологического статуса хозяина.

Препаративное получение бактериофагов. Суспензию вирусных частиц, смытую с поверхности плотной среды, или фаголизат суспензионной культуры освобождают от фрагментов разрушенных клеток фильтрованием через мембранный фильтр диаметром пор ≤0,2 мкм.

Суспензию бактериофага обычно концентрируют скоростным центрифугированием (~60 тыс. g). Для получения очищенного препарата используется равновесное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы или хлорида цезия.

Большинство бактериофагов хранят при 4°C в суспензии или в виде лиофильно высушенного препарата. Для типовых штаммов рекомендуется криохранение при −70°C на среде с 50%-ным глицерином в качестве антифриза.

2.4. ОНТОГЕНЕЗ БАКТЕРИОФАГОВ

Одиночный цикл развития бактериофагов был впервые прослежен Эмори Эллисом и Максом Дельбрюком на примере фага T4 (см. рис. 10).

Растущую культуру *E. coli* заражали вирусом с тем расчетом, чтобы на клетку хозяина приходилась примерно одна частица. По завершении адсорбции (2–3 мин) неадсорбированные частицы инактивировали антифаговой антисывороткой. Затем культуру сильно разбавляли, чтобы потомство бактериофага избежало инактивации.

Через равные промежутки времени после заражения суспензию высевали на чашки с индикаторной культурой бактерии, чтобы определить титр вируса и его урожай (число образовавшихся частиц на клетку). Таким способом были определены продолжительность латентного периода и периода лизиса, а также суммарный выход вирусных частиц (для конкретного бактериофага эти показатели постоянны при заданных условиях культивирования хозяина). Чтобы проследить внутриклеточное развитие бактериофага во время латентного периода, инфицированные клетки мягко лизировали ультразвуком и также определяли число образовавшихся частиц (см. рис. 11).

Как выяснилось, через некоторое время после адсорбции (в эклипс-периоде) родительские частицы и их потомство как бы исчезают, что отражает несколько этапов онтогенеза вируса: 1) проникновение, раздевание и презентацию генома; 2) транскрипцию; 3) синтез ранних белков; 4) репликацию; 5) синтез поздних белков; 6) сборку вирионов.

Затем в отдельных клетках (поскольку культура хозяина была асинхронной) начинали появляться инфекционные частицы. Еще позже в каждой клетке выявлялось в среднем по одной частице. И, наконец, число еще не покинувших хозяина инфекционных частиц значительно увеличивалось, выходя на плато в период лизиса.

В свое время эксперимент Эллиса—Дельбрюка послужил доказательством того, что вирусы не делятся, как клетки, а размножаются путем сборки из отдельных частей (см. раздел 1.4).

2.4.1. АДСОРБЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

Рецепторами бактериофагов могут быть практически любые молекулы, постоянно и в достаточном количестве экспонированные на поверхности клетки-хозяина.

Липополисахариды. Напомним, что у большинства бактерий в состав клеточной оболочки, помимо цитоплазматической мембраны, входит наружная мембрана (англ. outer membrane, OM). Она обогащена белками (англ. outer membrane protein, OMP), которые подразделяются на: 1) «структурные» белки, стабилизирующие OM и обеспечивающие ее взаимодействие с глубже лежащими структурами; 2) порины, образующие водные каналы, по которым, в зависимости от своего эффективного радиуса, диффундируют гидрофильные молекулы; 3) липопротеины, заякоривающие OM на ригидном слое клеточной стенки.

В отличие от цитоплазматической мембраны, липидные слои OM асимметричны; внешний полумембранный листок содержит липополисахариды (англ. lipopolysaccharide, LPS), которые состоят из: 1) высококонсервативного проксимального липида A; 2) умеренно-консервативного внутреннего домена кор-олигосахарида (мономерами которого служат гептозы и октозы); 3) умеренно-консервативного внешнего домена кор-олигосахарида (мономерами которого являются гексозы); 4) вариабельной дистальной, или боковой, цепи, состоящей из нескольких десятков олигосахаридных блоков.

В целом у бактерий в составе боковой цепи LPS выявлено свыше 60 вариантов моносахаридов, которые дополнительно модифицируются за счет более чем 30 типов заместителей.

Благодаря разным комбинациям мономеров индивидуальная структура наружной цепи LPS становится уникальной. Эта часть LPS, или О-антиген (от нем. **o**hne — без; в *данном случае — **без** распространения бактерий по поверхности агара; этим подчеркивается, что антиген не имеет отношения к подвижности, т. е. он ассоциирован не со жгутиком, а с телом клетки*), в основном определяет специфичность клеточной поверхности грамотрицательных бактерий. Бактериофаги, которые используют в качестве рецептора О-антиген, могут размножаться только на штаммах с соответствующими серологическими свойствами.

Определение серотипа бактерии по способности стандартного бактериофага лизировать ее культуру называется ***фаготипированием***; этот метод используется для идентификации патогенных бактерий, в частности сальмонелл.

О-антиген служит в первую очередь рецептором Т-четных фагов. Следует учесть, что у сложноустроенных вирионов этап адсорбции состоит из нескольких обратимых или необратимых стадий. Отдельные части вириона (короткие и длинные фибриллы базальной пластинки, белки хвостового отростка и др.) последовательно взаимодействуют с разными рецепторами или разными доменами одной и той же рецепторной молекулы.

При связывании бактериофага с О-цепью она обычно разрушается в результате гидролазной активности вирусных белков, что позволяет вириону вступить в прямой контакт с ОМ.

С кор-олигосахаридом преимущественно связываются фаги S13, 6SR, T3, T7 и ϕX174. В лабораторных условиях они предпочтительно инфицируют лишенные О-специфичной боковой цепи R-мутанты (сокр. англ. **rough** — шероховатый; *у R-мутантов колонии имеют шероховатую поверхность*). Эти бактериофаги развиваются на более широком круге хозяев и способны поражать близкородственных бактерий кишечной группы, в частности *Escherichia* sp., *Salmonella* sp. и *Shigella* sp.

Как показал анализ бактериальных мутантов с заменами или удалением моносахаридов в дистальном домене кор-олигосахарида, для эффективной адсорбции бактериофага гораздо важнее общая пространственная конфигурация рецептора, чем последовательность расположения его мономеров.

Белки наружной мембраны. Помимо LPS, рецепторами бактериофагов могут быть белки, входящие в состав ОМ. В частности, структурный белок OmpA служит рецептором для трансдуцирующих фагов K3, Ox2 и TuII*.

Порины «общего назначения» OmpC и OmpF фильтруют субстраты по размеру, хотя предпочтительно это нейтральные молекулы и катионы. Они служат рецепторами для фагов SS1, TP2, TuIa и TuIb, а также для фага T4 на стадии необратимой адсорбции.

«Специализированные» порины, которые содержат стереоспецифичные сайты связывания субстратов, транспортируют молекулы определенных типов, например моно- и дисахариды, а также нуклеозиды и жирные кислоты. Это индуцибельные белки, и их количество изменяется в зависимости от внешних условий. Соответственно на эффективность адсорбции влияет качественный состав транспортируемых субстратов.

Фосфопорин PhoE, который накапливается при фосфорном голодании, служит рецептором для фага TC45; фаг T2 рецептируется переносчиком жирных кислот FadL;

фаги λ, K10 и TP1 связываются с «мальтопорином» LamB; фаги H8, K9, Ox1 и T6 используют в качестве рецептора канал для нуклеозидов Tsx.

«Высокоаффинные» порины не образуют постоянно действующих каналов и раскрываются в результате энергозависимого изменения конформации, т.е. служат функциональными аналогами пермеаз цитоплазматической мембраны. Однако ОМ, в отличие от последней, не участвует в ассимиляции и использовании энергии; конформационные изменения поринов обеспечиваются модификацией транспортных посредников, расположенных в периплазматическом компартменте (TonB, ExbB и ExbD). В частности, Ton-зависимые порины, в норме отвечающие за транспорт хелатов железа и витамина B12, служат рецепторами для фагов T1, T5, ϕ80 и BF23.

Тейхоевые кислоты. У грамположительных бактерий отсутствует ОМ; поверх цитоплазматической мембраны расположен муреин-тейхоатный комплекс.

Тейхоевые кислоты (30–89% массы муреина) состоят из основной цепи, образованной рибитол-5-фосфатом, глицерол-3-фосфатом или сополимером этих полиолов. По свободным гидроксильным группам к ним присоединяются моносахариды, D- и L-аминокислоты, а также ди-, три- и тетрасахариды, состоящие из остатков глюкозы, N-ацетилглюкозамина, галактозы и N-ацетилгалактозамина; одна и та же бактерия может образовывать разные типы и сочетания этих заместителей. Поэтому тейхоевые кислоты высоковариабельны и используются в качестве поверхностных антигенов, а также рецепторов для бактериофагов, специфичных по отношению к серотипу хозяина. На этом основано фаготипирование грамположительных бактерий, в частности стрептококков.

«Стеночные» тейхоевые кислоты ковалентно связаны с муреином посредством своего консервативного линкерного домена (состоящего из трех остатков 3-глицеролфосфата, остатка N-ацетилманнозамина и остатка N-ацетилглюкозамина). Бактериофаги, использующие этот домен в качестве рецептора, способны размножаться в клетках широкого круга хозяев. В частности, фаги 3C, 52A, 71, 79, 80 и U16 инфицируют многочисленные штаммы *Staphylococcus aureus*, в том числе коагулазоотрицательные. В свою очередь, любой фаг *S. epidermidis* размножается в клетках любого штамма, принадлежащего к этому роду. Фаги стафилококков также могут инфицировать некоторые штаммы рода *Bacillus*.

Однако не все грамположительные бактерии содержат тейхоевые кислоты; например, они отсутствуют у представителей рода *Micrococcus*. В таком случае бактериофаги адсорбируются на полисахаридной цепи муреина, точнее, на остатках N-ацетилглюкозамина.

Капсулы. На эффективность адсорбции бактериофагов могут влиять дополнительные покровные структуры, встречающиеся и у грамотрицательных, и у грамположительных бактерий. Среди них наиболее распространены полисахаридные капсулы, в состав которых входят мономеры свыше десяти типов, в том числе гексозы, пентозы, дезоксигексозы и гексуроновые кислоты, а также их производные. Молекулярный состав и толщина капсулы изменяются в зависимости от внешних условий.

Капсулы выполняют роль поверхностных K-антигенов (сокр. от нем. die **K**apsel — футляр: в *данном случае* — капсула) и служат рецепторами для фага ϕ63 (инфицирует *Klebsiella* sp.), для фага M-1 (инфицирует *Rhizobium japonicum*), а также для некоторых

фагов стрептококков. Условно патогенная бактерия *Pseudomonas aeruginosa* синтезирует гликопротеиновую капсулу, которая служит рецептором для умеренного фага 8. При интеграции в хромосому изменяется состав углеводного компонента гликопротеина, и это достаточно для блокирования повторной инфекции.

В то же время капсула грамположительных бактерий может препятствовать адсорбции бактериофагов благодаря маскировке рецепторов. Например, у *S. aureus* белок А (ассоциированный с наружной поверхностью муреинового слоя и служащий фактором вирулентности из-за способности связываться с иммуноглобулином G и делать антитело недоступным для лейкоцитарных рецепторов) экранирует тейхоевую кислоту, что защищает бактерию от литических бактериофагов.

Экзополисахариды. Для адсорбции бактериофагов важен как состав мономеров, так и пространственная конфигурация полимерной молекулы.

В частности, *Lactobacillus casei* не синтезирует тейхоевые кислоты и не образует капсулу, но зато секретирует экзополисахариды (англ. extracellular polysaccharide, EPS), состоящие из остатков L-рамнозы, D-глюкозы, D-галактозамина и D-глюкозамина. Остатки L-рамнозы служат рецептором для фага PL-1, хотя для его эффективной адсорбции необходимо дополнительное взаимодействие с остатком D-глюкозы.

При адсорбции на экзополисахаридах бактериофаги проявляют эндогликан-гидролазную активность, которая позволяет им вступить в контакт с поверхностью клетки. Кофактором этой реакции служат катионы Ca^{2+} и Mg^{2+}, которые иммобилизуются анионным экзополисахаридом. При удалении олигосахаридных цепей структура внешнего слоя экзополисахарида изменяется, что препятствует адсорбции близкородственных бактериофагов.

Жгутики. Некоторые бактериофаги используют в качестве рецепторов локомоторную органеллу — жгутик, дистальная часть которого (нить, или флагелла) состоит из спирально уложенных молекул белка флагеллина, играющего роль Н-антигена (сокр. от нем. der **H**auch — налет; *этим подчеркивается связь антигена со структурой, обеспечивающей активную подвижность и, как следствие, образование не точечных колоний, а колоний, распространяющихся по влажной поверхности агара*).

Флагеллины служат рецепторами лямбда-подобных фагов, которые инфицируют широкий круг энтеробактерий, в частности представителей родов *Escherichia*, *Salmonella* и *Serratia*. У сложных жгутиков нить флагеллина окружена чехлом (специализированным выростом ОМ). Примером того, как сложный жгутик используется в качестве рецептора, служит фаг 7-7-1, инфицирующий *Rhizobium lupini*.

При адсорбции бактериофага хвостовые фибриллы облепляют нить жгутика, которая перестает вращаться. Затем бактериофаг по аналогии с закручивающейся гайкой смещается к основанию нити, где он инъецирует свою ДНК.

Фимбрии. Помимо жгутиков в роли рецепторов бактериофагов могут выступать не вращающиеся придаточные структуры — фимбрии (пилусы). Фимбрии имеются у многих грамотрицательных бактерий и обеспечивают межклеточные контактные взаимодействия, а также адгезию к мертвым субстратам. Биогенез фимбрий регулируется внутренними и внешними факторами; белки фимбрий (пилины) могут кодироваться как хромосомами, так и плазмидами. По признаку присутствия/отсутствия фимбрий бактериальные популяции обычно неоднородны.

Фимбрии классифицируются в соответствии с их строением, механизмом сборки и выполняемой функцией. Множественные фимбрии «главного» типа используются для адгезии к плотным субстратам и у патогенных бактерий служат одним из факторов вирулентности. В данном случае жесткая нить фимбрии прикрепляется к ОМ. Фимбрии «альтернативного» типа (1–2 на клетку), помимо адгезии, принимают участие в особых формах нежгутиковой подвижности, секреции экзотоксинов и конъюгации. Нить такой фимбрии жесткая или гибкая; подобно нити жгутика, она взаимодействует с базальным телом, которое встроено в клеточную оболочку.

Ярким примером бактериофага, использующего фимбрию главного типа в качестве рецептора, служит фаг φ6, который инфицирует *Caulobacter vibrioides*, и бактериофаг M6, хозяином которого является *Pseudomonas aeruginosa*. Их вирионы буквально облепляют фимбрию (к отдельной нити прикрепляется до десятка вирусных частиц, и они равномерно распределяются по ее длине).

У лизогенной бактерии *Vibrio cholerae* фаг CTXΦ отвечает за образование холерного токсина. Его рецептором служат фимбрии главного типа, которые называются токсин-корегулируемыми (англ. toxin co-regulated pili, TCP), так как экспрессия генов пилина *tcpPH* и генов токсина *ctxAB* регулируется продуктом одного и того же гена — *toxT*.

Интересно, что гены *tcpPH* и *toxT* принадлежат не фагу CTXΦ, а другому фагу — VPIφ, который использует Tcp-белки в качестве структурных белков (рецепторы для него другие). Популяция вибрионов подразделяется на особи, у которых возможна эксцизия профага VPIΦ с переходом к литическому циклу и формированию полноценных вирионов (редкие случаи), и особи, у которых лизогения необратима (подавляющее большинство случаев). Таким образом, в результате двух последовательных актов лизогенной инфекции приобретается островок патогенности, ответственный за комплекс структурных и вирулентных свойств холерного вибриона.

Фимбрии альтернативного типа служат рецепторами для представителей семейства *Leviviridae*. В частности, «мужской» фаг MS2, инфицирующий *E. coli*, использует в качестве рецептора «половую» F-фимбрию, которая закодирована в конъюгативной F-плазмиде. В результате связывания с вирионами фимбрия стабилизируется, что позволяет наблюдать конъюгацию с помощью электронного микроскопа.

Для фага PR4 (сем. *Siphoviridae*) рецепторами служат половые фимбрии *E. coli* и *S. typhi* серовар Typhimurium. В обоих случаях вирион прикрепляется к концу фимбрии с помощью пепломеров, находящихся на вершинах икосаэдрической головки.

Фимбрии не только рецептируют бактериофагов, но и используются для их проникновения (см. ниже); в качестве примера можно назвать длинных нитевидных бактериофагов семейства *Inoviridae*.

2.4.2. ПРОНИКНОВЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Как правило, при проникновении бактериофага в хозяйскую клетку его нуклеиновая кислота покидает капсид (декапсидируется) и одновременно с этим через цитоплазматическую мембрану впрыскивается (инъецируется) в цитоплазму.

Хотя Альфред Херши и Марта Чейз описали феномен «раздевания» фагового генома еще в середине XX в., многие детали этого процесса по-прежнему не ясны.

Транслокация. Из-за сложной структуры оболочки, состоящей из клеточной стенки в комплексе с одной или двумя мембранами (соответственно, у грамположительных и грамотрицательных бактерий), проникновение бактериофага происходит в два этапа. На первом этапе вирион или декапсидированная нуклеиновая кислота транслоцируются к цитоплазматической мембране, на втором этапе нуклеиновая кислота поступает в цитоплазму.

Предполагается, что у грамотрицательных бактерий зоной проникновения бактериофагов служат связки Байера (англ. Bayer junction), т. е. локальные участки, в которых ОМ контактирует с цитоплазматической мембраной. На поверхности клетки *E. coli* необратимо адсорбируется ~300 частиц фага T4, что примерно соответствует числу связок Байера.

Ригидный слой муреина преодолевается благодаря мурамидазной активности вирусных белков, которые проделывают в нем отверстия, открывая доступ к цитоплазматической мембране. В частности, «литическая» эндопептидаза P5 оболочного фага φ6 связана с суперкапсидом; N-ацетилмурамидаза gp5 безоболочного фага T4 находится на базальной пластинке; у фагов PRD1, T7 и P1 имеются последовательности генов трансгликозилаз.

При доставке ДНК фага T7 к наружной поверхности цитоплазматической мембраны в ОМ образуется пора; геномная нуклеиновая кислота покидает головку совместно со структурным белком, который обладает эндопептидазной активностью и, проникнув в периплазму, начинает разрушать олигопептидные мостики муреина.

У фага ϕ29 побочную мурамидазную активность проявляет терминальный белок, связанный с концами линейной dsДНК и обеспечивающий праймирование при репликации.

Особый способ проникновения используют бактериофаги, которые адсорбируются на поверхности жгутика или фимбрии альтернативного типа (см. выше). Они инъецируют свою геномную нуклеиновую кислоту в канал, который проходит внутри нити жгутика или нити фимбрии и упирается в цитоплазматическую мембрану.

Инъецирование нуклеиновой кислоты. Этот процесс, а также его прямые последствия изучены в основном на примере ДНК-содержащих бактериофагов.

Механизм инъецирования. Предполагается, что трансмембранный перенос ДНК происходит с помощью двух механизмов, действующих порознь или совместно: 1) формирование порового комплекса в цитоплазматической мембране; 2) использование энергозависимых транслоказ и протондвижущей силы (англ. **p**roton **m**otive **f**orce, *pmf*).

Для импорта ДНК некоторые бактериофаги образуют специализированные поровые комплексы в цитоплазматической мембране клетки-хозяина (в препарате цитоплазматической мембраны клеток *E. coli*, инфицированных фагом T5, обнаружен белок хвостового отростка, формирующий пору диаметром 2 нм; это достаточно для проникновения ДНК).

У представителей семейства *Tectiviridae* внутренний липопротеиновый слой капсида выворачивается наизнанку и сливается с цитоплазматической мембраной; ДНК поступает в цитоплазму по образовавшемуся каналу.

Проникновение фага ϕ29 (сем. *Podoviridae*) — двухстадийный процесс. Вначале в цитоплазму инъецируется 65% ДНК; этот механизм похож на действие шприца

и считается общим для бактериофагов с сократимым отростком. Движущей силой служит давление, которое создается внутри хвостового отростка при изменении конформации его белков. На второй стадии в ход вступают мембраносвязанные белки энергозависимого транспорта (в том числе, вирусного происхождения). Они осуществляют симпорт оставшихся 35% ДНК за счет энергии *pmf*.

Большинство бактериофагов содержит ДНК, что позволяет им участвовать в горизонтальном переносе генов, используя клеточные механизмы рекомбинации. Однако в отличие от конъюгации или генетической трансформации (когда экзогенная dsДНК временно превращается в ssДНК), при заражении бактериофагом в клетку поступает dsДНК; механизм этого процесса не установлен.

Представители семейств *Inoviridae* (ssДНК-бактериофаги), которые адсорбируются на фимбриях альтернативного типа, скорее всего, используют механизмы импорта ДНК хозяина. В случае фагов семейства *Leviviridae* (ssРНК-бактериофаги) это исключено, и механизм проникновения геномной нуклеиновой кислоты вируса в цитоплазму неизвестен.

Защита ДНК бактериофага от рестрикции. Попав внутрь клетки, dsДНК бактериофага становится потенциальным субстратом рестриктаз, которые должны расщеплять экзогенную ДНК, защищая бактерию от чужеродной генетической информации.

Напомним, что феномен рестрикции (англ. restriction — ограничение), открытый в 1952 г. Сальвадоре Луриа и Мэри Хьюмен, состоит в том, что после адсорбции бактериофаги размножаются на одних и не размножаются на других штаммах бактерий. Как установил в 1978 г. Вернер Арбер, при рестрикции dsДНК фрагментируется сайтспецифичными эндонуклеазами (рестриктазами) хозяина. Рестриктазный комплекс обладает бинарной функцией эндонуклеазы и метилтрансферазы (см. раздел 1.7.1). Рестриктазы классифицируют в зависимости от количества и состава субъединиц, по структуре сайтов рестрикции и метилирования, а также по потребности в кофакторах. В то время как рестриктазная активность направлена против чужеродной ДНК, метилтрансферазная активность служит для защиты собственного генома (благодаря метилированию в сайтах узнавания и/или расщепления клеточная ДНК избегает рестрикции).

Рестриктазы подавляют репродукцию бактериофагов, содержащих немодифицированную ДНК; при инактивации этих ферментов (например, в результате перенесенного стресса) или при наличии у бактериофага собственной системы модификации его ДНК не рестрицируется, и он беспрепятственно размножается.

Существует несколько способов защиты ДНК бактериофага от рестрикции. Прежде всего, это подавление активности рестриктаз. Например, в капсиде фага P1 содержатся два белка, которые проникают в клетку *E. coli* совместно с ДНК и блокируют рестриктазы EcoA, EcoB и EcoK. Наиболее изучены антирестриктазные белки Ocr (сокр. от англ. **o**vercome **c**lassical **r**estriction — преодолеть классическую рестрикцию), обнаруженные у фагов T3 и T7. Они синтезируются при проникновении вирусной ДНК в клетку *E. coli* и взаимодействуют с рестриктазами EcoB, EcoK и EcoP1, дезактивируя их. Кроме подавления этих рестриктаз, Ocr-белки подавляют рестриктазы *Salmonella* sp. (SA и SB), а также закодированную в плазмиде R124 рестриктазу EcoRIII.

Защитные свойства Ocr-белков используются при внедрении в бактерии плазмидной ДНК посредством трансформации или конъюгации. Если фаги T3 и T7 об-

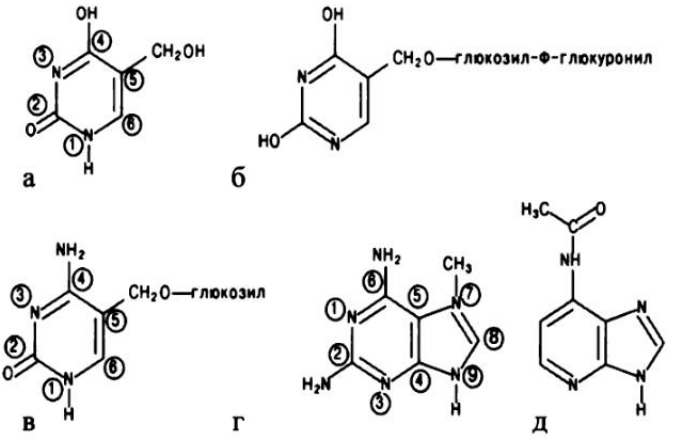


Рис. 26. Модифицированные нуклеотиды в составе геномных нуклеиновых кислот бактериофагов.

а — 5-гидроксиметилурацил; б — глюкозилированный и фосфоглюкуронилированный 5-гидроксиметилурацил; в — глюкозилированный 5-гидроксиметилцитозин; г — 7-метилгуанин; д — 6-N-ацетиладенин.

лучить УФ-светом, они выйдут из литического цикла, однако на начальном этапе инфекции у них будут по-прежнему синтезироваться Ocr-белки, которых достаточно для защиты плазмидной ДНК от рестрикции.

Другой способ защиты ДНК бактериофага — это удалить из нее сайты узнавания для рестриктаз. Например, в ДНК фагов T3 и T7 отсутствуют сайты CCA/TGG для узнавания Ocr-устойчивой рестриктазой EcoRII. В свою очередь, фаг SPO1 сохранил только пять (из 300 ожидаемых) сайтов GGCC для узнавания рестриктазой BsuRI. Наконец, фаг ϕ29 вообще не содержит сайтов узнавания.

Распространенный способ защиты от рестриктаз — это пострепликационная модификация оснований (рис. 26). В частности, у фагов *Bacillus subtilis* SPO1, ϕ25 и SP8 тимин полностью замещен 5-гидроксиметилурацилом. В результате модификации оснований рестриктазы перестают распознавать сайты рестрикции в вирусной ДНК.

Некоторые бактерии в итоге коэволюции с бактериофагами приобрели рестриктазы, эффективные в отношении ДНК с модифицированными основаниями. В свою очередь, дополнительные модификации (например, гликозилирование) позволяют бактериофагам создать вторую линию защиты против рестриктаз. Например, у фага SP15 до 60% тимина заменено 5-дигидроксиметилурацилом, который дополнительно гликозилирован и фосфоглюкуронилирован. В свою очередь, у Т-четных фагов *E. coli* и фага DDVI *Shigella sonnei* цитозин заменен дополнительно гликозилированным гидроксиметилцитозином.

Для защиты ДНК некоторые бактериофаги используют такую стратегию, как метилирование оснований. С одной стороны, «в интересах» бактериофага могут активизироваться хозяйские системы метилирования. Например, у фага λ и лямбда-по-

добных фагов имеется белок Ral (сокр. от англ. **r**estriction **al**leviation — ослабление рестрикции), который стимулирует метилирование немодифицированной геномной ДНК с помощью метилтрансферазных субъединиц рестриктаз EcoB и EcoK; вероятно, он активирует экспрессию их генов. С другой стороны, некоторые бактериофаги используют собственную метилазу — примерами служат Dam-метилаза (сокр. англ. **D**NA **a**denine **m**ethylase) фагов T2, T4 и Mx8, а также гуанинметилаза фага DDVI.

Фаг мю (Mu) использует необычную систему модификации: ацетимидирование ~15% остатков аденина в положении 6, которое обеспечивает продукт гена *mom* (сокр. от англ. **m**odification **o**f **Mu**).

Антирестриктазные системы бактериофагов интересны как с теоретической стороны, так и в практическом отношении. При планировании опытов с новым хозяином (или с новым бактериофагом у известного хозяина) следует учитывать штамм-специфичную рестриктазную активность; это особенно важно при конструировании генетических векторов.

2.4.3. РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Принципы экспрессии генома едины для всех живых существ, и бактериофаги не исключение. Однако репликативные интермедиаты, которые образуются у бактериофагов, различаются по типу носителя генетической информации. Напомним, что геномной нуклеиновой кислотой может быть ДНК или РНК, причем как в ds-форме, так и в ss-форме (см. раздел 1.4.4).

Зависимость бактериофагов от хозяйских систем репликации и транскрипции. Все бактериофаги в той или иной степени используют системы репликации и транскрипции клетки-хозяина. В этом отношении различают группы сильно-, средне- и слабозависимых бактериофагов.

Сильнозависимые бактериофаги, такие, как ssДНК-содержащие фаги MS2 и ϕX174 (5,4–6,4 тыс. н.), не кодируют собственные репликазы, и поэтому у них переход к двунитевым репликативным интермедиатам осуществляется полностью за счет хозяйской ДНК-полимеразы. Бактериальные гены транскрибируются до момента освобождения вирионов из клетки, хотя эти бактериофаги способны осуществлять и хроническую инфекцию.

Среднезависимые бактериофаги, например dsДНК-содержащий фаг лямбда (48 тыс. п.н.), кодируют собственную ДНК-полимеразу, однако для транскрипции генов ранних белков они используют клеточную РНК-полимеразу.

Слабозависимые бактериофаги, в частности dsДНК-содержащий фаг T4 (166 тыс. п.н.), кодируют собственные полимеразы и даже некоторые факторы трансляции. В данном случае клетка-хозяин обеспечивает экспрессию только вирусных генов, и инфекция сопровождается быстрой деградацией хромосомы, в том числе, с помощью ферментов бактериофага. Некоторые слабозависимые цианофаги (вирусы цианобактерий) содержат «фотосинтетические» гены, что позволяет им полностью обеспечивать энергией свою репродукцию (см. раздел 1.9).

Репликация генома бактериофага. Геном РНК-содержащих бактериофагов реплицируется с помощью мультисубъединичной РНК-зависимой РНК-полимеразы

(RdRP). У этого фермента отсутствуют аналоги в живой клетке, и поэтому РНК-бактериофаги содержат кодирующие его гены.

В то же время геномная ДНК бактериофагов реплицируется с помощью тех же механизмов, которые действуют при репликации бактериальных хромосом, а также при репликации плазмид. При копировании ДНК бактериофага используются либо только клеточные факторы репликации (ДНК-связывающие белки DnaA/HU/IHF, ДНК-геликаза DnaB, ДНК-праймаза DnaG, ДНК-гираза и ДНК-полимераза Pol III), либо их репликативный комплекс, модифицированный в результате включения в его состав вирусоспецифичных субъединиц. В репликационной вилке они образуют ***фаговую реплисому*** — мультиферментную органеллу, расположенную на экваторе клетки.

Ori-зависимая репликация кольцевой ДНК (тета-механизм). Кольцевые молекулы хромосомной ДНК клетки-хозяина начинают реплицироваться в репликаторе, или сайте *oriC* (сокр. от англ. **ori**gin — начало и **c**hromosome — хромосома). В результате взаимодействия этого специализированного участка dsДНК с реплисомой геномная молекула расплетается на нити с образованием двух противоположно направленных репликационных вилок (рис. 27). Опыты с включением ^{3}H-тимидина показали, что на начальном этапе репликативные интермедиаты имеют форму «глазка» (англ. eyelet), а позднее приобретают форму греческой буквы тета (θ).

Репликация кольцевых молекул вирусной ДНК и кольцевых плазмид сходна с репликацией кольцевых хромосом. Молекула dsДНК также расплетается в локусе *ori*, в результате чего образуется репликационный «глазок». Однако копирование осу-



Рис. 27. Тета-механизм репликации ДНК (по: Пиневич, 2009).

Сплошные линии — старые нити ДНК; пунктиры — новые нити ДНК; гребенки — РНК-праймеры; белые стрелки — копирование ведущей нити ДНК; черные стрелки — копирование ведомой нити ДНК.

oriC — сайт начала репликации; *terC* — сайт окончания репликации.

Объяснение в тексте.

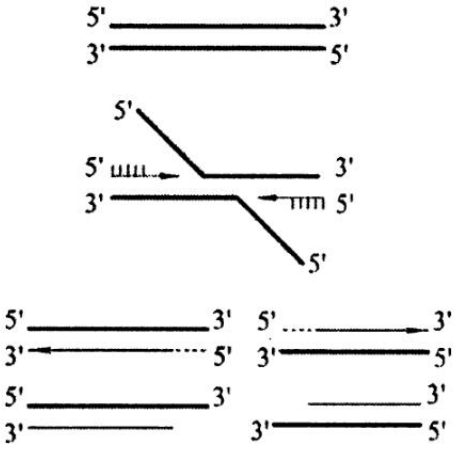


Рис. 28. Репликация линейной ДНК бактериофага.

Гребенка — РНК-праймер; стрелка — направление удлинения нити; пунктир — удаление праймера.

ществляется только в одном направлении, и используется единственная репликационная вилка. Кроме того, в репликации участвует особый инициаторный белок, ген которого находится по соседству с ориджином; репликатор также структурно отличается от *oriC*.

Ori-зависимая репликация линейной ДНК. Репликацию линейных молекул вирусной ДНК усложняет то, что полимераза не может копировать ее с открытого конца (для наращивания полинуклеотидной цепи в направлении 5′→3′ требуется РНК-праймер; после его удаления на 3′-конце остается не реплицированный участок) (рис. 28).

Эта проблема решается по-разному:

— линейная ДНК временно переходит в кольцевую форму и реплицируется, как изложено выше;

— на концах ДНК образуются ss-шпильки. Локус *oriC* занимает центральное положение, разделяя хромосому на две «реплихоры» примерно одинаковой длины. Репликация осуществляется в обоих направлениях в соответствии с тета-механизмом. Роль сайтов *terC* (сокр. от англ. **ter**minus — конец пути и **c**hromosome — хромосома) выполняют шпильки-теломеры. После копирования ДНК сцепленные кольца теломеров декатенируются с помощью резольвазы, и концы сестринских молекул заделываются одноцепочными шпильками;

— в качестве праймеров используются не РНК, а белки. Роль ориджинов выполняют правый и левый теломеры, а сайт *terC* занимает центральное положение. Инициаторный белок Tap (сокр. от англ. **t**elomere-**a**ssociated **p**rotein) распознает сайты *ori*, связывается с ними и начинает расплетать dsДНК. После этого к свободным 3′-концам ковалентно присоединяется «терминальный» белок Tpg (сокр. от англ. **t**erminal **p**rotein **g**). Он играет роль праймера и взаимодействует с ДНК-полимеразой, образующей ковалентную связь между ним и первым дезоксирибонуклеозидтрифосфатом (dTP), который становится 5′-концевым нуклеотидом. От него дочерние цепи ДНК наращиваются в направлении 5′→3′.

Механизм белкового праймирования изучен на примере фага ϕ29 (20 тыс. п.н.). Для бактериофагов, использующих его, характерно наличие коротких инвертированных терминальных повторов; у фага ϕ29 это 3′–TTTCAT–5′. По аналогии с РНК-праймером, содержащим свободную 3′-OH группу, у белка Tpg такие группы имеются в остатках Ser, Tyr и Tre. При инициации репликации образуется гетеродимер ДНК-полимераза/Tpg, что способствует образованию фосфодиэфирной связи между OH-группой остатка Ser-232 в белке Tpg и 5′-dAМФ. Связывание нуклеотида в присутствии дополнительных ранних белков делает сайт *ori* доступным для этого гетеродимера. Праймирование с помощью белка Tpg продолжается до момента встраивания 10-го нуклеотида, после чего гетеродимер диссоциирует, и происходит переход к РНК-праймированию. Репликация начинается на обеих комплементарных нитях, однако с разных концов и не одновременно; частично реплицированные матрицы разделяются до встречи разнонаправленно движущихся полимеразных комплексов. Поэтому в данном случае не требуется участие геликазы, но зато необходим еще один продукт генов раннего оперона — SSB-белок, который защищает одноцепочный участок репликативного интермедиата. Считается, что нити разделяет вирусная ДНК-полимераза (ее N-концевой-домен обладает экзонуклеазной активностью).

Белковое праймирование не уникально для бактериофагов; этот консервативный механизм описан у аденовирусов, плазмид (например, S1 и Kalilo), а также у бактерий рода *Streptomyces*.

У бактериофагов, содержащих линейную dsДНК, имеются геномные модификации, которые способствуют формированию репликативных интермедиатов. Это:

— ***концевая избыточность*** (англ. terminal redundancy), которая встречается у Т-четных фагов. В данном случае на обоих концах линейной ДНК находятся одинаковые последовательности, которые образуются при headful-упаковке (см. раздел 2.3.4), когда от конкатемера отрезается фрагмент большего размера, чем копия генома. Если геном можно схематически изобразить как ABCDEF, то геном с концевой избыточностью выглядит как ABCDEFAB;

— ***прямые концевые повторы*** (англ. direct terminal repeat), например, у фага T7. При этом нуклеотидные последовательности dsДНК можно схематично изобразить как GHABCDEFGH;

— ***инвертированные концевые повторы*** (англ. inverted terminal repeat), например, у фага PRD1 и фага мю. В этом случае на концах молекулы повторяется одна и та же последовательность в зеркальном отражении: ABCDEFGHCBA.

Ori-независимая репликация (сигма-механизм). Этот механизм репликации, известный под образным названием «катящееся кольцо» (англ. rolling circle, RC), впервые описан в середине 1980-х годов на примере плазмиды pT181 *Staphylococcus aureus*. Первоначально его считали крайне редким, хотя уже тогда было известно, что подобным же образом реплицируются ssДНК-бактериофаги, например фаг ϕX174.

Напомним, что главная особенность тета-механизма заключается в том, что локус *ori* распознается и расплетается специфическими белками; на обеих нитях синтезируются праймеры, и ДНК продолжает расплетаться перед репликационной вилкой. В отличие от тета-механизма, главная особенность сигма-механизма состоит в том, что синтез ведущей нити начинается в точке разреза одной из комплементарных ни-

тей ДНК. Репликационная вилка имеет специфическую структуру, а отстающая нить не образуется до тех пор, пока не закончена сборка ведущей нити. Наконец, инициаторный Rep-белок и репликаторный локус здесь иные, чем при тета-механизме. Тем не менее в сигма-механизме, как и в тета-механизме используются бактериальные факторы репликации — геликаза, РНК-полимераза, ДНК-полимераза и гираза, которые образуют органеллу репликации — реплисому.

Основные шаги сигма-механизма изображены на рис. 29. Инициаторный Rep-белок связывается с «двунитевым» ориджином *dso* (сокр. от англ. **d**ouble-**s**trand **o**rigin). Помимо сайта длиной 30 нуклеотидов для связывания Rep-белка, локус *dso* содержит сайт для однонитевого разреза ДНК. Иногда (например, в плазмидах pT181 и pC194) эти сайты примыкают друг к другу. В других случаях (например, в плазмидах pE194 и pLS1) их разделяет последовательность протяженностью в 85 нуклеоти-

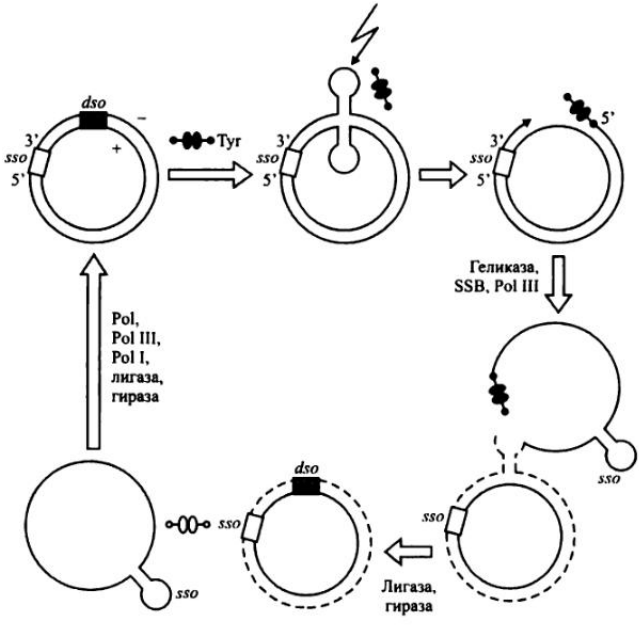


Рис. 29. Сигма-механизм репликации ДНК, или механизм «катящееся кольцо». Одиночный раунд (по: Пиневич, 2009).

Сплошные линии — старые, пунктиры — новые нити ДНК; двойной черный овал — активный, двойной белый овал — неактивный димер белка Rep; зигзагообразная стрелка — место одноцепочного разреза ДНК

Tyr — остаток тирозина, которым белок Rep присоединяется к 5'-концу минус-нити ДНК; *sso* — «однонитевый» ориджин; *dso* — «двухнитевый» ориджин; SSB — белки, стабилизирующие однонитевую ДНК; Pol I и Pol III — ДНК-полимеразы; Pol — РНК-полимераза (праймаза).

дов. В результате связывания с Rep-белком ДНК в локусе *dso* изгибается и образует двойную шпильку, что обнажает сайт для однонитевого разреза. Rep-белок наносит разрез в минус-нити ДНК и ковалентно прикрепляется к образовавшемуся 5′-концу при помощи остатка тирозина, расположенного в его активном центре. Одновременно с разрезанием ДНК он привлекает в локус *dso* геликазу, SSB-белки (сокр. от англ. single-strand binding — связывающиеся с однонитевой ДНК) и ДНК-полимеразу Pol III. ДНК в точке разреза начинает наращиваться на 3′-конце с помощью ДНК-полимеразы до тех пор, пока старая ведущая нить полностью не вытеснится новой. Тогда Rep-белок отрезает вытесненную нить ssДНК в месте соединения старой и новой ведущих нитей (что соответствует скопированному участку разреза). Кольцевая структура ssДНК и dsДНК восстанавливается с помощью лигазы; ssДНК временно остается в релаксированной форме, а dsДНК суперспирализуется при помощи гиразы. Белок Rep освобождается и переходит в неактивную форму. За счет «однонитевого» ориджина *sso* (сокр. англ. single-strand origin) ssДНК превращается в dsДНК. Число ориджинов *sso* в плазмиде составляет от одного до трех. РНК-полимераза Pol узнает в локусе *sso* свой промоторный участок и синтезирует РНК-праймер длиной в 17–18 нуклеотидов, а ДНК-полимераза Pol III его удлиняет. Завершает репликацию ДНК-полимераза Pol I, доращивающая ss-участок на месте, освобожденном после удаления праймера. После этого ДНК-лигаза замыкает концы новой нити, и dsДНК суперспирализуется с помощью гиразы.

Если белок Rep не отрезает вытесненную ssДНК в месте соединения старой и новой ведущих нитей, число копий материнского генома, соединенных «голова к хвосту», или ***конкатемеров*** (англ. concatemer; от лат. **concate**natus — составленный цепью и греч. **mer**os — часть), может быть сколько угодно большим.

В отличие от репликации бактериофагов, при репликации плазмид продвижение репликационной вилки обычно блокируется. Такой регуляторный эффект можно объяснить взаимодействием между белком Rep и новым локусом *dso*, а также транскрипционным контролем за содержанием этого инициатора.

Вначале механизм «катящееся кольцо» был описан только у ssДНК-фага φX174, однако в настоящее время установлено, что его могут использовать и dsДНК-фаги, а также некоторые РНК-содержащие вирусы.

Регуляция транскрипции у бактериофагов. В процессе своего внутриклеточного развития бактериофаги используют генетическую программу, позволяющую переключать транскрипцию с генов одной группы на гены другой группы, причем это происходит в определенной временной последовательности.

Поскольку в течение латентного периода транскрипция вирусных генов предшествует репликации геномной нуклеиновой кислоты, ее условно разделяют на две фазы — раннюю и позднюю, соответственно, до начала синтеза ДНК и после него.

Гены, транскрибируемые в этих фазах, а также соответствующие белковые продукты подразделяют на ранние (англ. early) и поздние (англ. late). Эта классификация достаточно условна и ориентируется на временные рамки хорошо изученного литического цикла Т-четных фагов.

Поскольку синтез белков из разных групп перекрывается во времени, их дополнительно подразделяют на «предранние» (англ. pre-early), «самые ранние» (англ. im-

mediate early), «запаздывающие ранние» (англ. delayed early), «квазипоздние» (англ. quasi-late) и т. д.

Самые ранние белки синтезируются в течение двух первых минут инфекции. Как правило, в эту группу входят факторы защиты от рестриктаз и ДНК-полимеразы; их образование полностью обеспечивается бактериальными ферментами. Ранние белки появляются на 2–6-й минуте инфекции и участвуют в регуляции репликации. Поздние белки — белки морфогенеза и лизиса — появляются после 10-й минуты.

Для включения транскрипции очередной группы генов или выключения транскрипции генов предыдущей группы используются разнообразные механизмы, в частности контроль промоторов, смена сигма-факторов, привлечение фаговых терминаторов и антитерминаторов и т. д.

2.4.4. СБОРКА И ОСВОБОЖДЕНИЕ ВИРИОНОВ БАКТЕРИОФАГОВ

По завершении репликации фагового генома происходит переход к завершающим этапам онтогенеза — сборке вирионов и их выходу из клетки-хозяина.

Сборка вирионов. Известно два способа сборки бактериофагов: 1) сборка предшественника капсида (прокапсида) с последующей упаковкой в него геномной нуклеиновой кислоты (порядок *Caudovirales*, семейства *Cystoviridae* и *Microviridae*); 2) коагрегация генома и структурных белков (семейства *Inoviridae и Leviviridae*).

В первом случае прокапсид образуется с помощью «морфогенетических» белков, которые кодируются как фаговым, так и клеточным геномом. При сборке икосаэдрических прокапсидов эти белки образуют внутренний и наружный ***каркас*** (англ. scaffold).

У разных бактериофагов структура внутреннего каркаса различается: у фага ϕX174 морфогенетический белок образует икосаэдрический каркас внутри строящегося прокапсида; у фага P22 элементы икосаэдрической симметрии каркаса наблюдаются только в участках его контакта с капсомерами; у большинства dsДНК-фагов белки каркаса не образуют икосаэдрическую структуру, а в виде моно-, ди- и тетрамеров присоединяются к капсомерам.

Прокапсид фага ϕX174 состоит из структурного белка (60 копий), пепломерного белка (60 копий), белка внутреннего каркаса (60 копий) и белка наружного каркаса (240 копий). Наружный каркас обеспечивает взаимодействие между пепломерами и капсомерами, а также контролирует икосаэдрическую укладку последних. Внутренний каркас индуцирует конформационные изменения капсомеров, что, в свою очередь, инициирует их самосборку.

Белки каркаса обеспечивают минимальный уровень конденсации структурных белков, достаточный для начала самосборки капсида, форма и размер которого, в конечном счете, определяются строением капсомеров. Поскольку этот процесс может проходить по-разному и приводить к разным результатам, основная задача морфогенетических белков — регулировать сборку в правильном направлении.

Сказанное демонстрируют фаг P2 и его вирус-сателлит P4. Капсомеры фага P2 могут использоваться для построения капсида меньшего размера (45 нм; T=4) и капсида большего размера (60 нм; T=7); второй вариант капсида образуется с меньшей

вероятностью. Белок внутреннего каркаса способствует преимущественной сборке капсида большего размера, поскольку в капсид меньшего размера геном фага P2 не вмещается. Геном вируса-сателлита капсомеров не кодирует, однако его наружный каркас использует капсомеры фага P2 для сборки капсида меньшего размера.

Белки каркаса также контролируют образование входного отверстия, или ***портала*** (англ. portal — ворота) для упаковки генома. Как правило, совместно с белками каркаса они инициируют сборку капсида.

Перед упаковкой генома внутренний каркас удаляется из прокапсида (у большинства представителей порядка *Caudovirales* он разрушается вирусными протеазами). Однако у фага P22 его мономеры сохраняются и могут повторно использоваться для сборки еще нескольких вирионов. У представителей семейства *Microviridae* внутренний каркас также удаляется без участия протеаз; решающую роль играет конкуренция между ним и ДНК за сайты связывания структурных белков.

Геномная нуклеиновая кислота dsДНК-бактериофагов проникает в прокапсид через кольцевой портал на одной из его вершин (рис. 30). С помощью криоэлектронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа установлено, что портал состоит из 12 субъединиц с центральным каналом, который достаточно широк для прохождения dsДНК. По-видимому, портал служит еще и выходным отверстием для ДНК на этапе проникновения вируса.

При упаковке вирусного генома химическая энергия АТФ преобразуется в механическую, и ДНК проталкивается в капсид молекулярными моторами — упаковочными АТФазами. Это бифункциональные ферменты, которые еще могут отрезать концевые копии генома от конкатемера, и поэтому их называют ***терминазами*** (англ. terminase). Различают следующие терминазы: 1) доверху заполняющие капсид безотносительно к инфраструктуре генетического материала (англ. headful — заполненная головка), примером служат фаги P22, SPP1, T1 и T4; 2) фрагментирующие конкате-

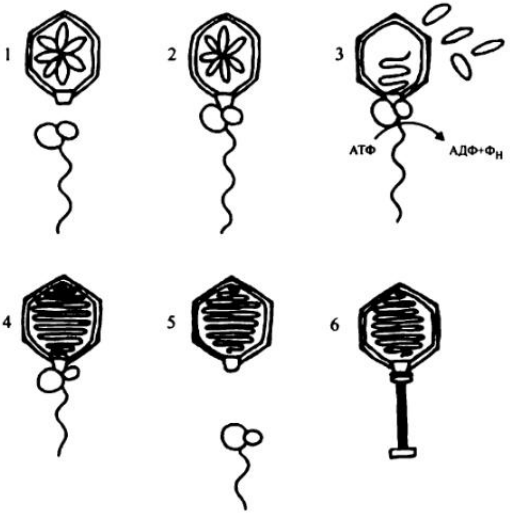


Рис. 30. Упаковка геномной ДНК бактериофага и сборка вириона.

1 — прокапсид с каркасом, присоединение терминазы к конкатемеру; 2 — присоединение терминазы к порталу прокапсида; 3 — индукция конформационных изменений белков прокапсида за счет гидролиза АТФ, проталкивание ДНК, удаление каркаса; 4 — завершение упаковки по механизму headful или после распознавания терминазой сайта терминации упаковки; 5 — отсоединение терминазы и остатка конкатемера; 6 — присоединение хвостового отростка.

мер на одиночные копии генома по «упаковочным» *pac*-сайтам, в случае фагов T3, T7 и лямбда; 3) упаковывающие однокопийный геном, как у фага ϕ29.

Белки портала не только иммобилизуют АТФазы/терминазы, но и регулируют активность этих ферментов.

При использовании конкатемера упаковка начинается с образования под действием терминазы свободного эквивалента генома, даже в отсутствие *pac*-сайтов конкатемер фрагментируется в более или менее определенной зоне, например, у фага T4 преимущественно в области ssДНК-репликативных интермедиатов.

Когда ДНК бактериофага в комплексе с терминазой взаимодействует с порталом, активируется АТФазный домен, и геномная нуклеиновая кислота начинает проталкиваться внутрь прокапсида. Затем терминаза отрезает лишний фрагмент либо в *pac*-сайте, либо по принципу headful.

Для упаковки однокопийного генома терминазной активности не требуется, достаточно только АТФазной активности. Но даже такой упаковочный фермент нуждается в помощниках: он присоединяется к порталу в комплексе с ДНК при помощи белка, участвующего в праймировании, и 5–6 молекул «упаковочных» РНК (англ. packing RNA, pRNA).

Терминаза фага ϕ29 является одним из наиболее эффективных молекулярных моторов. Установлено, что последние участки ДНК проникают в капсид, преодолевая внутреннее давление ~6 мегапаскалей (MPa); при этом мотор создает нагрузку ~70 пиконьютонов (pN).

Упаковка происходит очень быстро, например, у фага T3 ее скорость составляет 5,7 тыс. п.н.·мин$^{-1}$ при 20°C и 22 тыс. п.н.·мин$^{-1}$ при 30°C; при этом на перемещение пары нуклеотидов затрачивается около двух молекул АТФ. В свою очередь, при упаковке ДНК фага лямбда расходуется энергия гидролиза 6–10 молекул АТФ на пару нуклеотидов. В процессе упаковки происходят необратимые конформационные изменения как отдельных капсомеров, так и всей головки вириона; внутреннее пространство капсида расширяется, что способствует удалению каркаса и стабилизирует вирион.

Терминазы, как правило, не остаются в составе вирионов, а диссоциируют от них по завершении упаковки и могут присоединяться к новым копиям генома.

Образование сложных вирионов включает в себя несколько независимых актов: помимо сборки прокапсида и упаковки нуклеиновой кислоты идет сборка хвостового отростка и концевых фибрилл. Из этих частей окончательно собирается зрелый вирион (рис. 30).

Второй, реже встречающийся, механизм упаковки — коагрегация геномной нуклеиновой кислоты и структурных белков — обеспечивается их сайтспецифичными взаимодействиями. В данном случае сборка и упаковка происходят одновременно, без промежуточных стадий или интермедиатов. Такой механизм упаковки характерен для ssРНК-бактериофагов, независимо от их хозяйской принадлежности и формы вириона. Ключевую роль играет даже не конкретная последовательность нуклеотидов, а специфика локальных 3D-структур.

В частности, у икосаэдрического фага MS2 (T=3) сборка начинается в области большой петли (англ. stem-loop) на ssРНК(+), с которой связывается димер струк-

турного белка; другие димеры присоединяются по концам затравки. Наличие такой вторичной структуры является единственным условием для сборки вириона: любые РНК, у которых она есть, могут образовывать вирусоподобные частицы.

Освобождение вирионов. У бактериофагов очень распространен литический инфекционный цикл, когда выход вирионов сопряжен с разрушением клетки-хозяина. В большинстве случаев лизис обеспечивается 2-компонентной ферментной системой, состоящей из ***лизина***, или ***эндолизина*** (англ. endolysin), и ***холина*** (англ. holin, от hole — отверстие; в *русской транскрипции возникает путаница со спиртом холином — N-(2-гидроксиэтил)-N,N,N-триметиламмоний-гидроксидом*).

Эндолизины, разрушающие пептидогликан, в зависимости от своих молекулярных мишеней подразделяются на гликозилазы, трансгликозилазы, амидазы и эндопептидазы. Гликозилазы и трансгликозилазы разрушают гликозидные связи в полигликановом остове муреина. Амидазы и эндопептидазы воздействуют на пептидные связи в поперечных мостиках. Большинство эндолизинов, которые не способны преодолеть цитоплазматическую мембрану, накапливается внутри клетки-хозяина на завершающем этапе инфекции.

Холины являются гидрофобными интегральными мембранными белками, они повышают проницаемость цитоплазматической мембраны и открывают эндолизинам доступ к пептидогликану. В зависимости от первичной структуры их подразделяют на класс I (белки с тремя трансмембранными спиралями, состоящие из >95 аминокислот) и класс II (белки с двумя трансмембранными спиралями, состоящие из 65–95 аминокислот). Интересно, что гены эндолизинов у бактериофагов и их хозяев очень схожи и, возможно, переносятся горизонтально. Бактериофаги грамположительных бактерий, как правило, кодируют эндолизины с двумя доменами — N-концевым (с энзиматической активностью) и С-концевым (для связывания с пептидогликаном).

В систему лизиса клетки-хозяина дополнительно входят регуляторные белки, которые активизируют или, наоборот, ингибируют активность холинов. Ингибиторы холина часто (но не всегда) отличаются от самого холина лишь несколькими аминокислотными остатками на N-конце и транскрибируются с того же гена, используя альтернативные старт-кодоны. Комплекс холина с ингибитором не может интегрироваться в цитоплазматическую мембрану. Ингибиторный анализ показал, что момент лизиса определяется энергетическим статусом цитоплазматической мембраны.

При инфицировании вирулентными штаммами фагов из семейств *Leviviridae* и *Microviridae* лизис клетки осуществляется ***амуринами*** (англ. amurin; от греч. a — без и лат. murus — стенка; *фермент, удаляющий клеточную стенку*), которые блокируют отдельные стадии биосинтеза пептидогликана. При таком сценарии лизиса хозяин сохраняет жизнеспособность до заключительных этапов инфекции.

2.5. ЛИЗОГЕНИЯ

Лизогения (англ. lysogeny), или лизогенная фазовая инфекция, характеризуется отсутствием стадий сборки капсида и упаковки ДНК, хотя вирус потенциально способен перейти к литическому сценарию. Приобретение лизогенного состояния называется ***лизогенизацией*** (англ. lysogenization).

При лизогении геном бактериофага встраивается в хозяйскую хромосому. Этот процесс называется ***интеграцией*** (англ. integration) и осуществляется с помощью вирусной ***интегразы*** (англ. integrase). Геномная ДНК бактериофага, встроенная в хромосому и образующая с ней единый репликон, называется ***профагом*** (англ. prophage; *букв.* — предшественник фага). В свою очередь, бактерия, в хромосому которой встроен профаг, называется ***лизогенной*** (англ. lysogen bacterium).

Бактериофаги, способные вызвать лизогению, называются ***умеренными*** (англ. temperate phage), в отличие от ***вирулентных, или литических, бактериофагов*** (англ. virulent phage, lytic phage), размножение которых чаще всего приводит к лизису клетки-хозяина.

Лизогенная инфекция приобретает либо хронический характер, либо временный. Во втором случае происходит ***индукция профага***; он удаляется из клеточной хромосомы и начинает размножаться по литическому сценарию.

Индукция профага, как правило, связана с воздействием агентов, повреждающих ДНК, или иных стрессовых факторов. Переходу к литической инфекции может способствовать вирус-хелпер. В частности, умеренные фаги P2 и P4 выступают в качестве взаимных дерепрессоров. Фаг P4 дерепрессирует профага P2 за счет белка E, который взаимодействует с репрессором C; в результате последний отсоединяется от промотора, что активирует транскрипцию генов поздних белков. В свою очередь, фаг P2 дерепрессирует профага P4 с помощью белка Cox, активирующего промотор генов репликации.

Известны бактериофаги, которые способны выбирать тот или иной путь развития инфекции. В частности, это фаг лямбда (сем. *Siphoviridae*; см. раздел 2.7.1.3), инфицирующий *E. coli*. На примере интеграции и эксцизии этого бактериофага был впервые изучен механизм сайтспецифичной рекомбинации.

2.5.1. ИНТЕГРАЦИЯ И ЭКСЦИЗИЯ ФАГА ЛЯМБДА

При лизогении кольцевая ДНК бактериофага интегрируется в клеточную хромосому и становится профагом. Репрессорный белок, продукт вирусного гена *cI*, почти полностью подавляет экспрессию вирусного генома.

В свою очередь, при индукции профага синтез репрессора блокируется антирепрессором (продуктом вирусного гена *cro*). Это приводит к эксцизии вирусной геномной ДНК и, как следствие, к воспроизводству популяции инфекционных вирионов.

Процессы интеграции и эксцизии основаны на сайтспецифичной рекомбинации (рис. 31). Со стороны бактерии в интеграции принимают участие уникальный сайт *attB* (сокр. англ. attachment — присоединение и B — bacterium), а со стороны бактериофага — уникальный сайт *attP* (сокр. англ. attachment — присоединение и P — plasmid; другая возможная расшифровка — phage). В свою очередь, в эксцизии участвуют сайт *attL* (сокр. от англ. left) и сайт *attR* (сокр. от англ. right), фланкирующие профаг слева и справа. Рекомбинационные белки обладают высоким сродством ко всем четырем сайтам.

Профаг локализуется в консервативном участке хромосомы между генами *gal* и *bio*. Если сайт *attB* делетирован, то бактериофаг может интегрироваться в других участках хромосомы, однако частота этого события ниже на три порядка.

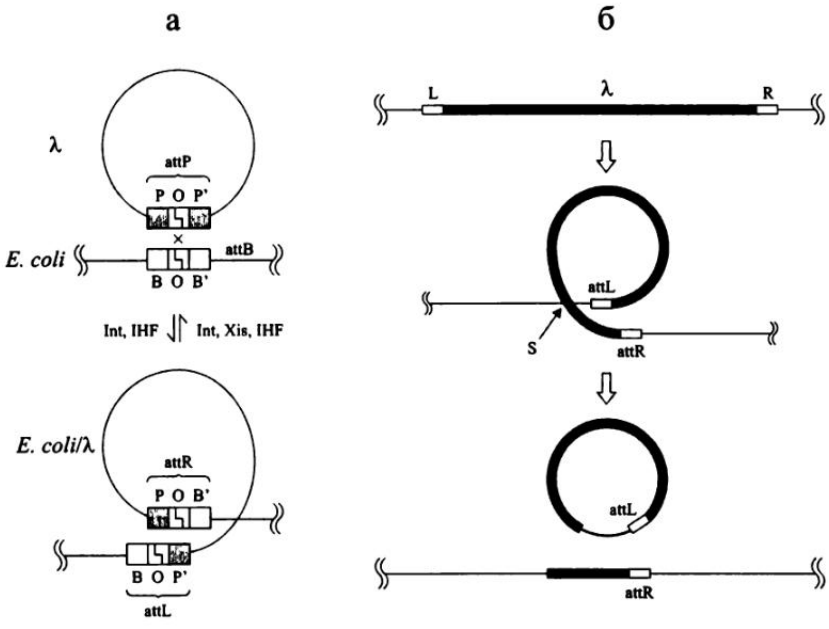


Рис. 31. Интеграция/эксцизия (а) и незаконная рекомбинация при эксцизии (б) фага лямбда (по: Пиневич, 2009).

attB и *attP* — рекомбинационные сайты присоединения; *attL* и *attR* — гибридные рекомбинационные сайты; *S* — сайт незаконной рекомбинации; Int — интеграза; Xis — эксцизионаза; IHF — хозяйский ДНК-связывающий белок.

Хозяйский рекомбинационный сайт *attB* состоит из центральной части, или АТ-богатой кор-последовательности О (сокр. от англ. overlap region — перекрывающаяся область). Ее длина 15 п.н., и она фланкирована короткими «плечами» В и В′ (длиной по 20 п.н.). Таким образом, этот сайт имеет структуру ВОВ′. Вирусный сайт рекомбинации *attP* содержит такую же кор-последовательность О, однако она фланкирована длинными «плечами» Р и Р′ (~160 и 80 п.н.), т. е. имеет структуру РОР′.

При интеграции, происходящей в результате рекомбинации по кор-последовательностям в составе сайтов ВОВ′ и РОР′, образуются сайты *attL* и *attR*, которые имеют гибридную структуру ВОР′ и РОВ′. При эксцизии происходит рекомбинация по сайтам ВОР′ и РОВ′, с возвращением к первоначальной структуре ВОВ′ и РОР′ (рис. 31). Хотя интеграция обратима, она осуществляется иначе, чем эксцизия, — в этих процессах используются разные сайты узнавания интегразы, что требует участия асимметричного набора рекомбинационных белков.

Интеграза Int. Интеграцию осуществляет продукт фагового гена — интеграза Int, которая действует совместно с бактериальным ДНК-связывающим белком IHF. Для эксцизии помимо них требуется другой продукт фагового гена — эксцизионаза Xis (сокр. от англ. excision). Сайт *attP* содержит семь субсайтов для связывания интегразы Int, три субсайта для связывания ДНК-изгибающего белка IHF (H1, H2 и H′)

и субсайт для связывания белка Xis. Сайт *attB* содержит два субсайта для связывания интегразы Int.

При интеграции и эксцизии интеграза Int выступает в качестве сайтспецифичной топоизомеразы I. Она наносит однонитевые разрезы в кор-последовательностях обоих рекомбинационных сайтов и одновременно с этим устраняет их суперспирализацию, что позволяет образовать перекрестные фосфодиэфирные связи. Предполагается, что в результате миграции перекреста образуется хиазма Холлидея с гетеродуплексным участком, который укладывается в границы сайта POP′.

Интеграза Int (40 кДа) принадлежит к суперсемейству «тирозинных» рекомбиназ, которые участвуют в разнообразных перестройках ДНК у прокариотов — репликации, декатенации сцепленных репликонов, сегрегации сестринских репликонов и т. д. Все эти ферменты, действуя в тетрамерной форме, катализируют обмен нитями ДНК путем образования и демонтажа крестообразных структур, или хиазм Холлидея (для этого требуется последовательно нанести две пары ss-разрезов, а затем произвести лигирование). Такие реакции не требуют затраты энергии и происходят посредством образования ковалентно связанных 3′-фосфотирозинных ДНК-белковых интермедиатов.

Интеграза Int содержит большой С-концевой домен, который присоединяется к обеим кор-последовательностям и катализирует ферментативные стадии рекомбинации. В свою очередь, небольшой N-концевой домен интегразы связывается за пределами участка обмена нитями.

ДНК-изгибающие белки. Чтобы интеграза могла взаимодействовать с взаимно дистанцированными областями субстрата, используются вспомогательные белки, которые образуют на молекуле ДНК сайтспецифичный изгиб. При эксцизии эту роль выполняет фаговый белок Xis; когда его мало, используется хозяйский белок Fis (сокр. от англ. factor for inversion stimulation).

Третий ДНК-изгибающий белок, IHF (сокр. от англ. integration host factor; *название объясняется тем, что этот белок имеет отношение к интегративной рекомбинации фага лямбда в хромосому хозяина*) участвует и в интеграции, и в эксцизии. Он состоит из двух субъединиц — IHFα (10,5 кДа; ген *himA*) и IHFβ (9,5 кДа; ген *hip*/*himD*).

Незаконная рекомбинация. Термин «незаконная рекомбинация» (англ. illegitimate recombination) используется по отношению к рекомбинационным событиям, в которых участвуют негомологичные области одной и той же молекулы ДНК или негомологичная пара ДНК-донор/ДНК-реципиент. Иными словами, он применяется по отношению к разным явлениям, формально объединенным по негативному признаку — отсутствию сходства между обменивающимися участками (поэтому такой тип рекомбинации правильнее было бы назвать негомологической). Наиболее изучена незаконная рекомбинация при транспозиции мобильных элементов.

Тем не менее незаконной (что, конечно, может привести к путанице) иногда называют такую рекомбинацию, которая затрагивает взаимно сходные последовательности. В частности, такая рекомбинация происходит при эксцизии фага лямбда, когда внутренняя (т. е. расположенная между *att*-сайтами) последовательность профага обменивается с последовательностью бактериальной ДНК, удаленной от одного из сай-

тов присоединения. Обмен осуществляется с помощью рекомбиназы RecA и определяется случайной гомологией между короткими последовательностями вирусной и бактериальной ДНК.

В результате такой рекомбинации образуются дефектные вирусные частицы, поскольку фрагмент вирусной ДНК замещается фрагментом бактериальной хромосомы и одного из *att*-сайтов. Благодаря тому, что часть бактериальных генов включается в состав вирусного репликона, они могут переноситься в реципиентную бактерию посредством трансдукции (см. раздел 2.4).

При интеграции или из-за случайных постинтеграционных мутаций профаг может лишиться генов, способствующих эксцизии; в этом случае лизогения становится необратимой.

2.5.2. ЛИЗОГЕННАЯ КОНВЕРСИЯ

Лизогенная, или фаговая, конверсия (англ. lysogenic conversion; phage conversion) — это приобретение бактерией новых фенотипических свойств в результате интеграции профага. Данное явление связано с горизонтальным переносом генов и служит одним из примеров механизма, с помощью которого происходит недарвинова эволюция.

Признаки лизогенной конверсии разнообразны. Это могут быть изменения морфологии и пигментации колоний, смена серотипа в результате модификации О-антигена (например, у *Salmonella* sp.) и т. д.

Поскольку при лизогенной конверсии может измениться состав вирусных рецепторов, лизогенные бактерии приобретают «иммунность», или устойчивость, к заражению родственными бактериофагами. В свою очередь, профаг лямбда содержит ген *rex*, продукт которого даже в незначительных количествах блокирует ранние этапы инфекции Т4-подобных фагов.

Лизогенная конверсия имеет большое значение для медицинской бактериологии, поскольку это один из способов приобретения непатогенными бактериями факторов вирулентности и патогенности.

Факторы вирулентности. Вирулентные свойства бактерий часто зависят от специализированных поверхностных структур, которые либо позволяют преодолеть иммунитет клетки-хозяина, либо обеспечивают адгезию к клеткам-мишеням. Некоторые из этих структур могут кодироваться умеренными бактериофагами, в частности капсула патогенных штаммов *Streptococcus pneumoniae*.

Возбудитель цереброспинальных менингитов *Neisseria meningitidis* — один из обитателей носоглотки даже у практически здоровых людей. Популяция этих грамотрицательных кокков генетически гетерогенна; лишь представители нескольких кластеров способны проникнуть в кровяное русло и преодолеть гематоэнцефалический барьер. Факторами вирулентности служат защитные полисахаридные капсулы и адгезионные фимбрии, хотя эти структуры широко представлены и у представителей нормальной микробиоты. Путем секвенирования генома менингококков было установлено, что у вирулентных штаммов имеются профаги, которые встроены в хромосому в области множественных dRS3-повторов. Нуклеотидные последова-

тельности рамок считывания указывают на родство этих профагов с представителями семейства *Inoviridae* (в частности, с фагом CTXφ, который содержит ген холерного токсина).

Факторы патогенности. Особое значение имеет появление токсических свойств у лизогенных бактерий (табл. 16).

Таблица 16. **Факторы патогенности, приобретенные бактериями в результате лизогенной конверсии**

Бактерия	Вирус	Фактор патогенности	Заболевание	Симптомы
Clostridium botulinum	Фаг C1	Нейротоксин	Ботулизм	Нарушение синаптической передачи, приводящее к параличу дыхательных мышц
Corynebacterium diphtheriae	Фаг β	Дифтерийный токсин	Дифтерит	Отек горла; поражение сердца и почек
E. coli (STEC-штаммы)	Фаг H-19B	Цитотоксин (Шига-токсин)	Острая пищевая инфекция	Геморрагическая диарея
Pseudomonas aeruginosa	CTXφ-подобный фаг	Порообразующий цитотоксин	Гнойная инфекция	Воспаление; некроз тканей
	P2-подобный фаг	Бактериоцин	—"—	Дисбактериоз
Salmonella enterica серовар Typhi	Фаг CT18-02	Энтерогемолизин	Брюшной тиф	Общая интоксикация; гемолитическая уремия
Shigella flexneri	λ-подобный фаг	Энтеротоксин	Бациллярная дизентерия (шигеллез)	Геморрагическая диарея; лихорадка
Staphylococcus aureus	Фаг ϕPVL	Пиогенный лейкоцидин	Острая кишечная инфекция	Лейкоцитоз; воспаление и некроз тканей; токсический шок
Streptococcus pyogenes	Фаг 315.4	Фосфолипаза A_2	Синдром токсического шока	Воспаление; нарушение свертываемости крови
	Фаг T12	Пирогенные экзотоксины A и C	Скарлатина	Скарлатинозная лихорадка; токсический шок; некротизирующий фасциит
Vibrio cholerae	Фаг CTXφ	Токсин CT	Холера	Диарея; обезвоживание организма

В случае *Corynebacterium diphtheriae* профаг коринефага β содержит ген, который кодирует дифтерийный токсин, блокирующий эукариотную трансляцию. Он переносит АДФ-рибозный остаток от молекулы НАД на эукариотный фактор элонгации EF-2; мишенью для ковалентного присоединения АДФ-рибозы к С-концу фактора EF-2 служит необычная аминокислота дифтамид, представляющая собой модифицированный гистидин. В свою очередь, у *Clostridium botulinum* профаг кодирует нейротоксин, который вызывает расстройство зрения и дыхательный паралич, что может привести к летальному исходу. Профаг фага T12, инфицирующего *Streptococcus pyogenes*, кодирует пирогенный токсин, повреждающий субэпидермальные капилляры, что вызывает появление красной накожной сыпи. Гены двух наиболее известных

токсинов *Staphylococcus aureus* (энтеротоксина А, вызывающего потерю воды и минеральных ионов клетками эпителия пищеварительного тракта, и пиогенного лейкоцидина) также принадлежат профагам. Наконец, токсин CT *Vibrio cholerae*, Шига-токсин STEC-штаммов *E. coli*, энтерогемолизин *Salmonella enterica* серовар Typhi и дизентерийный энтеротоксин синтезируются бактериями, содержащими лямбдаподобного профага.

2.5.3. ПСЕВДОЛИЗОГЕНИЯ

При псевдолизогении (англ. pseudo-lyzogeny), так же как и при лизогении, отсутствует внеклеточная стадия онтогенеза бактериофага. Однако, в отличие от лизогении, вирус не интегрируется в хромосому, а существует в форме плазмиды. При этом он автономно реплицируется в общем ритме с репликацией и цитокинезом клетки-хозяина.

Данный тип вирусной инфекции уникален для бактериофагов-представителей семейств *Inoviridae*, *Myoviridae* и *Siphoviridae*.

Псевдолизогению вызывают лизогенные бактериофаги, у которых dsДНК является геномной нуклеиновой кислотой или служит репликативным интермедиатом. Предполагается, что в природных популяциях бактерий псевдолизогения обычна и вызвана тем, что хозяин не в состоянии обеспечить продуктивную инфекцию из-за низкого уровня энергетического метаболизма и дефицита биогенных элементов; при этом репродукция бактериофага ограничивается репликацией геномной нуклеиновой кислоты.

Псевдолизогения, так же как и лизогения, обратима; после устранения лимитирующего фактора запускается литический цикл.

Отличить псевдолизогенного бактериофага от плазмиды только на основе размерного критерия невозможно; требуется секвенирование и аннотирование генов (в отличие от бактериофагов плазмиды не кодируют полимеразных комплексов и не способны образовывать вирионы).

2.6. ТРАНСДУКЦИЯ

Трансдукцией (англ. transduction; от лат. trans-duco — переправлять) называется горизонтальный перенос хромосомной или плазмидной ДНК с помощью бактериофага, играющего роль вектора.

При трансдукции часть генома клетки-донора упаковывается в капсид бактериофага. Затем она передается реципиенту в ходе инфекционного процесса, который состоит из адсорбции вирусной частицы поверхностными структурами клетки-мишени и инъецирования упакованной ДНК в цитоплазму.

При трансдукции переносится dsДНК в линейной конфигурации (по крайней мере, в случае фагов P1 и P22).

Внутри клетки-реципиента донорская ДНК либо деградирует, либо сохраняется и получает возможность реплицироваться (автономно или после интеграции в хромосому — если трансдуцированная ДНК донора содержит гомологичные участки

с ДНК реципиента, между ними происходит рекомбинация, и генетический материал донора ассимилируется реципиентом).

При трансдукции, как и при генетической трансформации (т. е. простейшем типе горизонтального переноса, при котором в качестве вектора выступает молекула ДНК), не соблюдается принцип совпадения места/времени, т. е. не требуется партнерская пара. Однако, в отличие от «голой» трансформирующей ДНК, в случае трансдукции ДНК упакована, что защищает ее от повреждения, в частности нуклеазами. Поэтому трансдукция служит более надежным способом доставки ДНК в клетку реципиента.

Поскольку капсид может вместить в себя только небольшое количество ДНК — около одного эквивалента фагового генома (~100 тыс. п.н.), с помощью трансдукции переносится ограниченное число тесно сцепленных генов; в случае фага P1 это ≤2% генома *E. coli*.

Феномен трансдукции впервые обнаружили в 1952 г. американские вирусологи Джошуа Ледерберг (J. Lederberg) и Натан Зиндер (N. D. Zinder) на примере фага P22. При одновременном высеве на минимальную среду двух штаммов *Salmonella enterica* серовар Typhimurium, ауксотрофных по разным наборам аминокислот, вырастало небольшое количество колоний дикого типа, что свидетельствовало о рекомбинационном переносе генов. Ответственный за это вирулентный фаг P22 и сейчас остается одним из модельных объектов молекулярной генетики бактерий и их вирусов.

Спустя три года американский вирусолог Эдвин Леннокс (E. S. Lennox) открыл фага P1, осуществляющего трансдукцию у *E. coli*. В настоящее время трансдукция описана более, чем у 50 видов бактерий из 25 родов, а также у трех видов архей, относящихся к двум родам.

Если раньше считали, что передача генов путем трансдукции происходит только в узком кругу энтеробактерий (как, например, в случае фагов лямбда и T4), то в настоящее время показано, что многие трансдуцирующие бактериофаги обладают широким промискуитетом. Кроме того, выяснилось, что геномы бактерий на 20% состоят из вирусных генов. Наконец, следует иметь в виду, что концентрация вирусных частиц, прежде всего бактериофагов, в водных экосистемах оценивается как 10^4–10^8·мл$^{-1}$ (на три порядка выше, чем концентрация бактерий). Все это показывает, что трансдукция служит одним из факторов эволюции геномов в природных популяциях бактерий, поскольку она способствует освоению новых ниш и лучшей адаптации к ранее занятой нише. Кроме того, трансдукция имеет важное клиническое значение, поскольку с ее помощью распространяются гены вирулентности и гены устойчивости к антибиотикам.

Если трансформацию можно рассматривать как использование в генетических целях механизма трофического импорта полинуклеотидов, а конъюгацию — как использование в генетических целях механизма секреции ферментов и токсинов, то трансдукция представляет собой побочный эффект репродукции умеренных бактериофагов.

Умеренные и литические бактериофаги. Напомним, что бактериофаги бывают литическими и умеренными. Литический бактериофаг использует программу для репродукции зрелых вирионов, которые обычно покидают клетку-хозяина в результате

ее лизиса. В то же время умеренный бактериофаг предпочитает стабильное партнерство с хозяином — он координирует свою репликацию с репликацией хромосомы бактерии и избирательно подавляет экспрессию тех генов, продукты которых могут причинить вред хозяину.

ДНК умеренного бактериофага, как правило, интегрируется в хромосому хозяина и становится профагом. Некоторые умеренные фаги (например, LE1, N15, P1, φ20 и φBB-1) не способны к интеграции и существуют в качестве автономно реплицирующейся плазмиды.

Лучше всего на наличие профагов изучены бактерии фил BXII *Proteobacteria* и BXIII *Firmicutes*. В частности, 11 из 14 секвенированных геномов протеобактерий содержат по 7–20 профагов. В свою очередь, 9 секвенированных геномов фирмикутов содержат по 2–6 профагов. Остальные филы в этом отношении менее охарактеризованы, хотя считается, что иметь профага — скорее правило, чем исключение. Характерно, что паразитические бактерии с «минимизированными» геномами не содержат профагов, что можно считать следствием эволюционной стратегии массового делетирования генов (даже незаменимых). Примерами служат такие эндопаразиты, как *Buchnera* sp. и *Mycobacterium leprae*, а также эктопаразит *Mycoplasma* sp. На данный момент чемпионом по числу профагов, одновременно присутствующих в хромосоме, является инфицирующий пищевые продукты патоген *E. coli* штамм O157:H7 Sakai (18 профагов, что составляет ~16% генома). Еще один опасный патоген, *Streptococcus pyogenes*, содержит 4–6 профагов (до 12% генома). Примером богатой профагами непатогенной бактерии служит *B. subtilis* (10 профагов).

Для сохранения лизогенного состояния необходим репрессор, подавляющий экспрессию большинства вирусных генов, в частности тех, которые нужны для образования вирионов и лизиса клетки.

При спонтанной инактивации рецептора (частота 10^{-5}–10^{-6} на клетку) бактериофаг переходит к литическому циклу. В свою очередь, профага можно индуцировать почти одновременно у всех лизогенных клеток, для чего необходимо внешнее воздействие, например УФ-облучение или обработка мутагенами. Индукции профага с частотой 10^{-2}–10^{-1} также способствует стресс у хозяина, например перенос бактерии на голодную среду. В обоих случаях активизируются гены литического цикла, в результате чего образуются зрелые вирионы.

Лизис, наблюдаемый визуально или оцениваемый по уменьшению светорассеяния культуры при 550 нм, является следствием разрушения муреина литическими системами бактериофага или клеточными автолизинами. Известны две крайности — когда клетка мгновенно «растворяется» с образованием мембранных фрагментов и обломков клеточной стенки, в случае фага лямбда, или когда клеточная стенка сохраняется в виде «тени» (англ. ghost); примером служит фаг φX174. В первом случае стенка разрушается под воздействием эндолизина (гетерогенный комплекс ферментов, к которому относятся гликозидаза-лизоцим, литическая трангликозилаза и эндопептидаза; они закодированы в геноме фага, и их гены начинают экспрессироваться с началом синтеза капсомеров). Лямбда-подобные фаги обладают тремя поздними генами (*s*, *r* и *rz*), которые транскрибируются с общего промотора. Ген s контролирует лизис, ген *r* кодирует трансгликозилазу; функция гена *rz* не установлена. Во втором

случае клеточная стенка повреждается автолизинами, в частности амидазой и эндопептидазой, однако сохраняет свою морфологию. Как уже отмечалось, при лизогении экспрессируется только незначительная часть фаговых генов, причем те, которые не имеют отношения к образованию вирионов и лизису клетки.

В соответствии с особенностями развития трансдуцирующего бактериофага различают два типа трансдукции — общую и специализированную.

2.6.1. ОБЩАЯ ТРАНСДУКЦИЯ. ФАГ P22

Общая трансдукция играет значительную роль в горизонтальном переносе генов между близкородственными бактериями.

Суть феномена. При литической инфекции или при индукции умеренных бактериофагов активируются гены вирусных эндонуклеаз, и хромосома клетки-хозяина расщепляется на крупные фрагменты.

В случае общей трансдукции (англ. generalized transduction) фрагменты ДНК хозяина случайно упаковываются в капсид вместо вирусной ДНК (при условии, что в них имеются участки гомологии с *pac*-сайтами). При этом относительно редком ($\leq 1 \cdot 10^{-3}$) событии с равной вероятностью могут мобилизоваться любые хромосомные гены, поскольку решающее значение приобретает длина фрагмента, а не его нуклеотидная последовательность. В процессе упаковки по механизму headful терминаза отрезает фрагмент бактериальной ДНК, по длине примерно равный геномной ДНК бактериофага.

Таким образом, в результате функциональной мимикрии бактериальная ДНК упаковывается в головку капсида вместо вирусной ДНК. Естественно, что такой «фальшивый» бактериофаг не в состоянии пройти литический цикл после попадания в клетку реципиента, хотя сохраняет способность к адсорбции и инъецированию ДНК.

В результате рекомбинации между донорной и реципиентной ДНК появляются мутантные бактерии (трансдуктанты), которые стабильно наследуют привнесенные гены. Теоретически любой фрагмент ДНК хозяина может быть упакован в капсид, поэтому такой тип трансдукции называется не только общей, но и неспецифической.

Феномен общей трансдукции учитывается при построении генетических карт — по частоте совместного наследования признаков при трансдукции можно судить о расстоянии между их генетическими детерминантами.

Каноническим примером бактериофага, осуществляющего общую трансдукцию, служит **фаг P22** (сем. *Podoviridae*).

Так же, как фаг лямбда, он способен «выбирать» цикл развития; они оба являются умеренными бактериофагами, способными вызвать лизогению и индуцировать лизис клетки-хозяина. Для геномной ДНК фага P22 (43,5 тыс. п.н.) характерна циклическая пермутация, а также концевая избыточность в виде длинных (~2 тыс. п.н.) прямых повторов в результате упаковки по механизму headful.

Рецептором фага P22 служит липополисахарид наружной мембраны; адсорбция сопровождается расщеплением О-цепи вирусной гидролазой (эндорамнозидазой), встроенной в хвостовой отросток, что препятствует повторному заражению.

Сразу же после проникновения вирусная ДНК замыкается в кольцо (так же как у фага лямбда), однако механизм перехода в циклическую репликативную форму в данном случае иной. Циклический интермедиат служит матрицей для транскрипции и воспроизводится путем *ori*-зависимой репликации. Затем копирование продолжается по механизму «катящееся кольцо», в результате чего появляются длинные конкатемеры.

Терминаза распознает *pac*-сайт и рядом с ним наносит ds-разрез. При упаковке теряется 250 молекул каркасного белка и изменяется конформация капсомеров, что увеличивает внутреннее пространство капсида. Эндонуклеаза отрезает лишнюю ДНК, и терминаза снова присоединяется к свободному концу конкатемера.

В результате лизиса освобождается 50–100 новых вирионов. В природной популяции бактерий, имеющей высокую численность, частота трансдукции велика (одна из 1000 частиц фага содержит фрагмент хромосомы хозяина); в лабораторных условиях она еще выше. Например, у мутантов фага P22HT терминаза утратила способность распознавать собственные *pac*-сайты, и почти половина популяции вирусного потомства содержит фрагменты бактериальной ДНК.

2.6.2. СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ТРАНСДУКЦИЯ. ФАГ МЮ

Умеренные бактериофаги интегрируются в хромосому клетки-хозяина. Некоторые из них делают это только в одном хромосомном сайте (примером служит *attB*-сайт фага лямбда), поэтому размер и нуклеотидные последовательности переносимых фрагментов бактериальной ДНК строго определены. Другие бактериофаги могут интегрироваться в нескольких сайтах (свыше десяти в случае фага P2). Наконец, существуют бактериофаги, способные интегрироваться практически в любом участке хромосомы; пример — фаг мю (μ; Mu). После эксцизии он захватывает с собой и передает реципиенту только те гены, которые находились по соседству с сайтом интеграции.

Суть феномена. Процесс ***специализированной трансдукции*** (англ. specialized transduction) осуществляет умеренный бактериофаг, который интегрируется в одном или нескольких сайтах бактериальной хромосомы.

Специализированную трансдукцию осуществляют многие умеренные бактериофаги. Например, фаг лямбда переносит гены локуса *gal*, обеспечивающего утилизацию галактозы, и гены *bio*, ответственные за образование биотина. Они локализуются по соседству с сайтом интеграции вируса.

При эксцизии происходит незаконная рекомбинация (см. выше) в участках случайной гомологии между короткими последовательностями бактериальной ДНК и вирусной ДНК, в результате которой в хромосоме хозяина остается фрагмент профага. В свою очередь, часть последовательностей генома бактериофага замещается хозяйскими последовательностями. Если при этом сохраняется *pac*-сайт, рекомбинантная ДНК упаковывается в капсид и доставляется в клетку нового хозяина. Таким образом, рекомбинация гомологичных участков ДНК трансдуцирующего бактериофага и хромосомы реципиента приводит к горизонтальному переносу бактериальных генов.

Enterobacteria phage Mu — **фаг мю** относится к семейству *Myoviridae*. Его название (сокр. от англ. **mu**tator — вызывающий мутации) указывает на то, что он служит причиной наследственных изменений генома у хозяина; для него обязательны встраивание в хромосому и переход в состояние профага.

Линейная dsДНК фага мю имеет размер 39 тыс. п.н., однако на собственно фаговый геном из них приходится лишь 37,2 тыс. п.н. Остальное — это фрагменты бактериальной хромосомы: на левом плече 50–150 п.н., на правом — 1–2 тыс. п.н. Их нуклеотидные последовательности варьируют, поскольку фаг мю может интегрироваться практически в любом локусе. Различие в длине чужеродных участков определяется упаковкой по механизму headful при наличии резервного объема капсида. Терминаза не распознает специфических сайтов, а лишь отрезает лишний фрагмент после заполнения головки. Таким образом, у потомства фага мю, образовавшегося в одной клетке, геномы различаются по длине и концевым нуклеотидным последовательностям.

Другой особенностью генома фага мю служит присутствие в правом плече инверсионного G-сегмента (англ. invertible G-segment) размером 3 тыс. п.н., который содержит гены U, U′, S и S′. Справа к G-сегменту примыкает ген «инвертазы», обеспечивающей G(+)-направление или G(–)-направление транскрипции (соответственно, SU или U′S′). Смена направления транскрипции регулируется путем активации одного из двух промоторов G-сегмента. В результате разнонаправленной транскрипции синтезируются два разных белка терминальных фибрилл хвостового отростка. Инверсия транскрипции позволяет фагу мю инфицировать широкий круг хозяев: при G(+)-направлении заражаются *E. coli* (штаммы K12, B и E) и сальмонеллы; при G(–)-направлении — *E. coli* (штамм C), а также энтеробактерии, относящиеся к родам *Citrobacter и Shigella.*

После проникновения фаг мю встраивается в бактериальную хромосому с помощью собственной интегразы (транспозазы), N-концевой домен которой связывается с ДНК, а C-концевой домен обладает ферментативной активностью. Вирусная эндонуклеаза наносит в сайте интеграции два ss-разреза на расстоянии 5 н.; вирусная ДНК присоединяется к освободившимся 5′-концам. Затем достраиваются бреши, и на клеточной хромосоме появляются характерные 5-нуклеотидные повторы (рис. 32).

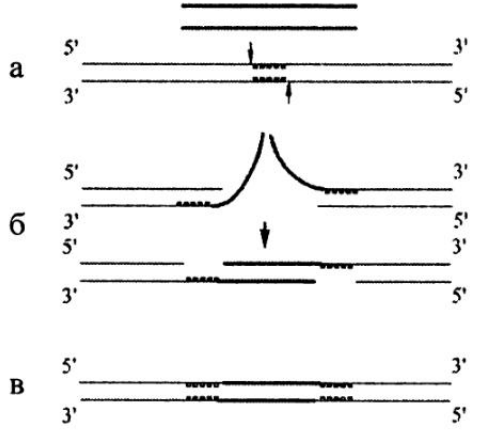


Рис. 32. Интеграция фага мю в хромосому хозяина.

а — вирусная эндонуклеаза делает на хромосоме два однонитевых разреза на расстоянии 5 нуклеотидов (черные квадраты); б — вирусная ДНК присоединяется к свободным 5′-концам; в — достраивание недостающих участков (белые квадраты).

Профаг мю реплицируется с помощью механизма репликативной транспозиции, т. е. он фактически является транспозоном, который помимо генов, обеспечивающих этот процесс, содержит гены структурных и упаковочных белков.

Репликативная транспозиция. В геномах бактерий, архей и эукариотов широко распространены мобильные элементы (англ. transposable element). Они представляют собой участки ДНК, способные к транспозиции (англ. transpose — переставлять), т. е. к перемещению из одного сайта хромосомы или плазмиды в другой, не гомологичный ему сайт. Эти участки кодируют фермент(ы), обеспечивающие транспозицию, и сами же ей подвергаются. Транспозиция проходит в пределах одного генома или между геномом-донором и геномом-мишенью. В одних случаях она приводит к потере мобильного элемента донорным репликоном; в других случаях ей сопутствует копирование мобильного элемента, причем одна копия остается в донорном сайте, а другая копия появляется в акцепторном сайте. Мобильные элементы, за исключением фага мю, не имеют собственного ориджина репликации.

Простейшие мобильные элементы, ***инсерционные последовательности*** (англ. insertion sequence, IS; от англ. insert — вставлять), имеют размер 200 п.н. — 2,5 тыс. п.н. и содержат на обоих концах инвертированные повторы по 10–40 п.н. (рис. 33). Поскольку транспозиция сопровождается копированием сайта-мишени, инсерционная последовательность фланкирована прямыми повторами длиной 2–14 п.н. Кодирующая область, находящаяся внутри инсерционной последовательности, содержит ген транспозазы, который отвечает за ферментативный процесс транспозиции; промотор этого гена расположен внутри левого инвертированного повтора. В случае использования репликативного способа транспозиции (см. ниже) гену транспозазы сопутствует ген резольвазы. В состав инвертированного повтора входят концевой сайт из 2–3 п.н. для нанесения ss-разреза с помощью транспозазы и соседствующий с ним сайт для узнавания и связывания данного фермента. Инсерционные последовательности эгоистичны (т. е. они не имеют фенотипического проявления и кодируют только ферменты, обеспечивающие транспозицию). Более сложные мобильные элементы, ***транспозоны***, дополнительно содержат те или иные селективные маркеры.

Так называемые составные транспозоны (англ. compound transposon) размером 750 п.н. — 50 тыс. п.н. содержат центральную область и два боковых плеча, каждое

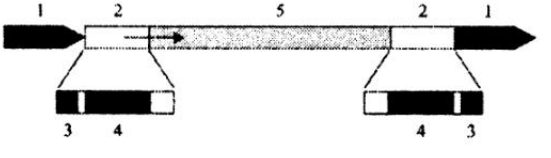


Рис. 33. Структура инсерционной последовательности и фланкирующих ее участков ДНК-мишени (по: Пиневич, 2009).

1 — прямой повтор; 2 — инвертированный повтор; 3 — сайт разреза транспозазой; 4 — сайт узнавания и связывания транспозазы; 5 — ген транспозазы.

Стрелка — промотор.

из которых представляет собой инсерционную последовательность. Плечи транспозона находятся в прямой или инвертированной взаимной ориентации и обеспечивают транспозицию этого сложного мобильного элемента.

От составных транспозонов отличаются транспозоны, несущие по обоим концам не инсерционные, а IS-подобные последовательности, которые существуют только в составе транспозона. Примерами таких транспозонов служат транспозон Tn3 (обеспечивающий лекарственную устойчивость бактерий), конъюгативные транспозоны (способствующие собственному переносу из одной бактерии в другую совместно с частью хромосомы-хозяина), а также фаг мю.

Процесс транспозиции включает в себя разрыв фосфодиэфирных связей на концах мобильного элемента и перенос последних на молекулу ДНК-мишени. Такая рекомбинационная реакция осуществляется с помощью тройственного нуклеопротеинового комплекса, или транспозосомы (англ. transpososome), который состоит из транспозазы, концов мобильного элемента и ДНК-мишени.

Существуют два способа транспозиции, консервативный и репликативный. При консервативной транспозиции мобильный элемент в ее ходе не копируется, а при репликативной — копируется. Кроме того, в первом случае мобильный элемент физически обособляется от репликона-донора, а во втором — остается связанным с ним. При репликативной транспозиции транспозаза наносит не ds-, а ss-разрезы в репликоне-доноре по 3′-концам мобильного элемента (рис. 34). Одновременно с этим она производит ss-разрезы в сайте-мишени репликона-реципиента с образованием 5′-концевых выступов. Затем она катализирует реакцию трансэтерификации, 5′-концы реципиента соединяются с 3′-концами донора и образуется Х-образный «интермедиат Шапиро» (*по имени американского микробиолога J. Shapiro, который в 1979 г.*

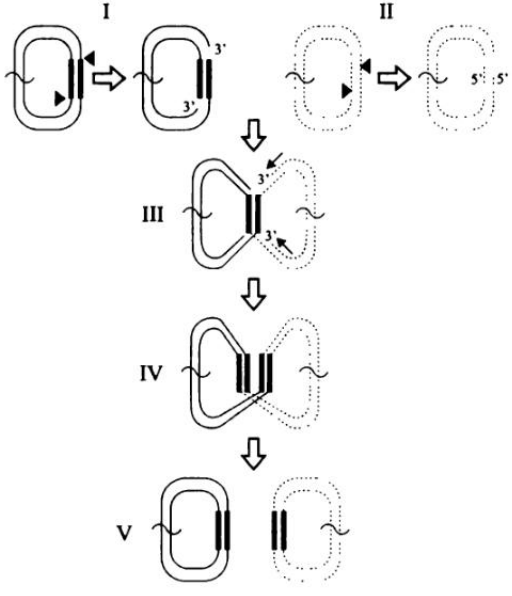


Рис. 34. Репликативная транслокация мобильного элемента (по: Пиневич, 2009).

Тонкие линии — репликон-донор; пунктирные линии — репликон-реципиент; толстые линии — мобильный элемент; треугольники — сайты разрезов транспозазой; тонкие стрелки — заполнение однонитевых участков.

Объяснение в тексте.

предложил модель репликативной транспозиции). После этого с помощью двух репликационных вилок заполняются ss-участки ДНК в реципиенте, а также реплицируется сам мобильный элемент (праймерами служат его свободные 3′-концы). Если транспозиция происходит между двумя разными репликонами, то после репликации образуется кольцевой коинтеграт, в котором между репликоном-донором и репликоном-мишенью находятся две одинаково ориентированные копии мобильного элемента (рис. 34). Затем коинтеграт разделяется на репликон-донор и репликон-реципиент; с этой целью используется резольваза, открытая рамка считывания которой присутствует в самом мобильном элементе. В отсутствие резольвазы ее роль выполняет клеточная RecA-зависимая система гомологической рекомбинации.

Фаг мю служит классическим примером использования репликативной транспозиции. Он не вырезается из донорного сайта, а взаимодействует с акцепторным сайтом с образованием репликационных вилок. Перестройка интермедиата Шапиро осуществляется в пределах одного репликона (хромосомы хозяина). Восстановление ds-интермедиата осуществляют вирусные резольваза и лигаза.

Выбор фага мю между литическим или лизогенным циклом контролируется репрессором ранних генов (продуктом гена *c*). Ранние гены, контролирующие интеграцию и лизогению, немедленно транскрибируются. Белок С входит в ту же группу, и если он накапливается в достаточном количестве, синтезируется активатор поздних генов. В этом случае начинается синтез структурных белков и ферментов-лизинов, в результате чего бактериофаг окончательно переходит к литическому циклу.

2.7. БИОРАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Как уже отмечалось, вирусы бактерий названы бактериофагами из-за драматичного (литического) финала одного из альтернативных сценариев онтогенеза, и этот термин используется в литературе независимо от типа инфекции. Действительно, помимо литической инфекции, широко распространены лизогенные и псевдолизогенные инфекции, причем один и тот же бактериофаг может выбирать свой путь развития. В то же время хронические инфекции вызывают только представители семейства *Inoviridae*. Что касается персистентных вирусных инфекций, то они у бактерий неизвестны.

У всех групп бактерий имеются собственные вирусы, среди которых наиболее изучены фаги бактерий кишечной группы (*E. coli* и *S. typhi* серовар Typhimurium).

В настоящее время известно 12 семейств бактериофагов; в основном это dsДНК-бактериофаги. Бактериофаги с геномной РНК более редки, а РНК(–)-бактериофаги вообще не обнаружены.

Геном бактериофагов имеет размер 4–600 тыс. п.н. Большинство морфологического разнообразия бактериофагов (до 90%) — это безоболочные вирусы со сложным типом симметрии, состоящие из головки и (не)сократимого хвостового отростка. Оболочные бактериофаги относятся к семействам *Cystoviridae* и *Plasmaviridae*.

2.7.1. БАКТЕРИОФАГИ С ГЕНОМНОЙ dsДНК

Эти бактериофаги — самые разнообразные и многочисленные; они заражают представителей большинства актуалистических фил бактерий. Именно они в свое время стали модельными объектами при изучении молекулярных основ наследственности; это для них были оптимизированы и стандартизированы методы поддержания и культивирования бактериофагов.

В настоящее время dsДНК-бактериофагов объединяют в 6 семейств; мы рассмотрим только те, представители которых обладают линейной dsДНК и сложно устроенными вирионами (семейства *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae* и *Tectiviridae*).

У членов семейств *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae* вирионы снабжены хвостовым отростком с дополнительными придатками. На основе сходства морфологии они объединены в порядок *Caudovirales* («хвостатые» бактериофаги). Однако единство этих семейств и родов внутри них спорно. Геномы этих бактериофагов почти не обнаруживают взаимного сходства, они «мозаичные», т. е. являются комбинацией фрагментов вирусных и хозяйских генофоров. В данном случае построение филогенетических систем даже по сходству последовательностей нескольких генов не отражает истинных эволюционных связей.

2.7.1.1. Семейство *Myoviridae*. Фаг T4

Хозяева этих бактериофагов принадлежат к нескольким филам домена *Bacteria* (BX *Cyanobacteria*, BXII *Proteobacteria*, BXIII *Firmicutes* и BXIV *Actinobacteria*), а также к филе AII домена *Euryarchaeota* (последние рассматриваются в разделе 3.1).

Миовирусы проходят преимущественно литический цикл и поэтому являются одним из регуляторов круговорота органического вещества бактериального пикопланктона. Сравнительно-морфологические и генетические исследования показывают, что эти бактериофаги широко распространены как в пресноводных, так и в морских экосистемах.

Для всех представителей данного семейства характерна сложная морфология вирионов, состоящих из икосаэдрической головки диаметром 50–110 нм и хвостового отростка длиной 80–455 нм и шириной 16–20 нм. Этот терминальный комплекс обеспечивает взаимодействие вируса с клеточными рецепторами.

Адсорбция сопровождается АТФ-зависимыми конформационными изменениями хвостового отростка. В результате его длина резко уменьшается, что является частью механизма проникновения линейной dsДНК (100–170 тыс. п.н.).

Геном миовирусов кодирует 200–300 белков, в том числе собственные полимеразы и даже тРНК. Взаимное сходство нуклеотидных последовательностей у представителей данного семейства невелико и даже может отсутствовать. Мозаичная организация генома свидетельствует о свободной комбинации генов в популяции и их перемещении в разные локусы, причем в этот процесс вовлечены фрагменты бактериальных хромосом.

Горизонтальный перенос генов маскирует эволюционные связи, поэтому четкие критерии обособления родов отсутствуют. В последнее время в систематике миовирусов используется комбинированный подход, учитывающий результаты геномного

и протеомного анализа. Благодаря этому удается обособить кластеры видов, соответствующие рангу рода.

Со времен исследований, проводимых «фаговой» группой, активно изучаются литический фаг Т4 и подобные ему фаги Т2 и Т6. У них похожая организация и сходный онтогенез; их геном — один из самых крупных для миовирусов, и их репликация осуществляется в несколько стадий.

Типовым видом семейства *Myoviridae* служит *Enterobacteria phage T4* — **фаг Т4**. Его сложный вирион состоит из несколько вытянутой икосаэдрической головки (85×110 нм) и хвостового отростка (110×25 нм), который присоединяется к ней через шейку, содержащую воротничок с воротничковыми фибриллами. На дистальном конце хвостового отростка находится базальная пластинка с терминальными фибриллами (см. рис. 9).

В геноме фага Т4 (166 тыс. п.н.) около 200 генов. Цитозин полностью замещен 5-гидроксиметилцитозином, 5-ОН группа которого гликозилирована, что обеспечивает устойчивость вирусной ДНК к воздействию рестриктаз. Хотя геномная ДНК находится в линейной конфигурации, она способна переходить в кольцевую форму (рис. 35).

Поскольку у фага Т4 отсутствуют *pac*-сайты, а в капсиде может поместиться только одна копия генома, при упаковке по механизму headful от конкатемера отрезается чуть больший фрагмент. Поэтому свободный конец конкатемера, который с помощью терминазы присоединяется к порталу, отличается от уже упакованной ДНК первыми нуклеотидами; при повторной упаковке точка терминации опять сдвигается. В итоге геномные ДНК в популяции бактериофага отличаются друг от друга первыми и последними нуклеотидами (рис. 35). Еще одна особенность генома фага Т4 — это присутствие в нескольких его генах интронов, которые по строению сходны с интронами I типа эукариотов и также подвергаются автосплайсингу.

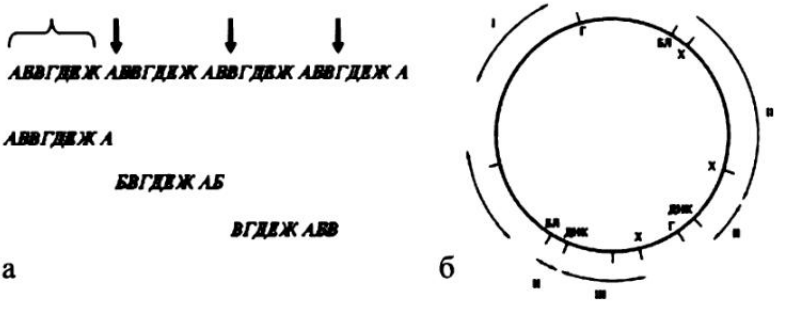


Рис. 35. Геном фага Т4.

а — схема надрезания конкатемера; б — карта генома.

Скобка — минимальный размер генома.

I — гены белков, участвующих в репликации ДНК и модификации оснований; II — гены структурных белков; III — гены, отвечающие за биосинтез нуклеотидов.

БЛ — гены белков лизиса; Г — гены белков головки; ДНК — гены контроля репликации; Х — гены белков хвостового отростка.

Адсорбция и проникновение фага Т4 проходят в несколько стадий и регулируются рядом белков, в том числе бактериальных. На обратимой стадии адсорбции хвостовые фибриллы связываются с липополисахаридом, и базальная пластинка прикрепляется к наружной мембране клетки-хозяина. На необратимой стадии белки базальной пластинки изменяют свою конформацию, что вызывает сокращение чехла хвостового отростка. Белок Gp5, входящий в состав стержня хвостового отростка и обладающий лизоцимной активностью, локально разрушает пептидогликан (ферментативный домен активируется периплазматическими протеазами). Сократившийся отросток внедряется в образованный канал; при этом N-концевой домен белка Gp5 принимает участие в транслокации вирусной ДНК в цитоплазму.

После проникновения хозяйская РНК-полимераза распознает промотор самых ранних генов, транскрипцию которых регулируют клеточные сигма-факторы. По завершении адсорбции уже через 3 мин начинается синтез ферментов, которые расщепляют ДНК хозяина до нуклеотидов и модифицируют РНК-полимеразу благодаря АДФ-рибозилированию ее α-субъединицы. Фаг Т4 в отличие от фага Т7 (см. ниже) не кодирует собственную РНК-полимеразу, и поэтому использует бактериальный фермент, который после модификации уже не распознает промоторы *E. coli*.

Модифицированная РНК-полимераза взаимодействует с промоторами запаздывающих ранних генов, а транскрипция самых ранних генов прекращается. Белки, синтезированные на протяжении 5–10 мин от начала инфекции, участвуют в репликации генома бактериофага, причем в качестве субстратов используются хозяйские

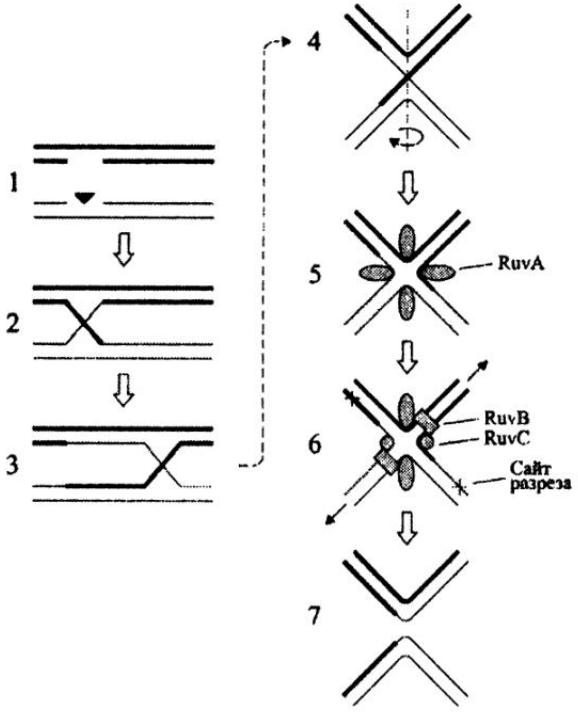


Рис. 36. Рекомбинационно-зависимая репликация ДНК фага Т4 (по: Пиневич, 2009).

1 — нанесение однонитевого разреза в ds-интермедиате: 2 — образование перекреста; 3 — инициация репликации, миграция перекреста; 4 — хиазма Холлидея в «сложенной», 5 — в «квадратно-плоской» конформации; 6 — резольвасома в действии; 7 — образование рекомбинантов.

Объяснение в тексте.

нуклеотиды. Одновременно с этим синтезируется новый сигма-фактор, который регулирует транскрипцию поздних генов.

Поздние гены кодируют структурные и морфогенетические белки. Их транскрипция тесно связана с репликацией и активизируется ДНК-полимеразным комплексом.

Сначала геном бактериофага реплицируется *ori*-зависимым способом одновременно в семи локусах. При этом образуются линейные dsДНК, имеющие ss-разрывы, которые возникают после удаления РНК-праймеров при синтезе отстающей нити. Такие детали строения репликативных интермедиатов играют важную роль на следующем, рекомбинационно-зависимом этапе репликации с использованием хозяйского механизма рекомбинационной репарации ds-разрывов. По-видимому, ss-участок внедряется с помощью вирусной рекомбиназы в гомологичный участок ds-интермедиата с образованием хиазмы Холлидея (рис. 36). В этой области вирусная ДНК-полимераза достраивает на матрице недостающий фрагмент 3′-конца. Вирусная резольваза и лигаза демонтируют хиазму Холлидея и восстанавливают ds-интермедиат, в результате чего образуются длинные конкатемеры.

Капсид и хвостовой отросток собираются независимо друг от друга. При упаковке ДНК приобретает сверхвысокую плотность в результате паракристаллической укладки.

Через 20–30 мин после начала инфекции активизируются гены лизиса. На поздних этапах, если клетку инфицирует слишком много частиц батериофага, литический цикл затормаживается (англ. lysis inhibition), и в течение еще 4–6 ч продолжаются репликация и упаковка вирусной ДНК. По завершении литического цикла из клетки выходит ~200 частиц.

2.7.1.2. Семейство *Podoviridae*. Фаг T7

Хозяева подовирусов разнообразны — среди них встречаются грамотрицательные и грамположительные бактерии, а также микоплазмы; они принадлежат к филам BX *Cyanobacteria*, BXII *Proteobacteria*, BXIII *Firmicutes* и BXIV *Actinobacteria*.

В это большое семейство входят бактериофаги, которые вызывают преимущественно литическую инфекцию и образуют сложно устроенные вирионы. Размер генома подовирусов составляет 19–44 тыс. п.н. К икосаэдрической головке, диаметр которой 40–60 нм (высота несколько больше ширины), через переходник (англ. connector) присоединяется короткий несократимый хвостовой отросток (≤10 нм). С этим морфологическим признаком связано название данного семейства (греч. podos — нога). В области коннектора, а также на вершинах капсида иногда находятся дополнительные придатки (рис. 37).

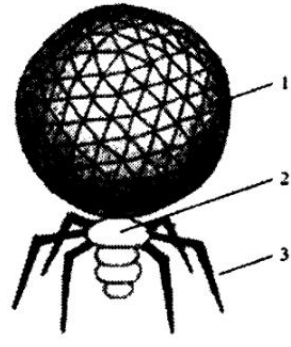


Рис. 37. Вирион фага T7.

1 — головка; 2 — хвостовой отросток; 3 — нить хвостового отростка.

Цикл развития вирулентного **фага T7** подробно изучен. При инфицировании типовых штаммов *E. coli* в стандартных условиях лизис культуры начинается через 12–15 мин (при 37°C) или через 20–25 мин (при 30°C). Из одной клетки выходит в среднем 200 частиц.

Геном фага T7 (39937 п.н.) содержит 56 генов, в том числе гены субъединиц полимеразы. На кодирующие последовательности приходится 92% емкости генома; остальное — это прямые концевые повторы (160 п.н.), *ori*-сайты, промоторы и сайты процессинга РНКазы; часть ORF взаимно перекрывается.

Отличительной особенностью фага T7 служит медленный процесс проникновения, занимающий до 10 мин и сопряженный с действием вирусной РНК-полимеразы, которая устойчива к рифампицину и высокоспецифична по отношению к промоторам.

Сначала в клетку поступает участок ДНК размером 850 п.н. с тремя самыми ранними генами (ген ингибитора хозяйских рестриктаз, ген РНК-полимеразы и ген протеинкиназы) (рис. 38). Транскрипция осуществляется с помощью бактериальной РНК-полимеразы, распознающей промотор самых ранних генов, который успешно конкурирует с сильными промоторами клетки-хозяина. Попутно отметим, что в генной инженерии с целью преимущественной экспрессии гена «интересующего» белка используется гибридная плазмида именно с этим промотором.

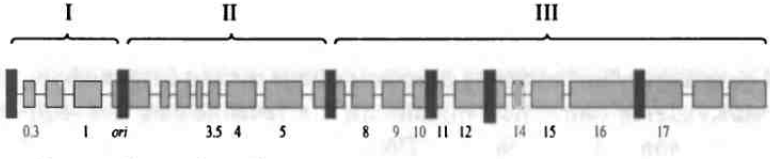


Рис. 38. Геном фага T7.

I — гены самых ранних, II — ранних; III — поздних белков.

0.3 — ген белка, модифицирующего хозяйскую рестриктазу; 3.5 — ген лизоцима; 4 — ген геликазы; 5 — ген ДНК-полимеразы; 8, 9, 10, 15 и 16 — гены белков головки; 11, 12 и 17 — гены белков хвостового отростка; *ori* — сайт инициации репликации.

Черные прямоугольники — промоторы.

Гены второй группы, запаздывающие ранние гены, транскрибируются вирусной РНК-полимеразой. Они кодируют белки, обеспечивающие репликацию, а также ингибитор РНК-полимеразы хозяина. В ходе транскрипции вирусная РНК-полимераза транслоцирует вирусную ДНК в цитоплазму со скоростью 50 п.н.·с$^{-1}$, что соответствует темпу транскрипции in vitro.

К третьей группе генов относятся гены структурных и морфогенетических белков. Они поступают в клетку со скоростью 250 п.н.·с$^{-1}$ и транскрибируются с 15 сильных промоторов одновременно с генами запаздывающих ранних генов. Как правило, образуются полицистронные транскрипты; вирусная РНКаза расщепляет их по специфическим сайтам.

То, что гены третьей группы экспрессируются преимущественно в конце инфекционного цикла — результат связывания РНК-полимеразы с лизоцимом, продуктом одного из запаздывающих ранних генов. С одной стороны, это приводит к абортивной инициации транскрипции; с другой стороны, повышается вероятность транскрипции поздних генов «дезактивированной» РНК-полимеразой, поскольку число промоторов генов третьей группы вдвое больше, чем промоторов генов второй группы.

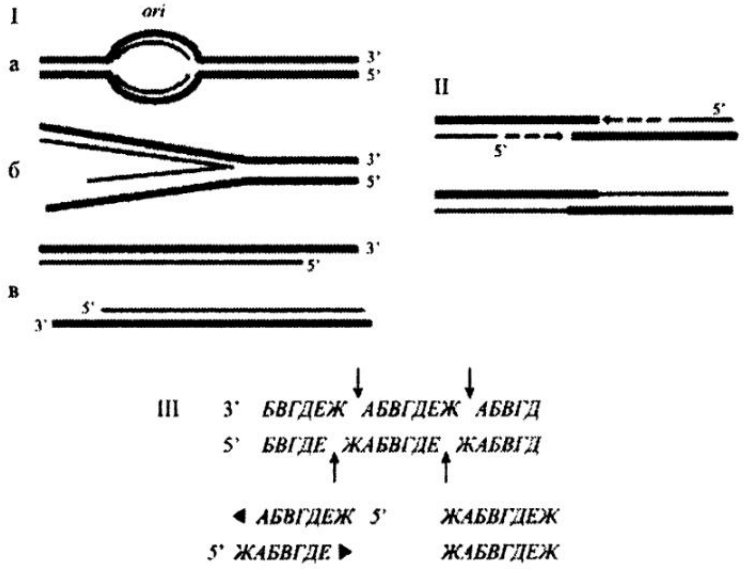


Рис. 39. Образование репликативных интермедиатов фага T7.

I — двунаправленная ориджинзависимая репликация, интермедиаты «глазок» (а) и «Y» (б), копии геномов со свободными 3′-концами в области прямых повторов (в); II — рекомбинация интермедиатов, комплементарное соединение свободных 3′-концов, достраивание бреши вирусной ДНК-полимеразой и вирусной лигазой, образование конкатемера из 3–10 копий генома; III — образование копий генома, нанесение однонитевых разрезов фаговой эндонуклеазой (стрелки), образование копий генома со свободными 5′-концами, достраивание концевых повторов (головки стрелок).

Буквы — условные нуклеотидные последовательности.

Геном фага T7 кодирует почти все белки, необходимые для репликации (ДНК-полимеразу gp5; праймазу/геликазу gp4 и белок gp2.5, связывающий ssДНК). В состав реплисомы обязательно входит бактериальный белок тиоредоксин, обеспечивающий взаимодействие ДНК-полимеразы с праймазой/геликазой и синхронное перемещение ДНК-полимеразы gp5 вдоль ведущей и ведомой нитей.

Собственно репликация состоит из ориджинзависимой и рекомбинационно-зависимой (рис. 39). На первом этапе двунаправленная репликация начинается в *ori*-сайте, который смещен в левое плечо генома. При этом образуются характерные фигуры, в частности «глазок». На втором этапе фрагменты генома, имеющие свободный 3′-конец и терминальные повторы, соединяются в конкатемеры. Бреши заполняются с помощью ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы, как при обычной репликации. Затем эндонуклеаза разрезает конкатемер по сайтам в области повторов, и ДНК-полимераза достраивает свободный 5′-конец, восстанавливая полноразмерный геном.

2.7.1.3. Семейство *Siphoviridae*. Фаг лямбда

Члены этого, самого обширного, семейства вирулентных и умеренных бактериофагов повсеместно распространены и играют важную роль в распределении потоков органического вещества в водных экосистемах. Так же как у миовирусов, круг хозяев сифовирусов широк и включает в себя бактерий и архей.

Геномы сифовирусов имеют размер ~50 тыс. п.н. и содержат около 70 генов. Сложные вирионы состоят из икосаэдрической головки диаметром 55–60 нм и несократимого хвостового отростка длиной до 570 нм, снабженного терминальными фибриллами.

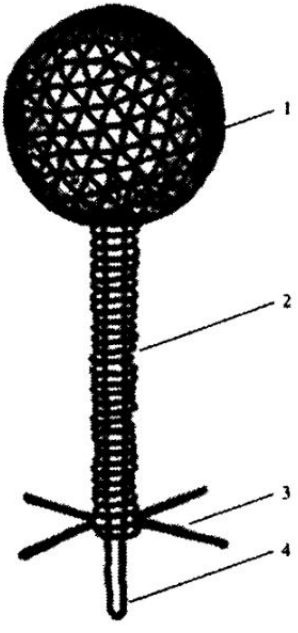


Рис. 40. Вирион фага лямбда.

1 — головка; 2 — хвостовой отросток; 3 — нить хвостового отростка; 4 — стержень.

Самым изученным представителем данного семейства является умеренный **фаг лямбда** (lambda, λ). Его вирион состоит из головки диаметром 64 нм и несократимого хвостового отростка длиной 150 нм с внутренним стержнем; от конца отростка отходят хвостовые фибриллы длиной 23 нм (рис. 40).

Геном фага лямбда (48514 п.н.) полностью секвенирован. В нем идентифицировано 46 генов и картированы регуляторные участки. Гены группируются в кластеры в соответствии с их функцией и очередностью экспрессии (рис. 41). Среди них выделяют три группы — самые ранние (*cro* и *N*), запаздывающие ранние (*cII*/*cIII*, *O*, *P*, *Q* и семь генов рекомбинации) и поздние (гены морфогенетических белков, структурных белков и белков лизиса).

Линейная молекула ДНК фага лямбда эквивалентна кольцевой, поскольку на ее 5′-концах находятся взаимно комплементарные ***липкие концы*** (англ. cohesive site, cos) длиной по 12 н., что позволяют ей пермутировать в циклическую форму.

Рецептором фага лямбда служит порин LamB, в норме предназначенный для транспорта мальтозы. После инъецирования геномной ДНК она замыкается в кольцо, и РНК-полимераза хозяина приступает к транскрипции самых ранних генов (в отличие от представителей семейства *Myoviridae*, фаг лямбда не кодирует собственные полимеразы и не модифицирует бактериальные).

Клеточная транскрипция и трансляция продолжаются вплоть до момента образования вирусного потомства. Такой «гуманизм» связан с возможностью реализации не только литического, но и лизогенного цикла; выбор между ними определяется совокупностью внутренних и внешних факторов.

В регуляции транскрипции участвуют продукты самых ранних генов (рис. 42). В частности, белок N служит антитерминатором и позволяет РНК-полимеразе считывать гены в downstream-положении от сайта терминации. Белок Q также является антитерминатором; его накопление стимулирует переход к транскрипции генов струк-

турных белков и генов белков лизиса. К этому моменту вирусный белок Cro начинает взаимодействовать с правым и левым операторами, блокируя транскрипцию с промоторов ранних генов. В результате этого прекращается синтез белков cII и cIII, необходимых для прохождения лизогенного цикла, и начинается переход к литическому циклу, который становится необратимым.

Транскрипция поздних генов провоцирует новый этап репликации — по механизму «катящееся кольцо», в результате чего образуется ds-конкатемер, причем вытесняться может любая из нитей.

Упаковка геномной ДНК осуществляется с помощью сайтспецифичного механизма. Вирусная терминаза распознает *cos*-сайт и наносит в этой области надрезы, отстоящие на плюснити и минус-нити на расстояние 12 н. друг от друга, благодаря чему образуются липкие концы.

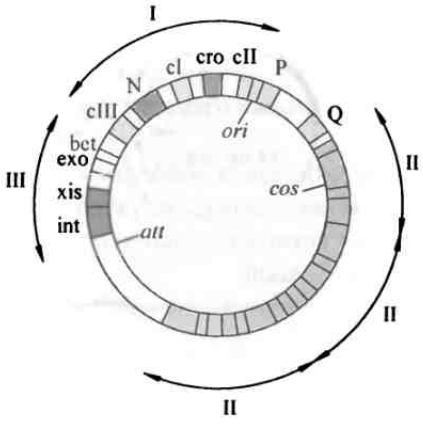


Рис. 41. Геном фага лямбда.

I — гены регуляторных белков, II — структурных, III — белков лизогенного цикла.

att — сайт рекомбинации; *cos* — сайт упаковки; *ori* — сайт инициации репликации.

После упаковки ДНК к головке присоединяются отдельно собранные хвостовые отростки. В результате лизиса клетки с помощью системы эндолизин/холин в окружающую среду выходит ~300 частиц.

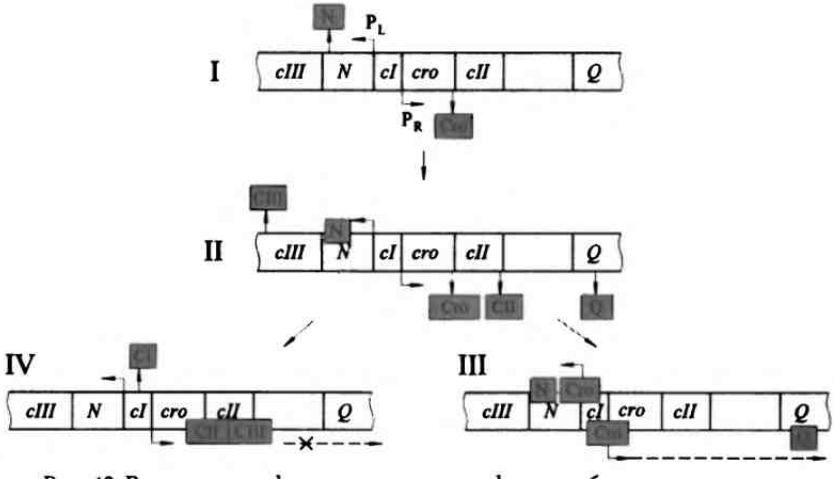


Рис. 42. Регуляция инфекционного цикла фага лямбда.

I — самая ранняя экспрессия; II — запаздывающая ранняя экспрессия; III — литический цикл; IV — лизогенный цикл.

P_L — левый промотор; P_R — правый промотор; серые квадраты — продукты генов; пунктирная стрелка — направление транскрипции с правого промотора поздних генов; перечеркнутая стрелка — завершение транскрипции.

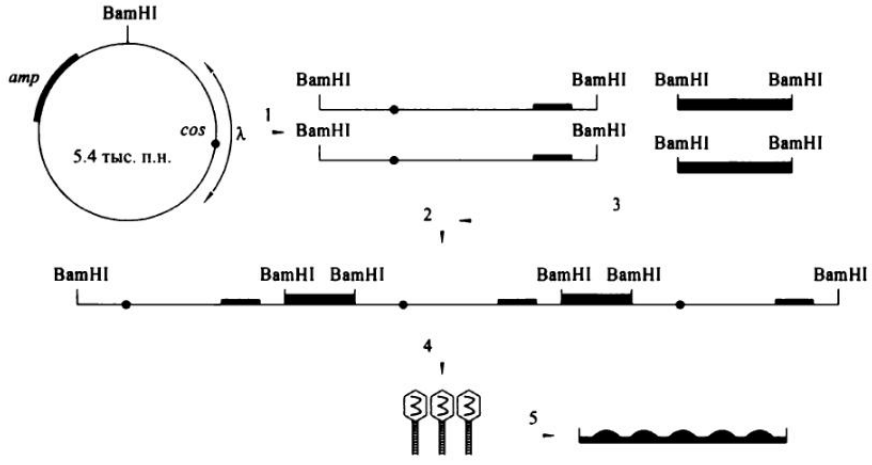


Рис. 43. Схема клонирования генов в космиде pjB8.

1 — рестрицирование плазмиды; 2, 3 — лигирование плазмиды с клонируемым геном (серый отрезок), синтез конкатемера; 4 — упаковка in vitro; 5 — инфицирование культуры *E. coli*, высев на среду с ампициллином, экспрессия генов рекомбинатной плазмиды.

amp — ген устойчивости к ампициллину; *cos* — сайт упаковки в участке генома фага лямбда; BamH1 — сайт рестрикции.

Фаг лямбда и генетические конструкции на его основе широко применяются в лабораторной практике. На левом плече геномной ДНК находится участок длиной около 15 тыс. п.н., который содержит гены, участвующие в лизогенном цикле. Для развития по литическому пути (когда на поверхности агаризованной среды образуются характерные бляшки) такие гены не нужны, и поэтому данный участок можно безболезненно удалить, заменив его чужеродной ДНК. Сайтспецифичная упаковка гибридной конструкции производится in vitro. Для клонирования «интересующих» последовательностей ДНК используется ***космида*** (англ. cosmid; сокр. от англ. **co**hesive site и pla**smid**). Она представляет собой кольцевую молекулу, содержащую вирусные сайты *ori* и *cos*, сайт распознавания эндонуклеазой, а также репортерный ген, например ген устойчивости к ампициллину (рис. 43). После разрезания кольца эндонуклеазой к липким концам линейного продукта можно присоединить «интересующую» последовательность (размером до 40 тыс. п.н.). Полученная генетическая конструкция упаковывается в капсид, и вирусными частицами инфицируется индикаторный штамм *E. coli* K12.

2.7.1.4. Семейство *Tectiviridae*. Фаг PRD1

У представителей данного семейства сферический вирион имеет икосаэдрическую симметрию, его диаметр составляет 63 нм. Внешний белковый капсид (очень похожий на капсид аденовирусов) имеет толщину 3 нм; на вершинах икосаэдра расположены пепломеры длиной 20 нм, обеспечивающие адсорбцию на клеточных рецепторах. Одна из вершин икосаэдра отличается от остальных по морфологии и составу; в этом месте формируется портал для упаковки ДНК.

Внутренний липопротеиновый капсид толщиной 5–6 нм представляет собой двухслойную мембрану, содержащую 56% фосфатидилэтаноламина и 37% фосфатидилглицерола. Представители данного семейства не имеют хвостового отростка; при адсорбции и проникновении сферическая мембрана их внутреннего капсида преобразуется в тубулярную структуру.

Геном тективирусов (14,7–15,7 тыс. п.н.) представлен линейной суперспирализованной dsДНК, с обоими 5′-концами которой связаны молекулы терминального белка. Характерной для ДНК-содержащих бактериофагов мозаичности геномов у представителей данного семейства не наблюдается.

Хозяевами тективирусов служат грамотрицательные протеобактерии и грамположительные представители рода *Bacillus*. Тективирусы грамотрицательных бактерий (в частности, фаг PRD1) вызывают преимущественно литическую инфекцию. Напротив, тективирусы грамположительных бактерий (например, умеренный фаг Bam35 *B. thuringiensis*) способны реплицироваться как плазмиды, т. е. они осуществляют псевдолизогенную инфекцию. Разнообразие нуклеотидных последовательностей у умеренных тективирусов выше, чем у литических.

Типовой вид семейства *Tectiviridae*, **фаг PRD1**, инфицирует широкий круг грамотрицательных бактерий, содержащих конъюгативные плазмиды P-, N- или W-группы совместимости. Со стороны вируса в адсорбции участвуют пепломеры; молекулярная природа рецептора, кодируемого плазмидой, неизвестна. Предполагается, что такую роль играет «адгезионный» белок в составе связки Байера.

Проникновение бактериофага обеспечивается трансгликозилазной активностью структурного белка P7, а также способностью внутреннего липидного слоя капсида (рис. 44) выворачиваться наизнанку, формируя пору в цитоплазматической мембране.

Воспроизведение фага PRD1 начинается с того, что бактериальная РНК-полимераза транскрибирует гены ранних белков, участвующих в репликации, а также выполняющих регуляторную функцию. При репликации фага PRD1 происходит белковое праймирование. Терминальный белок TP (28 кДа) вступает во взаимодействие с вирусной ДНК-полимеразой; затем этот комплекс взаимодействует с обоими 3′-концами матрицы.

Сборка частиц фага PRD1 — многоэтапный процесс, в котором участвуют вирусные неструктурные белки и шапероны хозяина, придающие структурным белкам правильную конформацию. В отличие от капсида большинства икосаэдрических dsДНК-фагов, капсид фага PRD1 формируется без участия каркаса, роль которого берет на себя мембранная везикула. Неструктурные белки немедленно после трансляции интегрируются в цитоплазматическую мембрану и индуцируют отпочкование от нее мембранных везикул, вокруг которых скапливаются структурные белки (рис. 45). В вершинах капсида собираются пе-

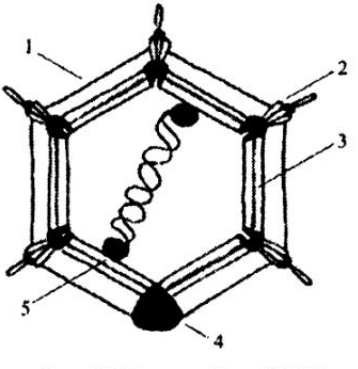


Рис. 44. Вирион фага PRD1.

1 — капсид; 2 — комплекс белков вершины; 3 — липидный слой; 4 — специализированная вершина (портал); 5 — терминальный белок, связанный с концами суперспирализованной dsДНК.

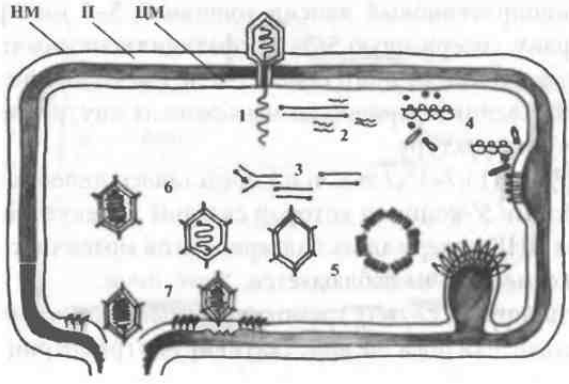


Рис. 45. Цикл репродукции фага PRD1.

1 — проникновение; 2 — транскрипция; 3 — репликация; 4 — трансляция; 5 — образование мембранной везикулы; 6 — сборка капсида и упаковка ДНК; 7 — выход из клетки.

НМ — наружная мембрана; П — пептидогликановый слой; ЦМ — цитоплазматическая мембрана.

пломерные комплексы, а также упаковочный комплекс. Белок P9 присоединяется к комплексу ДНК/ТР, и такой тройственный агрегат фиксируется в зоне упаковки. Как и у всех dsДНК-фагов, упаковка является АТФ-зависимым процессом; особенностью упаковочной АТФазы фага PRD1 служит то, что последняя сохраняет связь со специализированной вершиной икосаэдра и превращается в структурный белок.

Фаг PRD1 является вирулентным; как у большинства бактериофагов, лизис клетки-хозяина осуществляет 2-компонентная ферментная система. Предполагают, что фермент холин доставляется в цитоплазматическую мембрану бактериальными шаперонами GroEL/GroES, которые участвуют в сборке вирусной мембраны. Они вовлекаются в транспорт интегральных мембранных белков при падении клеточного уровня АТФ (что, в свою очередь, является результатом затрат на синтез и сборку компонентов вируса). Полигликозидный остов муреина разрушает β-1,4-N-ацетилмурамидаза вируса (белок P15), которая находится в цитоплазме в растворимой форме, а также может включаться во внутренний липидный капсид фага.

Фаг PRD1 репродуцируется очень эффективно; из одной клетки высвобождается до 500 вирионов.

2.7.2. БАКТЕРИОФАГИ С ГЕНОМНОЙ ssДНК(+)

Использование накопительных культур с индикаторными бактериями в качестве хозяев свидетельствует о широком распространении бактериофагов этой группы. Они вызывают литическую, хроническую и/или лизогенную инфекцию. При разнообразии структуры вирионов они имеют сходную организацию генома, и их онтогенез протекает по общему сценарию.

Геномы этих бактериофагов невелики и содержат мало генов, которые, как правило, перекрываются. При размножении вируса используется хозяйский аппарат транскрипции и репликации. Репликативными интермедиатами служат кольцевая dsДНК и линейные конкатемеры ssДНК(+).

Отдельные представители двух семейств этих бактериофагов (см. ниже) являются модельными объектами молекулярной биологии и используются для конструирования генетических векторов.

2.7.2.1. Семейство *Inoviridae*. Фаг M13

Данное семейство объединяет бактериофагов, очень разных по кругу хозяев, строению и сценарию онтогенеза. Их геном (4,4–8,5 тыс. н.) содержит около десяти взаимно перекрывающихся генов с межгенными спейсерами, в которых локализуются сайты *ori* и *pac*. Эти фаги не кодируют полимеразу и белки лизиса; они осуществляют хроническую инфекцию и способны к лизогении, а также к псевдолизогении.

В состав семейства иновирусов входят рода *Inovirus* и *Plectrovirus*. Их хозяевами служат клостридии, пропионовые бактерии, псевдомонады, энтеробактерии и *Thermus aquatilis*.

Иновирусы образуют нитевидные капсиды длиной 760–1950 нм и шириной около 7 нм. Представители рода *Plectrovirus*, избирательно инфицирующие микоплазм, образуют палочковидные вирионы длиной 85–280 нм и шириной 10–16 нм.

Типовым видом рода *Inovirus* является *Enterobacteria phage M13* — **фаг M13**. Его кольцевой геном (6407 н.) кодирует 11 белков: 5 из них структурные, а 6 участвуют в размножении.

Сильно вытянутый в длину (~1мкм) капсид состоит из 2700 капсомеров — идентичных копий белка g8p. В его молекуле, состоящей из 50 а.о., имеется три домена: 1) N-терминальный отрицательно заряженный, направленный к поверхности вириона; 2) C-терминальный положительно заряженный, ориентированный в сторону ДНК; 3) центральный гидрофобный, обеспечивающий взаимодействие между капсомерами и стабилизирующий их спирально-симметричную укладку. На концах нитевидной частицы расположено по пять копий минорных структурных белков g3p, g6p, g7p и g9p (рис. 46).

Фаг M13 избирательно заражает бактерий, имеющих F-плазмиду (которая кодирует «половую» F-фимбрию). Инфекционный цикл начинается с того, что капсидный белок g3p прикрепляется сбоку к F-фимбрии, которая «сокращается» путем разборки на проксимальном конце, в результате чего вирус сближается с поверхностью наружной мембраны. При изменении конформации капсомеров вирион укорачивается; затем благодаря взаимодействию N-концевого домена минорного структурного белка g3p с транспортными белками TolQ, TolR и TolA хозяина вирусная ДНК инъецируется в цитоплазму.

Фаг M13 использует в качестве репликативных интермедиатов dsДНК — RF I и RF II (сокр. от англ. **r**eplication **f**orm **I** and **II**). Репликация осуществляется по механизму «катящееся кольцо». Переход к ds-форме достигается с помощью клеточных ферментов и инициируется взаимодействием РНК-полимеразы со шпилькой

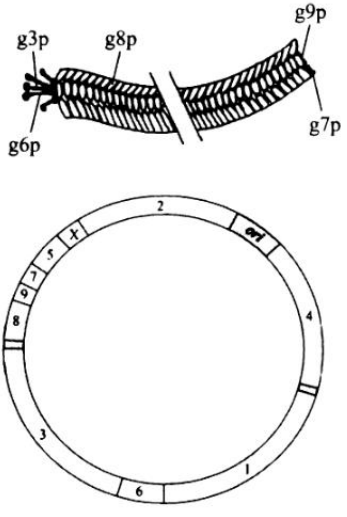


Рис. 46. Вирион и геном фага *Enterobacteria phage M13.*

g3p, g6p–g9p — структурные белки; 3, 6–9 — гены структурных белков; 1, 2, 4 и 5 — гены белков, участвующих в репликации; *ori* — сайт инициации репликации.

Темным цветом отмечены некодирующие межгенные локусы.

на ss-форме. В этом месте синтезируется РНК-праймер, от которого стартует ДНК-полимераза.

Транскрипция вирусных белков осуществляется только с репликативного интермедиата RF I и лишь в одном направлении. Она происходит с разной эффективностью: преимущественно транскрибируются ген 8 (кодирует основной структурный белок) и ген 4 (кодирует морфогенетический белок).

Использование репликативного интермедиата RF II начинается с того, что эндонуклеаза g2p делает ss-разрез в ds-интермедиате. По завершении копирования плюснити этот фермент отрезает от реплики полноразмерную копию генома и лигирует ее концы. Затем бактериальные ферменты восстанавливают ds-статус ДНК, благодаря чему увеличивается количество репликативных интермедиатов RF I, служащих матрицей и для репликации, и для транскрипции вирусного генома.

За начало упаковки отвечает белок g5p. Он выполняет роль SSB-белка (сокр. от англ. **s**ingle **s**trand **b**inding — связывающийся с одиночной нитью), а также предотвращает появление новых RF. К этому моменту белок g8p уже в основном встроен в цитоплазматическую мембрану, к внутренней стороне которой присоединяются белки g7p и g9p, распознающие *pac*-сайт. Геномная ДНК бактериофага проходит через канал, образованный мультимерными комплексами белков g1p–g11p (в цитоплазматической мембране) и белка g4p (в наружной мембране). По мере прохождения ДНК через цитоплазматическую мембрану 1500 копий белка g5p замещаются 2700 копиями белка g8p. Свободный белок g5p остается в цитоплазме, где он участвует в упаковке следующей молекулы ДНК. У бактериофага M13 отсутствуют специализированные сайты и белки терминации упаковки, поэтому размер его генома соответствует вместительности капсида. После полного замещения белка g5p белком g8p к концу вирусной частицы прикрепляются белки g3p и g6p. По завершении инфекционного цикла во внешнюю среду выходит до 1000 вирионов; при этом клетка не разрушается, хотя рост культуры заторможен.

Благодаря особенностям организации и упаковки генома фаг M13 широко используется в качестве генетического вектора. В межгенные спейсеры можно встраивать чужие последовательности, которые даже при существенном увеличении размера генома не влияют на его копирование и упаковку. Кроме того, вирусная ДНК практически не содержит взаимно комплементарных участков и находится в ss-форме, что технически упрощает секвенирование. Наконец, благодаря хронической инфекции можно добиться высокого урожая фаговых частиц.

2.5.2.2. Семейство *Microviridae*. Фаг ϕX174

Хозяевами микровирусов служат представители фил BXII *Proteobacteria* (энтеробактерии, *Bdellovibrio* sp.), BXIII *Firmicutes* (*Spiroplasma* sp.) и BXVI *Chlamydiae*.

Геномы этих бактериофагов представлены кольцевой молекулой ssДНК(+) размером 4,5–6 тыс. н. Капсиды очень мелкие (~25 нм) и состоят из 60 капсомеров — минимально возможного для икосаэдра числа субъединиц. На вершинах и внутренней поверхности капсида находятся вспомогательные белки (рис. 47).

По организации генома и белковому составу семейство *Microviridae* подразделяется на две группы: фаги энтеробактерий и фаги бактерий-внутриклеточных паразитов.

Малый размер капсида и литический тип инфекции в равной мере ограничивают возможность приобретения и потери генов этими бактериофагами, поэтому изменчивость их генома в основном связана с генными мутациями. Горизонтальный перенос, затрагивающий единичные гены подсемейства фагов энтеробактерий, обусловлен, как предполагается, одновременным заражением клетки родственными вирусами.

Типовым видом семейства *Microviridae* служит **фаг ϕX174**, инфицирующий *E. coli*. Его геном стал первым полностью секвенированным геномом; он также стал объектом, у которого был впервые описан феномен взаимного перекрывания генов.

Хотя геном фага ϕX174 имеет размер «всего» 5386 н., он содержит 11 генов, 5 из которых кодируют морфогенетические белки (рис. 47). Регуляция трансляции полицистронной мРНК осуществляется посредством либо повторной инициации, либо сдвига рамки считывания. Например, при синтезе белка D внешнего каркаса рибосома может случайно процессировать триплет аланина (GCN; где N — U, C, A или

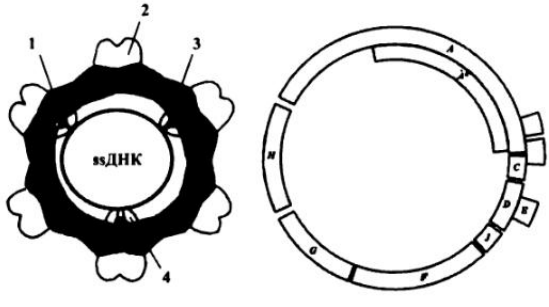


Рис. 47. Вирион и геном фага *Enterobacteria phage ϕX174*.

1 — структурный белок H; 2 — G; 3 — F; 4 — структурный белок J.

A и *A** — гены белков, участвующих в репликации; *G*, *F*, *H* и *J* — гены структурных белков; *E* — ген белка лизиса; *D* — ген белка каркаса.

G) как дуплет. Это приводит к сдвигу рамки считывания на один нуклеотид и преждевременной терминации трансляции (следом за терминирующим кодоном расположен сайт связывания рибосомы и старт-кодон гена *E*, кодирующего белок лизиса). В результате такого редкого события обеспечивается синтез многочисленных копий каркасного белка и только единичных копий белка лизиса.

Изометрические частицы фага ϕX174 имеют диаметр 27 нм. Вирион состоит из 60 копий белков F, G и J, а также 12 копий белка H. Белки G и H образуют 12 выростов на вершинах икосаэдра (рис. 47); при адсорбции белок G прикрепляется к липополисахариду наружной мембраны.

Следует отметить, что фаг ϕX174 размножается не только на разных штаммах *E. coli,* но и на разных штаммах *P. aeruginosa,* относящихся к другому классу протеобактерий. Предполагается, что область рецептора находится в умеренно консервативном наружном коре липополисахарида.

Цикл размножения фага ϕX174 схематично представлен на рис. 48. Проникшая в цитоплазму ssДНК немедленно одевается ее SSB-белками. Ферменты бактерии (ДНК-полимераза III, ДНК-полимераза I, ДНК-лигаза, гираза и праймаза) обеспечивают переход вирусной ssДНК в ds-репликативную форму I (RF I). Для инициации репликации на ss-форме в области гена A образуется не укрытая SSB-белками ds-шпилька длиной 55 н., которая имитирует репликационную вилку. Вокруг шпильки формируется праймасома (комплекс клеточных ферментов, осуществляющий РНК-праймирование). Она перемещается вдоль ssДНК и синтезирует фрагменты Оказаки, которые после лигирования образуют сплошную комплементарную нить. Репликативные формы воспроизводятся с помощью обычного механизма *ori*-зависимой репликации с образованием тета-структур (см. выше). Следует отметить, что у разных представителей данного семейства способ праймирования может различаться, однако репликативные интермедиаты всегда одинаковые.

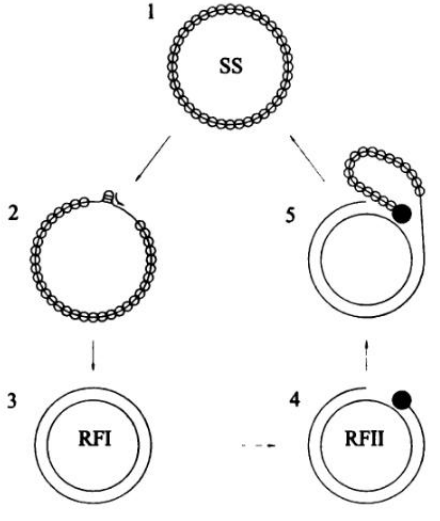


Рис. 48. Образование репликативных интермедиатов фага ϕX174.

1 — геномная ДНК бактериофага, одетая хозяйским белком SSB; 2 — образование шпильки, у которой собирается праймосома, переход к ds-интермедиату; 3 — ds-интермедиат; 4 — переход к репликации по механизму «катящееся кольцо»; 5 — образование геномных копий.

SS — однонитевая ДНК; RFI — первый, RFII — второй репликативный интермедиат.

Белые кружки — белок SSB; серый кружок — белок A.

Бактриальная РНК-полимераза считывает мРНК с нескольких промоторов репликативной формы RF I. Переход от транскрипции ранних генов к транскрипции поздних генов регулируется соответствующими промоторами.

Ранний ген A играет ключевую роль в образовании следующей репликативной формы — RF II. Его продукт, ранний белок A, наносит однонитевой разрез по соседству с *ori*-сайтом и сохраняет связь с образующимся 5′-концом. Свободная 3′-OH группа инициирует репликацию по механизму «катящееся кольцо». В качестве матрицы используется минус-нить. В результате образуется конкатемер из линейных геномов вируса, опять-таки за счет бактериальных ферментов.

Образование репликативной формы RF II тесно связано с упаковкой: предполагается, что переход к ssДНК регулируется накоплением прокапсидов, а также C-белком бактериофага, который модифицирует репликационный комплекс. На этом этапе белок A функционирует в качестве терминазы — он взаимодействует с белками портала, отрезает полноразмерную копию генома от конкатемера после заполнения капсида и лигирует концы ssДНК.

Фаг ϕX174 кодирует белок лизиса E, который блокирует перенос мономеров пептидогликана в периплазму. Поскольку клетка-хозяин продолжает расти вплоть до заключительных этапов инфекции, высокий тургор в отсутствие ригидного слоя приводит к разрушению бактерии.

2.7.3. БАКТЕРИОФАГИ С ГЕНОМНОЙ dsРНК. СЕМЕЙСТВО *CYSTOVIRIDAE*

Бактериофаги с геномной РНК впервые описаны в начале 60-х годов XX в. Изучение их свойств во многом способствовало пониманию биологической роли РНК, а также расшифровке механизмов взаимодействия РНК с клеточными белками.

В настоящее время известно два семейства РНК-бактериофагов — *Cystoviridae* (бактериофаги, содержащие dsРНК) и *Leviviridae* (бактериофаги, содержащие ssРНК(+)).

В семейство *Cystoviridae* входят оболочные бактериофаги с сегментированной dsРНК (размер генома ~13 тыс. п.н.).

Строение этих вирусов довольно однообразно. Сферические вирионы имеют диаметр 75–86 нм. Оболочка содержит фосфолипиды, позаимствованные у цитоплазматической мембраны, а также структурные вирусные белки P9, P10 и P13. На поверхности суперкапсида равномерно распределены пепломеры, состоящие из белка P3, который участвует в адсорбции, и белка P6, обеспечивающего слияние оболочки с клеточной мембраной. Капсид изометрический, двухслойный. Внешний слой имеет толщину 58 нм, внутренний — 43 нм. Структурные белки вириона обладают ферментативной активностью: белки P1, P2, P4 и P7 входят в комплекс РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP); белки P10 и P5 выполняют роль эндопептидаз (рис. 49).

Хозяевами этих бактериофагов служат грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas*, в том числе фитопатогенные.

Типовым видом семейства *Cystoviridae* является **фаг Φ6**, хозяином которого выступает фитопатогенная бактерия *Pseudomonas syringae*. Его адсорбция осуществляется на фимбриях IV типа с помощью пепломерного белка P3 (остальные члены дан-

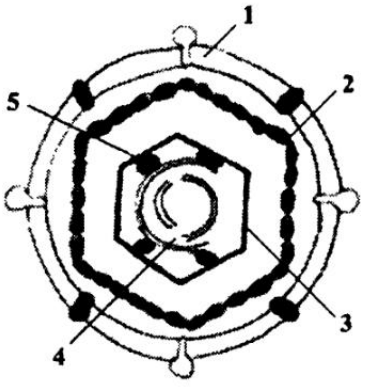


Рис. 49. Вирион фага *Pseudomonas phage Φ6.*

1 — оболочка (белки P3, P6, P9 и P10); 2 — наружный капсид (белки P5 и P8); 3 — внутренний капсид (белки P1, P2, P4 и P7); 4 — сегменты dsРНК; 5 — полимераза (белок P2).

ного семейства в качестве рецептора используют липополисахариды наружной мембраны). В ходе проникновения в клетку вирус раздевается. В результате «сокращения» нити фимбрии вирион устанавливает контакт с наружной мембраной хозяина, и его оболочка сливается с ней. Белок P5 разрушает пептидогликан, а белок P8 способствует интернализации нуклеокапсида.

Транскрипцию осуществляет РНК-зависимая РНК-полимераза, В инициации транскрипции участвует, по крайней мере один хозяйский белок, который взаимодействует с главным структурным белком P1 вириона. На поздних этапах транскрипции структурные белки сгруппируются вокруг полимеразного комплекса, что служит сигналом прекращения транскрипции, и полицистронные мРНК поступают в цитоплазму.

Трансляция регулируется во времени: ранние белки (компоненты полимеразного комплекса) закодированы в большом сегменте генома (L); поздние структурные и неструктурные белки в среднем (M) и малом (S) сегментах.

Геномная нуклеиновая кислота реплицируется внутри капсида (рис. 50), что характерно для всех dsРНК-вирусов. Гексамерный белок P4, обладающий АТФазной активностью, обеспечивает транслокацию ssРНК(+) в прокапсиды. Упаковка, которая начинается с сегмента S и заканчивается на сегменте L, происходит специфично и однонаправленно благодаря особым 5′-концевым последовательностям. Полимераза RdRP, входящая в состав прокапсида, восстанавливает ds-статус генома (рис. 50).

Вирион окончательно созревает в цитоплазме. Белок P10 участвует в посттрансляционной модификации белков оболочки вируса, а белок P12 способствует ее сборке из липидов цитоплазматической мембраны. Эндопептидаза P5 обеспечивает лизис хозяйской клетки и выход вирионов.

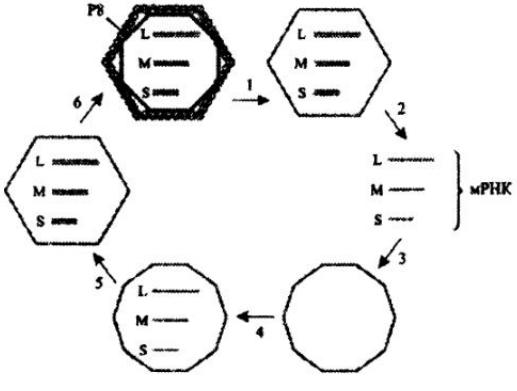


Рис. 50. Репликативные интермедиаты фага *Pseudomonas phage Φ6.*

1 — сбрасывание белка P8 наружного капсида после проникновения; 2 — выход в цитоплазму мРНК, синтезированных в капсиде; 3 — сборка прокапсида из белков внутреннего капсида; 4 — размещение РНК(+) в прокапсиде; 5 — восстановление полимеразой ds-сегментов, образование внутреннего капсида; 6 — образование наружного капсида.

2.7.4. БАКТЕРИОФАГИ С ГЕНОМНОЙ ssРНК(+). СЕМЕЙСТВО *LEVIVIRIDAE*

При попадании в клетку-хозяина смысловая геномная РНК используется в качестве мРНК. Последовательное осуществление трансляции и репликации регулируется элементами ее вторичной и третичной структуры.

Хозяевами этих бактериофагов служат энтеробактерии (*Escherichia* sp., *Salmonella* sp. и др.), а также бактерии родов *Acinetobacter*, *Caulobacter* и *Pseudomonas*.

Геномы представителей семейства *Leviviridae* относительно невелики (3,5–4,2 тыс. н.) и имеют единообразный набор генов. Взаимное родство левивирусов подтверждается их общими фенотипическими признаками. В частности, они адсорбируются на конъюгативных фимбриях, их капсомеры имеют сходную структуру, а сборка их вирионов происходит посредством коагрегации геномной нуклеиновой кислоты и структурных белков.

Безоболочные вирионы левивирусов имеют небольшой размер (23–34 нм); помимо структурного белка в них входит одна копия белка созревания, обладающего ферментативной активностью.

Типовой вид данного семейства, *Enterobacteria phage MS2* — **фаг MS2**, стал одним из объектов, на которых впервые отрабатывались методы молекулярного секвенирования: еще в 1972 г. была частично реконструирована нуклеотидная последовательность его генома. Несмотря на малый размер (3569 н.), за счет взаимного перекрывания в нем содержатся гены четырех белков — репликазы, белка созревания A, белка-лизина и капсомера.

Икосаэдрический вирион фага MS2 (рис. 51) имеет размер 23–25 нм и состоит из 180 капсомеров. При заражении хозяина вирусные частицы адсорбируются на боковой стороне фимбрии, а затем доставляются к ее основанию. Белок A образует в стенке фимбрии входную пору, через которую РНК проникает внутрь придатка и, как по каналу, попадает в цитоплазму, где незамедлительно используется в качестве мРНК.

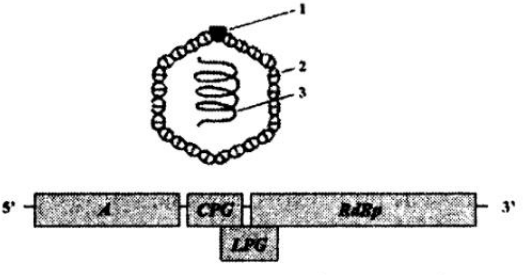


Рис. 51. Вирион и геном фага *Enterobacteria phage MS2*.

1 — портал; 2 — капсид; 3 — геномная РНК.

A — ген белка созревания; *CPG* — ген капсидного белка; *LPG* — ген белка лизиса; *RdRp* — ген РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Цикл размножения фага MS2 изображен на рис. 52.

Трансляция. На 5′-конце геномной РНК и между генами расположены нетранслируемые участки, образующие шпильки (англ. hairpin), которые обеспечивают связывание геномной РНК с рибосомами.

Помимо геномной РНК в состав трансляционного комплекса входят хозяйский рибосомный белок s1 и хозяйские факторы элонгации EF-S/EF-Tu.

Трансляция геномной РНК начинается с образования капсомеров, поскольку их старт-кодоны наиболее доступны; при этом изменяется вторичная структура мРНК и на короткое время открывается старт-кодон одной из субъединиц репликазы.

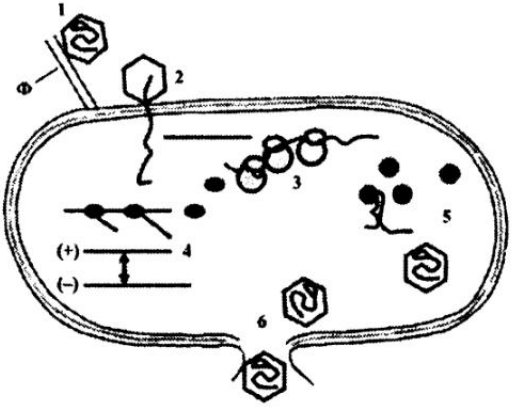


Рис. 52. Цикл размножения фага *Enterobacteria phage MS2.*

1 — адсорбция; 2 — проникновение; 3 — трансляция; 4 — репликация; 5 — сборка вириона; 6 — выход из клетки.

Ф — фимбрия.

Серые кружки — структурный белок; черный овал — полимеразный комплекс.

Репликация. Несколько репликазных комплексов инициирует синтез РНК(–) на плюс-нитях, что позволяет ограничить размер ds-интермедиатов, которые иначе могли бы стать мишенью для хозяйских РНКаз.

Затем с РНК(–) считываются новые копии вирусного генома. При прохождении репликазы по РНК(–) на вновь синтезируемой РНК(+) обнажается старт-кодон гена белка А. Преимущественное накопление РНК(+) обеспечивается тем, что минус-интермедиат всегда доступен для репликазы, в то время как плюс-нить связывается и с рибосомами, и с белками капсида.

Помимо своей основной функции (формирование капсида) структурные белки регулируют переход от репликации к сборке: они связываются с мРНК в области старт-кодона гена репликазы, что блокирует ее образование.

Сборка. Как у всех представителей семейства *Leviviridae*, сборка частиц фага MS2 определяется взаимодействием капсидных белков со шпилечной структурой в геномной РНК.

Высокая специфичность этого взаимодействия находит применение в препаративной биохимии при очистке РНК-белковых комплексов, а также в молекулярной биологии для выяснения локализации и оценки интенсивности транскрипции. Любой ген, лигированный с нетранслируемым участком РНК бактериофага MS2, в котором содержится *pac*-сайт, будет связываться с капсидным белком; в свою очередь, после трансформации бактерий плазмидой, содержащей гибридный ген капсидного белка и флуоресцирующего белка GFP, можно установить момент накопления мРНК, а также определить зону их преимущественной локализации.

Выход частиц. Зрелые частицы высвобождаются в результате деградации клеточной стенки под воздействием белка-лизина, который блокирует УДФ-N-ацетилглюкозамин-1-карбоксивинилтрансферазу (MurA), что приводит к прекращению полимеризации мономеров муреина.

Синтез белка лизиса, ген которого перекрывается с геном капсидного белка и с геном репликазы, регулируется изменениями вторичной структуры мРНК, что предотвращает преждевременный лизис.

Регуляция размножения посредством структурных изменений мРНК и формирования шпилек — это тот механизм, который используют все вирусы, содержащие РНК(+). Таким путем обеспечивается накопление структурных белков, появляются единичные копии белков созревания и лизиса, а также ограничивается число субъединиц репликазы.

Рекомендуемая литература

Ильяшенко Б. Н. (Ред.). Фаг лямбда. М.: Изд-во «Мир». 1975. 422 с.

Мекшенков М. И., Серегина Т. М. Генетический контроль развития бактериофага Т4. М.: Изд-во «Наука». 1977. 198 с.

Abedon S. T. (Ed.). Bacteriophage Ecology: Population Growth Evolution, and Impact of Bacterial Viruses. Cambridge Univ. Press. Cambridge (UK). 2008. 508 pp.

Abedon S. T. Phage evolution and ecology // Adv. Appl. Microbiol. 2009. Vol. 67. P. 1–45.

Ackermann H. W. Bacteriophage observations and evolution // Res. Microbiol. 2003. Vol. 154. P. 245–251.

Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.-D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. Vol. 68. P. 560–602.

Calendar R. (Ed.). Bacteriophages. Oxford Univ. Press. Oxford (UK). 2006. 746 pp.

Clokie M. R. J., Kropinski A. M. B. Bacteriophages: Methods and Protocols: Isolation, Characterization, and Interaction. Humana Press. Totowa, NJ (USA). 2009. 307 pp.

Kutter E., Sulakvelidze A. (Eds.). Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press. Boca Raton, FL (USA). 2006. 510 pp.

McGrath S., van Sinderen D. (Eds.). Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology. Caister Acad. Press. Norfolk (UK). 2007. 343 pp.

Poranen M. M., Tuma R., Bamford D. H. Assembly of double-stranded RNA bacteriophages // Adv. Virus Res. 2005. Vol. 64. P. 15–43.

Sabour P. M., Griffitths M. W. (Eds.). Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens. ASM Press. Washington, DC (USA). 2010. 333 pp.

Venigalla B., Rao V. B., Feiss M. The bacteriophage DNA packaging motor // An. Rev. Genet. 2008. Vol. 42. P. 647–681.

Waldor M. K. Phages: their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. ASM Press. Washington, DC (USA). 2006. 450 pp.

ГЛАВА 3

ВИРУСЫ АРХЕЙ

Еще недавно вирусов архей считали экзотическими объектами, не интересными «обычной» вирусологии. Однако в последнее время внимание к ним повысилось; число посвященных им публикаций неуклонно растет, что объясняется тремя основными причинами.

Во-первых, большинство вирусов архей, как и их хозяев, существует на границе адаптационных возможностей органической жизни, что относится к области интересов таких молодых и быстро развивающихся наук, как экстремальная биология и экзобиология. Во-вторых, с этими вирусами связывается перспектива обнаружения новых механизмов репликации и экспрессии генов. В-третьих, не принимая во внимание этих вирусов, мы не сможем реконструировать раннюю эволюцию органической жизни.

Вирусы архей интересны и в прикладном плане. Те из них, которые относятся к числу умеренных, могут служить векторами для осуществления гетерологичной экспрессии генов белков. В то же время литические вирусы архей опасны для производственных систем, где их хозяева используются в качестве продуцентов.

Согласно результатам оценки сходства нуклеотидных последовательностей 16S рДНК филогенетическое древо домена *Archaea* состоит из четырех фил. Две из них, фила *Euryarchaeota* («вездесущие» археи) и фила *Crenarchaeota* («археи из горячих источников»), включают в себя большинство изученных видов архей. Две другие филы, *Korarchaeota* («юные» археи) и *Nanoarchaeota* («карликовые» археи), бедны представителями и преимущественно содержат виртуальные объекты, не охарактеризованные в фенотипическом плане.

К филе *Euryarchaeota* принадлежат облигатные экстремальные галофилы (класс *Halobacteria*), облигатные метаногены (классы *Methanobacteria*, *Methanococci* и *Methanopyri*), облигатные термоацидофилы (класс *Thermoplasmata*) и серозависимые экстремальные термофилы/гипертермофилы (классы *Thermococci* и *Archaeoglobi*).

К филе *Crenarchaeota* преимущественно относятся экстремальные термофилы/гипертермофилы (класс *Thermoprotei*), большинство из которых растет при темпе-

ратуре >80°C. В порядки *Thermoproteales* и *Desulfurococcales* входят (ан)аэробы/нейтрофилы или факультативные анаэробы, восстанавливающие серу, в порядок *Sulfolobales* — окисляющие серу ацидофилы-аэробы или факультативные анаэробы.

Число видов вирусов архей (~50) на два порядка меньше по сравнению с числом видов бактериофагов и вирусов ядерных организмов (~8000). Лишь немногие из них охарактеризованы в фенотипическом отношении и только у семи (FCh1, HF2, SIFV, SIRV1, SIRV2, SSV1 и TTV1) геном частично или полностью секвенирован.

Выявленное разнообразие вирусов архей — только вершина айсберга, что объясняется и ограниченным скринингом, и рядом объективных причин.

Во-первых, не срабатывает испытанный прием вирусологии — получение препарата вирионов путем центрифугирования фильтрата образцов природного материала (возможно, из-за того, что в результате эволюции время пребывания вирусов архей в экстремальной среде сведено к минимуму).

Во-вторых, удается культивировать лишь немногих хозяев, да и то в условиях, неблагоприятных для выделения вирусов. В частности, из-за высокой оптимальной температуры роста (>75°C) многие из них не образуют зон лизиса (бляшек) на обычной агаризованной среде, хотя эта проблема часто решается путем замены агара более тугоплавким полимером микробного происхождения — гелланом («Gelrite™»).

В-третьих, многие вирусы архей (а в случае вирусов кренархеотов это большинство известных представителей) не относятся к литическим, а по типу инфекции являются персистирующими или умеренными.

Как правило, вирусы архей содержат геномную dsДНК (5–85 тыс. п.н.; 14–80 открытых рамок считывания) кольцевой или линейной конфигурации. Их вирионы либо похожи на вирионы хвостатых бактериофагов, либо имеют уникальную морфологию (см. рис. 53), и поэтому для этих вирусов предложены новые семейства.

3.1. ВИРУСЫ АРХЕЙ ИЗ ФИЛЫ *EURYARCHAEOTA*

Вирусы эвриархеотов содержат линейную dsДНК; размер генома у них составляет 15–23 тыс. п.н. Их вирионы (за исключением сферических вирионов у галофагов His2 и SH1, а также эллипсоидного вириона у вируса VLP, хозяином которого служит *Methanococcus voltae*), похожи на Т-фагов или лямбдаподобных фагов — они состоят из икосаэдрической головки и длинного или короткого хвостового отростка. Согласно современной классификации вирусов они принадлежат к семействам *Myoviridae* и *Siphoviridae*.

3.1.1. ВИРУСЫ ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ

Пока Карл Воз (C. R. Woese) в 1977 г. не переквалифицировал облигатно галофильных «бактерий» в облигатно галофильных архей, эти прокариоты мало интересовали микробиологов, хотя было известно, что при определенных обстоятельствах они наносят вред кожевенному производству или вызывают гниение соленой рыбы.

В настоящее время этих экстремальных галофилов относят к домену *Archaea*, филе *Euryarchaeota*, классу *Halobacteria*. За последние 30 лет число их родов увеличи-

лось до 15 (к 1980 г. было описано только два — *Halobacterium* и *Halococcus*), и сейчас они содержат около 40 видов, у 25% которых имеются вирусы (табл. 17).

Первые вирусы экстремальных галофилов, пионеры среди вирусов архей, оказались схожими с «хвостатыми» бактериофагами из семейства *Myoviridae*, в частности с фагом T4.

Вирус HS1 (сокр. от лат. ***Halobacterium salinarium* 1**), которого случайно обнаружили в 1974 г. норвежские вирусологи Терье Торсвик (T. Torsvik) и Аян Дандес (I. Dundas), имеет икосаэдрическую головку и длинный сократимый хвостовой отросток. Подобно своему хозяину, *H. salinarium*, вирус HS1 сохраняет структурную целостность и биологическую активность только в среде с высокой концентрацией поваренной соли. Зараженная культура *H. salinarium* образовывала колонии, в которых спорадически происходил лизис клеток, что сопровождалось массовым выходом зрелых вирусных частиц. Однако стабильные лизогенные клоны *H. salinarium* изолировать не удалось, т. е. вирус HS1 не является умеренным фагом, а вызывает персистентную инфекцию (см. раздел 1.6).

В 1975 г. американский вирусолог Аллен Вайс (A. C. Wais) с сотрудниками выделил из культуры *Halobacterium cutirubrum* второго экстремально галофильного вируса — Ja1 (сокр. от англ. **Ja**maica **1**). Морфологически он не отличался от вируса HS1, однако оказался вирулентным фагом.

В 1982–1983 гг. американский вирусолог Креллин Полинг (C. Pauling) выделил и предварительно охарактеризовал фагов Hh1 и Hh3, персистирующих в клетках *H. halobium*. У них икосаэдрические головки и длинные несократимые хвостовые отростки, как и у ДНК-содержащих бактериофагов из семейства *Siphoviridae*. При взаимном сходстве морфологии эти изоляты различаются молярным %GC (соответственно, 67% и 62%) и размером генома, а также составом структурных белков.

В 1988 г. немецкие вирусологи Хайнке Фогельзанг-Венке (H. Vogelsang-Wenke) и Дитер Эстерхельд (D. Oesterheld) обнаружили у *H. halobium* «хвостатого» умеренного галофага φN, сходного с фагом φH (см. ниже). В его линейной dsДНК (56 тыс. п.н.) цитидиловые остатки на 100% метилированы, что крайне редко встречается у вирусов прокариотов (вторым примером служит бактериофаг XP12 фитопатогенной бактерии *Xanthomonas oryzae*) и обеспечивает устойчивость к рестриктазам.

На протяжении 1980–1994 гг. группа немецких микробиологов из мюнхенского Института им. Макса Планка, возглавляемая Вольфрамом Циллигом (W. Zillig), охарактеризовала умеренного вируса φH, который остается наиболее изученным из галофагов. В частности, секвенирован и аннотирован его геном; выяснены стратегия репликации и контроль транскрипции, а также паттерн вирусных белков. Как оказалось, большинство генов вируса φH не обладает сходством с генами бактерий и генами бактериофагов, хотя по морфологии, характеру репликации и регуляции лизогении он похож на хвостатого фага P1.

В 1993 г. австралийские вирусологи Сидней Натэл (S. D. Nuttal) и Майк Даял-Смит (M. Dyall-Smith) выделили из местных соленых озер хвостатых литических фагов HF1 и HF2, хозяевами которых служат некоторые виды экстремально галофильных архей. После секвенирования генома галофага HF2 было установлено, что он имеет мозаичную природу — 109 из 121 открытой рамки считывания (90%) не встречаются

Таблица 17. **Вирусы экстремально галофильных *Euryarchaeota***

Название вируса	Морфология и размер вириона	Тип нуклеиновой кислоты; мол. %GC; размер генома	Хозяин	Тип инфекции
B10	Икосаэдрическая головка (?); несократимый хвостовой отросток (?)	Линейная dsДНК; –; –	*Halobacterium* sp. B10	–
HF1	Икосаэдрическая головка (58 нм); сократимый хвостовой отросток (94 нм)	Линейная dsДНК; 55,8%; 75,9 тыс п.н.	*Haloarcula* sp.; *Halobacterium salinarium*; *Haloferax volcanii*	Литический фаг
HF2	Икосаэдрическая головка (58 нм); сократимый хвостовой отросток (94 нм)	Линейная dsДНК, 55,8%; 77,7 тыс п.н.	*Halorubrum coriense*; *Halobacterium saccharovorum*	То же
Hh1	Икосаэдрическая головка (60 нм); несократимый хвостовой отросток (100 нм)	Линейная dsДНК; 67%; 37,6 тыс п.н.	*H. salinarium*	Выход фага в отсутствии лизиса
Hh3	Икосаэдрическая головка (75 нм); несократимый хвостовой отросток (50 нм)	Линейная dsДНК; 62%; 29,6 тыс п.н.	То же	То же
His1	Веретеновидный (44×74 нм)	Линейная dsДНК; 40%; 14,5 тыс п.н.	*Halobacterium cutirubrum*; *Halorubrum hispanica*	Литический или персистирующий фаг
His2	Сферический (62 нм)	Линейная dsДНК; –; 16,1 тыс п.н.	*H. hispanica*	То же
Hs1	Икосаэдрическая головка (50 нм); сократимый хвостовой отросток (120 нм)	Линейная dsДНК; –; –	*H. salinarium*	—"—
Ja1	Икосаэдрическая головка (90 нм); сократимый хвостовой отросток (150 нм)	Линейная dsДНК; –; 23 тыс п.н.	*H. cutirubrum*; *H. salinarium*	–
S45	Икосаэдрическая головка (40 нм); несократимый хвостовой отросток (70 нм)	Линейная dsДНК; –; –	*H. salinarium*	Литический фаг
S5100	Икосаэдрическая головка (?); сократимый хвостовой отросток (?)	Линейная dsДНК; –; –	То же	–
SH1	Сферический оболочный (50 нм)	Линейная dsДНК; –; 27 тыс п.н.	*H. hispanica*	Литический фаг
φCh1	Икосаэдрическая головка (70 нм); сократимый хвостовой отросток (130×20 нм)	Линейная dsДНК; 62%; 58,5 тыс п.н.; цитозин частично метилирован	*Natrialba magadii*	Умеренный фаг
φH	Икосаэдрическая головка (64 нм); сократимый хвостовой отросток (170 нм)	Линейная dsДНК; 65%; 59 тыс п.н.	*H. salinarium*	Литический или персистирующий фаг
φN	Икосаэдрическая головка (55 нм); несократимый хвостовой отросток (80 нм)	Линейная dsДНК; 70%; 56 тыс п.н.; цитозин полностью метилирован	То же	Умеренный фаг

Примечание. Здесь и в табл. 18, 19 «–» — данные отсутствуют.

в базах данных; остальные 10% являются ортологами ORF архей, а также ORF некоторых бактерий и бактериофагов. Последнее трудно объяснить — экстремальная среда обитания галофильных архей и высокое содержание соли в их цитоплазме исключают возможность использования общих с бактериями продуктов экспрессии генов.

Наконец, в 2007 г. группа китайских вирусологов во главе с Чен Ханьдоном (C. Xiangdong) описала индуцируемого митомицином С умеренного галофага, который избирательно репродуцируется в клетках *Natrinema* sp. F5. Вирион этого вируса, по морфологическим признакам принадлежащего к семейству *Siphoviridae*, состоит из головки диаметром 67 нм и несократимого хвостового отростка длиной 570 нм. Для поддержания его структурной целостности, а также для адсорбции и репродукции этого вируса требуется NaCl в концентрации 25–30%.

Большинство хвостатых галофагов слабо охарактеризовано, а многие из них утеряны из коллекций. Тем не менее на основе их изучения предположили, что они представляют собой вариации на тему обычных хвостатых бактериофагов. Однако этот обобщающий вывод оказался не только преждевременным, но и ошибочным, поскольку вскоре появились данные о морфологическом разнообразии вирусов архей и их генетическом отличии от других вирусов.

В частности, по результатам электронно-микроскопических наблюдений, проведенных в конце 1990-х годов группой израильских исследователей во главе с Аароном Ореном (A. Oren), концентрация вирусных частиц в Мертвом море превышает $10^7 \cdot мл^{-1}$. Большинство из них, в отличие от галофагов с головкой и хвостовым отростком, имеет веретеновидную форму, подобно вирусу SSV1 экстремального термофила *Sulfolobus* sp. (см. ниже).

В свою очередь, Майк Даял-Смит обнаружил в 1993 г. литических галофагов His1 (сокр. от *Halorubrum* ***his****panica virus 1*) и His2, соответственно веретеновидной и сферической формы; их геномы имеют размер ~5 тыс. п.н. и содержат до 35 ORF. Веретеновидного галофага His1 можно было бы по морфологическим признакам отнести к семейству *Fuselloviridae*, в которое входят некоторые вирусы гипертермофильных кренархеотов, в частности вирус SSV1 (см. ниже). Однако при сравнении геномов вирусов His1 и SSV1 оказалось, что они не обладают взаимным сходством. В отличие от литического галофага His1, который содержит линейную ДНК (кодирует собственную ДНК-полимеразу и реплицируется с помощью белкового праймера), вирус SSV1 содержит кольцевую ДНК, не содержит ген ДНК-полимеразы и является умеренным фагом. С учетом этих различий вирусы His1 и His2 в конечном счете были выделены в новый род *Salterprovirus* (от англ. **salt** **ter**minal **pro**tein), находящийся вне семейства.

Большой интерес представляют три неординарных галофага, выделенные и охарактеризованные в последнем десятилетии XX в. — первом десятилетии XXI в.

Во-первых, это умеренный галофаг φCh1 из спонтанно лизировавшейся культуры галоалкалифильного археота *Natronobacterium magadii*, изолированный в 1997 г. группой немецких вирусологов во главе с Анжелой Витте (A. Witte). Он персистирует в хозяине в качестве интегрированного в хромосому профага. Длина его вириона составляет 200 нм, из которых 70 нм приходится на головку и 130 нм — на хвостовой отросток. Уникальность этого вируса состоит в том, что наряду с линейной dsДНК

(55 тыс. п.н.) в состав зрелого вириона входит несколько молекул РНК (80–700 н.). Доказано, что они имеют клеточное происхождение, хотя это не рРНК. Возможно, что эти РНК участвуют в упаковке вирусной ДНК, которая частично метилирована (собственной метилазой или в результате активации фермента хозяина).

Во-вторых, это еще один, после His2, сферический галофаг — SH1 (сокр. от англ. **s**pherical **h**alovirus **1**), обнаруженный в 2005 г. группой во главе с Дэнисом Бэмфордом (D. Bamford) в австралийском гипергалинном озере (>3M NaCl). Он вызывает литическую инфекцию у плеоморфных археотов *Halorubrum* sp. и *Haloarcula hispanica*. В недифференцированных клетках хозяина вирус SH1 активно размножается (до 200 частиц), что сопровождается лизисом клетки, тогда как дифференцированные клетки (галоцисты) устойчивы к заражению. Размер линейного генома этого вируса (56 идентифицированных ORF) составляет 30,9 тыс. п.н. Шаровидный вирион вируса SH1 диаметром 70 нм лишен хвостового отростка и содержит 11 типов структурных белков. В пространстве между капсидом и упакованной ДНК находится липопротеиновая мембрана, уникальная для галофагов, но имеющаяся, по крайней мере, у трех других вирусов — кренархеотного вируса STIV (вне семейства), бактериофага PRD1 из семейства *Tectiviridae* и вируса PBCV-1 (сокр. от ***P**aramecium **b**ursaria **C**hlorella **v**irus **1***) из семейства *Phycodnaviridae*.

В-третьих, это уникальный галофаг HPRV-1 (сокр. от ***H**alorubrum **p**leomorphic **v**irus **1***), выделенный в 2009 г. группой Дэниса Бэмфорда из гипергалинного австралийского озера. В состав плеоморфного оболочного вириона (44×55 нм) входит не dsДНК, как у всех остальных вирусов архей, а ssДНК. Этот вирус вызывает персистентную инфекцию, не интегрируясь в состав хромосомы, и зрелые частицы выходят из клетки в отсутствие лизиса.

3.1.2. ВИРУСЫ МЕТАНОГЕННЫХ АРХЕЙ

По числу известных представителей вирусы метаногенов (табл. 18) значительно уступают вирусам экстремально галофильных архей; информация о них бедна и фрагментарна.

Первый литический фаг метаногенов, вирус PG, был обнаружен в 1984 г. Джузеппе Бертани (G. Bertani). Следом за этим в 1986 г. был описан литический фаг PMS1. Хозяевами обоих вирусов служит *Methanobrevibacter smithii*.

В 1986 г. было опубликовано предварительное сообщение о присутствии профага в клетках *Methanolobus vulcani*, впоследствии не подтвержденное, но и не опровергнутое. В 1989 г. в культуре *Methanococcus voltae* штамм A3 были выявлены вирусоподобные частицы (англ. **v**irus-**l**ike **p**article, VLP) размером 79×52 нм, содержащие кольцевую dsДНК (23 тыс. п.н.). К сожалению, работа в данном направлении также не была продолжена.

В 1989 г. Томас Лейсинджер (T. Leisinger) с сотрудниками обнаружил и охарактеризовал литического фага ψM1, хозяином которого служит термофильный (55–65°C) метаноген *Methanothermobacter thermautotrophicus* (*«Methanobacterium thermoautotrophicus»*). На других термофильных видах этого рода данный вирус не размножается. Развитие фага ψM1 в культуре хозяина приводило к образованию лизатов с высо-

Таблица 18. **Вирусы метаногенных *Euryarchaeota***

Название вируса	Морфология и размер вириона	Тип нуклеиновой кислоты; мол %GC; размер генома	Хозяин	Тип инфекции
PG	Икосаэдрическая головка (?); несократимый (?) хвостовой отросток (?)	Линейная dsДНК; –; 50 тыс. п.н.	*Methanobrevibacter smithii*	Литический фаг
PMS1	То же	Линейная dsДНК; –; 35 тыс. п.н.	То же	То же
VLP	Эллипсоидный (52×70 нм); короткий хвостовой отросток	Линейная (пермутирующая в кольцо) dsДНК; –; 23 тыс. п.н.	*Methanococcus voltae* A3	Умеренный фаг
VTA	Икосаэдрическая головка (40 нм); несократимый хвостовой отросток (61 нм)	–; –;–	*M. voltae* PS	То же
ϕF1	Икосаэдрическая головка (70 нм); несократимый хвостовой отросток (160 нм)	Линейная dsДНК, –; 85 тыс. п.н.	*Methanothermobacter thermautotrophicus*	Литический фаг
φF3	Икосаэдрическая головка (55 нм); несократимый хвостовой отросток (230 нм)	Линейная (пермутирующая в кольцо) dsДНК; –; 36 тыс. п.н.	То же	То же
ψM1	Икосаэдрическая головка (55 нм); несократимый хвостовой отросток (210 нм)	Линейная (пермутирующая в кольцо) dsДНК; –; 30,4 тыс. п.н.	—"—	—"—
ψM2	То же	Линейная dsДНК; 46,3%; 26,1 тыс. п.н.	—"—	—"—

ким титром инфекционных частиц (до $2 \cdot 10^{10} \cdot мл^{-1}$). В опытах по построению одноступенчатой кривой развития вируса (см. раздел 1.5) после латентного периода продолжительностью 4 ч наступал лизис с урожаем 5–6 инфекционных частиц на клетку. Вирионы фага ψM1 внешне напоминают хвостатых бактериофагов из семейства *Myoviridae* и состоят из полиэдральной головки диаметром 55 нм и длинного (210 нм) несократимого хвостового отростка толщиной 10 нм. Геномной нуклеиновой кислотой служит линейная dsДНК (27,1 тыс. п.н.) с липкими концами длиной по 3 тыс. н. При сборке фага ψM1 совместно с геномной ДНК (до 10–15%) в вирионы упаковывалась не интегрированная в ее состав плазмида pME2001 размером 4,4 тыс. п.н. В дальнейшем было показано, что благодаря релаксированному механизму упаковки генома фаг ψM1 способен к общей трансдукции.

Геном фага ψM2, делеционного мутанта фага ψM1, содержит 31 ORF. Шесть из них аннотированы: три отвечают за упаковку ДНК, две кодируют структурные белки, шестая — сайтспецифичную рекомбиназу из семейства Int (т. е. фаг ψM2 может оказаться умеренным).

В 2001 г. было показано, что в хромосому *Methanothermobacter wolfei* интегрирован гомолог фагов ψM1 и ψM2 — дефектный профаг ψM100 (28,8 тыс. п.н.), потерявший способность лизигенизировать хозяина, хотя он кодирует автолизин (псевдомуреин-эндопептидазу PeiW).

В 1993 г. у метаногенов были описаны еще два морфологически сходных литических фага — ϕF1 и ϕF3, которые инфицируют *M. thermautotrophicus*. В то время как фаг ϕF1 может размножаться на 5 штаммах хозяина, фаг ϕF3 репродуцируется только в клетках штамма *M. thermautotrophicus* FF3. Вирион фага ϕF1 состоит из икосаэдрической головки диаметром 70 нм и жесткого несократимого хвостового отростка длиной 160 нм и толщиной 20 нм, вирион фага ϕF3 — из икосаэдрической головки диаметром 55 нм и гибкого несократимого хвостового отростка длиной 230 нм и толщиной 9 нм. Геном фага ϕF1 имеет самый большой размер для всех обнаруженных фагов метаногенных архей (85 тыс. п.н.). Геном фага ϕF3 значительно меньше, 36 тыс. п.н., причем линейная dsДНК содержит липкие концы и может пермутировать в кольцевую форму. Согласно негативному результату ДНК–ДНК-гибридизации геномы фагов ϕF1 и ϕF3 не обладают взаимным сходством нуклеотидных последовательностей.

В 1999 г. Джузеппе Бертани описал для культуры *Methanococcus voltae* PS явление общей трансдукции. Вслед за этим был выявлен и сам вектор — фильтрующийся агент VTA (сокр. (*Methanococcus*) ***voltae*** **transfer agent**), способный переносить фрагмент клеточной ДНК размером 4,4 тыс. п.н. VTA имеет веретеновидную форму, легко переходящую в плеоморфную; размер его кольцевого генома, способного интегрироваться в хромосому, составляет 23 тыс. п.н.

3.1.3. ВИРУС ГИПЕРТЕРМОФИЛА *PYROCOCCUS*

В 2007 г. группа французских вирусологов во главе с Клэр Гелэн (C. Geslin) описала первого, и пока единственного представителя вирусов, инфицирующих гипертермофильных эвриархеотов, — вирусоподобную частицу (англ. **virus-like p**article, VLP), которая получила название PAV1 (сокр. от «***Pyrococcus abyssi*» *virus 1***).

Хозяином фага PAV1 служит новый вид облигатно анаэробных гипертермофильных архей (96°C), выделенных в 1993 г. из гидротермального ключа в районе тихоокеанской впадины Фиджи-Север на глубине 2 км.

Вирион фага PAV1 имеет лимоновидную форму (120×80 нм), снабжен коротким «хвостом» и содержит кольцевую dsДНК (18 тыс. п.н.), которая в большом числе плазмидных копий (до 60) персистирует в цитоплазме клетки-хозяина без интеграции в хромосому; пик выхода частиц в отсутствие лизиса приходится на стационарную фазу.

Согласно результатам молекулярного секвенирования, геном вируса PAV1 содержит 28 генов, 25 из которых расположены на одной из нитей ДНК (что не встречается у других вирусов гипертермофильных архей, за исключением вируса PSV из сем. *Globuloviridae*).

Большинство генов вируса PAV1 уникальны, и их функция неизвестна, что дает основание отнести его к новому роду или даже семейству. Генетическая обособленность вируса PAV1, по-видимому, связана с географической изоляцией хозяина, а также с адаптацией к экстремальным температуре и гидростатическому давлению, в то время как лимоновидные вирусы семейства *Fuselloviridae* (см. ниже) заселяют горячие источники на суше.

3.2. ВИРУСЫ АРХЕЙ ИЗ ФИЛЫ *CRENARCHAEOTA*

Вирусы кренархеотов чаще всего имеют оболочку; они исключительно разнообразны в морфологическом и генетическом отношении. Размер генома у них составляет 15–75 тыс. п.н. Все известные представители этой группы содержат dsДНК — кольцевую (15–75 тыс. п.н.) или линейную (25–45 тыс. п.н.). Способность инкапсидировать линейную dsДНК, которой обладают вирусы из семейств *Lipothrixviridae* и *Rudiviridae*, не имеет аналогий. Кольцевой вирусный геном может кодировать интегразу, что позволяет ему встраиваться в хозяйскую хромосому, в то время как в линейном геноме ген интегразы отсутствует и интеграции не происходит.

Большинство вирусов кренархеотов принадлежит к умеренным или персистирующим фагам (табл. 19). Такая стратегия вирусной инфекции ограничивает время контакта вириона с экстремальной средой, в которой обитают их хозяева. Тем не менее многие вирусы кренархеотов имеют собственные средства защиты от агрессивного внешнего воздействия (температура до 100°C; pH≤2). В частности, они образуют катионные ДНК-связывающие белки, которые предохраняют геномную нуклеиновую кислоту от термической денатурации. Благодаря этому безоболочные рудивирусы (см. ниже) выдерживают автоклавирование в течение 10 мин при 120°C и разрушаются только при автоклавировании в течение часа.

Сведения о вирусах кренархеотов, как и об остальных вирусах архей, фрагментарны. Неизвестно, каким способом они проникают в клетку-хозяина (в частности, не удается морфологически зарегистрировать адсорбцию вирионов на клеточной поверхности), с помощью каких механизмов реплицируются и каким способом покидают клетку. Вероятно, эти вирусы используют еще неизвестные типы ДНК-полимераз, которые в перспективе могут найти применение в молекулярной генетике. У них слабо изучена регуляция транскрипции, хотя установлено, что некоторые виды содержат промоторы, аналогичные клеточным (с TATA-боксами и участками связывания транскрипционных факторов). В то же время некоторые промоторы у них имеют специфическую структуру и содержат консенсусный элемент — тринуклеотид GTC в downstream-положении от TATA-бокса.

Гены вирусов кренархеотов (за исключением тех, которые отвечают за гликозилирование структурных белков, репликацию ДНК, рекомбинацию, интеграцию и метаболизм нуклеотидов) не удается аннотировать, так как неизвестна их функция. Несходство генов и белков с генами и белками, функция которых известна, не позволяет детально изучить онтогенез этих вирусов.

Реконструкции онтогенеза вирусов архей, в целом, и вирусов кренархеотов, в частности, может способствовать анализ паттерна экспрессии генов (транскриптома) в ходе их репродукции, а также анализ влияния на него транскрипционных факторов клетки-хозяина.

Хозяевами вирусов кренархеотов выступают (ан)аэробные представители порядка *Sulfolobales*: *Acidianus*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus* и *Thermoproteus*, а также *Aeropyrum pernix* — аэробный представитель порядка *Desulfurococcales*. Они заселяют материковые, островные, морские и океанические гидротермы (60–90°C; pH 1–9), широко распространенные в обоих полушариях. Археи *Acidianus* и *Sulfolobus* являются аэро-

Таблица 19. **Вирусы *Crenarchaeota***

Название вируса	Морфология и размер вириона	Тип нуклеиновой кислоты; мол %GC; размер генома	Хозяин	Тип инфекции
ABV	Оболочный бутылевидный (230×75 нм)	Линейная dsДНК; –; 23,9 тыс. п.н.	*Acidianus* sp.	Персистирующий фаг
AFV-типа	Оболочные нитевидные (900×24 нм)	Линейная dsДНК; 36%; 21–40 тыс. п.н.	То же	Персистирующие фаги
APBV1	Оболочный палочковидный (140×20 нм)	Кольцевая dsДНК; –; 5,3 тыс. п.н.	*Aeropyrum pernix*	Персистирующий фаг
ARV1	Оболочный палочковидный (600×23 нм)	Линейная dsДНК; 39%; 24,6 тыс. п.н.	*Acidianus* sp.	То же
ATV	Безоболочный веретеновидный с биполярными хвостовыми отростками (250×110 нм)	Кольцевая dsДНК; 41%; 62,7 тыс. п.н.	То же	Литический фаг
PSV	Оболочный сферический (100 нм)	Линейная dsДНК; 48%; 28,3 тыс. п.н.	*Pyrobaculum* sp., *Thermoproteus tenax*	Персистирующий фаг
SIFV	Оболочный нитевидный (1950×24 нм)	Линейная dsДНК; 33%; 40,8 тыс. п.н.	*Sulfolobus islandicus*	–
SIRV1	Безоболочный палочковидный (600×23 нм)	Линейная dsДНК; 25%; 32 тыс. п.н.	То же	Персистирующий фаг
SIRV2	Безоболочный палочковидный (900×23 нм)	Линейная dsДНК; 25%; 35,5 тыс. п.н.	—"—	Литический фаг
SIRV-Y1	Безоболочный палочковидный (900×25 нм)	Линейная dsДНК; –; 33 тыс. п.н.	*S. solfataricus*	–
SNDV	Безоболочный каплевидный (145×75 нм)	Кольцевая dsДНК; –; 20 тыс. п.н.	*S. neozealandicus*	–
SRV	Безоболочный палочковидный (700×22 нм)	Линейная dsДНК; 29%; 28 тыс. п.н.	*Stygiolobus* sp.	Персистирующий фаг
SSV1	Безоболочный веретеновидный (90×60 нм)	Кольцевая dsДНК; 40%; 15,5 тыс. п.н.	*S. shibatae*	Умеренный фаг
SSV2	Безоболочный веретеновидный (80×55 нм)	Кольцевая dsДНК; 39%; 14,8 тыс. п.н.	*S. islandicus*	То же
SSV-Y1	То же	Кольцевая dsДНК; 39%; 16,5 тыс. п.н.	То же	—"—
SSV-K1	Безоболочный веретеновидный (90×60 нм)	Кольцевая dsДНК; 39%; 17,4 тыс. п.н.	*Sulfolobus* sp.	–
STIV	Безоболочный икосаэдрический (70 нм)	Кольцевая dsДНК; 36%; 17,7 тыс. п.н.	То же	Персистирующий фаг
STSV1	Безоболочный веретеновидный (230×170 нм) с коротким (до 13 нм) хвостом	Кольцевая dsДНК; 35%; 75,3 тыс. п.н.	*S. tengchongensis*	То же
TTSV1	Оболочный сферический (100 нм)	Линейная dsДНК; 50%; 20,9 тыс. п.н.	*T. tenax*	—"—
TTV1	Оболочный палочковидный (400×40 нм)	Линейная dsДНК; –; 15,9 тыс. п.н.	То же	Умеренный фаг
TTV2	Оболочный нитевидный (1250×20 нм)	Линейная dsДНК; –; 16 тыс. п.н.	—"—	Персистирующий фаг
TTV3	Оболочный нитевидный (2500×30 нм)	Линейная dsДНК; –; 27 тыс. п.н.	—"—	То же
TTV4	Оболочный палочковидный (500×30 нм)	Линейная dsДНК; –; 17 тыс. п.н.	—"—	Литический фаг

бами/экстремальными ацидофилами (pH≤2), в то время как *Pyrobaculum и Sulfolobus* принадежат к числу анаэробов/нейтрофилов, а *A. pernix* — к облигатно аэробным нейтрофилам.

Природные гидротермы, в частности горячие источники с температурой выше 80°C, служат экологической нишей для высокоадаптированных экстремально термофильных и гипертермофильных микроорганизмов, многие из которых обладают уникальными генетическими свойствами и ранее были неизвестны. В последнее время в геотермальных экосистемах открыты вирусы, большинство которых, в отличие от банальных хвостатых фагов эвриархеотов, имеет беспрецедентную морфологию (каплевидные, веретеновидные с моно- или биполярными отростками, бутылевидные, икосаэдрические с башнеобразными выростами).

Помимо нетривиальной морфологии (рис. 53) эти вирусы обладают рядом необычных молекулярных признаков, что позволило обособить восемь новых семейств:

— «*Ampullaviridae*» (бутылевидные вирусы);
— «*Bicaudoviridae*» (веретеновидные вирусы с биполярными отростками);
— «*Clavaviridae*» (палочковидные вирусы);
— *Fuselloviridae* (веретеновидные вирусы с униполярным отростком);
— «*Globuloviridae*» (шаровидные вирусы);
— *Guttaviridae* (каплевидные вирусы);
— *Lipothrixviridae* (нитевидные вирусы);
— *Rudiviridae* (палочковидные вирусы).

Из них четыре семейства — *Fuselloviridae, Guttaviridae, Lipothrixviridae* и *Rudiviridae* — одобрены Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV), поэтому их названия приводятся без кавычек. Еще четыре вируса (TTV-4, STIV, STIV2 и STSV1) не отнесены ни к одному из вирусных семейств и рассматриваются обособленно.

Семейство «*Ampullaviridae*» (лат. ampulla — бутылка) (рис. 53, а). Первый и пока единственный вирус семейства «*Ampullaviridae*» — ABV (сокр. от *Acidianus bottle-shaped virus*), был описан в 2005 г. международной группой вирусологов во главе с Давидом Прангишвили (D. Prangishvili).

Источником его выделения послужили образцы воды из геотермального водоема (~90°C) в кратере потухшего вулкана Сольфатара (г. Поццуоли, Италия). Препарат вирусных частиц был получен из фильтрата смешанной накопительной культуры, содержащей ряд представителей порядка *Sulfolobales*. Среди нескольких морфотипов вирусоподобных частиц (англ. virus-like particle, VLP), наблюдаемых под электронным микроскопом, один оказался уникальным и представляет собой бутылевидный вирион средней длиной 230 нм, шириной донышка 75 нм и шириной горлышка 4 нм. На донышке бутылки по кругу расположены 20 хвостовых нитей длиной 20 нм и толщиной 3 нм, в основании которых находится структура в форме кольца или диска.

Вирион вируса ABV состоит из бутылеобразного суперкапсида толщиной 9 нм и конусовидного нуклеокапсида со спирально уложенными капсомерами. На узком конце вириона находится похожая на пробку структура, которая взаимодействует с геномной ДНК, а также служит для прикрепления вируса к мембране клетки-хозяина (вышеуказанные хвостовые нити в этом не участвуют).

Геном вируса ABV имеет размер 23,9 тыс. п.н. и кодирует, по меньшей мере, шесть белков молекулярной массой 15–80 кДа. Он реплицируется с помощью вирусной ДНК-полимеразы, причем праймером служит белок, присоединенный к терминальному участку линейной молекулы dsДНК.

Хозяином вируса ABV оказался *Acidianus* sp. (штамм AciF28). Репродукция вируса не приводит к лизису клетки, и инфекция, скорее всего, является персистентной.

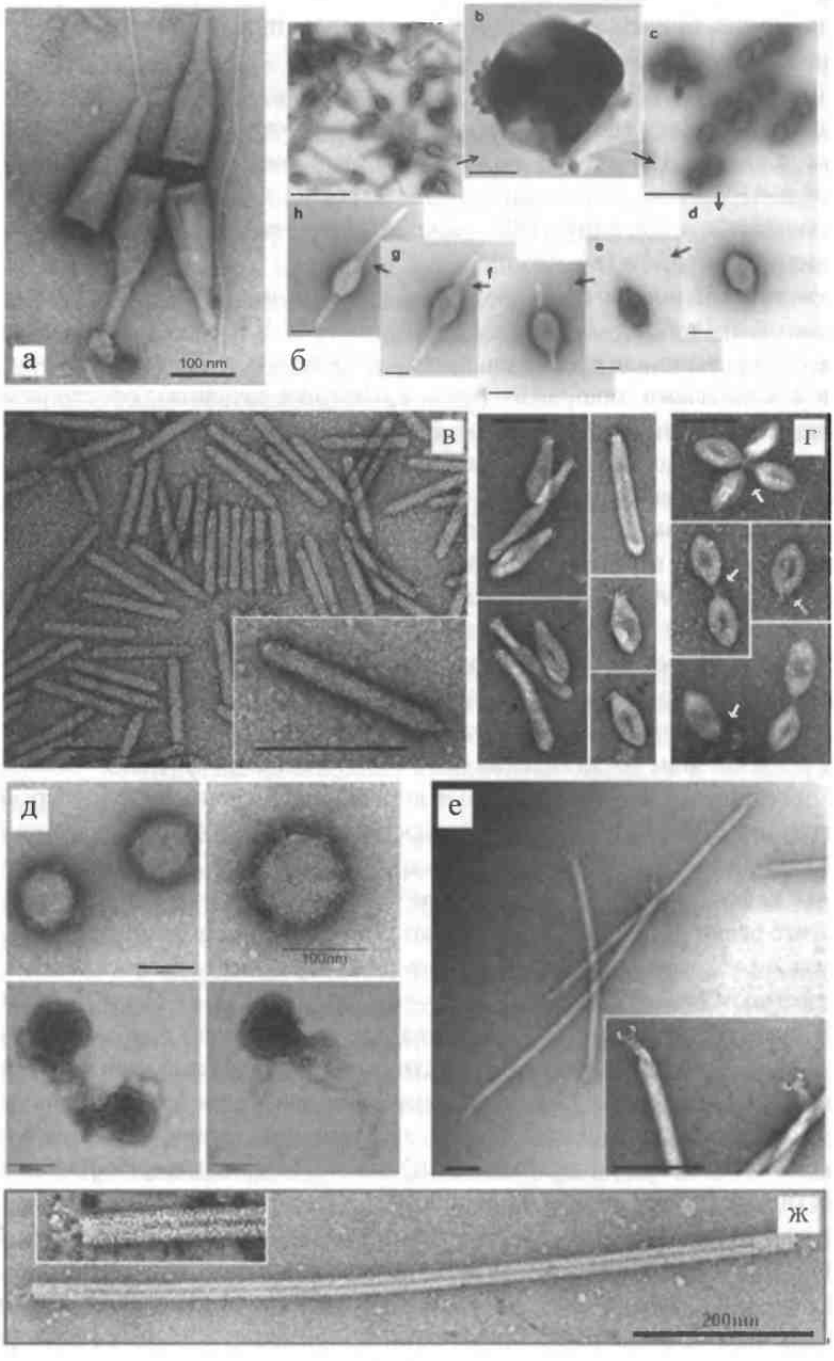
Помимо вируса ABV из той же культуры были выделены еще три новых вируса — ATV и AFV2, принадлежащие, соответственно, к семействам «*Bicaudoviridae*» и *Lipothrixviridae*, а также вирус ARV1 (сокр. *Acidianus rod-shaped virus 1*), относящийся к семейству *Rudiviridae* (см. ниже).

Семейство «*Bicaudoviridae*» (лат. bi — двойной и cauda — хвост) (рис. 53, б). Единственный представитель данного семейства — ATV (сокр. от *Acidianus two-tailed virus*) имеет веретеновидную (лимоновидную) форму и снабжен биполярными отростками с концевыми «якорями» (англ. anchor-like structure), обеспечивающими адсорбцию вириона на клетке-хозяине. Это единственный литический вирус среди вирусов ацидофильных гипертермофильных архей.

Вирус ATV обладает уникальной способностью к автономному морфогенетическому превращению на внеклеточной стадии онтогенеза. В момент выхода из клетки-хозяина вирион имеет веретеновидную (лимоновидную) форму (250–300×110–120 нм). Затем заостренные полюса вириона вытягиваются в «хвосты», один длиннее другого. Одновременно с этим тело вириона сжимается до размера 100×70–100 нм, хотя его окончательная длина, с учетом длины хвостов, может составить 1 мкм. Этот морфогенетический процесс не нуждается в экзогенном источнике энергии и может протекать даже в дистиллированной воде; единственное условие — температура не должна выходить за пределы зоны роста хозяина (65–96°C). Недавно показано, что за конформационное превращение вириона отвечают вирусные шапероны p800 (суперсемейство промежуточных филаментов) и p618 (суперсемейство AAA-АТФаз), а также кошаперон p892, содержащий VWA-домен (сокр. от **v**on **W**illebrand (domain) **A**). Эти белки совместно с капсидными белками p387 и p653 взаимодействуют с вирусной ДНК. Характерно, что белки p618 и p892 отсутствуют у веретеновидного вируса STSV1 (вне семейства; см. ниже), единственный хвост которого образуется внутри клетки-хозяина.

Семейство «*Clavaviridae*» (лат. clava — булава) (рис. 53, в). Первый и пока единственный представитель данного семейства, вирус *Aeropyrum pernix bacilliform virus 1* (APBV1), выделен в 2009 г. из горячего источника Ямагава (кальдера Ата, п-ов Сацума, префектура Кагосима, о. Сикоку, Япония) международной группой вирусологов во главе с Давидом Прангишвили. Хозяин, экстремально термофильный археот *Aeropyrum pernix* (семейство *Desulfurococcaceae*), является самым термофильным среди всех известных аэробов (оптимум роста 90°C).

Вирион вируса APBV1 имеет форму палочки (140×20 нм), один конец которой заострен, а другой закруглен. Геном этого вируса, представленный кольцевой dsДНК, самый маленький среди геномов известных вирусов архей (5278 п.н.). Он содержит 14 генов, расположенных на одной из нитей; ни один из них не имеет гомолога в базах данных. Капсид состоит из сильно гликозилированного главного белка (~10 кДа) и трех минорных белков (11, 12 и 23 кДа).


а
100 nm
б
b
c
h
g
f
e
d
в
г
д
100nm
е
ж
200nm

Вирус APBV1 не вызывает лизис клеток хозяина и не тормозит его рост. Интеграция в хозяйскую хромосому не наблюдается; скорее всего, инфекция является персистентной.

Семейство *Fuselloviridae* (лат. fusus — веретено) (рис. 53, г). Большинство веретеновидных фузелловирусов содержит кольцевую dsДНК (~15 тыс п.н.) и содержит ген интеразы, что позволяет им встраиваться в хромосому хозяина — *Sulfolobus* sp.

Типовым видом семейства и одновременно с этим наиболее изученным вирусом кренархеотов является умеренный фаг SSV1 (сокр. от ***Sulfolobus spindle-shaped virus type 1***), обнаруженный в 1984 г. группой Вольфрама Циллига в накопительной культуре *S. shibatae* из микробной коллекции университета г. Беппу (о-в Кюсю, Япония). Он имеет веретеновидную форму (60×90 нм); на одном из его полюсов находится короткий хвостовой отросток с нитями, которые обеспечивают его прикрепление к поверхности клетки-хозяина. Сборка и отпочкование вириона происходят на цитоплазматической мембране. Образование свободных частиц вируса SSV1 индуцируется УФ-облучением и не связано с лизисом клетки.

Вирус SSV1 содержит кольцевую dsДНК (15,5 тыс. п.н.). В его геноме имеется 35 ORF, большинство которых (75%) не имеет гомолога в базах данных. Четыре ORF аннотированы (кодируют интеразу и три структурных белка вириона). Помимо встроенной в хромосому хозяина геномной копии в клетке присутствуют положительно или отрицательно суперспирализованные эписомы (предполагают, что интегрированная копия используется при транскрипции, отрицательно суперспирализованная служит для репликации, а положительно суперспирализованная копия инкапсидируется). Сведений о стратегии генома вируса SSV1 еще крайне мало; выявлены и картированы 6 промоторов разной силы, с которых считываются 4 аннотированных и 5 неаннотированных транскриптов.

Рис. 53. Вирусы архей (фотографии любезно предоставлены Dr. D. Prangishvili, Institut Pasteur, France).

а — вирус *Acidianus bottle-shaped virus* (ABV, семейство «*Ampullaviridae*»; масштаб — 100 нм); б — вирус *Acidianus two-tailed virus* (ATV, семейство «*Bicaudaviridae*»; a — зрелые частицы с двумя «хвостами», масштаб — 500 нм; b, c — лимоновидные частицы, выходящие из клетки, масштаб — 500 нм; d–h — формирование «хвостов», масштаб — 100 нм); в — вирус *Aeropyrum pernix bacilliform virus* (APBV1, семейство «*Clavaviridae*»; масштаб — 100 нм); в, вставка — то же (крупным планом; масштаб — 100 нм); г, левый блок — *Sulfolobus spindle-shaped virus* SSV6 (семейство «*Fuselloviridae*; черные стрелки — толстые нити, образующие корону на конце вириона; масштаб — 200 нм); г, правый блок — *Sulfolobus spindle-shaped virus* SSV7 (семейство «*Fuselloviridae*; белые стрелки — тонкие нити на заостренном конце вириона; масштаб — 200 нм); д, верхний ряд — вирус *Pyrobaculum spherical virus* (PSV, семейство *Globuloviridae*; вирионы со сферическими поверхностными выступами; масштаб — 100 нм); д, нижний ряд — то же (выход нуклеопротеина из поврежденного капсида; масштаб — 100 нм); е — вирус *Acidianus filamentous virus 3* (AFV3, семейство *Lipothrixviridae*; масштаб — 100 нм); е, вставка — то же (терминальные клещевидные структуры; масштаб — 100 нм); ж — вирус *Sulfolobus islandicus rod-shaped virus* (SIRV1, семейство *Rudiviridae*; масштаб — 200 нм); ж, вставка — то же (крупным планом концевая пробка с тремя нитями; масштаб — 200 нм).

Помимо вируса SSV1 описано еще несколько фузелловирусов — SSV2, SSV-K1 (сокр. от *Sulfolobus spindle-shaped virus-Kamchatka 1*), SSV-Y1 (сокр. *Sulfolobus spindle-shaped virus-Yellowstone 1*), а также SSV5, SSV6 и SSV7.

Семейство «*Globuloviridae*» (лат. globules — шарик) (рис. 53, д). Первый представитель данного семейства — вирус PSV (сокр. от *Pyrobaculum spherical virus*), был описан в 2004 г. группой Давида Прангишвили. Материалом для его выделения послужил фильтрат смешанной культуры гипертермофильных бактерий и архей (85°C), полученной из Обсидианового пруда на территории Йеллоустоунского национального парка (штат Вайоминг, США). Вирус PSV репродуцируется в клетках *Pyrobaculum* sp. D11 и *Thermoproteus tenax*. Шаровидные вирионы диаметром 100 нм несут на наружной поверхности сферические выступы диаметром 15 нм, функция которых не установлена. Молекулярная структура вируса PSV во многом уникальна. Как показал анализ частично разрушенных вирионов, у них имеется протеолипидный суперкапсид (часть липидов вирусоспецифична и, по-видимому им детерминируется). Нуклеокапсид вируса PSV суперспирализован; для ДНК-содержащих фагов это единственный известный случай (обычно такое встречается только у ssРНК-содержащих вирусов животных, в частности у представителей семейства *Paramyxoviridae*). Линейная dsДНК ковалентно замкнута на концах. По контрасту с другими вирусами архей, содержащими линейную dsДНК, и по аналогии с клававирусами почти все гены расположены на одной из нитей. Согласно результатам секвенирования генома (28,3 тыс. п.н.) ни один из генов вируса PSV не обнаруживает явно выраженного сходства с генами остальных вирусов архей. Продуктивная инфекция не связана с разрушением клеточной мембраны и лизисом хозяина, т. е. она носит персистентный характер (носительство вируса).

В 2006 г. был описан второй представитель семейства «*Globuloviridae*» — вирус TTSV1 (сокр. от *Thermoproteus tenax spherical virus 1*). Вместе с хозяином, гипертермофилом *T. tenax*, он был выделен сеульской группой исследователей (Южная Корея) из горячего источника в Индонезии. Линейный геном этого вируса (dsДНК; 21,6 тыс. п.н.) содержит 38 ORF, из которых 15 сходны с таковыми у вируса PSV; остальные три ORF не имеют гомологов в базах данных. В состав вириона входят три структурных белка молекулярной массой 10, 20 и 35 кДа. Вирус TTSV1 не интегрируется в хромосому хозяина и вызывает у него персистентную инфекцию.

Семейство *Guttaviridae* (лат. gutta — капля). Единственный представитель данного семейства — каплевидный вирус SNDV (сокр. от *Sulfolobus neozealandicus droplet-shaped virus*), был обнаружен в 2000 г. в Новой Зеландии группой Вольфрама Циллига.

У вириона вируса SNDV ячеистая поверхность; на заостренном конце его находятся многочисленные хвостовые нити, возможно выполняющие прикрепительную функцию.

Вирус SNDV содержит кольцевую dsДНК (20 тыс. п.н.), в которой цитозин модифицирован в ходе метилирования; для вирусов *Crenarchaeota* это пока единственный описанный случай (аналогичная модификация наблюдается у галофагов φCh1 и φN).

Вирус SNDV не интегрируется в хромосому и находится в состоянии носительства (персистирует) в клетке-хозяине.

Семейство *Lipothrixviridae* (греч. liparos — толстый и trichos — волос) (рис. 53, е). Липотриксвирусы по форме напоминают гибкую нить и покрыты липидной оболоч-

кой. Это самое большое семейство вирусов архей, объединяющее четыре рода: *Alphalipothrixvirus*, *Betalipothrixvirus*, *Gammalipothrixvirus* и *Deltalipothrixvirus*. Основу родовых различий составляют особенности генома, а также строение нуклеокапсида и терминальных структур вириона.

Все липотриксвирусы содержат линейную ДНК (15,6–27 тыс. п.н.). В отличие от вирусов с кольцевым геномом, у них нет гена интеразы и поэтому они не могут встраиваться в хромосому, хотя стабильно персистируют в клетке-хозяине (за исключением умеренного фага TTV1).

В настоящее время описаны липотриксвирусы TTV1–3 (сокр. от ***Thermoproteus tenax virus 3***), SIFV (сокр. от ***Sulfolobus islandicus filamentous virus***) и AFV1–9 (сокр. от ***Acidianus filamentous virus 1–9***). Вирус TTV-4, как уже отмечалось, вынесен за пределы данного семейства.

Вирусы TTV1–4 были обнаружены группой Вольфрама Циллига в 1983 г. в Исландии, а вирус SIFV — теми же исследователями и там же в 2000 г. Согласно результатам ДНК–ДНК гибридизации они не обладают взаимным сходством нуклеотидных последовательностей. Оболочные вирусы TTV1–TTV4 различаются по морфологии, а также по молекулярному составу нуклеокапсида и суперкапсида; среди них охарактеризован только вирус TTV1.

Вирус TTV1 (род *Alphalipothrixvirus*) является умеренным фагом и индуцируется при истощении запасов серы в культуральной среде. Его вирион имеет форму жесткой палочки (400×40 нм) с закругленными выступами на концах. Суперкапсид толщиной 8 нм состоит из примерно равного количества археотных липидов-тетраэфиров и вирусоспецифичных белков. Линейная dsДНК (16 тыс. п.н.) в комплексе с двумя катионными белками образует кор вириона, окруженный двойной липидной оболочкой.

У умеренных вирусов TTV2 и TTV3 (род *Betalipothrixvirus*) гибкие нитевидные вирионы состоят из линейной ДНК, окруженной спиральным капсидом, а также билипидным суперкапсидом клеточного происхождения. В отличие от вирусов TTV1–TTV3, фаг TTV4 высоковирулентен и вызывает быстрый лизис клетки-хозяина.

У вируса SIFV (род *Betalipothrixvirus*) гибкий спиральный капсид (2000×24 нм), окруженный суперкапсидом с концевыми мутовками из шести тонких хвостовых нитей (англ. mop-like structure). Возможно, они играют роль прикрепительных структур. Этот вирус не вызывает лизис, не интегрируется в хромосому и, по-видимому, поддерживается в хозяйской клетке в нестабильном персистентном состоянии. Он содержит линейную dsДНК; до 90% генома (41–43 тыс. п.н.) составляют ORF средним размером 500 п.н.

Вирус AFV1 (род *Gammalipothrixvirus*), хозяином которого служит *Acidianus* sp., обнаружен в горячем источнике Йеллоустоунского национального парка группой Давида Прангишвили в 2003 г. Его нитчатый оболочный вирион имеет размер 900×24 нм, состоит из линейной dsДНК (20,8 тыс. п.н.) и, по меньшей мере, пяти белков молекулярной массой 23–130 кДа. На концах вириона расположены клещевидные структуры (англ. claw-like terminal structure) диаметром 20 нм, которые захватывают вирусные рецепторы на фимбриях клетки-хозяина. В вирусном геноме выявлено около 40 ORF, 32 из которых сходны с таковыми вируса SIFV (род *Betalipothrixvirus*),

и рудивирусов SIRV1 и SIRV2 (см. ниже). Инфекция носит персистентный характер (стабильное носительство).

Вирус AFV2 (род *Deltalipothrixvirus*), описанный группой Давида Прангишвили в 2005 г., содержит линейную dsДНК (31,7 тыс. п.н.). Его гибкий оболочный вирион имеет размер 1100×24 нм. На обоих концах находятся клещевидные структуры, аналогичные имеющимся у вируса AFV1.

Вирусы AFV3, AFV6 и AFV8–9 (род *Betalipothrixvirus*), открытые группой Давида Прангишвили в 2008 г., содержат линейную dsДНК (37–41 тыс. п.н.). Вирион детально изученного вируса AFV3 представляет собой длинную гибкую нить (2000×24 нм) с оболочкой толщиной 3 нм. На его концах расположены клещевидные структуры — у вируса AFV3, или «воротнички» с двумя рядами нитей, напоминающие ершик для мытья посуды (англ. bottlebrush structure) — у вирусов AFV6, AFV8 и AFV9.

Семейство *Rudiviridae* (лат. rudis — тонкая палочка) (рис. 53, ж). К настоящему времени обнаружены и охарактеризованы четыре представителя данного семейства. Вирусы SIRV1 и SIRV2 (сокр. от ***Sulfolobus islandicus rod-shaped virus 1 and 2***) инфицируют штаммы *Sulfolobus islandicus*; вирус ARV1 (сокр. от ***Acidianus rod-shaped virus 1***) размножается на штаммах *Acidianus* sp.; хозяином недавно обнаруженного вируса SRV (сокр. от ***Stygiolobus rod-shaped virus***) является *Stygiolobus* sp.

Рудивирусы SIRV1 и SIRV2 были выделены в 1999 г. в Исландии группой Вольфрама Циллига. По частоте встречаемости и степени изученности они занимают второе место среди вирусов *Crenarchaeota* (после *Fuselloviridae*). Безоболочные вирионы этих вирусов имеют форму жесткой палочки (23×600–900 нм) и внешне напоминают ssРНК-содержащих вирусов сосудистых растений, в частности тобамовирусов. Однако, в отличие от последних, на концах жесткого цилиндрического капсида рудивируса имеются «пробки» (50 нм) с тремя нитями, служащими для адсорбции; тем не менее образование вирионов вируса SIRV1 не индуцируется УФ-облучением или обработкой митомицином С, и он не вызывает лизиса клеток хозяина. Вирусы SIRV1 и SIRV2 содержат линейную dsДНК (35–36 тыс. п.н.) с длинными терминальными инвертированными повторами (англ. inverted terminal repeat, ITR) и ковалентно замкнутыми концевыми шпильками. Такая структура (напоминающая теломеры линейных хромосом у эукариотов) обеспечивает репликацию путем «автопраймирования» — введения однонитевых разрезов внутри ITR, образования интермедиатов типа «голова к голове» и «хвост к хвосту» с последующим превращением геномных конкатемеров в мономеры с помощью кодируемой вирусом резольвазы хиазмы Холлидея. Согласно результатам молекулярного секвенирования геномы вирусов SIRV1 и SIRV2 содержат 45 и 54 ORF (55–1070 а.о.), соответственно. Из них 21 ORF проявляет отдаленное сходство с генами ДНК-содержащих вирусов ядерных организмов; в частности, восемь ORF сходны с генами *Amsacta mooreii pox virus* (сем. *Poxviridae*), семь ORF — с генами *African swine fever virus* (сем. *Asfarviridae*) и *Paramecium bursaria-Chlorella virus PBCV-1* (сем. *Phycodnaviridae*).

Рудивирус ARV1 был выделен в 2005 г. группой Давида Прангишвили из горячего источника в окрестностях г. Поццуоли (Италия). В составе жесткого нуклеокапсида, имеющего форму палочки (610×22 нм) с тремя длинными хвостовыми нитями на каждом конце, выявлены два белка — гликозилированный капсомерный белок (14,4 кДа)

и минорный белок (24 кДа) неизвестной функции. Линейная dsДНК (24,7 тыс. п.н.) содержит концевые инвертированные повторы длиной 1365 н. В геноме этого вируса идентифицированы гены структурных и ДНК-связывающих белков, а также гены резольвазы и тимидилатсинтазы. Несмотря на морфологическое сходство с вирусами группы SIRV, вирус ARV1 существенно отличается от них в генетическом плане.

Вирус SRV выделен в 2008 г. группой Давида Прангишвили из горячего кислотного источника (93°C, pH 2) на Азорских о-вах (Португалия). По морфологии и в генетическом отношении он существенно отличается от вирусов SIRV1, SIRV2 и ARV1. Его безоболочный вирион имеет форму гибкой палочки (700×22 нм) и на концах несет по три коротких хвостовых нити. Геномная dsДНК (28 тыс. п.н.) содержит характерные для рудивирусов терминальные инвертированные повторы длиной 1 тыс. п.н.

«Линейные» липотриксвирусы и рудивирусы имеют до 25% ортологов, в числе которых — гены гликозилтрансфераз (осуществляющих посттранскрипционную модификацию структурных белков) и гены транскрипционных факторов. Это дало основание объединить указанные семейства в новый порядок *«Ligamenvirales»* (лат. ligament — нить).

Вирусы STIV и STIV2 (вне семейства). Первый представитель вирусов архей с икосаэдрическим типом симметрии — STIV (сокр. от ***Sulfolobus turreted icosahedral virus***), был обнаружен в 2004 г. группой Марка Янга (M. Young) в кислотном горячем источнике (pH 3–4; 72–92°C) на территории Йеллоустоунского национального парка.

Капсид вируса STIV, образованный четырьмя типами капсомеров (молекулярная масса главного из них — 37 кДа), имеет две характерные особенности. Во-первых, это отраженные в видовом названии уникальные башнеобразные выросты-турели (англ. turret — турель, орудийная стойка), которые расположены на вершинах икосаэдрического капсида и, по-видимому, участвуют в адсорбции вируса и интернализации геномной ДНК. Во-вторых, это два электроноплотных липидных слоя, лежащих между капсидом и упакованной ДНК; интересно, что аналогичные слои имеются у бактериофага PRD1 (сем. *Tectiviridae*), вируса PBCV-1 (***Paramecium bursaria Chlorella virus 1***) и галофага SH1. Геном вируса STIV (кольцевая ДНК; 17,7 тыс. п.н.) содержит 36 ORF, из которых только четыре аннотированы. Среди них главный белок капсида B345, обладающий структурным сходством с главными капсидными белками бактериофага PRD1, а также вируса хлореллы PBCV-1 и аденовируса. Этот примечательный факт может свидетельствовать в пользу существования общего предка у разных dsДНК-вирусов, инфицирующих представителей трех доменов глобального филогенетического древа.

Вирус STIV2, выделенный в 2006 г. из кислотного горячего источника (pH 3,5; 88°C) в Исландии и описанный в 2010 г. международной группой исследователей под руководством Сары Батчер (S. Butcher), морфологически и по структуре генома чрезвычайно похож на вируса STIV. Его геном (кольцевая ДНК; 16,2 тыс. п.н.) содержит 64 ORF. Две OFR из 34 предполагаемых генов, кодирующих структурные белки, уникальны. Различие между вирусами STIV и STIV2 в основном связано с деталями строения турели и проявляется в эффективности распознавания клетки-хозяина.

Вирус STSV1 (вне семейства). Веретеновидный вирус STSV1 (сокр. от ***Sulfolobus tengchohgensis spindle-shaped virus 1***) — один из самых крупных веретеновидных ви-

русов (230×170 нм). Он также обладает одним из самых больших вирусных геномов (75,3 тыс. п.н.) и содержит 74 ORF, из которых только 14 аннотированы (5 кодируют структурные белки, 9 — компоненты системы биосинтеза нуклеотидов, ДНК и полисахаридов). На одном конце веретеновидного тела вириона имеется «хвост», длина которого составляет в среднем 70 нм.

Вирус STSV1 быстро размножается, образуя потомство с высоким титром (>10^{10} частиц·мл$^{-1}$), однако их выход не сопровождается лизисом клетки. Он не интегрируется в хромосому хозяина, и его можно рассматривать как фага, вызывающего персистентную инфекцию.

В заключение раздела следует отметить, что изучение вирусов архей, по сути, находится на этапе первичного сбора информации, и многое о них еще предстоит узнать. Остается «черным ящиком» их онтогенез; не выяснены его ключевые этапы: прикрепление, проникновение, репликация, сборка и выход из клетки.

Археи морфологически и функционально мимикрируют под бактерий, однако отличаются от них по составу (над)молекулярных структур, в частности по строению таких периферических барьеров, как цитоплазматическая мембрана и клеточная стенка.

Хотя во многих случаях вирусы архей проявляют морфологическое сходство с бактериофагами, они адаптированы к экстремальной среде, где обитают хозяева. Поэтому неудивительно, что мы еще так мало знаем о специфике взаимодействия между археями и их вирусами — ведь все, что известно о системе бактериофаг/бактерия, нельзя механически переносить на такую нетривиальную симбиотическую систему.

Рекомендуемая литература

Dyall-Smith M., Tang S.-L., Bath C. Haloarchaeal viruses: how diverse are they? // Res. Microbiol. 2003. Vol. 154. P. 309–313.

Prangishvili D., Garrett R. A. Viruses of hyperthermophilic crenarchaea // Trends Microbiol. 2005. Vol. 13. P. 535–542.

Le Romancer M., Gaillard M., Geslin C. et al. Viruses in extreme environments // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2007. Vol. 6. P. 17–31.

Snyder J. C., Stedman K., Rice G. et al. Viruses of hyperthermophilic archaea // Res. Microbiol. 2003. Vol. 154. P. 474–482.

ГЛАВА 4

ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ, ГРИБОВ И ВОДОРОСЛЕЙ

Протисты, или имеющие ядро одноклеточные организмы, богато представлены на эволюционном древе — по разным версиям образуют 30–40 ветвей (фил). Они обладают разнообразными генетическими и эколого-физиологическими свойствами и служат важным функциональным звеном почти любой экосистемы. Среди них можно встретить сравнительно мало изменившихся потомков предковых форм микроорганизмов; на их примере можно проследить важнейшие этапы эволюции структур и функций живой клетки.

По традиции подразумевается, что протисты в узком смысле слова (Protozoa, ~30 тыс. видов) питаются фаготрофным способом. Однако в современных таксономических системах к протистам в широком смысле слова (Protista) относят и одноклеточных ядерных организмов с другими типами питания — осмотрофным (что характерно для грибов) и фотосинтетическим (что свойственно растениям); примерами служат, соответственно, *Saccharomyces* и *Chlorella*. Не вступая в дискуссию, мы будем придерживаться традиционной классификации.

Грибы, в том числе одноклеточные, морфологически гетерогенны и демонстрируют разные паттерны онтогенеза (~70 тыс. видов).

Водоросли, среди которых много одноклеточных, также богаты представителями (~30 тыс. видов); они различаются по морфологии и способам размножения.

На фоне разнообразия протистов, грибов и водорослей сведения об их вирусах крайне скудны и не идут в сравнение с тем, что известно о бактериофагах, вирусах растений и животных, — официально зарегистрировано лишь 26 родов, относящихся к 13 семействам. Важной (но не единственной) причиной того, что мы так мало знаем о вирусах протистов, грибов и водорослей, служит бессимптомный характер вызываемой ими инфекции. В частности, вирусы грибов обнаруживаются в основном случайно при ультраструктурном или молекулярно-генетическом исследовании их хозяев.

Многие вирусы протистов, грибов и водорослей обладают перекрестным промискуитетом и способны инфицировать представителей нескольких групп хозяев; поэтому мы рассматриваем их совместно, а не в отдельных главах.

4.1. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ И ВОДОРОСЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ dsДНК

У некоторых вирусов протистов и водорослей геном представляет собой линейную dsДНК. Эти вирусы относятся к двум семействам — *Mimiviridae и Phycodnaviridae.*

4.1.1. СЕМЕЙСТВО *MIMIVIRIDAE*

Представители данного семейства — это крупные нефильтрующиеся и медленно размножающиеся вирусы, что долго не позволяло выявить их традиционными вирусологическими методами. В то же время, как показывает метагеномный анализ образцов воды из разных областей Мирового океана, биоразнообразие семейства *Mimiviridae* может оказаться весьма значительным. В частности, для 43% генов «ядра» генома мимивирусов обнаружены близкие гомологи в базе данных, составленной по результатам секвенирования анонимных последовательностей ДНК из планктона Саргассова моря; вероятно, основными хозяевами этих вирусов служат морские водоросли.

Вместе с вирусом натуральной оспы (сем. *Poxviridae*) и хлоровирусами (сем. *Phycodnaviridae*) мимивирусы принадлежат к группе NCLDV (сокр. от англ. **n**ucleo-**c**yto-plasmic **l**arge **D**NA **v**iruses), которые имеют многослойную оболочку и геном в 200–300 тыс. п.н. и даже 1200 тыс. п.н. Из-за особо крупного размера их еще называют ***гирусами*** (сокр. англ. **gi**gantic vi**rus**).

Род *Mimivirus*. Первый представитель семейства *Mimiviridae*, избирательно инфицирующий несколько видов амеб рода *Acanthamoeba*, был случайно открыт в 2003 г.

При исследовании *Legionella*-подобных бактерий, эндосимбионтов амебы *A. polyphaga*, один из изолятов не удавалось идентифицировать несмотря на то, что он положительно окрашивался по Граму. При тщательном изучении такой «бактерии», имевшей размер >0,5 мкм (что превышает размер эндосимбиотических бактерий, патогенных для человека), оказалось, что за нее принимали очень крупного вируса. Из-за внешнего сходства с микроорганизмом его назвали ***мимивирусом*** (mimivirus; сокр. англ. **mi**crobe **mi**micking **virus** — вирус, мимикрирующий под микроба).

У вириона мимивируса икосаэдрический капсид имеет диаметр около 500 нм; внутри него находится мембранная везикула, в которую, в свою очередь, упакован геном. Поверхность капсида равномерно покрыта фибриллярным слоем толщиной 140 нм, что является уникальной чертой вирусов семейства *Mimiviridae* (рис. 54). Таким образом, вирион представляет собой структуру размером ~750 нм, и его, в отличие от вирионов обычных вирусов, можно наблюдать под световым микроскопом.

В геноме мимивируса закодировано несколько гликозилтрансфераз. Они участвуют в образовании фибриллярного слоя, аналогичного гликану в составе муреина клеточной стенки грамположительных бактерий, стимулирующему фагоцитоз и везикулярный транспорт у амеб. Этот слой, присутствием которого объясняется положительное окрашивание по Граму, по-видимому, позволяет вирусу мимикрировать под бактерий, обычную пищу амеб. После слияния фагосомы с лизосомами он разрушается, что позволяет капсиду раскрыться, и внутренняя мембрана вириона сливается с мембраной фаголизосомы.

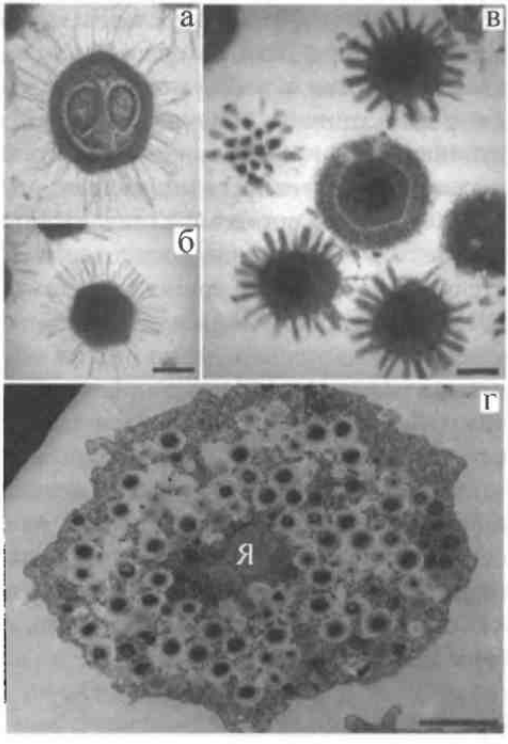


Рис. 54. Мимивирус (фотографии любезно предоставлены Prof. D. Raoult, Université de la Méditerranée, France).

а и б — ультратонкие срезы вириона (масштаб — 200 нм); в — криоэлектронный препарат вирионов (масштаб — 200 нм); г — ультратонкий срез клетки *Acanthamoeba polyphaga*, содержащей крупные частицы мимивируса в окружении мелких частиц вирофага *Sputnik*, 10–12 ч после инфицирования (масштаб — 2 мкм).

Я — клеточное ядро.

Вирион мимивируса содержит 12 белков системы транскрипции, что дает ему возможность самостоятельно транскрибировать ранние гены (таким образом, в состав частицы входит не только ДНК, но и РНК). После интернализации реплицирующихся вирионов вокруг них формируются «вирусные фабрики» (англ. virus factory, VF) — динамичные центры, в которых экспрессируются поздние гены и осуществляется сборка вирусного потомства.

Первые 4 ч инфицирования приходятся на эклипс-период; еще через 2–5 ч на периферии сборочных фабрик появляются прокапсиды, не имеющие фибриллярного наружного слоя. Через 14 ч после начала инфекции вирионы выходят во внешнюю среду в результате лизиса клетки хозяина (урожай ~300 частиц на клетку).

Геном мимивируса имеет размер 1200 тыс. п.н. (что на порядок больше среднего размера генома ДНК-содержащих вирусов) и кодирует 910 белков, а также 6 разновидностей тРНК. Хотя высокое содержание АТ-пар (72%) не рекордное для вирусов, оно обусловливает сдвиг в аминокислотном составе белков — относительное содержание аминокислот, кодоны которых не содержат А или Т, минимально. Как и у остальных вирусов группы NCLDV, до 90% генома приходится на кодирующие последовательности. Таким образом, «огромный» размер генома этих вирусов (в 2,5 раза больше минимального генома микоплазм) не является следствием накопления некодирующей ДНК.

На флангах геномной последовательности мимивируса расположены инвертированные повторы размером до 617 п.н. каждый. При спаривании по принципу комплементарности они могут образовывать Q-подобную структуру, что крайне важно для репликации. До 33% генов имеют хотя бы по одному паралогу вследствие генной дупликации. В то же время вклад горизонтального переноса генов в увеличение размера генома мимивируса минимален — доля чужеродных генов не превышает 10%.

Как показал протеомный анализ, вирион мимивируса содержит не менее 114 разных белков собственного кодирования. Продукты 36 кодирующих последовательностей не встречаются у других вирусов: 1) полный набор белков системы репарации ДНК; 2) три топоизомеразы; 3) ферменты метаболизма нуклеотидов, аминокислот, углеводов и липидов; 4) десять белков, имеющих отношение к трансляции, в том числе четыре аминоацил-тРНК-трансферазы, три фактора трансляции и кэп-связывающий белок. Тем не менее мимивирус не кодирует рибосомные белки и полностью зависит от аппарата трансляции, а также от энергетического метаболизма хозяина. Это отчасти размывает границу между клетками и вирусами, ранее казавшуюся столь четкой, но кардинально отличает его от облигатных паразитических внутриклеточных бактерий. На основе данных, полученных в результате секвенирования генома мимивируса, некоторые авторы предполагают, что группу NCLDV можно рассматривать как отдельную ветвь глобального древа, и что у нее был общий предок с эукариотами (рис. 55).

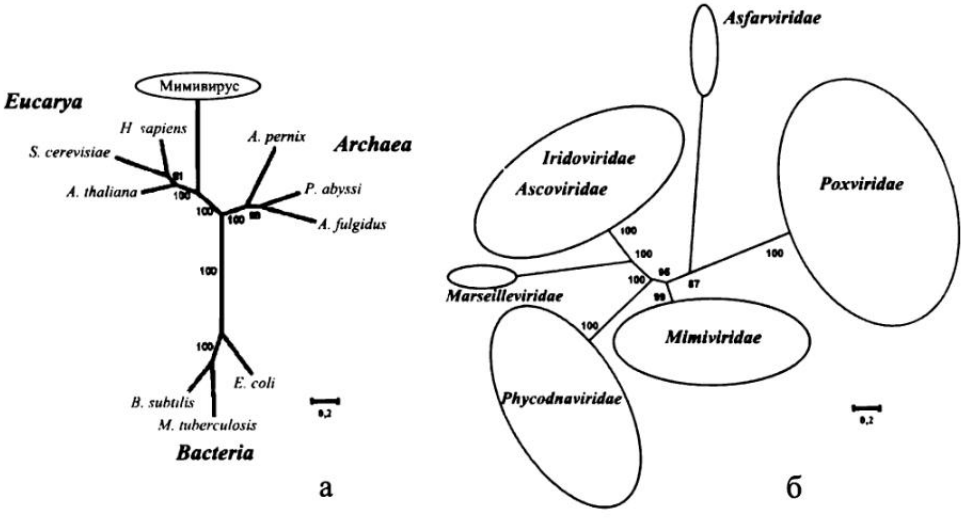


Рис. 55. Филогенетическое положение мимивирусов.

а — дендрограмма, результат сравнительного анализа аминокислотных последовательностей 7 консервативных универсальных белков (по: Raoult *et al.*, 2004); б — древо больших ядерно-цитоплазматических вирусов (NCLDV), результат сравнительного анализа генов ДНК-полимеразы, праймазы-геликазы, упаковочной АТФазы и A2L-подобного транскрипционного фактора (по: Colson *et al.*, 2011).

Цифры — статистическая достоверность (англ. bootstrap value) очередности ветвления, %.

Масштаб — 0,2 замены на сайт.

Недавно обнаружен еще один «гигантский» ДНК-содержащий мимивирус — CroV (сокр. от *Cafeteria roenbergensis virus*) — литический вирус, инфицирующий широко распространенного морского фаготрофного жгутиконосца *Cafeteria roenbergensis*. Его геном имеет размер 730 тыс. п.н. (544 ORF), т.е. это второй по величине вирусный геном. Анализ ортологов показал, что вирус CroV, вероятнее всего, принадлежит к отдельному подсемейству и соответствует рано дивергировавшей ветви филогенетического кластера мимивирусов. У вируса CroV выявлен ряд генов, сходных с генами других представителей группы NCLDV, а также аннотированы гены бактериального, археотного и эукариотного происхождения.

Открытие взаимно родственных вирусов у таких сильно дистанцированных объектов, как пресноводные амебы и морские жгутиконосцы, позволяет предположить, что может заражаться и более широкий круг хозяев. Косвенным подтверждением этого служит простая стратегия инфекции — мимикрия под пищевых бактерий, которая избавляет вируса от необходимости проявлять специфическое сродство к клеточным рецепторам разных хозяев; вполне достаточно способности последних к фагоцитозу.

Хозяевами вирусов группы NCLDV могут быть также губки, в клетках которых обнаружены включения, внешне напоминающие вирусные фабрики, а также восьмилучевые кораллы-горгонарии, митохондрии которых содержат ген *mutS* (ген бактериальной системы репарации ДНК), сходный с одним из генов вирусов рода *Mimivirus*, а также вируса CroV. Хотя данный ген не характерен для геномов митохондрий, его гомологи обнаружены у протеобактерий *Arcobacter*, *Nitratiruptor* и *Sulfurimonas*, которые вступают в симбиотические отношения с глубоководными беспозвоночными. Такая тройственная гомология скорее всего объясняется горизонтальным переносом гена *mutS* между симбиотическими бактериями и митохондриями (с помощью вируса, предка современных представителей сем. *Mimiviridae*). У горгонарий имеются клетки, способные к фагоцитозу, что согласуется с таким сценарием.

Вскоре после открытия мимивируса были обнаружены еще два родственных ему вируса — *Mamavirus* и *Marseillevirus*.

Род *Mamavirus*. В клетках амебы *A. polyphaga*, выделенной из образцов воды системы водоснабжения г. Марселя, были выявлены вирусные частицы, морфологически сходные с мимивирусами, однако еще более крупного размера. Их поместили в то же семейство, но дали им родовое название *Mamavirus* (сокр. ***Marseille macrovirus***).

Род *Marseillevirus*. Вирусы рода *Marseillevirus* образуют икосаэдрический капсид и мембранный нуклеокапсид, на поверхности которого находятся фибриллы диаметром 12 нм. В составе капсида насчитывается, как минимум, 49 разных белков.

Геном марселевируса имеет размер 368454 п.н. (457 ORF); в нем присутствуют гены гистоноподобных белков, участвующие в упаковке вирусной ДНК, что довольно редко встречается у вирусов: другими примерами служат аденовирус типа 5 (сем. *Adenoviridae*), вирус ASFV (сем. *Asfarviridae*) и фаг ϕ29 (сем. *Podoviridae*). Как и многие гены марселевируса, они попали в его геном скорее всего путем горизонтального переноса от хозяина; часть из них могла быть также приобретена от бактерий, составлявших пищу амебы.

В геноме марселевируса выявлено 28 генов «ядра» генома вирусов группы NCLDV. Как показал филогенетический анализ шести из них, этот вирус может быть отнесен к новому семейству, близкому к иридовирусам и асковирусам.

Sputnik. Уникальной особенностью мамавируса служит то, что у него имеется мелкий (диаметром 50 нм) вирус-сателлит, частицы которого были выявлены в сборочных центрах в цитоплазме инфицированной амебы, а также в фибриллярном слое зрелых вирионов мамавируса. Этот вирус-сателлит получил название *Sputnik*; он может реплицироваться в амебе, если только одновременно с ним хозяина инфицирует мимивирус или мамавирус. По всей видимости, вирус *Sputnik* попадает в амебу одновременно со «старшим» вирусом благодаря физическому контакту с его фибриллярным слоем. Частицы вируса *Sputnik* и «старшего» вируса формируются на одних и тех же вирусных фабриках, хотя у первого из них процесс сборки протекает быстрее.

В вирионах вируса *Sputnik* содержится мРНК, что позволяет ему сразу же после проникновения приступить к экспрессии ранних генов. При совместной сборке у вирионов мамавируса наблюдаются морфологические отклонения: утолщается стенка капсида и появляются дополнительные слои оболочки; кроме того, на 70% снижается инфекционность и уменьшается литическая активность. Это позволяет предположить, что вирус *Sputnik* — не просто вирус-сателлит, сборка которого осуществляется в присутствии вируса-хелпера, а паразит мамавируса — ***вирофаг*** (англ. virophage).

Геном вирофага имеет размер 18343 п.н. (21 ORF) и представлен кольцевой dsДНК. Плотность кодирования высока, и гены частично перекрываются; молярный % АТ-пар идентичен таковому у мамавируса. Более половины генов (13 из 21) не обнаруживают гомолога в базах данных. У одного из них, гена интегразы, имеются высокогомологичные ортологи в геномах вирусов архей. Три гена идентичны ортологам в геномах мамавирусов и мимивирусов; это позволяет предположить, что при сборке на одних и тех же вирусных фабриках между ними происходит рекомбинация.

Таким образом, вирус *Sputnik* служит примером вируса-химеры. Его систематическое положение пока еще не ясно, однако предполагается, что он входит в группу NCLDV-подобных вирусов из морских и пресных водоемов. В пользу этого говорят результаты метагеномного анализа. На основе последовательностей ДНК, выделенной из проб воды одного из антарктических озер, удалось реконструировать геном «виртуального» вируса OLV (сокр. от англ. ***O**rganic **L**ake **v**irophage*); его гены оказались сходными с генами вируса *Sputnik*.

Удалось также реконструировать полноразмерный геном ранее неизвестного вида фиковирусов — OLPV (сокр. от англ. ***O**rganic **L**ake **p**hytovirus*), который скорее всего инфицирует празинофитные водоросли. Судя по наличию ортологов у вирусов OLV и OLPV, они в ходе эволюции могли обмениваться между собой генетическим материалом.

Присутствие вирофагов несомненно является фактором, ограничивающим вирусные инфекции микроскопических водорослей в бедных органикой полярных водоемах, что стабилизирует короткие пищевые цепи этих экосистем, косвенно повышая их продуктивность.

Mavirus. С вирусом CroV, инфицирующим жгутиконосца *C. roenbergensis*, ассоциирован вирофаг *Mavirus* (от названия класса транспозонов Maverick, которые сходны с геномом этого вируса и кодируют практически идентичную интегразу; в *свою очередь, название «Maverick», англ. — неортодоксальный, дано этим транспозонам из-за их уникальной способности кодировать ДНК-полимеразу PolB и уникального механизма репликации*).

Геном мавируса (19063 п.н.) содержит 20 кодирующих последовательностей; 10 из них не имеют гомолога в базах данных, а 4 гомологичны генам, найденным у вируса *Sputnik*. Все они используют промотор, почти идентичный промотору вируса CroV; это значит, что экспрессия генов мавируса находится под контролем транскрипционного аппарата «старшего» вируса.

В заключение необходимо еще раз подчеркнуть, что вирофаги, или ***вирусы-паразиты вирусов***, не имеют ядерной стадии в своем инфекционном цикле и размножаются в сборочных центрах «старшего» вируса, т.е. они, по сравнению с другими вирусами, меньше зависят от ферментативного аппарата клетки-хозяина (по сути дела, эксплуатируется лишь его аппарат трансляции).

Таким образом, ограничивая размножение «старших» вирусов, вирофаги выступают на стороне организма-хозяина и обеспечивают ему, а также себе селективное преимущество.

4.1.2. СЕМЕЙСТВО *PHYCODNAVIRIDAE*

Это архаичное и, несмотря на морфологическое единообразие, генетически гетерогенное семейство вирусов, инфицирующих водоросли. Они контролируют онтогенез и популяционные циклы своих хозяев, что во многом определяет масштаб их экологического значения. Тем более досадно, что выявлено всего 200 фиковирусов; геном секвенирован только у десяти из них и лишь единственный представитель этой группы (вирус PBCV-1) изучен более или менее подробно.

В настоящее время к семейству *Phycodnaviridae* относят 6 родов, названных в соответствии с родовыми именами хозяев: *Chlorovirus*, *Coccolithovirus*, *Phaeovirus*, *Prasinovirus*, *Prymnesiovirus* и *Raphidovirus*.

Род *Chlorovirus*. Вирусы рода *Chlorovirus*, в частности типовой вид — ***Paramecium bursaria Chlorella virus*** (PBCV), инфицируют одноклеточных зеленых водорослей рода *Chlorella*, как свободноживущих, так и вступающих в эндосимбиоз с инфузориями или гидрами.

Это литические вирусы, которые атакуют свободные клетки хлореллы и разрушают их в течение 12 ч после начала инфекции; в то же время заражения хлорелл, попавших в симбионтофорную вакуоль парамеции, не происходит.

Хлоровирусы в небольшой концентрации ($1–10^2$ PFU·мл$^{-1}$) неизменно присутствуют в пресных водоемах; их титр подвержен сезонным флуктуациям и достигает 10^5 PFU·мл$^{-1}$.

Род *Coccolithovirus*. Хозяином представителей рода *Coccolithovirus* служит широко распространенная одноклеточная водоросль *Emiliania huxleyi* (ранее известная как *Coccolithus huxleyi*). Это наиболее многочисленный из водорослей-кокколитофоров вид, один из доминирующих в фитопланктоне Мирового океана, и один из важнейших первичных продуцентов. Кальцит, который они накапливают во время цветения и который после их отмирания оседает на дно, — среди главных источников неорганического углерода в морской воде, а также важнейших палеонтологических документов. Кроме того, при гибели *E. huxleyi* образуется диметилсульфоксид. Таким образом, кокколитофоровые водоросли — важное звено круговорота углерода и серы.

Род *Phaeovirus*. Представители рода *Phaeovirus* заражают бурых водорослей (единственные многоклеточные хозяева фиковирусов).

Род *Prasinovirus*. Фитовирусы рода *Prasinovirus*, инфицирующие празинофитную водоросль *Micromonas pusilla*, могут ежедневно лизировать до 25% клеток ее популяции, однако высокий темп деления клеток хозяина позволяет симбиотической ассоциации сохранять относительное равновесие по сравнению с неустойчивой системой *Emiliania–Coccolithovirus*.

Род *Prymnesiovirus*. Хозяевами вирусов рода *Prymnesiovirus* выступают гаптофитные водоросли родов *Chrysochromulina* и *Phaeocystis*, широко распространенные в морях и океанах. Они относительно редко вызывают цветение водоемов; когда же это происходит, *Chrysochromulina* sp. образует экзотоксин, вызывающий массовую гибель рыб. Более частое «цветение» *Phaeocystis* sp. обычно заканчивается внезапной гибелью популяции водоросли, и тогда в воде появляется множество органических субстратов, что вызывает вспышку развития гетеротрофных бактерий. В свою очередь, это приводит к дефициту кислорода в экосистеме, а также нарушает природный круговорот углерода и серы. Массовая гибель гаптофитных водорослей напрямую связана с примнезиовирусной инфекцией.

Род *Raphidovirus*. Обычными представителями морского фитопланктона в прибрежных районах являются рафидофитные водоросли. Их массовое размножение вызывает феномен «красного» прилива (англ. red tide), когда вода приобретает красноватый цвет, и в ней накапливаются токсины, убивающие рыб. Один из видов рафидофитов, *Heterosigma akashiwo*, служит хозяином для вирусов рода *Raphidovirus*.

Строение вирионов. Вирионы фиковирусов имеют размер 100–220 нм; они состоят из ДНК-белкового кора, который заключен в икосаэдрический капсид, окруженный двойным липидным слоем (рис. 56).

В состав вириона вируса PBCV-1 входит около 110 белков. Главный белок капсида (~40% массы частицы) представлен гликопротеином, причем у хлоровирусов имеется свой собственный аппарат гликозилирования, поэтому они не зависят от клеточного эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи.

Геномная нуклеиновая кислота представляет собой линейную молекулу dsДНК либо с концевыми инвертированными повторами (благодаря чему она может переходить в кольцевую форму, как у вируса EsV, и даже реплицироваться, как кольцевая ДНК в случае вируса EhV), либо с концевыми ковалентно замкнутыми шпильками (как у вируса PBCV).

Строение генома. Геном фиковирусов относительно большого размера, близко к минимальному размеру бактериального генома. В то же время он очень компактный (средний размер гена 900–1000 п.н.), в нем имеются повторы, позволяющие осуществлять рекомбинацию как между разными вирусами, так и между ДНК вируса и хозяйской ДНК. Гены равномерно распределены по обеим нитям ДНК.

Геномы большинства фиковирусов кодируют несколько тРНК, от репертуара которых зависит частота используемых кодонов. В геноме вируса PBCV имеются гены ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы, ДНК-лигазы, геликаз, топоизомераз и рестриктаз/метилтрансфераз. Около 25% метилтрансфераз имеют «парные» (англ. cognate) эндонуклеазы–рестриктазы; ранее считали, что эти ферменты существуют только у бактерий.

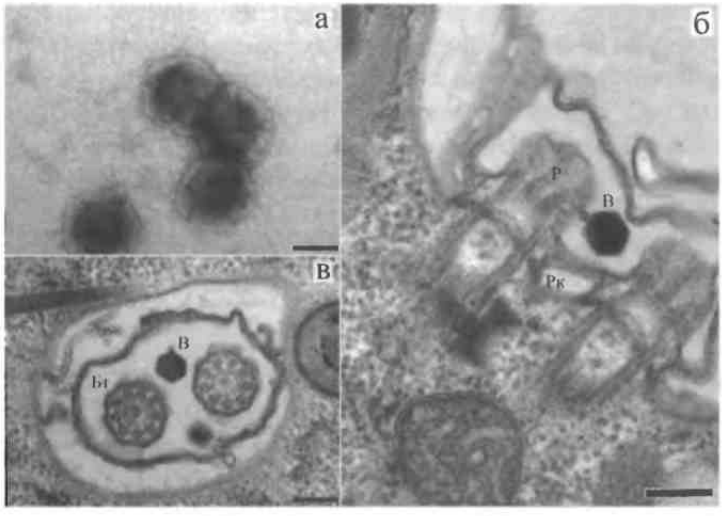


Рис. 56. Вирус PBCV (фотографии любезно предоставлены канд. биол. наук В. В. Ященко, СПбГУ).

а — ультратонкий срез вирионов; б, в — продольный и поперечный срез ресничных карманов *Paramecium bursaria*.

В — вирион; Бт — базальное тело; Р — ресничка; Рк — ресничный карман.

Масштаб — 200 нм.

Гены фиковирусов содержат интроны, удаляемые посредством автосплайсинга или с помощью сплайсосом водоросли. В свою очередь, белки фиковирусов содержат интеины — автокаталитически вырезаемые участки полипептидных цепей. Разнообразие белков, которые закодированы в геноме фиковирусов, исключительно велико. Многие из них являются самыми маленькими среди своих гомологов.

Цикл размножения. У некоторых фиковирусов хорошо изучены жизненные циклы, в частности онтогенез вируса PBCV, размножающегося в «зоохлореллах», т. е. в хлореллах-эндосимбионтах инфузории *Paramecium bursaria* (рис. 57). Долгое время было неизвестно, как ведет себя этот вирус вне хозяина, однако недавно было выяснено, что он прикрепляется к рецепторам на мембране парамеции и дожидается выхода хлореллы из инфузории. Когда хлорелла оказывается в окружающей среде (например, в случае гибели инфузории), вирус связывается с клеточной стенкой водоросли и локально разрушает ее своими ферментами. Затем мембрана вируса сливается с цитоплазматической мембраной, ДНК вируса и ассоциированные с ней белки вириона проникают в цитоплазму, а капсид остается снаружи. Вирусная ДНК транспортируется в ядро, где начинается транскрипция ранних вирусных генов. Через 1,5 ч после начала инфекции инициируется репликация вирусного генома и транскрипция поздних генов; эти процессы сопровождаются деградацией хромосомной ДНК зоохлореллы, и свободные нуклеотиды используются для синтеза вирусных нуклеиновых кислот. Через 3 ч начинается сборка вирионов; через 8 ч клетка лизируется, и в окружающую среду выходит ~1000 новых вирусных частиц.

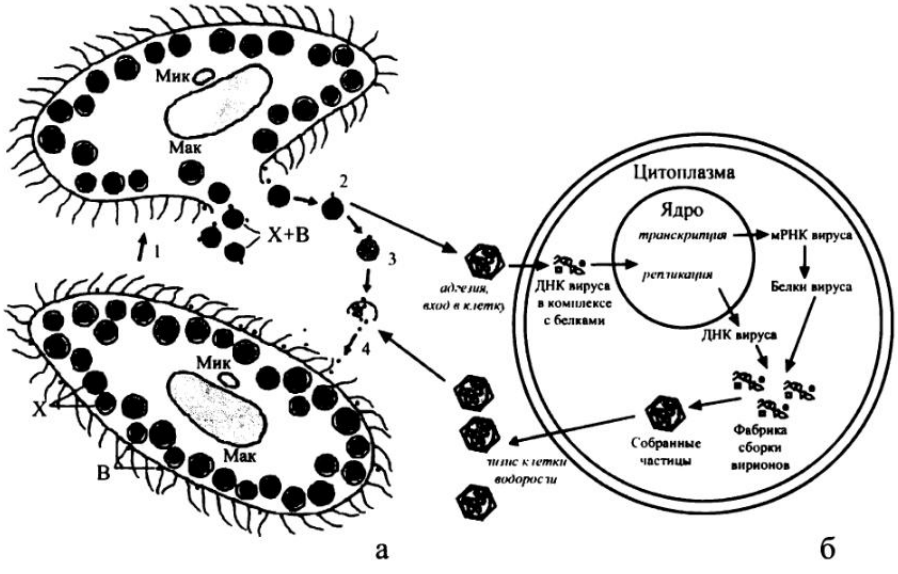


Рис. 57. Инфекционный цикл вируса PBCV.

а — поддержание вируса в окружающей среде; б — цикл размножения в клетках хлореллы (соответствует этапам 2–4 цикла «а»).

X — клетка хлореллы; B — вирион; X+B — инфицирование хлореллы; 1 — вирусы, адсорбированные на рецепторах инфузории в отсутствие выхода хлореллы; 2 — заражение хлореллы при гибели инфузории; 3 — инфекционный цикл, проходящий в клетках хлореллы; 4 — выход вирионов в окружающую среду и адсорбция на рецепторах инфузории.

Литический фиковирус из рода *Coccolithovirus* тоньше регулирует функции клетки-хозяина. В то время как другие фиковирусы не содержат генов, кодирующих РНК-полимеразу, и полностью полагаются на клеточный аппарат транскрипции, он обладает этим ферментом, что позволяет функционально не обременять ядро клетки. Лишь на протяжении первого часа после проникновения вируса некоторые его гены (в том числе ген РНК-полимеразы) транскрибируются за счет водоросли, а затем в дело вступает вирусная РНК-полимераза, и транскрипция основной части генов вируса передислоцируется в цитоплазму. Вирионы не скапливаются в клетке водоросли, а постепенно покидают ее; по-видимому, они используют тот же транспортный путь, который в норме обеспечивает секрецию кальцита. Водоросль все равно лизируется, однако это происходит позже, чем в системе PBCV–*Chlorella*, что продлевает срок инфекции и обеспечивает дополнительную сборку вирусных частиц.

У представителей рода *Phaeovirus* в ходе инфекции геном интегрируется в хромосому хозяина. Иными словами, для их жизненного цикла характерна стадия лизогении. Вирусные частицы инфицируют свободно плавающие гаметы, лишенные клеточной стенки. Через 5 мин после прикрепления вириона к клеточной мембране гаметы вирусная ДНК доставляется в ядро, где с помощью вирусной интегразы встраивается в хромосому хозяина. При митозе все клетки развивающегося таллома получают копию вирусного генома, который не проявляет себя только в спорангиях

и гаметангиях. При образовании репродуктивных органов запускается репликация вирусной ДНК, за которой следуют разрыв ядерной оболочки, сборка вирионов и их выход. В результате вирусные геномы наследуются по законам Менделя, а зрелые вирусные частицы обнаруживаются только в репродуктивных органах хозяина.

Результаты мультилокусного молекулярно-филогенетического анализа указывают на то, что семейство *Phycodnaviridae* монофилетично, и позволяют установить степень родства между его членами. Как оказалось, к общему предку фиковирусов ближе всего вирус EhV. В свою очередь, рода *Phaeovirus* и *Chlorovirus* обладают высоким уровнем внутригеномной рекомбинации и образуют общую ветвь на дендрограмме.

4.2. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ, ГРИБОВ И ВОДОРОСЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ dsРНК

В данную группу входят представители шести вирусных семейств: *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Hypoviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae* и *Totiviridae*.

4.2.1. СЕМЕЙСТВО *CHRYSOVIRIDAE*

В этом семействе есть единственный род *Chrysovirus*, который раньше относили к семейству *Partitiviridae*. Однако теперь установлено, что связь между хризовирусами и партитивирусами весьма отдаленная.

Хозяевами вирусов рода *Chrysovirus* являются грибы; наиболее часто это плесневый гриб *Penicillium chrysogenum* (от видового эпитета которого произведено родовое название этого вируса). Инфекция протекает бессимптомно; цикл размножения практически такой же, как у вирусов рода *Partitivirus*.

Геном хризовируса состоит из четырех молекул dsРНК (2,8–3,6 тыс. п.н.), каждая из которых кодирует отдельный белок — главный белок капсида, RdRP и минорный белок капсида; функция четвертого белка не установлена.

4.2.2. СЕМЕЙСТВО *ENDORNAVIRIDAE*

В данном семействе существует единственный род *Endornavirus*. Его представители инфицируют культивируемые однодольные и двудольные растения, в частности овес (*Avena sativa*), бобы (*Vicia faba*) и фасоль (*Phaseolus vulgaris*). Помимо растений хозяевами эндорнавирусов могут быть оомицеты рода *Phytophthora* и базидиомицеты рода *Helicobasidium*.

Эндорнавирус не образует вирионов и реплицируется в цитоплазматических везикулах в виде инфекционной РНК-плазмиды (>10 тыс. п.н.), кодирующей только один полипептид — РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRP), в котором имеются характерные мотивы геликазы.

Передается эндорнавирус горизонтально, при половом процессе.

4.2.3. СЕМЕЙСТВО *HYPOVIRIDAE*

В этом семействе описан единственный род *Hypovirus*; в нем четыре вида.

Хозяином гиповируса служит патогенный гриб *Cryphonectria parasitica*, возбудитель рака коры каштана (*Castanea sativa*); он неоднократно вызывал эпидемию в североамериканской популяции этого растения. Так, в 1950 г. им было погублено около 4 млн взрослых деревьев.

Грибы, зараженные гиповирусом, проявляют ослабленную вирулентность, или ***гиповирулентность*** (англ. hypovirulence). Гиповирусная инфекция принадлежит к персистентному типу, и фенотип хозяина вполне стабилен.

Как у большинства вирусов грибов, в жизненном цикле гиповируса отсутствует внеклеточная фаза, и он репродуцируется как dsРНК (12–13 тыс. п.н.; 3′-конец плюснити полиаденилирован), ассоциированная с мембранными везикулами диаметром 50–80 мкм. Геном гиповируса содержит одну–две ORF (A и B). ORF-A, которая присутствует не у всех гиповирусов, кодирует два полипептида (один из них отвечает за снижение вирулентности гриба-хозяина). В свою очередь, ORF-B кодирует препротеин с доменами высокоточной РНК-полимеразы RdRP и геликазы.

Механизм уменьшения вирулентности гриба-хозяина не ясен; показано, что в инфицированной клетке нарушаются сигнальные каскады, в первую очередь сигналинг с участием G-белков. Кроме того, уменьшается целлюлазная активность гриба, что препятствует разрушению клеточной стенки растения в зоне инвазии.

В популяциях гриба *C. parasitica* вирус передается вертикально (при клеточном делении) или горизонтально (при слиянии гиф, а также при половом процессе).

Образование анастомозов между гифами гриба контролируется системой вегетативной совместимости. В Северной Америке несовместимых групп гораздо больше, чем в Европе (вероятно, поэтому преобладающая часть местной популяции *C. parasitica* остается неинфицированной).

В настоящее время разработана система трансформации *C. parasitica* с помощью кДНК гиповируса (ДНК, комплементарная РНК; продукт обратной транскрипции). При ее интеграции в хромосому появляется устойчивый фенотип с низкой патогенностью.

4.2.4. СЕМЕЙСТВО *PARTITIVIRIDAE*

У представителей этого семейства геном сегментирован, т. е. распределен между разными молекулами РНК, находящимися внутри одного капсида. Это также партитный геном, поскольку сегменты могут упаковываться в разные капсиды. Последнее обстоятельство отражается в названии семейства (лат. partitus — разделенный).

Известно четыре рода партитивирусов. Два из них, *Alphacryptovirus* и *Betacryptovirus*, инфицируют растения, в частности клевер (*Trifolium pratense*); ранее эти рода относили к ныне упраздненному семейству *Cryptoviridae*. Третий род, *Partitivirus*, заражает грибы. Хозяином четвертого рода, *Cryspovirus*, служит споровик *Cryptosporidium parvum*. Вирусы с dsРНК, принадлежащие к группе партитивирусов, обнаружены также у морских зеленых водорослей рода *Bryopsis*.

В жизненном цикле партитивирусов отсутствуют литическая и внеклеточная стадии. Для хозяев, базидиомицетов или аскомицетов (вирус найден у представителей 15 родов этих грибов), инфекция протекает бессимптомно. Латентный характер инфекции указывает на коэволюцию партитивируса и гриба. Поскольку передача вируса через окружающую среду невозможна, его судьба целиком зависит от жизнеспособности хозяина.

Род *Partitivirus*. Вирусы рода *Partitivirus* имеют сферический капсид (30–35 нм в диаметре) из 120 капсомеров. Группы вирионов образуют в цитоплазме полиэдральные агрегаты, упакованные в общую мембрану.

Сегментированный геном состоит из двух моноцистронных молекул dsРНК размером по 1,4–3,0 тыс. п.н. Один сегмент кодирует белок капсида; в другом сегменте, по-видимому, закодирована РНК-полимераза RdRP. У нескольких видов обнаружены третий и четвертый сегменты. Это сателлитные РНК, которые не требуются для репликации вируса. Вирионы могут также содержать дефектные молекулы dsРНК.

Цикл размножения партитивирусов состоит из нескольких этапов, характерных для dsРНК-вирусов. Геномная нуклеиновая кислота никогда не выходит в цитоплазму; транскрипция происходит внутри капсида с помощью вирусной RdRP. Образующаяся РНК(+) служит матрицей для трансляции. Часть РНК(+) упаковывается в новые вирионы, где синтезируется минус-нить РНК с восстановлением двунитевой структуры молекулы. Как уже отмечено, два сегмента РНК упаковываются в капсиды либо вместе, либо по отдельности.

Представители рода *Partitivirus* могут распространяться и вертикальным, и горизонтальным путем. В первом случае вирус передается либо при делении клеток, либо при росте гиф через латеральные поры в септах (вирусы накапливаются на периферии клетки и с током цитоплазмы проникают в кончик растущей гифы), либо при образовании спор. Вирус попадает в конидиоспоры и у аскомицетов, и у базидиомицетов (в половые споры — только у базидиомицетов). Жизнеспособность и функции спор не изменяются в зависимости от присутствия или отсутствия вируса.

Важнейший путь горизонтального распространения представителей рода *Partitivirus* — при формировании анастомозов между гифами совместимых штаммов хозяина. Вирус может передаваться и между разными видами, однако как это происходит, неизвестно. Обычны смешанные инфекции (в основном, у аскомицетов), когда в одном хозяине сосуществуют несколько разных вирусов.

Род *Cryspovirus*. Его представители недавно обнаружены у одного из важнейших оппортунистических патогенов — споровика *Cryptosporidium parvum* (тип *Apicomlexa*), который имеет широкий круг хозяев, от рептилий до млекопитающих; у человека он вызывает расстройство пищеварительной системы.

Крисповирусы отличаются от других представителей семейства *Partitiviridae* меньшим размером капсида и тем, что они инфицируют только одного хозяина; молекулярно-филогенетический анализ также свидетельствует об обособленности этого рода от других партитивирусов.

4.2.5. СЕМЕЙСТВО *REOVIRIDAE*

К семейству *Reoviridae* в основном принадлежат вирусы животных, но к роду *Mycoreovirus* относятся вирусы грибов. Они репродуцируются в мицелии хозяев — *Rosellinia necatrix* и *Cryphonectria parasitica* (класс Sordariomycetes, отдел Ascomycota).

Вирусы еще одного рода этого семейства, *Mimoreovirus*, заражают одноклеточную зеленую водоросль *Micromonas pusilla* (класс Prasinophyceae). Она широко распространена в низких и высоких широтах; это доминирующий фототрофный микроорганизм в некоторых морских экосистемах; вирусная инфекция может привести к массовой гибели водорослей-хозяев.

По аналогии с представителями семейства *Hypoviridae*, микореовирусы служат причиной гиповирулентности своих хозяев-патогенов растений. При экспериментальном заражении протопластов инфекция приводит к гиповирулентности и у других сордариомицетов.

Икосаэдрические вирионы реовирусов грибов имеют диаметр около 80 нм. Их геном состоит из 11–12 сегментов dsРНК суммарным размером ~23 тыс. п.н. (род *Mycoreovirus*) и ~25,5 тыс. п.н. (род *Mimoreovirus*).

В каждом вирионе имеется по одной копии сегментов генома; каждый сегмент содержит одну рамку считывания.

После проникновения вируса в клетку его RdRP синтезирует с каждого сегмента кэпированную мРНК, которая экспортируется в цитоплазму на предмет трансляции. Часть молекул мРНК снова упаковывается в капсиды; там осуществляется транскрипция и восстанавливается исходная двунитевая структура генома. Зрелые вирионы покидают клетку после разрушения цитоплазматической мембраны и клеточной стенки.

4.2.6. СЕМЕЙСТВО *TOTIVIRIDAE*

В данное семейство (от лат. totus — цельный; *имеется в виду, что геном этих вирусов не сегментирован*) входят три рода: *Giardiavirus*, *Leishmaniavirus* и *Totivirus*.

К роду *Giardiavirus* принадлежат два вида вирусов протистов — ***Giardia lamblia virus*** (GLV) и ***Trichomonas vaginalis virus*** (TvV).

Представители рода *Leishmaniavirus* персистируют в клетках паразитического протиста рода *Leishmania* (отряд Kinetoplastida).

Вирусы рода *Totivirus* чаще всего инфицируют грибы. В нем описано три вида: вирус дрожжей из отдела Ascomycota — ***Saccharomyces cerevisiae virus*** (ScV), вирус возбудителя пузырчатой головни из отдела Basidiomycota — ***Ustilago maydis virus*** (UmV) и вирус возбудителя гельминтоспориоза из отдела Ascomycota — ***Helminthosporium victoriae virus*** (HvV). Кроме того, тотивирусы встречаются у протистов-споровиков *Babesia bovis* и *Eimeria stiedae*.

Род *Giardiavirus*. Тотивирусы рода *Giardiavirus* были открыты в 1986 г. В трофозоитах одного из самых архаичных эукариотов — дипломонады *Giardia lamblia* —

была найдена dsРНК размером 6,3 тыс. п.н., представляющая собой геном маленького вируса (диаметр капсида 36 нм, толщина оболочки 5–6 нм). На ее концах находятся нетранслируемые последовательности размером, соответственно, 301 п.н. и 367 п.н., которые отвечают за транскрипцию и репликацию.

В состав вирусного генома входят две ORF; одна из них кодирует главный полипептид капсида (p98), другая перекрывается с ней на участке размером 22 н. Если трансляция происходит со сдвигом рамки на –1 нуклеотид (2–5% случаев), образуется минорный гибридный белок p120, состоящий из капсидного белка и RdRP.

Вирусы GLV исключительно вирулентны — для успешного заражения достаточно 10 частиц на клетку. Когда частиц на два порядка больше, инфекция протекает еще бессимптомно. Если превышено и это число, инфекция приводит к остановке делений инфицированных трофозоитов.

Детали проникновения вирусов GLV в клетку-хозяина неясны. По-видимому, при этом используются специфические рецепторы, поскольку некоторые штаммы *G. lamblia* устойчивы к заражению. Методом электропорации клетки резистентных лямблий можно трансформировать вирусной РНК; при этом развивается продуктивная инфекция, что позволяет использовать вирусы GLV в качестве вектора для генетических манипуляций с хозяином.

После взаимодействия с рецептором вирус эндоцитируется, затем покидает эндосому и переходит в цитоплазму. Репликация происходит сначала в цитоплазме так же как у тотивирусов грибов. На поздних стадиях инфекции частицы обнаруживаются в обоих ядрах лямблии.

В инфицированной клетке может образоваться до 10^5 вирусных частиц. Через 42 ч после заражения в культуральной среде *G. lamblia* обнаруживаются зрелые вирионы. При этом клетка хозяина не лизируется; выход вирионов, по-видимому, происходит посредством экзоцитоза.

Вирусы GLV инфицируют только трофозоитов, т. е. они обладают высокой специфичностью по отношению к хозяину. Они распространены повсеместно, и их можно выделить от любых млекопитающих.

Род *Leishmaniavirus*. Геном этих вирусов имеет размер 5,3 тыс. п.н.; как и у других представителей семейства *Totiviridae*, он кодирует белок капсида и RdRP; а также содержит небольшую потенциальную ORF на 5′-конце. Белок капсида обладает специфической эндорибонуклеазной активностью — он удаляет последовательность размером 320 нуклеотидов на 5′-конце вирусной мРНК; вероятно, таким путем устраняется ингибирование трансляции.

Вирусы рода *Leishmaniavirus* передаются при клеточном делении; инфекция, которую они вызывают, протекает бессимптомно.

Род *Totivirus*. Тотивирусы, поражающие грибы, образуют частицы диаметром 40 нм; икосаэдрический капсид состоит из 120 капсомеров CP (сокр. от англ. capsid protein). Геномная нуклеиновая кислота представлена молекулой dsРНК размером 4,7–6,7 тыс. п.н. Наряду с ней в инфицированных клетках всегда присутствуют дефектные вирусные РНК, а иногда и сателлитная РНК.

Геном содержит две ORF; первая (*gag*) кодирует белок CP, вторая (*pol*) — RdRP. Они почти всегда перекрываются на участке 16–130 н. Геномная dsРНК никогда не

покидает капсид и служит матрицей для синтеза мРНК, которая поступает в цитоплазму и там транслируется. Плюс-нить многократно реплицируется до заполнения капсида и только потом высвобождается в цитоплазму, где полноразмерные копии генома упаковываются в отдельные капсиды. После инкапсидирования синтезируется минус-нить РНК, в результате чего восстанавливается двунитевая структура генома.

Трансляция, которая начинается с уникального сайта узнавания рибосомы, приводит к образованию главного белка CP (p78; 78 кДа). Помимо него из-за сдвига рамки считывания на один нуклеотид на участке GGGUUUA, где рибосома проскальзывает по матрице, синтезируется минорный белок RdRP (p88; 88 кДа).

Для сборки капсида важно обеспечить правильное количественное соотношение белков CP и RdRP, а для сборки вирионов необходимо перевести белок CP в фосфорилированную форму. Комплекс белков CP/RdRP взаимодействует с ssРНК(+), а затем CP-участок начинает полимеризоваться совместно с субъединицами «обычного» белка CP. Белок RdRP путем протеолитического расщепления превращается в белок CP; при этом он дефосфорилируется, и РНК высвобождается из вириона.

Клетка-хозяин поддерживает репликацию тотивируса на безопасном для себя уровне. Семь дрожжевых генов SK (сокр. от англ. **s**uper **k**iller), которые являются частью клеточной системы блокирования трансляции неполиаденилированных мРНК, негативно контролируют число копий вирусного белка на уровне инициации трансляции. Один из генов SK кодирует 5′-экзонуклеазу по некэпированным 5′-концам — именно таким, как у вирусной РНК. Мутация по любому из этих генов приводит к появлению фенотипа суперкиллерства (см. ниже).

Около 30 хромосомных генов MAK (сокр. от англ. maintenance of killer) отвечают за стабильную репликацию и трансляцию сателлитной вирусной РНК. Гены MAK в основном кодируют белки субъединицы 60S, которая связывает полиА-«хвост» мРНК перед формированием функциональной рибосомы. При дефиците 60S-субъединиц неполиаденилированные мРНК не способны транслироваться. У мутантов по генам MAK понижено содержание свободных 60S-субъединиц в цитоплазме.

Тотивирусы не инфекционны для интактных грибов. В то же время виды ScV и UmV слабо инфекционны для сферопластов (трансформация вирусной кДНК осуществляется одновременно с трансформацией плазмидной ДНК), т. е. ограничителем инфекционности служит клеточная стенка хозяина.

Тотивирусы могут передаваться как вертикально, так и горизонтально. В первом случае это происходит при клеточном делении и дифференциации (через аскоспоры). Горизонтальная передача осуществляется при половом процессе между совместимыми штаммами хозяев. Возможна и искусственная трансфекция (в данном случае — генетическая трансформация с помощью вирусной кДНК) методом электропорации. Часто встречаются смешанные инфекции, когда разные штаммы тотивирусов сосуществуют в одном хозяине.

Первые данные о тотивирусах грибов появились в 60-е годы XX в. в связи с открытием ***эффекта киллерства*** у дрожжей и базидиомицета-возбудителя головни. Оказалось, что штамм-киллер образует безвредный для себя токсин, убивающий грибы других штаммов. Токсин кодируется сателлитной РНК тотивируса, для репликации и инкапсидирования которой необходим тотивирус-хелпер.

Образование токсина — один из тех случаев, когда вирус придает своему хозяину конкурентное преимущество (в отличие от штаммов-конкурентов, хозяин устойчив к воздействию собственного токсина).

Фракция киллеров в природных популяциях *Ustilago maydis* составляет ~1%. Выявлено три типа киллеров — KP1, KP4 и KP6; каждый из них образует определенный 2-субъединичный токсин.

Процессинг тотивирусных токсинов напоминает процессинг инсулина и ряда других гормонов млекопитающих. После трансляции от препротоксина отрезается сигнальный пептид, а также удаляется вставка между субъединицами. Все зрелые токсины — это небольшие стабильные белки, в молекулах которых остатки Cys образуют дисульфидные мостики.

Токсин киллера KP6 атакует мембраны чувствительных клеток, образуя в них поры; токсин киллера KP4 блокирует Ca^{2+}-каналы цитоплазматической мембраны; механизм действия токсина киллера KP1 не установлен.

Существуют три группы устойчивости к этим токсинам, что определяется рецессивными аллелями трех независимых генов. Фактор устойчивости к токсину киллера KP1 передается через цитоплазму при клеточном делении; токсины киллеров KP4 и KP6 не могут синтезироваться, если в ядре отсутствуют рецессивные аллели устойчивости. Функции генов устойчивости неизвестны; скорее всего они кодируют мембранные или стеночные рецепторы токсинов.

Тотивирусы грибов находят практическое применение. В частности, в пивоварении использование штаммов-киллеров защищает культуру продуцента от контаминации посторонними дрожжами.

Токсины паразитического гриба *Ustilago* могут представлять опасность для других видов паразитических грибов семейства головневых. При этом токсины, кодируемые тотивирусом UmV, безвредны для животных, что делает их потенциальным оружием для борьбы с головней таких злаков, как кукуруза, овес и пшеница. В перспективе можно создать трансгенные растения с интегрированными генами токсинов вируса UmV, обеспечивающими устойчивость к головне.

Таким образом, тотивирусы обнаружены у четырех дивергентных родов протистов, а также у трех родов грибов, принадлежащих к двум разным отделам. То, что все тотивирусы (за исключением вируса GLV) передаются только вертикально и инфицируют представителей разных таксонов протистов и грибов, может указывать на раннее эволюционное происхождение этого семейства — еще до дивергенции их хозяев.

В молекуле RdRP тотивирусов содержится 8 консервативных мотивов, что позволило определить степень родства между видами. Как оказалось, самым архаичным и наиболее дивергировавшим тотивирусом является вирус GLV, который максимально близок к партитивирусам. Тотивирусы дрожжей образуют самостоятельную ветвь, а представители рода *Leishmaniavirus* парадоксальным образом оказались ближайшими родственниками представителей рода *Victorivirus*, хозяевами которого служат аскомицеты рода *Helminthosporium*.

4.3. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ И ГРИБОВ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ ssРНК(+)

В данную группу входят представители пяти родов — *Alphaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Narnaviridae* и *Virgaviridae*.

4.3.1. ВИРУСЫ ГРИБОВ В СЕМЕЙСТВАХ *ALPHAFLEXIVIRIDAE*, *GAMMAFLEXIVIRIDAE*, *BARNAVIRIDAE* И *NARNAVIRIDAE*

Семейства *Alphaflexiviridae* и *Gammaflexiviridae*. Главными хозяевами флексивирусов служат растения. Тем не менее недавно открыты вирусы родов *Botrexvirus* и *Sclerodarnavirus* (сем. *Alphaflexiviridae*) и *Mycoflexivirus* (сем. *Gammaflexiviridae*), которые инфицируют грибы.

Род *Botrexvirus*. Вирусы рода *Botrexvirus* заражают клетки фитопатогенного аскомицета *Botrytis cinerea*; чаще всего инфекция протекает бессимптомно, хотя встречаются исключения. Обычно гриб вызывает у винограда болезнь под названием «серая гниль», однако в определенных климатических условиях развивается «благородная гниль», когда ягоды только подвяливаются. Из такого обогащенного сахарами винограда изготавливают натуральные сладкие вина, в частности марок Сотерн и Токай.

Нитевидный вирион представителей рода *Botrexvirus* имеет размер 720×12–13 нм. Его геном (7 тыс. н.), представленный линейной ssРНК(+) с полиаденилированным 3′-концом и кэпированным 5′-концом, кодирует 5 белков. После попадания в цитоплазму клетки-хозяина ботрексвирус раздевается, и следом за этим инициируется трансляция гена RdRP, продукт которого сразу же приступает к репликации вирусного генома. Затем с внутренних промоторов начинается транскрипция субгеномных мРНК, каждая из которых содержит по одной ORF. При их трансляции синтезируется несколько белков, в том числе белок капсида, который взаимодействует с полноразмерной геномной РНК с образованием новых вирионов.

Род *Sclerodarnavirus*. Вирусы рода *Sclerodarnavirus* (***Sclero**tinia sclerotiorum **debi**litation-**a**ssociated **RNA** virus*) инфицируют грибы-аскомицеты рода *Sclerotinia*. Для них характерно не только то, что они не образуют полноценных вирионов, но и то, что они не обладают капсидом. Инфекционная ssРНК(+) выступает в роли геномной молекулы, а также в качестве мРНК; она содержит только одну ORF, с которой транслируется вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRP). Склеродарнавирус ослабляет патогенные свойства гриба, одного из важнейших вредителей салата посевного (*Lactuca sativa*).

Род *Mycoflexivirus*. Вирусы рода *Mycoflexivirus* также заражают *B. cinerea* и похожи на ботрексвирусов; разница между ними состоит в том, что в первом случае геномная РНК кодирует не пять белков, а три. На основе анализа последовательностей консервативных участков RdRP эти вирусы выделены в отдельное семейство *Gammaflexiviridae*.

Семейство *Barnaviridae*. В этом семействе только один род — *Barnavirus*. Хозяином барнавирусов служит промышленно культивируемый гриб *Agaricus bisporus*

(шампиньон). Они вызывают у него болезнь «La France», которая проявляется в замедленном росте и укороченной жизни мицелия, а также в деформации плодовых тел. Вывести устойчивый к вирусу сорт *A. bisporus* не удается.

Барнавирус — это единственный известный палочковидный вирус грибов; его вирион имеет размер 50×20 нм.

Геном барнавируса представлен линейной ssРНК(+) размером 4 тыс. н.; кэп на 5′-конце и полиА-хвост на 3′-конце отсутствуют. Он содержит гены четырех белков (капсидного белка; RdRP; белка, участвующего в репликации; белка с неизвестной функцией) и три дополнительные рамки считывания. Все ли они экспрессируются in vivo, не выяснено.

После проникновения в клетку хозяина вирус раздевается, и геномная РНК попадает в цитоплазму, где начинаются трансляция и синтез комплементарной минус-нити РНК. Затем образуются субгеномные мРНК, которые транслируются, в частности, в структурный белок капсида. В конечном счете, происходит сборка новых вирусных частиц, которые выходят из клетки посредством ее лизиса.

Распространяется барнавирус горизонтально — через мицелий и базидиоспоры.

Семейство *Narnaviridae*. Вирусы рода *Narnavirus*, хозяином которых служат дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, представлены двумя видами инфекционных ssРНК(+) с константой седиментации, соответственно, 20S и 23S (~2,5 тыс. н.). Они не образуют капсид (единственная ORF кодирует RdRP, отвечающую за репликацию вирусного генома в цитоплазме дрожжей) и передаются либо вертикально, в ряду вегетативных поколений, либо горизонтально, при скрещивании разных штаммов хозяина.

Вирусы рода *Mitovirus*, сходные с нарнавирусами, недавно обнаружены у грибов *Botrytis*, *Cryphonectria* и *Ophiostoma*. Их геномная (+)РНК примерно такого же размера (2,5–2,9 тыс. н.).

4.3.2. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ В СЕМЕЙСТВЕ *VIRGAVIRIDAE*

Основными хозяевами виргавирусов (лат. virga — палка; *имеется в виду палочковидная форма вириона*) служат растения, а протистов они используют в качестве промежуточного хозяина для своего расселения.

Представители нескольких родов этого семейства (*Benevirus*, *Furovirus*, *Pecluvirus* и *Pomovirus*) инфицируют протистов из класса Plasmodiophorea (фила Rhizaria; отдел Cercozoa), паразитирующих на корнях злаков или на клубнях бобовых, картофеля и свеклы; они также обнаружены в ассимилирующих тканях указанных растений.

Частицы виргавирусов выявляются только внутри клеток; внеклеточная стадия отсутствует. В растениях вирионы могут находиться как в цитоплазме, так и в вакуолях. Одним из симптомов инфекции служит изменение окраски листьев и стеблей, поскольку при размножении вируса повреждаются хлоропласты.

Вирион виргавирусов диаметром 20 нм имеет спиральный тип симметрии и состоит из двух частей длиной, соответственно, 140–160 нм и 260–300 нм (у *Benevirus* — до 390 нм).

Геномная РНК кэпирована и на 3′-конце содержит тРНК-подобную структуру (вместо полиА). Геном большинства виргавирусов состоит из двух сегментов разме-

ром 6–7 и 3,5–3,6 тыс. н. (хотя существуют варианты с одним или тремя сегментами). Первый сегмент кодирует структурный белок капсида, в котором иногда имеется специальный домен, отвечающий за транслокацию вируса из растительной клетки в протиста. Другой сегмент кодирует RdRP.

Цикл развития виргавируса состоит из нескольких этапов. После проникновения вирус раздевается, и геномная РНК транслируется на рибосомах. Помимо этого синтезируется РНК(–), которая служит матрицей для образования новых копий вирусной мРНК. Часть молекул ssРНК(+) упаковывается в капсиды, и новые вирионы покидают лизирующуюся клетку хозяина.

Горизонтальная передача виргавирусов между растениями осуществляется векторами из группы Plasmodiophora (в свое время этих протистов причисляли к миксомицетам; теперь же их относят к филе Rhizaria). К ним принадлежат два вида рода *Polymyxa* (не вызывают патологию у хозяев), а также род *Spongospora* (приводит к патогенному изменению клубней картофеля).

Основной стадией жизненного цикла плазмодиофоров является многоядерный плазмодий, ассоциированный с корнями растений или поселяющийся в тканях корня. На нем образуются зооспорангии с расселительными зооспорами. Кроме того, на плазмодии могут формироваться цистозории, содержащие покоящиеся споры; в них вирус может храниться годами, не теряя инфекционности.

Вирионы виргавируса обнаруживаются в 1–10% зооспор. При встрече со здоровым растением зараженная зооспора проникает внутрь корня, где прорастает в плазмодий. При этом вирус выходит в цитоплазму растительной клетки и приступает к размножению (в протисте он не репродуцируется). Если в растение попадает плазмодий другого плазмодиофора, он приобретает вируса посредством фагоцитоза или пиноцитоза; после образования зооспор инфекционный цикл замыкается.

Рекомендуемая литература

Ghabrial S. A., Suzuki N. Viruses of Plant Pathogenic Fungi // An. Rev. Phytopathol. 2009. Vol. 47. P. 353–384.

La Scola B., Desnues C., Pagnier I. et al. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus // Nature. 2008. Vol. 455. P. 100–105.

Nuss D. L. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface // Nat. Rev. Microbiol. 2005. Vol. 3. P. 632–642.

Van Etten J. L. (Ed.). Lesser Known Large dsDNA Viruses // Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag. Berlin—Heidelberg. 2009. Vol. 328. 250 pp.

Van Etten J. L., Lane L. C., Dunigan D. D. DNA viruses: the really big ones (giruses) // An. Rev. Microbiol. 2010. Vol. 64. P. 83–99.

ГЛАВА 5

ВИРУСЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ (ФИТОВИРУСЫ)

На первый взгляд, высшие растения обладают преимуществами перед другими объектами, на которых изучаются вирусные инфекции. Действительно, в отличие от бактерий их проще культивировать, а по сравнению с животными они быстрее растут и размножаются, требуют меньше ухода и не находятся под бдительным оком биоэтики. Тем не менее вирусы высших растений охарактеризованы гораздо хуже бактериофагов или вирусов животных.

5.1. ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФИТОВИРУСОВ

Относительно слабая изученность фитовирусов имеет не только такую «субъективную» причину, как неактуальность их для медицины, но и связана со спецификой строения растений на клеточном и тканевом уровнях.

Вирион фитовирусов. У разных представителей фитовирусов вирионы различаются по форме (рис. 58). Однако в настоящее время она не считается главным критерием при разграничении семейств или порядков.

Вирионы фитовирусов могут быть безоболочными и оболочными; изометрическими (сферическими или продолговатыми); спирально-симметричными (жесткими или гибкими); палочковидными; пулевидными. Наконец, представители семейства *Narnaviridae* вообще не образуют капсида.

Геном фитовирусов. Размер генома у всех изученных РНК-содержащих фитовирусов варьирует в пределах от 2,5 тыс. н. (сем. *Narnaviridae*) до 20 тыс. н. (сем. *Closteroviridae*); среднее значение составляет 4–6 тыс. н. В свою очередь, геном ДНК-содержащих фитовирусов имеет размер от 4,8 тыс. п.н. (сем. *Geminiviridae*) до 7–8 тыс. п.н. (семейство *Caulimoviridae*).

Геномы фитовирусов бывают несегментированными, сегментированными, унипартитными и мультипартитными, причем в одном и том же семействе могут встречаться все перечисленные варианты геномов (примером служит сем. *Virgaviridae*). Широкому распространению мультипартитных вирусов благоприятствуют персистентный характер инфекции и передача агента насекомыми.

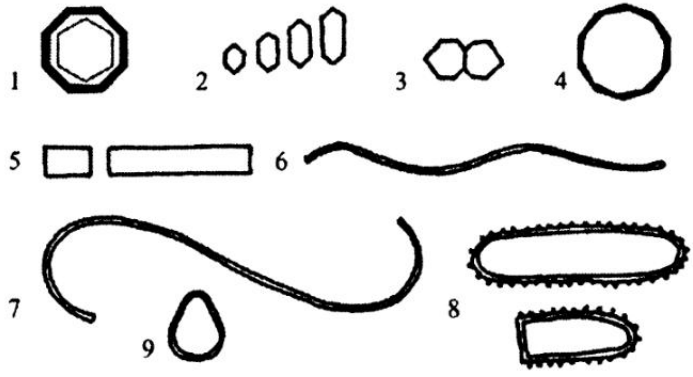


Рис. 58. Главные морфотипы фитовирусов.

1–7 — безоболочные фитовирусы; 8–9 — оболочные фитовирусы. 1 — *Phytoreovirus* (сем. *Reoviridae*); 2 — *Alfamovirus* (сем. *Bromoviridae*); 3 — *Begomovirus* (сем. *Geminiviridae*); 4 — *Caulimovirus* (сем. *Caulimoviridae*); 5 — *Tobravirus* (сем. *Virgaviridae*); 6 — *Potexvirus* (сем. *Flexiviridae*); 7 — *Closterovirus* (сем. *Closteroviridae*); 8 — *Cytorhabdovirus*/*Nucleorhabdovirus* (сем. *Rhabdoviridae*); 9 — *Tospovirus* (сем. *Bunyaviridae*).

Особенности проникновения и транслокации. В нормальных условиях стенка растительной клетки представляет собой массивный и очень жесткий каркас целлюлозных фибрилл в аморфном матриксе, который состоит в первую очередь из гемицеллюлоз и пектина; в зависимости от типа ткани матрикс может дополнительно содержать лигнин, кутин, суберин, белки и во́ски.

Различают первичные и вторичные клеточные стенки.

Первичные клеточные стенки (англ. primary cell wall) формируются в процессе роста клетки. Они относительно тонкие (0,1–1 мкм) и состоят из неупорядоченно ориентированных целлюлозных фибрилл, которые погружены в обводненный матрикс из гемицеллюлоз, пектинов и белков. Первичные клеточные стенки способны к растяжению под воздействием тургорного давления.

Вторичная стенка (англ. secondary cell wall) формируется после окончания роста клетки; в ней преобладают упорядоченно ориентированные целлюлозные фибриллы и лигнин, придающий растительным волокнам и древесине механическую прочность, а также рекальцитрантность, т. е. устойчивость к разложению. Вторичная стенка обычно толще первичной (0,5–10 мкм); у нее иная ультраструктура и другие механические свойства. В частности, она бывает способна к эластичному растяжению под воздействием тургора, обусловленного накоплением в цитоплазме осмотически активных ассимилятов, в частности сахаров.

Клеточная стенка выполняет не только арматурную, защитную, транспортную и регуляторную функции; без нее растительная клетка не может долго просуществовать. Искусственно полученные протопласты даже в условиях осмотического комфорта через непродолжительное время (обычно спустя несколько часов) приступают к ее восстановлению.

Преодоление барьера клеточной стенки; роль плазмодесм. У фитовирусов нет ферментов, которые могли бы разрушить клеточную стенку хозяина, поэтому им приходится ее «обходить». Более того, на пути проникновения и распространения в организме-хозяине фитовирусы не преодолевают цитоплазматическую мембрану (в отличие от бактериофагов и вирусов животных).

В свою очередь, выход частиц фитовирусов, как правило, не сопровождается лизисом клетки; преобладают персистентные инфекции, при которых вирионы мигрируют в теле хозяина или передаются другому хозяину с помощью животных-векторов (см. ниже).

Хотя первичное проникновение фитовирусов возможно в поврежденных частях растения, для дистанционной транслокации они используют особую деталь его тканевой организации — систему плазмодесм (диффузионных коридоров, соединяющих соседние клетки).

Плазмодесма (англ. plasmodesma; от греч. plasma — тело и desme — связка; в *данном случае* — цитоплазматическая перемычка) представляет собой мембранный канал диаметром 30–40 нм, связывающий цитоплазму соседних клеток. В него вложена десмотубула — продолговатая цистерна эндоплазматического ретикулума, которая обеспечивает непрерывность внутренних мембран клеток растительной ткани (рис. 59). Просвет десмотубулы и зазор между ней и мембранным каналом регулируются цитоскелетом и вспомогательными белками.

Максимальный пропускной (эксклюзионный) диаметр плазмодесмы и десмотубулы составляет 2,5–3 нм, что позволяет свободно диффундировать молекулам массой не более 0,75–1 кДа (значительно меньше, чем молекулярная масса геномной нуклеиновой кислоты фитовирусов, вирусных белков и, тем более, вирионов).

В процессе транслокации вирионов фитовирусов участвуют уникальные «белки движения» (см. ниже). Под их воздействием эксклюзионный диаметр плазмодесмы и десмотубулы значительно увеличивается; кроме того, эти белки выполняют регуляторные функции.

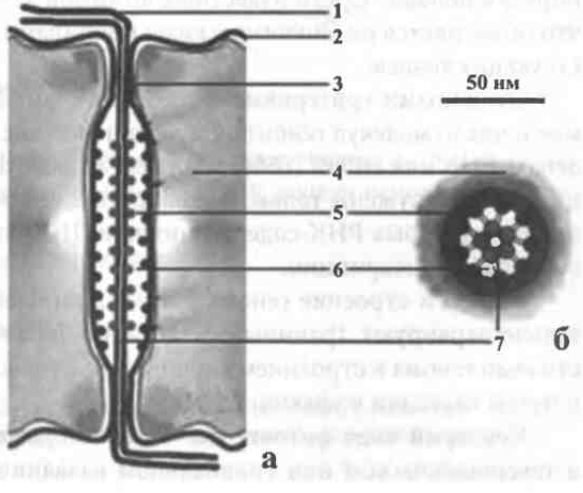


Рис. 59. Плазмодесма.

а — продольный, б — поперечный разрез.

1 — цистерны эндоплазматического ретикулума; 2 — цитоплазматическая мембрана; 3 — область перешейка; 4 — клеточная стенка; 5 — белки плазмодесмы; 6 — цитоплазматический микроканал; 7 — десмотубула.

Наряду с транслокацией, происходящей в результате контактного взаимодействия между клетками в пределах ткани, фитовирусы могут использовать дистанционную связь между тканями и органами растения, которая обеспечивается их проводящей системой.

Роль проводящей системы в транслокации фитовирусов. Проводящая система функционально интегрирует ткани и органы растительного организма и подразделяется на ксилему (англ. xylem; от греч. xylon — древесина), которая транспортирует воду и минеральные ионы от корней к надземным частям, в частности к ассимилирующим тканям, и флоэму (англ. phloem; от греч. phloios — луб), которая переносит ассимиляты в корни, в зоны роста, к зреющим плодам и т. д., т. е. в места их непосредственной утилизации или запасания. За последнее десятилетие выяснилось, что проводящая система дополнительно транспортирует информационные молекулы, в том числе мРНК. С проводящей системой связано и распространение вирусной инфекции по телу растения.

Специфичность фитовирусов. Отсутствие рецепторов на поверхности растения в сочетании с особыми механизмами инвазии позволяют фитовирусам инфицировать очень широкий круг хозяев.

Узкоспецифичные фитовирусы, заражающие один или несколько видов растений, развиваются на многолетниках и передаются при вегетативном размножении или с семенами, хотя обычно их хозяевами служат представители отдельного рода в пределах семейства. В то же время нередки случаи, когда фитовирусы преодолевают барьер между семействами и даже таксонами более высокого ранга. Например, вирус бронзовости томата (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) может инфицировать представителей более 650 видов 80 семейств однодольных и двудольных растений. Наконец, известны случаи, когда фитовирусы преодолевают межрегнальный барьер, и их хозяевами становятся представители другого царства — беспозвоночные животные (см. ниже).

Биоразнообразие и систематика фитовирусов. В настоящее время насчитывается свыше 2000 видов фитовирусов, и можно предположить, что их на самом деле на порядок больше. Среди известных штаммов 77% выделено от культурных растений, что объясняется не биологическими причинами, а практическим значением соответствующих хозяев.

Основными критериями систематики фитовирусов служат тип, структура, размер и число молекул геномной нуклеиновой кислоты, которая может быть представлена dsРНК или ssРНК (65% изолятов), а также dsДНК или ssДНК разной конфигурации. Не обнаружены только фитовирусы с геномной линейной dsДНК. В жизненном цикле некоторых РНК-содержащих или ДНК-содержащих фитовирусов есть стадия обратной транскрипции.

Размер и строение генома у представителей разных групп фитовирусов значительно варьируют. Границы семейств и родов, наряду с молекулярными характеристиками генома и строением вириона, определяются кругом хозяев, а также способом и путем передачи инфекции.

Критерий вида фитовируса — характерные симптомы болезни; они отражены в таксономическом или тривиальном названии, в него входит название растения,

на котором данный вид был впервые обнаружен, например ***Barley yellow dwarf virus*** (BYDV) — вирус желтой карликовости ячменя; ***Tobacco ringspot virus*** (TRSV) — вирус кольцевой пятнистости табака и т. д.

Экономический ущерб от вирусной инфекции. Вызванное вирусной инфекцией нарушение метаболизма приводит к отмиранию частей растения или, гораздо реже, к его гибели. Особое значение имеют поражения цветков, плодов и семян сельскохозяйственных культур; новых представителей фитовирусов обычно описывали при эпифитотиях (от греч. epi — охватывающий и phyton — растение; *эпидемия среди растений*), которые наносят серьезный экономический ущерб.

Потери урожая могут происходить на всех этапах агротехнического цикла (выращивание, сбор урожая, хранение, обработка и т. д.), поэтому их трудно точно оценить в денежном выражении. Интродукция новых культур и несоблюдение карантинных мер в условиях интенсивного земледелия способствуют расширению круга хозяев и развитию эпифитотий. Сильнее всего подвержены вирусным инфекциям популярнейшие культуры. Например, растение картофеля инфицируется фитовирусами 14 родов; огурца — 8 родов; пшеницы — 17 видов. Ущерб от вирусных болезней в сельском хозяйстве огромен. По примерной оценке, он ежегодно составляет >60 трлн. долларов (~10% стоимости урожая). Последствия эпифитотии обычно сказываются в течение нескольких лет: утрачивается сортность, снижаются урожаи, теряется товарный вид плодов, возникают новые природные резервуары инфекции, расширяется круг поражаемых культур.

Фитовирусы служат неотъемлемой частью природных экосистем; они способны быстро адаптироваться к разным хозяевам (в том числе, размножаться в насекомых) и долго сохраняться в растительных останках, что создает постоянную угрозу земледелию и стимулирует выведение вирусоустойчивых сортов. К сожалению, благодаря высокой частоте рекомбинаций и мутаций у РНК-содержащих фитовирусов (которых большинство) последние неизменно лидируют в соревновании с селекционерами. Тем не менее в настоящее время массово выращиваются генетически модифицированные вирусоустойчивые растения, при создании которых учитывается структура и свойства генетических элементов фитовирусов.*

5.2. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИТОВИРУСОВ

Для размножения фитовирусов используются чувствительные к ним хозяева. Как правило, их круг широк, и выбор наиболее адекватной модели основан на следующих критериях:

— хорошо выраженные симптомы инфекции;
— относительно быстрый рост;
— отсутствие сопутствующих инфекций.

* Информацию о фитовирусах, в том числе с секвенированными геномами, можно найти на сайтах http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/, http://www.dpvweb.net/ и http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/ppi/links/pplinks/viruseqs/viruses.php.

Поскольку вторичные метаболиты, прежде всего фенолы и танины, могут неспецифически подавлять развитие инфекции, предпочтительно использовать растения с их пониженным содержанием. Чаще всего это представители семейств *Leguminosae и Solanaceae.*

Возраст растения и режим культивирования существенно влияют на урожай вируса. В молодых растениях при оптимальных условиях роста вирусы накапливаются в значительном количестве, например на грамм сухой биомассы можно получить до 2 мг частиц вируса табачной мозаики.

Оптимальная температура для проявления симптомов вирусной инфекции составляет 16–25°С; уровень освещенности должен быть также оптимальным для роста модельных растений, хотя при заражении в лаборатории их рекомендуется вначале притенять.

Для идентификации фитовирусов используются индикаторные растения, у которых признаки инфекции проявляются наиболее ярко. Список таких культур и описание соответствующих симптомов приводятся в специальных справочниках, которые помогают диагностике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных культур, особенно древесных растений. Например, присутствие вируса кольцевой пятнистости вишни и вируса мозаики яблони можно диагностировать по появлению некротических пятен, соответственно на листьях огурца и табака.

Заражение модельных растений можно осуществлять биологическими или механическими способами.

Биологические способы инфицирования обычно применяются по отношению к древесным растениям. Самый распространенный из них — это прививка, которая производится либо путем контактного сближения индивидуально укорененных растений (одно из которых инфицировано), либо путем пересадки инфицированного привоя. Более простой, но не всегда эффективный, метод основан на использовании паразитического растения — повилики (*Cuscuta europaea*), которая образует гаустории, проникающие через поверхностные ткани в проводящие пути заражаемого растения; с ее помощью удается перенести инфекцию между взаимно удаленными формами. Особенно успешно передаются вирус мозаики огурца (***Cucumber mosaic virus***, CMV) и вирус погремковости табака (***Tobacco rattle virus***, TRV).

Механическое инфицирование растения осуществляют, втирая суспензию вирусных частиц или сока инфицированного растения тампоном, шпателем или щеткой. Для заражения большого числа особей или высокорослых растений с жесткими листьями обычно применяется пульверизатор, распыляющий смесь вирусной суспензии с зернами абразива.

Целое растение является сложной моделью, на которой трудно проследить этапы онтогенеза вируса. Поэтому механизмы репликации фитовирусов часто изучают на протопластах. В данном случае состав и объем инокулята, условия инфекции и последующую обработку материала легко контролировать. Для получения протопластов используют молодые листья и стандартные наборы («коктейли») гидролитических ферментов. Недостатком такой модели служит кратковременность ее существования (как правило, несколько суток), после чего протопласты либо разрушаются, либо регенерируют клеточную стенку.

Фитопатологические исследования проводят на клеточных культурах, которые можно получить практически из любого растения. Для этого фрагмент растительной ткани помещается в стерильных условиях на питательную среду, содержащую минеральные соли, сахара, витамины и регуляторы роста (прежде всего, ауксины и цитокинины), а также агар в качестве уплотнителя. Через некоторое время клетки дедифференцируются и приступают к делению, в результате чего образуется бугорчатая масса, или каллус (англ. callus cell culture; от лат. callus — наплыв), который периодически пересевают на свежую питательную среду. Каллус инфицируют вирусом, разбрызгивая суспензию вирионов по его поверхности. Недостаток данной модели заключается в более низкой, чем при инфицировании целого растения, частоте заражения; например, вирус табачной мозаики (*Tobacco mosaic virus*, TMV) обнаруживается лишь в 40% клеток. В некоторых случаях каллус удается мацерировать, и затем выращивать в погруженной клеточной культуре; при этом частота заражения может существенно увеличиться.

5.3. СИМПТОМЫ ФИТОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Внешние проявления фитовирусной инфекции, часто связанные с изменением габитуса и пигментации растения, издавна привлекали внимание садоводов. Описания картины заболевания и предохранительных приемов встречаются еще в средневековой литературе, причем сохранения симптомов, например лепестковой пятнистости тюльпанов, иногда сознательно добивались (см. раздел 1.1).

Как уже отмечалось, характерная симптоматика имеет исключительное значение для классификации и диагностики фитовирусов, хотя она не всегда специфична, и ее проявление может варьировать в зависимости от экологических факторов, сопутствующих инфекции. Симптомы поражения чаще всего подразделяют на локальные и системные; первые регистрируются в зоне первичного инфицирования, вторые служат результатом распространения инфекционного агента по растению (рис. 60).

К локальным симптомам прежде всего относятся:

— ***некрозы*** (специфически расположенные омертвевшие белесые, черные, бурые или красные зоны);

— ***хлорозы*** (пятна в отдельных участках листовой пластинки, имеющие, по сравнению с фоном, более светлую, желтоватую или розоватую окраску).

Системные симптомы более разнообразны:

— ***гравировка*** (зоны отмирания клеток паренхимы);

— ***деформации*** (патологический рост в форме опухолей; разрастание верхушечных почек; морщинистость, курчавость, нитевидность и скручивание листовой пластинки; махровость цветков; искажение формы плодов и т. д.);

— ***израстание*** (пролиферация или сращивание вегетативных и генеративных органов, образование множественных боковых побегов или нескольких стеблей из одного узла; превращение частей цветка в листовидные образования);

— ***карликовость*** (угнетение роста; уменьшение числа побегов и листьев; мелкоплодие);

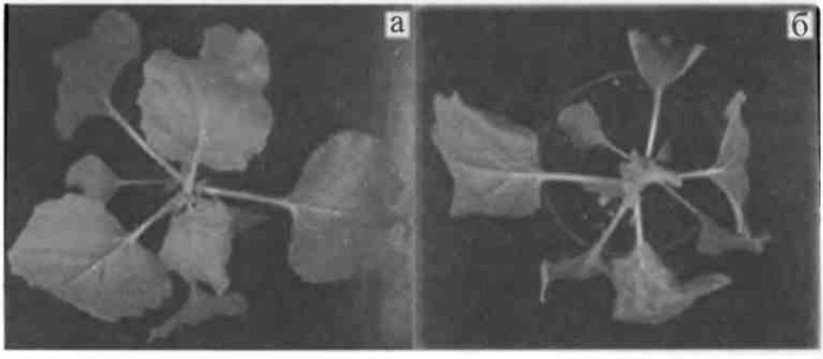


Рис. 60. Угнетение роста растения табака в результате заражения вирусом мозаики рапса (ORMV) (фотографии любезно предоставлены Prof. M. Heilein, Insitut de Biologie Moléculaire des Plantes, France).

Слева — контрольное растение.

— ***мозаики*** (чередование разноокрашенных зон на листьях, цветках или плодах, причем в зависимости от формы, окраски и взаимного расположения таких зон различают жилковатую, желтую, белую и полосатую мозаику, а также кольцевую пятнистость, крапчатость, линейный узор, пестролистность, сетчатость и т. д.);

— ***увядание*** (потеря тургора побегами, цветками или плодоножками; она возникает не только при вирусном поражении сосудистой или корневой системы, но и в результате вторичного воздействия стрессовых факторов).

В подавляющем большинстве случаев механизмы патогенеза остаются неизвестными.

Симптомы вирусных заболеваний проявляются по-разному в зависимости от возраста растения или его частей; наиболее отчетливо — на молодых листьях в период активного роста; на старых листьях и побегах они могут пропадать. При голодании по минеральным элементам может наблюдаться как прямая, так и обратная корреляция со степенью выраженности симптомов. Характер влияния температуры и освещенности на инфекционный процесс определяется также видовой принадлежностью хозяина и типом возбудителя. На многолетних растениях при повышенной температуре (25–30°C) внешние признаки заболевания иногда маскируются, например, в регионах с теплым климатом широко наблюдается временное «выздоровление» плодовых культур. Признаки болезни могут видоизменяться и при комплексном поражении.

К проявлениям вирусных инфекций на уровне клеток или тканей относится образование белковых включений разной локализации, а также гиперплазия (разрастание тканей при избыточном делении клеток) или, наоборот, гипоплазия (подавление роста и дифференциации клеток).

Например, гипоплазия паренхимы наблюдается при мозаиках: клетки в зонах хлороза теряют форму; их взаимный контакт нарушается; уменьшается толщина листовой пластинки. В свою очередь, вирус курчавости верхушки растения сахарной

свеклы (***Beet curly top virus, BTV***) вызывает гиперплазию проводящей ткани, образуется избыточное количество ситовидных трубок. Ряд фитовирусов способен стимулировать образование опухолей в результате активизации деления клеток ксилемы, паренхимы или флоэмы. Этот же механизм может приводить к искривлению побегов.

Важной характеристикой ряда семейств и видов фитовирусов служит образование клеточных включений разной формы и локализации. Их размер варьирует в зависимости от природы хозяина, например, при заражении табака Х-вирусом картофеля (***Potato X virus***, PXV) включения по размеру не превышают клеточное ядро, тогда как в растении картофеля они занимают до половины объема клетки. Включения либо преимущественно состоят из вирусных белков, либо представляют собой агрегат вирусных частиц.

Многие фитовирусные инфекции не дают внешних проявлений и протекают бессимптомно или латентно. Однако при этом постепенно снижается урожай и теряется сортность; страдает и качество посадочного материала. Особо важен мониторинг латентных инфекций в семеноводческих хозяйствах. Поскольку фитовирусы эксплуатируют систему транспорта и метаболизм хозяина, они даже при латентных инфекциях оказывают негативное воздействие на его физиологическое состояние. Чаще всего нарушаются фотосинтетический аппарат, транспорт углеводов, водно-солевой баланс и гормональный статус.

Фитовирусные инфекции, как правило, не летальны, поскольку хозяин имеет избыточную вегетативную массу; растение умирает только в результате редко происходящей генерализации некрозов. Негативный экономический эффект связан с резким снижением урожая, потерей товарного вида у плодов и сокращением сроков их хранения. В то же время в отдельных случаях ряд симптомов фитовирусной инфекции (лепестковая пятнистость, пестролистность и т. д.) повышает ценность декоративных растений.

5.4. СПОСОБЫ ЗАРАЖЕНИЯ ФИТОВИРУСАМИ

Как уже отмечалось, фитовирусы не содержат ферментов, способных разрушить поверхностную кутикулу и ригидную клеточную стенку. Поэтому первичное проникновение возможно либо только в зоне механического повреждения или мацерации, либо в результате инъецирования вирусных частиц в клетки или проводящую систему с помощью ротового аппарата растительноядных насекомых (см. табл. 20).

Случайные механические повреждения эпидермы и коры возникают постоянно, даже при трении надземных органов растения друг о друга. Плотного контакта корней также бывает достаточно для их поверхностного повреждения, благодаря чему вирусы проникают в клетки паренхимы.

Растительноядные животные и мелкие грызуны не выступают собственно векторами, однако они могут наносить механические повреждения органам и тканям растения, что обеспечивает проникновение фитовирусов.

Особенно опасны вирусы, передающиеся механическим путем при сгущенности посевов. Любые манипуляции с вегетативными органами растения (обрезка, пикировка, прививка, прореживание и т. д.) могут способствовать быстрому распростра-

нению инфекции. Фитовирусы длительное время, нередко более сезона, сохраняются в растительных останках, и поэтому поврежденные растения и их отдельные части предпочтительно уничтожать, а не компостировать.

Переносчики фитовирусов. Еще в конце XIX в. высказывались предположения о том, что фитовирусная инфекция может передаваться насекомыми. И хотя природа инфекционного агента оставалась неясной, в 1915 г. было экспериментально доказано, что курчавость верхушки растения сахарной свеклы передается цикадкой *Eutettix tenella*, причем для развития инфекции достаточно 5-минутного прокорма насекомого на здоровом растении. В настоящее время в число особо опасных переносчиков входят представители пяти отрядов насекомых: Coleoptera, Hemiptera, Homoptera, Lepidoptera и Thysanoptera. Сложные жизненные циклы переносчиков, включающие в себя смену хозяев и зимующие стадии, а также высокая скорость размножения, способность к миграции и быстрая адаптация в новых экосистемах обеспечивают фитовирусам практически неограниченные возможности для поддержания численности собственной популяции и ее распространения.

Характер взаимодействия фитовируса с соответствующим вектором может различаться.

Неперсистирующие, т. е. не сохраняющиеся в векторе, фитовирусы (от англ. persist — продолжать существовать) обычно передаются на конце стилета, через который насекомое высасывает растительный сок, хотя переносчик временно теряет свою эффективность при линьке. Фитовирус прикрепляется к вектору, а также отсоединяется от него в новом хозяине с помощью специальных вспомогательных белков (англ. **h**elper **pro**tein, Hpro), хотя иногда для прикрепления достаточно белка капсида — например в случае кукумовирусов (сем. *Bromoviridae*). Между питанием насекомого на носителе и инфицированием нового хозяина обычно проходит от нескольких секунд до нескольких минут, хотя вирус мозаики цветной капусты (CMV; сем. *Caulimoviridae*) может сохраняться на поверхности ротового аппарата тлей до нескольких часов. Неперсистирующие вирусы мало специфичны, и могут передаваться несколькими видами насекомых.

Персистирующие/циркулентные, т. е. сохраняющиеся в векторе и распространяющиеся по его органам и тканям фитовирусы (от англ. circulate — распространяться) проникают в пищеварительную и выделительную системы, а также в гемолимфу. Они могут долго сохраняться в теле насекомого, в частности, накапливаются в зимующих яйцах. Заражение нового хозяина происходит через несколько часов после начала кормления на вирусоносителе, например, тли-переносчики представителей семейства *Luteoviridae* становятся инфекционными только на следующий день.

Персистирующие/пропагативные фитовирусы (от англ. propagate — размножаться) не только проникают в тело вектора и распространяются по его органам и тканям, но и размножаются в нем. В данном случае инфекционность может сохраняться на протяжении всего жизненного цикла животного — например, у трипсов (сем. Thripidae), которые служат переносчиками вируса бронзовости томата (TSWV).

Пропагативные фитовирусы принадлежат к семействам *Bunyaviridae, Reoviridae и Rhabdoviridae*, к которым относится также ряд вирусов беспозвоночных и позвоночных. Предполагается, что все они произошли от вирусов насекомых, которые

в ходе эволюции адаптировались к размножению в хозяевах, относящихся к другим классам или даже к другому царству.

Переносчики фитовирусов. Успешность передачи фитовирусов, равно как и успешность их сохранения и/или размножения в векторе, зависят от ряда факторов, в частности от морфологии ротового аппарата и состава слюны организма-вектора, а также от структурных и неструктурных белков вируса.

К числу важнейших переносчиков фитовирусов относятся протисты, аскомицеты, нематоды, клещи и насекомые (табл. 20).

Таблица 20. **Способы передачи фитовирусов и ее посредники**

Семейство вируса	Типовой вид вируса	Способ передачи	Вектор
Bromoviridae	Вирус мозаики костра (*Bromus mosaic virus*)	Механический; с пыльцой или семенами; беспозвоночными	*Longidorus breviannulatus, Xiphinema coxi* (сем. Longidoridae, порядок Dorylaimida, тип Nematoda); *Oulema melanopus* (сем. Chrysomelidae, отряд Coleoptera, тип Arthropoda)
Bunyaviridae	Вирус бронзовости томата (*Tomato spotted wilt virus*)	То же	*Frankliniella bisponsa, F. fusca, F. intonsa, F. occidentalis, F. schultzei*; *Thrips tabaci, T. setosus* (сем. Thripidae, отряд Thysanoptera, тип Arthropoda)
Comoviridae	Вирус мозаики вигны (*Cowpea mosaic virus*)	Механический; беспозвоночными	*Cerotoma trifurcata* (сем. Chrysomelidae, порядок Coleoptera, тип Arthropoda)
Geminiviridae	Вирус курчавости листьев табака (*Tobacco leaf curl virus*)	Беспозвоночными	*Bemissia tabaci* (сем. Aleyrodoidae, порядок Homoptera, тип Arthropoda)
Luteoviridae	Вирус желтой карликовости ячменя (*Barley yellow dwarf virus*)	— » —	*Rhopalosiphum maidis, R. padi, Schizaphis graminum, Sitobion avenae* (сем. Aphididae, порядок Hemiptera, тип Arthropoda)
Potyviridae	Y-вирус картофеля (*Potato virus Y*)	Механический; с семенами; беспозвоночными	*Aphis fabae, A. nasturtii, Myzus persicae* (сем. Aphididae, порядок Hemiptera, тип Arthropoda,)
Rhabdoviridae	Вирус мозаики озимой пшеницы (*Winter wheat mosaic virus*)	Механический; беспозвоночными	*Macrosteles laevis, Psammotettix striatus* (сем. Cicadellidae, порядок Hemiptera, тип Arthropoda)
Tombusviridae	Вирус некроза табака (*Tobacco necrosis virus*)	Механический; протистами или беспозвоночными	*Olpidium brassicae* (сем. Olpidiaceae, порядок Spizellomycetales, отдел Chytrydiomycota)
Virgaviridae	Вирус погремковости табака (*Tobacco rattle virus*)	Механический; беспозвоночными или грибами	*Paratrichodorus minor, P. pachyderms, Trichodorus similis* (сем. Trichodoridae, порядок Triplonchida, тип Nematoda)

Протисты. В переносе фитовирусов участвуют фитопатогенные протисты, относящиеся к разным таксономическим группам.

В первую очередь это хитридиевые грибы (например, *Olpidium brassicae* и *Synchytrium endobioticum*), которые образуют амебоидные зооспоры, способные перемещаться по почвенным капиллярам на расстояние до нескольких метров.

После прикрепления к молодым корням они либо проникают внутрь клеток, где дают начало новому спорангию (в случае *O. brassicae*), либо разрастаются в тканях, образуя разветвленные ризоиды, внедряющиеся в цитоплазму (в случае *S. endobioticum*). На примере вируса некроза растения огурца (***Cucumber necrosis virus***, CNV) показано, что рецепторами служат поверхностные олигосахариды зооспоры. В результате адсорбции вируса изменяется конформация его структурных белков, и при попадании зооспор *O. brassicae* в клетки корня из дестабилизированной частицы высвобождается геномная РНК.

Другими протистами-переносчиками фитовирусов служат внутриклеточные паразиты-плазмодиофореи, которых по традиции считают грибами, хотя, согласно результатам молекулярно-филогенетического анализа, они принадлежат к протистам отдела Cercozoa. В их жизненном цикле имеется стадия двужгутиковой зооспоры и стадия внутриклеточного многоядерного плазмодия, который превращается в спорангий, окруженный клеточной стенкой растения-хозяина. Наиболее известен вид *Plasmodiophora brassica*, паразитирующий на капусте и других крестоцветных (сем. Cruciferae), однако он не играет существенной роли в передаче фитовирусов. Зато другой вид, *Polymyxa gramini*, очень активно переносит разных фитовирусов, поэтому его распространение необходимо особо контролировать при массовом выращивании картофеля, пшеницы и ячменя. Фитовирусов, которых переносят плазмодиофореи, можно рассматривать как персистирующих/циркулентных; в покоящихся спорах они сохраняют инфекционность годами.

Аскомицеты. Известны примеры, когда фитовирусы специфически переносятся аскомицетами. В частности, *Spongospora subterranea* форма-вид *nasturtii* служит вектором для вируса желтой пятнистости кресса водяного (***Watercress yellow spot virus***, WYSV), а форма-вид *subterranea* передает вирус метельчатости верхушки растения картофеля (***Potato mop-top virus***, PMTV).

Нематоды. Почвенные нематоды, в частности 7 видов рода *Paratrichodorus* и 4 вида рода *Trichodorus*, переносят тобравирусов (сем. *Virgaviridae*) и неповирусов (сем. *Comoviridae*),

Передача вируса, механизм которой неизвестен, высокоспецифична — штаммы, относящиеся к разным серотипам, используют разные векторы. Благодаря нематодам фитовирусы могут в течение нескольких лет сохраняться в почве на корнях древесных культур. Избавиться от нематод очень трудно; применяемые против них ядохимикаты эффективны относительно не продолжительный срок. Такое распространение фитовирусов очень трудно ограничить и, тем более, предотвратить.

Клещи. Эти паукообразные, относящиеся к подклассу Acarina, переносят римовирусов (сем. *Potyviridae*), которые вызывают болезни пшеницы, райграса и ячменя.

Насекомые. Тли (отряд Homoptera) служат переносчиками для 19 родов фитовирусов, прокалывая стенку клеток эпидермы и внедряя стилет в проводящую систему. Эти насекомые сами являются сельскохозяйственными вредителями, а в сочетании с вирусной инфекцией их фитопатогенный эффект умножается.

Продолжительность сложного жизненного цикла тлей зависит от окружающих условий; в теплом климате он занимает 10–12 дней (число генераций за год достигает 20). Смена стадий онтогенеза насекомого может сопровождаться изменениями

кормовой базы (например, при переходе с травянистых растений на древесные). В зависимости от среды обитания жизненный цикл тлей может включать в себя стадию перезимовывающих яиц, а также расселительную стадию. Хотя средний радиус миграции не превышает 100–120 м, в пределах которого сосредоточено до 90% заражаемых растений, отдельные особи тлей переносят инфекцию на расстояние свыше 1 км. В связи с этим рекомендуется разбивать новые питомники и насаждать лесные массивы на расстоянии не менее 500 м от уже существующих. Особый ущерб наносят тли-космополиты, например *Myzus persicae* переносит более 70 видов фитовирусов.

Помимо тлей в распространении фитовирусов активно участвуют белокрылки (сем. Aleyrodidae). В частности, *Bemisia tabaci* встречается на всех континентах за исключением Антарктиды; будучи занесено однократно, это насекомое стремительно расширяет свой местный ареал. Белокрылка служит вектором для 111 видов фитовирусов, а ее кормовая база насчитывает 900 видов растений, что вызывает крупные потери урожая во всем мире.

Как правило, переносчики конкретного вида фитовирусов принадлежат к одной и той же систематической группе, однако известны примеры широкого промискуитета (см. табл. 20). Например, вирус кольцевой пятнистости табака (TRSV) может передаваться нематодами, а также несколькими видами трипсов. В свою очередь, вирус мозаики костра (***Bromus mosaic virus***, BMV), который передается преимущественно механическим путем, может распространяться жуками и нематодами.

Фитовирусы очень быстро адаптируются к новым хозяевам; в частности, показано, что тобравирусы (***Tobacco rattle virus***; вне семейства) уже через два пассажа на модельном растении теряют фрагмент геномной РНК с генами, ответственными за передачу нематодами.

Благодаря высокой частоте смешанных и сочетанных инфекций фитовирусы, дефектные по факторам переноса, используют белки вирусов-хелперов. Известны многочисленные случаи гетерологичной упаковки генома потивирусов и лютеовирусов, что позволяет осуществлять неперсистентную передачу с помощью «чужого» вектора.

Многие фитовирусы переносятся с пыльцой или с семенами. Соответствующие механизмы не вполне ясны; предполагается, что они контролируются несколькими генами материнского растения. Установлено, что вертикальная передача не связана с интеграцией в геном хозяина, т. е. в данном случае фитовирусы ведут себя как факторы цитоплазматического наследования. Тем не менее их накопление в пыльце может приводить к стерильности.

5.5. ПУТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ФИТОВИРУСОВ В ТЕЛЕ РАСТЕНИЯ

В 1934 г. австралийский вирусолог Джеффри Сэмюэль (G. Samuel) в своих классических опытах с вирусом табачной мозаики (TMV) показал, что инфекция распространяется из зоны первичного заражения по проводящей системе; в конечном счете заражаются молодые и старые листья, верхние и боковые побеги, а также корни.

При вирусной болезни агент должен распространиться из первоначально инфицированной в остальные части растения. Такой процесс, или системная инфекция

(англ. systemic infection), осуществляется в несколько этапов, причем вирус использует структуры растения, которые в норме служат для транспорта эндогенных макромолекул.

Сначала либо вирион, либо специализированный нуклеопротеиновый комплекс доставляются из сайта репликации, которым служит участок эндоплазматического ретикулума, к плазмодесме; это так называемый ***внутриклеточный транспорт*** (англ. intracellular movement). Затем вирус проходит сквозь плазмодесму и попадает в соседнюю клетку; это так называемый ***межклеточный транспорт*** (англ. cell-to-cell movement). Наконец, вирус передается по сосудистой системе, обычно по ситовидным трубкам флоэмы от органа к органу; это так называемый ***дистанционный транспорт*** (англ. long-distance movement).

Белки движения. В перемещении фитовируса по телу растения участвуют транспортные белки вирусного кодирования, или белки движения (англ. **m**ovement **p**rotein, MP). Первый из них, молекулярной массой 30 кДа, был обнаружен в 1978 г. у вируса TMV.

Белки MP имеются у большинства РНК-содержащих и ДНК-содержащих фитовирусов. Их аминокислотные последовательности различаются у представителей разных таксономических групп. Кроме того, белки MP могут по-разному участвовать в транслокации вируса, когда он существует в форме нуклеопротеинового комплекса или в форме вириона. Наконец, для некоторых систем транслокации достаточно использовать только белки MP, тогда как в других случаях к решению этой задачи привлекаются другие вирусные белки.

Межклеточный транспорт вирусного нуклеопротеина с участием белка движения. В качестве примера белка движения можно привести белок MP (30 кДа), который обеспечивает межклеточный транспорт вируса TMV в форме нуклеопротеина.

На уровне эндоплазматического ретикулума несколько молекул белка MP кооперативно взаимодействуют с ssРНК (за счет двух РНК-связывающих доменов в области аминокислотных остатков 112–185 и 186–268 независимо от нуклеотидной последовательности). В результате образуется нетранслируемый комплекс — продолговатые частицы вирусного нуклеопротеина диаметром 2–3 нм. Этот комплекс доставляется к плазмодесме по системе актиновых филаментов, взаимодействующих с эндоплазматическим ретикулумом и его производным — десмотубулой плазмодесмы.

В обычном состоянии плазмодесма пропускает диффундирующие молекулы диаметром ~0,2 нм (≤1 кДа). Для прохождения вирусного нуклеопротеина просвет, или эксклюзионный диаметр (англ. **s**ize **e**xclusion **l**imit, SEL), плазмодесмы необходимо увеличить почти на порядок. Это достигается с помощью белка MP (за связывание с плазмодесмой отвечают аминокислотные остатки 3–5 и 195–213, а за прохождение через нее — аминокислотные остатки 126–224).

В ходе взаимодействия с плазмодесмой белок MP переходит из активной формы, с помощью которой увеличивается эксклюзионный диаметр плазмодесмы, в неактивную форму. Инактивация осуществляется в результате фосфорилирования, сайт которого находится на С-конце молекулы белка MP. Фосфорилирование белка MP в составе нуклеопротеинового комплекса лишает его способности подавлять трансляцию и дестабилизирует комплекс. Высвобождающаяся РНК получает возможность

транслироваться, а затем реплицироваться. Таким образом, транслокация в соседнюю клетку служит не только для распространения вируса, но и регулирует начало нового инфекционного цикла.

При прохождении через плазмодесму вирусный нуклеопротеин взаимодействует с актиновыми микрофиламентами/миозиновыми моторами, которые, в свою очередь, ассоциированы с десмотубулой (см. выше).

Межклеточный транспорт вирусного нуклеопротеина с участием белка движения и капсидного белка. У некоторых РНК-содержащих фитовирусов, в частности у вируса мозаики растения огурца (CMV), нуклеопротеин транслоцируется с помощью капсидного белка (англ. coat protein, CP), который наряду с защитной функцией начинает выполнять транспортную функцию.

Предполагается, что вирусный нуклеопротеин сам по себе не способен транслоцироваться из одной клетки в другую. В то же время белок CP индуцирует конформационное изменение белка MP, и он прочнее связывается с геномной РНК. Это стабилизирует комплекс и делает его транслокационно-компетентным.

Таким образом, белки MP фитовирусов можно подразделить на две группы: обходящиеся без белка CP и нуждающиеся в помощи белка CP, но не вириона в целом.

Межклеточный транспорт вирусного нуклеопротеина с участием нескольких белков движения. У многих фитовирусов имеется консервативный генетический модуль в виде трех частично перекрывающихся ORF, который называется тройственным блоком генов (англ. triple gene block, TGB). Он кодирует три белка движения, которые в соответствии с их расположением в модуле обозначаются как TGB1, TGB2 и TGB3.

РНК-содержащие фитовирусы, у которых имеются белки TGB, подразделяются на две группы — палочковидные вирусы с сегментированными ssРНК-геномами («гордеиподобные» вирусы родов *Benyvirus*, *Hordeivirus* и *Pomovirus*) и нитчатые вирусы с несегментированными ssРНК-геномами («потексподобные» вирусы родов *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus* и *Potexvirus*).

Главное различие систем транслокации «гордеиподобных» и «потексподобных» вирусов заключается в том, что в первом случае не требуется участие белка CP. «Гордеиподобные» вирусы транспортируются в форме TGB1-содержащего нуклеопротеина (молекулы белка TGB1 содержат нуклеозидтрифосфатазный/АТФ-зависимый геликазный домен; они связываются в цитоплазме с геномной РНК, образуя нуклеопротеиновый комплекс). Для межклеточного транспорта этих вирусов необходимы белки TGB2/TGB3 (их молекулы содержат трансмембранный домен и выполняют роль мембранного якоря, обеспечивающего доставку нуклеопротеинового комплекса к плазмодесме). «Потексподобные» вирусы, напротив, транспортируются в форме частично или полностью собранного нитчатого вириона. Его 5′-конец взаимодействует с несколькими молекулами белка TGB1, благодаря чему при прохождении через плазмодесму вирион дестабилизируется. В результате проникшая в соседнюю клетку геномная РНК может транслироваться.

Межклеточный транспорт вируса с использованием тубулярной структуры. Особую стратегию транслокации проявляют вирусы родов *Comovirus* и *Nepovirus* (сем. *Secoviridae*), в частности комовирус мозаики коровьего гороха (*Cowpea mosaic virus*, CPMV). Для межклеточного транспорта в форме вириона эти небольшие ико-

саэдрические вирусы индуцируют образование внутри сильно видоизмененной плазмодесмы специфической тубулярной структуры диаметром около 30 нм, которая заполняется цепочкой вирионов.

Материалом тубулярной структуры служит белок MP (48 кДа). Для его доставки к плазмодесме не используются ни секреторный путь, ни цитоскелет; предполагается, что он мигрирует по эндоплазматическому ретикулуму или достигает цитоплазматической мембраны простой диффузией.

В молекуле белка MP вируса CPMV имеется несколько функциональных доменов. Домен, ответственный за формирование тубулярной структуры, используется для таргетинга димеров белка MP к цитоплазматической мембране; С-концевой домен способствует внедрению вирионов внутрь тубулярной структуры по мере ее сборки на «донорном» конце. На противоположном, «акцепторном», конце тубулярная структура разбирается, высвобождая вирионы в цитоплазму соседней клетки.

Межклеточный транспорт вируса в отсутствие белков движения. Нитчатые вирусы из рода *Potyvirus*, которые транслоцируются в форме вириона, не используют белки движения. Тем не менее эти вирусы индуцируют увеличение эксклюзионного диаметра плазмодесмы и проникают через нее в соседнюю клетку. Активным участником транспорта является геном-ассоциированный белок VPg (сокр. от англ. **v**iral **p**rotein, **g**enome-linked), который ковалентно связывается с 5′-концом геномной РНК. Он вступает во взаимодействие с двумя хозяйскими белками — фактором инициации трансляции eIF-4E и белком PVIP (сокр. от англ. **p**otyvirus **V**Pg **i**nteracting **p**rotein). Первый из них имеет высокое сродство к микротрубочкам, что может способствовать перемещению вируса.

Предполагается, что транслокация потивируса происходит за счет образующегося на 5′-конце его вириона специализированного комплекса, состоящего из вирусного белка Vpg и вирусной протеазы HC-pro (сокр. от англ. **h**elper **c**omponent-**pro**teinase), а также клеточных белков eIF-4E и PVIP. При прохождении через плазмодесму геномная РНК декапсидируется, и белок eIF-4E инициирует ее трансляцию в соседней клетке.

У нитчатых вирусов рода *Closterovirus* на одном из концов очень длинного вириона (~1300 нм) находится небольшой «хвост», содержащий минорный капсидный белок CPm (сокр. от англ. **c**oat **p**rotein, **m**inor), белок Hsp70h (гомолог клеточного шаперона Hsp70), белок p64 (64 кДа) и белок p20 (20 кДа). Все они, за исключением белка p20, необходимы как для сборки вириона, так и для его транслокации; особо важная роль отводится белку Hsp70h, за счет АТФазной активности которого вирион такой большой длины может доставляться в соседнюю клетку. В свою очередь, «хвост» может контролировать полярную дестабилизацию и разборку вириона, что позволяет защитить крупный геном от деградации под воздействием хозяйской системы сайленсинга РНК (см. раздел 1.7.3).

Дистанционный транспорт. Межклеточный транспорт и дистанционный транспорт — это разные процессы, в которых участвуют разные вирусные белки.

Дистанционный транспорт осуществляется и по ксилеме, и по флоэме (преимущественно по флоэме) со скоростью 1,5–8 см·ч$^{-1}$. До сих пор неизвестно, каким образом вирус проникает в сложноорганизованную сосудистую систему флоэмы, которая окружена сосудистой обкладкой и состоит из клеток нескольких типов, в том числе

клеток сосудистой паренхимы, ситовидных элементов и клеток-спутников. Неизвестно также, как он перемещается по флоэме и как он ее покидает.

При транслокации в сосудистую систему вирус должен перейти из мезофилла в клетки сосудистой обкладки, затем проникнуть в клетки сосудистой паренхимы и/или клетки-спутники и, наконец, попасть в ситовидные элементы. При транслокации из сосудистой системы эти этапы проходятся в обратном порядке. Проникновение в ситовидные элементы, в частности, обеспечивается плазмодесмами, которые пропускают молекулы массой 20–50 кДа.

При перемещении по проводящей системе вирусы эксплуатируют основные пути транспорта сигнальных молекул растения. Дистанционный транспорт столь же разнообразен по механизму и составу комплексов, как и межклеточный. Он также требует участия вирусных белков, в том числе белков CP.

Некоторые фитовирусы кодируют специфические белки, необходимые для системной инфекции; примером служат белки L-pro и p20 вируса желтизны свеклы (*Beet yellows virus*, BYV).

Поскольку у растений обнаружены паралоги генов белков MP, предполагается, что вирусы получили транспортные белки от своего хозяина.

5.6. БИОРАЗНООБРАЗИЕ ФИТОВИРУСОВ

У подавляющего большинства фитовирусов геномной нуклеиновой кислотой является РНК. Что касается ДНК-содержащих представителей, то они относятся только к двум семействам — *Caulimoviridae* (dsДНК-фитовирусы) и *Geminiviridae* (ssДНК-фитовирусы).

Отметим, что у фитовирусов семейства *Caulimoviridae* в репликативном цикле есть стадия обратной транскрипции, в то время как dsДНК-фитовирусы, геном которых реплицировался бы с помощью ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, не обнаружены.

5.6.1. ФИТОВИРУСЫ С ГЕНОМНОЙ ssДНК. СЕМЕЙСТВО *GEMINIVIRIDAE*

Фитовирусы, содержащие sДНК, образуют вирионы разной морфологии, а также различаются по структуре генома и стратегии его репликации. Эти ведущие таксономические признаки варьируют даже на уровне родов одного и того же семейства.

Эти фитовирусы распространены по всему Земному шару и впервые описаны в ходе обширных эпифитотий. Они поражают однодольные и двудольные растения, нанося ощутимый вред мировому сельскому хозяйству.

В то же время такие вирусы ценны как векторы, используемые при проведении молекулярно-биологических исследований, а их генетические элементы применяются в генной инженерии.

Название семейства фитовирусов *Geminiviridae* объясняется тем, что их вирионы соединяются попарно (лат. gemini — близнецы).

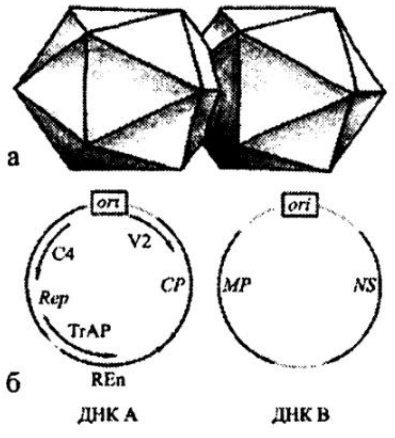


Рис. 61. Капсиды (а) и карта генома (б) бегомовирусов (по: Bisaro, 1996).

Rep — ген мультифункционального белка репликации; *CP* — ген белка капсида; C4 — рамка считывания ДНК(–); V2 — рамка считывания ДНК(+), отсутствующая у бегомовирусов Нового Света; *MP* — ген белка движения; *NS* — ген белка транспорта в ядро; TrAP — активатор транскрипции; REn — регуляторный белок репликации.

По часовой стрелке — транскрипция ДНК(+); против часовой стрелки — транскрипция ДНК(–).

Структура семейства. Семейство *Geminiviridae* подразделяется на рода *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* и *Topocuvirus* в соответствии с особенностями организации генома, хозяйской специфичностью и кругом переносчиков.

Геминивирусы распространяются белокрылками, саранчой и другими насекомыми; у некоторых хозяев они вызывают персистентную инфекцию. Они заражают бобовые, клевер, пшеницу и ячмень, нанося большой вред посевам.

Строение вириона. Частицы геминивирусов квазиизометрические; два неполных икосаэдра (T=1) размером 15–20 нм каждый сближены и развернуты относительно друг друга на 20° (рис. 61).

Строение генома. Размер генома геминивирусов составляет 4,8–5,6 тыс. н.; это пример одного из самых маленьких вирусных геномов, еще способных к самостоятельной репликации.

Геномная нуклеиновая кислота представляет собой кольцевую ssДНК. Геном сегментирован (сегменты А и В имеют одинаковый размер, но содержат разное число ORF) и может быть как монопартитным, так и бипартитным. У бипартитных представителей рода *Begomovirus* разные сегменты генома упаковываются в отдельные капсиды.

Цикл размножения. Геминивирусы размножаются в ядре, чаще всего в клетках флоэмы. Геномная ДНК реплицируется с помощью механизма «катящееся кольцо». Вирусный инициаторный белок Rep (320–400 а.о.) связывается с сайтом *ori*, который имеет сходный размер у всех известных геминивирусов (200 н.) и содержит прямые 5-нуклеотидные повторы-итероны (англ. iteron; от лат. iteratio — повторение и греч. ontos — сущее; *нечто повторяющееся*). В результате этого за счет участков комплементарности в сайте *ori* образуется шпилька, на вершине которой белок Rep наносит разрез. Поскольку репликация зависит от клеточных полимераз, размножение геминивирусов происходит преимущественно в фазе синтеза клеточной ДНК (S-фазе), и белок Rep ускоряет ее наступление.

Первым репликативным интермедиатом является dsДНК. Регуляция смены репликативных форм очень похожа на таковую у бактериофагов семейства *Inoviridae*.

При транскрипции бипартитных геномов у наиболее изученных, благодаря своему экономическому значению, представителей рода *Begomovirus* в качестве матрицы используются сегменты A и B репликативного интермедиата ДНК(–). Они содержат разное число ORF, причем транскрибироваться может как плюс-нить, так и минус-нить. Таким образом, ДНК бегомовирусов может рассматриваться как «двусмысленная»; подобная стратегия кодирования позволяет разместить максимальное число ORF на небольшом участке геномной молекулы, а также регулировать последовательность их экспрессии.

Пять ORF сегмента A кодируют белок капсида и белки, участвующие в репликации. Белок Rep считывается с минус-нити после того, как появляется ds-интермедиат; тем самым обеспечивается своевременный переход от dsДНК к ssДНК. Белки, закодированные в сегменте B, необходимы для дальнего транспорта, а также определяют круг хозяев.

У монопартитных бегомовирусов недавно обнаружены сателлитные ДНК (ДНКβ) размером около половины сегмента A, которые реплицируются и упаковываются при участии белков вируса-хелпера. Более того, они упаковываются совместно с ДНК разных хелперов, что обеспечивает разнообразие проявлений вирусной инфекции. Помимо этого у бегомовирусов описаны самореплицирующиеся ДНКβ-подобные молекулы, сходные по нуклеотидным последовательностям с геномной ssДНК вирусов семейства *Nanoviridae*. Эти геномные компоненты могут рекомбинировать с геномами разных геминивирусов, изменяя характер их передачи.

Теоретически вирусы, образующие репликационные dsДНК-интермедиаты, способны к лизогении. Примечательно, что участки нуклеотидных последовательностей геминивирусов обнаружены в геномах некоторых видов рода *Nicotiana*, что указывает на возможную роль вирусов в изменчивости их хозяев.

5.6.2. ФИТОВИРУСЫ С ГЕНОМНОЙ dsРНК

Представители этой, относительно небольшой, группы фитовирусов принадлежат к семейству *Reoviridae*. К фитореовирусам относятся виды родов *Fijivirus, Oryzavirus и Phytoreovirus*. Они распространены в Азии (преимущественно в южном Китае и Японии), а также в Африке и Северной Америке. К наиболее изученным представителям данной группы относятся вирус карликовости риса (RDV) и вирус раневых опухолей (WTV).

Фитореовирусы инфицируют как однодольные, так и двудольные растения. Симптомами заболевания служат галлы на листьях, наросты на стеблях и опухоли на корнях, а также гиперплазия флоэмы.

Реовирус RDV вызывает полосатость листа у однодольных растений. В свою очередь, реовирус WTV, заражающий свыше 50 видов бобовых, индуцирует образование небольших опухолей на стеблях, а также крупных опухолей на корнях; при инфекции лобелий (*Lobelia* sp.) и некоторых других декоративных растений наблюдается аномальный морфогенез, например, на нижней стороне листовой пластинки образуется дополнительный лист.

Для фитореовирусов характерен персистентный тип инфекции; они распространяются цикадками (в которых размножаются), причем насекомое сохраняет инфек-

ционность всю жизнь, т. е. 10–20 дней. Фитореовирусы способны инфицировать растения только с помощью вектора; механически передать инфекцию не удается.

Строение вириона. Фитореовирусы образуют капсиды размером 55–88 нм, состоящие из внешнего белкового слоя и внутреннего кора, в состав которого входят несколько субъединиц РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP), а также кэпирующий фермент — 7-метилгуанидилтрансфераза.

Строение генома. Геном фитореовирусов (19–32 тыс. п.н.) сегментирован; вирион содержит по одной копии каждого сегмента. В частности, геном вируса RDV (25,7 тыс. п.н.) состоит из 12 сегментов. Каждый из них содержит одну ORF (помимо 11 и 12-го сегментов, в которых две ORF). Как у всех фитовирусов, последовательности на 5′-конце и на 3′-конце консервативны.

Цикл размножения. Стратегия размножения dsРНК-фитовирусов такая же, как у dsРНК-вирусов животных.

Связанная с вирионом RdRP синтезирует РНК(+). Как у всех dsРНК-содержащих вирусов, структурные белки входят в состав репликативного интермедиата. На этой стадии одновременно происходит транскрипция, которая осуществляется внутри однослойного прокапсида; образовавшиеся РНК(+) выходят в цитоплазму и используются в качестве мРНК. Когда накапливается достаточно структурных белков, геномная РНК(+) совместно с РНК-полимеразой начинают упаковываться в прокапсид, внутри которого достраиваются минус-нити.

О цикле репродукции фитореовирусов многое еще предстоит выяснить. Самая актуальная проблема — избирательность упаковки вирусных мРНК в прокапсид; предполагается, что этот процесс регулируется вторичными шпилечными структурами, которые обеспечивают взаимодействие РНК с белками.

5.6.3. ФИТОВИРУСЫ С ГЕНОМНОЙ ssРНК(+)

Эта группа фитовирусов наиболее разнообразна и насчитывает свыше десяти семейств, к которым принадлежит 65% изолятов.

Репликация и упаковка геномной РНК исключительно специфичны (последняя безошибочно выбирается из множества типов РНК, присутствующих в клетке); они чаще всего регулируются не на уровне первичных последовательностей, а на уровне вторичных структур (петель, тРНК-подобных шпилек и псевдоузлов), которые способны взаимодействовать только с вирусными ферментами и структурными белками.

Репликация РНК(+)-геномов. В отличие от ДНК-полимераз, РНК-полимеразы не нуждаются в РНК-праймировании и не сталкиваются с проблемой репликации концов геномной молекулы. Соответственно большинство РНК-геномов вирусов линейны.

Помимо РНК-полимеразы в процессе репликации участвует геликаза, которая необходима для предотвращения внутримолекулярного спаривания оснований в ходе синтеза РНК. Хозяйские белки играют существенную роль в репликации РНК-содержащих вирусов, будучи частью полимеразного комплекса. Во всех случаях, когда проводились специальные исследования, показано, что полимеразный комплекс фитовирусов связан с внутренними мембранами клетки; заякоривание репликазного аппарата обеспечивают как клеточные, так и вирусные белки.

Изменчивость РНК-геномов. В отличие от ДНК-зависимых ДНК-полимераз, РНК-зависимые РНК-полимеразы не способны к автокоррекции. В результате частота возникновения ошибок оказывается на несколько порядков выше, чем при репликации ДНК. Поскольку число ошибок пропорционально размеру генома, последний в ходе эволюции закономерно сокращался и не превышает 5–15 тыс. н. Благодаря накоплению неисправленных ошибок (случайных мутаций) популяции РНК-содержащих вирусов генетически неоднородны, что способствует конкурентному отбору в ходе адаптации к окружающей среде.

Изменчивость РНК-геномов также обеспечивается рекомбинацией, которая бывает трех типов: гомологическая, аберрантная гомологическая (англ. aberrant — отклоняющийся от нормы) и негомологическая (рис. 62).

Гомологическая рекомбинация (рис. 62, а). Она осуществляется между геномными молекулами, обладающими высокой степенью взаимного сходства. Сайты рекомбинации имеют одинаковую локализацию, и фланкирующие их последовательности сходны. Рекомбинанты сохраняют размер и структуру родительских геномных молекул. Обычно в рекомбинацию данного типа вовлекаются полноразмерные геномы.

Аберрантная гомологическая рекомбинация (рис. 62, б). В ней, как и в гомологической рекомбинации, участвуют две геномные молекулы с взаимно сходными последовательностями. Однако сайты рекомбинации различаются по локализации; поэтому рекомбинант содержит повторы, делеции и вставки (предполагается, что они возникают при одновременно протекающей рекомбинации и репликации). Фланкирующие участки не обладают взаимным сходством. Такой тип рекомбинации характерен для дефектных геномных молекул.

Гомологическая и аберрантная гомологическая рекомбинации продемонстрированы в лабораторных условиях на примерах вируса мозаики костра (BMV; сем. *Bromoviridae*), вируса погремковости табака (TRV; сем. *Virgaviridae*) и вируса мозаики люцерны (*Alfalfa mosaic virus*, AMV; сем. *Bromoviridae*).

Негомологическая, или незаконная, рекомбинация (рис. 62, в). Она происходит между несходными геномными молекулами; механизм ее пока не ясен. Предполагается, что в данном случае сайты рекомбинации имеют одинаковую вторичную структу-

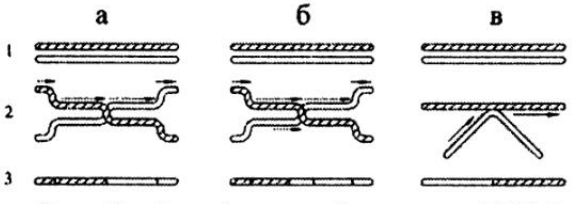


Рис. 62. Способы рекомбинации у РНК(+)-содержащих фитовирусов.

а — гомологическая рекомбинация; б — аберрантная гомологическая; в — негомологическая рекомбинация.

1 — родительские нити ДНК; 2 — рекомбинация; 3 — рекомбинантная нить.

Стрелки — фрагменты, вошедшие в состав рекомбинантной нити.

ру. По-видимому, именно таким путем возникают наблюдаемые у РНК-вирусов генные перестановки, вставки и делеции.

Транскрипция РНК(+)-геномов. В случае РНК(+)-вирусов транскрипция является вторым этапом репликации и происходит на матрице интермедиата — минус-нити. Она осуществляется тем же ферментом, что и репликация — вирусоспецифичной RdRP, которая «по совместительству» служит транскриптазой; поэтому процессы репликации и транскрипции взаимосвязаны.

Субгеномные РНК. Самой распространенной стратегией, обеспечивающей синтез мРНК с 3′-конца геномной РНК, является синтез РНК(–)-репликативных интермедиатов, или субгеномных РНК (англ. **subgenomic RNA**, sgRNA). При их транскрипции РНК-полимераза взаимодействует с внутренним субгеномным промотором (англ. **subgenomic promoter**, SGP).

У субгеномных РНК отсутствует сигнал терминации; поэтому 3′-конец, а также первый с 5′-конца нуклеотид у них такие же, как у геномной РНК. Терминальные модифицирующие структуры (в частности, кэпы) также идентичны. Количество субгеномных РНК превышает потребности вирусов в синтезе белков, поэтому эти РНК часто упаковываются в вирионы совместно с геномной РНК.

Сателлитные РНК. Помимо субгеномных РНК в вирионах может содержаться линейная или кольцевая сателлитная РНК. В отличие от геномной РНК вируса-сателлита, она упаковывается в капсид совместно с геномом вируса-хелпера и имеет следующие особенности:

— малый размер (200–1500 н., преимущественно 350 н.);
— отсутствие гомологии с основным геномом;
— наличие генов, не участвующих в репликации;
— репликация за счет вируса-хелпера;
— влияние на симптоматику заболевания.

Трансляция. Геномная РНК(+)-фитовирусов может непосредственно выполнять роль мРНК.

Кэп-зависимая и кэп-независимая трансляция. Как известно, молекулы мРНК у эукариотов содержат кэп ($m^7G(5')–PPP–(N)_n$) на 5′-конце и полиА-последовательность на 3′-конце, что требуется для инициации трансляции. Упрощенная схема кэп-зависимой трансляции приведена на рис. 63.

Для разных семейств фитовирусов характерно наличие или отсутствие концевых модификаций геномной ssРНК(+). В частности, она может:

— повторять структуру эукариотной мРНК, т.е. быть кэпированной и полиаденилированной;
— содержать кэп на 5′-конце и тРНК-подобную шпилечную структуру на 3′-конце;
— содержать ковалентно присоединенный белок на 5′-конце и полиА-последовательность на 3′-конце;
— не содержать ни кэпа, ни полиА.

Каждая из этих разновидностей генома имеет свои особенности репликации и экспрессии генов.

Наряду с кэп-зависимой трансляцией, которая обеспечивает считывание первого стартового кодона с 5′-конца, у эукариотов существует кэп-независимый механизм,

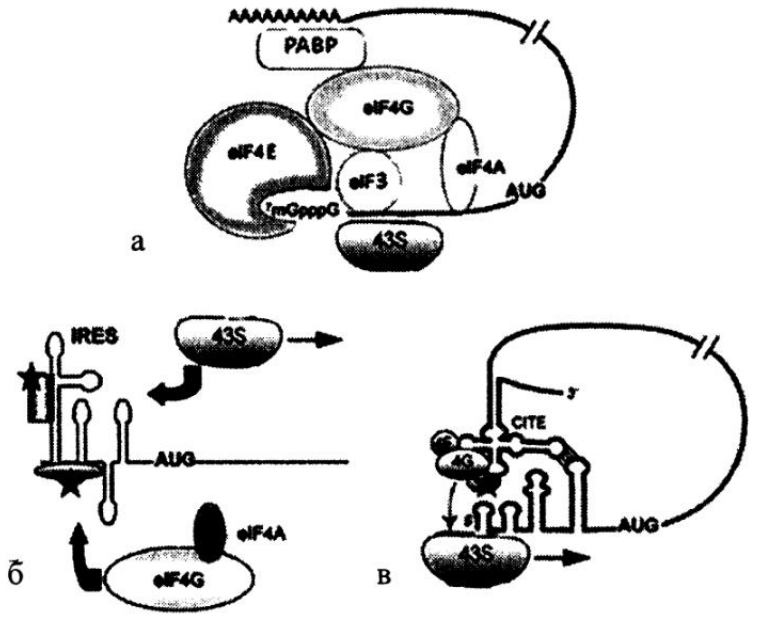


Рис. 63. Инициация трансляции у РНК(+)-содержащих фитовирусов (по: Rakotondrafara *et al.*, 2006; Teder *et al.*, 2007).

а — кэп-зависимая трансляция; б — инициация трансляции 5′-некодирующими сайтами IRES; в — инициация трансляции 3′-сайтами CITE.

eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4E и eIF4G — факторы инициации трансляции; PABP — белок, присоединяющийся к полиА-последовательности; 43S — комплекс из 40S-субъединицы, фактора eIF2, ГТФ и Met-тРНК (перемещается в область стартового кодона AUG, после распознавания которого за счет гидролиза ГТФ присоединяется 60S-субъединица и образуется первая пептидная связь).

Звездочки — дополнительные белки, участвующие в инициации трансляции.

позволяющий рибосомам связываться со старт-кодоном на значительном расстоянии от 5′-конца. В данном случае используются межцистронные шпилечные структуры, которые образуются в сайтах IRES (сокр. от англ. internal ribosome enrty site) (рис. 63).

Фитовирусы также используют сайты IRES для инициации трансляции своих мРНК. Помимо этого на 3′-конце фитовирусной мРНК могут находиться сайты CITE (сокр. от англ. cap-independent translation element), которые не имеют аналогов в составе эукариотных мРНК. В настоящее время известно 6 классов таких сайтов, которые различаются нуклеотидной последовательностью, однако образуют одинаковые шпилечные структуры (интересно, что различие в строении этих сайтов не связано с принадлежностью фитовирусов к тем или иным таксономическим группам).

Благодаря взаимодействию с 5′-концом мРНК сайты CITE способствуют образованию трансляционного комплекса (рис. 63).

Инициация трансляции внутри ORF (англ. in-frame initiation). Предполагается, что рибосомные комплексы присоединяются к IRES-подобным сайтам по соседству с внутренними старт-кодонами. Такой механизм описан, в частности, у потивирусов.

Сдвиг рамки считывания в ходе элонгации транскрипта (англ. frameshift). Сдвиг рамки считывания происходит при перемещении рибосомы как в направлении 5′-конца (–1), так и в направлении 3′-конца (+1) молекулы мРНК. В результате образуются два белка, идентичные на всем протяжении от N-конца до точки сдвига. К числу инициирующих факторов относятся сигнальные нуклеотидные последовательности, расположенные по соседству с сайтом сдвига, а также вторичные структуры мРНК. Предполагается, что такая стратегия трансляции используется всеми РНК(+)-фитовирусами, хотя пока она описана только у лютеовирусов.

Пропуск терминального кодона (англ. read-through). Трансляция прекращается по достижении терминального кодона. Однако при наличии аминоацил-тРНК, распознающей этот кодон, она может быть продолжена, в результате чего образуются два белка. Более короткий из них (преобладающий) идентичен N-концевому участку более длинного. Данный механизм описан у представителей семейств *Luteoviridae*, *Tombusviridae и Virgaviridae*.

Посттрансляционный процессинг. Он заключается в протеолитическом расщеплении полипротеина-предшественника, транслированного с одной мРНК. Лютеовирусы, потивирусы и собемовирусы кодируют собственные протеазы, которые по аминокислотной последовательности каталитического домена сходны с клеточными химотрипсиновыми и папаиновыми протеазами.

5.6.3.1. Семейства *Alphaflexiviridae* и *Betaflexiviridae*

Три семейства флексивирусов — *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae и Gammaflexiviridae*, получили названия из-за характерной формы гибких нитевидных вирионов (от лат. flexilis — гибкий). Хозяевами альфа-флексивирусов служат растения или грибы, бета-флексивирусов — только растения, тогда как гамма-флексивирусы паразитируют исключительно на грибах (см. раздел 4.3.1).

В настоящее время выделяют четыре рода альфафлексивирусов (*Allexivirus*, *Lolavirus*, *Mandarivirus и Potexvirus*) и шесть родов бетафлексивирусов (*Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus и Vitivirus*).

Общими признаками фитофлексивирусов являются:

— нитевидные гибкие вирионы размером 400–1000×12–13 нм;

— капсид, построенный из белка единственного типа (22–44 кДа);

— монопартитный геном на основе кэпированной и полиаденилированной РНК(+), содержащий до шести частично перекрывающихся ORF;

— трансляция хотя бы одной из ORF с субгеномной РНК;

— препротеин (150–250 кДа), транслируемый с ORF1, продуктами процессинга которого являются RdRP, геликаза и метилтрансфераза.

При транслокации у фитофлексивирусов используется либо один белок движения (30 кДа), либо белки движения, которые кодирует триада взаимно перекрывающихся генов.

Члены сборной группы фитофлексивирусов инфицируют очень широкий круг однодольных и двудольных растений, представленных травянистыми или древесными формами. В то же время круг хозяев у конкретных видов очень узок. Вызываемые

ими заболевания не летальны, и ярко выраженные макроскопические симптомы, как правило, отсутствуют. Характерным ультраструктурным признаком болезни служит цитоплазматический гранулез, т.е. образование в цитоплазме микроскопических агрегатов вирусных частиц.

Фитофлексивирусы переносятся механическим способом или с помощью векторов; в частности, представители рода *Carlavirus* передаются тлями, а родов *Allexivirus* и *Trichovirus* — клещами.

По масштабу наносимого ущерба наиболее важным видом является Х-вирус картофеля (PXV; род *Potexvirus*, сем. *Alphaflexiviridae*). Его геном (8,1 тыс. н.) содержит пять ORF; на 3′-конце геномной РНК локализована триада генов белков движения (рис. 64).

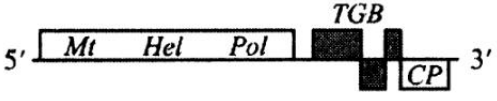


Рис. 64. Геном вируса Х картофеля (PVX).

Mt, *Hel* и *Pol* — домены продукта ORF1, обладающие, соответственно, трансмиссивной, геликазной и полимеразной активностью; *CP* — ген белка капсида; *TGB* — гены белков движения.

Вирус PXV передается механическим способом, возможен также перенос тлями в присутствии хелпера, которым может быть другой вирус того же семейства. Важнейшими хозяевами вируса PXV служат картофель, томат и разные виды капусты. Распространению инфекции способствуют контакт здоровых и зараженных растений, а также такие агротехнические процедуры, как высаживание рассады, прививка, установка опор для подвязки растений и обрезка. Симптомами заражения служат: 1) кольцевая пятнистость, мозаичность и некротические пятна; 2) угнетение роста; 3) деформация, измельчение и опадание листьев; 4) измельчение и опадание плодов.

Меры борьбы с фитофлексивирусами предусматривают выбраковку зараженных растений, а также санитарную обработку оборудования и инструментов; рекомендуется не выращивать такие культуры, как баклажан или перец, на полях, которые в предыдущий сезон отводились под картофель.

5.6.3.2. Семейство *Bromoviridae*

Название данного семейства производится от крапчатой болезни люцерны *Medicago sativa* (alfalfa) (англ. **bro**ad bean **mo**ttle).

Структура семейства. В семейство *Bromoviridae* входят рода *Alfamovirus, Bromovirus, Cucumovirus, Ilarvirus* и *Oleavirus.*

Бромовирусы инфицируют представителей девяти семейств однодольных и двудольных растений, причиняя большой вред многим сельскохозяйственным культурам. В частности, виды рода *Alfamovirus* заражают бобовые, рода *Bromovirus* преимущественно злаковые и бобовые, виды рода *Cucumovirus* — бобовые; родов *Ilarvirus* и *Oleavirus* — широкий круг древесных растений, в том числе плодовые культуры.

Следует отметить, что круг хозяев у разных представителей рода *Cucumovirus* довольно узкий — обычно это растения одного рода, хотя вирус мозаики огурцов (CMV) инфицирует очень широкий круг растений, вызывая у них деформацию листьев и плодов, карликовость, мозаичность окраски и некрозы.

Строение вириона. Представители родов *Bromovirus, Cucumovirus* и *Ilarvirus* образуют икосаэдрические вирионы диаметром 26–35 нм. Это трипартитные вирусы; два сегмента их генома (РНК1 и РНК2) упаковываются в разные частицы. Третья геномная РНК (РНК3) упаковывается совместно с субгеномной РНК4.

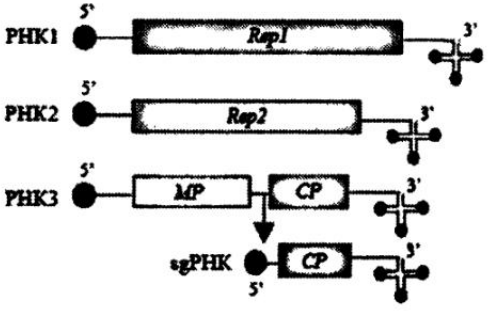


Рис. 65. Геном вируса мозаики костра *Bromus* sp. (BMV).

Rep1 и *Rep2* — гены компонентов репликазного комплекса; *MP* — ген белка движения; *CP* — ген белка капсида.

sgРНК — субгеномная РНК.

Представители родов *Alfamovirus* и *Oleavirus*, а также некоторые иларивирусы образуют бацилловидные вирионы размером 18×5 нм. Это тетрапартитные вирусы; три частицы содержат по одной копии РНК1, РНК2 и РНК3, а четвертая — две копии РНК4.

Строение генома. Специфической особенностью геномной РНК бромовирусов служит присутствие тРНК-подобной шпилечной структуры на 3′-конце.

В качестве модельного объекта многих вирусологических исследований используется вирус мозаики костра (BMV). Это трипартитный вирус, сегменты генома которого (РНК1 — 3,2 тыс. н.; РНК2 — 2,9 тыс. н.; РНК3 — 2,1 тыс. н.) упаковываются в разные капсиды. Сегменты РНК1 и РНК2 кодируют по одному белку. У каждого из трех сегментов в некодирующей области на 3′-конце присутствуют идентичные последовательности размером 200 н. (рис. 65).

5.6.3.3. Семейство *Potyviridae*

Название данного семейства происходит от сокращенного названия типового вида, Y-вируса картофеля (***Potato virus Y***).

Структура семейства. В состав семейства *Potyviridae* входят шесть родов: *Bymovirus, Ipomovirus, Macluravirus, Potyvirus, Rymovirus* и *Tritimovirus*. Самый крупный род, *Potyvirus*, содержит более 90 признанных и почти столько же нелегитимных видов.

Потивирусы вызывают болезни, сопровождающиеся значительными потерями урожая многих сельскохозяйственных культур: бахчевых (арбуз, кабачки и др.), полевых (сахарный тростник, сорго и др.), огородных (горох, фасоль и др.) и садовых (папайя, слива и др.). Кроме того, они влияют на рост и изменяют внешний вид декоративных растений, в частности тюльпанов.

Симптомами инфекции служат: 1) угнетенный и уродливый рост; 2) некрозы; 3) опадание плодов; 4) хлорозы и мозаичность. Ультраструктурным признаком по-

тивирусной инфекции является образование в цитоплазме цилиндрических включений, состоящих из агрегированных вирионов.

Монопартитные потивирусы родов *Macluravirus* и *Potyvirus* переносятся тлями, родов *Rymovirus* и *Tritimovirus* — клещами, рода *Ipomovirus* — белокрылками. В свою очередь, переносчиками бипартитных потивирусов служат протисты, в частности *Polymyxa graminis*. Возможна передача потивирусов с семенами (см. табл. 20).

Потивирусы причиняют наибольший ущерб картофелеводству, уничтожая до 40% урожая. Вирус PVY (***Potato virus Y***) может выступать в качестве хелпера при передаче вируса PVX (сем. *Alphaflexiviridae*), при сочетанной инфекции потери урожая достигают уже 60%.

Строение вириона. Потивирусы образуют гибкие нитевидные вирионы размером 500–900×10–15 нм (рис. 66, а). В частности, капсид вируса PVY, состоящий из единственного типа структурного белка, имеет длину 690–800 нм и диаметр 12 нм.

Строение генома. Геномная РНК вируса PVY (10 тыс. н.) полиаденилирована и на 5′-конце связана с белком VPg (сокр. от англ. **v**irus **p**rotein, **g**enome-linked) (рис. 66, б).

Цикл размножения (на примере вируса PVY). В результате дистанционного взаимодействия белка VPg с полиА-последовательностью инициируется кэп-независимая трансляция.

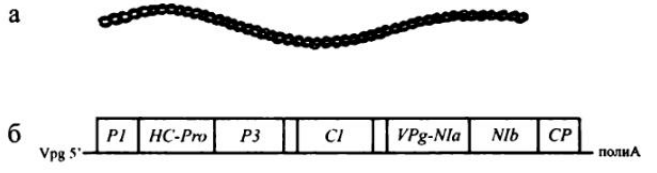


Рис. 66. Капсид (а) и геном (б) вируса Y картофеля (PVY).

VPg — кэпирующий белок; *P1*, *HC-Pro* и *NIa* — гены протеаз; *CI* — ген геликазы; *NIb* — ген РНК-зависимой РНК-полимеразы; *CP* — ген белка капсида.

Геном вируса PVY транслируется как полицистронная мРНК с образованием полипротеина размером 346 кДа. Этот предшественник в несколько этапов расщепляется вирусными протеазами на мультифункциональные белки (рис. 67): 1) белок VPg, который инициирует и регулирует трансляцию, регулирует репликацию, а также обеспечивает дальний и ближний транспорт; 2) капсидный белок, который служит также белком движения; 3) белки P1 и HC-Pro, которые расщепляют N-конец полипротеина и участвуют в репликации; 4) белок Nla, N-концевой домен которого является пред-

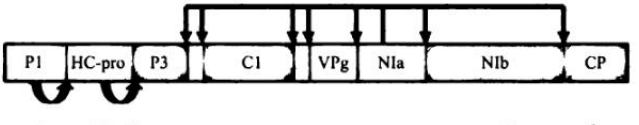


Рис. 67. Процессинг полипротеина вируса Y картофеля (PVY).

Стрелки — сайты разреза протеазами.

шественником белка VPg, а С-концевой домен обладает протеолитической активностью.

Геном вируса PVY реплицируется в цитоплазме без образования субгеномных РНК. В состав репликативного комплекса входят вирусные белки CI, VPg и NIb. Белок CI — это геликаза, которая в присутствии трифосфатов расплетает ds-интермедиаты с 3′-конца. Белок VPg, оставаясь N-терминальной частью протеазы NIa, присоединяется через фосфоэфирную связь к 5′-концу РНК. Белок NIB, или собственно РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRP), совместно с малым вспомогательным белком (6 кДа) фиксирует репликативный комплекс на внутренних мембранах.

5.6.3.4. Семейство *Virgaviridae*

Данное семейство, название которого отражает палочковидную форму вирионов (лат. virga — палка), было официально признано Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) только в 2008 г.

Структура семейства. К виргавирусам относятся рода *Furovirus, Hordeivirus, Pecluvirus, Pomovirus, Tobamovirus* и *Tobravirus*. Типовой вид рода *Tobamovirus*, вирус табачной мозаики (TMV), — самый знаменитый и до сих пор актуальный модельный объект вирусологии и фитопатологии.

Рода виргавирусов различаются, в частности, по числу используемых белков движения — это либо единственный белок молекулярной массой ~30 кДа, либо три белка, гены которых локализуются вблизи 3′-конца РНК(+).

Виргавирусы могут инфицировать новых хозяев при механическом повреждении последних (для тобамовирусов этот путь единственный) или с помощью векторов. Представители родов *Furovirus, Pecluvirus* и *Pomovirus* переносятся протистами, виды рода *Hordeivirus* — нематодами. Гордеивирусы и пеклуривирусы могут также передаваться с семенами. Круг хозяев виргавирусов, определяющий межштаммовые отличия, очень широк. В частности, вирус TMV заражает 125 видов растений, принадлежащих к девяти семействам. Основной ущерб наносится урожаю табака (до 2% потерь в Северной Америке), огурца, перца и томата; от этого вируса страдают и декоративные растения.

Вирус TMV распространен повсеместно и очень устойчив; попав на одежду сельскохозяйственных рабочих он сохраняет инфекционность в течение года, а в растительном соке — до двух лет. Первым симптомом инфекции служит появление светло-зеленой пятнистости между жилками молодых листьев; очень быстро мозаичность распространяется по всем листовым пластинкам. Болезнь не летальна, однако приводит к карликовости, поскольку развивается в начале вегетационного периода. У других растений, например у яблони и винограда, инфекция может протекать бессимптомно.

Строение вириона. Моно-, би- и трипартитные виргавирусы образуют негибкие палочковидные вирионы. Капсиды, имеющие спиральный тип симметрии, состоят из субъединиц структурного белка молекулярной массой 19–24 кДа.

Вирус TMV стал первым вирусом, архитектура которого была реконструирована с помощью электронной микроскопии. В данном случае капсид представляет собой

плотно сжатую спираль длиной 300 нм и шагом 23Å, образующую 130 витков. Капсомеры, общим числом 2130, состоят из 158 а.о. и имеют молекулярную массу 17,5 кДа. Геномная ssРНК(+) помещается в центральном осевом канале диаметром 2 нм (см. рис. 8).

Строение генома. Геномы виргавирусов значительно варьируют по размеру (5–16 тыс. н.). У вируса TMV он составляет 6395 н.; помимо структурных белков в нем закодированы белок движения (30 кДа), геликаза (126 кДа) и репликаза (183 кДа).

Геномная ssРНК(+) виргавирусов кэпирована на 5′-конце. На 3′-конце вместо полиА находится последовательность, которая не только имеет такую же вторичную структуру, как тРНК^{His}, но и может связывать аминокислоты, в частности валин, гистидин или тирозин (рис. 68).

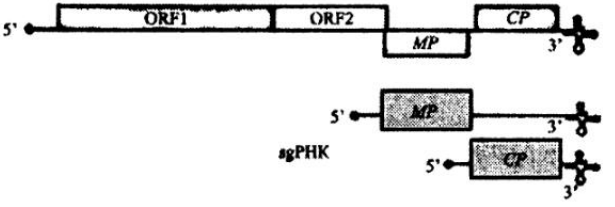


Рис. 68. Геномная и субгеномные РНК вируса табачной мозаики (TMV).

ORF1 кодирует геликазу (малую субъединицу репликазного комплекса), *ORF1* и *ORF2* — РНК-полимеразу (большую субъединицу репликазного комплекса); считывание идет в результате пропуска терминального кодона; белки MP и CP считываются с sgРНК.

sgРНК — субгеномные РНК; *MP* — реплика гена белка движения; *CP* — реплика гена белка капсида.

Цикл размножения (на примере вируса TMV). Хотя виргавирусы содержат разный набор белков репликативного комплекса, их РНК-зависимые РНК-полимеразы (RdRP) обнаруживают высокую степень сходства.

Цикл размножения начинается с раздевания геномной РНК; сразу после этого инициируется вирусоспецифичная трансляция на клеточных рибосомах с использованием геномной РНК(+) в качестве мРНК; в первую очередь транслируются гены компонентов репликативного комплекса, расположенные на 5′-конце.

Репликативный интермедиат — РНК(–) служит матрицей для синтеза дочерних копий геномных ssРНК(+). Сродство репликазы к РНК(–) на несколько порядков выше, чем к РНК(+), что обеспечивает необходимый баланс продуктов репликации. Помимо этого, с РНК(–) считываются мРНК капсидного белка и белка движения, гены которых расположены на 3′-конце. Таким образом, для трансляции 3′-конца вирус TMV использует стратегию субгеномных РНК.

Установлено, что вирус TMV репродуцируется в области эндоплазматического ретикулума; локализация сборки неизвестна.

Сборка TMV, как и большинства палочковидных вирусов со спиральной симметрией, происходит по механизму агрегации капсомеров вокруг геномной нуклеино-

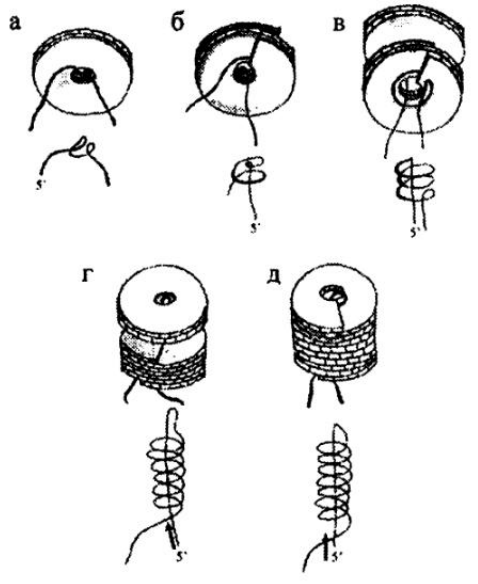


Рис. 69. Сборка вириона вируса табачной мозаики (TMV) (по: Butler et al., 1978).

а — размещение РНК между слоями белковых субъединиц после встраивания упаковочной петли в отверстие двойного диска; б — конформационные изменения белковых субъединиц, расхождение слоев двойного диска и укладка между ними петли РНК; в — присоединение следующего двойного диска к комплексу нуклеации; г — проталкивание 5′-конца внутрь образующегося цилиндра; д — формирование петли РНК между слоями диска, смыкание субъединиц и повторное проталкивание 5′-конца в отверстие.

вой кислоты. Теоретически, в самосборке могут участвовать моно- и димеры капсидного белка, однако in vivo он образует олигомерные комплексы.

Сборка вируса TMV начинается с того, что двухслойная затравка из 34 молекул капсидного белка присоединяется к специализированному сайту на расстоянии ~1 тыс. н. от 3′-конца геномной РНК. Затем слои затравки смещаются относительно друг друга и объединяются со следующим олигомерным комплексом (рис. 69). Величина образующейся частицы определяется размером генома. Как показывают опыты in vitro, специфичность упаковки ограниченная; в популяции вирусов встречается до 30% неинфекционных частиц, которые вместо геномной РНК содержат мРНК капсидного белка или даже клеточную РНК.

По прошествии сборки вирионы распространяются по всему растению, и на клеточном уровне обнаруживаются в ядре, цитоплазме и хлоропластах.

5.6.4. ВИРОИДЫ

Наряду с истинными вирусами растений существуют уникальные вирусоподобные агенты — вироиды, которые автономно репродуцируются в чувствительных растениях-хозяевах, вызывая у них болезни, синдромы которых сходны с синдромами вирусных болезней.

Хотя вироиды не являются вирусами (см. ниже), их по методологическим соображениям причисляют к нетрадиционным объектам вирусологии. Показательно, что в настоящее время их классифицируют согласно правилам Международного кодекса номенклатуры вирусов (ICTV) (см. табл. 21), и вопросы их таксономии относятся к юрисдикции Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV). Поэтому

включение вироидов в раздел, посвященный вирусам, содержащим ssРНК(+), вполне оправдано.

Вироиды были открыты в 1967 г. американскими фитопатологами Теодором Динером (T. O. Diener) и Уильямом Реймером (W. B. Raymer) при поисках предполагаемого вируса-возбудителя болезни веретеновидности клубней картофеля (англ. potato spindle tuber disease), которая передается с фильтратом клеточного сока. Вопреки ожиданиям оказалось, что инфекция ассоциируется не с вирусом, а с малой РНК (246–401 н.), которая, как и вирус, реплицируется в клетке-хозяине, однако не кодирует белки и не способна инкапсидироваться. С учетом такого необычного сочетания свойств нового инфекционного агента Теодор Динер назвал его «вироидом» (англ. viroid; от лат. virus — яд, в *данном случае* — вирус и греч. eidos — вид, в *данном случае* — подобный).

В 1978 г., в самом начале геномной эры, вироид веретеновидности клубней картофеля стал первым секвенированным патогеном эукариотов, а ярко выраженная вторичная структура его РНК (по существу, его единственный фенотипический признак) была продемонстрирована в 1973 г. методом электронной микроскопии.

Вироидная инфекция может протекать либо латентно (без проявления симптомов), либо со значительным изменением габитуса растения (карликовость, скручивание побегов и листьев, уродство плодов и листьев).

В настоящее время известно 30 вироидных болезней, которые поражают травянистые и древесные растения агрономического или декоративного назначения. К числу их возбудителей относятся вироид веретеновидности клубней картофеля (***Potato spindle tuber viroid***, PSTVd), вироид каданг-каданга кокосовой пальмы (***Coconut cadang-cadang viroid***, CCCVd), вироид латентной мозаики груши (***Peach latent mosaic viroid***, PLMVd), вироид солнечной пятнистости авокадо (***Avocado sunblotch viroid***, ASBVd) и др.

Вироидные болезни распространены на гигантской территории, в первую очередь. в зоне тропического и субтропического климата. Хозяйственный ущерб от них огромен. В частности, на Филиппинах от болезни каданг-каданг (на языке коренного населения юго-восточной части о-ва Лусон — *медленная смерть*) погибло 30 млн кокосовых пальм, и ежегодные потери плантаций составляют 1 млн деревьев.

Биологическая природа вироидов. Сходство вироидов с РНК-содержащими вирусами заключается:

— в ультрамикроскопическом размере (критерий фильтруемости);

— в одном и том же типе носителя генетической информации;

— в инфекционности.

Вироиды особенно сходны с вирусом гепатита D (HDV; см. раздел 6.6.5). В обоих случаях репликон представлен небольшой кольцевой молекулой РНК, которая копируется с помощью механизма «катящееся кольцо». Однако, в отличие от некодирующих и не инкапсидирующихся вироидов, ssРНК(–) вируса HDV кодирует белок (дельта-антиген), а также капсидный белок.

Вироиды, как нетрадиционные объекты вирусологии, сходны с ***вирусоидами*** (англ. virusoid) — РНК-сателлитами некоторых РНК-содержащих фитовирусов, в частности вируса кольцевой пятнистости табака (TRSV; сем. *Secoviridae*). РНК

вирусоидов имеет размер ~350 н.; как и у вироидов, она образует палочковидные ds-структуры, реплицируется с помощью механизма «катящееся кольцо» и не кодирует белки. Однако, в отличие от вироидов, вирусоиды инкапсидируются совместно с РНК вирусов-хелперов, хотя кольцевая геномная ssРНК вирусоида-сателлита и линейная геномная ssРНК вируса-хелпера (~4,5 тыс. н.) не обладают взаимным сходством нуклеотидных последовательностей.

К нетрадиционным объектам вирусологии с большой натяжкой также относят ***прионы*** (сокр. от англ. **p**rotein **on**ly; в *данном случае* — размножающиеся внутри клетки инфекционные агенты белковой природы), которые вызывают нейродегенеративные болезни человека и животных (куру, скрейпи, болезнь Крейцфельд—Якоба и др.). Однако сходство прионов с вирусами и вирусоподобными агентами не имеет под собой структурной и филогенетической основы; оно состоит лишь в том, что те и другие отвечают таким «эклектическим» критериям, как фильтруемость и инфекционность. Поэтому в нашем учебнике прионы не рассматриваются.

Таким образом, вироиды принципиально отличаются от РНК-содержащих вирусов тем, что никогда не инкапсидируются (даже в качестве сателлита в чужом вирионе), а также тем, что не могут функционировать в качестве мРНК. Иными словами, у вироидов отсутствуют гены, в частности гены капсидных белков. Следовательно, вироиды не обладают геномом, и поэтому их (как и вирусоиды) нельзя считать живыми существами — в отличие от вирусов (см. раздел 1.2).

Строение вироидов. В настоящее время на основе различий в строении РНК, а также с учетом использования разных вариантов репликации (см. ниже) обособляются два семейства вироидов — *Pospiviroidae* и *Avsunviroidae*. В семействе *Avsunviroidae* меньше видов и они имеют более узкий круг хозяев.

Для первичной структуры РНК представителей семейства *Pospiviroidae* характерна высокая степень автокомплементарности, благодаря чему ~70% нуклеотидов спарены друг с другом Уотсон-Криковыми связями. В результате этого кольцевая ssРНК приобретает линейную ds-форму. Точнее сказать, она выглядит как неразветвленная палочка, в которой имеется несколько «пузырьков» или шпилек, а также две короткие (размером в несколько нуклеотидов) ss-петли на концах преимущественно линейной dsРНК.

У типового вида семейства *Pospiviroidae*, вироида веретеновидности клубней картофеля (PSTVd; 359 н.), и родственных ему вироидов в центральном высококонсервативном домене (англ. **c**entral **c**onservative **r**egion, CCR) расположены два ss-«пузырька» с плечами длиной 4–5 н., между которыми находится ds-участок размером 8 н. Центральный домен фланкирован доменом патогенности (англ. **p**athogenic, P) и вариабельным доменом (англ. **v**ariable, V). По концам расположены левый терминальный (англ. **t**erminal **l**eft, TL) и правый терминальный (англ. **t**erminal **r**ight, TR) домены (рис. 70).

Для первичной структуры РНК у представителей семейства *Avsunviroidae* (типовой вид — ***Avocado sunblotch viroid*** (ASBVd) характерна меньшая степень самокомплементарности, из-за чего кольцевая ssРНК приобретает форму палочки только на одном конце молекулы. В данном случае CCR-домен отсутствует; зато на другом конце находится система протяженных шпилек; кроме того, в молекуле РНК имеется консервативная последовательность рибозима (см. ниже).

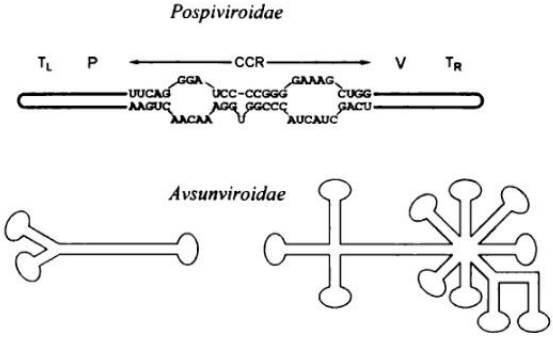


Рис. 70. Вторичная структура РНК вироидов.

а — вироид веретеновидности клубней картофеля (PSTVd, семейство *Pospiviroideae*); б — вироиды семейства *Avsunviroideae*.

Объяснение в тексте.

Репликация вироидов. РНК вироидов принято обозначать как смысловую, или РНК(+), хотя она не используется в качестве матричной РНК. Она реплицируется в клеточном ядре и накапливается в ядрышке (представители сем. *Pospiviroidae*) или в хлоропласте (представители сем. *Avsunviroidae*).

Поскольку вироиды не кодируют собственные РНК-полимеразы, они реплицируются с помощью хозяйских ДНК-зависимых РНК-полимераз, в частности, РНК-полимеразы II (Pol II). До сих пор не известно, каким образом вироиды заставляют работать на себя эти хозяйские полимеразы (соответственно, ядерную и хлоропластную).

Как станет ясно из дальнейшего, в репликации вироида участвуют еще две ферментативные активности — фрагментирующая (для нарезания конкатемерного репликативного РНК-интермедиата на мономерные линейные РНК) и РНК-лигазная (для перевода «мономерных» линейных РНК в кольцевую форму).

Репликация происходит только через образование РНК-интермедиатов и осуществляется с помощью механизма «катящееся кольцо» в двух вариантах — асимметричном и симметричном (рис. 71).

Асимметричный вариант репликации. Таким путем реплицируются вироиды семейства *Pospiviroidae*. В данном случае на основе кольцевого мономера РНК(+) образуется комплементарная ей конкатемерная линейная нить РНК(–), в которой 2–5 мономеров соединены друг с другом по принципу «голова к хвосту». На этой конкатемерной матрице синтезируется конкатемерная РНК(+), которая затем нарезается на мономеры с помощью клеточной РНКазы. После лигирования концов этих мономеров с помощью клеточной РНК-лигазы образуются кольцевые РНК(+) вироидного потомства. Таким образом, в данном варианте репликации в качестве матрицы используется только РНК(+), что и объясняет его название.

В отличие от представителей семейства *Avsunviroidae* у вироидов семейства *Pospiviroidae* отсутствуют консервативные последовательности рибозимных структур. По-видимому, в данном случае функцию нарезания конкатемера на мономеры выполняют какие-то клеточные сайтспецифичные РНКазы. Альтернативой может служить образование вироидной рибозимной структуры, отличной от «головки молотка» (см. ниже), хотя это еще предстоит выяснить.

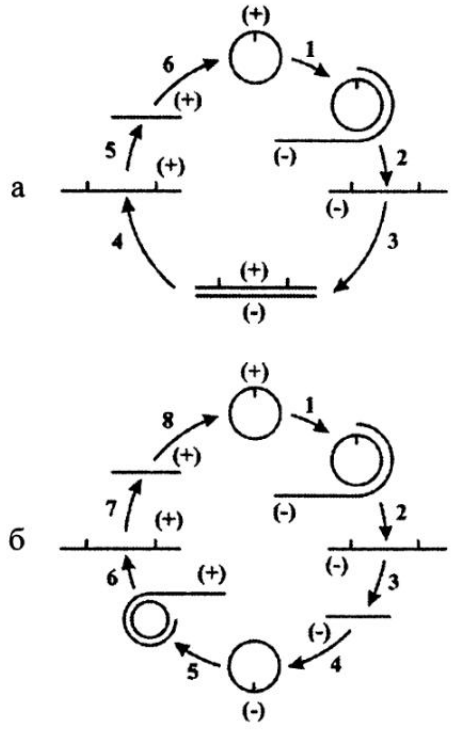


Рис. 71. Асимметричный (а) и симметричный механизм (б) репликации вироидов.

Объяснение в тексте.

Симметричный вариант репликации. С его помощью реплицируется геномная РНК представителей семейства *Avsunviroidae*. В данном случае в качестве матрицы наряду с РНК(+) используется РНК(–). Вначале образуется конкатемерная линейная нить РНК(–). Затем она нарезается на линейные мономеры, концы которых лигируются с образованием кольцевых РНК(–). Этот репликативный интермедиат служит матрицей для синтеза линейного конкатемера РНК(+) с помощью механизма «катящееся кольцо». На завершающей стадии линейный конкатемер нарезается на линейные мономеры, которые лигируются с образованием кольцевых РНК(+) вироидного потомства.

Нарезание конкатемера на мономеры и их лигирование осуществляются за счет цисрибозимной активности (т.е. действующей в пределах одной молекулы) самого вироида. В данном случае рибозим временно формируется на основе линейных конкатемерных РНК(+) и РНК(–) в процессе их элонгации и приобретает форму «головки молотка» (англ. hammer-head structure), состоящей из трех консервативных ds-участков, на концах которых находятся шпильки произвольного размера. С помощью рибозима расщепляется только одна связь между ручками шпилек II и III.

Как происходит лигирование мономеров, неизвестно. Предполагается, что его осуществляет еще не выявленная хлоропластная РНК-лигаза. Согласно альтернативной гипотезе, оно осуществляется неферментативным путем за счет 2′–5′ фосфодиэфирной связи.

Следует отметить, что вироиды семейства *Avsunviroidae* являются единственными патогенами, способными с целью репликации проникнуть в хлоропласт.

Транспортировка вироидов. Первичное заражение вироидами происходит механическим способом. Инфекционный агент переносится на инструментах, одежде и руках сельскохозяйственных рабочих; возможна инокуляция при прививке или в результате повреждения растений при их взаимном контакте. Некоторые вироиды могут распространяться с пыльцой или семенами зараженных растений. Наконец, показано, что вироиды TPMVd и PSTVd могут передаваться насекомыми.

Спонтанного излечивания от вироидов не наблюдается; однократно инфицированное растение воспроизводит 200–10000 копий вироида на зараженную клетку на протяжении всего вегетационного периода.

Таблица 21. **Вироиды (виды, официально признанные ICTV)**

Род	Типовой вид	Число секвенированных вариантов	Размер (н.)	Хозяева
	Семейство *Avsunviroidae*			
Avsunviroid	***Avocado sunblotch viroid*** (ASBVd)	83	239–251	Авокадо
Elaviroid	***Eggplant latent viroid*** (ELVd)	9	332–335	Баклажан
Pelamoviroid	***Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*** (CChMVd)	21	397–401	Хризантема
	Peach latent mosaic viroid (PLMVd)	168	335–351	Персик; гладкий персик (нектарин)
	Семейство *Pospiviroidae*			
Apscaviroid	***Apple dimple fruit viroid*** (ADFVd)	2	306	Яблоня
	Apple fruit crinkle viroid (AFCVd)	29	368–372	— " —
	Apple scar skin viroid (ASSVd)	8	329–333	Яблоня; груша
	Australian grapevine viroid (AGVd)	1	369	Виноградная лоза
	Citrus bent leaf viroid (CBLVd)	24	315–329	Цитрусовые
	Citrus dwarfing viroid (CDVd)	53	291–297	— " —
	Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1)	49	365–368	Виноградная лоза
	Grapevine yellow speckle viroid 2 (GYSVd-2)	1	363	— " —
	Pear blister canker viroid (PBCVd)	18	314–316	Груша; айва
Cocadviroid	***Citrus bark cracking viroid*** (CBCVd)	6	284–286	Цитрусовые
	Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd)	8	246–301	Кокосовая пальма
	Coconut tinangaja viroid (CTiVd)	2	254	— " —
	Hop latent viroid (HLVd)	10	255–256	Хмель
Coleviroid	***Coleus blumei viroid-1*** (CBVd-1)	9	248–251	Колеус (декоративное растение); мята
	Coleus blumei viroid-2 (CBVd-2)	–	295–301	— " —
	Coleus blumei viroid-3 (CBVd-3)	3	361–364	Базилик; мелисса
Hostuviroid	***Hop stunt viroid*** (HSVd)	144	294–303	Виноградная лоза; слива; цитрусовые
Pospviroid	***Chrysanthemum stunt viroid*** (CSVd)	19	348–356	Хризантема
	Citrus exocortis viroid (CEVd)	86	36–375	Томат; цитрусовые

Окончание табл. 21

Род	Типовой вид	Число секвенированных вариантов	Размер (н.)	Хозяева
Pospviroid	***Columnea latent viroid*** (CLVd)	17	359–456	Брунфельзия (*Brunfelsia* sp.); колумнея (*Columnea* sp.); нематантус (*Nemathanthus* sp.) (декоративные цветущие растения)
	Iresine viroid (IrVd)	3	370	Ирезине (*Iresine* sp.) (декоративное цветущее растение)
	Mexican papita viroid (MPVd)	6	359–360	*Solanum cardiophyllum*
	Potato spindle tuber viroid (PSTVd)	109	341–364	Картофель
	Tomato apical stunt viroid (TASVd)	5	360–363	Томат
	Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd)	2	360	—»—
	Tomato planta macho viroid (TPMVd)	2	360	—»—

Чтобы размножиться, вироид должен проникнуть в клеточное ядро или в хлоропласт (т. е. транспортироваться между разными компартментами). В свою очередь, по завершении репликации вироидов их потомство должно выйти в цитоплазму, проникнуть в соседние клетки через плазмодесмы (межклеточный транспорт) и распространиться по всему растению (дальний транспорт).

Предполагается, что внутриклеточный транспорт вироидов семейства *Pospiviroidae* осуществляется с помощью РНК-связывающих белков, которые содержат сигнал ядерной локализации; как проникают в хлоропласт вироиды семейства *Avsunviroidae*, совершенно непонятно. В свою очередь, для межклеточного транспорта могут использоваться белки, аналогичные (или гомологичные) белкам движения и узнающие специфические последовательности РНК вироида. Наконец, дальний транспорт, по-видимому, осуществляется по флоэме с участием РНК-связывающего флоэмного белка 2 (англ. **ph**loem **p**rotein **2**, PP2).

Механизм патогенности вироидов. Механизм патогенности вироидов долго оставался загадкой, поскольку было неясно, как они могут индуцировать патологические изменения растений, не кодируя белки.

В последние годы вироиды стали привлекать к себе повышенное внимание в связи с открытием ***малых интерферирующих РНК — siРНК*** (англ. small-interfering **RNA**, siRNA), которые участвуют в РНК-сайленсинге. Последний обеспечивает регуляцию экспрессии эукариотных генов и защищает геном от чужой генетической информации (см. раздел 1.7).

Появляется все больше данных о том, что вироиды могут быть не только мишенями ***РНК-сайленсинга*** (что является одной из форм естественной защиты от их инфекции), но и его индукторами (что служит одним из объяснений их патогенности). В частности, в тканях растений, инфицированных представителями семейств *Avsun-*

viroidae и *Pospiviroidae*, обнаружены производные вироидов — небольшие (21–25 н.) РНК(+) и РНК(–), сходные с siРНК.

Функциональные эквиваленты siРНК образуются в результате расщепления dsРНК-репликативных интермедиатов ssРНК(+)-вирусов с помощью аналога РНКазы III — ***дайсер-фермента*** (см. раздел 1.3) у животных или ***дайсерподобного фермента*** (англ. Dicer-like, DCL) у растений.

Минус-нить образующихся фрагментов (22 н.) вводится в состав ***сайленсинг-комплекса*** хозяина (англ. **R**NA-induced **s**ilencing **c**omplex, RISC), который распознает комплементарную этой нити вирусную РНК и разрушает ее.

У представителей семейства *Pospiviroidae* вироидоспецифичные siРНК могут образовываться в ядре. Для представителей семейства *Avsunviroidae* субстратом дайсер-фермента может быть только РНК, транспортируемая из клетки в клетку, поскольку на уровне хлоропластов феномен сайленсинга неизвестен.

Вироидоспецифичные siРНК включаются в комплекс RISC, который блокирует клеточные мРНК; видимо, этим объясняется патогенность вироидов. Тем не менее не исключено, что вироиды могут быть и первичными эффекторами патогенеза, если они взаимодействуют с какими-то хозяйскими факторами и тем самым препятствуют выполнению ими нормальной функции.

Неизвестно, как удается избежать сайленсинга самим вироидам; возможно, этому способствует их специфическая вторичная структура или компартментализация в ядре и хлоропласте.

Происхождение вироидов. Малый размер, кольцевая форма, высокое относительное содержание GC и рибозимная активность вироидов позволяют в первую очередь предположить, что они являются реликтами древнего «мира РНК». Возможно, что с появлением ДНК-содержащих организмов они стали паразитировать в них (в этом отношении особая роль могла принадлежать древним цианобактериям как предшественникам хлоропластов).

Борьба с вироидной инфекцией. Современная диагностика вироидной инфекции основана на использовании: 1) электрофореза РНК; 2) молекулярного зондирования; 3) полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (англ. **r**everse **t**ranscription-**p**olymerase **c**hain **r**eaction, RT-PCR); 4) ДНК-микрочипов.

Радикальной мерой борьбы с вироидами служит уничтожение зараженных растений; профилактические мероприятия основаны на санитарной обработке посадочного и посевного материала (см. раздел 5.7), а также на выведении и интродукции устойчивых сортов. Антивироидная терапия еще не разработана.

5.6.5. ФИТОВИРУСЫ С ГЕНОМНОЙ ssРНК(–)

Такой тип генома имеется у представителей только двух семейств (*Bunyaviridae* и *Phabdoviridae*), к которым, наряду с фитовирусами, относятся вирусы беспозвоночных и позвоночных. Хотя фитовирусы составляют относительно малую часть этой группы, их значение исключительно велико, поскольку они наносят огромный вред сельскому хозяйству и при благоприятном для себя сочетании абиотических и биотических факторов (в частности, при высокой численности переносчиков) способны

уничтожить почти весь урожай чувствительных к ним культур. Особенно страдают от них посевы зерновых.

Антисмысловой РНК-геном не инфекционен, поскольку в хозяйских клетках отсутствуют полимеразы, связывающиеся с РНК(–). Поэтому в данном случае вирион должен обязательно содержать несколько копий вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Геномная РНК служит матрицей для синтеза и мРНК, и репликативного интермедиата; первым этапом цикла репродукции вируса является транскрипция.

Поскольку при упаковке в вирионе оказывается часть вирусоспецифичного репликативного комплекса, вирусов этой группы широко используют в качестве моделей при исследовании регуляции транскрипции и репликации in vitro.

5.6.5.1. Семейство *Bunyaviridae*

Первый буньявирус был выделен в 1940 г. при эпидемии в поселении Буньямвера (англ. Bunyamwera; Уганда, Центральная Африка). Однако это семейство было охарактеризовано и получило свое нынешнее название только в 1975 г.

Структура семейства. В семейство *Bunyaviridae* входят четыре рода вирусов животных (*Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus* и *Phlebovirus*) и лишь один род фитовирусов — *Tospovirus*.

Типовой вид рода *Tospovirus* — вирус бронзовости томата (TSWV) очень широко распространен и наиболее важен в плане причиняемого им хозяйственного ущерба: ежегодные потери урожая оцениваются в 1 млрд долларов. Он переносится трипсами и способен заражать представителей более 800 видов из 80 семейств однодольных и двудольных растений. Симптомами инфекции служат карликовость, некрозы, хлорозы и кольцевая пятнистость.

Строение вириона. Сферические оболочные вирионы тосповирусов имеют диаметр ~90 нм; на их поверхности расположены гликопротеиновые пепломеры. Внутри оболочки находятся три (по числу сегментов генома) спиральных нуклеокапсида длиной 200–300 нм и диаметром 2–2,5 нм; каждый из них ассоциирован с копией РНК-полимеразы L (рис. 72).

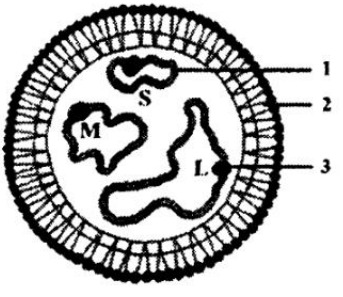


Рис. 72. Вирион тосповируса.

M, L и S — сегменты генома.

1 — рибонуклеопротеин; 2 — гликопротеины оболочки; 3 — РНК-полимераза.

Строение генома. Монопартитный геном тосповирусов (10,5–22,7 тыс. н.) состоит из трех сегментов, которые обозначаются как большой (L), средний (M) и малый (S). У типового вида TSWV их размер составляет 8,8 тыс. н., 4,8 тыс. н. и 3 тыс. н.

Цикл размножения. В то время как тосповирусы проникают в клетки тканей векторов-трипсов с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза, в растительную клетку они могут попасть только путем впрыскивания через ротовой аппарат насекомого.

В полости ранней эндосомы вирус частично раздевается; при этом оболочка вириона сливается с ее мембраной, и нуклеокапсиды попадают в цитоплаз-

му. Раздевание инициирует транскрипцию с помощью вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, ассоциированной с нуклеокапсидом (рис. 73).

Сегмент L содержит одну ORF. Сегменты M и S являются «двусмысленными» (англ. ambisense) — одна ORF расположена на геномной РНК, а другая на комплементарном ей репликативном интермедиате; ORF не перекрываются; стоп-сигналами служат шпильки между генами.

В результате трансляции сегмента M синтезируется полипротеин, который фрагментируется хозяйскими протеазами на структурные белки. Буньявирусы кэпируют собственные мРНК с помощью уникального механизма — кэпирующие олигонуклеотиды отрезаются от 5′-концов клеточных мРНК.

Репликация начинается после накопления структурных белков в количестве, достаточном для сборки нуклеокапсида. При этом вирусная РНК-полимераза синтезирует копии геномной нуклеиновой кислоты на РНК(+)-интермедиатах, ассоциированных со структурными белками. Заполненный нуклеокапсид мигрирует к цитоплазматической мембране, а затем отпочковывается от нее.

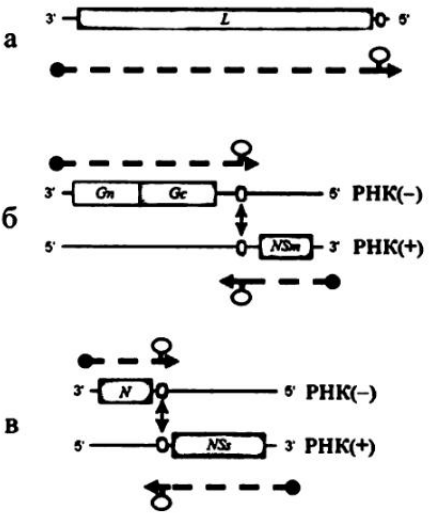


Рис. 73. Транскрипция у тосповирусов.

а — транскрипция сегмента L, б — сегмента M, в — сегмента S.

L — ген РНК-полимеразы; *Gn* и *Gc* — гены структурных белков; *N* — ген белка нуклеопротеина; *NSs* и *NSm* — гены дополнительных белков.

Пунктир — мРНК; черные кружки — кэпы; белые кружки — сигналы терминации трансляции (шпилечные структуры).

5.6.5.2. Семейство *Rhabdoviridae*

Данное семейство вирусов с палочковидными вирионами (греч. rhabdos — палка) насчитывает свыше 150 видов, которые инфицируют беспозвоночных и позвоночных животных, а также растения. Они вызывают ряд тяжелых заболеваний человека и домашних животных и болезни зерновых культур.

Структура семейства. Представители четырех родов данного семейства (*Ephemerovirus*, *Lyssavirus*, *Novirhabdovirus* и *Vesiculovirus*) являются вирусами животных, а фитовирусы представлены родами *Cytorhabdovirus* и *Nucleorhabdovirus*. Как следует из родовых названий, инфекция, вызываемая этими фитовирусами, сопровождается двумя типами цитопатологических проявлений.

Фиторабдовирусы часто встречаются в умеренных, тропических и субтропических широтах. Они заражают представителей широкого круга семейств однодольных и двудольных растений (бобовых, злаковых, крестоцветных, лилейных, пасленовых, сложноцветных и др.), однако круг хозяев у конкретного вида довольно узок. В природной среде инфекция распространяется исключительно с помощью переносчиков

(тлей, цикадок и т. д.); передача механическим путем возможна только в лабораторных условиях. Поэтому эпидемиология заболеваний зависит от биологических особенностей векторов, в которых фитовирусы размножаются, используя их в качестве промежуточных хозяев.

Рабдовирусная инфекция может быть латентной, хотя в некоторых случаях она приводит к гибели растения. Наиболее выраженные симптомы — карликовость, некроз, осветление жилкования, мозаика и хлороз.

Строение вириона. Вирионы фиторабдовирусов имеют бацилловидную или пулевидную форму; их размер варьирует в пределах 130–350×45–100 нм (см. рис. 104). Билипидная оболочка, за исключением квазипланарной поверхности у пулевидных частиц, усеяна пепломерами длиной 5–10 нм, которые состоят из тримеров гликопротеинов. Нитевидный нуклеокапсид имеет спиральный тип симметрии; он обладает транскриптазной активностью и инфекционен.

Строение генома. Геном фиторабдовирусов (11–12 тыс. н.) представлен единственной молекулой некэпированной и неполиаденилированной ssРНК(–). Помимо пяти ORF, общих для всех рабдовирусов, фиторабдовирусы дополнительно содержат 1–4 ORF (см. рис. 105).

В вирусном геноме закодированы: 1) структурный белок N, который входит в состав нуклеокапсида и, по крайней мере, у нуклеорабдовирусов несет сигнал ядерного транспорта; 2) фосфопротеин P, входящий в состав РНК-полимеразного комплекса;

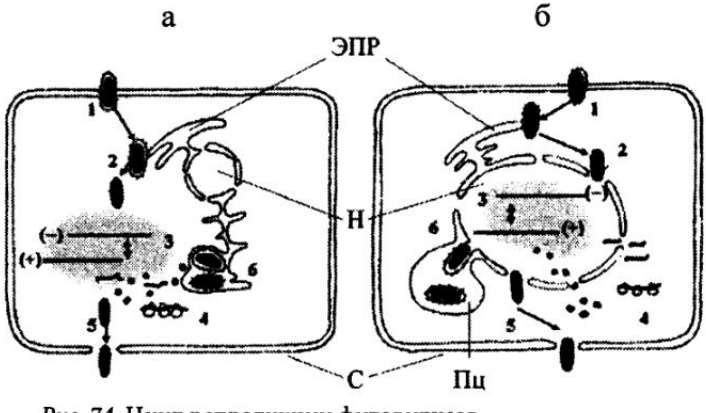


Рис. 74. Цикл репродукции фитовирусов.

а — род *Cytorhabdovirus*: 1 — проникновение; 2 — раздевание на уровне эндоплазматического ретикулума; 3 — транскрипция и репликация в цитоплазме; 4 — синтез вирусных белков, сборка вирионов; 5 — ближний транспорт нуклеокапсидов; 6 — отпочкование нуклеокапсидов в цистерну эндоплазматического ретикулума.

б — род *Nucleorhabdovirus*: 1 — проникновение; 2 — раздевание на уровне эндоплазматического ретикулума; 3 — транскрипция, репликация и сборка вирионов в нуклеоплазме; 4 — синтез вирусных белков; 5 — ближний транспорт нуклеокапсидов; 6 — отпочкование нуклеокапсидов в перинуклеарную цистерну.

ЭПР — эндоплазматический ретикулум; Н — нуклеоплазма; С — клеточная стенка; Пц — перинуклеарная цистерна.

3) белок морфогенеза M, обеспечивающий сборку нуклеокапсида; 4) белковый компонент гликопротеина оболочки; 5) РНК-полимераза L; 6) дополнительные белки, предположительно, белки движения.

Цикл размножения. По ходу своего развития фиторабдовирусы транслоцируются между компартментами клетки-хозяина. Этот путь различен у представителей родов *Nucleorhabdovirus* и *Cytorhabdovirus* (рис. 74).

Нуклеорабдовирусы частично раздеваются в цистернах эндоплазматического ретикулума; нуклеокапсид транспортируется к поровому комплексу ядерной мембраны. Геномная РНК вместе с вирусной РНК-полимеразой поступает в нуклеоплазму, где и транскрибируется.

Вирусные мРНК экспортируются в цитоплазму на предмет трансляции. Вновь синтезированные вирусные белки направляются в ядро, где продолжается синтез вирусных мРНК и где реплицируется вирусный геном.

Скопление вирусных молекул образует в нуклеоплазме изолированную область, или «вириоплазму», а часть структурных белков вируса интегрируется во внутреннюю мембрану ядерной оболочки. Сборка нового поколения нуклеокапсидов осуществляется внутри перинуклеарных цистерн; билипидная оболочка приобретается в результате отпочкования в перинуклеарное пространство. Часть нуклеокапсидов переходит в цитоплазму, а затем распространяется по растению (рис. 74, а).

Размножение циторабдовирусов в целом сходно с размножением нуклеорабдовирусов; главное различие состоит в том, что сборка вирионов происходит в цитоплазме, и вирусные частицы отпочковываются внутрь цистерн эндоплазматического ретикулума (рис. 74, б).

5.6.6. ФИТОВИРУСЫ С ГЕНОМНОЙ dsДНК, ИМЕЮЩИЕ СТАДИЮ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ. СЕМЕЙСТВО *CAULIMOVIRIDAE*

Фитовирусы, содержащие dsДНК, были впервые описаны в 1968 г., однако только в 1983 г. было установлено, что их размножение связано с обратной транскрипцией на основе использования репликативного РНК-интермедиата.

В отличие от сборной группы ретровирусов животных (см. разделы 6.6.6.1) и 6.6.7.1), данную группу фитовирусов называют «параретровирусами» (греч. para — многозначная приставка; в *данном случае* — ложные ретровирусы), поскольку их геном не кодирует интегразу, которая могла бы обеспечить встраивание вирусного генома в геном хозяйской клетки и, как следствие, лизогенизацию.

Структура семейства. В семействе *Caulimoviridae* шесть родов (*Badnavirus, Caulimovirus, Cavemovirus, Petuvirus, Soymovirus* и *Tungrovirus*).

Колимовирусы (сокр. от англ. **caul**iflower **mos**aic — мозаика цветной капусты) широко встречаются и заражают многие двудольные растения, хотя конкретные виды занимают узкий ареал и имеют ограниченный круг хозяев. Симптомами инфекции служат карликовость, осветление жилкования, мозаика и хлороз; их проявление зависит как от видовой принадлежности вируса и хозяина, так и от внешних условий.

Наибольший урон от колимовирусов несут посевы кочанной и цветной капусты. Эпифитотия, разразившаяся в 1980 г. в Великобритании, вызвала гибель 10% урожая, что стимулировало фундаментальные исследования этой группы фитовирусов.

Неперсистентная инфекция преимущественно распространяется насекомыми; в зависимости от конкретного вида вируса вектором могут быть тли, цикадки и червецы. Соответственно, в геномах колимовирусов содержатся гены факторов переноса, обеспечивающих взаимодействие капсидов с покровами насекомого.

Представители семейства *Caulimoviridae* различаются между собой по строению генома, в частности по нуклеотидным последовательностям ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы, а также по архитектуре вирионов.

Наиболее изученным представителем рассматриваемого семейства является вирус мозаики цветной капусты (***Cauliflower mosaic virus***, CaMV); его урожай составляет до 100 частиц на инфицированную клетку, и после размножения он распространяется по всему растению.

Строение вирионов. Колимовирусы родов *Caulimovirus, Cavemovirus, Petuvirus* и *Soymovirus* образуют икосаэдрические частицы диаметром 43–45 нм, а родов *Badnavirus* и *Tungrovirus* — бацилловидные частицы размером 60–900×30 нм (они также имеют изометрическую симметрию; концы капсида образованы пентамерами, а середина — гексамерами).

Икосаэдрический капсид вируса CaMV (T=7) диаметром 52 нм состоит из 420 копий белка CP (сокр. от англ. **c**apsid **p**rotein), субъединицы которого чередуются с молекулами вспомогательного белка VAP (сокр. от англ. **v**irion-**a**ssociated **p**rotein). На электронных микрофотографиях частицы этого вируса выглядят сферическими.

Строение генома. Колимовирусы содержат кольцевую dsДНК (7,2–8,3 тыс. п.н.) с 2–4 нарушениями непрерывности (см. ниже). Общий промотор позволяет синтезировать мРНК со всех ORF, количество которых варьирует от одной (род *Petuvirus*) до восьми (род *Soymovirus*). В геномах всех колимовирусов имеются гены обратной транскриптазы, протеазы и структурных белков (рис. 75).

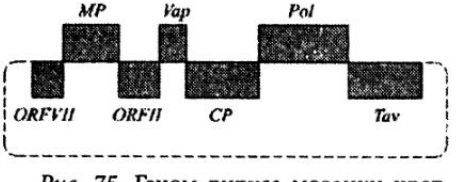


Рис. 75. Геном вируса мозаики цветной капусты (CaMV).

CP и *Vap* — гены структурных белков; *Pol* — ген активатора трансляции; *Tav* — ген мультифункционального белка; *MP* — ген белка движения; *ORFII* — ген белка передачи вируса.

В кольцевой dsДНК вируса CaMV (8 тыс. п.н.) плюс-нить и минус-нить имеют нарушения непрерывности, которые не являются только однонитевыми разрывами или однонитевыми брешами, а представляют собой небольшие участки, в которых одна из нитей перекрывается сама с собой (рис. 76, а).

Семь ORF кодируют: 1) белок движения; 2) фактор переноса насекомыми; 3) гипотетический фактор упаковки; 4) структурный белок; 5) полипротеин с активностями протеазы, обратной транскриптазы и РНКазы H; 6) транскрипционный фактор и белок тел включения; 7) белок с неустановленной функцией.

Цикл размножения (на примере вируса CaMV). Репродукция вируса CaMV состоит из двух основных стадий: ядерной и цитоплазматической.

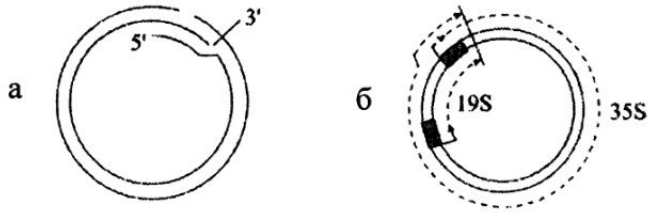


Рис. 76. Физическая структура геномной ДНК (а) и схема синтеза 19S РНК и 35S РНК (б) вируса мозаики цветной капусты (CaMV).

Прямоугольники — расположение промоторов.

Во время ядерной стадии клеточная РНК-полимераза осуществляет транскрипцию. На цитоплазматической стадии происходит трансляция, а также с помощью обратной транскриптазы синтезируются копии вирусного генома.

Транскрипция. После попадания вируса в клетку геномная dsДНК раздевается и транспортируется в ядро, где с помощью хозяйской экзонуклеазы и лигазы в первую очередь устраняются нарушения непрерывности.

Полученный репликативный интермедиат связывается с ядерными гистонами, образуя мини-хромосому; хозяйская ДНК-зависимая РНК-полимераза синтезирует с соответствующих промоторов две мРНК — 35S мРНК и 19S мРНК, которые транспортируются в цитоплазму.

Промотор 35S является очень активным конститутивным промотором (он используется в генетических конструкциях с целью экспрессии чужеродных генов у многих видов двудольных растений). Транскрипция с этого промотора осуществляется во всех ORF; образующаяся полицистронная мРНК имеет концевую избыточность (ее размер на 180 н. превышает размер вирусного генома).

Моноцистронная 19S мРНК кодирует фактор транскрипции VI.

Репликация. Копирование генома параретровирусов осуществляется через РНК-интермедиат, или прегеномную РНК.

Прегеномная РНК, которая образуется в результате транскрипции с промотора 35S и содержит на обоих концах прямые повторы, служит матрицей для обратной транскрипции; она же используется в качестве мРНК для синтеза всех белков вируса CaMV (см. выше).

Процесс обратной транскрипции протекает так же, как у ретровируса HIV-1 (см. раздел 6.6.6.1). Для инициации синтеза минус-нити ДНК используется затравка (тРНК^{Met} клетки-хозяина), которая связывается со специфическим сайтом, расположенным на расстоянии ~600 н. от 5′-конца прегеномной РНК.

Дальнейшие этапы обратной транскрипции протекают в целом так же, как у ретровируса HIV-1, — полноразмерная нить комплементарной ДНК (кДНК) синтезируется в три этапа, с использованием трех разных матриц. Однако на заключительном этапе проявляется существенное различие между параретровирусом CaMV и ретровирусами — вместо dsДНК с длинными концевыми повторами (англ. **l**ong **t**erminal **r**epeat, LTR) образуется кольцевая ДНК с вышеописанными нарушениями непрерывно-

сти. Скорее всего, после образования полноразмерной dsДНК обратная транскриптаза переходит на противоположную нить, что создает на коротком участке геномной ДНК трехнитевую структуру.

Дочерние dsДНК могут упаковываться в новые вирионы или поступать в ядро, что позволяет умножить число копий вирусных мРНК и вирусных структурных белков.

На поздних этапах инфекции в цитоплазме образуется зона высокой концентрации вирусных белков («вириоплазма»), где осуществляется сборка вирионов; при этом структурные белки объединяются вокруг молекул геномной ДНК.

5.7. БОРЬБА С ФИТОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Необходимость борьбы с фитовирусами продиктована колоссальным ущербом, который они наносят мировому сельскому хозяйству. Применяемые меры подразделяются на профилактические и терапевтические. Наряду с этим производится выбраковка зараженных, но еще живых растений, что иногда практикуется в случае животных, но, естественно, недопустимо по отношению к человеку.

Ограничение распространения вируса. Основной превентивной мерой борьбы с эпифитотиями служит контроль за интродукцией растительных культур (в том числе декоративных), а также размещение питомников вдали от мест хозяйственного выращивания растений.

Распространению фитовирусов, передающихся механическим путем, препятствует использование классического приема микробиологии — стерилизации (в данном случае это санитарная обработка садовых инструментов и инвентаря). Сохранение фитовирусов на полях ограничивается благодаря уборке остаточной растительной биомассы по завершении вегетационного периода, а также путем вспашки полей после сбора урожая.

Ограничение распространения переносчиков. В последнее время большое внимание уделяется рациональному конструированию агроландшафтов, где численность переносчиков фитовирусов поддерживается на низком уровне естественным путем. В данном случае успех зависит от набора культур, включенных в севооборот, а также от сроков посадки и мелиорации. Например, большинство вирусов зерновых культур циркулирует и персистирует, используя в качестве хозяев травы, особенно многолетние; поэтому не рекомендуется производить посевы зерновых рядом с лугами и пастбищами, а также после многолетних трав в севообороте.

Для борьбы с переносчиками фитовирусов, прежде всего с насекомыми, применяются пестициды; естественно, как и при всякой борьбе с вредителями, встает проблема появления устойчивых форм.

Получение неинфицированного посадочного материала. В соответствующий комплекс мер входят: 1) отбор исходного материала без симптомов болезни; 2) использование культуры клеток апикальной меристемы; 3) обеззараживание методом термотерапии; 4) выращивание в питомниках в условиях защиты от заражения; 5) контроль в процессе выращивания.

Маточные растения, полученные из клеток культуры апикальной меристемы, изначально свободны от вирусной инфекции, поскольку практически не бывает фитовирусов, способных размножаться в этой ткани. Возникновение безвирусных участков (0,1–1 мм от дистального участка апекса) связано с неразвитостью системы плазмодесм и отсутствием дифференцированной проводящей системы.

Термотерапия, или продолжительная (в течение нескольких недель) инкубация семян, клубней и луковиц при 30–50°С, позволяет избавиться от большинства фитовирусов; в данном случае ограничительным фактором служит термоустойчивость самих растений.

Диагностика инфекций. К ранним мерам диагностики относится выявление фитовирусов с помощью молекулярно-биологических и серологических тестов; поздняя диагностика проводится путем мониторинга посевов на предмет выявления и уничтожения поврежденных растений.

Химиотерапия. Примером химиотерапевтического лечения от фитовирусной инфекции служит обработка зараженных клубней такими препаратами, как рибавирин или 5-азадигидроурацил-2,4-диоксидигидро-1,3,5-триазин (DHT).

Селекция вирусоустойчивых сортов. Наряду с традиционной селекцией используется создание методами генной инженерии вирусоустойчивых сортов и разновидностей. Характер генетических изменений может различаться, однако все они нацелены на подавление процессов вирусной репродукции, не имеющих аналогов у растения-хозяина.

Рекомендуемая литература

Agrios G. N. Plant Pathology (5 ed.). Elsevier / Academic Press. Amsterdam e.a. 2005. 952 pp.

Ammar El-D., Tsai C.-W., Whitfield A. E. et al. Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts // An. Rev. Entomol. 2009. Vol. 54. P. 447–468.

Hull R. Comparative Plant Virology (2 ed.). Elsevier / Academic Press. Amsterdam e.a. 2009. 376 pp.

Hull R., Ellis R., Martthews F. Matthew's Plant Virology. Elsevier / Academic Press. Amsterdam e.a. 2002. 1001 pp.

Khan J. A., Dijkstra J. Plant Viruses as Molecular Pathogens. Foods Products Press. Binghampton, New York (USA). 2002. 537 pp.

Mahy B. W. J., van Regenmortel M. H. V. (Eds.) Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Elsevier / Academic Press. Amsterdam e.a. 2009. 632 pp.

Maia I. G., Sėron K., Haenni A.-L. et al. Gene expression from viral RNA genomes // Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 32. P. 367–391.

Mushegian A. R., Shepherd R. J. Genetic elements of plant viruses as tools for genetic engineering // Microbiol. Rev. 1995. Vol. 59. P. 548–578.

Plumb R. T., Callow J. A. (Eds.) Plant Virus Vector Interactions. Elsevier / Academic Press. San Diego e.a. (USA). 2002. Adv. Bot. Res. Vol. 36. 275 pp.

Riesner D., Gross H. J. Viroids // Annu. Rev. Biochem. 1985. Vol. 54. P. 531–564.

Taliansky M., Torrance L., Kalinina N. O. Role of plant virus movement proteins // Meth. Mol. Biol. 2008. Vol. 451. P. 33–54.

ГЛАВА 6

ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ

Так как авторы учебника не стремились (и не имели возможности) охарактеризовать всех вирусов животных, настоящая глава представляет собой обзор главных семейств с важнейшими представителями. Наряду с актуальными для медицины вирусами человека рассматриваются вирусы других млекопитающих, а также экологически и хозяйственно значимые вирусы птиц, рыб, земноводных, насекомых и ракообразных.

При описании вирусов животных делается акцент на их использование в качестве модельных объектов вирусологии, а также их применение в генной инженерии и генной терапии; по возможности упоминается их роль в эпидемиологической обстановке, в частности на территории Российской Федерации. Несмотря на разную степень детализации при выборочном описании семейств, авторы учебника пытались на конкретных примерах отразить общие свойства вирусов и закономерности вирусных инфекций.

К данному разделу учебника ни в коем случае не следует относиться как к пособию по медицине или ветеринарии — все вопросы, касающиеся диагностики, лечения и профилактики вирусных болезней человека и животных, необходимо адресовать специалистам-медикам.

6.1. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Специфика вирусов животных тесно связана с особенностями строения и физиологии их хозяев, поскольку является результатом их совместной эволюции.

Эти вирусы проникают в клетки либо путем эндоцитоза, либо в результате слияния оболочки вириона с цитоплазматической мембраной. Вирус гриппа, например, использует механизм клатрин-опосредованного, а полиомавирусы — кавеолин-опосредованного эндоцитоза (см. раздел 1.5.3). В свою очередь, вирусы герпеса, вирус иммунодефицита человека и вирус кори доставляют свой генетический материал

в цитоплазму хозяина путем слияния липопротеиновой мембраны вириона с цитоплазматической мембраной. Таким образом, в отличие от бактериофагов, вирусы животных проникают в клетку либо в интактном виде, либо частично раздетыми.

Поскольку у млекопитающих сильно развит клеточный и гуморальный иммунитет, их вирусы часто содержат гены, ответственные за уклонение от иммунного ответа хозяина или за его подавление.

Например, в геноме аденовирусов присутствует блок стелс-генов (англ. stealth — украдкой), продукты которых вызывают деградацию поверхностных рецепторов зараженной клетки, в результате чего она становится «невидимой» для иммунной системы. В свою очередь, вирусы гриппа и кори кодируют ранние неструктурные белки, подавляющие клеточный сигналинг, в частности при использовании системы интерферона, предназначенной информировать соседние клетки о вирусной инфекции и запускать противовирусный ответ. Вирус Эбола и респираторно-синцитиальный вирус (RSV) не только блокируют межклеточный сигналинг, но и заставляют инфицированные клетки секретировать вирусные белки для связывания нейтрализующих антител, которые вырабатываются в ответ на вирусную инфекцию. Особо изощренные способы подавления иммунного ответа используют вирусы, вызывающие хронические и медленные инфекции (в частности вирус гепатита С, герпесвирусы и вирус ВИЧ). Эта тема будет подробно освещена в соответствующих подразделах.

6.1.1. ОНТОГЕНЕЗ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Цикл развития вирусов животных состоит из тех же основных стадий, что и у вирусов других организмов, однако имеет ряд особенностей.

Адсорбция. Для того, чтобы вирус прикрепился к клетке, на ее поверхности должны присутствовать рецепторы с той или иной степенью избирательности; соответственно различают неспецифическую и специфическую адсорбцию.

В ***неспецифической адсорбции*** участвуют неполярные и полярные химические группы, широко представленные на поверхности клеток разного типа, в частности остатки сахаров, сиаловая кислота, гепарансульфат, заряженные «головки» липидов и т. п. Неспецифическая адсорбция не всегда завершается проникновением вируса и бывает обратимой. Однако когда вирион вступает во взаимодействие со специфическими рецепторами, она становится необратимой.

Специфическая адсорбция — это сложный многостадийный процесс, в котором могут участвовать несколько вирусных и клеточных белков. Как правило, со стороны хозяина она опосредована сложноустроенными рецепторами, характерными для определенного типа клеток. Например, рецептором для вируса ВИЧ являются молекулы CD4 (трансмембранные белки, экспонированные на поверхности Т-хелперов). Для аденовирусов первичным специфическим рецептором служит белок CAR (сокр. от англ. **C**oxsackie **a**denovirus **r**eceptor; *компонент плотных контактов, англ. tight junction*); на следующей стадии специфической адсорбции используются интегрины (белки, обеспечивающие прикрепление клетки к внеклеточному матриксу).

Вслед за специфической адсорбцией происходит интернализация вирусного генома.

Проникновение вируса. Как уже отмечалось (см. раздел 1.5.3), вирусы животных проникают в клетки либо путем эндоцитоза, либо в результате слияния суперкапсида с цитоплазматической мембраной.

Эндоцитоз происходит в ответ на лиганд-рецепторное взаимодействие клетки с вирусными белками. В данном случае вирус использует механизмы, которые в норме обеспечивают поглощение пищи и/или обновление поверхностных рецепторов.

Многие оболочные вирусы проникают в клетки путем слияния вирусной мембраны с мембраной хозяина; для этого используются специализированные вирусные белки слияния (англ. fusion protein). Примером служат представители семейства *Paramyxoviridae*, в частности вирусы кори, парагриппа, чумы плотоядных и эпидемического паротита (свинки), а также представители семейства *Retroviridae* — вирусы иммунодефицита и лейкозов.

Раздевание вируса и презентация генома. У вирусов животных, использующих для проникновения в клетки механизм слияния мембран, презентация генома обычно сопряжена с проникновением. Если вирус заражает клетку путем эндоцитоза, проникновение предшествует презентации генома. Для этого мембрана оболочных вирусов (таких, как вирус гриппа) сливается с мембраной эндосомы; безоболочные вирусы (например, пикорнавирусы) прикрепляются изнутри к мембране эндосомы, их капсиды раскрываются, высвобождая геномную РНК.

Нуклеокапсиды ДНК-содержащих вирусов (в частности, аденовирусов и вирусов герпеса) доставляются к ядерным порам, и геномная нуклеиновая кислота высвобождается в нуклеоплазму. Внутриклеточная транслокация нуклеокапсидов или рибонуклеопротеиновых комплексов происходит с помощью транспортных белков, которые распознают специфические сайты на вирусных белках, например сигналы ядерной локализации (англ. nuclear localization signal).

Следует отметить, что не все вирусы животных проходят стадию раздевания. Например, содержащие dsРНК ротавирусы никогда полностью не раздеваются и не высвобождают свой геном — у них первичная транскрипция происходит внутри капсида; ds-геномы потомства также образуются не в цитоплазме, а внутри заранее сформированных капсидов.

Синтез вирусных белков и нуклеиновых кислот. Различают ранние и поздние вирусные белки; первые образуются в начале цикла размножения, вторые — в конце его. Многие вирусы животных на ранней стадии инфекции синтезируют специализированные белки, подавляющие иммунный ответ хозяина. Как правило, это неструктурные белки, которые не входят в состав вирусных частиц.

Вирусы животных различаются по зависимости от клеточных биосинтезов. В то время как их белки, как у всех вирусов, образуются на хозяйских рибосомах, их нуклеиновые кислоты обычно синтезируются собственными ферментами. Для этого РНК-содержащие вирусы (в частности, вирус гриппа) используют вирусоспецифичные РНК-зависимые РНК-полимеразы (RdRP). Крупные ДНК-содержащие вирусы (например, вирусы африканской чумы свиней, иридовирусы и вирусы оспы) образуют цитоплазматические вирусные фабрики, где геномная ДНК синтезируется с помощью вирусных ферментов.

Сборка вирионов. После того, как в клетке накопилось достаточно вирусных структурных белков, начинается сборка вирионов. У большинства ДНК-содержащих

вирусов животных сначала формируются капсиды, а затем в них упаковывается генетический материал. Вирионы оболочных РНК-содержащих вирусов упаковываются и при отпочковании от клеточных мембран.

Выход вирионов. Безоболочные вирусы животных часто образуют внутри инфицированной клетки обширные квазикристаллические скопления. В данном случае вирионы могут выйти из клетки только после того, как цитоплазматическая мембрана разрушится и клетка погибнет. Некоторые вирусы, например аденовирусы, помогают выходу своего потомства, образуя ***белки смерти***, или ***апоптины*** (англ. death protein, DP; apoptin), которые стимулируют апоптоз.

Выход оболочных вирусов в отличие от выхода безоболочных вирусов не обязательно связан с гибелью клетки. При низкой интенсивности отпочкования, например, при хронической инфекции вирусом гепатита С, клетка может долго существовать, производя все новые и новые вирусные частицы. У многих оболочных вирусов (в частности, у вирусов гриппа и коронавирусов) представители нового поколения вирионов остаются после выхода прикрепленными к клеточной мембране; чтобы нарушить эту связь, требуются специализированные вирусные или клеточные ферменты. У вируса гриппа такую роль выполняет нейраминидаза.

Внеклеточное созревание вирионов. Для многих вирусов животных характерна стадия внеклеточного ***созревания*** (англ. maturaton), когда вышедшие из клетки частицы вирусного потомства претерпевают изменения под воздействием вирусных и/или клеточных ферментов. Вновь синтезированные вирусные частицы зачастую не способны осуществить следующий раунд размножения, пока не созреют.

Стадия созревания отчетливо выражена у таких вирусов, как аденовирусы и вирус HIV-1. В процессе созревания структурные белки вируса процессируются вирусоспецифичными протеазами, что приводит к завершению формирования капсида.

6.1.2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Вирусы способны размножаться в клетках животных определенного вида и передаваться от одной особи к другой. Как правило, вирусы животных могут размножаться в клетках одного или нескольких родственных видов хозяина.

Специфичность вируса (англ. host specificity — специфичность в отношении хозяина) непосредственно не связана со способностью вызывать заболевание — многие вирусы циркулируют в природных популяциях хозяев, не причиняя им особого вреда. В то же время у «тупикового» хозяина, каковым часто является человек, вирусы животных способны вызывать тяжелые, а иногда смертельные заболевания (в популяции тупикового хозяина вирус по определению не передается от особи к особи). Примерами служат вирусы бешенства и клещевого энцефалита.

Для многих вирусов животных характерен сложный экологический цикл, обусловленный свойством размножаться в клетках неродственных организмов, например млекопитающих и членистоногих. Очень часто промежуточными хозяевами служат членистоногие (клещи, москиты и т. д.), поэтому вирусы, которые передаются млекопитающим через их укус, называются ***арбовирусами*** (сокр. от англ. **ar**thropod **borne virus** — вирус, переносимый членистоногими).

Следует учесть, что специфичность вирусов никогда не бывает абсолютной и варьирует в широких пределах в зависимости от природы вируса и хозяина. Например, чума плотоядных, поражающая главным образом собак и волков, не раз становилась причиной гибели львов и леопардов в африканских национальных парках.

В настоящее время благодаря применению методов генной диагностики представления о специфичности многих вирусов животных сильно изменились, поскольку появилась возможность выявлять субклинические и бессимптомные формы инфекции. В частности оказалось, что ротавирусы собак способны вызывать бессимптомную инфекцию у человека; коронавирусы коров (телят) и собак размножаются в кишечнике кошек и т. п.

Когда вирус почему-либо встречается с популяцией нового хозяина и приобретает способность передаваться от особи к особи, говорят о преодолении вирусом межвидового барьера и смене хозяина. Примером служит появление в 1976 г. новой болезни собак — парвовирусного энтерита («олимпийки»). Этот новый парвовирус — вариант давно известного вируса панлейкопении кошек, который при невыясненных обстоятельствах сменил хозяина и в результате перестал быть патогенным для первичного хозяина, хотя сохранил способность в нем размножаться.

Клеточный тропизм. В многоклеточном организме вирус заражает только клетки, на поверхности которых имеются специфические рецепторы и которые способны поддерживать его размножение. Например, ротавирусы и парвовирусы поражают тонкий кишечник, вызывая острый энтерит, однако первые размножаются исключительно в дифференцированных клетках ворсинок, а вторые — в камбиальных клетках крипт. Респираторные вирусы, как правило, могут размножаться только в эпителии дыхательных путей, а вирусы, вызывающие гепатит, — в гепатоцитах.

Некоторые вирусы способны размножаться в клетках нескольких типов. Например, вирус простого герпеса при первичном заражении размножается в эпидермисе, а затем по аксонам добирается до спинальных ганглиев, где вызывает латентную инфекцию. В свою очередь, вирус полиомиелита в норме реплицируется в желудочно-кишечном тракте, однако в провоцирующих условиях (при травмах, внутримышечных инъекциях и т. д.) может проникнуть в центральную нервную систему и вызвать поражение моторных нейронов.

Многие вирусы способны изменять свой клеточный тропизм при прогрессирующей инфекции. Например, вирус иммунодефицита человека в начальной стадии инфицирует почти исключительно Т-хелперы, однако с развитием заболевания приобретает способность заражать моноциты/макрофаги, дендритные клетки и астроглию. Наконец, коронавирусы кошек в норме персистируют в эпителии кишечника, однако если хозяин перенес стресс, они начинают заражать макрофаги, а затем клетки других тканей и органов. Развивается системная инфекция, заканчивающаяся гибелью животного.

Разнообразие вирусов животных. Вирусы животных, даже если говорить только о вирусах млекопитающих, исключительно разнообразны в отношении генетического материала, строения вирионов и цикла размножения. Приведем ряд типичных, а также крайних примеров.

Средний размер генома ssРНК-содержащих вирусов животных составляет 10–15 тыс. н. Таковы геномы вируса гриппа, вируса иммунодефицита человека и виру-

са кори. Самый большой ssРНК-геном (~30 тыс. н.) имеют коронавирусы, а самый маленький (~7 тыс. н.) — калицивирусы и пикорнавирусы. Диаметр частиц РНК-содержащих вирусов животных варьирует в пределах 30–300 нм (в среднем 80–100 нм). Предполагается, что его естественным ограничителем служит размер генома, который, в свою очередь, ограничивается свойством полимеразного комплекса ошибаться чаще ДНК-полимеразы при неспособности исправлять (репарировать) ошибки.

Диапазон размера генома у самых маленьких и самых больших ДНК-содержащих вирусов животных значительно шире. В частности, геном вируса гепатита В всего 3,2 тыс. п.н., в то время как геном таких крупных вирусов, как вирус оспы, некоторые герпесвирусы и иридовирусы, имеет размер 300–400 тыс. п.н., т. е. различие составляет целые два порядка. Средний диаметр вириона ДНК-содержащих вирусов животных близок к 100 нм.

Размер генома вируса животных не коррелирует с размером генома хозяина; так, самый большой из известных вирусных геномов (1200 тыс. п.н.) у вируса амебы — *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*.

Один и тот же вид животного может быть хозяином и самых мелких, и самых крупных вирусов. Например, дикие африканские свиньи-бородавочники служат природными хозяевами парвовирусов (размер генома — 4 тыс. н.), асфарвирусов (200 тыс. п.н.) и поксвирусов (350 тыс п.н.).

6.2. СИСТЕМАТИКА ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Различия между вирусами животных, близкими по клиническим проявлениям и кругу хозяев, первоначально устанавливались с помощью иммунологических реакций. В основном использовалась реакция нейтрализации сывороточными антителами, полученными от переболевших животных. Тогда же были введены такие понятия, как видовой и групповой антигены (англ. species antigen, SAG; group antigen, GAG).

В настоящее время в систематике вирусов животных преобладает филогенетический подход, основанный на результатах сравнения нуклеотидных последовательностей геномной нуклеиновой кислоты. Однако это не отказ от классификации по антигенным свойствам, поскольку она очень важна в иммунологии, а также при производстве диагностических иммуноферментных тест-систем и вирусных вакцин. Поскольку антигенные свойства вирусных белков определяются более высокими уровнями молекулярной структуры, чем аминокислотная последовательность, классификация по антигенным свойствам не всегда совпадает с филогенетической. Более подробно классификация вирусов по антигенным свойствам будет рассмотрена на примерах вируса гриппа (сем. *Orthomyxoviridae*) и ротавирусов (сем. *Reoviridae*).

Современная систематика вирусов в первую очередь учитывает тип геномной нуклеиновой кислоты и, как следствие, стратегию ее транскрипции и репликации (см. раздел 1.8). Согласно классификации Дэвида Балтимора, можно выделить семь основных групп вирусов животных:

— ssРНК(+)-вирусы семейств *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae* и *Togaviridae*;

— ssРНК(–)-вирусы семейств *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae*;

— dsРНК-вирусы семейств *Birnaviridae* и *Reoviridae*;

— ssДНК-вирусы семейств *Circoviridae* и *Parvoviridae*;

— dsДНК-вирусы семейств *Adenoviridae*, *Asfarviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae* и *Papillomaviridae*;

— ssРНК-ретровирусы семейства *Retroviridae*;

— dsДНК-ретровирусы семейства *Hepadnaviridae*.

При классификации вирусов животных в пределах одной и той же группы дополнительно учитываются: 1) структура генома (сегментированный, несегментированный, линейный, кольцевой); 2) порядок расположения генов; 3) (не)сходство с геномами представителей других таксонов; 4) строение вириона; 5) характер онтогенеза вируса; 6) способность инфицировать определенный круг хозяев и т. д.

Основные таксономические группы в систематике вирусов животных — семейства и рода, а международные названия — составные англо-латинские конструкции, в которых обычно отражены хозяин и заболевание: *Bovine viral diarrhea virus* (вирус диареи телят), *Human hepatitis B virus* (вирус гепатита В человека), *Acute bee paralysis virus* (вирус острого паралича пчел) и т. д.

Чтобы получить информацию о конкретном вирусе и определить, к какому семейству он относится, необходимо знать его полное название. При попытке найти вирус по перечню семейств следует учитывать, что некоторые из них объединяются в порядки, а это несколько затрудняет поиски.*

Вирусы животных представлены в четырех официально признанных порядках:

— ***Herpesvirales*** (dsДНК-вирусы; семейства *Alloherpesviridae*, *Herpesviridae* и *Malacoherpesviridae*);

— ***Mononegavirales*** (ssRNA(–)-вирусы с несегментированным геномом; семейства *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae*);

— ***Nidovirales*** (ssRNA(+)-вирусы с «гнездовой» стратегией репликации; семейства *Arteriviridae*, *Coronaviridae*, *Roniviridae* и *Toroviridae*);

— ***Picornavirales*** (ssRNA(+)-вирусы; семейства *Dicistroviridae*, *Iflaviridae* и *Picornaviridae*).

В систематике вирусов животных постоянно происходят какие-то изменения: описываются новые рода и семейства, ранее известные рода повышаются в ранге до

---

* Семейства и рода вирусов животных (табл. 8–14) можно найти на диаграмме «Virosphere-2005», размещенной на сайте http://www.ictvdb.org/index.htm Международного комитета по систематике вирусов (ICTV). В базе данных ICTV можно получить дополнительные сведения о биологических свойствах и систематике большинства вирусов животных.

В медико-биологической базе данных PubMed в разделе «Taxonomy» все вирусы, в том числе вирусы животных, систематизированы по группам, порядкам и семействам в соответствии с рекомендациями ICTV. На этот сайт можно зайти с главной страницы PubMed — http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/, последовательно отметившись в ресурсах Taxonomy\Taxonomy Browser\Viruses.

На сайте PubMed в разделе «Taxonomy» основные группы вирусов животных расположены в алфавитном порядке: *Deltavirus* (вирус гепатита D); dsDNA viruses; dsRNA viruses; retro-transcribing viruses (ДНК- или РНК-содержащие ретровирусы); satellites (вирусы-сателлиты); ssDNA viruses; ssRNA viruses; unclassified viruses.

уровня семейства, появляются новые порядки, вирусы из одного семейства переносятся в другое и т. п. Отдельные изменения в систематике вирусов животных связаны не только с тем, что описываются ранее неизвестные представители; новые семейства часто создаются в результате сравнительного анализа вирусных геномов, депонированных в базе данных GenBank.

Семейства вирусов животных подразделяются на рода и виды. В пределах рода обычно сгруппированы вирусы, инфицирующие взаимно родственные виды животных. Например, вирусы семейства *Birnaviridae*, относящиеся к роду *Aquabirnavirus*, заражают рыб, а вирусы рода *Avibirnavirus* вызывают заболевания у птиц. Критерием вида у вирусов животных, как правило, служит конкретный вид хозяина. В пределах вида вирусы животных различаются по серотипам и генотипам.

Серотип определяется в реакции нейтрализации инфекционной активности вируса сывороткой крови переболевших особей. Кроме этого, для определения серотипа могут быть использованы другие иммунологические тесты: реакция торможения гемагглютинации (РТГА), реакция связывания комплемента (РСК) и т. п. Все они основаны на присутствии в сыворотке крови антител к вирусным белкам. По мере открытия новых вирусов серотипам присваивается тот или иной порядковый номер.

Число серотипов может варьировать в широких пределах и определяется вариабельностью поверхностных белков вируса, например, у вируса полиомиелита известно три серотипа (соответственно, полиовирус-1, -2 и -3). Следовательно, для различения любого «дикого» вируса полиомиелита используются только три иммунные антисыворотки. В то же время у риновирусов человека, также относящихся к семейству *Picornaviridae*, известно 100 серотипов; поэтому для идентификации любого «дикого» риновируса потребуется тест-набор из 100 антисывороток.

От числа серотипов вируса зависит возможность создать вакцину против соответствующего заболевания. Например, у вируса кори известен только один серотип, и поэтому вакцинирование любым аттенуированным (ослабленным) штаммом обеспечивает защиту от заболевания. В свою очередь, в вакцину против вируса полиомиелита необходимо включать ослабленные штаммы сразу трех серотипов. Наконец, создать вакцину против риновируса вообще нереально из-за слишком большого количества его серотипов.

Подразделение серотипов на подтипы и антигенные варианты осуществляется в иммунологических реакциях с моноклональными антителами (МКАТ). Их искусственно получают путем гибридизации В-лимфоцитов иммунизированных животных с клетками культуры миеломы. МКАТ синтезируются специально подобранными клонами клеток гибридомы. Их главное отличие от сывороточных антител заключается в том, что у определенного клона они направлены к одним и тем же эпитопам (антигендетерминирующим участкам) вирусных белков, в то время как сывороточные антитела могут быть направлены не только к разным эпитопам, но и к разным белкам. Проще говоря, все МКАТ определенной группы одинаковы, в то время как сыворотка всегда содержит широкий спектр антител.

Структура белков вируса определяется его генотипом. В современных условиях, при широком использовании молекулярного секвенирования, проще определить генотип вируса, чем его серотип, поскольку иммунные сыворотки не всегда доступ-

ны. Однако для практических целей, например для вакцинации, нужно в первую очередь знать серотип вируса. Во многих случаях (хотя далеко не всегда) серотип можно косвенно определить, сравнивая реконструированную аминокислотную последовательность с таковыми у белков вируса известного серотипа, которые представлены в GenBank. Попытка найти полное соответствие между генотипами и серотипами вируса может не удасться даже в том случае, когда сравниваются последовательности так называемых «нейтрализующих» эпитопов вирусного белка. Причина неудачи состоит в том, что по аминокислотной последовательности трудно предсказать третичную и четвертичную структуру белка, которая определяет серотип. В тех случаях, когда в литературе употребляется термин «тип» (англ. type) или «подтип» (англ. subtype), обычно имеется в виду именно серотип вируса.

Понятие «штамм» (англ. strain) используется по отношению к изолятам вируса, полученным в лаборатории из клинического материала путем пассирования на лабораторных животных или на клеточных культурах; в коллекции может храниться несколько штаммов одного и того же серотипа или генотипа. Одной из важнейших характеристик вирусного штамма служит история выделения и пассирования, которая обязательно должна быть отражена в его паспорте. Нередко случается, что нуклеотидные последовательности первичного изолята и полученного на его основе лабораторного штамма существенно различаются, что обусловлено адаптацией вируса к специфическим условиям культивирования. Особые требования предъявляют к штаммам, которые используются при производстве вакцин и тест-систем — в первую очередь это генетическая стабильность и высокая продуктивность. В современных условиях необходимой кондиции вирусных штаммов удается добиться с помощью методов генной инженерии.

При работе с медицинской литературой следует помнить, что кроме научной классификации вирусов их для удобства часто объединяют в группы по вызываемым заболеваниям: вирусы гепатитов (ВГ), вирусы энцефалитов (ВЭ), вирусы острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), вирусы гастроэнтеритов (ВГЭ) и т. д. В таких группах вирусы объединены вне зависимости от их генетического материала. В качестве примера можно привести гепатовирусов: вируса гепатита А (*Hepatitis A virus*; ssРНК(+); семейство *Picornaviridae*), вируса гепатита В (*Hepatitis B virus*; dsДНК-RT; сем. *Hepadnaviridae*), вируса гепатита С (*Hepatitis C virus*; ssRNA(+); сем. *Flaviviridae*), вируса-сателлита гепатита D (*Hepatitis delta virus*; кольцевая ssРНК; вне семейства), вируса гепатита Е (*Hepatitis E virus*; ssRNA(+); сем. *Hepeviridae*).

В заключение раздела следует отметить, что в современной классификации вирусов животных в первую очередь используются методы биоинформатики, оперирующей большими массивами генетических данных. При таком подходе не всегда учитывается фенотип, хотя именно он во многом определяет характер взаимоотношений вируса и хозяина. Известны случаи, когда вирусы, которые на основе результатов генетического анализа классифицируются как высокопатогенные, оказывались слабопатогенными, и наоборот. Примером служат разные варианты вируса подтипа H5N1 гриппа птиц, изолированные из полевого материала при вспышке «птичьего» гриппа в 2005–2008 гг.

6.3. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Для изучения вирусов животных необходимо владеть приемами их культивирования. В отличие от бактериофагов и вирусов растений (их хозяев легко выращивать, «не жалко», и получение культур которых обычно не представляет сложности), многие вирусы животных слабо изучены из-за отсутствия метода культивирования и удобных лабораторных животных для воспроизведения инфекции.

Современные методы культивирования вирусов животных можно условно подразделить на те, когда используются лабораторные животные, и те, когда используются клеточные культуры.

Лабораторные животные как система для выделения и культивирования вирусов. На заре вирусологии после первичного выделения вирусов от больных людей инфекционный материал размножали на лабораторных животных, причем для изучения вспышек неизвестных заболеваний вирусологам иногда требовался целый «зоопарк». Примером служат поиски в 1937 г. возбудителя клещевого энцефалита, в которых сибирскую экспедицию Л. А. Зильбера сопровождал виварий, в нем содержались мыши, крысы, кролики и обезьяны. Выделение вируса из материала от больных или умерших людей проводилось на мышах и крысах, а ключевые опыты по заражению полученными изолятами и по нейтрализации вируса сывороткой крови переболевших людей — на обезьянах.

К вирусному заражению обычно наиболее чувствительны новорожденные животные. Поэтому в вирусологической практике чаще всего используют детенышей мелких грызунов (крыс, мышей и хомяков), а также птенцов, хотя в некоторых случаях ветеринарные вирусологи предпочитают более крупных животных — коров, овец и свиней.

Возможность выделить и культивировать вируса зависит не только от того, чувствительно ли к нему животное данного вида, но и от того, насколько удобна конкретная экспериментальная модель. Далеко не всех вирусов можно размножать на недорогих и простых в содержании лабораторных животных. Например, крайне актуальная для человека норовирусная инфекция воспроизводится на новорожденных детенышах свинохвостого макака-лапундера (*Macaca nemestrina*), однако эта модель не получила распространение по причине высокой стоимости. Поскольку норовирусная инфекция обычно протекает кратковременно и не сопровождается осложнениями, ее в виде исключения изучают на волонтерах. Сложнее обстоит дело с такими инфекциями, как полиомиелит и вирусные гепатиты. С одной стороны, их запрещено изучать на человеке, поскольку заболевание может сопровождаться тяжелыми осложнениями с переходом в хроническую форму. С другой стороны, полиомиелит и вирусные гепатиты адекватно воспроизводятся только на приматах.

В последнее время в исследовании патогенеза тяжелых вирусных инфекций широко применяются методы генной инженерии. Иногда с их помощью удается создать удобную модель на основе лабораторных животных. Например, трансгенные мыши с человеческим рецептором CD155 чувствительны к вирусу полиомиелита.

Животные, несмотря на трудность стандартизации и высокую стоимость опытов с ними, повсеместно используются с целью выделения и культивирования вирусов.

Одно из главных преимуществ этой модели заключается в том, что при ее использовании вирусный геном сохраняет свою целостность, в то время как при культивировании in vitro вирусы часто теряют гены, ответственные за подавление иммунного ответа.

Лабораторные животные используются не только для выделения вирусов. Они незаменимы при изучении патогенеза заболевания, т. е. негативных изменений в органах и тканях под влиянием вирусной инфекции. Разумеется, наиболее адекватную картину можно наблюдать при заражении того вида или породы, для которых данный вирус является патогенным. Однако такие эксперименты либо исключены по этическим соображениям (когда модельным объектом мог бы послужить человек), либо нежелательны из-за высокой стоимости (когда модельным объектом являются крупные или редкие животные) и по требованию биологической безопасности (недопустимость попадания вируса в окружающую среду). Лабораторные животные часто применяются и при испытаниях новых противовирусных препаратов. Продвижение любого из них на рынок допускается только после тщательной проверки на эффективность и безвредность; поэтому одним из обязательных этапов лицензирования препарата является тестирование на нескольких видах лабораторных животных.

Для многих вирусов, в частности вирусов гриппа и кори, удобной системой для культивирования являются эмбрионы (яйца) птиц. Обычно это куриные эмбрионы, хотя можно использовать эмбрионы и других видов, например перепелов или уток. Они чувствительны к широкому спектру вирусов животных, хотя и не ко всем.

Технология накопления вирусов в данном случае проста: 9–10-дневные куриные эмбрионы обычно заражают в аллантоис и помещают в инкубатор; спустя 4–5 суток содержимое отсасывается (см. рис. 3). Оно имеет высокий титр вирусных частиц (от 10^6 до 10^{10}·мл$^{-1}$), стерильно и свободно от крупных фрагментов клеток. Полученный таким образом препарат удобен для дальнейшей очистки и концентрирования вируса путем центрифугирования. Многие вирусные вакцины, в частности против гриппа и кори, приготавливают именно таким способом.

Клеточные культуры. Мы остановимся лишь на основных понятиях и терминах, касающихся размножения вирусов в клеточных культурах; более подробную информацию можно найти в специальных руководствах.

С середины XX в. широкое распространение получил метод культивирования вирусов в культурах клеток, выделенных из разных органов животных, и была заложена основа коллекций клеточных культур, ныне всемирно известных и активно пополняемых. Использование метода клеточных культур произвело настоящую революцию в вирусологии, поскольку с ними намного проще работать, чем с лабораторными животными. На клеточных культурах были впервые выделены многие ранее неизвестные вирусы, в том числе герпесвирусы 6- и 8-го типов, вирус ВИЧ и ряд других.

Клеточные культуры очень широко применяются в вирусологии для выделения вирусов от больных, для накопления вирусного материала с целью производства вакцин, для изучения онтогенеза вирусов, для тестирования противовирусных препаратов и т. д. Однако следует иметь в виду, что условия размножения вируса in vitro иные, чем в организме животного. Главное различие, как уже отмечалось, состоит в том, что в клеточной культуре вирус не подвержен воздействию со стороны иммунной

системы хозяина и поэтому часто теряет гены, отвечающие за подавление иммунного ответа.

Клеточные культуры классифицируют по происхождению (вид животного, орган, ткань), по методу получения, по способности клеток прикрепляться к субстрату, по приемам культивирования, по биологическим и биохимическим свойствам и т. д. В общем случае различают первичные и перевиваемые клеточные культуры.

Первичные клеточные культуры. Эти культуры получают непосредственно из эмбриональных органов, а также из органов новорожденных или молодых животных путем мацерации тканей и высева клеток в сосуды с питательной средой (см. рис. 4). Вирусологи особенно часто используют первичные культуры почки эмбрионов, поскольку они наиболее чувствительны ко многим вирусам. Одним из примеров успешного применения первичных культур служит выделение группой тайваньских ученых в 2003 г. коронавируса SARS, этиологического агента атипичной пневмонии. В данном случае использовалась первичная культура почки эмбриона макаки-резуса (*Macaca mulatta*).

Будучи высокочувствительными к вирусному заражению, первичные клеточные культуры имеют ряд недостатков. Во-первых, клетки в них совершают лишь ограниченное число последовательных делений (в среднем 50), после чего культура стареет и погибает. Во-вторых, каждый раз берутся клетки нового животного, поэтому такие культуры невозможно стандартизировать. В-третьих, они могут контаминироваться латентными вирусами.

Перевиваемые (иммортализованные, «бессмертные») клеточные культуры. Эти культуры получают таким же способом, но из опухолей или путем трансформации нормальных клеток в опухолевые. Опухолевые клетки потенциально способны к неограниченному делению, что является их основным преимуществом в качестве экспериментальной модели для размножения вирусов. В отличие от первичных перевиваемые клеточные культуры сравнительно легко стандартизировать по основным параметрам, которые долго сохраняются без изменений. Такой материал можно поместить в замороженном состоянии в банк клеточных культур, а затем по мере надобности извлекать оттуда на протяжении десятилетий. Самые известные коллекции клеточных культур находятся в США (**A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection, ATCC) и Германии (**D**eutsche **S**ammlung von **M**ikroorganismen und **Z**ellenkulturen, DSMZ).

Как правило, перевиваемые клеточные культуры менее чувствительны к вирусам, чем их первичные аналоги; тем не менее именно они преимущественно используются для выделения вирусов. Это отчасти обусловлено достаточно жесткими правилами, ограничивающими применение лабораторных животных. Приведем три наиболее известных примера перевиваемых клеточных культур.

Культура HeLa — одна из старейших культур в коллекции ATCC. Она происходит от клеток карциномы шейки матки у пациентки по имени Генриетта Лэкс (**H**enrietta **L**acks). Это одна из самых быстрорастущих и нетребовательных культур; она применяется для выделения аденовирусов и других вирусов человека. Однако следует учитывать, что ДНК клеток HeLa содержит нуклеотидные последовательности папилломавируса 18-го типа человека (*Human papilloma virus type 18*), который и вызвал малигнизацию. Кроме того, при работе с культурой HeLa необходимо соблюдать особые меры предосторожности, так как она может контаминировать другие культуры, конкурентно вытесняя их.

Культура MDCK (сокр. англ. **M**adin–**D**arby **c**anine **k**idney) — перевиваемая эпителиальная культура почки американского кокер-спаниеля. Эта культура широко используется для выделения новых эпидемических вариантов вируса гриппа, а также для производства вирусных вакцин.

Культура Vero (на языке эсперанто **verda reno** — зеленая почка) — перевиваемая эпителиальная культура почки африканской зеленой мартышки (*Chlorocebus* sp.). Она широко используется для выделения вирусов, скрининга токсинов *E. coli* и тестирования лекарственных препаратов. Поскольку клетки этой культуры дефектны по синтезу интерферонов, ее можно использовать для культивирования генетически модифицированных вирусов, которые лишены генов, ответственных за подавление иммунного ответа хозяина.

Эпителиальные клетки, растущие на стенках сосуда, получают субстраты из питательной среды и секретируют метаболиты в произвольном направлении, что не соответствует физиологической норме в составе ткани. Для того, чтобы приблизить условия культивирования к естественным, предложены разные технические решения, в частности выращивание на фильтрах, через которые в культиватор поступает свежая питательная среда. При этом эпителиальные клетки нередко образуют монослой, по своей структуре приближающийся к естественному однослойному эпителию, и у них формируется четко выраженные базальная и апикальная поверхности. Такие клеточные культуры называются ***поляризованными***.

При заражении поляризованных клеточных культур цикл размножения многих вирусов наиболее приближен к их циклу в организме животного. Например, на поляризованных культурах клеток эпителия респираторных отделов дыхательной системы показано, что вирус гриппа проникает в клетку, а также отпочковывается с ее апикальной стороны, покрытой микроворсинками. В отличие от вируса гриппа, вирус везикулярного стоматита и вирус бешенства (семейство *Rhabdoviridae*) проникают в клетку с апикальной стороны, однако отпочковываются от базальной поверхности мембраны. На поляризованных культурах можно изучать процессы, связанные с внутриклеточным транспортом и пространственным сортингом макромолекул, в том числе вирусных белков.

Большинство клеток животных, в частности эпителиальные клетки, при пересеве прикрепляются к стенкам сосуда с помощью внеклеточного матрикса, делятся и при дальнейшем культивировании образуют монослой. Такие культуры называются ***адгезионными***.

Некоторые клетки, например клетки крови, в естественных условиях находятся во взвешенном состоянии, и их можно культивировать в суспензии. Подобные культуры называются ***суспензионными***. Число клеток на единицу объема в суспензионных культурах намного выше, чем в адгезионных.

Для накопления вирусов при промышленном производстве вирусных вакцин важно получить максимальное число клеток хозяина в единице объема, и поэтому для таких целей предпочтительны суспензионные культуры. Однако не всех вирусов можно культивировать в суспензионных культурах всех типов клеток. В частности, эпителиальные клетки либо выращивают на микроносителях, образующих взвесь, либо генетически модифицируют таким образом, чтобы они могли расти, не прикре-

пляясь к стенкам сосуда. Например, экспрессирующую человеческий ген siat7e культуру MDCK, в норме адгезионную, можно выращивать в суспензии плотностью до $7 \cdot 10^5$ клеток·мл$^{-1}$. При использовании таких генетически модифицированных клеток для получения гриппозных вакцин 10 л клеточной суспензии заменяют 10 тыс. куриных эмбрионов.

Органные культуры. Далеко не всех вирусов можно культивировать на клеточных культурах, в том числе первичных. Некоторых вирусов, легко выделяемых от лабораторных животных, удается культивировать только на органных культурах, которые представляют собой фрагменты эмбриональных органов и тканей (поперечные срезы трахеи, кусочки кожи, участки тонкой кишки и т. д.), сохраняемые на питательных средах.

Способность клеточной культуры инфицироваться вирусом называется ***чувствительностью*** к нему, что связано с присутствием соответствующих рецепторов на поверхности клетки. В свою очередь, ***пермиссивностью*** клеточной культуры (англ. permission — разрешение) называется способность клеток поддерживать размножение вируса с выходом инфекционно активных частиц вирусного потомства.

Чувствительность не всегда коррелирует с пермиссивностью. Например, многие клеточные культуры пермиссивны для вируса полиомиелита и других вирусов, содержащих ssРНК(+), но не чувствительны к ним — искусственное введение геномной вирусной РНК в клетки приводит к образованию полноценных частиц вирусного потомства, в то время как заразить клетки естественным путем не удается. Нередко наблюдается обратное явление: клеточная культура, чувствительная к вирусу, оказывается непермиссивной. Пермиссивную клеточную культуру можно сделать чувствительной к вирусу, если заставить ее образовывать специфические рецепторы. Например, модифицированные клетки HeLa, на поверхности которых имеется кошачий рецептор N-аминопептидаза (CD13), способны поддерживать полноценную репродукцию коронавирусов кошки.

Иногда не удается непосредственно размножить вируса в клеточной культуре. В таких случаях с помощью методов генной инженерии можно создать искусственные конструкции, содержащие геном нужного вируса и способные реплицироваться с образованием вирусных частиц. Они называются ***вирусными репликонами***. Подобным образом, например, культивируют вируса гепатита С.

Культуры клеток животных выращивают на питательных средах, основой которых служит водный раствор солей и аминокислот. Чаще всего используются среды DMEM и alpha-MEM, а также ряд других сред, рецептуру которых можно найти на сайтах коммерческих производителей. Как правило, в среду добавляют сыворотку крови животных (до 10%); обычно используют сыворотку телят или фетальную сыворотку (сыворотку коровьих эмбрионов), поскольку она содержит ростовые факторы и липопротеины высокой плотности. Использование сыворотки значительно улучшает условия роста клеток культуры, однако несет угрозу контаминации посторонними вирусами, микоплазмами и прионами. Одним из наиболее частых контаминантов в телячьей сыворотке служит вирус бычьей диареи/болезни слизистой (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV), персистентно инфицирующий 30–70% поголовья. В последние годы наметилась тенденция перехода на бессывороточные питательные

среды, поскольку многие ростовые факторы научились получать генноинженерным способом.

В зараженной культуре видоизменяется форма клеток (например, они округляются), нарушается пролиферативная активность (клетки быстро стареют, либо, наоборот, начинают активно делиться), локально или полностью распадается монослой и т. д. Перечисленные эффекты называются ***цитопатическим действием***, сокращенно ЦПД (англ. **c**yto**p**athic **e**ffect, CPE).

Для некоторых вирусов цитопатическое действие особо ярко выражено. Например, при инфекции аденовирусами (сем. *Adenoviridae*) клетки открепляются от внутренней поверхности сосуда, округляются, собираются в гроздья и лизируются; при обычной множественности заражения монослой за сутки практически полностью распадается. Герпесвирусная инфекция (сем. *Herpesviridae*) характеризуется появлением увеличенных округлившихся клеток с раздутым ядром. В свою очередь, при размножении спумавирусов (сем. *Retroviridae*) в клетках появляются множественные вакуоли, они как бы вспениваются (лат. spuma — пена). Наконец, размножение парамиксовирусов (подсем. *Paramyxovirineae*), сопровождается слиянием клеток с образованием многоядерных синцитиев. Во многих случаях по характеру ЦПД можно определить, какой именно вирус вызвал поражение.

Размножение вируса в культуре не всегда сопровождается выраженным ЦПД, например, вирус краснухи (*Rubella virus*, сем. *Togaviridae*) обычно размножается довольно вяло. При электронно-микроскопическом исследовании в клетках помимо вирусных фабрик выявляется гипертрофированный аппарат Гольджи, хотя на светооптическом уровне наблюдаются лишь незначительные морфологические изменения, не препятствующие образованию полноценных вирионов. Для размножения вируса краснухи, природным хозяином которого является только человек, используют культуру клеток человеческого эмбриона или культуру RK13 (перевиваемые клетки эпителия почки кролика).

Клеточные культуры являются общепринятой моделью для количественной оценки инфекционной активности препаратов вирусных частиц. Чтобы определить титр, приготавливают серию десятикратных или двукратных разведений в пробирках объемом 1 мл; оттуда материал высевают в лунки планшета с клеточной культурой и наблюдают проявление ЦПД. Там, где был внесен материал с высоким содержанием инфекционных частиц, ЦПД развивается достаточно быстро и охватывает основную часть клеток. В лунках с очень низким содержанием инфекционно активного вируса, либо с его полным отсутствием, ЦПД не наблюдается. За инфекционную дозу-50 (англ. **t**issue **c**ulture **i**nfectious **d**ose-**50**, TCID50) принимают количество вируса, которое вызывает появление ЦПД у 50% зараженных клеток. Например, если титр равен шести lgTCID50, это значит, что в исследуемом материале содержится 10^6 инфекционных доз, т. е. посев из 6-го десятикратного разведения дает выраженное ЦПД; при посеве из 7-го разведения в монослое появляются только отдельные бляшки; 8-е и дальнейшие разведения оказываются инфекционно не активными. Если произвести подсчет бляшек (что не всегда возможно и зависит от характера ЦПД), можно выразить титр в бляшкообразующих единицах — БОЕ (англ. **p**lague **f**orming **u**nit, PFU).

В настоящее время в связи с развитием генной инженерии методы размножения вирусов в перевиваемых клеточных культурах переживают расцвет. Многие клеточные линии, ранее считавшиеся малопригодными для культивирования, можно преобразовать в высокопродуктивные системы, оснащая их соответствующими рецепторами и прочими факторами, необходимыми для размножения вирусов.

6.4. ТИПЫ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ ЖИВОТНЫХ

Взаимодействие вируса с организмом животного проходит по разным сценариям, что зависит от типа вируса, хозяина и инфицируемых клеток, а также от состояния иммунной системы хозяина.

Типы инфекций на уровне клеток. По характеру взаимодействия вируса с клетками инфекции подразделяются на литические, хронические и латентные. При размножении вирусов в клеточных культурах конкретный характер инфекции проявляется в том или ином ЦПД; особым типом инфекции, характерным для вирусов животных, является злокачественная трансформация клеток, что также наблюдается в культуре.

Литическая инфекция на уровне клетки сопровождается лизисом и выходом вирусного потомства. Примером такой инфекции может служить инфекция эпителиальных клеток безоболочными вирусами, например аденовирусами, ротавирусами и пикорнавирусами. В культуре клеток литическая инфекция отчетливо проявляется в прогрессирующей деструкции монослоя.

Хроническая инфекция на уровне клетки обычно вызывается оболочными вирусами, потомство которых покидает клетку либо путем отпочкования от цитоплазматической мембраны, либо путем экзоцитоза после отпочкования от внутренних мембран. Итог взаимодействия вируса с клеткой определяется тем, как и насколько используются ее метаболические ресурсы. При интенсивном образовании вирусных частиц они быстро исчерпываются и клетка погибает, т. е. в данном случае инфекция приобретает литический характер. Обычно это происходит при взаимодействии клеток эпителия респираторных отделов дыхательных путей с высокопатогенными вариантами вируса гриппа. В то же время при низком уровне синтеза вирусных белков, что характерно для респираторно-синцитиального вируса (сем. *Paramyxoviridae*), клетка может долго существовать, производя вирусное потомство, и тогда инфекция становится хронической. В частности, вирус краснухи обычно вызывает в клеточной культуре хроническую инфекцию. При этом клетки могут морфологически изменяться и быстро стареть, однако явно выраженной деструкции монослоя, как при литической инфекции, не наблюдается. В свою очередь, в организме животного вирус может вызывать лизис одних клеток и хроническую инфекцию других. Например, вирус диареи телят (сем. *Flaviviridae*) вызывает лизис клеток кишечного эпителия, но хронически инфицирует макрофаги.

Хроническая инфекция на уровне клетки характерна для представителей семейства *Paramyxoviridae* — вирусов кори, морбиливирусов морских млекопитающих,

респираторно-синцитиального вируса и вируса чумы плотоядных. В данном случае рибонуклеопротеиновые комплексы вирусного потомства инфицируют соседние клетки, проникая в них через поры, образованные вирусным белком слияния (англ. fusion protein). Такие комплексы лишены матриксного белка и липопротеиновой оболочки — основных мишеней клеток иммунной системы. Использование данной стратегии позволяет вирусу уклониться от иммунного ответа хозяина. Параллельно с хронической часть клеток поддерживает продуктивную инфекцию. Если же организму животного удается перебороть инфекцию, она становится абортивной (вирус, в конце концов, элиминируется), и формируется стойкий иммунный ответ.

Латентная инфекция на уровне клетки происходит, когда в клетке присутствует вирусный геном, однако он отчетливо не экспрессируется, и сколько-нибудь заметное ЦПД не наблюдается. При латентной инфекции могут синтезироваться некоторые вирусные РНК и белки, однако сборка вирионов не происходит. Примером может служить инфекция клеток нервных ганглиев вирусом простого герпеса, а также инфекция Т-лимфоцитов вирусом ВИЧ. При некоторых условиях латентная инфекция может активироваться и переходить в продуктивную с образованием вирусных частиц. Аналогом латентной инфекции является лизогенная и псевдолизогенная инфекция у бактериофагов (см. раздел 2.3). Однако способность вируса вызывать латентную инфекцию не всегда связана с интеграцией его генома в клеточную хромосому. В частности, геном вируса простого герпеса не встраивается в геном клетки-хозяина, а присутствует в ядре в виде эписомы — замкнутой в кольцо dsДНК. Напротив, геном ретровирусов (в том числе, вируса ВИЧ) включается в клеточный геном.

Интеграция генома вируса может приводить к злокачественной трансформации клетки. В организме животного пролиферация находится под контролем, а в клеточных культурах, особенно в первичных культурах, координация делений проявляется в форме контактного торможения — клетки, растущие на дне сосуда, при соприкосновении друг с другом перестают делиться. Некоторые вирусы, в частности высокоонкогенные папилломавирусы и аденовирусы, встраивают свой геном в геном хозяина, в результате чего нарушается нормальное взаимодействие клеток с их окружением, и они начинают неограниченно делиться. В организме животного такие трансформированные клетки в значительной степени находятся под контролем иммунной системы; тем не менее вирусная инфекция может привести к злокачественному заболеванию. В качестве примера можно назвать лейкозы животных, вызываемые ретровирусами (сем. *Retroviridae*); лимфому Беркитта, одной из причин которой является инфекция вирусом Эпштейна—Барр (сем. *Herpesviridae*), а также рак шейки матки, вызываемый папилломавирусами 16-, 18- и 31-го типов (сем. *Papillomaviridae*).

В норме геном папилломавируса существует в ядре клетки в виде эписомы. Экспрессия вирусных генов строго регулируется в зависимости от характера клеточной дифференцировки. Пока клетка находится вблизи базальной мембраны и активно делится, синтез поздних вирусных белков подавлен. И только когда клетка становится терминально дифференцированной, в ней «разрешается» синтез всех вирусных белков, в том числе белков капсида, необходимых для продуктивной инфекции.

В некоторых случаях под воздействием разных, чаще всего неустановленных, факторов вирусный геном интегрируется в геном клетки, что нарушает нормальную экспрессию последнего и приводит к злокачественной трансформации. При интеграции вирус теряет часть генов, поэтому синтезируются лишь отдельные вирусные белки, а генетический материал вируса реплицируется совместно с генетическим материалом активно делящихся раковых клеток.

Типы инфекции на уровне организма. При классификации типов взаимодействия вирусов животных и организма учитываются такие явления, как клинические признаки инфекции и реакция на нее иммунной системы. В этом случае различают следующие виды вирусной инфекции: острую, хроническую, латентную и медленную (см. рис. 17). Три последних вида инфекции объединяются понятием «персистентная инфекция». Она характеризуется продолжительным, часто пожизненным существованием вируса в хозяине. В зависимости от физиологического состояния последнего она может время от времени активизироваться или ослабляться.

Острая инфекция на уровне организма сопровождается массовой гибелью клеток и ответной реакцией — активизацией клеток иммунной системы. В этом случае гибель инфицированных клеток обусловлена не только и не столько их лизисом под воздействием вируса, сколько влиянием специализированных клеток иммунной системы.

Острая инфекция сопровождается ярко выраженными клиническими признаками: повышением температуры тела, обильными слизистыми выделениями из носоглотки, кашлем, накожной сыпью, желудочно-кишечным расстройством и т. д. Обычно она происходит при первой встрече здорового иммунокомпетентного организма с ранее незнакомым вирусом (следует отметить, что первая встреча с вирусным агентом, или первичная инфекция, не обязательно бывает острой).

При острой инфекции формируется специфический противовирусный иммунный ответ — синтезируются противовирусные антитела и появляются клетки памяти. При повторной встрече с тем же самым вирусом заболевание обычно протекает намного легче, либо вообще не сопровождается клиническими проявлениями.

Первичная острая инфекция характерна для вирусов гриппа, кори, краснухи, норовирусов и аденовирусов. В то же время первичная инфекция, вызванная вирусом полиомиелита и прочими энтеровирусами, в 95% случаев протекает в отсутствие явных клинических проявлений; тем не менее при ней возникает стойкий иммунный ответ. О встрече с вирусом говорит присутствие в сыворотке крови специфических противовирусных антител, причем их высокий уровень обычно свидетельствует о том, что инфекция была острой. Острая инфекция может закончиться полным выздоровлением организма и гибелью вируса, либо, в зависимости от типа вируса и состояния хозяина, переходит в хроническую или латентную.

Хроническая инфекция на уровне организма характеризуется длительным течением и вялым иммунным ответом при непрекращающемся размножении вируса. Ее клиническое течение может варьировать от субострого до субклинического. Примером хронических инфекций являются респираторно-синцитиальная инфекция, парагрипп, гепатиты В и С; известна хроническая форма чумы плотоядных. Хронические инфекции заканчиваются полным выздоровлением (при адекватном лечении), либо вступают в острую фазу.

Латентная инфекция на уровне организма в ряде случаев является переходной от острой инфекции. Примерами служат гепатит В и гепатит С; по некоторым данным, аденовирусы могут вызывать латентную инфекцию на протяжении десятилетий.

Вирусы герпеса (все представители сем. *Herpesviridae*) вызывают пожизненные инфекции, протекающие в разной форме в зависимости от иммунного статуса хозяина. У иммунодефицитных индивидуумов герпесвирусная инфекция часто протекает в хронической форме с постоянно присутствующими клиническими проявлениями, периодическими обострениями и ремиссиями. В то же время у большинства здоровых людей первичная инфекция протекает в виде локального поражения ткани, а затем переходит в латентную инфекцию без каких-либо клинических проявлений.

Латентная инфекция характеризуется скрытым существованием вирусного генома в популяции клеток в отсутствие клинических проявлений и поражения тканей. При этом уровень синтеза вирусных белков в организме настолько мал, что они не способны активизировать систему иммунного надзора, и вирусы эффективно ускользают от «ответа». Латентная инфекция непосредственно не связана со способностью вируса интегрировать свой геном в геном клетки. В частности, вирусы с ssРНК(+) — коронавирусы, пестивирусы и флавивирусы, для которых интеграция генома в клеточный геном в принципе неосуществима, вызывают у хозяев латентные инфекции, вяло размножаясь в цитоплазме. При этом уровень сывороточных антител отражает интенсивность размножения вируса и силу иммунного ответа. Например, при коронавирусной инфекции кошек нарастающий титр противовирусных антител служит признаком перехода инфекции в системную форму с неизбежным летальным исходом.

К ***медленным инфекциям*** на уровне организма (понятие было введено с целью противопоставления «быстро развивающимся» вирусным инфекциям) относятся инфекции, вызываемые вирусами Висна—Мэди овец, вирусами лейкозов, парамиксовирусами (вирус коревого склеротизирующего панэнцефалита, вирус хронической церебральной формы чумы плотоядных), полиомавирусами JC и BK, а также ретровирусами. Медленные инфекции характеризуются прогрессирующим течением и неадекватным иммунным ответом. Такие инфекции рано или поздно заканчиваются гибелью хозяина.

В заключение раздела отметим, что подразделение инфекций, вызываемых вирусами животных, на хронические, латентные и медленные носит условный характер, и разные авторы вкладывают в эти понятия неодинаковый смысл.

Кроме того, в зависимости от конкретных условий, в частности от реакции иммунной системы, одни и те же вирусы могут вызывать у своего природного хозяина разные типы инфекций. Наконец, вирус, вызывающий у природного хозяина один тип инфекции, может вступать в иные взаимоотношения с организмом животного другого вида. Например, герпесвирус обезьян саймири (*Herpesvirus saimiri*), не причиняющий вреда природному хозяину, является высокоонкогенным для человека. Инфекция макак-резусов герпесвирусом В (*Herpesvirus simiae*) также крайне опасна для человека и в 80% случаев приводит к летальному исходу. В свою очередь, многие безвредные для человека вирусы оказываются патогенными для животных.

6.5. МЕТОДЫ НАБЛЮДЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ СТРОЕНИЯ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Вирусы животных исключительно разнообразны по строению, форме и размеру вирионов. Диаметр частиц икосаэдрических вирусов варьирует от 20 нм у цирковирусов до 600–800 нм у мимивирусов. Длина частицы нитевидных оболочных вирусов (например, вируса гриппа С и вируса Эбола) составляет 3–5 мкм при диаметре 10–120 нм. В зависимости от размера вирусов их можно увидеть с помощью светооптических и электронно-микроскопических методов, а также методов молекулярного зондирования.

Разрешение светового микроскопа ограничено дифракционным пределом, что соответствует половине длины волны видимого света (~200 нм), и только наиболее крупных вирусов, например *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, можно непосредственно увидеть под световым микроскопом. Поэтому светооптические методы визуального наблюдения вирусов в основном базируются на использовании флуоресцентных ДНК-красителей (DAPI, Hoechst-33258 и др.), флуоресцирующих белков (GFP, YFP и др.), а также антител, меченных флуорофорами.

При помощи флуоресцентного или лазерного конфокального микроскопа, в принципе, можно увидеть вирусов любого размера в виде светящихся точек или нитей, а также провести подсчет вирусных частиц в жидких средах, например в морской воде. Однако при использовании флуоресцентных красителей все равно сохраняется размерное ограничение световой оптики — близко расположенные частицы видны по отдельности только в том случае, если они находятся друг от друга на расстоянии, превышающем половину длины волны падающего света.

Лазерная конфокальная микроскопия позволяет добиться лучшего разрешения, однако на практике приходится искать компромисс между качеством изображения и разрушением препарата под воздействием лазерного пучка. С помощью данного метода, получившего широкое применение в вирусологии, можно определить локализацию синтеза вирусных белков, проследить транспорт вирионов в клетках и органах хозяина и т. п.

В настоящее время основным методом визуального наблюдения вирусных частиц и изучения их строения служит ***просвечивающая электронная микроскопия*** (англ. **t**ransmissive **e**lectron **m**icroscopy, TEM), используемая в разных модификациях. Напомним, что первые изображения относительно крупных вирусов были получены в конце 1930-х годов (см. рис. 2). Однако тогда еще не удавалось обнаружить детали строения вирионов, что объяснялось не столько несовершенством приборов, сколько использованием грубых методов при подготовке препаратов.

В начальный период развития электронной микроскопии вирусы делали видимыми путем вакуумного напыления атомов металла, что приводило к сглаживанию деталей поверхности вириона. В конце 1940-х годов разрешение электронного микроскопа достигло 3–4 Å, однако при исследовании биологических объектов такой субмолекулярный уровень уже не нужен.

В просвечивающем электронном микроскопе контраст изображения создается за счет упругого рассеивания электронов на ядрах вещества, из которого состоит об-

разец. Чем выше атомный номер элемента, тем сильнее рассеиваются электроны. На визуальном уровне этот эффект проявляется в том, что участки препарата с высоким содержанием тяжелых элементов выглядят темными (электроноплотными). Поскольку вирусные частицы в основном состоят из легких элементов, на фоне углеродной или полимерной подложки их изображение получается слабоконтрастным. Поэтому для визуализации частиц их необходимо оттенять веществом, содержащим атомы тяжелых элементов, например вольфрама, золота, свинца или урана; такой прием называется контрастированием.

В конце 1950-х годов были разработаны методы контрастирования, которые до сих пор широко применяются при изучении морфологии вирусов: метод негативного контрастирования частиц в водных суспензиях и метод позитивного контрастирования ультратонких срезов. С этого времени начинается широкое использование электронной микроскопии в диагностике вирусных инфекций.

Метод ***негативного контрастирования*** (англ. negative staining) применяют для изучения формы вирусных частиц. С этой целью их осаждают на полимерной подложке (ее наносят на поддерживающую металлическую сеточку), а затем обрабатывают раствором вещества-контрастера, обволакивающего частицы и проникающего в неровности их поверхности. Излишек контрастера удаляется фильтровальной бумагой; препарат высушивают на воздухе и помещают в держатель электронного микроскопа. В качестве контрастирующих соединений обычно применяют 1–2%-ный раствор ацетата уранила или калиевой соли фосфорно-вольфрамовой кислоты. Атомы тяжелого элемента создают темный фон вокруг светлых вирусных частиц (отсюда происходит термин «негативное контрастирование»). Пространственное разрешение получаемых таким образом изображений составляет ~1 нм, что позволяет выявить даже отдельные капсомеры. Основными лимитирующими факторами в данном случае выступают толщина подложки и размер зерна контрастирующего вещества. Если оно проникает через поры (супер)капсида, удается выявить внутреннее строение вириона.

Метод негативного контрастирования относительно прост и не занимает много времени; поэтому его широко применяют в вирусологической диагностике. Анализируемым материалом могут быть биологические жидкости, в том числе слюна, сыворотка крови, водный экстракт фекалий и т. п. Для постановки диагноза часто достаточно идентифицировать инфекционного агента до семейства, как правило, по морфологическим признакам вириона. В зависимости от сложности обработки клинического материала такое исследование (с учетом времени на приготовление препарата) занимает от 15 мин до 3 ч.

В последнее время возможности метода негативного контрастирования расширились благодаря применению компьютерной обработки полученных изображений. Если изучаются одинаковые частицы, разрешение можно улучшить при помощи суммирования изображений. При этом повышается соотношение сигнал/шум и нивелируются неровности подложки. Фотографируя частицы под разными углами наклона препарата, можно получить их объемное изображение. Таким способом недавно получены 3D-изображения репликативных комплексов вируса гриппа, рибонуклеопротеина вируса кори и т. п.

Ультратонкие срезы (англ. ultrathin section) инфицированных клеток служат для изучения внутреннего строения вириона и морфологических особенностей отдельных этапов размножения вируса. При этом используются такие же методы приготовления препаратов, как и для исследования ультраструктуры ткани. Биоптат органа или инфицированную клеточную культуру фиксируют 2,5%-ным раствором глутарового альдегида, контрастируют тетраоксидом осмия и/или ацетатом уранила, обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации и заключают в полимерную смолу. Из полученных блоков приготавливают срезы толщиной 20–100 нм, которые после контрастирования просматривают в просвечивающем электронном микроскопе. Клеточные структуры, а также зрелые вирионы и их предшественники выявляются благодаря избирательному связыванию соединений тяжелых металлов с белковыми структурами, что повышает их электронную плотность. Изготовление высококачественных срезов требует навыка и времени (от 3 ч до 3 сут); поэтому данный метод применяется в основном в исследовательских целях. Достигаемое разрешение зависит от методики, однако в целом оно несколько хуже, чем при использовании негативного контрастирования; в частности, отдельные капсомеры (например, гексоны аденовируса) таким способом не выявляются. Качество изображения зависит также от толщины среза; современные ультрамикротомы, например Leica UC-7, позволяют получить срез толщиной 15–20 нм, что открывает возможность томографической реконструкции структуры относительно крупных вирусов.

В настоящее время проблемы, связанные с низким контрастом биологических объектов, отчасти удается преодолеть с помощью ***низковольтной просвечивающей электронной микроскопии*** (англ. low-voltage TEM). Разрешение лучших приборов этого типа, свободно помещающихся на письменном столе, составляет около 2 нм, что вполне достаточно для морфологической идентификации большинства вирусов. Контрастировать препараты обычно не требуется, так как при ускоряющем напряжении 5 кВ контраст изображения в 300 раз выше, чем в обычных электронных микроскопах, работающих при ускоряющем напряжении 100–120 кВ. Следует, однако, учитывать, что низковольтный электронный луч способен проходить только сквозь тонкие препараты (менее 50 нм), и поэтому дополнением к подобным приборам должны быть современные ультрамикротомы, а также вакуумные испарители, используемые для изготовления срезов и подложек.

Основной недостаток просвечивающей электронной микроскопии заключается в том, что подготовка биологических образцов предполагает либо высушивание в вакууме, либо обезвоживание с целью приготовления срезов. В обоих случаях биологический материал деформируется, что приводит к многочисленным артефактам. Собственно говоря, с помощью классических методов получают изображения контрастирующих соединений, а не самих вирусных частиц.

В качестве альтернативы просвечивающей электронной микроскопии недавно разработан метод ***криоэлектронной микроскопии*** (англ. cryo-electron microscopy), позволяющий получать изображения неокрашенных вирусных частиц в их естественном гидратированном состоянии. В данном случае препарат представляет собой вирусную суспензию, мгновенно замороженную жидким азотом (–186°C); при этом вода не успевает кристаллизоваться. Охлажденный препарат немедленно по-

мещают в криодержатель электронного микроскопа. Поскольку вирусные частицы по электронной плотности мало отличаются от воды, изображение получается недостаточно четким; его качество можно повысить с помощью фазово-контрастного устройства и компьютерной обработки сигнала.

В начале 1990-х годов был разработан метод ***криоэлектронной 3D-реконструкции*** симметричных вирусов, основанный на компьютерном суммировании изображений отдельных частиц (англ. single particle analysis). Так были получены изображения аденовирусов, ротавирусов и капсидов вируса герпеса; разрешение составляло 3–4 Å. Следует иметь в виду, что разрешение повышается только для тех частей вириона, которые имеют жесткую форму, тогда как конфигурация динамичных структур (например, поверхностных рецепторов или порталов на вершинах икосаэдра) при суммировании усредняется и «размывается».

Детали строения несимметричных, в частности оболочных, вирусов можно изучать с помощью метода ***криоэлектронной томографии*** (англ. cryo-electron tomography), разработанного в начале 2000-х годов. Он позволяет получить 3D-изображение произвольно выбранной вирусной частицы, отражающее структуру ее поверхности и ее внутреннее устройство. В данном случае объемное изображение генерируется компьютером путем суммирования серии изображений, получаемых под разными углами наклона образца. Этот метод был впервые применен в 2003 г. для получения 3D-изображения вирионов вируса простого герпеса. В настоящее время с его помощью достигнуто разрешение ~1,5 нм, что позволяет идентифицировать структурные белки. Основное достоинство криоэлектронных томограмм несимметричных вирусов по сравнению с 3D-реконструкцией симметричных вирусов заключается в том, что в первом случае можно увидеть отдельные детали строения вирионов. В частности, установлено, что одна из вершин капсида вируса герпеса имеет особое строение и соответствует порталу для упаковки ДНК.

Ценную информацию о морфогенезе вирионов можно получить при помощи ***сканирующей электронной микроскопии*** (англ. scanning electron microscopy, SEM). В данном случае электронный луч «прочесывает» образец, формируя изображение рельефа поверхности. При подготовке препарата его обезвоживают, и на его поверхность напыляют металл, что приводит к деформации и сглаживанию деталей. Разрешение SEM лимитируется диаметром луча, а также методикой напыления и обычно составляет 2–3 нм, что на порядок ниже разрешения при TEM. Поэтому SEM применяется в вирусологии только для решения ограниченного круга задач. Таким путем можно, например, изучать отпочкование оболочных вирусов. Достоинства и недостатки SEM хорошо иллюстрируются примером вируса гриппа: благодаря большой глубине резкости на поверхности клетки видны отпочковывающиеся вирионы, однако не заметна «щетка» молекул гемагглютинина на вирионах, легко выявляемая методом негативного контрастирования.

Одна из современных модификаций SEM, ***экологическая сканирующая электронная микроскопия*** (англ. environmental scanning electron microscopy, ESEM), позволяет исследовать образцы во влажной камере без предварительного напыления металлом. Однако сканирующие микроскопы этой разновидности еще не достигли необходимого разрешения. В настоящее время ESEM широко применяется в фарма-

цевтике для изучения структуры микрокапсул и эмульсий, начиненных разными препаратами, в том числе вирусными вакцинами.

Сканирующая электронная микроскопия получила новые возможности в связи с разработкой фирмой Carl Zeiss ***сканирующего гелиево-ионного микроскопа***. Благодаря уникальным параметрам гелиево-ионного пучка этот прибор позволяет получить высококонтрастные изображения биологических образцов с разрешением 0,75 нм.

Как в просвечивающих, так и в сканирующих электронных и ионных микроскопах образец помещают либо в вакуумную камеру, либо в камеру с пониженным давлением газа (в случае ESEM), что накладывает жесткие ограничения на характер получаемой информации. С помощью вышеописанных методов нельзя изучать динамические процессы в жидкости, например конформационные изменения вирусных капсидов. Такая возможность появилась с изобретением в 1990-х годах ***сканирующей зондовой микроскопии***, или ***атомной силовой микроскопии*** (англ. scanning probe microscopy, SPM; atomic force microscopy, AFM). В данном случае изображения создаются по принципу сканирования образца зондом-кантилевером (англ. cantilever — кронштейн), с передачей на компьютер сигнала о взаимодействии в зоне контакта. Зондовые микроскопы, снабженные жидкостной ячейкой, способны «на ощупь» визуализировать вирусные частицы, адсорбированные на ровной подложке. В данном случае разрешение составляет <0,1 нм по вертикали; по горизонтали оно на порядок ниже и сильно зависит от размера объекта. С помощью AFM можно не только наблюдать динамические изменения вирусных частиц, но и проводить измерения, например, определять механическую прочность вирионов или картировать распределение электрического потенциала на их поверхности. В частности, этим методом недавно показано, что субъединицы гемагглютинина на поверхности частицы вируса гриппа при снижении pH перестраиваются и образуют гексагональную решетку.

Методы изучения структуры вирусных частиц постоянно совершенствуются; все чаще используется комплексный подход. Благодаря внедрению масс-спектрометрии появилась возможность определять элементный состав белков вирионов. На основе расширенной базы данных о 3D-структуре вирусных белков вскоре появятся методы, позволяющие локализовать эти молекулы на «карте» распределения электронной плотности.

6.6. БИОРАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Хотя в наше время вирусологов все чаще начинает интересовать глобальное участие вирусов в эволюции и экосистемах, важнейшей темой для них остаются вирусные болезни человека. Гепатиты, грипп, респираторные и энтеровирусные заболевания (список нетрудно расширить) были и, по-видимому, надолго останутся одним из главных бедствий человечества.

На фоне безусловных успехов профилактики и лечения вирусных инфекций, несмотря на практически полную ликвидацию ряда опаснейших болезнетворных агентов (в частности, вируса натуральной оспы) вирусы все еще виновники страданий и причина преждевременной смерти миллионов людей.

6.6.1. ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ dsДНК

Изучение вирусов животных позволяет не только проникнуть в тайны их молекулярных взаимоотношений с организмом хозяина, но и решить конкретные задачи медицины. В настоящем разделе мы будем придерживаться традиционной направленности вирусологии и в первую очередь уделим внимание вирусным заболеваниям человека, которые вызывают представители семейств *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae* и *Poxviridae*.

6.6.1.1. Семейство *Adenoviridae*

В 1953 г. из аденоидов (носоглоточных миндалин) людей, страдающих респираторными заболеваниями, были выделены ранее неизвестные вирусы, которые вскоре получили название ***аденовирусов*** (от греч. aden — железа).

В настоящее время в семействе *Adenoviridae* описаны многочисленные вирусы млекопитающих, птиц, рептилий, земноводных и рыб; только у человека известно свыше 50 аденовирусов.

Вирионы аденовирусов — это икосаэдры диаметром 70–90 нм с нитями (фибриллами) на вершинах. Их генетический материал — линейная молекула dsДНК размером 26–45 тыс. п.н.

Структура семейства. В семейство *Adenoviridae* входят два рода, обособленные на основе генетических критериев (*Atadenovirus* и *Siadenovirus*), а также три рода, в которые объединены аденовирусы в соответствии с типом хозяина (*Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus* и *Mastadenovirus*).

Род Atadenovirus (от AT-adenovirus; *этот недавно образованный род объединяет аденовирусов с высоким относительным содержанием AT-пар в геномной ДНК*). Типовой вид этого рода — аденовирус D овец (*Ovine adenovirus D*). К этому же роду принадлежат аденовирусы змей, опоссумов, коров (телят), уток, хамелеонов и ящериц.

Род Siadenovirus (от sialidase; *этот род объединяет аденовирусов, в геноме которых на 5′-конце имеется ген сиалидазы — фермента, отрезающего остатки сиаловых кислот от поверхностных гликопротеинов клетки хозяина*). Кроме того, геном сиаденовирусов имеет минимальный для представителей данного семейства размер — 26–28 тыс. п.н. Они инфицируют лягушек и птиц; в США зарегистрированы случаи массовой гибели от них соколов. Типовой вид данного рода — аденовирус С лягушек (***Frog adenovirus C***, FrAdV-C)

Род Aviadenovirus (от лат. avis — птица). Этот род объединяет аденовирусов индеек, перепелов, кур и ряда других птиц. Типовой вид, аденовирус-1 (*Avian adenovirus 1*), вызывает гибель эмбрионов и респираторное заболевание у перепелов и цыплят. Другие представители этого рода являются возбудителями синдрома снижения яйценоскости (англ. egg drop syndrome), геморрагического энтерита (англ. haemorrhagic enteritis) и гепатита с образованием телец включений.

Род Ichtadenovirus (от греч. ichthys — рыба). К этому роду отнесены аденовирусы рыб; единственный охарактеризованный представитель — аденовирус белого осетра (*White sturgeon adenovirus*). Других аденовирусов рыб пока не удается культивировать.

Род Mastadenovirus (греч. mastos — грудь; *указание на способность вызывать маститы, или воспаления грудных желез*). В состав этого рода входят аденовирусы млекопитающих, в том числе коров (телят), овец, оленей, свиней, собак и человека. У человека известно 57 аденовирусов, которые разбиты на 7 групп (A–G). Представители рода *Mastadenovirus* послужили основными объектами исследований в области молекулярной биологии аденовирусов.

Подразделение аденовирусов на указанные рода отражает современные взгляды на их происхождение и эволюцию. Например, ветвь рода *Aviadenovirus* обособилась раньше, чем дивергировали ветви родов *Atadenovirus* и *Mastadenovirus*. Отмечено также, что аденовирусы имеют ряд общих черт с бактериофагами семейства *Tectiviridae*.

В пределах рода аденовирусы подразделяются на группы в соответствии с конкретными хозяевами. Группа может состоять из нескольких типов (серотипов), которым даются буквенно-цифровые обозначения — HAdV5 (сокр. англ. ***Human adenovirus type 5*** — аденовирус типа-5 человека), OAdV-D (сокр. англ. ***Ovine Adenovirus type D*** — аденовирус типа-D овец) и т. д.

Строение и цикл репродукции аденовирусов в основном изучены на примере аденовирусов типа-2 и типа-5 человека.

Строение вириона. Частицы аденовирусов представляют собой икосаэдр, вершины которого несут нити с концевыми утолщениями (рис. 77). Диаметр вириона составляет 70–80 нм (без учета длины нитей). На негативно контрастированных препаратах видны относительно крупные капсомеры. На вершинах икосаэдра находятся пентоны, к которым прикрепляются нити. Ребра и грани икосаэдра образованы гексонами, составляющими ~80% массы вириона.

Аденовирусы различаются формой и длиной нитей. Самые короткие нити имеет аденовирус типа-3, самые длинные — аденовирус типа-12. Аденовирусы группы F, или кишечные аденовирусы (тип-40 и тип-41), наряду с нитями длиной ~20 нм содержат нити длиной ~30 нм. Нити используются для адсорбции на клеточных рецепторах, например на рецепторе CAR (сокр. англ. Coxsakie adenovirus receptor); на микроскопических препаратах клинических образцов они, как правило, не видны. В природе вирионы довольно быстро теряют часть нитей, хотя это мало сказывается на инфекционной активности, поскольку в адсорбции и проникновении также участвуют гексоны и пентоны. Пентон состоит из пяти белковых протомеров с дистальными петлями, содержащими мотивы для связывания с клеточными интегринами.

Структурные белки аденовирусов обозначаются римскими цифрами в порядке убывания молекулярной массы. На-

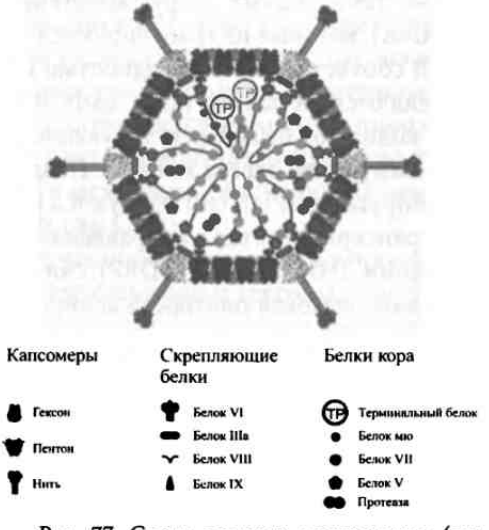


Рис. 77. Схема вириона аденовируса (по: Nemerov, 2009).

пример, второе название гексона — полипептид II. Между гексонами расположены «скрепляющие» белки (англ. cement protein); к ним относятся полипептиды IIIa, VI, VIII и IX.

Внутри вириона находится генетический материал — линейная dsДНК в комплексе с ДНК-связывающими белками V, VII, IVa2 и μ. Одним из важнейших структурных белков аденовируса является цистеиновая протеаза (**a**denovirus **p**rotease, AVP; 23 кДа), числом 20–70 молекул на вирион. Она процессирует белки вириона на стадии созревания, а также способствует перестройке капсида, необходимой для выхода из эндосомы на этапе проникновения в клетки.

Строение генома. Размер генома аденовирусов варьирует в пределах от 26 тыс. п.н. (у представителей рода *Siadenovirus*) до 46 тыс. п.н. (у представителей рода *Aviadenovirus*). На концах геномной ДНК находятся инвертированные повторы (англ. **i**nverted **t**erminal **r**epeat, ITR), при спаривании которых образуется большая шпилька (англ. pan-handle — сковорода с ручкой). На 5′-конце следом за ITR расположена последовательность ψ (сигнал инкапсидирования), необходимая для упаковки ДНК. Концы молекулы геномной ДНК ковалентно связаны с молекулами «терминального» белка TP (сокр. англ. **t**erminal **p**rotein), необходимого для инициации репликации.

Геном аденовирусов можно условно подразделить на четыре функциональных блока:

— гены белков, обеспечивающих репликацию генома вируса, т.е. ген ДНК-полимеразы, ген предшественника белка TP, белка pTP (сокр. англ. **p**re-**t**erminal **p**rotein) и ген ДНК-связывающего белка DBP (сокр. англ. **D**NA-**b**inding **p**rotein);

— гены белков капсида и протеазы AVP, необходимой для процессинга капсидных белков;

— стелс-гены, продукты которых позволяют инфицированной клетке стать «невидимой» для иммунной системы хозяина (см. ниже);

— гены малых вирус-ассоциированных РНК (англ. **v**irus-**a**ssociated **RNA**, VA-RNA), которые не транслируются и выполняют регуляторные функции.

В соответствии с очередностью их экспрессии гены аденовирусов условно подразделяются на ранние (англ. early, E) и поздние (англ. late, L). Геномные участки E1 и E3 кодируют белки, регулирующие цикл репликации и способствующие подавлению иммунного ответа хозяина. Поздние гены кодируют в основном белки капсида.

Вирусные мРНК синтезируются клеточной РНК-полимеразой II. Большинство генов транскрибируется в направлении 5′→3′, в то время как гены, необходимые для репликации ДНК (Pol, pTP и DBP), считываются в направлении 3′→5′. Обращает на себя внимание высокая плотность кодирования: при наличии всего 10 промоторов геном аденовирусов человека кодирует свыше 50 белков. Разнообразие мРНК достигается за счет посттранскрипционного процессинга (сплайсинга). Следует отметить, что именно аденовирусы послужили в свое время моделью для изучения этого явления.

Как уже отмечалось, геном аденовирусов кодирует не только белки, но и малые вирус-ассоциированные РНК (VA-RNA), которые синтезируются с помощью клеточной РНК-полимеразы III. Аденовирусы типа-2 и типа-5 кодируют две вирус-ассоциированные РНК — VA-I и VA-II, которые экспортируются в цитоплазму и накапливаются в большом количестве, особенно в конце цикла размножения.

Основная функция малой РНК VA-I состоит в ингибировании протеинкиназы R — клеточного сенсора, запускающего экспрессию генов интерферона. В малой РНК VA-I имеется двунитевой участок, с помощью которого она связывается с протеинкиназой, и центральный сложноорганизованный домен, необратимо ингибирующий этот фермент. Кроме того, при экспорте из ядра малая РНК VA-I связывается с экспортином 5 и отвлекает его от участия в системах РНК-интерференции и РНК-сайленсинга (см. раздел 1.7.3).

Функции малой РНК VA-II еще мало изучены; по-видимому, она присоединяется к комплексу RISC и подавляет систему РНК-сайленсинга. Часть молекул малых РНК VA-I и VA-II расщепляется цитоплазматическим дайсер-ферментом (см. раздел 1.7.3) с образованием микро-РНК (miRNA), которые связываются с ферментом AGO1, что также угнетает систему РНК-сайленсинга.

Цикл репродукции. Аденовирусы могут размножаться в разных клетках, в том числе в клетках эпителия дыхательных путей и лимфоцитах. Они строго контролируют свой онтогенез от этапа адсорбции до этапа высвобождения вирионов.

В культуре клеток адсорбция вириона начинается с взаимодействия окончания нити со специфическим клеточным рецептором. В частности, аденовирусы типов 2 и 5 используют клеточный рецептор CAR — трансмембранный белок, входящий в состав плотных контактов. В свою очередь, аденовирусы группы B используют рецептор CD46. Благодаря взаимодействию нити с рецептором вирион сближается с поверхностью клетки, и пентон связывается с интегринами $\alpha v\beta 3$ или $\alpha v\beta 5$, что индуцирует проникновение вириона путем клатрин-опосредованного эндоцитоза.

В условиях in vivo рецепторы CAR и интегрины обычно недоступны, поскольку они либо укрыты в зоне плотного контакта, либо экспонируются на базальной стороне клеточной мембраны. Опыты на животных показали, что в данном случае аденовирус использует иные способы проникновения. Например, при внутривенном введении вируса проникновение обеспечивается в первую очередь взаимодействием гексона с компонентами крови, в том числе с фактором коагуляции FX и/или с липидными комплексами, поэтому при внутривенном введении аденовирусные векторы (см. ниже) неминуемо оказываются в печени. Конкретный механизм проникновения в данном случае неизвестен. Возможно, что либо индуцируется эндоцитоз, либо происходит латеральный транспорт в направлении плотных контактов (подобно тому, как белок DAF, рассредоточенный на поверхности мембраны, обеспечивает перемещение вируса Coxsackie по направлению к рецепторам CAR).

При снижении pH в полости эндосомы капсид частично разбирается и проникает в цитоплазму. Затем из него удаляются пентоны, перипентонные гексоны и внутренний белок pVI. В результате этого на поверхности капсида появляются ранее скрытые сигналы ядерной локализации (англ. **n**uclear **l**ocalization **s**ignal, NLS), с помощью которых он по микротрубочкам транспортируется к ядру. Вблизи комплекса ядерной поры капсид приоткрывается, высвобождая коагрегат ДНК с ДНК-связывающими белками. Проникновение генома аденовируса в ядро обеспечивается белками-импортинами.

Избегание раннего иммунного ответа. Транскрипция ранних генов (геномные участки E1 и E3) клеточной РНК-полимеразой II приводит к тому, что активируется

метаболизм и клетка вступает в S-фазу (за это отвечают белки E1A); одновременно блокируется сигнальный каскад апоптоза.

Напомним, что апоптоз служит защитной реакцией на вирусную инфекцию и предотвращает распространение вируса в организме (см. раздел 1.7.4). В свою очередь, ранние белки аденовируса блокируют как внутренние сигналы апоптоза, так и внешние сигналы, исходящие от цитотоксических Т-лимфоцитов (англ. **c**ytotoxic **T**-**l**ymphocyte, CTL). В частности, вирусные белки E1B и E4 присоединяются к клеточному белку p53, блокируя индуцируемый им апоптоз.

Уже на ранней стадии инфекции клетка теряет значительную часть поверхностных рецепторов. Это патологическое изменение индуцируется ранними аденовирусными белками E3 RID и E3 6.7K, которые являются продуктами стелс-генов (см. раздел 6.1). В частности, с поверхности клетки удаляются рецепторы альфа-интерферона (англ. **interferon-alpha receptor**, IFNAR), рецепторы альфа-фактора некроза опухолей (англ. **t**umor **n**ecrosis **f**actor-**alpha**, TNF-alpha, TNFR1) и родственные им рецепторы (англ. **TNF r**elated **a**poptosis **i**nducing **l**igand, TRAIL), а также молекулы I класса гистосовместимости (англ. **m**olecule of **histocompatibility-I**, MHC-I). В результате этого цитотоксические Т-лимфоциты перестают распознавать зараженные клетки и не могут индуцировать их гибель путем апоптоза. По этой причине аденовирусные инфекции бесполезно лечить препаратами интерферонового ряда — на зараженных клетках отсутствуют соответствующие рецепторы.

В некоторых случаях зараженные клетки теряют рецепторы, в норме участвующие в клеточном питании, и тогда дефицит субстратов компенсируется за счет аутофагии — интернализации и утилизации части собственных поверхностных структур.

При пассировании на клеточных культурах аденовирусы нередко теряют способность индуцировать потерю клеточных рецепторов, поскольку стелс-гены не используются in vitro. Дикие штаммы аденовирусов, напротив, сохраняют эту способность.

Отсутствие рецепторов не позволяет аденовирусам полностью преодолеть ранний иммунный ответ хозяина. Помимо цитотоксических Т-лимфоцитов в животном организме существуют клетки-убийцы (сокр. англ. **n**atural **k**iller, NK), для которых наличие рецепторов не является необходимым условием распознавания и уничтожения зараженных клеток.

Особенности репликации. В результате накопления ранних белков начинают экспрессироваться поздние гены, и следом за тем происходит репликация генома (рис. 78). Она инициируется на обоих концах геномной ДНК в сайтах *ori*, расположенных внутри концевых инвертированных повторов (ITR). Особенность этого процесса заключается в том, что вирусная полимераза (AdVPol) использует в качестве праймера предшественник терминального белка — белок pTP (см. выше).

Инициирующий комплекс состоит из ДНК-полимеразы AdVPol (140 кДа), белка pTP (75 кДа), белка TP (55 кДа) и ДНК-связывающего белка DBP, а также ядерных белков NFI и NFIII (сокр. англ. **n**uclear **f**actor). В отличие от клеточных ДНК-полимераз, затравкой для которых служит гидроксильная группа РНК-праймера, аденовирусная AdVPol использует гидроксил остатка Ser-588 в полипептидной цепи белка pTP.

На первом этапе полимераза синтезирует тринуклеотид CAT, который комплементарен не только матричному триплету GTA (в положении 4–6), но и триплету

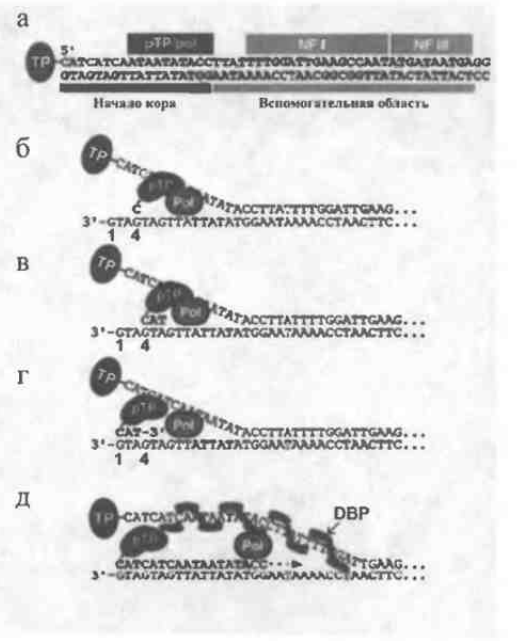


Рис. 78. Репликация генома аденовируса (по: Gonçalves, 2006).

а — образование инициирующего комплекса белок pTP/вирусная ДНК-полимераза Pol/клеточные факторы NFI и NFIII; б, в — инициация синтеза ДНК, переход к элонгации, синтез тринуклеотида CAT в положении 4–6 с помощью ДНК-полимеразы; г — смещение комплекса влево на 4 нуклеотида; д — открепление белка pT; продолжение синтеза в правостороннем направлении; укрывание новой нити белком DBP.

GTA, расположенному слева от него на 3′-конце. Затем инициирующий комплекс смещается в направлении 3′-конца, в результате чего триплет CAT спаривается с оконечным триплетом GTA. На этом процесс инициации заканчивается; клеточные факторы NFI и NFIII диссоциируют от ДНК, и начинается элонгация.

Полимераза AdPol отсоединяется от белка pTP и копирует ДНК в направлении 3′→5′; при этом вытесняемая нить укрывается ДНК-связывающим белком DBP. Белок pTP на дочернем дуплексе расщепляется аденовирусной протеазой и превращается в белок TP.

Возникает вопрос, какое преимущество дает аденовирусу такой механизм инициации репликации? По-видимому, благодаря началу копирования на внутреннем участке матрицы обеспечивается сохранение концов линейной ДНК. У некоторых бактериофагов (например, у фага PRD1; сем. *Tectiviridae*) имеет место аналогичная инициация с помощью белкового праймера; возможно, что аденовирус использует этот очень древний механизм.

Вытесняемая нить ДНК постепенно освобождается и в конце концов образует дуплекс с комплементарной ей нитью или внутренний дуплекс в результате спаривания ITR. Спаренные ITR содержат на 5′-конце белок TP, поэтому этот участок (panhandle; см. выше) может также использоваться для инициации синтеза ДНК по вышеописанному механизму.

Синтез и накопление вирусной ДНК в зараженной клетке приводят к активации генов pIX и IVa2, а также промотора E2 и главного позднего промотора MLP (сокр. англ. **m**ajor **l**ate **p**romoter). Будучи сильным промотором, последний находит применение в разнообразных генноинженерных конструкциях.

В отличие от ранних генов, экспрессия которых инициируется шестью промоторами, экспрессия поздних генов осуществляется с главного промотора MLP. В ре-

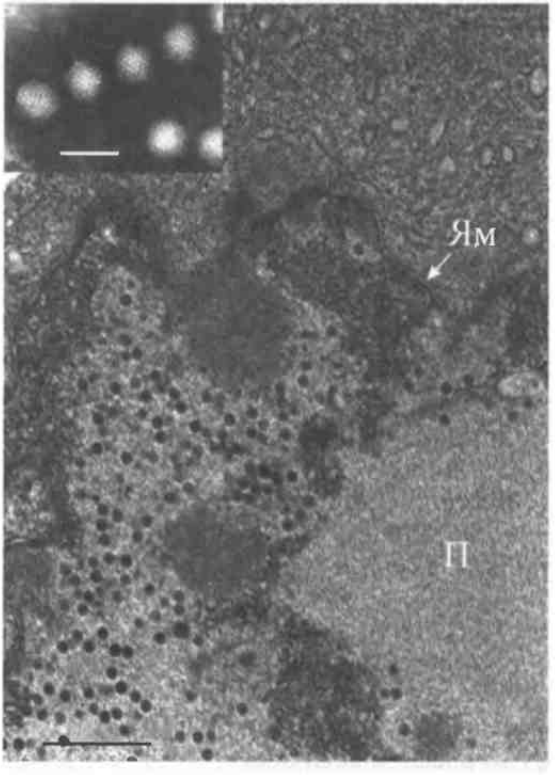


Рис. 79. Частицы аденовируса в ядре клетки (ультратонкий срез, масштаб — 500 нм); на врезке — частицы аденовируса в межклеточной среде (негативно контрастированный препарат, масштаб — 100 нм) (фотографии получены А. К. Сироткиным).

П — паракристалл, образованный вирусными белками; Ям — ядерная мембрана.

зультате образуется транскрипт, процессинг которого (путем сплайсинга и полиаденилирования) дает начало пяти семействам мРНК, трансляция которых приводит к образованию предшественников капсидных белков.

Вновь синтезируемые белки-предшественники содержат сигналы ядерной локализации и транспортируются в ядро, где из них образуются незрелые капсиды, готовые к упаковке геномной ДНК (рис. 79). Этот процесс мало изучен, однако известно, что решающее значение в нем имеет мультипартитный сигнал инкапсидирования ψ, расположенный в области между 194-м и 380-м нуклеотидами.

После упаковки ДНК предшественники белков капсида процессируются вирусной протеазой AVP, причем этот фермент приобретает активную конформацию только после связывания с ДНК и отщепления небольшого пептида от белка pVI.

Зрелые вирионы высвобождаются при лизисе клетки. Примечательно, что этот процесс также управляется аденовирусом. В число поздних вирусных белков входит «белок смерти» (11,6 кДа), который обеспечивает быстрое разрушение клетки в конце цикла репродукции. Лизис зараженных клеток и выброс «белка смерти» индуцируют гибель соседних клеток по сценарию некроза; в результате повреждения эпителия обнажаются рецепторы, используемые аденовирусом для своего проникновения.

Многие аденовирусные инфекции характеризуются некротическими поражениями тканей; в качестве примера можно назвать аденовирусные заболевания копыт-

ных, сопровождающиеся тяжелыми патологиями дыхательной системы и кишечника (вплоть до случаев массовой гибели оленей в национальных парках).

Аденовирусные инфекции человека и животных. Клинические проявления аденовирусных инфекций человека в первую очередь связаны с такими респираторными заболеваниями, как тонзиллиты и ангины. Аденовирусы часто становятся причиной вспышек ОРЗ в незадолго до этого сформированных замкнутых коллективах, например в детских садах или армейских подразделениях; у детей ОРЗ обычно вызывают аденовирусы типов-1, -2, -3, -5 и -6; у взрослых типа-4 и типа-7. Особенно тяжело заболевание может протекать при сочетанной инфекции разными респираторными вирусами.

Широко известен также аденовирусный кератоконъюнктивит.

Аденовирусы группы F (тип-40 и тип- 41) вызывают кишечное заболевание детей младшего возраста. По окончании острого периода болезни вирус может в течение многих лет персистировать в миндалинах, а также в пейеровых бляшках кишечника. Латентная аденовирусная инфекция может активироваться под воздействием разных факторов, например при иммуносупрессии, связанной с трансплантацией органов, или при ВИЧ-инфекции. У иммунодефицитных больных она часто приводит к летальному исходу.

Перечислить все заболевания животных, вызываемые аденовирусами, практически невозможно. Упомянем только аденовирусный гепатит собак, гепатит и энтерит индеек и т. д.

Гепатотропность некоторых аденовирусов, вероятно, объясняется связыванием гексона с разными факторами крови, главным образом с липопротеиновыми комплексами.

При искусственном заражении аденовирусы человека могут вызывать опухоли у новорожденных особей других видов животных, в частности аденовирус типа-12 вызывает опухоли у новорожденных хомяков.

Благополучно перенесенные аденовирусные инфекции индуцируют стойкий иммунный ответ. Как правило, у взрослых уровень антиаденовирусных антител в крови достаточно высок, что служит серьезным препятствием на пути использования аденовирусов в качестве векторов в терапии опухолей.

Противоаденовирусные препараты. Как уже упоминалось, аденовирусы не чувствительны к препаратам интерферонного ряда. До некоторой степени их размножение ограничивают низкомолекулярные индукторы интерферона, в частности циклоферон; среди необычных нуклеозидов обнаружены такие, которые проявляют активность в отношении аденовирусов, например цидофовир (HPMPC). Однако эти вещества высокотоксичны, поэтому допускается только их местное применение в виде мазей или путем инъекции непосредственно в пораженный орган.

Мишенью HPMPC служит аденовирусная ДНК-полимераза. Механизм антивирусного действия этого соединения основан на том, что оно фосфорилируется клеточными киназами и при синтезе ДНК конкурирует с обычными нуклеозидами. При последовательном включении в нить ДНК двух молекул HPMPC блокируется элонгация. Адресное воздействие HPMPC на зараженные клетки обеспечивается более высоким сродством HPMPC-дифосфата к вирусной ДНК-полимеразе, чем к ДНК-полимеразе хозяина.

Использование аденовирусов в качестве векторов при генной терапии. Перспективность использования аденовирусов в качестве векторов обусловлена тем, что в их линейную ДНК можно встроить относительно большой фрагмент (трансген). В частности, с появлением векторов второго поколения появилась возможность встраивать в геном аденовируса последовательности чужеродной ДНК размером до 35 тыс. п.н., сохранив при этом только исходные инвертированные повторы и сайт упаковки.

Кроме того, рецепторы аденовируса (например, окончание нити) можно генетически модифицировать таким образом, чтобы повысить тропизм вируса по отношению к опухолевой ткани. В качестве продукта трансгена, позволяющего уничтожить опухоль, можно использовать тимидилаткиназу вируса герпеса (сем. *Herpesviridae*) или апоптин вируса анемии цыплят (сем. *Circoviridae*). В первом случае больному назначают противогерпетический препарат ацикловир; во втором случае опухоль разрушается в результате вектор-индуцированного апоптоза.

К сожалению, генноинженерные конструкции на основе аденовирусных векторов пока не нашли клинического применения. Одной из причин этого служит использование вирусом множественных механизмов проникновения в клетки-мишени (см. выше). Поэтому добиться избирательной доставки векторов в раковые клетки пока не удается.

Аденовирусные векторы также активно изучаются на предмет использования в качестве генноинженерных вакцин, направленных против возбудителей разных вирусных заболеваний.

6.6.1.2. Семейство *Herpesviridae*

У вирионов герпесвирусов сложное строение — икосаэдрический капсид покрыт липопротеиновой оболочкой. Эти вирусы содержат геномную линейную dsДНК (120–300 тыс. п.н.), реплицируются в ядре клетки и способны к персистенции.

Систематика герпесвирусов. В названии семейства (греч. herpeton — пресмыкающееся; в *данном случае* — ползучий, крадущийся) отражена двойственная способность герпесвирусов человека: сохраняться в латентной форме с периодической активацией и ремиссией, а также вызывать характерное клиническое проявление в виде центробежно расходящихся накожных высыпаний. Обоими свойствами, в частности, обладает вирус-1 простого герпеса (***Human herpesvirus 1***, *HHV-1*; род *Simplexvirus*), знакомый многим из нас по болезненным волдырям, появляющимся на губах, а также в области рта и ноздрей после перенесенного стресса, простудного заболевания или иного вмешательства в нормальный иммунный статус.

Еще недавно всех известных герпесвирусов человека объединяли в семейство *Herpesviridae*, однако открытие аналогичных вирусов у других животных, в том числе амфибий, моллюсков и рыб, потребовало изменить эту классификацию. В результате появился новый порядок ***Herpesvirales***, к которому кроме ***Herpesviridae*** относятся семейства ***Alloherpesviridae*** и ***Malacoherpesviridae***, а также ряд родов вне семейства.

Семейство *Alloherpesviridae* (греч. allos — другой; *«другие» герпесвирусы*) объединяет герпесвирусов рыб и лягушек. Помимо рода *Ictalurivirus*, типовым видом которо-

го служит вирус герпеса-1 кошачьих сомов *Ictaluridae* (***Ictalurid herpesvirus 1***, IcHV-1), в него входит недавно описанный род *Cyprinivirus*, типовым видом которого является вирус герпеса-3 карповых (***Cyprinid herpesvirus 3***, CyHV3), причиняющий большой ущерб рыбоводческим хозяйствам. К этому же семейству принадлежат новые рода *Batrachovirus* (вирусы лягушек) и *Salmonivirus* (вирусы лососевых рыб).

Семейство *Malacoherpesviridae* (от греч. malakion — моллюск; *герпесвирусы моллюсков*) содержит герпесвирусов двустворчатых моллюсков. К нему относится род *Ostreavirus* (Ostreidae — семейство устриц), типовой вид которого — вирус герпеса-1 устриц (***Ostreid herpesvirus 1, OsHV-1***), спорадически вызывает гибель личинок гребешков, устриц и других двустворчатых моллюсков в аквакультуре.

Семейство *Herpesviridae* — самое многочисленное и наиболее изученное; к нему относятся герпесвирусы млекопитающих и птиц. В нем три подсемейства и 12 родов, представители которых различаются по структуре генома и типу инфицируемых клеток.

В подсемейство *Alphaherpesvirineae* входят четыре рода: *Iltovirus* (сокр. англ. **i**nfectuous **l**aryngo-**t**racheitis-like viruses; вирусы птиц, вызывающие острое воспаление носоглотки и трахей), *Mardivirus* (сокр. англ. **Mar**ek **d**isease; вирусы птиц, агенты болезни Марека), *Simplexvirus* (от лат. herpes simplex — простой герпес; вирусы млекопитающих, в частности человека) и *Varicellovirus* (от лат. varicella — ветряная оспа; вирусы млекопитающих, в том числе человека). Характерной особенностью герпесвирусов этого подсемейства является поражение кожных покровов при первичном инфицировании с последующей персистенцией в нервных ганглиях.

В подсемейство *Betaherpesvirineae* входят четыре рода: *Cytomegalovirus* (цитомегаловирусы человека), *Muromegalovirus* (цитомегаловирусы мышей), *Proboscivirus* (Proboscidea — отряд хоботные; вирусы слонов) и *Roseolovirus* (от лат. roseola — экзантема, или краснуха; вирус герпеса-6 человека). Для вирусов этого подсемейства характерен продолжительный цикл репродукции, в ходе которого они сохраняются в инфицированных клетках. Латентная инфекция, как правило, приурочена к моноцитам и Т-лимфоцитам.

В подсемейство *Gammaherpesvirineae* входят четыре рода: *Lymphocryptovirus* (вирус герпеса-4 человека, или вирус Эпштейна—Барр), род *Macavirus* (сокр. от англ. **ma**lignant **ca**tarrhal; вирусы полорогих млекопитающих-конгони *Alcelaphus buselaphus*), род *Percavirus* (**Perc**idae — семейство окуневых; вирусы рыб и вирус герпеса-2 лошадей) и род *Rhadinovirus* (от лат. rhadino — хрупкий; *геномная ДНК радиновирусов при выделении легко фрагментируется*; вирус герпеса-8 человека и вирус герпеса-2 обезьян саимири). В условиях in vitro многие члены данного подсемейства хронически инфицируют культуру лимфоцитов. В условиях in vivo происходит латентная инфекция лимфоцитов или лимфоидной ткани; острая инфекция нередко сопровождается лимфопролиферативными нарушениями. Многие члены этого подсемейства ассоциируются со злокачественным перерождением лимфоидной ткани; примером служит лимфома Беркитта.

С учетом исключительной важности семейства *Herpesviridae* мы в дальнейшем остановимся только на нем. Поскольку в учебнике невозможно дать подробную характеристику всех представителей, в качестве примера рассмотрим вирус простого

герпеса-1 (***Human herpesvirus 1***, HHV-1; род *Simplexvirus*, подсемейство *Alphaherpesvirineae*).

Вирус простого герпеса-1. Вирус HHV-1 может продуктивно инфицировать разные клеточные культуры, в том числе культуры лимфоцитов и культуры эпителиальных клеток.

При первичном инфицировании in vivo он вызывает поражение эпителия, преимущественно по кайме губ (лат. herpes labialis), а затем системой центростремительного транспорта (англ. retrograde transport) по аксонам переносится в спинальные ганглии, где вызывает латентную инфекцию. При неблагоприятном воздействии на организм хозяина (нервный стресс, авитаминоз, недавно перенесенное заболевание и т. д.) латентная инфекция может активироваться с переходом в продуктивную. При этом вирус переносится системой центробежного транспорта (англ. anterograde transport) по аксонам к месту своего первичного проникновения и реинфицирует эпителий.

Строение вириона. Частицы герпесвирусов однотипного строения (рис. 80). Вирион имеет липопротеиновую оболочку, содержащую свыше 20 разных белков, часть которых используется для проникновения вируса в клетки-мишени.

Гликозилированные поверхностные белки вируса герпеса обозначаются, как gB–E, G–M. Белки gB и gC служат для прикрепления к клеткам-мишеням, белок gD обеспечивает слияние оболочки вириона с клеточной мембраной, а комплекс белков gE/gI улавливает Fc-фрагменты антител (см. ниже).

Под оболочкой находится икосаэдрический капсид диаметром ~120 нм, упаковывающий вирусную ДНК. Между оболочкой и капсидом расположен тегумент (лат. tegimentum — покров) в виде аморфной массы, состоящей из белков, необходимых на ранней стадии цикла размножения вируса. Недавно появились данные о том, что слой тегумента, примыкающий к капсиду, имеет упорядоченное строение.

Икосаэдрический капсид (T=16) состоит из 162 капсомеров. Капсомеры, расположенные на гранях икосаэдра, содержат 6 идентичных субъединиц, образующих цилиндр с центральным каналом. В незрелых капсидах (так называемые капсиды «типа B») каналы открыты и служат для выхода вспомогательных белков, с помощью

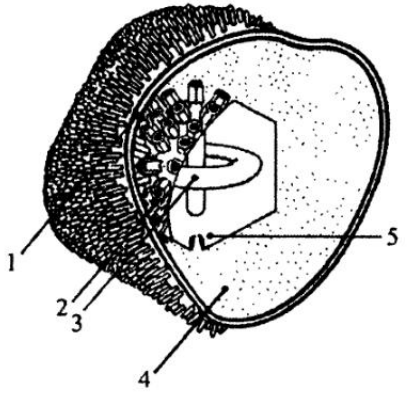


Рис. 80. Вирион герпесвируса в разрезе (по: Horzinek, 1995).

1 — липопротеиновая оболочка (свыше 20 разных белков); 2 — икосаэдрический капсид; 3 — тороидальный кор (компактизованная ДНК); 4 — тегумент (аморфная масса вирусных белков); 5 — портал на одной из вершин капсида.

которых осуществляется сборка вирионов. После упаковки ДНК и протеолитического расщепления вспомогательных белков каналы закрываются.

Благодаря своеобразной морфологии капсомеров вирионы герпеса можно легко отличить от вирионов других вирусов на электронно-микроскопических препаратах, подготовленных методом негативного контрастирования.

Геномная ДНК упаковывается через портал — специализированный канал на одной из вершин икосаэдра, образованный белком UL6. Его строение недавно изучено с помощью метода криоэлектронной томографии; выяснилось, что он имеет вид конической втулки с 12 зубцами. Внутри капсида геномная ДНК образует тороидальную структуру, которая отчетливо выявляется на ультратонких срезах. Поскольку герпесвирусы не имеют гистоноподобных ДНК-связывающих белков, компактизация ДНК достигается в ходе упаковки в результате образования комплекса с полиаминами (спермином и спермидином).

Строение генома. Геномная ДНК вируса HHV-1 (рис. 81) состоит из двух ковалентно связанных сегментов — длинного и короткого, которые обозначаются, как U_L (сокр. англ. **u**nique **l**ong; 126 тыс. п.н.) и U_S (сокр. англ. **u**nique **s**hort; 26 тыс. п.н.); они фланкированы инвертированными повторами *ab* и *b'a'* (в сегменте U_L) и *ac* и *c'a'* (в сегменте U_S). Поскольку эти сегменты могут принимать разную ориентацию, в популяции вируса всегда присутствуют четыре изомера с их разным взаимным расположением.

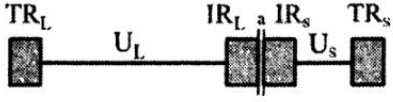


Рис. 81. Геном вируса простого герпеса (HSV). Сегменты U_L и U_S, фланкированные повторами TR и IR и связанные последовательностью «a».

Объяснение в тексте.

На обоих 3'-концах геномной dsДНК находятся неспаренные основания («липкие концы»), с помощью которых она замыкается в кольцо при попадании в клеточное ядро.

Геном герпесвируса HHV-1 кодирует около 85 белков, гены которых подразделяются на три блока: самые ранние (англ. immediate early, α), ранние (англ. early, β) и поздние (англ. late, γ).

Самые ранние α-гены обеспечивают избегание иммунного ответа на начальном этапе инфекции и регулируют транскрипцию β-генов. Важнейшими из продуктов трансляции β-генов являются ДНК-полимераза и тимидинкиназа, а также ряд других белков, ответственных за метаболизм и репликацию ДНК. Поздние γ-гены кодируют белки капсида и тегумента. В повторах *a* и *a'* локализованы сигналы упаковки *pac1* и *pac2*.

Цикл репродукции. Основные особенности литического цикла герпесвируса HHV-1 схематически изображены на рис. 82.

Адсорбция вирионов на клетках хозяина приводит к слиянию вирусной и клеточной мембран; в качестве рецепторов используются гепарансульфат, протеогликаны и другие сигнальные молекулы, широко представленные на поверхности клеток млекопитающих.

Процесс слияния изучен недостаточно, поскольку оболочка вириона содержит много разных рецепторов (до 10 типов гликозилированных и 7–8 типов негликози-

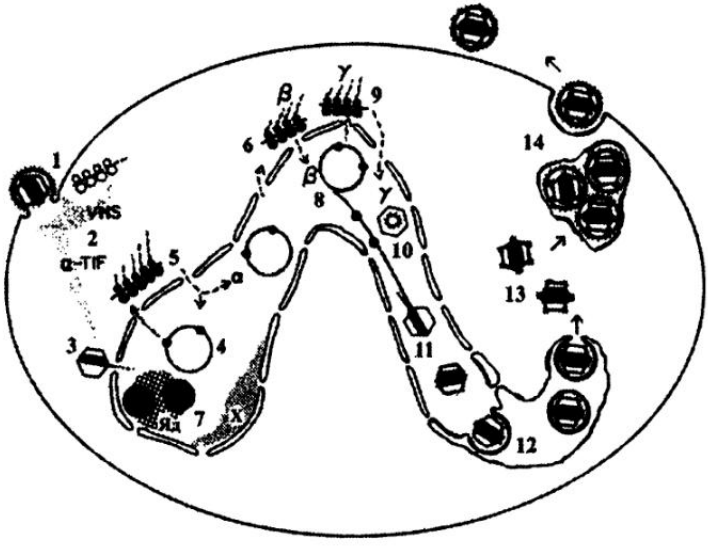


Рис. 82. Цикл репродукции герпесвируса (по: Roizman, 1993).

1 — прикрепление вируса, слияние вирусной и клеточной мембран; 2 — высвобождение белков тегумента, блокирование клеточной трансляции белком VHS, транспорт белка α-TIF в ядро; 3 — транспорт капсида по микротрубочкам к ядерной поре, доставка геномной ДНК в ядро, замыкание линейной ДНК в кольцо; 4 — инициация транскрипции α-генов под воздействием белка α-TIF, поступление ранних мРНК в цитоплазму, трансляция; 5 — перенос продуктов трансляции α-генов в ядро, инициация транскрипции β-генов; 6 — синтез β-белков; 7 — конденсация хроматина на внутренней мембране ядерной оболочки, деградация ядрышек; 8 — репликация геномной ДНК по механизму «катящееся кольцо», образование конкатемеров; 9 — следующий этап транскрипции и трансляции, синтез γ-белков, преимущественно структурных; 10 — сборка прекапсидов B-типа, содержащих белок каркаса; 11 — нарезание конкатемеров рестриктазой, расположенной на вершинах капсида, упаковка, укрывание нуклеокапсида белками тегумента; 12 — отпочкование вирионов в перинуклеарные цистерны, приобретение промежуточной оболочки; 13 — выход вирионов в цитоплазму; 14 — транспорт вирионов в транс-цистерны Гольджи, приобретение окончательной оболочки, выход из клетки путем экзоцитоза.

Яд — ядрышко; X — хроматин.

лированных). В результате слияния в цитоплазму высвобождается капсид, а также белки тегумента, которые быстро берут под контроль клеточные процессы. Один из белков тегумента, α-TIF (сокр. англ. **α**-genes transinducing factor), транспортируется в ядро и подготавливает транскрипцию ранних вирусных генов. Другой белок, VHS (сокр. англ. virion host shut-off protein), блокирует синтез клеточных белков, разрушая цитоплазматические мРНК.

Капсиды доставляются к ядерным порам по микротрубочкам — подобно тому, как происходит транспорт капсидов аденовируса (см. раздел 6.6.1.1). Возле комплек-

са ядерной поры капсид приоткрывается и высвобождает вирусную ДНК в нуклеоплазму. Исследования с помощью атомно-силовой микроскопии показали, что ДНК-содержащий кор проходит через ядерную пору, сохраняя компактность, и вирусная ДНК только в нуклеоплазме релаксируется и замыкается в кольцо.

Циклу репликации герпесвирусов свойственна каскадная регуляция транскрипции. Сначала клеточная РНК-полимераза II под контролем белка α-TIF осуществляет транскрипцию самых ранних α-генов. В результате этого синтезируется шесть мРНК, которые экспортируются в цитоплазму на предмет трансляции. Один из самых ранних белков, US47, блокирует презентацию вирусных пептидов на поверхности инфицированной клетки, а остальные белки направляются в ядро и после достижения необходимой концентрации запускают второй раунд транскрипции — теперь уже β-генов. Следует отметить, что одним из продуктов β-генов является вирусная тимидинкиназа (англ. thymidine kinase, TK), служащая мишенью для противовирусного препарата ацикловира. На данной стадии происходит распад хозяйского хроматина, продукты деградации которого конденсируются на внутренней мембране ядерной оболочки; ядрышко также деградирует.

Вирусная ДНК реплицируется по механизму «катящееся кольцо» с образованием конкатемеров (составных молекул ДНК, в которых вирусные геномы соединены в цепь «голова к хвосту»).

Продукты трансляции β-генов накапливаются в ядре и индуцируют транскрипцию поздних γ-генов, преимущественно кодирующих белки капсида.

Сборка капсида осуществляется с помощью вирусных и клеточных факторов; основная роль в ней принадлежит вспомогательному вирусному белку ORF 17,5 кДа, или скэфолд-белку (англ. scaffold — каркас), который в ходе упаковки вирусной ДНК демонтируется и удаляется. Готовые к упаковке капсиды имеют форму концентрических двойных колец и называются капсидами «типа B». Кроме них на ультратонких срезах часто видны капсиды «типа A», не содержащие вспомогательный белок. Считалось, что предварительно образуются капсиды «типа A», превращающиеся в капсиды «типа B», однако в настоящее время их рассматривают как побочный продукт абортивной упаковки, при которой инициируются только фрагментация и выброс вспомогательного белка.

Нарезание конкатемеров на мономеры и упаковка вирусной ДНК осуществляются с помощью рестриктазно-упаковочного комплекса на одной из вершин капсидов типа B. Капсиды присоединяются к конкатемерам в стыках мономеров, вирусная рестриктаза разрезает ДНК, и один из свободных концов начинает втягиваться в капсид. Как уже говорилось, при этом инициируются расщепление и выброс вспомогательных белков.

После упаковки каналы капсомеров закрываются, и поверхность нуклеокапсида приобретает сродство к белкам тегумента, предварительно накопленным в ядре. Затем нуклеокапсид покрывается белками тегумента и отпочковывается от внутренней мембраны ядерной оболочки в перинуклеарную вакуоль, временно приобретая липопротеиновую мембрану.

На следующем морфогенетическом этапе вирус «переодевается» в аппарате Гольджи. Как он туда попадает, точно не известно; скорее всего, временный суперкапсид

сливается с наружной мембраной ядерной оболочки, и капсид, покрытый белками тегумента, оказывается в цитоплазме. После приобретения окончательной оболочки и недостающих компонентов тегумента вирусная частица покидает клетку путем экзоцитоза.

Латентная инфекция в нейронах. Помимо литического цикла все вирусы герпеса могут вызывать латентную инфекцию. Хорошо известны нейротропность вируса HHV-1 и его способность к латентному заражению нейронов. Установлено, что в спинальных ганглиях вирус реплицируется ограниченно либо вообще не реплицируется и сохраняется в виде эписомы — кольцевой dsДНК.

С вирусной ДНК в нейронах считывается несколько транскриптов, обозначаемых как LAT (сокр. англ. latency associated transcript), которые не покидают ядро и не транслируются. В максимальном количестве образуются транскрипты размером 1,5 тыс. н. и 2 тыс. н. Гены этих РНК перекрываются с регуляторным геном *α0*, однако транскрибируются в противоположном направлении, т. е. по отношению к нему они являются антисмысловыми (продукт этого гена — активатор литического цикла, самый ранний белок ICP0 — в нейронах не образуется).

Транскрипт LAT, по-видимому, служит предшественником нескольких miPHK, с помощью которых подавляется экспрессия самых ранних генов.

Как уже отмечалось, при стрессовых воздействиях активируется транскрипция самых ранних генов и происходит переход к продуктивной инфекции. Механизм активации неизвестен; возможно, что решающим фактором служит уровень интерферона IFN-α, понижающийся в нейронах при стрессах.

Избегание иммунного ответа. Герпесвирусы обладают многочисленными, в том числе изощренными механизмами избегания иммунного ответа хозяина. Латентная инфекция устанавливается в клетках, наименее подверженных иммунному надзору, например в нейронах или в собственно клетках иммунной системы. В свою очередь, литическая репродукция и распространение вируса в пределах организма требуют защиты инфицированных клеток от распознавания цитотоксическими лимфоцитами, NK-клетками и системой комплемента.

Один из способов ухода вируса HHV-1 от иммунного ответа состоит в нейтрализации антител. В норме антитела класса IgG, синтезируемые В-лимфоцитами, присоединяются посредством своих Fab-фрагментов к рецепторам gD или gC на поверхности инфицированных клеток, в то время как наружные Fc-фрагменты служат для узнавания зараженных клеток лимфоцитами, а также для активации системы комплемента. Однако вирусные гликопротеины gE и gI связывают Fc-фрагменты, что блокирует активацию системы комплемента, а также препятствует уничтожению инфицированных клеток макрофагами и цитотоксическими Т-лимфоцитами. Кроме того, поверхностный белок gC вируса HHV-1 связывает фактор C3 системы комплемента, блокируя образование атакующего комплекса.

Одним из наиболее изощренных методов избегания иммунного ответа является модификация клеточных рецепторов, необходимых для распознавания инфицированной клетки цитотоксическими лимфоцитами. В данном случае вирус HHV-1 снижает экспрессию компонентов главного комплекса гистосовместимости, задерживая их транспорт к поверхности клетки при помощи белка ICP47, который присоединя-

ется к транспортному комплексу TAP (сокр. англ. transporter associated with antigen presentation).

Помимо описанных механизмов, представители семейства *Herpesviridae* имеют в своем арсенале другие средства борьбы с иммунной системой; в частности, они активно вмешиваются в систему цитокинов.

Противогерпесвирусные препараты. Эффективными лекарственными средствами, которые неспецифически подавляют репродукцию вируса HHV-1, являются препараты интерферонного ряда, а также индукторы интерферонов. Однако их использование ограничено из-за опасности возникновения побочных эффектов.

Наибольшее применение в терапии герпесвирусных инфекций получили атипичные нуклеозиды. Один из них — широко известный препарат ацикловир (зовиракс), за разработку которого американским химикам Гертруде Элион (G. B. Elion), Джеймсу Блэку (J. W. Black) и Джорджу Хитчингсу (G. H. Hitchings) была присуждена Нобелевская премия по химии 1988 г.

Ацикловир является ациклическим аналогом гуанозина. Механизм антивирусного действия этого соединения состоит в том, что в инфицированных клетках вирусная тимидинкиназа ТК производит его первое фосфорилирование. Второе и третье фосфорилирование ацикловира осуществляются клеточными киназами, после чего ацикловиртрифосфат становится субстратом вирусной полимеразы и блокирует синтез геномной ДНК.

Избирательность действия ацикловира основана на том, что сродство вирусной ТК к этому субстрату намного ниже, чем у клеточных киназ; в незараженных клетках он так же фосфорилируется и так же угнетает синтез ДНК, однако почти в 1000 раз слабее. Помимо некоторой токсичности недостатком ацикловира является то, что при частом применении к нему быстро вырабатывается резистентность. Поэтому кроме него при лечении герпесвирусных инфекций используются сходные соединения — валацикловир, пенцикловир, фамцикловир и т. д., а также индукторы интерферона, в частности циклоферон (см. рис. 83).

Другие герпесвирусы человека. Помимо вируса простого герпеса HHV-1 (а также сходного с ним вируса HHV-2), которые преимущественно вызывают кожные поражения, известны другие представители семейства *Herpesviridae*, инфицирующие человека. Все они так же, как вирусы простого герпеса, осуществляют пожизненную инфекцию, однако на этот раз заражаются не нейроны, а клетки других типов (кроме вируса HHV-3). Известно 8 герпесвирусов человека.

Вирус ветрянки/опоясывающего лишая *(Human herpesvirus 3, HHV-3; varicella/zoster virus; лат. varicella — ветряная оспа и zoster — опоясывающий лишай; род Varicellovirus, подсемейство Alphaherpesvirineae).* Вирус HHV-3 вызывает два разных заболевания. При экзогенном заражении развивается ветряная оспа, а при эндогенной реактивации того же вируса — заболевание, известное как «антонов огонь», «опоясывающий лишай» и «рожа».

Ветряная оспа — антропозная инфекция, сопровождающаяся характерной макулопапулезной и везикулезной сыпью, лихорадкой и умеренно выраженными явлениями общей интоксикации. Единственным источником инфекции служит больной ветряной оспой или опоясывающим лишаем; основной путь передачи — воздушно-

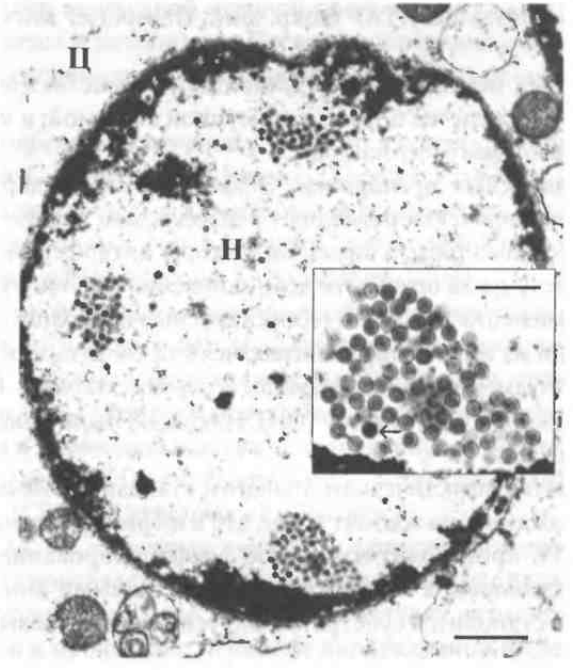


Рис. 83. Накопление в нуклеоплазме пустых капсидов вируса простого герпеса (HSV) вследствие нарушения упаковки ДНК под воздействием циклоферона (фотографии получены А. К. Сироткиным).

Ультратонкий срез (масштаб — 1 мкм). На врезке (масштаб — 300 нм) стрелкой отмечен капсид, содержащий ДНК.

Н — нуклеоплазма; Ц — цитоплазма.

капельный. Инкубационный период составляет в среднем две недели; после исчезновения клинических проявлений заболевания устанавливается латентная инфекция в межпозвоночных ганглиях.

У взрослых, в детстве перенесших ветряную оспу, наблюдается другая форма инфекции — опоясывающий лишай. Реактивация латентного вируса может быть вызвана такими факторами, как нервный стресс, переохлаждение, прием иммунодепрессантов и т. д.

В обоих случаях практикуется лечение ацикловиром или аналогичными препаратами.

Вирус герпеса-4 человека, или вирус Эпштейна—Барр (Human herpesvirus 4, HHV-4; род Lymphocryptovirus; подсемейство Gammaherpesvirinae). Вирус HHV-4 вызывает три типа заболеваний: инфекционный мононуклеоз, лимфому Беркитта и назофарингеальную карциному. В странах с умеренным климатом преимущественно распространен инфекционный мононуклеоз; в тропиках — лимфома Беркитта, а в Китае — назофарингиальная карцинома.

Вирус HHV-4 содержит ряд специфических антигенов: капсидный антиген (англ. viral capsid antigen, VCA), ядерный антиген (англ. Epstein—Barr nuclear antigen, EBNA), ранний антиген (англ. early antigen, EA) и мембранный антиген (англ. membrane antigen, MA). Это лимфотропный вирус и, в отличие от других представителей семейства, способен вызывать не лизис, а размножение пораженных клеток (В-лимфоцитов). Нередко он выделяется со слюной, поэтому может передаваться контактным способом, например при поцелуях; возможна передача гемотрансфузионным путем (при переливании крови).

Инфекционный мононуклеоз встречается практически повсеместно. Первичное заражение происходит чаще всего в детском возрасте, после чего вирус пожизненно остается в организме. В странах с умеренным климатом преобладают бессимптомные формы инфекции.

Вирус HHV-4 способен встраивать свой геном в геном лимфоцитов и провоцировать их неконтролируемый рост и деление: в этом случае развиваются злокачественные лимфопролиферативные заболевания — лимфома Беркитта и назофарингиальная карцинома.

Вирус герпеса-5 человека, или цитомегаловирус *(Human herpesvirus 5, HHV-5; род Cytomegalovirus; подсемейство Betaherpesvirineae).* Вирус HHV-5 инфицирует большинство взрослого населения планеты; среди женщин детородного возраста частота выявления антител к нему варьирует в пределах 40–100% (в России ~90%). Он способен длительное время сохраняться в организме в отсутствие каких-либо патологических проявлений. Цитомегалию часто рассматривают как оппортунистическую инфекцию; это означает, что только при нарушении «равновесия» между вирусом и организмом хозяина вирус начинает интенсивно размножаться и может вызвать заболевание.

Подобно вирусу HHV-1 и вирусу Эпштейна—Барр, цитомегаловирус блокируют презентацию молекул MHC-I на поверхности клеток. Он обладает поразительной способностью к «камуфляжу»: кодируемый им белок US11 направляет синтезируемые клеткой молекулы MHC-I из эндоплазматического ретикулума в цитозоль, где они быстро разрушаются в протеасомах. Одновременно с деградацией молекул MHC-I вирус HHV-5 восполняет их отсутствие при помощи гомолога — вирусного белка UL18. Его структура такова, что он подавляет активацию NK-клеток, одновременно с этим препятствуя узнаванию зараженных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Вирусы герпеса-6 и герпеса-7 *(Human herpesvirus 6&7, HHV-6&7; род Roseolovirus; подсемейство Betaherpesvirineae).* Вирус герпеса-6 человека был впервые выделен в США в 1986 г. из лимфоцитов пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями; позднее была показана его способность заражать Т-лимфоциты.

Патогенность вируса HHV-6 в отношении человека продолжают изучать; доказана его этиологическая роль в развитии детской краснухи (лат. roseola infantum); допускается его связь с таинственным синдромом «хронической усталости». Инфекция широко распространена по всему миру, хотя ее отчетливые клинические проявления довольно редки.

Вирус HHV-7 был выделен в 1992 г. из лимфоцитов больного с синдромом «хронической усталости». Его геном обладает 60%-ным сходством с геномом вируса

HHV-6. Показано, что при совместном культивировании с вирусом HHV-6 он может выполнять функцию вируса-хелпера, активируя репликацию последнего. Клинические проявления, обусловленные вирусом HHV-7, изучены недостаточно.

Вирус герпеса-8 *(**Human herpesvirus 8**; HHV-8; род Rhadinovirus; подсемейство Gammaherpesvirinae)*. Иммунокомпетентным людям вирус HHV-8, как правило, не опасен, однако при иммунодепрессии, например в результате ВИЧ-инфекции или после лучевой терапии, возможно развитие саркомы Капоши (по американской статистике у больных со смешанной ВИЧ/HHV-8 инфекцией она появлялась в 50% случаев на протяжении 10 лет).

Вирус HHV-8 неравномерно распространен в странах Африканского рога (где местами инфицировано до 100% населения), тогда как в США и странах Восточной Европы он встречается гораздо реже. По данным серологического обследования, проведенного в США, им заражено 1–3% доноров крови.

Герпесвирусы животных, опасные для человека. При инфицировании гетерологичного хозяина вирусы герпеса могут вызывать тяжелые заболевания.

Наибольшую опасность представляет вирус герпеса B обезьян (*Simian **herpesvirus B***, SiHV-B; род *Simplexvirus*; подсемейство *Alphaherpesvirineae*), который у человека вызывает энцефаломиелит с летальным исходом. Известно около 25 таких случаев, в основном среди персонала зоопарков или научно-исследовательских лабораторий. Почти всегда заражение происходило при укусе животного (17 случаев с летальным исходом; пятеро переболевших получили пожизненные тяжелые осложнения).

При подозрении об инфицировании следует немедленно принять ацикловир и провести диагностическое обследование.

Герпесвирусы животных, опасные для гетерологичных видов. Наиболее известен вирус герпеса-1 свиней, или вирус псевдобешенства (*Pseudorabies virus, PRV*; род *Varicellovirus*; сем. *Alphaherpesviridae*). Он поражает центральную и периферическую нервную систему.

Помимо свиней к вирусу PRV восприимчивы еноты, кошки, норки и собаки, а также козы и овцы; у хищников источником заражения служит свиное мясо. У свиней заболевание протекает с той или иной степенью тяжести, в зависимости от породы хозяина и штамма вируса; у других видов обычен летальный исход.

6.6.1.3. Семейство *Papillomaviridae*

В семейство *Papillomaviridae* помещены вирусы с геномной кольцевой dsДНК. Их сравнительно небольшие геномы (~8 тыс. п.н.) кодируют несколько структурных и регуляторных белков; транскрипция и репликация осуществляются с помощью ферментов хозяина.

Папилломавирусы реплицируются в клеточном ядре; сборка вирионов происходит в нуклеоплазме. Цикл размножения протекает по литическому или лизогенному сценарию; возможен вариант псевдолизогении (когда вирусная ДНК присутствует в нуклеоплазме в виде кольцевой эписомы, или мини-хромосомы).

Папилломавирусы обладают ярко выраженным тканевым тропизмом и заражают клетки базального слоя эпителия. Инфекция протекает либо бессимптомно (тогда

ее можно рассматривать как персистентную), либо с периодическими обострениями. Во втором случае в инфицированной зоне появляются характерные доброкачественные новообразования — бородавки и папилломы; название семейства является аббревиатурой этих симптомов (лат. papilla — сосочек и греч. oma — опухоль). Локальная трансформация эпителия наблюдается на коже и в области верхних дыхательных путей, реже — на конъюнктиве, в ротовой полости, пищеводе и прямой кишке.

Безобидные, на первый взгляд, папилломавирусы привлекли к себе внимание в 1933 г., когда американский вирусолог Ричард Шоуп (R. E. Shope) доказал, что они могут вызвать рак кожи у кроликов. Немецкий вирусолог Харальд цур Хаузен (H. zur Hausen), открывший первого онкогенного папилломавируса (***Human papillomavirus***, HPV), стал одним из лауреатов Нобелевской премии 2008 г. по физиологии и медицине.

Структура семейства. Папилломавирусы проявляют строгую специфичность в отношении своих хозяев, которыми являются рептилии (например, черепахи), птицы и млекопитающие; случаи передачи вируса от одного вида к другому чрезвычайно редки. Круг хозяев папилломавирусов и локализация вызываемых ими новообразований служат дискриминирующими признаками видов и подвидов.

Виды семейства *Papillomaviridae* традиционно обозначают как «типы» (англ. type); в настоящее время их описано свыше 140.

Систематика папилломавирусов учитывает сходство их геномов (оцениваемое по степени ДНК–ДНК гибридизации и результатам сравнения рестрикционных паттернов ДНК), а также набор ORF и их локализацию. По совокупности этих признаков построены филогенетические кластеры, которые рассматриваются как 16 родов: *Alphapapillomavirus*–…–*Pipapillomavirus*.

Представители рода *Alphapapillomavirus* преимущественно инфицируют эпителий ротовой полости и урогенитального тракта человека, а также других приматов; ORF E5 локализуется между ранними и поздними генами (см. ниже).

К роду *Betapapillomavirus* относятся папилломавирусы, которые преимущественно инфицируют кожные покровы человека; ORF E5 у них отсутствует. Вирусы рода *Gammapapillomavirus* вызывают трансформацию кожных покровов человека; в клетках образуются характерные цитоплазматические включения; ORF E5 отсутствует.

Папилломавирусы рода *Deltapapillomavirus* вызывают образование папиллом у парнокопытных и способны индуцировать саркоидозы (в последнем случае, в виде исключения, возможна межвидовая передача). Папилломавирусы рода *Epsilonpapillomavirus* вызывают образование кожных папиллом у крупного рогатого скота.

Вирусы рода *Zetapapillomavirus* заражают лошадей; дополнительная рамка считывания перекрывается с ORF L2. Члены рода *Etapapillomavirus* поражают кожный эпителий птиц; ORF E6 в данном случае отсутствует. У вирусов рода *Thetapapillomavirus*, которые также заражают птиц (в частности, попугаев), отсутствуют ORF E4, ORF E5 и ORF E6.

У вирусов рода *Iotapapillomavirus*, вызывающих кожные новообразования у грызунов, ORF E2 имеет больший размер, чем у папилломавирусов других родов; ORF E5 отсутствует. Папилломавирусы рода *Kappapapillomavirus* инфицируют кожу и слизистые оболочки кроликов; ORF E6 имеет больший размер, чем у папилломавирусов

других родов; дополнительно присутствует ORF E8. Представители рода *Lambdapapillomavirus* — вирусы собак и кошек; они характеризуются наличием протяженного некодирующего участка (1200–1500 п.н.) между ранними и поздними генами.

К роду *Mupapillomavirus* относятся вирусы человека, по характеру патогенеза подобные вирусам рода *Gammapapillomavirus*; контролирующий участок их генома более протяженный, чем у представителей остальных родов. Папилломавирусы рода *Nupapillomavirus* вызывают доброкачественные и злокачественные новообразования на коже человека; по соседству с ORF L1 находится несколько дополнительных ORF.

Члены рода *Xipapillomavirus* инфицируют кожу и слизистые оболочки крупного рогатого скота; место ORF E6 занимает ORF E8. Вирусы рода *Omikronpapillomavirus* изолированы из гениталий китообразных; типичная ORF E7 отсутствует; несколько ORF перекрывается с ORF L1. К роду *Pipapillomavirus* принадлежат папилломавирусы, вызывающие новообразования на слизистых оболочках хомяков; ORF E2 и ORF L2 частично перекрываются.

Внутриродовые таксоны обособляются на основе сравнения последовательности гена структурного белка L1; границей между видами (типами) считается 10%-ное сходство; подвиды (подтипы) различаются на 2–10%; варианты — менее чем на 2%.

Около 90% видов папилломавирусов человека относится к родам *Alphapapillomavirus* и *Betapapillomavirus*. Наиболее клинически значимы представители первого семейства, среди которых известны виды (типы), способные вызывать злокачественное перерождение клеток слизистой оболочки урогенитального тракта.

По вероятности развития новообразования различают две группы папилломавирусов человека (HPV): группу высокого риска (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58 и -59) и группу низкого риска (HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72 и -81). Виды (типы) из группы высокого риска ассоциируются с 99,7% случаев рака анальной области и половых органов. Папилломавирусы второй группы, например HPV-11, также клинически значимы, поскольку они вызывают бородавки на половых органах. Это высококонтагиозная инфекция, носители которой в ряде стран составляют 1–2% населения в возрасте 18–35 лет.

Строение вириона. Вирионы папилломавирусов устроены однообразно — поликлональные антитела против структурных белков бычьего папилломавируса 1-го типа (*Bovine papillomavirus*, BPV-1), связываются с капсидами других папилломавирусов человека и животных. Благодаря такому консерватизму антигенных детерминант папилломавирусы легко выявляются в эпителии разных тканей и органов с помощью методов иммунодиагностики.

Икосаэдрические капсиды папилломавирусов (T=7) имеют относительно небольшой размер (52–55 нм) и содержат 72 капсомера, состоящих из структурных белков L1 (сокр. англ. large; 55 кДа; 360 копий на вирион) и L2 (сокр. англ. little; 76 кДа; 12 копий на вирион) (рис. 84).

В укладке геномной ДНК участвуют «позаимствованные» ядерные гистоны H2a, H2b, H3 и H4.

Строение генома. В результате взаимного перекрывания ORF относительно небольшая хромосома папилломавирусов (~8 тыс. п.н.) содержит 8–10 генов (рис. 85). Все ORF расположены на минус-нити ДНК; комплементарная нить содержит stop-кодоны.

Гены папилломавирусов подразделяются на две группы: ранние — E1, E2, E4–E7 (сокр. англ. early) и поздние — L1 и L2 (сокр. англ. late). Такая классификация довольно условна. Например, ген E4 экспрессируется у вирусов HPV-1 и HPV-2 на поздних этапах инфекции. Ортологи генов E1, E2 и L1 обладают высоким взаимным сходством; наибольшие различия наблюдаются между генами E4 и E5. Порядок расположения генов одинаков у всех представителей семейства.

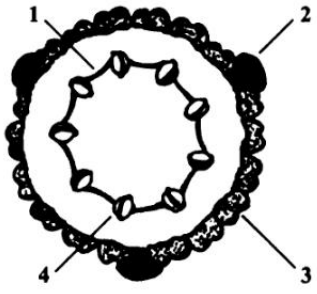


Рис. 84. Вирион папилломавируса.

1 — геномная ДНК; 2 — минорный структурный белок; 3 — главный структурный белок; 4 — хозяйские гистоны.

Между генами E6 и L1 расположена протяженная (~30 п.н.) контролирующая область (англ. long control region, LCR), которая содержит сайты связывания регуляторных белков, а также промотор ранних генов p97, сайт инициации репликации *ori* и промотор поздних генов p67.

Большинство белков папилломавирусов содержит несколько функциональных доменов. Белок E1 участвует в инициации репликации и регулирует копийность вирусных мини-хромосом; регуляторный белок E2 связывается с областью LCR; полифункциональный белок E4 способствует циклизации вирусной ДНК, а также дезинтеграции хозяйского цитоскелета при выходе вирионов; белки E5, E6 и E7 участвуют в трансформации клетки; белки L1 и L2 являются структурными; функция белков E3 и E8 неизвестна.

Цикл размножения. Папилломавирусы распространяются контактным способом; входными воротами инфекции служат микроповреждения поверхности эпителия.

Проникновение. Предполагается, что для первичной адсорбции папилломавирусов используются в качестве рецепторов гепарансульфат и протеогликаны. Папилломавирус HPV нуждается во втором рецепторе — интегрине (мембранном белке эпителиальных клеток).

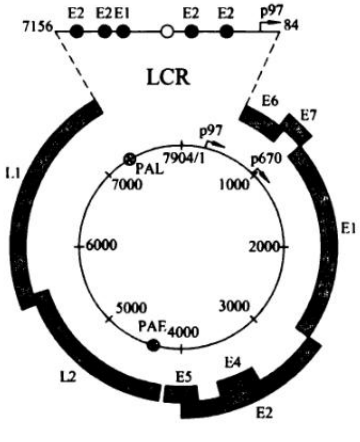


Рис. 85. Геном папилломавируса человека (HPV-6) (по: Doorbar, 2006).

E1–7 — ранние гены; L1 и L2 — поздние гены; LCR — контролирующая область; p97 — ранний промотор; p670 — поздний промотор; PAE — сайт раннего, PAL — позднего полиаденилирования.

Черные кружки — сайты связывания регуляторных белков; белый кружок — сайт *ori*; цифры — расстояние (п.н.) от сайта инициации репликации.

В начале инфекционного цикла папилломавирусу необходимо попасть в делящиеся клетки базального слоя эпителия. Проникновение происходит путем клатрин-опосредованного или кавеолин-опосредованного эндоцитоза. Декапсидирование осуществляется в поздней эндосоме (или в фаголизосоме). Структурный белок L2 обеспечивает транспорт геномной ДНК в ядро, где она транскрибируется клеточными ферментами.

Далее инфекция может развиваться двумя путями:

— вирусная ДНК существует в ядре в форме эписомы; синтезируются ранние и поздние белки; происходит сборка вирионов (продуктивная инфекция);

— вирусная ДНК интегрируется в хромосому хозяина; синтезируются ранние белки; сборка вирионов не происходит (лизогенная инфекция).

Большинство папилломавирусов осуществляет только продуктивную инфекцию.

Транскрипция. Ранние этапы инфекции растянуты во времени; первые вирусные мРНК появляются только через 12 ч после первичного инфицирования.

Белок E2 может служить как активатором, так и репрессором «раннего» промотора p97. Когда его мало (начало инфекции), он присоединяется только к сайтам 3 и 4 области LCR и служит активатором; когда его много, он дополнительно связывается с сайтами 1 и 2.

Транскрипция поздних генов L1 и L2 осуществляется с «позднего» промотора p67; она сопровождается сменой раннего сайта полиаденилирования (англ. **poly**a**d**enylation **e**arly site, PAE) на поздний (англ. **poly**a**d**enylation **l**ate site, PAL).

Репликация. Инициаторами репликации геномной ДНК служат белки E1 и E2. Белок E2 является ДНК-связывающим; он распознает палиндромные последовательности $AACCG(N)_4CGGTT$, расположенные в области LCR. Белок E1 также обладает ДНК-связывающими свойствами, но они слабее выражены.

В начале инфекции число копий белка E1 невелико, и с сайтом *ori* связывается комплекс белков E1/E2, который локально расплетает dsДНК. Затем, по мере удаления белка E2, к области LCR присоединяются новые молекулы белка E1. Последние образуют двойное гексамерное кольцо (которое имитирует структуры, образующиеся в сайтах *ori* на хозяйских хромосомах); в эту же область привлекаются компоненты клеточного репликазного комплекса — белок A и праймаза.

В делящихся клетках базального слоя эпителия в конце S-периода число копий вирусного генома достигает 50–200. Вирусная ДНК при посредстве белка E2 и специализированных клеточных белков связывается с микротрубочками веретена, что обеспечивает эквивалентное распределение копий вирусного генома между дочерними клетками.

Некоторые папилломавирусы могут подолгу реплицироваться в форме плазмиды; в частности, в стволовых кератиноцитах они сохраняются в течение нескольких лет.

На поздних стадиях размножения используется белок E5. Взаимодействуя с протонной АТФазой, он тормозит закисление полости эндосомы и нарушает процессы рециклизации поверхностных рецепторов. Тем самым обеспечивается благоприятная среда для репродукции вируса, а клетки верхних слоев эпителия обогащаются рецептором EGF (сокр. англ. **e**pidermal **g**rowth **f**actor).

Сборка капсида, упаковка ДНК и выход вирионов. Активация позднего промотора связана с дифференциацией клетки. В этом случае число геномных копий вируса не ограничивается, и начинают синтезироваться структурные белки. Среди них — ДНК-связывающий белок L2, который содержит сигнал ядерной локализации. Другой структурный белок — L1 попадает в ядро в составе капсомеров. Помимо структурных белков в сборке капсида и упаковке ДНК участвуют вирусный белок E2 и клеточный шаперон Hsp70.

Вирусные частицы выходят из клеток, переместившихся в поверхностный слой эпителия. Ключевую роль в процессе лизиса играет белок E4, который разрушает субмембранные кератиновые волокна.

Патогенез. Инфекционные вирусные частицы попадают во внешнюю среду в результате слущивания клеток поверхностного слоя эпителия. Папилломавирусы достигают базального слоя эпителия через микротравмы любой этиологии; эффективность заражения очень высока (для него достаточно нескольких частиц). Продуктивная инфекция характеризуется разрастанием эпителия из-за усиления пролиферативной активности в базальном и надбазальном слоях. При этом толщина эпителия увеличивается, а его структура изменяется.

В основе патогенеза лежит нарушение регуляции клеточного цикла под воздействием белков E6 и E7. Мишенями служат опухолевые супрессоры — белок ретинобластомы (англ. protein of retinoblastoma, pRb) и белок 53.

Самые опасные патологии — неоплазии и карциномы — возникают в результате встраивания геномной ДНК папилломавируса в клеточный геном. Этому предшествует переход кольцевой ДНК в линейную форму. Из-за разрыва в области E1–E2 нарушается транскрипция с «позднего» промотора, и в интегрированной ДНК экспрессируются только гены белков E6 и E7; избыточное накопление их продуктов в первую очередь способствует малигнизации клеток. Для папилломавирусов группы высокого риска (см. выше) установлено, что белок E7 обладает более высоким аффинитетом по отношению к супрессору pRb, чем тот же белок у группы низкого риска.

Помимо присутствия интегрированного вируса HPV (группа высокого риска) возможность злокачественного перерождения определяется накоплением множественных повреждений в клеточной ДНК, а также активацией превращения эстрадиола в 16β-гидроксистерон.

Многообразие факторов, влияющих на уровень экспрессии генов вирусных белков, а также сложная система клеточного иммунитета препятствуют малигнизации (например, при цервикальных поражениях часто происходит самопроизвольная элиминация вируса).

Эффективной мерой защиты от таких грозных заболеваний, как рак шейки матки, служит вакцинация. Она производится вирусоподобными частицами (англ. virus-like particle, VLP; *не путать с природными VLP*, см. с. 127), которые конструируются из основного капсидного белка и не содержат ДНК. Регистрируемый уровень антител в крови привитых женщин на один-два порядка выше, чем достигаемый вследствие инфекции, и такой иммунный статус сохраняется на протяжении, как минимум, 5 лет.

6.6.1.4. Семейство *Poxviridae*

По ряду признаков поксвирусы отличаются от остальных ДНК-содержащих вирусов:

— геном кодирует ферменты репликации ДНК;
— ферменты первичной транскрипции упаковываются в вирион;
— цикл размножения происходит в цитоплазме;
— образуется два типа инфекционных частиц;
— выход из хозяйской клетки осуществляется разным способом;
— заболевания человека имеют характерную симптоматику.

По величине частиц, а также по размеру генома они относятся к «гигантским» вирусам.

Поксвирусы вызывают у высших животных оспу и оспоподобные заболевания.

Вариола, или натуральная человеческая оспа (лат. variola vera — настоящая вариола; от лат. varius — пятнистый, *из-за первоначального появления на коже красных пятен-розеол*; возможна другая этимология: лат. varus — сыпь), распространяется воздушно-капельным путем или при физическом контакте с больным. Вирус размножается в эндотелии сосудов кожи, ротовой полости и носоглотки, а также может колонизировать поверхностные сосуды роговицы (что приводит к ее изъязвлению и, как следствие, к «оспенной» слепоте).

В результате подавления вирусом иммунных реакций точечные кожные кровоизлияния (первичные оспенные пятна) трансформируются в очаги вторичной бактериальной инфекции в виде гнойных пузырьков, или пустул (лат. pustulo — волдырь), что вызывает генерализованную интоксикацию. Характерные для оспы обильные кожные высыпания последовательно проходят стадии пятен, гнойных пузырьков и пустул; в случае выздоровления пустулы превращаются в корочки, после отпадения которых остаются рубцы (оспенные рябинки). Из-за повреждения базальной мембраны они сохраняются пожизненно.

В зависимости от штамма возбудителя и ответной реакции организма различают оспу средней тяжести (лат. varioloa vera); тяжелую, или «сливную», оспу, когда отдельные оспины сливаются друг с другом (лат. variola confluens), и самую тяжелую, геморрагическую, или «черную», оспу (лат. variola haemorrhagica). Известна также облегченная форма оспы (лат. varioloid).

По масштабам эпидемии оспу подразделяют на «большую» (лат. variola major) и «малую» (лат. variola minor); смертность от них составляет, соответственно, 30–35% и ~1%.

История оспы и борьбы с этой болезнью. Предполагается, что очагом происхождения вируса человеческой оспы была древняя Эфиопия, откуда болезнь проникла в древний Египет. Первое письменное упоминание о ней встречается в папирусах времени царствования фараона XVIII Династии Аменхотепа I (~1527–1506 г. до н.э.). Типичные оспенные поражения видны на коже мумии фараона XX Династии Рамзеса V (~1146–1142 г. до н.э.).

В 165 г. н.э., во время осады парфянской крепости Селевкии в легионах Луция Вера, соправителя римского императора Марка Аврелия, разразилась эпидемия ази-

атской «черной» оспы. На пути отступления войск болезнь распространилась от берегов Евфрата до Италии (она достигла Рима в 167 г., где в разгар эпидемии ежедневно умирало до 2 тыс. человек).

Позднее, в ходе завоевания Испании арабами (711 г.), оспа вторично проникла в Европу. На этот раз она приняла форму пандемии; в частности, в VIII в. она охватила 25% населения Франции. В начале XVI в. испанские конкистадоры завезли оспу в древние государства ацтеков и инков (на территории современных Мексики и Перу); в результате от нее умерло около 35 тыс. испанцев и до 6 млн индейцев. Частые пандемии оспы происходили в XV–XVI вв., а также в XVIII в., когда от нее погибло 60 млн человек (в Индии только в 1770 г. — 3 млн человек). С конца XIX в. стали часто регистрироваться эпидемии «малой» оспы. Вспышки заболевания возникали и распространялись независимо от эпидемий «большой» оспы.

На территории Российской Империи в конце XIX в. от оспы умерло 300 тыс. человек; в 1919 г. было зарегистрировано 100 тыс. случаев болезни; в 1922 г. — 25 тыс. (сокращение масштаба эпидемии было связано с законодательным введением оспопрививания).

К середине XX в. «большая» оспа приняла характер пандемии; повсеместно, за исключением Австралии и отдаленных островов Тихого океана, ежегодно регистрировались миллионы случаев заболевания.

Еще в глубокой древности было подмечено, что люди, излечившиеся от оспы, чаще всего повторно не заболевали или если заболевали, то всегда с благоприятным исходом.

По-видимому, еще в VI–IX вв. китайские, индийские и арабские врачи эмпирически использовали прием ***вариоляции*** (от variola) — иммунизации против оспы прикладыванием пустул оспенных больных к телу здоровых людей или втиранием им оспенной лимфы в кожу. С начала XVIII в. вариоляция (или «инокуляция») посредством надреза ланцетом, смоченным оспенным гноем, стала широко применяться в Европе. Однако вскоре выяснилось, что это сопряжено с риском заболевания, в том числе со смертельным исходом, что вызвало в целом негативное отношение к данному приему.

На Британских островах на протяжении XVIII в. наряду с натуральной оспой была широко распространена крайне заразная коровья оспа, которая в легкой форме поражала рабочих на фермах и доильщиц. При этом было подмечено, что у лиц, переболевших коровьей оспой, приобреталась устойчивость к натуральной оспе.

В поисках более надежного и безопасного метода оспопрививания, чем вариоляция, английский врач Эдуард Дженнер не прошел мимо этих разрозненных наблюдений. Проанализировав соответствующие клинические случаи, он в 1796 г. привил коровью оспу восьмилетнему мальчику Джемсу Фиппсу (J. Phipps) путем внесения ему в кожные надрезы лимфы, полученной от больной доильщицы Сары Нелмс (S. Nelmes). После того, как ребенок перенес в легкой форме коровью оспу, Дженнер рискнул заразить его натуральной оспой; эксперимент прошел успешно, болезнь не наступила.

Несмотря на сопротивление консервативной части общественности, данный способ оспопрививания, который Дженнер назвал ***вакцинацией*** (от лат. vacca — ко-

рова; *прививка возбудителя с ослабленной патогенностью, защищающая от высокопатогенных возбудителей; расширенное толкование первоначальному термину дал в 1881 г. Луи Пастер*), был широко внедрен в медицинскую практику (в 1801 г. в Лондоне против оспы было вакцинировано до 60 тыс. человек).

Обязательная вакцинация против оспы была впервые введена в Норвегии (1801), позднее это произошло в Швеции (1816); за ними последовали другие страны, в том числе Англия (1853). В России, хотя первые успешные вакцинации были произведены в 1801 г., государственный указ «Об обязательном оспопрививании» был издан только в 1918 г.; в СССР с конца 30-х годов регистрировались единичные вспышки оспы, связанные со случайным занесением возбудителя-эндемика из Азии.

В 1958 г. на ассамблее ВОЗ была объявлена программа глобальной ликвидации оспы посредством повсеместной иммунизации 80–90% населения. Последняя проводилась на основе использования вируса осповакцины, который по своим свойствам отличается как от вируса коровьей оспы, так и от вируса натуральной оспы (см. ниже). Устойчивый иммунитет поддерживался в течение 5 лет, а затем стал постепенно снижаться. Данная программа была в целом завершена к 1980 г.; последние прививки (в частности, воинских контингентов) были прекращены в 1991 г., и на текущий момент большинство населения планеты не обладает иммунитетом против натуральной оспы.

Считается, что вирус натуральной оспы в природе уже больше не циркулирует; музейные штаммы хранятся в США в Центре Контроля над Распространением Заболеваний (Center for Disease Control, CDC), а также в России в Государственном Научном Центре Вирусологии и Биотехнологии («Вектор»). При угрозе возникновения эпидемической ситуации они могут послужить основой для оперативной разработки вакцины.

Структура семейства. В соответствии с кругом хозяев вируса семейство *Poxviridae* подразделяется на два подсемейства — ***Chordopoxvirineae*** и ***Entomopoxvirineae***.

К подсемейству *Chordopoxvirineae* (поксвирусы хордовых) относятся восемь родов: *Avipoxvirus* (от лат. avis — птица; поксвирусы птиц), *Capripoxvirus* (лат. capra — коза: поксвирусы коз и овец), *Leporipoxvirus* (лат. lepus — заяц; поксвирусы белок, зайцев и кроликов), *Molluscipoxvirus* (лат. molluscus — мягкий; *отражает мягкую консистенцию пораженных тканей человека*), *Orthopoxvirus* (от греч. ortho — прямой; *настоящие поксвирусы*; поксвирусы человека и животных), *Parapoxvirus* (от греч. — в стороне; *отличаются от настоящих поксвирусов*; поксвирусы белок, крупного рогатого скота, оленей и человека), *Suipoxvirus* (от лат. sus — свинья; поксвирусы свиней) и *Yatapoxvirus* (от **Ya**ba — пригород г. Лагоса, Нигерия, и **Ta**na — река в Кении; *места первого обнаружения этих вирусов*; поксвирусы обезьян и человека).

К роду *Orthopoxvirus* относятся самые актуальные для медицины представители: вирус коровьей оспы (***Cowpox virus***, CPXV), вирус натуральной оспы человека (***Variola virus***, VARV) и вирус осповакцины (***Vaccinae virus***, VACV),

Все заболевания, вызываемые хордопоксвирусами (за исключением представителей рода *Molluscipoxvirus*), являются антропозоонозными инфекциями, т. е. они могут передаваться между людьми или от животных человеку.

К подсемейству *Entomopoxvirineae* (поксвирусы насекомых) относятся три рода — *Alphaentomopoxvirus, Betaentomopoxvirus* и *Gammaentomopoxvirus*.

Строение вирионов. Вирионы поксвирусов — самые крупные у вирусов животных; их эллипсоидные или скругленно-прямоугольные частицы имеют размер 220–450×140–260 нм. С помощью специальной обработки (в частности, путем импрегнирования серебром) такие частицы можно увидеть даже в световом микроскопе, что впервые удалось немецкому патологу Энрике Пашену (E. Paschen) еще в 1906 г. (так называемые «тельца Пашена»).

В результате сборки вириона образуются инфекционные частицы двух типов — зрелые внутриклеточные (англ. intracellular mature virus, IMV) и оболочные внеклеточные (англ. extracellular enveloped virus, EEV) (рис. 86). В обоих случаях сердцевина (кор), содержащая геномную ДНК, на срезе имеет форму лежащей на боку восьмерки.

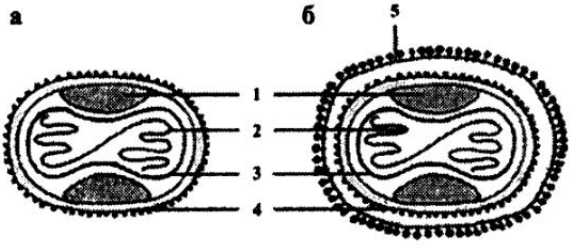


Рис. 86. Инфекционные частицы поксвирусов.

а — внутриклеточные зрелые частицы (IMV); б — внеклеточные оболочные частицы (EEV).

1 — латеральное тело; 2 — геномная ДНК; 3 — белковая оболочка кора; 4 — наружная мембрана; 5 — внешняя мембрана.

Сложная оболочка состоит из 2–3 мембранных слоев, в состав которых включено около 100 разных белков. Наружная мембрана (англ. outer membrane) содержит гликопротеины, которые образуют спирально уложенные валики; у EEV-частиц имеется дополнительная внешняя мембрана (англ. external membrane), поверхность которой покрыта трубчатыми белковыми придатками. Под внутренним мембранным слоем находятся два белковых включения — так называемые латеральные тела (англ. lateral body).

На концах линейной dsДНК расположены длинные (до 10 тыс. п.н.) инвертированные терминальные повторы (англ. inverted terminal repeat, ITR). Концы нитей ковалентно замкнуты и формируют небольшие петли, рядом с которыми находятся участки с короткими (54–70 п.н.) тандемными повторами. Благодаря такой концевой структуре ДНК предохраняется от прогрессивного укорочения (механизм репликации линейных хромосом усложняется тем, что ДНК-полимераза не способна копировать dsДНК со срезанного конца; напомним, что для наращивания полинуклеотидной нити в направлении 5′→3′ требуется РНК-праймер, а после его удаления остался бы нереплицированный 3′-участок).

Строение генома. Размер генома поксвирусов лежит в пределах 139–289 тыс. п.н.; мол. % АТ составляет от 36% (у представителей рода *Parapoxvirus*) до 75% (у представителей рода *Capripoxvirus*).

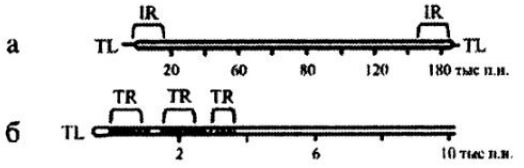


Рис. 87. Геном вируса осповакцины (VACV).

а — общая организация; б — участок в области инвертированных концевых повторов.

IR — инвертированные концевые, TR — тандемные повторы; TL — концевая петля.

В 1990 г. под эгидой ВОЗ была развернута Международная программа по изучению генома поксвирусов, прежде всего ортопоксвирусов; в настоящее время в ее рамках определены полные геномные последовательности более чем 20 штаммов-изолятов.

В частности, геном вируса VACV насчитывает свыше 200 генов. В центральной области молекулы ДНК находится консервативный участок размером ~100 тыс. п.н. По концам расположены участки, которые содержат гены, контролирующие взаимодействие вируса с хозяином (рис. 87).

Вариабельность инфраструктуры генома менее выражена у хордопоксвирусов, что позволяет считать их эволюционно более молодыми.

Цикл размножения. Лучше всего он изучен у вируса VACV, хотя многое остается неясным. В частности, не идентифицированы клеточные рецепторы. Вероятно, они специфичны у клеток разных тканей; в качестве примера можно назвать рецептор эпидермального фактора роста (англ. epidermal growth factor, EGF).

Проникновение может осуществляться путем фагоцитоза (в случае IMV-частиц) или слияния внешней мембраны оболочки вириона с клеточной мембраной (в случае EMV-частиц).

Весь цикл размножения проходит в цитоплазме с образованием характерных включений, или «телец Гварнери» (см. ниже). После проникновения наружная мембрана сбрасывается, а кор, окружающая его внутренняя мембрана и белки матрикса попадают в цитоплазму.

Размножение начинается с ранней транскрипции, которая осуществляется вирусной ДНК-зависимой РНК-полимеразой. На этой стадии экспрессируются все гены, отвечающие за синтез вирусной ДНК или РНК (исключение составляет входящая в состав вириона топоизомераза I, которая синтезируется на стадии поздней транскрипции). Вирусные мРНК транскрибируются с обеих нитей ДНК и транслируются в отсутствие сплайсинга.

При содействии ранних вирусных белков происходит второе раздевание (с потерей внутренней мембраны и белков кора), и «голая» вирусная ДНК оказывается в цитоплазме.

Следующая, репликативная, стадия проходит в виросоме (англ. virosome), которая образуется в околоядерной области; при этом частично разбираются центриоли и реорганизуется система микротрубочек. Поскольку в виросоме концентрируются ДНК и белки вируса, она выявляется в цитоплазме при световом микроскопировании в виде крупного эозинофильного включения, получившего название «тельце Гварнери» в честь итальянского врача Джузеппе Гварнери (G. Guarneri), впервые описавшего его в 1893 г.

Перед началом репликации эндонуклеаза надрезает одну из нитей в участке инвертированных повторов; концевые петли расплетаются, и образуются свободные

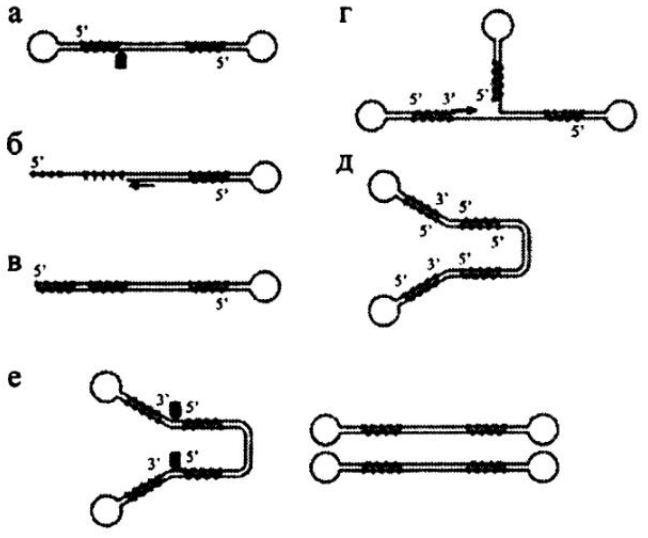


Рис. 88. Репликация генома поксвируса (по: Львов, 2008).

а — разрезание нити эндонуклеазой; б, в — расплетание нитей, образование свободных 5′-концов, достраивание комплементарной нити; г — повторное расплетание нитей, образование ss-фрагмента; д, е — образование конкатемеров, образование копий генома.

Толстая стрелка — сайт разреза эндонуклеазой; тонкая стрелка — направление достраивания участка нити ДНК.

5′-концы (рис. 88). Полимеразный комплекс, состоящий из ранних вирусных белков, достраивает комплементарную нить по механизму синтеза ведущей нити. После этого ДНК-геликаза вируса «разводит» концы вновь синтезированной dsДНК, которые за счет инвертированных повторов образуют шпильки. Затем ДНК-полимераза достраивает недостающий фрагмент нити в направлении 3′→5′. Образующиеся конкатемеры могут состоять из двух и более геномных копий. Нарезание конкатемеров на мономеры приводит к образованию зрелых молекул геномной ДНК.

Поздняя транскрипция, при которой образуются структурные белки, тесно связана с репликацией и начинается в среднем через 2,5 ч от начала инфицирования.

Сборка вирионов у вируса VACV — сложный процесс. Предполагается, что комплекс вирусных нуклеиновых кислот и белков удерживается в виросоме цитоскелетными элементами (микрофиламентами и микротрубочками). На его основе образуется кор, или незрелый вирион (англ. immature virion, IV). Последний транспортируется в аппарат Гольджи, приобретает там мембранную оболочку и превращается в IMV-частицу, которая, в свою очередь, доставляется по микротрубочкам на периферию клетки.

Вирус VACV может выйти из клетки-хозяина тремя способами: 1) IMV-частицы освобождаются в результате лизиса; 2) IMV-частицы отпочковываются от клеточной мембраны и превращаются в EEV-частицы; 3) отпочковывание сопровождается фор-

мированием актинового «хвоста», который подпирает вырост мембраны и выталкивает EEV-частицу в межклеточное пространство или в соседнюю клетку.

Следует отметить, что вирус VACV — это не единственный внутриклеточный паразит, использующий комплекс полимеризации актина Arp2/3 для собственного перемещения как внутри клетки, так и между клетками. Факторы полимеризации актина, или адапторные белки, имеются у бактерий *Shigella* sp., *Listeria* sp. и энтеропатогенной *Escherichia coli* (EPEC), причем у последней они очень похожи на белок-адаптор вируса осповакцины.

Весь цикл завершается за 12 ч, что достаточно быстро для такого сложного по строению вируса.

Иммуномодулирующие свойства поксвирусов. Защитная реакция на вирусную инфекцию состоит из двух стадий: 1) первичной, неспецифичной, стадии, ведущую роль в которой играют воспалительные процессы; 2) вторичной, высокоспецифичной, стадии, в которой участвуют иммунокомпетентные клетки. В ходе эволюции ортопоксвирусы приобрели набор генов, продукты которых служат модуляторами как неспецифических, так и специфических иммунных реакций.

Ключевую роль в индукции первичной стадии защиты играют цитокины (фактор некроза опухолей, интерферон IFN-γ, интерлейкин-1β, хемокины и др.), а также система комплемента плазмы крови. Однако у поксвирусов имеются белки, которые связываются со всеми перечисленными молекулами, причем они синтезируются уже на ранних этапах инфекции. Поксвирусы устойчивы к интерферону (он синтезируется в ответ на любую вирусную инфекцию; см. раздел 1.7.5), поскольку у них имеется по крайней мере четыре гена, продукты которых вторгаются в систему интерферона или непосредственно его блокируют.

На поздней, высокоспецифичной, стадии защиты цитокины индуцируют систему апоптоза и пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако белки поксвирусов связывают цитокины, что препятствует появлению иммунокомпетентных клеток и не позволяет ликвидировать инфекцию.

Интересно отметить, что, хотя вирусные рецепторы цитокинов отличаются от своих клеточных аналогов, они высокоспецифичны по отношению к лигандам. Вирус осповакцины не обладает полным набором белков-иммуномодуляторов; возможно, это одна из причин его слабой вирулентности.

Филогения поксвирусов. Согласно результатам молекулярно-филогенетического анализа, подсемейство *Entomopoxvirineae* является эволюционно более старым, причем представители рода *Betaentomopoxvirus*, инфицирующие чешуекрылых (отряд Lepidoptera) и прямокрылых насекомых (отряд Orthoptera), находятся ближе всего к предковой форме хордопоксвирусов.

Разделение ортопоксвирусов на современные виды произошло 12–14 тыс. лет назад, а виды, специфичные по отношению к человеку, сформировались ~6 тыс. лет назад. Этот период совпадает с эпохой одомашнивания копытных; стадное содержание и уход за ними способствовали перекрестному инфицированию и животных, и людей.

Геном вируса коровьей оспы (CPXV), самый большой среди геномов ортопоксвирусов, содержит все элементы, имеющиеся у остальных видов, и поэтому он может рассматриваться как наиболее близкий к геному предковой формы.

Есть основания полагать, что природным резервуаром всех поксвирусов служат грызуны (отряд Rodentia). В обследованных популяциях песчанок у 3–17% особей в крови содержались антитела к вирусу CPXV; поксвирусы выделены от грызунов в Африке, Европе (в лесотундре Кольского п-ва) и Южной Америке (в Бразилии).

После практически полной ликвидации вируса натуральной оспы (VARV) наибольшую эпидемиологическую опасность представляет вирус оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), который имеет с ним общего предка.

Поксвирус MPXV был впервые выделен в 1958 г. во время эпидемии среди яванских макак, завезенных в Европу из Сингапура; в 1971–1972 гг. появились первые сообщения об инфицировании им людей, причем клиническая картина была похожа на таковую при натуральной оспе.

На территории США в 2003 г. были описаны десятки случаев заболевания, вызванного вирусом MPXV, который передавался людям от обезьян через содержащихся в домашних условиях экзотических грызунов — африканских луговых собачек *Cynomys* sp. (сем. Sciuridae). Исследования показали, что в крови 14 видов обезьян, распространенных в Западной и Центральной Африке, есть антитела к этому вирусу. Среди населения Экваториальной Африки вирус MPXV вызывает заболевания с летальностью до 10% преимущественно у детей возрастом до 15 лет. Активными участниками в циркуляции вируса MPXV являются беличьи (референтный штамм был выделен от полосатой белки *Funisciurus anerythrus*, причем была показана возможность бессимптомного носительства).

С учетом отсутствия иммунитета к поксвирусам у подавляющей части населения планеты рекомендуется строго соблюдать карантинные мероприятия при импорте экзотических животных и проводить вакцинацию обезьян.

6.6.2. ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ ssДНК

К этой группе относится семейство *Circoviridae* (первоначально в нем было два рода; позднее к ним добавился род *Anellovirus*, который недавно был обособлен в семейство *Anelloviridae*) и семейство *Parvoviridae*.

Для экспрессии генов этих вирусов необходимо, чтобы транскрипции предшествовал синтез второй нити ДНК.

Вирусы семейств *Circoviridae*, *Anelloviridae* и *Parvoviridae* имеют большое эпидемиологическое значение. Цирковирусы и парвовирусы являются возбудителями болезней человека и хозяйственно-важных животных. В свою очередь, у людей в последнее время стали все чаще регистрироваться анелловирусные инфекции.

6.6.2.1. Семейства *Circoviridae* и *Anelloviridae*

Семейство *Circoviridae*. Представители семейства *Circoviridae* примечательны тем, что их геномы имеют минимальный размер среди геномов автономно размножающихся (т. е. без участия хелперов) вирусов ядерных организмов. Образное название этого семейства объясняется кольцевой формой геномной ssДНК (лат. circulus — круглый).

В семействе *Circoviridae* два рода — *Circovirus и Gyrovirus*. К роду *Circovirus* принадлежат цирковирусы копытных; наиболее опасны возбудители системного заболевания поросят, при котором поражаются пищеварительная и дыхательная системы, и животное погибает от истощения. Спектр хозяев рода *Gyrovirus* включает в себя несколько семейств диких и домашних птиц. Наиболее изучен вирус анемии кур, которая особо опасна для цыплят на протяжении десяти дней с момента вылупления.

Строение вириона. Безоболочные икосаэдрические вирионы цирковирусов (T=1) состоят из 12 пентамерных субъединиц и имеют размер 18–27 нм.

Строение генома. У представителей рода *Circovirus* размер генома 1,8 тыс. н., что соответствует минимальному размеру полноценного вирусного генома. Геном представителей рода *Gyrovirus* несколько большего размера (2,3 тыс. н.).

В геноме цирковирусов выявлены две-три достоверные и несколько потенциальных ORF. Одна из них кодирует белок капсида, другая — белок Rep, отвечающий за инициацию репликации. Еще один из белков обладает способностью индуцировать апоптоз. Некоторые ORF расположены на второй нити ДНК, которая синтезируется после попадания в ядро клетки-хозяина, т. е. эти вирусы имеют «двусмысленные» геномы (англ. ambisense genome).

Цикл размножения. Репродукция цирковирусов происходит в ядре. Сначала при помощи хозяйской ДНК-полимеразы достраивается вторая нить геномной ДНК. Затем с вирусной матрицы считываются мРНК, одна из которых транслируется на цитоплазматических рибосомах в белок Rep.

Белок Rep возвращается в ядро и инициирует репликацию вирусной ДНК по механизму «катящееся кольцо», что приводит к синтезу конкатемеров — цепочки однонитевых вирусных геномов. Последние либо достраиваются до двунитевой молекулы (что создает новые матрицы для транскрипции и репликации), либо инкапсидируются с образованием потомства вирионов. Вирионы выходят из клетки посредством отпочкования, однако в дальнейшем не сохраняют мембранную оболочку. Способ передачи цирковирусов между хозяевами — фекально-оральный.

Семейство *Anelloviridae*. В 1997 г. в Японии у пациента, заболевшего в результате переливания крови гепатитом неясной этиологии, был обнаружен новый вирус, названный «вирусом, передающимся при переливании крови» (англ. *Transfusion Transmitted Virus*, TTV). В настоящее время его фактически переименовали, поскольку аббревиатуру TTV теперь расшифровывают как *Torque teno virus* (от лат. torquis — ожерелье и tenuis — тонкий; в *названии нашла отражение кольцевая форма геномной ДНК этого вируса*). Когда выяснилось, что степень сходства капсидных белков между вирусом TTV и вирусами рода *Gyrovirus* не превышает 70%, его отнесли к новому роду *Anellovirus* (от лат. anellus — колечко). Последующее секвенирование геномов ряда штаммов анелловирусов показало, что этот род должен входить в отдельное семейство.

Вирионы анелловирусов имеют размер 30–40 нм. Геномная ДНК (3,8 тыс. н.) содержит четыре ORF и реплицируется тем же способом, как у цирковирусов.

Инфекционный цикл анелловируса TTV протекает так же, как и у цирковирусов, т. е. вирус может репродуцироваться в клетках разных тканей, хотя есть данные о том, что он «предпочитает» гепатоциты и лейкоциты.

Род *Anellovirus* состоит из нескольких квазивидов, представители которых, по последним данным, инфицируют в некоторых странах свыше 90% населения. Кроме того, один и тот же человек может одновременно заражаться несколькими штаммами вируса TTV, что приводит к высокому уровню рекомбинационной изменчивости вирусного генома. Геномный полиморфизм и глобальное распространение вируса TTV, а также факты обнаружения его вирионов не только в крови, но и в выделениях (слюне, фекалиях) дают основание считать, что механизмы распространения этих вирусов разнообразны. Тем не менее основным остается воздушно-капельный путь передачи.

Поскольку инфекция вирусом TTV протекает бессимптомно, ее считают относительно безопасной. Скорее всего вирус TTV является оппортунистическим патогеном, поскольку им активно инфицируются ВИЧ-носители. Однако очень часто анеловируса обнаруживают у больных с патологиями печени, что все-таки заставляет подозревать его в патогенности.

6.6.2.2. Семейство *Parvoviridae*

Парвовирусы — одни из самых мелких (лат. parvus — маленький). В то же время их частицы являются одними из самых стабильных: они устойчивы к воздействию кислот, щелочей и других агрессивных химических реагентов, а также к нагреванию до 50°C.

Структура семейства. Эти вирусы подразделяют на два подсемейства, одно из которых (*Parvovirineae*), содержащее пять родов, ассоциировано с млекопитающими, а второе (*Densovirineae*), в котором четыре рода, — с насекомыми.

Парвовирусы млекопитающих высокоспецифичны по отношению к своим хозяевам: почти для каждого вида характерен «свой» штамм парвовируса. Ряд парвовирусов обнаружен у человека, однако только один вид (*Parvovirus* B19, который на самом деле относится к роду *Erythrovirus*) вызывает неопасное заболевание — инфекционную эритему, осложнением которой становится малокровие. Парвовирусам также приписывают роль в развитии артритов, хотя механизмы развития этих заболеваний еще слабо изучены.

Широкую известность парвовирусам принесли болезни домашних животных — парвовирусный энтерит собак («олимпийка») и панлейкопения кошек. До создания соответствующих вакцин эти болезни, как правило, имели летальный исход.

Парвовирусы, в отличие от большинства других ДНК-содержащих вирусов, не обеспечивают репликацию собственной ДНК, и поэтому им необходимо попасть в клетки растущих или интенсивно обновляющихся тканей с высокой активностью ДНК-полимеразы. В первую очередь они поражают эпителий желудочно-кишечного тракта, лимфатическую систему и стволовые клетки кроветворной системы; под их воздействием у молодых животных могут происходить необратимые изменения сердечной мышцы и тканей головного мозга.

Строение вириона. Безоболочные икосаэдрические частицы парвовирусов имеют размер 18–26 нм и состоят из 60 капсомеров, которые, в свою очередь, образованы одним-тремя протомерами.

Строение генома и репликация геномной ДНК. В капсид парвовируса упакована ssДНК размером 4–6 тыс. н. (соотношение числа вирионов с плюс- и минус-нитями

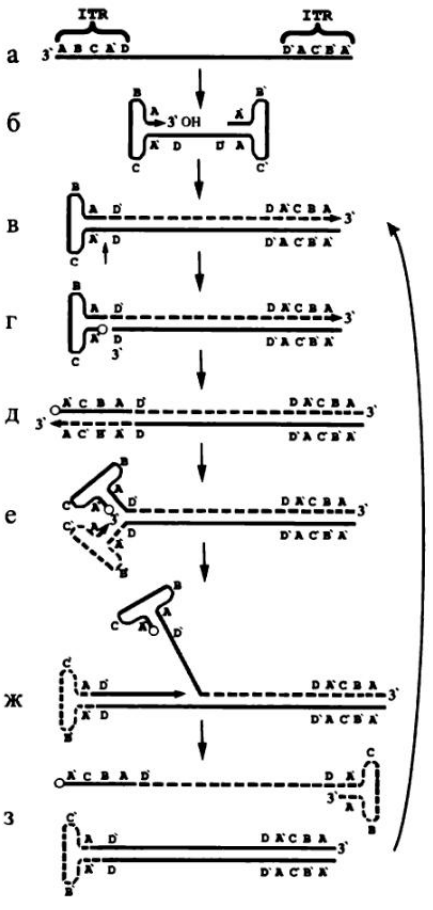


Рис. 89. Репликация генома парвовируса.

а — формирование Т-образной шпильки; б — синтез ДНК; в — нанесение разреза (стрелка) в инвертированном терминальном повторе материнской нити; г — продолжение элонгации от сайта разреза, присоединение эндонуклеазы (кружок) к 5′-концу материнской нити; д — ДНК-интермедиат; е — образование Т-образной шпильки на вновь синтезированном 3′-конце ДНК-интермедиата; ж — новый раунд синтеза ДНК с вытеснением дочерней нити; з — образование геномной ssДНК и не полностью реплицированной ДНК, служащей субстратом для реакции «в».

ITR — инвертированный терминальный повтор.

примерно равное). На концах молекулы находятся длинные (150–250 н.) инвертированные концевые повторы (англ. inverted terminal repeat, ITR), которые содержат несколько палиндромных участков и образуют Т-образные шпильки, необходимые для репликации геномной ДНК. Она осуществляется по принципу вытеснения нити (рис. 89) без использования РНК-затравки; вместо этого действует уникальный механизм автопраймирования (англ. self-priming). В качестве затравки для синтеза комплементарной нити используется шпилька на 3′-конце (которая, по-видимому, сама не реплицируется). По завершении репликации эндонуклеаза делает разрез внутри ITR материнской нити, и образовавшийся 3′-конец праймирует полимеризацию до конца нити ДНК.

Таким образом, исходная шпилька входит в состав дочерней нити, а комплементарная ей последовательность достраивается в материнской нити. Эндонуклеаза остается ковалентно связанной с 5′-концом материнской нити. Реплицированный 3′-конец ДНК-интермедиата за счет палиндромов вновь образует шпильку, с которой начинается следующий раунд репликации с вытеснением материнской нити. В итоге синтез дочерней нити ДНК сопровождается вытеснением материнской нити из образующегося дуплекса; вторым продуктом является двунитевой репликативный интермедиат. Вытесненная ssДНК может, в свою очередь, стать матрицей для репликации или войти в состав нового вириона.

Цикл репродукции. Парвовирусная инфекция начинается после контакта вириона с клеточными гликопротеинами, несущими на конце молекулы остатки сиаловой кислоты; в частности, рецептором для вируса *Parvovirus* B19 служит поверхностный антиген (P-антиген) клеток эритроидного ряда.

Некоторые парвовирусы используют трансферриновый рецептор. В частности, возбудитель панлейкопении кошек стал вызывать вирусный энтерит у собак в результате мутации капсидного белка, которая придала ему способность взаимодействовать с трансферриновым рецептором представителей псовых (сем. Canidae).

Главный белок капсида обладает фосфолипазной активностью, в результате чего вирус проникает в цитоплазму, а затем с помощью неизвестного механизма транспортируется в ядро, где высвобождается геномная ДНК.

Для транскрипции вирусных генов необходима комплементарная нить ДНК, которая синтезируется в S-фазе клеточного цикла. РНК-полимераза вступает во взаимодействие с «привычной» dsДНК-матрицей, в результате чего синтезируется несколько мРНК.

Важнейшие из ранних транскриптов — мРНК, транслируются в неструктурные белки NS1 и NS2. Они участвуют в репликации вирусного генома, разрезая в материнской нити ДНК-интермедиат и фиксируя 5′-конец. Репликация протекает крайне быстро и эффективно, так что в клетке может накопиться до 10^6 молекул вирусной dsДНК. Белок NS1 также активирует внутренний промотор, с которого начинается транскрипция генов, отвечающих за синтез белков капсида. Окончательная сборка капсидов и упаковка геномных ДНК также осуществляются в ядре.

Поскольку вирус покидает клетку путем отпочкования, она некоторое время не лизируется, что повышает урожай вирионов и способствует распространению инфекции.

Использование парвовирусов. Представители семейства *Parvoviridae* зависят от репликационной активности клеток хозяина, однако не способны стимулировать их пролиферацию, т.е. не являются онкогенными. Напротив, они часто оказывают онколитическое действие, заражая и лизируя интенсивно делящиеся клетки опухолей.

Представитель рода *Dependovirus*, парвовирус AAV (сокр. англ. *Adeno-associated virus*), может использоваться для «трансфекции» клеток млекопитающих (т.е. их трансформации с помощью инфекционной вирусной нуклеиновой кислоты) в целях генотерапии. Он вызывает латентную инфекцию, и для его эффективной репродукции необходим вирус-хелпер, в роли которого могут выступать аденовирусы, герпесвирусы или вирус осповакцины. Вирус AAV самостоятельно проникает в клетку, после чего его геномная ДНК почти в 100% случаев встраивается в один и тот же участок короткого плеча 19-й хромосомы, что позволяет избежать случайной интеграции и нежелательных эффектов «слепой» трансформации. Ценным качеством вируса AAV является его неиммуногенность — процедуру трансфекции можно повторять многократно, не рискуя вызвать иммунный ответ у организма, подвергающегося генотерапии.

6.6.3. ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ dsРНК

Вирусы, содержащие dsРНК, имеют ряд общих признаков:
— сегментированный геном;
— безоболочный вирион, который содержит РНК-зависимую РНК-полимеразу;
— неполное раздевание вируса;
— образование потомства вирионов в цитоплазме.

Неполное раздевание вируса объясняется тем, что dsРНК воспринимается клеточными сенсорами, в частности высококонсервативным рецептором TLR3, как сигнал вирусной атаки (см. раздел 1.7.5). При обнаружении вирусной dsРНК запускаются сигнальные каскады, которые через систему интерферона сообщают соседним клеткам о вирусном вторжении. Одновременно с этим в инфицированной клетке начинается ряд процессов, направленных на снижение репродукции вируса, или, при невозможности ее ограничить, на индукцию апоптоза.

Клеточная система распознавания dsРНК отличает относительно длинные геномные вирусные dsРНК от коротких фрагментов РНК, присутствующих в цитоплазме в качестве компонентов системы РНК-сайленсинга, которая предназначена для регуляции экспрессии генов хозяина и обезвреживания чужеродной генетической информации (см. раздел 1.7.3).

Репликативные интермедиаты dsРНК-вирусов представляют собой сложные макромолекулярные комплексы, состоящие из внутреннего капсида, нескольких молекул РНК-полимеразы (по количеству сегментов генома) и вспомогательных белков.

Геномная РНК никогда не появляется в цитоплазме — вирусная РНК-полимераза может функционировать только при взаимодействии с белками капсида; первичная транскрипция в начале цикла размножения и достраивание ssРНК до dsРНК при формировании вирионов потомства осуществляются внутри капсида.

Значительная дивергенция в группе dsРНК-вирусов и общая реакция отторжения dsРНК, происходящая у разных организмов, служат основанием для того, чтобы считать этих вирусов одними из самых архаичных. Есть мнение, что они являются прямыми потомками наиболее конкурентоспособных представителей первичного мира РНК-геномных живых существ, которые в ходе органической эволюции были в основном вытеснены ДНК-геномными живыми существами (не)клеточного строения.

Вирусы животных, содержащие геномную dsРНК, относятся к семействам *Birnaviridae* и *Reoviridae*; хозяевами вирусов из остальных семи семейств этой группы (см. табл. 10) являются бактерии, протисты, грибы и растения.

6.6.3.1. Семейство *Birnaviridae*

Геном бирнавирусов состоит из двух сегментов dsРНК, что отражено в названии семейства (англ. **bi**-segmented **RNA**).

Важнейшими представителями бирнавирусов являются вирус инфекционного бурсита кур (*Infectious **b**ursal **d**isease **v**irus*, IBDV) и вирус инфекционного некроза поджелудочной железы рыб (*Infectious **p**ancreatic **n**ecrosis **v**irus*, IPNV). Оба они известны с начала 1960-х годов как экономически актуальные патогены, наносящие значительный урон птицефабрикам и рыбоводческим хозяйствам. Аналоги этих бирнавирусов найдены у двустворчатых моллюсков и насекомых; у млекопитающих они не обнаружены.

Не все вирусы животных с геномом из двух сегментов dsРНК относятся к семейству *Birnaviridae*. Из кишечника млекопитающих, в том числе человека, недавно выделены мелкие икосаэдрические вирусы диаметром ~40 нм, содержащие два сегмента dsРНК общим размером ~4 тыс. п.н. (2,5 тыс. п.н. + 1,5 тыс. п.н.). Предполагается объ-

единить их в новое семейство *Picobirnaviridae* («мелкие» бирнавирусы). Поскольку в отличие от бирнавирусов пикобирнавирусы не размножаются в клеточной культуре, есть вероятность того, что они поражают не самих млекопитающих, а микрофлору их кишечника.

Структура семейства. Семейство *Birnaviridae* содержит четыре рода — *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus*, *Blosnavirus* и *Entomobirnavirus*.

Род Aquabirnavirus. К нему относятся вирусы, поражающие многие виды ценных лососевых рыб, в том числе семгу (*Salmo salar*) и радужную форель (*Oncorhynchus mykiss*). Типовой вид этого рода — вирус IPNV. К этому же роду принадлежат бирнавирусы, обнаруженные у двустворчатых моллюсков семейства Tellinidae, например *Tellina virus*.

Род Avibirnavirus. Как видно из названия, к этому роду относятся вирусы, поражающие птиц. Типовой вид — вирус IBDV; вызываемая им инфекция известна также как «болезнь Гамборо» (англ. Gumboro disease; *по названию городка на восточном побережье США, где она была впервые зарегистрирована*).

Род Blosnavirus. Его название произведено от начальных букв английского обозначения пресноводной рыбы *Chana lucius* (**blo**tched **sna**kehead — пятнистый змееголов), из культуры клеток которой был выделен вирус, отличающийся по строению генома от представителей рода *Aquabirnavirus*. Типовой вид — вирус пятнистого змееголова (англ. ***Blotched snakehead virus***, BSNV).

Род Entomobirnavirus. В данный род объединены бирнавирусы, хозяевами которых служат насекомые. Типовой вид — вирус X дрозофилы (***Drosophila X virus***, DXV).

Один из наиболее изученных представителей семейства *Birnaviridae* — вирус IBDV, поскольку его можно культивировать на куриных эмбрионах или в культуре клеток эмбриональных фибробластов. Свойства бирнавирусов мы опишем в основном на его примере.

Строение вириона. Однослойный икосаэдрический капсид вируса IBDV (T=13; 60–70 нм) состоит из 780 копий белка VP2 (рис. 90). Субъединицы этого белка образуют тримеры, имеющие периферический рецепторный домен P (сокр. от англ. projection — выступ), промежуточный домен S (сокр. от англ. shell — оболочка) и внутренний домен B (сокр. от англ. base — основание). За прикрепление к чувствительным клеткам отвечает вариабельный участок домена P.

При электронном микроскопировании негативно контрастированных препаратов на ребре вириона видны четыре капсомера; этот признак служит морфологическим критерием, позволяющим отличить бирнавирусов от других икосаэдрических вирусов близкого размера.

При сравнении бирнавирусов с реовирусами (см. раздел 6.6.3.2) бросается в глаза то, что при сходном размере частиц они содержат втрое меньший геном (6 тыс. п.н. против 18–20 тыс. п.н.) и, казалось бы, должны обладать более низкой плотностью упаковки геномной РНК. Однако недавно проведенный анализ физико-химических характеристик вирионов вируса IBDV привел к неожиданному выводу: плотность упаковки его геномной РНК сравнима с таковой у реовирусов. Причина в том, что частицы бирнавируса содержат диплоидный геном (по две копии каждого сегмента dsРНК).

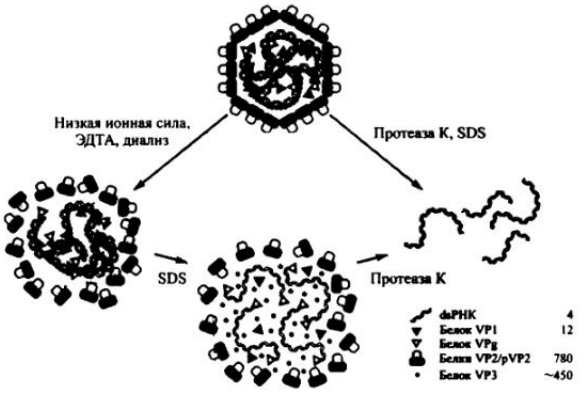


Рис. 90. Схема вириона бирнавируса с диплоидным геномом (два малых и два больших сегмента dsРНК) и разборка частицы с помощью ЭДТА/SDS/протеазы К (по: Luque, 2009).

В то время как полиплоидия известна у ряда оболочных вирусов (примерами служат вирус кори *Measles virus* из семейства *Paramyxoviridae* и вирус иммунодефицита человека HIV-1 из семейства *Retroviridae*), для безоболочных икосаэдрических вирусов она достоверно ограничивается вирусом IBDV. По некоторым данным, вирус IPNV также имеет диплоидный геном; другие представители семейства *Birnaviridae* в этом плане не анализировались.

Помимо капсидного белка VP2 вирионы бирнавирусов содержат его предшественник (белок pVP2), а также мультифункциональный белок VP3 (~450 копий). Основная роль белка VP3 заключается в образовании нитевидных рибонуклеопротеиновых комплексов (РНП) с dsРНК. Наряду с белком VP3 и dsРНК в состав комплекса входит ковалентно присоединенный к обоим концам каждого из сегментов генома белок VP1 (РНК-полимераза). Благодаря этому такие комплексы обладают транскриптазной и репликазной активностью, что само по себе необычно для dsРНК-содержащих вирусов и указывает на эволюционное родство между бирнавирусами и вирусами с негативным РНК-геномом.

Строение генома. Размер генома бирнавирусов варьирует в пределах 6–7 тыс. п.н.; больший сегмент (А) имеет размер 3,5 тыс. п.н.; меньший сегмент (В) — 2,5 тыс. п.н.

В сегменте А имеются 1–2 рамки считывания (рис. 91). Единственная (во втором случае главная) ORF кодирует полипротеин, который в несколько этапов расщепляется на белок VP2 (белок капсида), белок VP4 (протеазу) и белок VP3 (белок нуклеопротеина). Высокопатогенные штаммы IBDV и IPNV дополнительно содержат в сегменте А малую рамку считывания, которая кодирует неструктурный белок VP5 (~17кДа). У вируса IBDV этот белок блокирует апоптоз инфицированных клеток, возможно, что у вируса IPNV он выполняет аналогичную функцию, подавляя экспрессию генов интерферона.

Малый сегмент В генома всех известных бирнавирусов кодирует белок VP1 — РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRP). РНК-полимеразы бирнавирусов необычны

по строению и обладают способностью к автокэпированию. Оба сегмента генома несут на 5′- и 3′-концах некодирующие последовательности, которые участвуют в регуляции транскрипции и репликации.

Цикл размножения. Бирнавирусы IBDV и IPNV размножаются в цитоплазме клеток-мишеней у птиц и рыб, соответственно. Проникновение осуществляется, по-видимому, путем эндоцитоза. В данном случае детали этого процесса не изучены, однако известно, что закисления полости эндосомы не происходит.

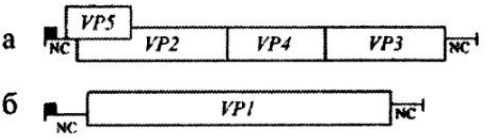


Рис. 91. Геном бирнавируса IBDV (по: Berg, 2000).

а — большой, б — малый сегмент.

VP2 и *VP3* — гены белков капсида; *VP4* — ген протеазы; *VP5* — ген белка подавления иммунного ответа хозяина; *VP1* — ген РНК-зависимой РНК-полимеразы; NC — некодирующие регуляторные последовательности.

Клеточными рецепторами, с которыми взаимодействует вирус IBDV, служат интегрины α4β1, в изобилии представленные на мембране незрелых лимфоидных клеток Фабрициевой сумки цыплят. После первичной адсорбции в процессе проникновения, по-видимому, участвует один из белков теплового шока — cHsp90 (сокр. от англ. chicken **h**eat **s**hock **p**rotein **90**).

Для бирнавирусов рыб, очевидно, существуют другие, еще не идентифицированные рецепторы; известно, что вирус IPNV не использует ни один из рецепторов, ассоциированных с клатрин-опосредованным эндоцитозом.

Стадия репродуктивного цикла, следующая за проникновением, слабо изучена. В свете новых данных о структуре вирионов бирнавирусов маловероятно, что они не раздеваются в цитоплазме, поскольку декапсидированный РНП достаточно замаскирован белком VP3 от клеточных сенсоров для вирусных dsРНК.

Так или иначе, после проникновения в цитоплазму РНК-полимераза (белок VP1) в составе РНП или более сложного комплекса (включающего в себя белки капсида) синтезирует вирусные мРНК на матрице минус-нити геномной dsРНК и кэпирует их. Эти транскрипты не содержат полиА-последовательность; возможно, ее заменяют нетранслируемые участки на 3′-концах, образующие вторичные структуры (шпильки).

После трансляции на клеточных рибосомах полипротеин, закодированный в большом сегменте генома, расщепляется на несколько фрагментов — подобно тому, как это происходит у вирусов с «позитивным» РНК-геномом, например у пикорнавирусов. В результате образуются белок pVP2 (предшественник белка капсида), белок VP4 (вирусная протеаза) и мультифункциональный белок VP3. Кроме них синтезируется еще несколько пептидов неустановленной функции.

Интересно, что один из пептидов, закодированных в геноме вируса IPNV, обладает антибактериальной активностью в отношении внутриклеточного паразита рыб — *Piscirickettsia salmonis* (класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Xanthomonadales*, семейство *Piscirickettsiaceae*), что указывает на возможность конкуренции между этими двумя патогенами.

Вирусные белки накапливаются в вириоплазме, где осуществляется сборка вирионов потомства. Формирование и созревание вирионов представляет собой многостадийный процесс, в котором ведущая роль принадлежит белку VP3, вступающему

в комплекс с предшественником белка капсида (pVP2) и полимеразой VP1 (см. выше). Геномные сегменты образуются внутри вирионов в результате синтеза минус-нити РНК на матрице мРНК. Выход вирионов происходит в результате лизиса клетки; имеются данные о том, что в этом процессе участвует неструктурный белок VP5.

Молекулярные детерминанты патогенности. По саркастическому замечанию известного бельгийского вирусолога Тьери ван ден Берга (T. P. van den Berg), для многих его коллег выяснение молекулярных детерминант патогенности вирусов сделалось чем-то вроде поисков Святого Грааля. Тем не менее в понимании молекулярного патогенеза бирнавирусов в последние годы достигнут определенный прогресс.

Анализ базы данных геномных последовательностей разных штаммов вируса IBDV и активное применение методов «обратной» генетики для получения реассортантов позволили сделать следующие выводы: 1) вирулентность штамма бирнавируса в отношении конкретного вида птиц зависит от обоих сегментов генома; 2) высокопатогенные штаммы имеют определенные сочетания аминокислот в сайте связывания с клеточными рецепторами, например, замена His на Glu или Asn в положении-253 белка VP2 (кодируется сегментом A) значительно повышает вирулентность; 3) скорость репродукции вируса в основном детерминируется сегментом B, который кодирует РНК-полимеразу; высокопатогенные штаммы быстро размножаются, однако установить позиции аминокислот, отвечающих за поддержание активной конформации фермента, не удается, поскольку такие штаммы в отличие от низкопатогенных характеризуются большим количеством аминокислотных замен.

Сходные закономерности выявлены при исследовании молекулярного патогенеза вирусов рыб. Основными детерминантами патогенности вируса IPNV, скорее всего, являются аминокислоты в положениях 217 и 221 белка VP2. Для высокопатогенных штаммов характерно сочетание Thr-217/Ala-221, в то время как низкопатогенные штаммы обычно содержат Thr-217/Thr-221 или Pro-217/Thr-221. Таким образом, замена одной неполярной аминокислоты (Ala) на полярную (Thr) в сайте связывания с клеточным рецептором значительно снижает патогенность вируса.

Поскольку база данных для вируса IPNV дает возможность определить значение единичных аминокислотных замен, он стал удобной моделью для изучения эволюции инфекционного процесса. В частности, когда рыб-мальков заражали двумя штаммами вируса, последние в ходе эксперимента приобретали одинаковые замены в сайте связывания с рецептором; параллельно с этим снижалась вирулентность. Согласно результатам секвенирования генома бирнавирусов возникновение низкопатогенного генотипа совпадает во времени с прекращением гибели мальков, что свидетельствует в пользу механизма изменчивости вируса под влиянием хозяина (англ. host editing — редактирование хозяином). В нем, по-видимому, участвуют аденозиндезаминазы, распознающие участки dsРНК и превращающие аденозин в инозин, что приводит к замене A на G при синтезе комплементарной нити РНК (характерно, что в острой фазе заболевания повышается уровень экспрессии именно генов аденозиндезаминазы). В настоящее время изучение «хозяйского редактирования» является одной из актуальных тем вирусологии.

Биологические особенности бирнавирусов птиц и рыб. Известно два серотипа вируса IBDV, которые различаются по специфичности и патогенности.

Вспышки тяжелого заболевания цыплят вызывает вирус IBDV первого типа. Вирус IBDV второго типа, обычно выделяемый от индеек, для кур не патогенен, однако он может вызывать заболевание у других видов птиц. В частности, действующая в США программа по восстановлению численности американского журавля (*Grus americana*) выявила необходимость вакцинации молодых особей против вирусов IBDV второго типа, бессимптомными носителями которого служат дикие индейки.

Первичной мишенью вируса IBDV первого типа являются B-клетки лимфоидного органа птиц — Фабрициевой сумки (лат. bursa Fabricius). Наиболее восприимчивы к инфекции 3–6-недельные цыплята, когда этот орган достигает максимального развития. На конечной стадии заболевания он атрофируется, что приводит к быстрому снижению числа лимфоидных клеток. Летальность, в зависимости от породы хозяина и штамма вируса, составляет 2–50%; взрослые птицы менее подвержены инфекции, и летальность обычно не превышает 5%.

После 1986 г. всемирное распространение получили особо патогенные штаммы вируса IBDV первого типа (англ. very virulent IBDV strains, vvIBDV), вызывающие заболевание с летальностью до 70%. Предполагается, что эти варианты возникли путем реассортации, однако конкретный источник реассортантов неизвестен.

Несмотря на многолетние исследования, патогенез бирнавирусной инфекции кур остается загадкой. Неизвестно, от чего в конечном счете погибают цыплята, поскольку значительных изменений во внутренних органах, за исключением атрофии Фабрициевой сумки и частичной деградации тимуса, не отмечено; при удалении Фабрициевой сумки цыплята, зараженные патогенным штаммом вируса, не заболевают.

Хозяйственный ущерб, наносимый вирусом IBDV, не ограничивается болезнью и гибелью цыплят — инфекционный бурсит подавляет иммунную систему, что препятствует вакцинации против других вирусов, например вируса болезни Ньюкасла (*Newcastle disease virus*, NDV; сем. *Paramyxoviridae*) и вируса инфекционного бронхита (*Infectious Bronchitis Virus*, IBV; сем. *Coronaviridae*).

Вакцинация цыплят против штаммов vvIBDV представляет собой серьезную проблему, так как убитые вакцины слабоиммуногенны, а живые вакцины могут вызвать заболевание и, более того, ревертировать к дикому типу. Ситуация осложняется наличием у цыплят материнских антител к вирусу IBDV, что препятствует развитию приобретенного иммунитета. На практике приходится искать компромисс между степенью аттенуации вакцинного штамма и его патогенностью, а также определять сроки вакцинации с учетом уровня материнских антител. Эффективная отечественная вакцина против штаммов vvIBDV недавно разработана во Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте птицеводства (ВНИВИП, г. Ломоносов).

Распространение вируса IBDV в популяциях диких птиц изучено крайне слабо. Антитела к вирусу IBDV первого и второго типа нередко находят у диких птиц, а также у домашних птиц, содержащихся на открытом выгуле.

Существует две основные версии происхождения штаммов vvIBDV. Согласно одной из них, природным резервуаром являются дикие птицы, и вспышки заболевания на птицефабриках возникают в результате заноса вируса извне. Эта версия не получила подтверждения; все случаи выделения от диких птиц патогенных для

цыплят штаммов вируса IBDV приурочены к птицефабрикам. Дикие птицы, например вороны и сороки, могут быть разносчиками инфекции, но не ее первичным хозяином.

Альтернативная, более популярная версия состоит в том, что штаммы vvIBDV, как и возбудители других инфекций, появляются именно на птицефабриках, где птицы содержатся в тесноте на фоне других факторов, способствующих проникновению вирусов в жизненно важные органы. Одним из таких факторов служит применение антибиотиков в виде аэрозолей с добавлением диметилсульфоксида, увеличивающего проницаемость клеток эпителия. Поскольку в настоящее время отказаться от использования антибиотиков на птицефабриках невозможно, Международная ассоциация птицеводства (англ. Poultry Science Association) выступает за ограниченное и сбалансированное их применение.

Аналогичная ситуация сложилась при изучении распространения бирнавирусов рыб. Вспышки заболевания, вызванного вирусом INPV, регулярно отмечались в рыбоводческих хозяйствах основных производителей лосося — Великобритании, Норвегии и Чили. Первоисточником вируса IPNV (начало 1960-х годов) могли быть корма на основе фарша из отходов рыбного промысла, поскольку скрининг в природных популяциях разных видов промысловых рыб выявил наличие бирнавирусов только вблизи рыбоводческих хозяйств.

Бирнавирусы относительно резистентны к повреждающим внешним воздействиям и могут сохранять инфекционную активность при 0–10°C в течение нескольких недель. Патогенные штаммы вируса IPNV распространяются между хозяйствами через торговый обмен икрой и мальками. Носителями вируса могут быть и переболевшие взрослые особи, у которых инфекция перешла в хроническую форму. В природе разносчиками вируса, видимо, служат ракообразные, а также морские птицы, поедающие зараженную рыбу.

6.6.3.2. Семейство *Reoviridae*

Конкретизирующая часть «***Reo***» в названии данного семейства происходит от начальных букв английского словосочетания ***respiratory/enteric/orphan***. Дело в том, что в 1960-е годы была описана группа морфологически сходных вирусов, некоторых из которых выделяли от больных с респираторной (англ. respiratory virus) или кишечной симптоматикой (англ. enteric virus); однако большинство из них не ассоциировались с каким-либо заболеванием (англ. orphan virus — «вирус-сирота»). Впоследствии многие из них были идентифицированы как этиологические агенты тех или иных болезней, однако первоначальное название семейства сохранилось.

Безоболочные вирионы реовирусов имеют диаметр 60–95 нм и содержат 9–12 сегментов генома, размер которого лежит в пределах от 15 до 28 тыс. п.н.

Структура семейства. В состав семейства *Reoviridae* входят два подсемейства — *Sedoreovirineae* (от лат. sedes — основание; *реовирусы с гладкой поверхностью капсида*) и *Spinareovirineae* (от лат. spina — шип; *реовирусы с выступами на вершинах капсида*).

Представители 15 родов реовирусов инфицируют протистов (см. главу 4) и растения (см. главу 5), а также беспозвоночных и позвоночных животных.

Подсемейство *Spinareovirineae* состоит из родов *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus* и *Seadornavirus*.

Род Cardoreovirus (от лат. **car**cinus — краб и **do**deca — двенадцать; *геном состоит из 12 сегментов*). К нему относится вирус китайского мохноногого краба *Eriocheis sinensis* — инвазивного вида, проникшего, в частности, в моря России.

Род Mimoreovirus (от названия хозяина, одноклеточной водоросли ***Micromonas pusilla***). Геном миореовирусов состоит из 11 сегментов.

Род Orbivirus (от лат. orbis — обод колеса; *капсомеры имеют форму пончика*). Геном орбивирусов состоит из 10 сегментов. Представители этого рода — *Bluetongue virus*, вызывающий системное заболевание овец, и *African horses sickness virus* — вирус африканской чумы лошадей. Они передаются комарами-мокрецами из рода *Culicoides* и других родов. В середине 2000 г. оба вируса проникли в страны Европейского содружества, а также в Россию.

Род Rotavirus (от лат. rota — колесо; *вирион в форме колеса с широкой ступицей*). Геном ротавирусов состоит из 11 сегментов. Представители этого рода — *Avian rotavirus*, *Bovine rotavirus*, *Human rotavirus* и др. вызывают широко распространенные кишечные инфекции птиц и млекопитающих.

Род Seadornavirus (от англ. **S**outh **E**astern **A**sia, **do**deca **RNA**; *распространенные в Юго-Восточной Азии вирусы с геномом из 12 сегментов*). Представитель этого рода — *Banna virus* был выделен в Китае от энцефалитных больных; передается москитами.

В свою очередь, подсемейство *Spinareovirineae* состоит из родов *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Idnoreovirus* и *Orthreovirus*.

Род Aquareovirus (от лат. aqua — вода; *вызывают заболевания рыб*). Геном аквареовирусов состоит из 11 сегментов. Представитель этого рода — *Grass carp hemorrhagic virus* наносит значительный ущерб разведению белого амура *Ctenopharyngodon idella*.

Род Coltivirus (от типового вида ***Colorado tick fever virus***). Геном кольтивирусов состоит из 12 сегментов. Эти вирусы распространены в горных районах США и передаются клещами; они вызывают у человека лихорадку, инфицируя эритробласты.

Род Cypovirus (от сокр. англ. **cy**toplasmic **po**lyhedrosis virus). Геном циповирусов состоит из 10 сегментов. Хозяевами этих вирусов служат насекомые; типовой вид — *Bombyx mori cypovirus* заражает гусениц тутового шелкопряда.

Род Dinovernavirus (от сокр. англ. **d**ouble stranded, **i**nsect, сокр. лат. **nove**m — девять и сокр. англ. **RNA**). Геном диновернавирусов состоит из 9 сегментов (у остальных представителей сем. *Reoviridae* их 10–12). К этому роду принадлежат вирусы москитов; типовой вид — *Aedes pseudoscutellaris reovirus*.

Род Idnoreovirus (от сокр. англ. **i**nsect **d**erived **n**on-**o**ccluded — безоболочный вирус насекомых). Геном идноореовирусов состоит из 10 сегментов. Типовой вид, *Diadromus pulchellus reovirus*, подавляет иммунную систему гусениц луковичной моли, на которых паразитирует перепончатокрылое-наездник.

Род Orthoreovirus (греч. ortho — прямой; *собственно реовирусы*). Для вирусологов реовирусы в первую очередь ассоциируются с представителями именно данного рода. Геном ортореовирусов состоит из 10 сегментов. Это обширная группа вирусов, которые поражают рептилий, птиц и млекопитающих. Инфекция обычно протекает субклинически (т.е. это типичные «вирусы-сироты»), однако иногда она сопро-

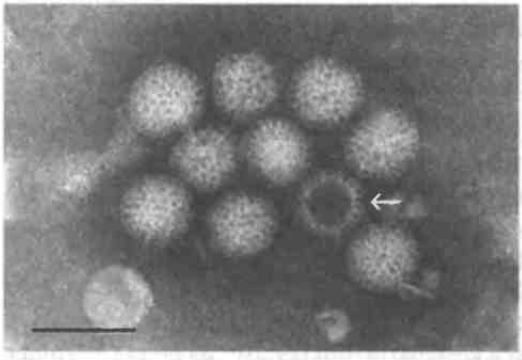


Рис. 92. Вирионы ротавируса в фекалиях ребенка, больного острым гастроэнтеритом (фотография получена А. К. Сироткиным).

Негативно контрастированный препарат (масштаб — 100 нм), стрелкой отмечена частица с проникшим внутрь нее контрастирующим веществом.

вождается осложнениями. Типовой вид — *Avian orthoreovirus* вызывает у цыплят воспаление суставов (англ. viral arthritis/tenosynovitis).

Ротавирусы. Особенности представителей семейства *Reoviridae* мы рассмотрим на примере ротавирусов группы А человека (*Human rotavirus A*).

Ротавирусная инфекция — одна из самых распространенных кишечных инфекций; ей в основном подвержены дети в возрасте до 7 лет (рис. 92). Например, в С.-Петербурге ротавирусов выявляют в среднем у 50% детей, госпитализированных с признаками острой кишечной инфекции (у 70–80% — в зимне-весеннее время). Заболевание протекает крайне тяжело, с высокой температурой и признаками интоксикации (диарея, рвота); по всему миру от ротавирусной инфекции ежегодно умирает до 650 тыс. детей. При излечении от ротавирусной инфекции приобретается стойкий иммунитет; с 2006 г. в экономически развитых странах проводится противоротавирусная вакцинация.

Строение вириона. Устройство частиц ротавируса человека (рис. 93) детально изучено с помощью криоэлектронной микроскопии. Структурные белки ротавирусов обозначаются, как VP1–VP7, неструктурные — как NSP1–NSP5.

Капсид ротавируса представляет собой икосаэдр (T=13) из трех концентрических белковых слоев. Внешний белковый слой зрелого капсида состоит из 780 молекул гликопротеина VP7 и 60 шипов, образованных димерами рецепторного белка VP4. В процессе созревания вириона белок VP4 разрезается на два фрагмента — VP8* (28 кДа) и VP5* (60 кДа); белок VP8* образует дистальный глобулярный домен шипа, а белок VP5* связывает его с промежуточным капсидом. Промежуточный икосаэдрический (T=13) белковый слой капсида состоит из 260 тримеров белка VP6. Внутренний икосаэдрический (T=1) белковый слой капсида образован 60 димерами белка VP2.

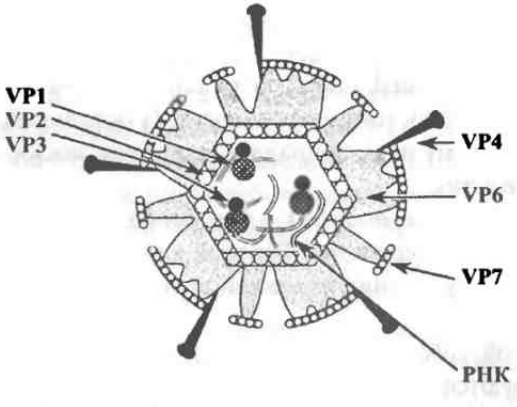


Рис. 93. Схема вириона ротавируса (по: Kapikian, 2004).

Объяснение в тексте и табл. 22.

В трехслойный белковый капсид заключен кор вирусной частицы — 11 сегментов генома, 11 молекул белка VP1 (РНК-зависимой РНК-полимеразы) и 11 молекул белка VP3 (гуанилилтрансферазы).

Характерной особенностью вириона ротавирусов служат каналы, пронизывающие все слои капсида. Они открываются на 11 вершинах икосаэдра и служат для экспорта вирусных мРНК в цитоплазму. Поскольку число сегментов генома на один меньше, чем число вершин, предполагают, что 12-я вершина отличается по строению от остальных. В дополнение к вершинным каналам на гранях икосаэдра расположено 120 каналов, которые служат для импорта метаболитов, необходимых для синтеза мРНК.

Сегменты генома уложены внутри капсида в компактные структуры в форме конусовидных спиралей, закрученных вокруг белков VP1 и VP3 транскриптазного комплекса.

Организация генома и функции вирусных белков. Сегменты генома ротавирусов (~15 тыс. п.н.) можно фракционировать с помощью электрофореза в полиакриламидном геле; в свое время этот метод широко использовался для так называемых «форетипирования». Их принято обозначать в порядке убывания молекулярной массы; каждый сегмент кодирует по одному белку, за исключением 11-го, кодирующего белки NSP5 и NSP6 (табл. 22).

Бросается в глаза то, что в геноме ротавируса закодировано много неструктурных белков, принимающих участие в регуляции трансляции, упаковке генома и морфогенезе вирусных частиц.

Цикл репродукции, рецепторы и клеточный тропизм. Ротавирусы заражают эпителиальные клетки тонкой кишки на верхушках ворсинок. За прикрепление от-

Таблица 22. **Сегменты генома ротавирусов группы А человека и функции кодируемых ими белков**

Сегмент генома	Белок	Функции белка
1	VP1 (125 кДа)	РНК-зависимая РНК-полимераза
2	VP2 (102 кДа)	Формирует внутренний слой капсида; входит в состав полимеразного комплекса
3	VP3 (98 кДа)	Гуанилилтрансфераза
4	VP4 (87 кДа)	Образует шипы на поверхности капсида; обеспечивает слияние с клеточной мембраной; определяет Р-серотип ротавируса
5	NSP1 (58 кДа)	Связывается с 5′-концами вирусных мРНК; регулирует трансляцию; подавляет иммунный ответ хозяина
6	VP6 (44,8 кДа)	Формирует промежуточный слой капсида; служит ловушкой метаболитов для синтеза мРНК; определяет антигенную подгруппу ротавирусов (A, B, C и т. д.)
7	NSP3 (34,6 кДа)	Связывается с 3′-концами вирусных мРНК, защищая их от расщепления
8	NSP2 (36,7 кДа)	Участвует в репликации и упаковке геномной dsРНК; обладает ssРНК-связывающей активностью
9	VP7 (37 кДа)	Формирует наружный слой капсида; определяет G-серотип ротавируса
10	NSP4 (20,3 кДа)	Участвует в морфогенезе вирусных частиц; играет важную роль в патогенезе ротавирусной инфекции (энтеротоксин)
11	NSP5 (21,7 кДа)	В форме димера принимает участие в репликации и упаковке геномной dsРНК; обладает ssРНК- и dsРНК-связывающей активностью
	NSP6 (11 кДа)	Регулирует активность белка NSP5, способствуя его димеризации

вечают белки VP4 и VP7 наружного слоя капсида. Проникновение осуществляется в несколько стадий, на которых вирусные белки взаимодействуют с разными молекулярными компонентами клеточной мембраны. Сначала глобулярный домен гликопротеина VP4 (VP8*) связывается с остатками сиаловых кислот, что вызывает изменение его конформации. В результате этого проксимальный домен VP5* получает возможность связаться с рецепторами-интегринами $\alpha_2\beta_1$ и корецептором — белком теплового шока hsp70. Второй вирусный гликопротеин (VP7) взаимодействует с интегринами $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_x\beta_2$.

Ротавирус обладает свойством, отсутствующим у других безоболочных вирусов, — он проникает в клетку с помощью механизма, аналогичного слиянию мембран (англ. membrane fusion). Гидрофобный участок белка VP4 внедряется в raft-микродомен билипидного слоя (см. раздел 6.6.5.1), после чего состоящий из белков VP4 и VP6 наружный слой капсида сбрасывается, и вирусная частица с двухслойным капсидом попадает в цитоплазму.

Как уже подчеркивалось, ротавирус раздевается не полностью, и транскрипция происходит внутри двухслойного капсида. В данном случае РНК-полимеразы в составе разных частиц функционируют независимо друг от друга, поэтому мРНК синтезируются не в эквимолекулярном соотношении.

Кэпирование ротавирусных мРНК осуществляет гуанилилтрансфераза (белок VP3), молекулы которой расположены под вершинами внутреннего слоя капсида. У представителей подсемейства *Spinareovirineae* за кэпирование отвечает белок, образующий выступы на вершинах внутреннего слоя капсида. Ротавирусные мРНК не имеют на 3′-концах полиА-последовательность, необходимую для их защиты от разрушения и для эффективной трансляции; эту функцию выполняют нетранслируемые участки на 3′-конце мРНК, а также белок NSP3, взаимодействующий с клеточным фактором инициации трансляции eIF-4G. Кэпированные вирусные мРНК выходят из капсида через каналы на вершинах икосаэдра и транслируются в цитоплазме.

Ротавирусные белки накапливаются в виоплазме — компартменте, лишенном мембраны; его образование контролируется белками NSP2 и NSP5. В виоплазме образуются репликативные интермедиаты, состоящие из мРНК и белков кора (VP1, VP2 и VP3), с помощью которых на мРНК-матрице синтезируется минус-нить РНК.

Репликация осуществляется одновременно и строго согласованно всеми 11-ю полимеразными комплексами, в результате чего образуются геномные сегменты dsРНК. Они одеваются белком VP6, превращаясь в частицы с двухслойным капсидом, готовые приступить к новому раунду репликации или послужить основой для образования зрелых инфекционно-активных вирионов. Во втором случае незрелые вирионы транспортируются к мембранам эндоплазматического ретикулума, где они приобретают промежуточную липидную оболочку с включенным в нее белком NSP4, а затем теряют ее и покрываются наружным белковым слоем капсида, состоящим из белков VP4 и VP7. Инфекционные частицы выходят из клетки либо в результате лизиса, либо путем экзоцитоза, минуя аппарат Гольджи. Размножение ротавируса в клетках занимает не более 10–12 ч.

Избегание иммунного ответа. Для эффективной репродукции любого вируса животных необходимо, чтобы инфекция как можно дольше «не замечалась» иммун-

ной системой хозяина. Представители семейства *Reoviridae*, в частности ротавирусы, достигают этого с помощью нескольких механизмов.

Во-первых, вирусный геном никогда не презентируется в цитоплазме; следовательно, не активируется синтез интерферонов I типа через сигнальные пути, включающие в себя рецептор TLR3 и протеинкиназу PKR (см. раздел 1.7.5). Во-вторых, неструктурные вирусные белки эффективно подавляют сигналинг. У ротавирусов эту функцию выполняет белок NS1, стимулирующий деградацию транскрипционных факторов IRF3, IRF5 и IRF7 (см. раздел 1.7.5) в протеасомах. Вероятно, это происходит через этап убиквитирования (*получение белком «черной метки» для протеолитической деградации; как правило, осуществляется путем убиквитирования, т. е. АТФ-зависимого ковалентного связывания с цитозольным белком убиквитином (англ. ubiquitin, Ub) молекулярной массой 8,6 кДа*). Предполагается, что регуляторную активность белка NS1 определяет его С-концевой участок, содержащий домен «цинковых пальцев» (англ. zink-finger motif).

Подавление индукции интерферонов на ранней стадии инфекции позволяет накопить достаточно ротавирусных белков, чтобы начали действовать вторичные механизмы угнетения иммунной системы. В частности, белок NSP4 как энтеротоксин стимулирует накопление в энтероцитах катионов Ca^{2+}, что приводит к потере воды и катионов Na^{+}. На уровне организма этот эффект проявляется в потере жидкости и электролитов, развитии диареи и ослаблении всасывания питательных субстратов в кишечнике.

Массивная интоксикация в целом негативно сказывается на способности иммунной системы противостоять инфекции. Реакция организма на интоксикацию выражается, в частности, в повышении температуры и усилении образования белка hsp70, являющегося корецептором для ротавируса.

Таким образом, на ранней стадии инфекции вирус расширяет свою нишу в организме. Кроме того, в результате воздействия белка NSP4 на энтероциты разрушаются плотные контакты (англ. tight junction) и повышается доступ к интегринам, которые служат рецепторами. Усиленное образование клеточных рецепторов, используемых для проникновения ротавируса, наблюдается и при других вирусных заболеваниях, например, при инфекции энтеровирусом *Enterovirus* 71 (сем. *Picornaviridae*).

Антигенная вариабельность и иммунитет. Антигенные свойства ротавирусов определяются белками наружного и промежуточного слоев капсида (VP4, VP6 и VP7).

Наиболее вариабелен белок VP4 (белок шипа), определяющий так называемый P-серотип (сокр. от англ. protein). Второй антигенной детерминантой служит белок VP7; он определяет G-серотип (сокр. от англ. glycoprotein). Белок промежуточного слоя капсида (VP6), определяющий антигенную подгруппу ротавирусов (A, B, C и т. д.), — наиболее консервативный из всех трех белков.

Для человека наибольшее значение имеют ротавирусы группы A (более 98% случаев заболевания). Антигенные варианты ротавирусов группы A принято обозначать как G1[P1], G3[P3], G6[P8] и т. д., в зависимости от сочетания поверхностных белков VP4 и VP7. Как правило, в эпидемический сезон одновременно циркулирует несколько подтипов ротавируса.

В основе антигенной изменчивости ротавирусов могут быть мутации (из-за ошибок РНК-полимеразы), РНК-рекомбинация, а также реассортация (т. е. взаимный обмен между сегментами генома). Отмечено, что полимеразы ротавирусов совершают меньше ошибок, чем полимеразы других РНК-содержащих вирусов. Вероятно, это обусловлено устройством вирусных частиц, представляющих собой сложный репликативный комплекс, в составе которого полимеразы действуют согласованно.

Главным механизмом изменчивости ротавирусов, по-видимому, служит реассортация. Она возможна не только между ротавирусами человека, но и между вирусами человека и других млекопитающих. В данном отношении ротавирусная инфекция напоминает гриппозную, однако между ними имеются существенные различия.

Во-первых, для человека основным источником новых вариантов ротавирусов служат не птицы, а свиньи. Во-вторых, ротавирусная инфекция вызывает стойкий иммунитет (несмотря на антигенную вариабельность поверхностных белков и гетерогенность популяции циркулирующих штаммов).

Как и при многих других вирусных инфекциях, гуморальный (связанный с образованием антител) ответ на ротавирусную инфекцию начинает развиваться с первых дней заболевания. Сперва в крови появляются антитела класса IgM, затем их титр увеличивается и достигает максимума через 3–4 недели с момента заражения, после чего он снижается. В начале второй недели появляются антитела класса IgG, их титр достигает максимума к концу месяца, после чего они продолжают вырабатываться в течение нескольких лет. Уникальность ротавирусной инфекции состоит в том, что основную роль в защите макроорганизма от заболевания играют IgA, причем важнейшими из них являются антитела к белку промежуточного капсида VP6.

В составе зрелых частиц белок VP6 недоступен для антител. Как же в таком случае они выполняют свою защитную функцию? Оказалось, что IgA проникают в инфицированные клетки и присоединяются к частицам с двухслойным капсидом (т. е. к репликативным интермедиатам). Исследования, выполненные с помощью метода криоэлектронной микроскопии, показали, что молекулы IgA блокируют каналы для выхода мРНК в цитоплазму, а также каналы, служащие ловушками для метаболитов. Поэтому благодаря антителам репродукция ротавируса тормозится на стадии транскрипции.

По современным представлениям на протяжении жизни особи иммунологическая память поддерживается не только длительным существованием клонов Т- и В-лимфоцитов, но и благодаря постоянному «напоминанию», т. е. присутствием антигена в организме и/или повторным инфекциям, протекающим субклинически. На примере ротавирусной инфекции впервые установлено, что с возрастом из-за «напоминания» иммунная система постоянно настраивается, обеспечивая все более эффективную защиту от заболевания; кроме того, были раскрыты механизмы такой настройки. В опытах на лабораторных животных было показано, что при повторном инфицировании одним и тем же штаммом ротавируса иммунный ответ расширяется, т. е. обеспечивается защита против инфицирования гетерологичными штаммами. Оказалось, что при повторном инфицировании в спектре антител возрастает доля IgA, направленных к консервативному ротавирусному белку VP6. Наконец, с возрастом происходит селекция тех клонов В-лимфоцитов, которые синтезируют антитела,

наиболее эффективно блокирующие каналы на поверхности репликативных интермедиатов.

Исследование ротавирусов, важнейших представителей семейства *Reoviridae*, внесло значительный вклад в вирусологию. На этих объектах были изучены такие фундаментальные явления, как уклонение dsРНК-вирусов от иммунного ответа, раскрыт механизм внутриклеточной нейтрализации вирусов антителами и показана тонкая возрастная настройка иммунной системы млекопитающих.

Перспективы исследований dsРНК-содержащих вирусов связаны с разработкой систем клонирования сегментированных dsРНК-геномов с помощью методов «обратной» генетики.

6.6.4. ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ ssРНК(+) И НЕ ИМЕЮЩИЕ СТАДИЮ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Геномная ssРНК(+) инфекционна — после проникновения в клетку она выполняет роль мРНК, которая транслируется с образованием структурных и неструктурных вирусных белков. Выделив геномную ssРНК(+) и обеспечив ее проникновение в клетки-мишени, например с помощью электропорации, можно получить полноценное вирусное потомство.

Репликаза этих вирусов, РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRP), не является структурным белком вириона, т. е. она не входит в его состав, хотя кодируется вирусным геномом и не относится к ранним вирусным белкам. Этим ssРНК(+)-вирусы отличаются от прочих РНК-содержащих вирусов — dsРНК-вирусов и ssРНК(+)-вирусов со стадией обратной транскрипции, а также от ssРНК(–)-вирусов, которые содержат этот фермент в составе вириона.

Все известные ssРНК(+)-вирусы размножаются в цитоплазме; исходная геномная РНК, репликативные интермедиаты и геномные РНК вирусного потомства не покидают ее пределы. Для сравнения, некоторые ssРНК(–)-вирусы, например вирусы гриппа и вирус болезни Борна, реплицируются в ядре. RdRP у ssRNA(+)-вирусов, как правило, взаимодействует с внутренними мембранами, в частности с мембранами модифицированных лизосом, мембранами гладкого эндоплазматического ретикулума или мембранами митохондрий.

Размножение в цитоплазме и неспособность интегрировать свой геном в геном клетки-хозяина не мешает некоторым из этих вирусов осуществлять персистентную, часто пожизненную инфекцию (примерами служат вирус гепатита С и другие представители сем. *Flaviviridae*).

Вирусы, содержащие ssРНК(+), обычно чувствительны к интерферонам I типа (IFN-α и IFN-β), а также к индукторам интерферонов. Это свойство используется при лечении вызываемых ими заболеваний. Исключение составляют персистентные инфекции, с которыми можно бороться при помощи интерферонов, однако такое лечение требует индивидуального подхода, поскольку может обострить болезнь или стимулировать автоиммунные процессы.

Размер генома ssРНК(+)-вирусов в среднем составляет 7–10 тыс. н. (крайние значения 6–30 тыс. н.). Максимальный размер генома в этой группе (30 тыс. н.) имеют ко-

ронавирусы. В соответствии с небольшим размером генома диаметр вирусных частиц также невелик и составляет от 30 нм у безоболочных пикорнавирусов до 100–150 нм у оболочных коронавирусов.

Вирусы, содержащие ssРНК(+), широко распространены, причем некоторые из них способны размножаться в клетках разных хозяев — насекомых, птиц и грызунов. В сектор диаграммы Virosphere-2005, отведенный ssРНК(+)-вирусам, попадает основная часть «арбовирусов», представители которых вызывают москитные лихорадки, клещевой энцефалит, восточный и западный энцефалит лошадей, венесуэльский энцефалит и т. д. Зависимость от одних и тех же клеточных ферментов наряду со способностью инфицировать разных хозяев отражаются на составе семейств из двух подсекторов ssРНК(+)-вирусов, подсекторе вирусов позвоночных и подсекторе вирусов беспозвоночных — в них присутствует несколько семейств с одними и теми же названиями (*Flaviviridae*, *Nodaviridae*, *Picornaviridae* и *Togaviridae*).

К сектору ssRNA(+) принадлежит большинство вирусов, вызывающих гепатиты у человека. Это вирусы гепатита А (сем. *Picornaviridae*), гепатита С (сем. *Flaviviridae*) и гепатита Е (сем. *Hepeviridae*).

Знакомство с ssРНК(+)-вирусами целесообразно начать с проще устроенных безоболочных представителей, геномная РНК которых заключена в белковый капсид. Из-за отсутствия липидов их вирионы не повреждаются органическими растворителями и детергентами. Капсиды таких вирусов образованы либо одним белком, либо несколькими разными белками (чаще всего тремя или четырьмя). Все безоболочные ssРНК(+)-вирусы животных проникают в клетки хозяина путем эндоцитоза. При закислении полости фаголизосомы капсид изменяет свою конформацию и приоткрывается, в результате чего геномная РНК переходит в цитоплазму.

Безоболочные виды ssРНК(+)-вирусов животных относятся к семействам *Astroviridae*, *Caliciviridae* и *Nodaviridae*.

Одним из первых хорошо изученных ssРНК(+)-вирусов стал вирус полиомиелита (род *Poliovirus*). Вирусов млекопитающих, сходных с ним по строению, в 1970-е годы объединили в семейство *Picornaviridae*. Позднее в него был включен ряд вирусов членистоногих и птиц. Однако, как показывают результаты молекулярно-генетического анализа, это семейство неоднородно. Особенности организации генома и цикла репродукции послужили основанием для того, чтобы выделить из него вирусов членистоногих в семейства *Dicistroviridae* и *Iflaviridae*.

В 2008 г. на основе семейства *Picornaviridae* был образован порядок *Picornavirales*. В него вошло восемь семейств — *Bacillariornaviridae* (вирусы фитопланктона), *Caliciviridae* (вирусы млекопитающих), *Dicistroviridae* (вирусы членистоногих), *Iflaviridae* (вирусы членистоногих), *Labyrnaviridae* (вирусы протистов), *Marnaviridae* (вирусы протистов-паразитов рыб), *Picornaviridae* (вирусы млекопитающих и птиц) и *Secoviridae* (вирусы растений).

Ниже рассматриваются три из восьми семейств порядка *Picornavirales* (*Caliciviridae*, *Dicistroviridae* и *Picornaviridae*), а также не входящее в этот порядок семейство *Nodaviridae*.

6.6.4.1. Семейство *Caliciviridae*

Первым в этом семействе был открыт возбудитель везикулярной экзантемы — некогда загадочного заболевания, поразившего в 1932 г. поголовье свиней на животноводческих фермах США и Канады. Вторая его волна пришлась на 1950-е годы, после чего оно не возобновлялось. При электронно-микроскопическом исследовании законсервированных образцов инфекционного материала оказалось, что находящиеся в нем вирусные частицы имеют нетривиальную морфологию: в главной проекции они похожи на 6-лучевую звезду с чашеобразными поверхностными углублениями. На этом основании данные вирусы были названы калицивирусами (от лат. calyx — чаша).

В 1976 г. сначала в Великобритании, а затем и в других странах в фекалиях детей, больных острым гастроэнтеритом, были обнаружены вирионы вышеописанной морфологии. Позднее методами молекулярной диагностики было выяснено, что ряд заболеваний человека и животных вызываются вирусами, которые морфологически отличаются от «классических» калицивирусов, однако сходны с ними по структуре генома. По совокупности указанных морфологических и генотипических критериев Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) предложил объединить всех этих агентов в семейство *Caliciviridae*.

Структура семейства. Семейство *Caliciviridae* содержит четыре основных рода: *Lagovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* и *Vesivirus*.

Род Lagovirus. К этому роду принадлежат вирусы, заражающие кроликов и зайцев (отряд Lagomorpha). Самый известный из них — возбудитель геморрагической болезни кроликов (*Rabbit hemorrhagic disease virus*) и калицивирус европейского зайца-русака (*European brown hare syndrome virus*).

Род Norovirus. Типовой вид — вирус Норуолк (*Norwalk virus*), обозначен по месту регистрации в 1968 г. массового кишечного заболевания в США. В настоящее время установлено, что норовирусы служат главной причиной эпидемий инфекционного гастроэнтерита среди взрослого населения экономически развитых стран. Помимо норовирусов человека существуют норовирусы коров и свиней.

Род Sapovirus. Название рода производится от типового вида — вируса Саппоро (*Sapporo virus*), впервые выделенного в г. Саппоро (о-в Хоккайдо, Япония). Подобно норовирусам, саповирусы являются возбудителями острых кишечных заболеваний, однако поражают преимущественно не взрослых, а детей. В наибольшей степени от саповирусных инфекций страдает население Японии. Частицы саповирусов морфологически сходны с вирионами вируса везикулярной экзантемы свиней (см. ниже).

Род Vesivirus. К этому роду принадлежат: вирус везикулярной экзантемы свиней (*Vesicular exanthema of swine virus*); калицивирусы морских млекопитающих, в частности морских львов (*San Miguel sea lion virus*) и моржей (*Walrus calicivirus*); калицивирус кошек (*Feline calicivirus*).

Изучение калицивирусов затрудняет то, что их редко удается культивировать in vitro, и только калицивирус кошек способен размножаться в клеточной культуре. Отсутствуют и удобные модели инфекции; до сих пор не подобран хозяин, на котором можно было бы размножать инфекционные частицы калицивирусов (хотя недавно

обнаружен норовирус мышей, вызывающий заболевание только у животных с нокаутированным геном интерферона). Сведения о цикле репродукции большинства калицивирусов, а также о строении их частиц получены с помощью генноинженерных методов (в частности, имеются 3D-изображения на основе компьютерной обработки микрофотографий рекомбинантных частиц, не содержащих РНК).

Строение вирионов. На негативно контрастированных препаратах вирионы калицивирусов выглядят, как округлые частицы диаметром 28–40 нм, поверхность которых усеяна невысокими выступами (рис. 94); форма и взаимное расположение последних варьируют у разных представителей семейства. В некоторых случаях частицы калицивирусов по виду напоминают «звезду Давида».

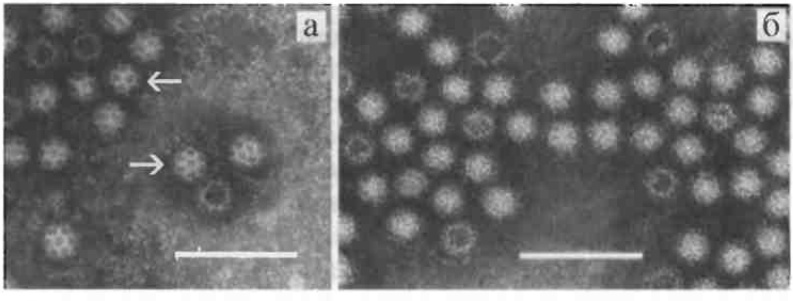


Рис. 94. Вирионы калицивирусов SaV (а) и NoV (б) (фотографии получены А. К. Сироткиным).

Негативно контрастированные препараты (масштаб — 100 нм), стрелки — по-разному ориентированные частицы.

Частицы калицивирусов устроены довольно просто: капсид состоит из единственного структурного белка VP1, консервативные внутренние домены которого ответственны за самосборку, а вариабельные наружные домены связываются с клеточными рецепторами. Частицы калицивирусов дополнительно содержат 2–3 копии белка VP2, необходимого для стабилизации капсида и упаковки РНК.

Вирионы норовирусов изучены лучше других. Методом криоэлектронной микроскопии показано, что белок VP1 образует миниатюрные поверхностные «арки» (рис. 95). Отличительной чертой калицивирусов служит то, что в состав вириона входят две молекулы РНК (помимо геномной РНК в капсид упаковывается молекула субгеномной РНК, в которой закодированы белки капсида).

Строение генома. Калицивирусы содержат несегментированную ssРНК(+) размером около 7,5 тыс. н. На 5′-конце находится короткий нетранслируемый участок с ковалентно присоединенным белком VPg (см. раздел 5.5.3). К нему примыкает рамка считывания ORF1, кодирующая неструктурные белки (в том числе геликазу, протеазу и РНК-зависимую РНК-полимеразу). За генами неструктурных белков следуют гены структурных белков капсида. У норовирусов и везивирусов белки капсида кодируются отдельными рамками считывания (ORF2 и ORF3). У лаговирусов и саповирусов главный белок капсида VP1 образуется путем расщепления полипротеина, зако-

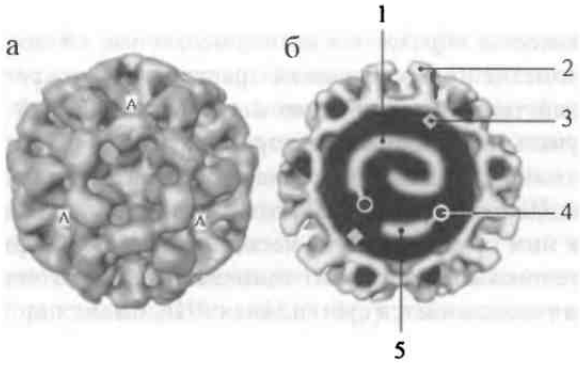


Рис. 95. Схема вириона норовируса, реконструированная на основе данных криоэлектронной микроскопии (по: Hardy, 2005). Внешний вид (а) и разрез (б).

А — арка.

1 — геномная РНК; 2 — белок VP1; 3 — белок VP2; 4 — белок VPg; 5 — субгеномная РНК (sgPHK).

дированного в первой рамке считывания (ORF1), а минорный белок VP2 кодируется отдельной рамкой считывания (ORF2). За генами капсида расположен небольшой нетранслируемый участок.

У калицивирусов 3′-конец геномной РНК полиаденилирован; субгеномная РНК содержит на 5′-конце белок VPg и полиА-последовательность на 3′-конце (рис. 96).

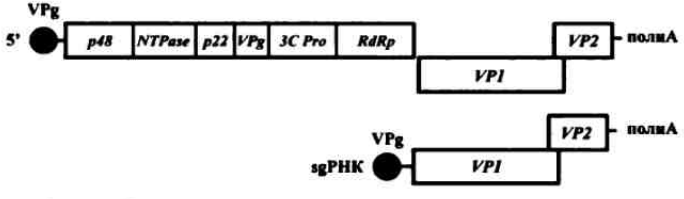


Рис. 96. Геном норовируса.

sgRNA — субгеномная РНК; *NTPase* — ген нуклеозидтрифофатазы; *p22* и *p48* — гены неструктурных белков; *3CPro* — ген протеазы; *RdRp* — ген РНК-зависимой РНК-полимеразы; *VP1* и *VP2* — гены белков капсида; VPg — РНК-связывающий белок на 5′-концах геномной и субгеномной РНК.

Темные кружки — белок VPg.

Цикл репродукции. Онтогенез калицивирусов в общих чертах сходен с онтогенезом пикорнавирусов (см. ниже). Вирусные частицы проникают в клетки путем эндоцитоза; в результате снижения pH внутри эндосомы в цитоплазму высвобождаются геномная и субгеномная РНК.

На плюс-матрице геномной РНК первоначально образуется полипротеин; затем он фрагментируется на структурные и неструктурные белки (важнейшие из них — вирусоспецифичная протеаза и RdRP). Инициация трансляции калицивирусов слабо изучена; поскольку их геномная РНК не содержит IRES-последовательностей (см. раздел 5.5.3) и некэпирована; роль кэпа, видимо, выполняет белок VPg, который связывается с клеточным фактором инициации трансляции eIF-4E.

Вирусная RdRP синтезирует репликативный интермедиат (минус-матрицу), на которой образуются комплементарные ей молекулы геномной РНК вирусного потомства. Переключение с транскрипции на репликацию происходит путем взаимодействия специфических последовательностей на 5′- и 3′-концах геномной РНК при участии клеточных факторов.

Капсидные белки в основном синтезируются на матрице субгеномной РНК. Капсиды потомства образуются из 180 копий главного белка VP1; в ходе самосборки к ним присоединяется несколько копий минорного белка VP2. Сигналом к упаковке геномной РНК служит связывание с ней «концевого» белка VPg; как синтезируется и упаковывается субгеномная РНК, до сих пор не известно.

Функции неструктурных белков калицивирусов изучены также недостаточно. В то же время на примере норовирусов недавно выяснено, что вследствие образования неструктурного белка p22 деградирует аппарат Гольджи и блокируется секреция клеточных белков.

Норовирусы. Эти вирусы ответственны за 70–95% эпидемий острого гастроэнтерита у взрослого населения экономически развитых стран. По данным одного из авторов учебника (*А. К. Сироткин*), в С.-Петербурге они распространены не меньше, чем в Западной Европе.

Норовирусы передаются в основном фекально-оральным путем и исключительно контагиозны. Источником заражения, помимо больного, могут быть вода и не прошедшие термическую обработку овощи, фрукты, рыбные блюда (особенно суши) и морепродукты, в частности мидии и устрицы. Инкубационный период составляет в среднем 36 ч. Острая фаза заболевания начинается с диареи и повторной рвоты; она продолжается недолго, и через 1–2 сут наступает выздоровление. Стремительное начало и быстрое завершение этой болезни способствуют тому, что она ложно воспринимается как пищевое отравление (в быту ее называют «желудочным гриппом»).

Характерной чертой норовирусов является способность инфицировать преимущественно взрослое население. Дети до одного года переносят норовирусную инфекцию либо бессимптомно, либо очень легко, в то время как у пожилых людей болезнь протекает тяжело, вплоть до летального исхода.

Норовирусная инфекция индуцирует относительно слабый иммунный ответ. В опытах на волонтерах показано, что ~50% переболевших удавалось заразить тем же самым вирусом уже через 6 месяцев после первого инфицирования. Одна из причин столь слабого иммунного ответа, возможно, заключается в быстротечности инфекции (иммунной системе требуется определенное время для отбора клонов В-лимфоцитов, которые синтезируют нейтрализующие антитела).

Патогенез норовирусной инфекции недостаточно изучен из-за отсутствия экспериментальной модели (инфекция воспроизводится только на новорожденных свинохвостых макаках *Macaca nemestrina* и на поросятах, однако эти модели дороги и не совсем адекватны). Анализ биоптатов кишечника, взятых у волонтеров в опытах 1970-х годов, свидетельствует о том, что норовирусы размножаются в двенадцатиперстной кишке и верхнем отделе тонкого кишечника; некоторые исследователи предполагают, что они могут также поражать гепатоциты.

Для норовирусов характерна высокая изменчивость и разнообразие циркулирующих вариантов. В пределах рода выделяют 5 геногрупп, каждая из которых, в свою очередь, включает в себя несколько генотипов. При одновременном заражении разными вариантами вируса (нередкий случай в госпитальных условиях) образуется потомство вируса со смешанным генотипом, в первую очередь за счет РНК-рекомбинации. На основе субгеномной РНК рекомбинантные варианты могут образоваться также путем так называемой псевдореассортации (когда геномная РНК и субгеномная РНК вирусного потомства происходят от разных «родителей»).

Рецепторы к норовирусам мало изучены, хотя известно, что ими могут быть углеводные остатки, определяющие группы крови человека. Норовирусной инфекции в наибольшей степени подвержены люди с группой крови 0, в наименьшей степени — с группой крови B (в системе AB0). С начала 2000-х годов во всем мире наблюдается экспансия норовирусов II геногруппы, 4-го генотипа (*Norovirus* GII. 4). По мнению ряда исследователей, его широкое распространение обусловлено тем, что он лучше других представителей данного рода использует все многообразие человеческих рецепторов, т. е. имеет более широкую нишу в популяции хозяина. Вытеснение прочих вариантов служит тревожным сигналом начала позитивной селекции, которая может привести к появлению высокопатогенных штаммов. Разумеется, пластичность генома необходима, но недостаточна для позитивной селекции; определяющими факторами служат благоприятные условия существования, среди которых можно выделить такие, как увеличение плотности популяции хозяина, ограниченность водных ресурсов и их загрязнение сточными водами. Особую роль в позитивной селекции патогенных норовирусов, по-видимому, играет замкнутость коллективов высоковосприимчивых индивидуумов (примером служат дома престарелых и гериатрические отделения больниц).

Вирус геморрагической болезни кроликов (***Rabbit hemorrhagic disease virus***, RHDV). Повышенный интерес к семейству *Caliciviridae* возник в 1980-е годы в связи с появлением новой высоколетальной инфекции — геморрагической болезни кроликов. Она была впервые зарегистрирована в 1984 г. на фермах Китая (по-видимому, в результате завоза ангорских кроликов из Германии). Установлено, что импортированные животные были носителями непатогенного варианта вируса, на основе которого в местных условиях возник высокопатогенный вариант (скорее всего, произошла рекомбинация между европейскими и азиатскими калицивирусами). Через два года вирус RHDV был занесен в Европу, что вызвало массовый падеж животных.

Болезнь быстро прогрессирует, и большинство особей погибает спустя 24–48 ч с признаками тотального поражения печени и множественными кровоизлияниями во внутренние органы; летальность достигает 100%. Высокой патогенностью вируса RHDV пытались в 1990-х годах воспользоваться для контроля численности австралийских диких кроликов (инфекция преднамеренно распространялась фермерами), но вскоре такая практика была прекращена по настоянию вирусологов, опасавшихся появления нового агента с более широким спектром хозяев.

Характерным свойством вируса RHDV является невосприимчивость к нему молодых животных. Причина этого состоит в специфике экспрессии рецепторов на поверхности клеток респираторного и кишечного эпителия; как уже отмечалось, это

антигены групп крови. У новорожденных особей они отсутствуют и впервые появляются после первого месяца жизни; уровень их экспрессии постепенно возрастает, достигая максимума к году.

Таким образом, калицивирусы человека и калицивирусы кроликов сходны в том, что их природную нишу составляют взрослые особи популяции соответствующих хозяев.

Калицивирусы морских млекопитающих. Некоторые исследователи считают, что основным резервуаром калицивирусных инфекций в природе служат морские млекопитающие — китообразные, моржи и тюлени. При этом, растущая эксплуатация человеком биоресурсов Мирового океана повысила вероятность появления новых калицивирусов в результате рекомбинации между «наземными» и «морскими» вариантами. Поскольку филогенетические исследования показали, что вирус везикулярной экзантемы свиней обладает высоким сходством с калицивирусами морских львов, высказано предположение, что заболевание свиней возникло в результате заноса «морского» вируса с морепродуктами в популяцию другого хозяина. В норме калицивирусы не патогенны для морских животных; один из авторов учебника (*А. К. Сироткин*) неоднократно обнаруживал вирионы калицивирусов в фекалиях здоровых моржей и тюленей.

В целом нужно отметить, что семейство *Caliciviridae* изучено крайне фрагментарно; многие ключевые вопросы ждут ответа. Например, до сих пор неясно, какую роль в распространении калицивирусов играют двустворчатые моллюски — являются ли они механическими их накопителями, или же эти вирусы могут в них размножаться.

6.6.4.2. Семейство *Dicistroviridae*

В 1980-х годах были обнаружены РНК-содержащие вирусы ракообразных и насекомых, сходные с пикорнавирусами млекопитающих. Вначале этих вирусов отнесли к семейству *Picornaviridae*, однако затем выяснилось, что некоторые из них используют уникальную стратегию репликации (см. раздел 5.5.3). Геномная РНК содержит два IRES-элемента, причем один из них расположен на 5′-конце, а другой, IGR IRES (сокр. англ. **i**nter **g**enic **r**epeat) находится в средней части между двумя рамками считывания и обеспечивает трансляцию капсидных белков.

Таким образом, геномная РНК этих вирусов содержит два цистрона (т.е. два независимых участка инициации трансляции). С учетом данного признака было предложено объединить этих вирусов в семейство *Dicistroviridae* (di-cistro-viridae). В настоящее время оно активно изучается и изредка пополняется новыми представителями.

Структура семейства. Многие дицистровирусы были открыты сравнительно недавно, и поэтому систематика этого семейства еще не устоялась. Часть дицистровирусов перемещена в род *Cripavirus*, типовым видом которого служит вирус паралича сверчков (англ. ***Cri**cket **p**aralysis **v**irus*). К этому роду также относятся вирус С дрозофилы (*Drosophila C virus*), вирус смертельного паралича тлей (*Aphid lethal paralysis virus*), кишечный вирус клопа-щитника (*Plautia stali intestine virus*) и ряд других. В то же время такие значимые с экономической точки зрения инфекционные агенты, как вирус острого паралича пчел (*Acute bee paralysis virus*) и поражающий креветок вирус

Таура (*Taura syndrome virus*), до сих пор не классифицированы на уровне рода. Международный комитет по систематике вирусов (ICTV) недавно предложил объединить их в новый род *Aparavirus*.

Строение вириона. Икосаэдрический капсид диаметром 30 нм состоит из белков VP1, VP2, VP3 и VP4; белок VP1 образует пентамеры на вершинах икосаэдра, а белок VP4 расположен внутри капсида и высвобождается при снижении в нем pH. Геномная РНК выходит через портал на вершине икосаэдра.

Строение генома и цикл размножения. Геном дицистровируса не сегментирован и представлен единственной молекулой ssРНК(+). На 5′-конце расположены регуляторный элемент IRES и ковалентно связанный белок VPg.

Геномная РНК дицистровирусов содержит две рамки считывания, разделенные регуляторным элементом IGR IRES (рис. 97, а). Первая из них (ORF1) кодирует полипротеин, расщепляющийся на неструктурные белки, — супрессор антивирусной защиты хозяина (SS), геликазу (Hel), протеазу (Pro) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRP). Кроме того, ORF1 содержит несколько повторов гена белка VPg. Вторая рамка считывания (ORF2), находящаяся под контролем IGR IRES, кодирует полипротеин, который расщепляется на предшественники капсидных белков.

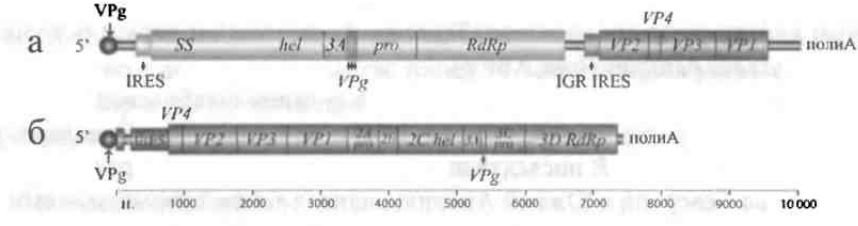


Рис. 97. Геномы дицистровируса (а) и пикорнавируса (б) (по: Bonning, 2010).

Объяснение в тексте.

Регуляторный элемент IGR IRES у дицистровирусов обладает уникальными свойствами. В отличие от других IRES, он непосредственно связывается с рибосомой хозяина и обеспечивает трансляцию downstream-участка РНК в отсутствие клеточных факторов инициации трансляции (eIF).

Регуляторный элемент IGR IRES состоит из двух доменов со специфическими функциями. Первый из их отвечает за сборку 80S-рибосомы из большой и малой субъединиц, а второй (по структуре напоминающий тРНК) стимулирует взаимодействие кодона с антикодоном и обеспечивает неканоническую инициацию трансляции, которая завершается образованием пептидной связи. Поскольку IGR IRES-зависимая трансляция обходится без канонического старт-кодона (AUG) и клеточных факторов, высказано предположение, что этот элемент является «молекулярным ископаемым».

Регуляторный элемент IRES, расположенный на 5′-конце геномной РНК дицистровирусов, отличается по свойствам от IGR IRES и по структуре напоминает аналогичный элемент пикорнавирусов (см. ниже).

Цикл размножения дицистровирусов протекает в цитоплазме. Присутствие двух независимых регуляторных IRES-элементов проявляется в том, что на матрице геномной РНК синтезируются два полипептида, один из которых расщепляется на структурные, а другой — на неструктурные белки.

Подавление антивирусного ответа. Установлено, что вирус паралича сверчков (CrPV) и вирус С дрозофилы (DCV) кодируют белки, вызывающие супрессию антивирусного ответа хозяина (англ. silencing suppressor, SS). У насекомых, как и у растений, ключевую роль в защите хозяина от вирусной инфекции играет индуцированная вирусом РНК-интерференция (см. раздел 1.7).

При размножении дицистровирусов образуются репликативные dsРНК-интермедиаты; с помощью дайсер-фермента (см. раздел 1.7.3) они разрезаются на фрагменты размером ~22 н. Эти продукты являются функциональными аналогами малых интерферирующих РНК — минус-нить вводится в состав хозяйского сайленсинг-комплекса. Он распознает комплементарную этой нити вирусную РНК и разрушает ее.

Механизмы действия супрессорных белков могут различаться; например, у вируса С дрозофилы они связываются с ds-вирусными интермедиатами, препятствуя их узнаванию и расщеплению дайсер-ферментом.

Представители семейства. В семействе *Dicistroviridae* можно особо выделить вируса Таура, инфицирующего креветок (*Taura syndrome virus*), и вируса острого паралича пчел (*Acute bee paralysis virus*, ABPV).

Вирус Таура. Этот вирус получил название в связи с заболеванием креветок, которое впервые было зарегистрировано в 1992 г. на аквафермах Эквадора, расположенных в устье р. Таура. В последующие годы он стремительно распространился вдоль побережья Северной и Южной Америки, нанося значительный экономический ущерб. Позднее он проник в восточное полушарие, где вызвал опустошительные эпизоотии на аквафермах Китая и Таиланда.

Вирус Таура вызывает системное поражение органов промышленно выращиваемых видов креветок — *Penaeus monodon*, *P. vannamei* и др. У зараженного животного под панцирем появляются характерные темные пятна; оно теряет координацию движений и быстро погибает. Особо вирулентные штаммы способны за 3–4 сут полностью погубить популяцию креветок в отгороженной акватории. Вирус характеризуется высокой частотой мутирования и может заражать близкородственные виды хозяина.

Вирус Таура распространяется на большие расстояния морскими птицами, которые питаются креветками, а также с замороженными морепродуктами. Дикие креветки менее чувствительны к нему, чем окультуренные виды; млекопитающим вирус Таура не опасен.

Массовая гибель креветок была отмечена вскоре после начала применения сильнодействующих фунгицидов на банановых плантациях Эквадора. Поскольку эти химикаты смывались дождями в океан и в большом количестве обнаруживались во внутренних органах креветок, их вначале посчитали непосредственной причиной эпизоотии. В дальнейшем была установлена инфекционная природа заболевания, однако не исключено, что присутствие фунгицидов в морской воде могло способство-

вать подавлению иммунной системы креветок и заражению их каким-то дицистровирусом другого вида животных.

Изучение заболевания, вызываемого вирусом Таура, требует строгого соблюдения мер биологической безопасности, поэтому молекулярные механизмы репликации дицистровирусов изучают на модельных объектах, одним из которых является дицистровирус клопа-щитника *Plautia stali* (*Plautia stali intestine virus*), относящийся к роду *Cripavirus*.

Вирус острого паралича пчел *(Acute bee paralysis virus, ABPV).* Эта инфекция является настоящим бичом пчеловодства во всем мире. Исследования показали, что вирус широко распространен в колониях пчел, обнаруживается в кишечнике этих насекомых и в норме непатогенен для своего хозяина. Инфицирование пчел через желудочно-кишечный тракт не вызывает заболевания.

Вспышки острого паралича пчел по времени (1970-е годы) и географии совпали с распространением пчелиного паразита, клещика *Varroa destructor*. Возможно, что именно он сыграл решающую роль в возникновении данного заболевания, занося вируса в гемолимфу насекомого, что способствует его проникновению в обычно недоступные органы и ткани, в том числе в центральную нервную систему. В этом случае инфекция протекает в форме острого паралича и приводит к гибели хозяина. Штаммы вируса, выделенные из нервной ткани погибших пчел, обладают большей патогенностью, чем циркулирующие в кишечнике природные варианты того же самого вируса. Налицо некоторое сходство с полиомиелитом (см. ниже) — острым заболеванием, приводящим к параличу, которое развивается при попадании вируса из кишечника в кровь и далее в центральную нервную систему, где вирус проявляет более высокую патогенность.

6.6.4.3. Семейство *Nodaviridae*

В 1967 г. в селении Нода-мура (уезд Кунохе, префектура Ивате, о-в Хонсю, Япония) от комаров был выделен вирус, получивший название *Nodamura virus*. По морфологии он напоминал пикорнавирусов, однако обладал сегментированным геномом, состоящим из двух молекул РНК. Впоследствии вирусы со сходным строением генома были обнаружены у других насекомых и объединены в семейство *Nodaviridae*. Один из них, *Flock House virus* (по названию Сельскохозяйственной школы Флок Хаус в городке Буллз, район Рангитикей, Новая Зеландия), широко используется в качестве модельного объекта при изучении биологии нодавирусов.

Открытие в 1990-х годах сходных по строению вирусов, заражающих рыб и ракообразных, стало неожиданностью; в настоящее время у большинства вирусологов нодавирусы ассоциируются прежде всего с массовой гибелью промысловых рыб.

Структура семейства. Данное семейство состоит из двух родов — *Alphanodavirus* и *Betanodavirus*.

Род Alphanodavirus. К этому роду принадлежат нодавирусы насекомых, в том числе *Nodamura virus*, способный размножаться в клетках млекопитающих и птиц, а также *Flock House virus*, инфицирующий личинок жука *Costelytra zealandica*. Более или менее безвредный (для человека) вирус *Flock House virus* служит излюбленным модельным объектом вирусологов.

Род Betanodavirus. Этот род включает в себя вирусов, заражающих мальков ряда промысловых рыб, например трески (*Atlantic cod nervous necrosis virus*), палтуса (*Atlantic halibut nodavirus*) и пятнистого групера *Epinephelus tauvina* (*Greasy grouper nervous necrosis virus)* и т. д.

Помимо нодавирусов насекомых и рыб существуют нодавирусы ракообразных, например вирус пресноводной креветки *Macrobrachium rosenbergii.*

Лабораторные исследования патогенных нодавирусов должны проводиться в условиях, исключающих возможность их случайного попадания в окружающую среду.

Строение вириона. Безоболочные частицы нодавирусов имеют диаметр 25–35 нм и представляют собой икосаэдры, образованные 180 копиями белка α, который закодирован в малом сегменте генома (RNA2). В процессе созревания вирионов белок α расщепляется на две субъединицы, каждая из которых остается в составе капсида.

Строение генома. Частицы нодавирусов содержат две молекулы РНК. Более крупная из них, RNA1 (~3,5 тыс. н.), кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRP), или «белок А». Сегмент меньшего размера, RNA2 (~1,5 тыс. н.), кодирует «белок α», служащий предшественником белка капсида. Оба геномных сегмента кэпированы на 5′-конце, но не полиаденилированы. В цикле размножения образуется субгеномная RNA3, соответствующая 3′-концу геномного сегмента RNA1. Она содержит две рамки считывания, которые кодируют неструктурные белки B1 и B2.

Роль белка B1 неизвестна. Что касается белка B2, то у альфа-нодавирусов насекомых он подавляет иммунный ответ хозяина, присоединяясь к dsРНК и блокируя РНК-интерференцию; предполагается, что у бета-нодавирусов рыб он выполняет аналогичную функцию.

Цикл репродукции. Нодавирусы проникают в клетки хозяина путем эндоцитоза и размножаются в цитоплазме.

Геномная РНК транслируется рибосомным аппаратом хозяина, в результате чего образуется РНК-зависимая РНК-полимераза, которая синтезирует репликативный интермедиат — минус-копию генома, служащую матрицей для синтеза геномной нуклеиновой кислоты вирусного потомства.

Так же, как и у других вирусов с ssРНК(+), репликаза функционирует в ассоциации с клеточными мембранами. Уникальной особенностью нодавирусов служит то, что их репликативные комплексы встраиваются в оболочку митохондрии, образуя каналы, по которым геномная РНК вирусного потомства выходит в цитоплазму. Сегменты генома упаковываются по отдельности; субгеномная РНК упаковке не подлежит. Зрелые вирусные частицы образуют в цитоплазме паракристаллические скопления и покидают клетку путем ее лизиса.

Патогенез. Бета-нодавирусы рыб характеризуются ярко выраженной нейротропностью. Они поражают центральную нервную систему, сетчатку и ганглии периферической нервной системы мальков. Патологические изменения характеризуются в первую очередь вакуолизацией нейронов и их быстрой дегенерацией. Внешним признаком инфекции служат гипертрофия глазного яблока и нарушение координации движений — мальки плавают вверх брюхом. Рыбы погибают через 1–2 сут после заражения; летальность достигает 100%.

Механизмы изменчивости. Подобно другим РНК-содержащим вирусам, нодавирусы обладают крайней генетической лабильностью из-за большой скорости мутирования и высокой частоты РНК-рекомбинации. Однако основным механизмом их изменчивости служит реассортация, т. е. возникновение потомства со смешанным генотипом в результате приобретения сегментов генома от разных «родителей».

Сегмент RNA1, кодирующий РНК-полимеразу, обеспечивает быструю репродукцию вируса, а также подавление иммунного ответа с помощью белка B2, т. е. он детерминирует основные факторы патогенности. В то же время сегмент RNA2, кодирующий белок капсида, отвечает за проникновение вируса в клетки определенного хозяина. При совместной циркуляции штаммов, лишенных выраженного сродства к клеткам хозяина, и штаммов, обладающих таким сродством, может возникнуть высокопатогенный вариант.

Нодавирусы хорошо приспособлены к смене хозяина; к сожалению, это подтверждается на практике — на протяжении последних 20 лет они неоднократно вызывали массовую гибель разных видов промысловых рыб.

Филогенетические исследования свидетельствуют о возникновении новых вариантов нодавирусов путем реассортации; более того, она может происходить между нодавирусами неродственных организмов. Примером служит вирус гигантской пресноводной креветки *Macrobrachium rosenbergii*, культивируемой в странах Юго-Восточной Азии. Он вызывает «болезнь белого хвоста» (англ. white tail disease, WTD). Исследования показали, что сегмент RNA1 (кодирует полимеразу) этого вируса имеет высокую степень сходства с геномными последовательностями альфа-нодавирусов насекомых, а сегмент RNA2 (кодирует капсид) — с геномными последовательностями бета-нодавирусов рыб. Происхождение нодавируса креветки *M. rosenbergii* не выяснено. Можно допустить, что его предками были нодавирусы, инфицирующие водоплавающих насекомых, а также рыб. Интересная особенность данного вируса заключается в том, что он всегда встречается в ассоциации с мелким вирусом-сателлитом, РНК которого кодирует только белок капсида.

Экология. В прибрежных водах Юго-Восточной Азии нодавирусы были обнаружены у разных видов внешне здоровых беспозвоночных и рыб. Предполагается, что низкопатогенные нодавирусы широко распространены в природе, однако неизвестно, в каких органах хозяина они персистируют.

С проблемой нодавирусных инфекций человек столкнулся в 1990-е годы, когда страны Латинской Америки и Юго-Восточной Азии приступили к промышленному разведению промысловых рыб. Содержание мальков в небольших водоемах создает идеальные условия для возникновения высокопатогенных вариантов разных вирусов. Слабое развитие иммунной системы мальков и испытываемый ими в этих условиях стресс делают их особо восприимчивыми к вирусной инфекции, а избыточная плотность популяции хозяина обеспечивает молниеносную передачу от одного организма к другому. При таких условиях в популяции вируса начинает действовать система обратных связей, приводящая к появлению и доминированию высокопатогенных вариантов.

К числу факторов, благоприятствующих отбору высокопатогенных нодавирусов, можно добавить «моногенетику» популяции хозяина (все особи одинаково восприимчивы к инфекции) и специфические режимы содержания, отличные от природных

условий. Особо благоприятным для нодавирусов становится профилактическое применение антибиотиков, повышающих проницаемость стенок кишечника и эндотелия, что, в свою очередь, способствует проникновению агента в кровь и центральную нервную систему.

Поскольку уровень экспрессии генов, в частности генов интерферона, в нейронах значительно выше, чем в других клетках, в центральной нервной системе идет позитивная селекция быстро размножающихся и более патогенных нодавирусных вариантов.

Возникновение патогенных нодавирусов рыб в 1990-х годах является не единственным, но весьма показательным примером «новых» вирусных инфекций из-за усиления хозяйственной деятельности. В этом смысле промышленное выращивание животных служит неиссякаемым источником особо опасных вирусных инфекций.

Для борьбы с растущей угрозой активно разрабатываются вакцины против нодавирусов рыб; уже нашла практическое применение инактивированная (цельновирусная) вакцина, предоставляемая с кормами.

6.6.4.4. Семейство *Picornaviridae*

Название семейства (*Pico-rna-viridae*) расшифровывается как «очень мелкие РНК-содержащие вирусы». Действительно, это одни из самых мелких вирусов животных: диаметр их частиц в среднем составляет около 30 нм. Размер генома пикорнавирусов также невелик и лежит в пределах 7,0–7,5 тыс. н. К числу пикорнавирусов относятся возбудители таких актуальных заболеваний, как гепатит А (болезнь Боткина), полиомиелит и ящур.

Пикорнавирусы были открыты одними из первых. Еще в 1898 г. немецкие микробиологи Леффлер и Фрош (см. раздел 1.1) в опытах на животных показали, что ящур вызывается фильтрующимся агентом. Спустя десятилетие их соотечественники Карл Ландштайнер (K. Landsteiner) и Эрвин Поппер (E. Popper) аналогичным путем установили инфекционную этиологию полиомиелита. Успех в изучении пикорнавирусов во многом обусловлен тем, что большинство из них относительно легко культивируется на перевиваемых клеточных культурах.

Структура семейства. Семейство *Picornaviridae* в настоящее время насчитывает 12 родов вирусов млекопитающих (в том числе, человека) и птиц; отметим наиболее значимые из них.

Род Aphthovirus (лат. aphtha — везикулы, образующиеся в ротовой полости и на конечностях зараженных животных). Этот род включает в себя в качестве типового вида вирус ящура (*Foot-and-mouth disease virus*). Хотя афтовирусы преимущественно инфицируют коз, коров, овец и свиней, они могут представлять опасность и для других животных.

Род Cardiovirus (от греч. cardiace — болезнь сердца). Представлен вирусом энцефаломиокардита (*Encephalomyocarditis virus*), вирусом Тайлера (*Theiler virus*; заражает мышей), а также недавно открытым вирусом Сэффолд (*Saffold virus*; инфицирует человека). Природными хозяевами большинства кардиовирусов служат грызуны. Кардиовирусы вызывают миокардит и энцефалит у грызунов и других млекопитающих; описаны кардиовирусные эпизоотии среди африканских слонов.

Род Enterovirus (англ. enteric — кишечный). Включает в себя более 70 энтеровирусов человека. С эпидемиологической точки зрения самым важным из них является вирус полиомиелита (род *Poliovirus*). К энтеровирусам относятся также вирусы ECHO и Coxsackie, вызывающие у детей асептические менингиты и миокардиты. Помимо энтеровирусов человека известны энтеровирусы коров, обезьян и свиней. Энтеровирусы размножаются в эпителии желудочно-кишечного тракта и передаются фекально-оральным путем, однако кишечная симптоматика при вызываемых ими заболеваниях не является доминирующей.

Род Hepatovirus (от греч. hepar — печень). Представлен типовым видом, вирусом гепатита А (*Hepatitis A virus*, HAV). Вызываемое им заболевание — инфекционная желтуха, или болезнь Боткина, — протекает доброкачественно и заканчивается абортивной элиминацией вируса из организма (в отличие от гепатитов В и С, которые нередко вызывают хроническую инфекцию). Вирус гепатита А передается фекально-оральным способом. Вирусы, сходные с вирусом гепатита А человека, недавно были обнаружены у обезьян.

Род Rhinovirus (от греч. rinos — нос). Объединяет наиболее распространенных агентов острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) у детей и взрослых. Поражается слизистая оболочка носоглотки и верхних дыхательных путей. Персистенция риновирусов в организме является одним из факторов развития бронхиальной астмы. Известно около 100 разных риновирусов человека, лошади и других млекопитающих.

Род Teschovirus. Представлен типовым видом, тешовирусом серотипа 1 (PTV-1) — возбудителем тешинской болезни (англ. Teschen disease; *от названия района Тешин на северо-востоке Моравии (Чехия), где он был впервые обнаружен в 1929 г.*), или тяжелого энцефаломиелита и паралича свиней. Массовые эпизоотии, вызванные этим вирусом, наблюдались в 1930–1950-е годы. После разработки вакцины экономический ущерб от этого заболевания значительно снизился. В свое время было высказано мнение, что вирус тешинской болезни произошел от полиовируса человека, однако позднейшие исследования это не подтвердили.

Помимо названных родов в семейство *Picornaviridae* входят род *Avihepatovirus* (возбудитель гепатита уток), род *Erbovirus* (возбудители острых респираторных заболеваний лошадей), род *Kobuvirus* (в частности, вирус Аичи; вызывает гастроэнтериты у жителей Японии), род *Parechovirus* (вирусы ECHO 22- и 23-го типа; вызывают детский гастроэнтерит), род *Sapelovirus* (возбудители энтеритов птиц и свиней) и род *Tremovirus* (агент птичьих энцефалитов), а также ряд других, менее известных, родов пикорнавирусов.

С развитием метагеномного анализа выяснилось, что все описанные пикорнавирусы являются лишь вершиной айсберга; в природе существует множество пикорнавирусных инфекций, которые протекают незаметно, поскольку не вызывают заболевания с явными клиническими проявлениями.

Порядок *Picornavirales* постоянно пополняется новыми представителями, например, недавно обнаружен сенекавирус (*Seneca valley virus*), обладающий онколитической активностью, т. е. свойством избирательно поражать раковые клетки. В настоящее время изучается возможность использования этого вируса в качестве средства борьбы со злокачественными опухолями.

Строение вирионов. Пикорнавирусы образуют безоболочные вирионы; внутри капсида находится плотно скрученная спираль ssРНК, которая ковалентно связана с белком VPg. На негативно контрастированных препаратах они выглядят, как сферические частицы без каких-либо внешних структурных особенностей. В действительности капсиды представляют собой икосаэдры. При снижении pH они изменяют свою конформацию, и тогда на их вершинах обнаруживаются каналы.

Детали строения пикорнавирусов выяснены с помощью рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии. По строению капсида пикорнавирусы могут несколько отличаться друг от друга, но в целом их частицы устроены сходным образом. Капсид образован четырьмя структурными белками (VP1, VP2, VP3 и VP4), по 60 молекул каждого. На вершине икосаэдра находится пять молекул белка VP1, образующих пентон. Белки VP2 и VP3 расположены на гранях икосаэдра, а белок VP4 — внутри капсида. Белок VP4 миристилирован, т.е. с его N-концом ковалентно связан остаток миристиновой кислоты.

На поверхности капсида вокруг каждой из вершин размещаются вирусные рецепторы. У риновирусов и вируса полиомиелита они находятся в щелевидном углублении (англ. canyon); у вируса ящура они представляют собой подвижные белковые петли, выступающие над поверхностью капсида. В непосредственной близости от рецепторов находятся вариабельные участки капсидных белков, определяющие серотип вируса. На поверхность капсида выступают гидрофильные группы, в результате чего при нейтральном pH вирионы пикорнавирусов несут слабый отрицательный заряд. В свою очередь, гидрофобные участки скрыты внутри капсида, поэтому пикорнавирусы устойчивы к органическим растворителям (эфиру, хлороформу и т.д.), а также к слабым детергентам. Они сохраняют инфекционную активность в кислой среде; наиболее устойчив вирус полиомиелита — его частицы стабильны даже при pH 2.

Важнейшей функцией капсида пикорнавирусов служит доставка геномной ssРНК(+) в клетку-мишень. Исследования последних лет объяснили, как при этом функционируют капсидные белки. События развиваются в следующем порядке. Взаимодействие со специфическими клеточными рецепторами, например с молекулами межклеточной адгезии (англ. inter-cell adhesion molecule, ICAM), приводит к образованию клатрин-окаймленных везикул или индуцирует клатрин-независимый эндоцитоз, в результате чего вирусная частица попадает в раннюю эндосому. Затем при закислении полости эндосомы изменяется конформация наружных доменов капсидных белков, каналы на вершине икосаэдра приоткрываются и через них выдвигаются миристилированные N-концы молекул белка VP4. Предполагается, что когда гидрофобные остатки миристиновой кислоты внедряются в мембрану эндосомы, каналы на вершине капсида раскрываются еще шире, ковалентная связь между белком VP4 и геномной РНК нарушается и последняя переходит в цитоплазму. Одновременно с этим изменяется конформация белков VP1–VP3, в результате чего их внутренние гидрофобные домены перемещаются на поверхность капсида.

Детали строения вирионов пикорнавирусов недостаточно изучены. Например, до сих пор неизвестно, все ли вершины капсида функционально эквивалентны (т.е. может ли любая из них служить порталом для выхода геномной РНК). Неизвестно также, какова укладка РНК внутри капсида (упорядоченная или неупорядоченная).

Исследование риновирусов с помощью криоэлектронной микроскопии пролило свет на механизм нейтрализации их инфекционной активности. Показано, что антитела перекрывают каньоны на поверхности капсида, препятствуя доступу клеточных рецепторов к рецепторным карманам вируса. Кроме того, в сыворотке содержатся антитела, блокирующие каналы на вершинах икосаэдра, через которые геномная РНК выходит из капсида.

Строение генома. Вирион пикорнавирусов содержит молекулу ssРНК(+) размером около 7440 н., которая связана с белком VPg (см. раздел 5.5.3.3) на 5′-конце и полиаденилирована на 3′-конце.

В центральном участке генома расположена открытая рамка считывания, которая кодирует большой полипротеин; после трансляции он расщепляется на структурные и неструктурные белки. К первым относятся белки капсида VP1–VP4 и РНК-связанный белок VPg, ко вторым — РНК-зависимая РНК-полимераза (3Dpol), а также вирусоспецифичные протеазы 2Apro и 3Cpro/3CDpro. На обоих концах геномной РНК находятся нетранслируемые участки (англ. **un**translated **r**egion, UTR) (см. рис. 97, б и рис. 98).

В отличие от эукариотных мРНК, на 5′-конце геномной РНК пикорнавирусов отсутствует m7G-кэп. Его функцию выполняет цисэлемент — IRES (см. раздел 5.5.3), который инициирует трансляцию downstream-участка генома от классического старт-кодона AUG.

Трансляция у пикорнавирусов инициируется только в одном локусе геномной РНК, т. е. эта мРНК моноцистронна. Помимо сайта IRES в геномной РНК содержится еще несколько цисэлементов, представляющих собой вторичные структуры (шпильки). Первые 88 нуклеотидов на 5′-конце образуют «клеверный лист»; показано, что такая структура требуется для формирования репликативного комплекса при синтезе плюс-нити РНК на минус-матрице. На 3′-конце расположены две шпильки, образующие псевдоузел; они необходимы для репликации вируса, однако их конкретная функция неизвестна. В области генома, кодирующей белок 2C, находится еще одна шпилька, репликативный цисэлемент (англ. cis-acting replication element); он служит матрицей для полиуридилирования белка VPg в ходе репликации.

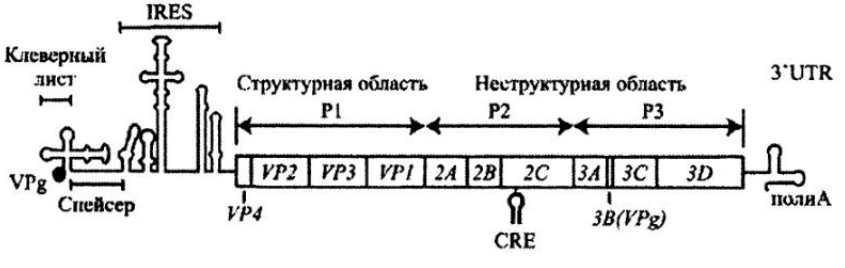


Рис. 98. Геном вируса полиомиелита (по: Mueller, 2005).

Рамка считывания полипротеина с участками капсидных белков (VP1–VP4), протеазы (3C), РНК-полимеразы (3D) и вспомогательных белков.

CRE — цис-элемент, необходимый для полиуридилирования белка VPg; IRES — сайт инициации трансляции; 3′UTR — нетранслируемый участок.

Цикл размножения. Большинство пикорнавирусов можно культивировать на перевиваемых клеточных культурах, поэтому их онтогенез хорошо изучен. Как и все ssРНК(+)-вирусы, пикорнавирусы размножаются только в цитоплазме. Репликация геномной РНК и сборка вирионов проходят в цитоплазме, хотя не исключается транспорт регуляторных вирусных белков в ядро. Размножению предшествует адсорбция и проникновение вируса в клетки-мишени; по-видимому, пикорнавирусы интернализуются путем эндоцитоза.

Специфическими рецепторами для пикорнавирусов могут быть разные поверхностные макромолекулы. В частности, рецептором для вируса полиомиелита служит CD155 — трансмембранный гликопротеин из класса иммуноглобулинов. Его нормальной функцией является связь с внеклеточным матриксом и соседними клетками. В норме этот белок присутствует на базолатеральной поверхности клетки и, следовательно, он мало доступен для взаимодействия с вирусными частицами со стороны апикальной поверхности. Поэтому должен существовать механизм для переноса адсорбированных частиц в область расположения рецепторов; в частности, он известен у вируса Coxsackie B, который использует для своего проникновения рецептор CAR (см. раздел 6.6.1.1). На апикальной поверхности клетки вирион связывается с белком DAF (сокр. англ. **d**ecay-**a**ccelerating **f**actor), что приводит к агрегации молекул последнего и транспорту образовавшегося комплекса в зону плотного контакта между латеральными поверхностями клеток — туда, где локализован рецептор CAR. Специфическое связывание полиовируса с клеточным рецептором CD155 приводит к поглощению вириона путем неканонического эндоцитоза, не зависящего от клатрина и кавеолина.

В отличие от полиовируса риновирусы используют рецептор липопротеина низкой плотности (англ. **l**ow **d**ensity **l**ipoprotein **r**eceptor, LDLR), а также фактор межклеточной адгезии (англ. **i**nter-cell **a**dhesion **m**olecule **1**, ICAM-1). Они проникают в клетки путем клатрин-опосредованного эндоцитоза и оказываются в ранней эндосоме. Как уже отмечалось, при снижении pH в эндосомах вирион претерпевает конформационное изменение: высвобождается внутренний миристилированный белок VP4 и на поверхности частицы экспонируются гидрофобные участки белка VP1. В результате этого вирионы прикрепляются к внутренней поверхности мембраны эндосомы и инъецируют геномную РНК в цитоплазму. Пустые капсиды направляются в лизосомы, где разрушаются протеазами. В цитоплазме от геномной РНК отщепляется белок VPg, что служит сигналом к началу кэп-независимой трансляции с участием элемента IRES. Остановимся на этом подробнее.

Для начала трансляции большинства клеточных мРНК требуется 5′-кэп, к которому поочередно присоединяются факторы инициации трансляции. После образования полного инициаторного комплекса к нему присоединяется 40S-субъединица рибосомы, сканирующая мРНК в направлении от 5′-конца к 3′-концу до первого старткодона (AUG). Затем к ним подключается 60S-субъединица и начинается трансляция.

Инициация трансляции геномной РНК пикорнавирусов происходит иначе. К элементу IRES присоединяется несколько клеточных факторов кэп-связывающего комплекса, а также дополнительные белки ITAF (**I**RES **t**rans-**a**ctivating **f**actor). Клеточные факторы инициации трансляции, в частности eIF-4G, модифицируются вирус-

ными протеазами. Затем к инициаторному комплексу поочередно присоединяются субъединицы рибосомы и начинается трансляция. Таким образом, элемент IRES напрямую не взаимодействует с рибосомой, а только способствует образованию инициаторного комплекса.

Трансляция геномной РНК пикорнавирусов начинается так же, как трансляция клеточных мРНК, — со старт-кодона AUG, расположенного на некотором расстоянии от инициаторного комплекса.

Элементы IRES, обнаруженные у многих ssРНК(+)-вирусов, различаются по степени использования хозяйских факторов. Например, элемент IRES дицистровирусов (сем. *Dicistroviridae*) связывается с рибосомой непосредственно, и для начала трансляции не требуются клеточные факторы инициации трансляции.

В результате трансляции геномной РНК образуется полипротеин-предшественник, который при помощи кодируемых вирусом протеаз (2Apro и 3Cpro/3CDpro) расщепляется на структурные и неструктурные белки. Протеолиз проходит в несколько этапов; интермедиаты не всегда имеют те же функции, что и конечные продукты. Одновременно с началом синтеза вирусных белков вирусная протеаза 2Apro расщепляет комплекс клеточных факторов инициации трансляции, что приводит к подавлению кэп-зависимой трансляции клетки-хозяина. Видоизмененный фактор eIF-4G совместно с белками ITAF участвует в инициации трансляции вирусных РНК, но они не способны образовывать инициаторный комплекс для трансляции клеточных мРНК.

Вирус подавляет хозяйскую транскрипцию. Вирусная протеаза 3Cpro проникает в ядро, где она инактивирует клеточные факторы — TFIIIC и TATA-связывающий белок (англ. **TATA**-box **b**inding **p**rotein, TBP).

Из структурных белков VP0, VP1 и VP3 в цитоплазме формируются капсиды для упаковки вирусной РНК. При расщеплении полипротеина-предшественника также образуются неструктурные белки, в том числе RdRP (3Dpol), которая синтезирует минус-матрицу на геномной РНК(+), в результате чего образуется репликативный интермедиат — короткоживущая dsРНК. Затем RdRP создает на минус-матрице многочисленные плюс-копии. Они могут использоваться как для синтеза вирусных белков, так и в качестве геномной ssРНК(+) потомства.

Для синтеза плюс-копий на минус-матрице необходим праймер — уридилированный белок VPg (VPg-pU-pU). Одно время считали, что для уридилирования используется последовательность поли-А на 3′-конце геномной РНК, однако позднее выяснилось, что белок VPg уридилируется за счет последовательности AAA, расположенной на конце шпильки элемента CRE гена белка 2C.

Геномная РНК реплицируется в особых структурах, образованных на основе мембран гладкого эндоплазматического ретикулума и вирусных белков 2C и 2BC. В инфицированных клетках содержится в 50 раз больше плюс-копий РНК, чем минус-копий. Сигналом к инкапсидированию дочерних плюс-копий РНК служит присоединение к ним белка VPg; без этого упаковка невозможна. За упаковкой следует созревание вириона: капсидный белок VP0 расщепляется на белки VP2 и VP4, капсид приобретает окончательную форму, и вирусная частица становится инфекционной.

Цикл размножения вируса полиомиелита в клетках HeLa занимает 6–8 ч; затем клетка исчерпывает свои метаболические ресурсы и лизируется, высвобождая много-

численные вирионы потомства. Цикл размножения других пикорнавирусов в общих чертах сходен с циклом размножения вируса полиомиелита.

Рецепторы и клеточный тропизм. Отдельные виды пикорнавирусов различаются органным, тканевым и клеточным тропизмом, а также способом эндоцитирования. При этом они используют разные клеточные рецепторы, примеры которых приводятся в табл. 23.

Таблица 23. **Рецепторы пикорнавирусов**

Вирус	Рецептор	Функция рецептора
Вирус ящура (*Foot-and-mouth disease virus*)	Интегрин α5β3	Прикрепление клетки к внеклеточному матриксу; межклеточный сигналинг
Вирус Коксаки (*Human coxsackievirus*)	Рецептор CAR (сокр. англ. Coxsackie adenovirus receptor) // корецептор DAF (сокр. англ. Decay accelerating factor)	Структурный элемент плотных контактов // регулятор системы комплемента
Энтеровирус человека (*Human enterovirus 71*)	VCAM-1 (сокр. англ. vascular cell adhesion molecule)	Взаимная адгезия клеток сосудистого эндотелия
Вирус полиомиелита (*Human poliovirus*)	CD155	Связь клетки с внеклеточным матриксом и другими клетками
Риновирус A (*Rhinovirus A*)	ICAM-1 (сокр. англ. intercellular adhesion molecule-1)	Взаимная адгезия клеток
Риновирус B (*Rhinovirus B*)	LDLR (сокр. англ. low density lipoprotein receptor)	Поступление в клетку липопротеинов низкой плотности

Как следует из данных табл. 23, пикорнавирусы в основном используют рецепторы, обеспечивающие межклеточные контакты и связь клеток с внеклеточным матриксом. Они представлены на поверхности клеток многих типов, в первую очередь на эпителиальных клетках. Вирусная инфекция стимулирует образование этих рецепторов, что, в частности, продемонстрировано на примере риновирусов и энтеровируса 71-го типа.

Усиленное образование рецепторов, с одной стороны, позволяет вирусу быстрее распространиться по макроорганизму; в то же время при этом активируются клетки иммунной системы, поскольку макрофаги и Т-лимфоциты используют адгезины для прикрепления к инфицированным клеткам и их лизиса. Стимулированное образование клеточных рецепторов, необходимых для проникновения вируса, является характерной чертой не только представителей семейства *Picornaviridae*, но и многих других вирусов, например ротавирусов.

Клинические проявления и патогенез. Энтеровирусы размножаются в эпителии желудочно-кишечного тракта и передаются фекально-оральным путем, однако кишечная симптоматика при вызываемых ими заболеваниях не является доминирующей. В частности, энтеровирусов (англ. enterovirus) семейства *Picornaviridae* не следует путать с вызывающими острые кишечные заболевания «кишечными» вирусами (англ. enteric virus), к которым относятся представители других семейств, в том числе астровирусы (сем. *Astroviridae*), норовирусы (сем. *Caliciviridae*), ротавирусы (сем. *Reoviridae*) и ряд других.

Особый интерес представляет патогенез полиомиелита. Это заболевание трудно изучать из-за отсутствия удобной экспериментальной модели (естественным хозяином вируса полиомиелита является только человек). К полиовирусу восприимчивы и обезьяны, однако стоимость данной экспериментальной модели чрезмерно высока.

В 1950-х годах заболеваемость полиомиелитом в связи с распространением вакцинации резко упала, поэтому период клинических наблюдений на людях в основном ограничивается серединой XX в. Тем большую ценность имеют свидетельства медиков тех лет, поскольку они проливают свет на очень важные аспекты патогенеза полиомиелита.

Входными воротами инфекции служат гланды и кишечный эпителий. В первые дни после заражения вирус обнаруживается также в Пейеровых бляшках кишечника и брыжеечных лимфатических узлах. У большинства инфицированных клинических проявлений не наблюдается, за исключением преходящей виремии (наличия вируса в крови). Приблизительно у 4–8% инфицированных развивается вторичная виремия, сопровождающаяся неспецифическими клиническими проявлениями, такими, как повышение температуры, мигрень и миалгия. Лишь у некоторых больных в инфекционный процесс вовлекается центральная нервная система.

Вирус полиомиелита поражает моторные нейроны, в результате чего развивается паралич отдельных групп мышц. Если затронута иннервация дыхательной мускулатуры, заболевание может привести к летальному исходу. Полиомиелит как таковой (поражение нервной ткани) наблюдается менее чем у 1% инфицированных; таким образом, это не норма, а скорее исключение — несчастный случай, обусловленный неблагоприятным стечением обстоятельств.

При попытке объяснить причину такой редкостной патологии встает вопрос — какие факторы способствуют переходу инфекции в нейротропную форму? В общем виде их можно разбить на три группы: 1) факторы патогенности вируса (особо патогенные штаммы); 2) генетически обусловленная предрасположенность к заболеванию; 3) факторы внешней среды и обстоятельства, сопровождающие инфекцию.

Первая группа факторов была изучена путем сравнения геномных последовательностей аттенуированных (ослабленных) и диких штаммов полиовируса. В его геноме были выявлены три мутантных локуса, один из которых находится в элементе IRES, а два других — в генах, кодирующих белки капсида и RdRP. Предполагается, что основное значение имеют мутации в генах белков капсида, поскольку они ограничивают клеточный тропизм вируса кишечным эпителием.

Вторая группа факторов изучена весьма недостаточно. Заболеваемость полиомиелитом в настоящее время ограничена редкими вспышками в развивающихся странах, поэтому провести статистически достоверные исследования индивидуальной восприимчивости невозможно.

Что касается третьей группы факторов, то они были подмечены клиницистами в период высокой заболеваемости полиомиелитом: инфекция переходила в нейротропную форму при весьма характерных обстоятельствах, а именно при физических нагрузках, мышечных травмах и внутримышечных инъекциях. Во многих случаях прослеживалась связь между травмированным участком и зоной поражения спинного мозга. Эти наблюдения позволили предположить, что вирус полиомиелита про-

никает в центральную нервную систему через нервно-мышечные синапсы в месте травмы и достигает моторных нейронов путем ретроградного (центростремительного) транспорта по аксонам. Репродукция вируса в моторных нейронах приводит к заражению соседних нейронов, их гибели и локальному поражению серого вещества. В 50-х годах XX в. проводились ограниченные эксперименты на приматах, подтвердившие такое предположение.

В настоящее время для изучения патогенеза полиомиелита применяют трансгенных мышей, получивших человеческий рецептор полиовируса (CD155). На этой модели было показано, что во внутримышечном заражении участвуют нейроны, иннервирующие те группы мышц, в которые производилась инъекция; при внутривенном заражении паралич не развивался. Однако если травмировали мышцу у животного, которому перед этим был внутривенно введен вирус, паралич развивался именно в ней. Стресс, сопровождающийся значительной физической нагрузкой, также способствовал развитию паралича.

Таким образом, поскольку проблема полиомиелита возникла только в первой половине XX в., тогда как в XIX в. тяжелых случаев заболевания практически не наблюдалось, можно предположить, что появлению высокопатогенных вариантов полиовируса способствовала установившаяся в XX в. практика лечения заболеваний с помощью внутримышечных инъекций.

Кроме вируса полиомиелита известно более 70 энтеровирусов человека. Вызываемые ими инфекции очень коварны, поскольку в большинстве случаев они протекают бессимптомно, хотя нередко сопровождаются тяжелыми осложнениями. В последние годы доказана связь между заражением вирусом *Coxsackie B4* и развитием инсулинзависимого диабета. Размножаясь в кишечнике, вирус поражает клетки островков Лангерганса. При этом развитие заболевания связано не столько с поражением клеток энтеровирусом, сколько с их разрушением вследствие аутоиммунной реакции, чему способствует высокий уровень интерферона. Инсулинзависимый диабет, или диабет 1-го типа, в настоящее время является одной из острейших проблем здравоохранения, в особенности в северных странах.

Другой энтеровирус, *Coxsackie B3*, вызывает миокардиты. Так же, как при диабете вирусной этиологии, поражение клеток в данном случае обусловлено аутоиммунной реакцией. Одним из факторов, способствующих развитию заболевания, служит дефицит микроэлемента селена. Интересно, что при размножении низкопатогенного вируса *Coxsackie B3* в кардиомиоцитах идет отбор высокопатогенных вариантов. Аналогичное явление наблюдается при размножении низкопатогенных вариантов вируса полиомиелита в нейронах.

Заражение энтеровирусами группы ECHO может привести к заболеванию асептическим, или серозным, менингитом.

Вовлечение центральной нервной системы в инфекционный процесс характерно также для энтеровируса 71-го типа, вызвавшего в 2008 г. эпидемию в Юго-Восточной Азии.

Гепатит А, или инфекционная желтуха, вызывается представителем рода *Hepatovirus* (***Hepatitis A virus***, *HAV*). Вирус распространяется фекально-оральным путем и легко передается в быту при несоблюдении правил личной гигиены. Источником

инфекции могут быть немытые сырые овощи и фрукты (салат, клубника и т. д.). Описаны случаи массового заражения, вызванные использованием загрязненной воды, однако такой путь передачи более характерен для вируса гепатита Е (сем. *Hepeviridae*). Инкубационный период длится примерно месяц.

Вирус гепатита А способен размножаться в криптах кишечника, но в основном поражает гепатоциты. Через желчные протоки он попадает в кишечник и может повторно инфицировать клетки крипт. Из просвета кишечника вирус адсорбируется на клетках ворсинок и вновь проникает в кровяное русло. В детском возрасте ~30% случаев гепатита А не сопровождается клиническими проявлениями; у взрослых, особенно пожилых людей, часто развивается тяжелое заболевание. Инфекция порождает стойкий иммунный ответ и заканчивается элиминацией вируса. Хотя вирус гепатита А трудно поддается культивированию, в настоящее время против него разработаны эффективные вакцины.

Помимо энтеровирусов человека известны энтеровирусы коров, обезьян и свиней.

Механизмы изменчивости. Пикорнавирусы так же, как и прочие РНК-содержащие вирусы, эффективно приспосабливаются к изменению условий существования. Свойство РНК-полимераз совершать на три-пять порядков больше ошибок, чем ДНК-полимеразы, способствует тому, что вирусная популяция становится генетически гетерогенной. В период болезни вирус проходит несколько циклов размножения, в результате чего появляются варианты, которые по биологическим свойствам иногда значительно отличаются от исходного. Как уже отмечалось, популяционная изменчивость такого вируса в пределах организма хозяина характеризуется понятием «квазивид».

Другим эффективным механизмом изменчивости пикорнавирусов является рекомбинация геномной РНК между их циркулирующими вариантами. В большинстве случаев инфекция не сопровождается ярко выраженными клиническими проявлениями и индуцирует слабый иммунный ответ, что приводит к продолжительному заболеванию (вирус в организме обнаруживается на протяжении 2–3 месяцев). В этот период существует вероятность заражения другими вариантами вируса и появления его потомства со смешанным генотипом. Рекомбинацию РНК между вакцинными штаммами вируса полиомиелита, циркулирующими в человеческой популяции, впервые обнаружил в 1980-х годах известный советский вирусолог В. И. Агол.

Высокопатогенные варианты пикорнавирусов появляются в тех случаях, когда последний получает доступ в жизненно важные органы, обычно не вовлеченные в инфекционный процесс. Появление патогенных вариантов также может быть связано с размножением вируса в хозяине, принадлежащем к другому виду млекопитающих. Примером служит ранее неизвестный энтеровирус под порядковым номером 70, обнаруженный в 1971 г. Он вызывает необычное для энтеровирусов заболевание — острый геморрагический конъюнктивит, эпидемия которого разразилась в Африке, затем охватила Индию и закончилась в Юго-Восточной Азии. Предполагается, что этот энтеровирус проник в человеческую популяцию из неизвестного природного резервуара, где он циркулировал, не вызывая патологию.

Противоположный пример, возникновение нового заболевания животных, вызванного вирусом человека, — это эволюционная история вируса Коксаки (*Coxsackie*

virus B5). Низкопатогенный для человека вирус приобрел способность размножаться в организме свиньи, вызывая «везикулярную» болезнь (англ. swine vesicular disease; *не смешивать с везикулярной экзантемой, англ. vesicular exanthema of swine, вызываемой калицивирусом VESV*).

Заранее предсказать, как поведет себя вирус при смене хозяина, невозможно. Неоднократно высказывалось мнение, что высокопатогенные варианты не приносят вирусам эволюционной выгоды, поскольку хозяин может погибнуть. С этим можно не согласиться, поскольку вирус, как правило, попадает во внешнюю среду, где его популяция некоторое время сохраняется, причем ее генофонд обогащается за счет генотипов, повышающих адаптационные возможности вида.

Так или иначе, задача вирусологов состоит в том, чтобы предотвратить распространение высокопатогенных вариантов вируса, зная типичные условия их возникновения.

Защита от иммунного ответа. Многие пикорнавирусы процветают, эффективно преодолевая иммунитет, обусловленный антителами. Широкое распространение риновирусов связано с их изменчивостью — во время эпидемии одновременно может циркулировать несколько десятков серотипов. В свою очередь, стратегия ухода энтеровирусов от иммунного ответа основана на их относительно вялой репликации в кишечнике, благодаря чему защитная реакция организма хозяина запаздывает и ниже по интенсивности.

Пикорнавирусы не ограничиваются преодолением популяционного иммунитета. Некоторые из них активно подавляют систему приобретенного иммунитета и связанный с ней межклеточный сигналинг.

Например, энтеровирус *Coxsackie B3*, вызывающий миокардиты у детей и подростков, подавляет презентацию антигена, зависящую от молекул главного комплекса тканевой совместимости I типа (MHC-I), и таким образом избегает ответа Т-лимфоцитов субпопуляции $CD8^+$. Вероятно, молекулярный механизм данного явления заключается в том, что вирусные белки 2B, 2C и 3A образуют комплекс, блокирующий транспортировку молекул MHC-I к поверхности клетки.

В свою очередь, L-протеаза вируса Тайлера (*Theiler's murine encephalomyelitis virus*) подавляет транскрипцию генов интерферона IFN-β. Аналогичными свойствами обладает лидерная протеаза (Lpro) вируса ящура, которая вдобавок расщепляет клеточный фактор инициации трансляции eIF-4G.

Обобщая имеющуюся информацию, можно отметить, что пикорнавирусы не слишком подавляют иммунный ответ хозяина. Вероятно, это обусловлено тем, что их небольшой геном не содержит генов специализированных иммуносупрессорных белков. Поэтому иммунный ответ подавляется специфическими протеазами, основная функция которых — фрагментация полипротеина-предшественника.

Антипикорнавирусные препараты. Создание антивирусных препаратов — гораздо более сложная задача, чем разработка антибактериальных средств. Основная трудность заключается в подборе соединений, которые в терапевтической концентрации специфически блокируют размножение вируса, не затрагивая нормальные клетки.

Эра антибиотиков наступила в 1928 г. с открытием пенициллина; с тех пор было найдено множество природных антибиотиков и получено не меньше их искусствен-

ных модификаций, а также создано большое количество антимикробных химиопрепаратов. В свою очередь, началом эры противовирусных препаратов можно считать 1966 г., когда изобрели амантадин; несколько позже появился ацикловир. Однако лицензировано лишь несколько десятков противовирусных препаратов, которые специфически воздействуют на вирусные ферменты.

До настоящего времени не существует ни одного разрешенного к применению медицинского препарата, который обладал бы специфической активностью против пикорнавирусов. Плеконарил, эффективный в отношении риновирусов, проходит клинические испытания. Механизм его действия основан на избирательном блокировании рецепторных карманов на поверхности капсида; при этом нарушается адсорбция вирионов на клетках-мишенях, а также предотвращается высвобождение вирусной РНК. Недавно синтезировано несколько аналогичных соединений, одно из которых (R75761) рекомендовано в качестве лекарственного средства против полиомиелита. Наряду с ингибиторами адсорбции изучаются ингибиторы вирусоспецифичных полимераз и протеаз, в частности протеазы 3CPro; выявлено несколько перспективных соединений, однако ни одно из них еще не введено в клиническую практику.

Пикорнавирусы, как и многие другие ssРНК(+)-вирусы, чувствительны к интерферонам и их индукторам. Следует отметить, что в экономически развитых странах лечение вирусных инфекций препаратами интерферонного ряда проводится с большой предосторожностью, поскольку их применение сопряжено с риском развития аутоиммунных заболеваний. К этому классу препаратов относятся лейкоцитарный человеческий интерферон, рекомбинантный интерферон IFN-α (реальдерон), индуктор интерферона циклоферон и другие. Все они представлены на отечественном фармакологическом рынке.

Вакцины. В середине XX в. были разработаны эффективные вакцины против пикорнавирусных инфекций, в частности против полиомиелита и ящура. Одной из первых стала вакцина против полиомиелита.

В 1950-е годы в США были созданы два варианта полиовакцины: 1) вакцина Джонаса Солка (J. Salk) на основе убитых патогенных штаммов, вводимая внутримышечно; 2) вакцина Альберта Сэбина (A. Sabin) на основе живых аттенуированных штаммов, применяемая перорально. Поскольку в природе циркулируют три серотипа вируса полиомиелита, все они были включены в обе вакцины. Массовая вакцинация, начатая в 1950-е годы, позволила резко снизить заболеваемость полиомиелитом. В 1988 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) провозгласила своей целью полную ликвидацию полиовируса, которая в настоящее время близка к достижению (локальные вспышки заболевания наблюдаются в развивающихся странах, мало охваченных вакцинацией). В России вакцинация против полиомиелита обязательна (см. «Национальный календарь профилактических прививок»), причем используется только живая вакцина.

Вакцины против полиомиелита не лишены недостатков. История применения убитой вакцины омрачена примерами развития тяжелого заболевания, поскольку партия препарата иногда содержала живого вируса. Наиболее известен трагический случай, произошедший в США в 1955 г. (так называемый «Cutter incident»), когда из-

за применения недоброкачественной вакцины производства фирмы Каттер умерло 5 детей, а 51 ребенок стал пожизненно парализованным. После пересмотра технологии приготовления вакцины подобные случаи уже не повторялись.

Живая вакцина в целом оказалась более эффективной и безопасной, хотя она чревата реверсией вируса к дикому типу. Чтобы предотвратить это, в настоящее время используются методы генной инженерии, в частности в вирусный геном встраивают последовательности, комплементарные последовательностям микро-РНК (англ. miRNA) нервной ткани. В этом случае вирус теряет способность реплицироваться в нейронах, поскольку в таких клетках его геномная РНК подвергается сайленсингу; при этом вакцинный штамм сохраняет способность размножаться в кишечнике.

6.6.5. ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ ssРНК(–)

Представители этой группы вирусов характеризуются рядом общих особенностей строения и репродукции.

1. Геномная минус-РНК не используется в качестве мРНК, т. е. она не может непосредственно транслироваться. В отличие от геномной РНК(+), депротеинизированная геномная РНК(–) не обладает инфекционной активностью.

Различие между геномной нуклеиновой кислотой ssРНК-содержащих вирусов обусловлено не только ее полярностью (+ или –), но и ее вторичной структурой, что определяет специфику действия регуляторных элементов. В то время как регуляторные элементы ssRNA(+)-вирусов, например IRES, используются в качестве инициаторов трансляции, регуляторные элементы ssRNA(–)-вирусов контролируют транскрипцию вирусных генов и препятствуют случайному узнаванию вирусного генома клеточным аппаратом трансляции.

2. У вирусов, содержащих ssРНК(–), в состав вириона входят РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRP) и вспомогательные белки, необходимые для ее функционирования. Иными словами, RdRP является структурным белком. У вирусов с несегментированным геномом в составе вириона имеется 1–2 полимеразных комплекса, в то время как у вирусов с сегментированным геномом число таких комплексов равно числу сегментов. Как правило, полимеразный комплекс состоит из нескольких белков, кодируемых разными генами, и функционирует в ассоциации с белком нуклеокапсида.

3. Первым этапом в цикле репродукции является транскрипция, т. е. образование вирусных мРНК на матрице геномной РНК. РНК-полимеразы вирусов, содержащих геномную ssРНК, различаются между собой по способности кэпировать мРНК. В частности, РНК-полимеразы парамиксовирусов (сем. *Paramyxoviridae*) самостоятельно кэпируют свои мРНК. В свою очередь, полимеразы вирусов гриппа (сем. *Orthomyxoviridae*) используют кэпы мРНК хозяина (англ. cap snatching — похищение кэпа). Наконец, полимеразы хантавирусов (сем. *Bunyaviridae*) «подбирают» в цитоплазме кэпы хозяина, не подвергшиеся деградации в ходе обновления мРНК.

4. Все известные вирусы животных, содержащие ssРНК(–), являются оболочными. Для объяснения этой закономерности можно предположить, что относительно

сложное строение вирионов (нуклеокапсид, один или несколько полимеразных комплексов и т. д.) требует координированной сборки на клеточной мембране.

К сказанному можно добавить следующее.

Во-первых, обеспечить репродукцию РНК(–)-вирусов с помощью «обратной генетики» намного сложнее, чем репродукцию вирусов, содержащих РНК(+). Помимо плазмиды, кодирующей геномную РНК, в клетку-хозяина приходится вводить серию экспрессирующихся плазмид, которые кодируют комплект основных и вспомогательных белков полимеразного комплекса (хотя все эти генетические элементы вируса, в приципе, можно объединить в кассетной плазмиде).

Во-вторых, вирусы животных, содержащие ssРНК(–), как правило, мало чувствительны к интерферонам, поскольку у них имеются гены для подавления иммунного ответа хозяина; наиболее распространен механизм синтеза ранних белков, блокирующих клеточный сигналинг.

В-третьих, в отличие от вирусов, содержащих ssРНК(+), которые размножаются исключительно в цитоплазме, некоторые ssРНК(–)-вирусы репродуцируются в клеточном ядре.

У вирусов, содержащих ssРНК(–), геном сегментирован или не сегментирован. Сегментированный геном имеют представители семейств *Arenaviridae*, *Bunyaviridae* и *Orthomyxoviridae*. Вирусы этих семейств образуют мРНК с использованием хозяйских кэпов (механизм «cap snatching»). Представители семейств *Arenaviridae* и *Bunyaviridae* репродуцируются в цитоплазме, а представители семейства *Orthomyxoviridae* — в клеточном ядре.

Вирусы с несегментированным геномом объединяются в порядок *Mononegavirales*, к которому относятся семейства *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae*.

Вирусы этого порядка репродуцируются в цитоплазме, за исключением представителей семейства *Bornaviridae* и некоторых вирусов растений, например нуклеорабдовирусов, которые размножаются в клеточном ядре.

6.6.5.1. Семейство *Orthomyxoviridae*

Вирусов, поражающих слизистые оболочки, в том числе вирусов гриппа, вируса парагриппа и вируса кори, первоначально объединяли в семейство *Myxoviridae* (от греч. муха — слизь). Затем вирусы гриппа, которые по морфологии и молекулярным свойствам значительно отличаются от вирусов парагриппа и кори, были обособлены в семейство *Orthomyxoviridae* (греч. ortho — настоящий).

Все представители семейства *Orthomyxoviridae* имеют геном из 6–8 сегментов ssRNA(–), репродуцируются в ядре и при кэпировании мРНК используют клеточные кэпы (механизм «cap snatching»).

Структура семейства. Семейство *Orthomyxoviridae* относительно невелико и представлено в основном вирусами гриппа, разделенными на три рода — *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* и *Influenzavirus C* (рис. 99). По строению вириона и циклу репродукции с ними сходен ряд вирусов рыб (род *Isavirus*), а также ряд арбовирусов (род *Thogotovirus*).

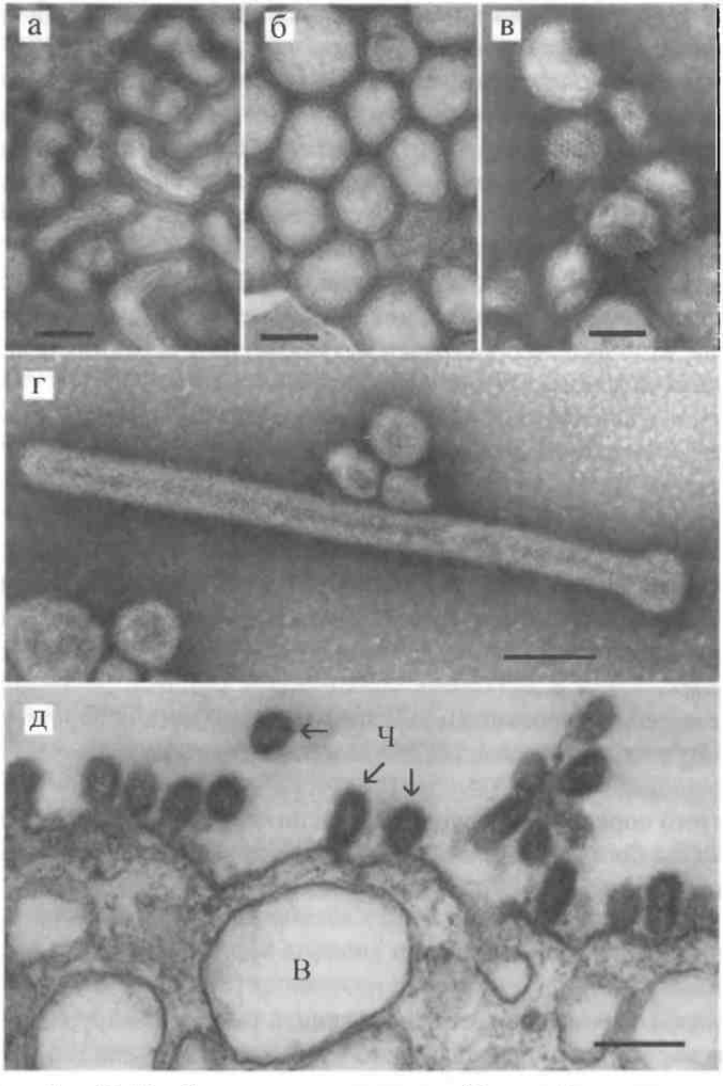


Рис. 99. Морфология вирусов гриппа (фотографии получены А. К. Сироткиным).

а — вирионы вируса гриппа А; б — гриппа В; в — гриппа С, стрелкой отмечена гексагональная решетка, образуемая вирусными рецепторами; г — нитевидная частица вируса гриппа А в окружении сферических и овальных частиц (негативно контрастированные препараты); д — отпочкование частиц вируса гриппа A/PR8(H1N1) от цитоплазматической мембраны клетки-хозяина (ультратонкий срез материала клеточной культуры MDCK; 18 ч от момента заражения).

Масштаб — 100 нм (а–в) и 200 нм (г, д).

Ч — почкующиеся и внеклеточные частицы; В — вакуоль.

Род Influenzavirus A (вирус гриппа А). Геном этого вируса состоит из 8 сегментов. Инфицирует лошадей, свиней, собак и человека. Известен ряд подтипов этого вируса (H1N1, H2N2, H5N1, H7N7, H9N1 и т. д.). Все прошлые пандемии гриппа были вызваны именно вирусами гриппа А.

Род Influenzavirus B (вирус гриппа В). Его геном также состоит из 8 сегментов. В основном инфицирует человека, но также выделен от тюленей. Он может вызывать тяжелое заболевание, однако в целом менее опасен, чем вирусы гриппа А.

Род Influenzavirus C (вирус гриппа С). Геном этого вируса состоит из 7 сегментов. Выделен от человека и свиней. По строению он отличается от вируса гриппа А и вируса гриппа В и вызывает легкое респираторное заболевание.

Род Isavirus. Типовой вид рода — вирус инфекционной анемии лососевых рыб (англ. *Infectious Salmon Anemia Virus*, ISAV), имеет геном из 8 сегментов. Он реплицируется в ядрах эритроцитов и вызывает анемию лососевых рыб в рыбоводческих хозяйствах.

Род Thogotovirus (виды *Batken virus*, *Dhori virus* и *Thogoto virus*). Содержит «арбовирусов», которые передаются млекопитающим при укусе клещей или москитов. Вид *Thogoto virus*, геном которого состоит из 6 сегментов, может вызывать энцефалит у человека.

Особенности семейства *Orthomyxoviridae* мы рассмотрим на примере вида *Influenza A virus* (вирус гриппа А).

Грипп (англ., франц. grippe; нем. die Grippe; от франц. gripper — схватывать), известный так же, как ***инфлюэнца*** (англ., франц. influenza; нем. die Influenza; от итал. influenza di freddo — влияние холода; в *Италии в середине XVIII в. причиной этой болезни считали переохлаждение*), — одно из самых грозных эпидемических заболеваний, которое унесло миллионы человеческих жизней.

Судя по эпиграфическим памятникам, гриппом болели еще в Древнем Египте. «Отец» медицины Гиппократ в 412 г. до н. э. описал симптомы заболевания, соответствующего современному гриппу. В конце XV в. во время междоусобной войны Алой и Белой роз эпидемия «английской потовой горячки» охватила противоборствующие армии, локально вызвав 90%-ную смертность. Эпидемии гриппа охватывали Британские острова в 1506, 1518, 1529 и 1530 годах, тогда же возбудитель проник в Европу.

Во время эпидемии 1729 г. в больших европейских городах от гриппа умерло по 50–100 тыс. человек. В 1742–1743 гг. очагом гриппозной пандемии стал Апеннинский п-ов; тогда же болезнь была названа инфлюэнцей. Свое современное название грипп получил в 1850 г. во время глобальной эпидемии (пандемии), охватившей Европу, Азию и Африку. Особенно тяжелой была пандемия гриппа-испанки, начавшаяся весной 1918 г. (см. ниже).

Несмотря на столь драматические проявления патогенеза, вирус гриппа во многих отношениях является характерным представителем мира вирусов. Как говорят вирусологи, «если вы понимаете грипп, вы понимаете вирусологию». Важно, что вирусы гриппа хорошо культивируются в эмбрионах птиц и клеточных культурах; для их выделения из клинического материала чаще всего используют клеточную культуру MDCK (см. раздел 6.3). Существуют и модельные объекты (мелкие и крупные жи-

вотные — мыши, обезьяны и хорьки), на которых изучают гриппозную инфекцию, а также тестируют противогриппозные вакцины и химические препараты.

Строение вириона. На негативно контрастированных препаратах видно, что вирионы вируса гриппа А (диаметр 100–120 нм) покрыты «шипами» поверхностных рецепторов (рис. 100). Помимо округлых частиц при выходе из клетки в результате отпочкования могут образовываться нитевидные вирионы длиной до нескольких микрометров. Для вирионов вируса гриппа птиц характерна округлая форма, а для вирионов вирусов гриппа человека и свиньи — нитевидная (примером служит пандемический вирус «свиного» гриппа pH1N1/2009).

Неизвестно, имеет ли нитевидная форма вириона какое-то значение для инфекционного процесса. Возможно, это дает преимущество тем вирусам, которые размножаются в легких (в то время как вирусы гриппа птиц репродуцируются в кишечнике) — нитевидные частицы способны заражать клетки мелких бронхиол, что способствует быстрой диссеминации вируса.

Вирионы окружены мембранной оболочкой, в основе которой находится фрагмент билипидного слоя, «позаимствованный» у клетки хозяина. Его липидный состав соответствует рафт-микродоменам (англ. raft microdomains — микродомены-плотики; *участки мембраны, содержащие холестерол, гликолипиды, сфинголипиды и белковые рецепторы; они более упорядочены и плотнее упакованы, чем окружение, хотя свободно плавают в билипидном слое; это центры сборки сигнальных молекул, которые влияют на жидкостное состояние мембраны, регулируют передачу нервного импульса и т. д.*). Оболочку вирионов пронизывают рецепторные белки — гемагглютинин (англ. **h**emagglutinin, HA) и нейраминидаза (англ. **n**eur**a**minidase, NA). Молекула гемагглютинина состоит из трех идентичных субъединиц, молекула нейраминидазы — из четырех.

HA склеивает между собой (агглютинирует) эритроциты, что объясняет название этого белка. Он адсорбируется на остатках сиаловых (N-ацил-нейраминовых) кислот в составе мембранных гликопротеинов и способствует слиянию вирусной мембраны с мембраной эндосомы. В свою очередь, NA разрушает муциновый слой,

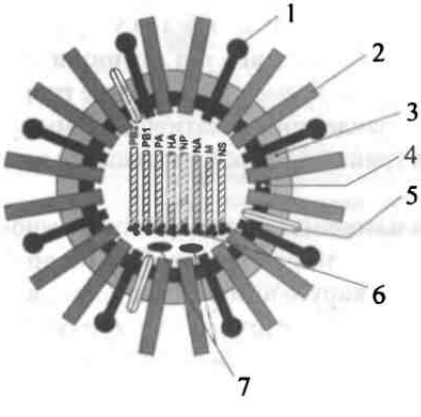


Рис. 100. Схема вириона вируса гриппа А (по: de Jong, 2000).

Внутри частицы — сегменты рибонуклеопротеина (РНП 1–8); каждый состоит из молекулы ssРНК, покрытой белком NP, и полимеразного комплекса из белков PB1/PB2/PA. Обозначения продуктов генов приведены над сегментами.

1 — нейраминидаза; 2 — гемагглютинин; 3 — билипидный слой, позаимствованный у клетки хозяина; 4 — белок матрикса; 5 — белок ионного канала; 6 — полимеразный комплекс; 7 — белок экспорта РНП из ядра.

что облегчает доступ вирусных частиц к поверхности эпителиальных клеток, а также отщепляет остатки сиаловых кислот от мембранных гликопротеинов, способствуя отпочкованию вирусного потомства.

HA и NA заякориваются в оболочке вириона благодаря гидрофобно-гидрофильным взаимодействиям с ее липидными и белковыми компонентами (трансмембранный домен HA в основном состоит из неполярных аминокислот, тогда как в наружной глобулярной «головке» преобладают полярные аминокислоты). Помимо гидрофобно-гидрофильных взаимодействий существенную роль в стабилизации вирусных рецепторов играет связь цитоплазматических доменов HA и NA с матриксным белком M1, выстилающим изнутри оболочку вириона. Кроме HA и NA в состав оболочки вируса гриппа A входит несколько молекул матриксного белка M2, образующих протонный канал.

Внутри вириона находится генетический материал — восемь рибонуклеопротеиновых сегментов (РНП). Каждый из них состоит из молекулы ssРНК(–), стабилизированной РНК-связанным «ядерным» белком (англ. nuclear protein, NP), и полимеразного комплекса (белки PB1, PB2 и PA). Сегменты имеют разную длину в зависимости от размера молекулы РНК, которая содержит спаренные основания на одном конце и шпильку на другом. Безотносительно конфигурации вириона (округлой или нитевидной) он содержит только один комплект сегментов. Сегменты образуют пучок, в котором один из них занимает центральное положение, а другие его окружают. В состав вирионов также входит белок Nep (сокр. англ. **n**uclear **e**xport **p**rotein), отвечающий за выведение геномов вирусного потомства из ядра клетки.

Частицы вирусов гриппа A и B устроены в целом сходно и содержат по восемь геномных сегментов; различие между ними заключается в том, что роль протонного канала у вируса гриппа B выполняет белок BM2, не чувствительный к ремантадину (см. ниже).

Вирус гриппа C имеет не восемь, а только семь геномных сегментов и не содержит нейраминидазу, отсутствие которой компенсируется многофункциональным белком HEF (сокр. англ. **h**emagglutinine-**e**sterase-**f**usion), который отвечает за прикрепление вирусных частиц к клеткам-мишеням, отщепление остатков нейраминовых кислот и слияние мембраны вириона с мембраной эндосомы. На негативно контрастированных препаратах видно, что рецепторы вируса гриппа C образуют гексагональную решетку на поверхности вирионов; адсорбированные вирионы вируса гриппа C сплетаются в шнуры, отходящие от поверхности клетки. Роль протонного канала вируса гриппа C играет белок CM2, закодированный в шестом сегменте генома.

Строение генома. Как уже упоминалось, геном вируса гриппа A состоит из 8 сегментов; на 3′-конце и 5′-конце он содержит взаимно комплементарные последовательности (англ. pan-handle motif — главный мотив рукояти), за счет которых образуются большие шпильки. Предполагается, что РНК-полимеразные комплексы присоединяются к основанию каждой такой шпильки.

Отдельные сегменты генома вируса гриппа кодируют по 1–2 белка (см. табл. 24).

Вирусные мРНК транскрибируются с соответствующих сегментов вирусной полимеразой; мРНК для белков M2 и Nep образуются в результате альтернативного сплайсинга.

Все белки, за исключением NS1 и PB1-F2, являются структурными; белок PB1-F2 имеется не у всех вирусов гриппа, его синтез обеспечивается присутствием внутренней рамки считывания в гене PB1 (см. ниже).

Таблица 24. **Белки, кодируемые сегментами генома вируса гриппа***

Сегмент генома	Белок	Функция белка
PB2	PB2 (сокр. англ. polymerase basic protein 2)	Катионная субъединица полимеразного комплекса
PB1	PB1 (сокр. англ. polymerase basic protein 1)	Катионная субъединица полимеразного комплекса; обладает эндонуклеазной активностью; отщепляет хозяйские кэпы при синтезе вирусных мРНК
	PB1-F2 (виропорин)	Синтезируется в макрофагах; локализован в оболочке митохондрии; стимулирует апоптоз инфицированных клеток
PA	PA (сокр. англ. polymerase acidic protein)	Анионная субъединица полимеразного комплекса
HA	HA (гемагглютинин)	Вирусный рецептор; распознает сиаловые кислоты; способствует слиянию вирусной мембраны с мембраной эндосомы
NP	NP (сокр. англ. nuclear protein)	РНК-связывающийся белок; предохраняет РНК от разрушения; функционирует как часть полимеразного комплекса
NA	NA (сокр. англ. neuraminidase)	Вирусный рецептор; облегчает диффузию вирионов в слое эпителиального гликокаликса; отщепляет остатки сиаловых кислот от клеточной мембраны, способствуя отпочкованию вирионов
M	M1 (сокр. англ. matrix protein 1)	Заполняет пространство между оболочкой и нуклеокапсидом; определяет форму вириона; Zn-содержащая форма белка M1 участвует в экспорте вирусных РНП из ядра в цитоплазму
	M2	Ионный (протонный) канал; снижает pH внутри вириона, обеспечивая высвобождение вирусного генома в цитоплазму; стабилизирует конформацию HA при его нахождении в аппарате Гольджи
NS	NS1 (сокр. англ. nonstructural protein 1)	Подавляет врожденный иммунный ответ хозяина, блокируя внутриклеточный сигналинг; препятствует апоптозу инфицированных клеток
	Nep (сокр. англ. nuclear export protein)**	Обеспечивает экспорт вирусных РНП из ядра в цитоплазму в комплексе с Zn-связанной формой белка M1

* Сегменты расположены в порядке убывания молекулярной массы. ** Белок Nep вначале обозначался как NS2, поскольку его считали неструктурным белком.

Важную роль в изучении вируса гриппа сыграла «обратная» генетика (т. е. синтез ДНК на РНК-матрице с помощью обратной транскриптазы; преобразование РНК-генома в плазмидную форму позволило манипулировать ДНК, комплементарной вирусной геномной РНК).

В 1999 г. английская группа Эрвина Фодора (E. Fodor) и американская группа Габриели Нойманн (G. Neumann) независимо друг от друга проклонировали 8 сегментов генома вируса гриппа в 8 плазмидах. Оказалось, что для получения инфекционного потомства вируса необходимо дополнительно ввести в клетку еще 4 плазмиды, кодирующие белки полимеразного комплекса (PA, PB1, PB2 и NP). При помощи такой

12-плазмидной системы можно получать произвольных реассортантов, комбинируя сегменты генома разных вирусов гриппа, а также исследовать функцию индивидуальных белков, вводя нуклеотидные замены в реплику вирусного генома.

Цикл репродукции. Онтогенез вируса гриппа начинается с адсорбции вирионов на клеточной поверхности. Мишени «узнаются» благодаря специфическому взаимодействию между HA и сиаловыми кислотами на поверхности эпителия верхних отделов дыхательных путей. Затем частицы вируса проникают в клетки хозяина путем эндоцитоза, причем вирус гриппа использует как клатрин-опосредованный эндоцитоз, так и эндоцитоз, не зависящий от клатрина или кавеолина.

Поскольку сиаловые кислоты входят в состав очень многих мембранных гликопротеинов, сложилась парадоксальная ситуация — клеточные рецепторы, ответственные за проникновение вируса гриппа, одного из самых изученных вирусов, до сих пор неизвестны. Предполагается, что ими могут быть рецепторы липопротеинов высокой и низкой плотности, соответственно, HDLR и LDLR (сокр. англ. high density & low density lipoprotein receptor).

Содержимое эндосомы закисляется с помощью протонной помпы (V-АТФазы); при pH ≤5,5–6,0 изменяется конформация HA, и на его поверхность выдвигаются «пептиды для слияния» (англ. fusion peptide), которые внедряются в мембрану эндосомы. Благодаря кооперации нескольких комплексов HA оболочка вириона сливается с мембраной эндосомы. Однако для высвобождения вирусного генома недостаточно, чтобы pH внутри эндосомы снизился — необходимо, чтобы он снизился еще и внутри вириона, что происходит благодаря присутствию протонного канала (его образует белок M2). В результате закисления полости вириона связь РНП с матриксным белком M1 нарушается, и геном вируса высвобождается в цитоплазму.

Сегменты генома вируса гриппа содержат множественные сайты ядерной локализации, которые обеспечивают таргетинг в ядро. Там вирусные РНК-полимеразы, ассоциированные с каждым сегментом, синтезируют вирусные мРНК. Кэпирование осуществляется с использованием хозяйских кэпов (механизм «cap-snatching»), которые отщепляются от клеточных пре-мРНК под воздействием PB1-субъединицы полимеразного комплекса (она обладает эндонуклеазной активностью). В качестве праймера для синтеза вирусных мРНК используются нетранслируемые участки на 3′-концах геномных сегментов. Сигналами для терминации транскрипции, а также для полиаденилирования мРНК служат поли-U последовательности на 5′-концах геномных РНК.

Вирусные мРНК, кодирующие белки M2 и Nep, подвергаются сплайсингу (необходимость в нем — одна из причин того, почему вирус гриппа реплицируется в клеточном ядре). Готовые вирусные мРНК выходят в цитоплазму и там транслируются, причем в первую очередь образуется ранний белок NS1, закодированный в самом коротком сегменте. Затем он димеризуется и в таком виде функционирует в качестве антагониста клеточного сигналинга, подавляя иммунный ответ хозяина.

Вновь синтезированные вирусные белки NP и Nep доставляются в ядро. Белок NP участвует в работе вирусных репликаз и образовании РНП вирусного потомства. Белки PA, PB1 и PB2 также поступают в ядро (белок PB2 — отдельно, а белки PA/PB1 — в виде гетеродимера).

Окончательная сборка новых полимеразных комплексов происходит в ядре (перед этим часть молекул белка M1 фосфорилируется и за счет «Zn-finger» мотива связывает катионы Zn^{2+}).

При достижении определенной концентрации белка NP вирусные полимеразы переключаются с транскрипции на репликацию. Вначале образуется репликативный интермедиат — некэпированная и неполиаденилированная ssРНК(+), на которой затем синтезируется комплементарная ей ssРНК(–) вирусного потомства.

Сегменты генома переносятся из ядра в цитоплазму при помощи клеточных транспортных белков-экспортинов (англ. exportin; *представитель молекулярного семейства кариоферинов, в которое входят экспортины и импортины, обеспечивающие транспорт белков и других макромолекулярных субстратов между ядерным и цитоплазматическим компартментами*), а также при помощи вирусного белка Nep и Zn-содержащей формы белка M1.

Вирусные гликопротеины HA и NA подвергаются посттрансляционному процессингу в аппарате Гольджи, гликозилируются и экспонируются на цитоплазматической мембране в виде островков, ассоциированных с raft-микродоменами. Тетрамерный белок M2 подвергается процессингу в аппарате Гольджи, где он выполняет важную функцию — повышает pH в его цистернах, что стабилизирует структуру HA.

Сборка вирионов происходит на клеточной мембране. С цитоплазматическими доменами HA и NA связывается белок M1 (в форме без Zn^{2+}), затем к ним прикрепляется РНП вирусного потомства, что служит сигналом для начала отпочкования. Как уже отмечалось, форму частиц (округлые либо нитевидные) в основном определяет белок M1. Нитевидные частицы при отпочковании захватывают из цитоплазмы некоторое количество актина.

NA отщепляет остатки сиаловых кислот от гликопротеинов, расположенных на участке отпочкования; вирусная частица отделяется от клеточной мембраны и окончательно созревает, превращаясь в инфекционно-активный вирион.

Этап созревания заключается в расщеплении пре-HA на две субъединицы (HA1 и HA2), в результате чего белок HA приобретает функционально активную конформацию. Процессинг пре-HA осуществляется разными протеазами. У высокопатогенных штаммов это делают эндогенные протеазы типа фурина (англ. furin; *принадлежит к семейству субтилизинподобных «конвертаз»; процессирует белки-предшественники в биологически активную форму; название происходит от* ***FES upstream region****, поскольку ген этой протеазы находится в upstream-положении по отношению к онкогену FES; синоним —* ***paired basic amino acid cleaving enzyme****, PACE*). В результате частицы вирусного потомства выходят из клетки уже инфекционно-активными. У низкопатогенных штаммов пре-HA расщепляется вне клетки трипсиноподобными экзопротеазами; в этом случае вирионы после высвобождения проходят длительную стадию созревания. В зависимости от характера нуклеотидной последовательности в сайте расщепления молекулы пре-HA используется та или иная протеаза.

Борьба с иммунным ответом хозяина. Репродукция вируса гриппа подавляется на ранней стадии в основном с помощью системы интерферона (см. раздел 1.7.5).

Вначале индукторы интерферона, в частности вирусная ssRNA, распознаются TLR-рецепторами. В результате этого активизируется транскрипция генов интер-

ферона и запускается комплекс реакций, направленных на подавление репродукции вируса. В числе прочего стимулируется синтез интерферонов I типа, служащих медиаторами «сигнала вирусной атаки», который передается соседним клеткам.

За подавление иммунного ответа отвечает неструктурный белок NS1, который в большом количестве синтезируется в самом начале инфекционного цикла (делеционные мутанты по гену NS могут размножаться только в клетках, дефектных по системе интерферона).

В зараженной клетке димер белка NS1 (содержит РНК-связывающий и эффекторный домены) находится преимущественно в ядре и выполняет ряд функций. РНК-связывающий домен маскирует короткие участки dsРНК (образующиеся при синтезе вирусных РНК). Клеточные TLR-рецепторы перестают узнавать репликативные интермедиаты вируса, в результате чего блокируется сигнальный каскад, активирующий протеинкиназу PKR. Кроме того, белок NS1 связывает и инактивирует цитоплазматические противовирусные факторы OAS и RIG-I, что препятствует передаче сигнала по каскаду RIG-I/IPS-1 (см. раздел 1.7.5).

Наконец, белок NS1 блокирует процессинг клеточных пре-мРНК, в результате чего синтез интерферонов IFN-α/IFN-β подавляется на посттранскрипционном уровне. Механизм данного явления обусловлен связыванием эффекторного домена с клеточным белком PABPII (сокр. англ. **poly**a**d**enine **b**inding **p**rotein **II**; *регуляторный белок, контролирующий скорость, с которой полиаденин-полимераза PAP присоединяет адениловые нуклеотиды к 3′-концу вновь синтезированной пре-мРНК*). Кроме того, эффекторный домен связывается с клеточным белком CPSF30 (сокр. англ. **c**leavage and **p**olyadenylation **s**pecificity **f**actor **30**; *белок молекулярной массой 30 кДа, одна из субъединиц полиаденилирующего комплекса млекопитающих; он помогает освобождению 3′-конца транскрипта при терминации, присоединяется к пре-мРНК и способствует полиаденилированию*).

Подавление внутриклеточного сигналинга белком NS1 проявляется в том, что инфицированные клетки теряют способность к апоптозу. Напомним, что ранняя гибель клетки служит одним из эффективных способов борьбы организма с вирусной инфекцией (см. раздел 1.7.4).

Белок NS1 не только подавляет, но и замедляет развитие иммунного ответа. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что он снижает уровень противовоспалительных цитокинов TNF-α и IL-6, препятствуя созреванию дендритных клеток и их миграции в региональные лимфатические узлы.

В гене белка PB1 вируса гриппа A недавно выявлена дополнительная рамка считывания F2, которая кодирует белок PB1/F2. Она имеется только у некоторых высокопатогенных штаммов, например у «испанки». Продуктом трансляции соответствующей мРНК служит белок виропорин (90 а.о.), который накапливается в цитоплазме и стимулирует апоптоз инфицированных клеток в результате образования пор в оболочке митохондрий. Белок PB1/F2 синтезируется преимущественно в макрофагах, что препятствует их участию в иммунном ответе.

Патогенез. В зависимости от штамма, вызвавшего заболевание, и состояния организма хозяина патогенность вируса гриппа варьирует в широких пределах. Обычный «сезонный» грипп (англ. seasonal flu), вызываемый низкопатогенными штаммами, за-

трагивает только верхние отделы дыхательных путей. В свою очередь, высокопатогенные штаммы проникают в нижние отделы дыхательных путей, вызывая обширное поражение легких. Самые патогенные варианты вируса гриппа человека, например «испанка», способны поражать разные типы клеток, в частности клетки эндотелия.

Значительная доля летальных исходов при гриппе обусловлена присоединившейся бактериальной пневмонией (одним из факторов, стимулирующих развитие этой инфекции, служит накопление белка PB1/F2). Однако грипп может вызывать и так называемую «первичную» вирусную пневмонию с отеком легких. Летальность сезонного гриппа варьирует в пределах 0,1–0,2%; во время пандемии «испанки» летальность составляла 2–5%.

Антигенные свойства. В ответ на гриппозную инфекцию в организме млекопитающих образуются антитела практически ко всем белкам вируса. Однако нейтрализующими свойствами обладают только антитела к HA и, в значительно меньшей степени, к NA. Антитела к NP и другим белкам необходимы для формирования Т-клеточного иммунного ответа, однако они не являются нейтрализующими.

В настоящее время у вирусов гриппа А известно 16 подтипов HA (H1–H16) и 9 подтипов NA (N1–N9), которые могут давать разные сочетания. Теоретически возможно образование 144 (16×9) подтипов вируса гриппа А (H1N1, H3N2, H5N1 и т. д.), однако в действительности встречаются только некоторые из них. Так, у человека известно три подтипа вируса гриппа А (H1N1, H2N2 и H3N2), возникших в разное время в результате интродукции вирусов гриппа птиц или части его генов в человеческую популяцию.

Ограниченное число подтипов вирусов гриппа человека, скорее всего, объясняется узким набором хозяйских рецепторов. Циркулирующие в человеческой популяции вирусы постоянно подвергаются давлению со стороны «коллективного» иммунитета, обусловленного присутствием в крови переболевших людей нейтрализующих антител.

Однако вирусы гриппа, как и другие РНК-содержащие вирусы, очень быстро изменяются. Под воздействием «коллективного» иммунитета происходит отбор антигенных вариантов, избегающих воздействия со стороны нейтрализующих антител. Это явление называется «антигенным дрейфом» (англ. antigenic drift) и на молекулярном уровне выражается в изменении структуры HA в области так называемых антигенных сайтов (места адсорбции нейтрализующих антител на головке HA). Антигенный дрейф требует заменять антигриппозные вакцины едва ли не ежегодно.

Исключительно высокая изменчивость антигенных свойств вируса гриппа отличает его от более стабильных в этом отношении вирусов, например от вируса кори или вируса полиомиелита (необходимость заменять противокоревые вакцины возникает очень редко — один раз на протяжении десятилетий, и только в связи с появлением атипичных штаммов).

Антигенный дрейф — не единственный механизм изменчивости вируса гриппа. Резкое изменение его антигенных свойств называют «антигенным сдвигом» (англ. antigenic shift). Все пандемии гриппа были вызваны интродукцией в человеческую популяцию новых антигенных вариантов, которые, как показал генетический анализ, были реассортантами вирусов гриппа человека и гриппа птиц. Поскольку в челове-

ческой популяции иммунитет к новым вирусам гриппа отсутствовал, их появление каждый раз приводило к пандемиям (табл. 25).

Причиной самой страшной пандемии (1918–1919) стал вирус «испанки», завезенный на театр военных действий Первой мировой войны американским экспедиционным корпусом; за полгода в союзных войсках от неизвестной «лихорадки» умерло около 12 тыс. человек.

Заболевание быстро распространилось по территории воюющих стран, в том числе Российской империи. Название «испанка» (англ. Spanish flu — испанская инфлюэнца), по одной версии, появилось после газетного сообщения о болезни короля Испании. По другой версии, военная цензура засекречивала статистические данные об эпидемии, однако сведения просочились в печать соблюдавшей нейтралитет Испании.

Первая волна «испанки» была зафиксирована в марте 1918 г. в США и Европе. Затем вирус стремительно распространился по всему миру и осенью 1918 г. вызвал вторую, более масштабную, волну заболевания. Оно характеризовалось особо высокой смертностью. Весной 1919 г. за ней последовала третья, меньшая, волна.

По общим оценкам от «испанки» умерло до 40 млн человек. Особенностью пандемии была высокая смертность среди заболевших в возрасте 20–40 лет. Характерная черта «испанки», отмеченная многими врачами, — множественные внутренние кровоизлияния, вызванные поражением эндотелия (вирус проникал в кровь из пораженных легких).

Таблица 25. **Разнообразие и происхождение вирусов гриппа, вызвавших пандемии в XX — начале XXI в.**

Год начала пандемии	Подтип вируса	Происхождение подтипа
1918	H1N1 («Spanish flu» — «испанка»)	Неизвестно; гены HA и NA унаследованы от вируса гриппа птиц; остальные гены не имеют сходства с генами современных вирусов птиц
1957	H2N2 («Asian flu» — «азиатский» грипп)	Гены HA, NA и PB1 унаследованы от вируса гриппа птиц; остальные гены — от вируса гриппа H1N1 человека
1968	H3N2 («Hong Kong flu» — грипп «Гонконг»)	Гены HA и PB1 унаследованы от вируса гриппа птиц; остальные гены — от вируса гриппа H2N2 человека
2009	H1N1 («Swine flu» — «свиной» грипп)	Гены M1 и NA унаследованы от вируса гриппа европейских свиней; гены HA, NP и NS — от вируса гриппа североамериканских свиней; гены PA и PB2 — от гриппа птиц; гены P1 — от вируса гриппа H3N2 человека

До недавнего времени о свойствах вируса «испанки» ничего не было известно, за исключением подтипа (H1N1). Ситуация в корне изменилась после того, как группа американских вирусологов во главе с Джеффри Таубенбергером (J. K. Taubenberger) и Энн Рейд (A. Reid) реконструировала его геном. Для этого использовался законсервированный в 1918 г. материал легочной ткани умерших от «испанки» американских волонтеров Роско Вогана (R. Vaughn) и Джеймса Даунса (J. Downs), а также легочной ткани жительницы Аляски (имя неизвестно).

Реконструированный вирус преподнес исследователям ряд сюрпризов. Он обладал высокой патогенностью для лабораторных животных, причем без предварительной адаптации к хозяину. Путем изучения реассортантов с низкопатогенными вирусами гриппа было установлено, что основные детерминанты патогенности «испанки» локализуются в генах HA, NA и PB1.

Филогенетический анализ дал неоднозначный ответ на вопрос о происхождении вируса «испанки». Одна из версий — это непосредственная интродукция вируса гриппа птиц в человеческую популяцию. Следует отметить, что возникновение «испанки» совпало с концом Первой мировой войны (возможно, что появлению вируса, обладавшего высокой патогенностью для человека, способствовали специфические условия военного времени). Если обратиться к аналогичным примерам возникновения других особо опасных вирусных инфекций (инфекции вызываемые бетанодавирусами у рыб, дицистровирусами у креветок, калицивирусами у кроликов и т. д.), то можно предположить, что локальным очагом возникновения «испанки» мог быть переполненный военный госпиталь, где находились молодые люди с огнестрельными ранениями легких. Дополнительным фактором, способствующим проникновению вируса в кровяное русло, могло быть лечение аспирином (повышающим проницаемость сосудов), который в то время применялся исключительно широко и в огромных дозах.

Экология. Вирусы гриппа А были выделены не только от человека, но и от других млекопитающих, а также от птиц. Полагают, что основным резервуаром вирусов гриппа А в дикой природе являются птицы околоводного комплекса — гуси, кулики, утки и чайки. У птиц (имеется в виду совокупность видов) наблюдается наибольшее разнообразие антигенных вариантов вируса. От птиц были выделены вирусы всех 16 подтипов HA и 9 подтипов NA.

В природе грипп птиц — это легкая кишечная инфекция, с которой птенцы впервые сталкиваются в местах скопления стай, готовящихся к осеннему перелету. Вирус размножается в кишечнике и не затрагивает другие органы. При широком скрининге в 2005–2009 гг. в популяциях диких птиц высокопатогенные варианты вируса гриппа не были обнаружены. Среди вирусологов господствует мнение, что патогенные варианты (вроде H5N1, вызвавшего вспышки эпидемии в 1997–2005 гг.) возникают на птицефабриках в результате заноса низкопатогенных вирусов из внешней среды.

Гораздо меньшее разнообразие антигенных вариантов наблюдается среди вирусов гриппа свиней, который, за исключением редких случаев, вызывает у этих животных легкое респираторное заболевание. Более серьезная проблема для ветеринаров — это грипп лошадей и, в последние годы, грипп собак. Как уже отмечалось, у человека известны вирусы гриппа только подтипов H1N1, H2N2 и H3N2. Адаптированные к хозяину варианты, годами циркулирующие в человеческой популяции, вызывают эпидемии «сезонного» гриппа, которые обычно начинаются в холодное время года и продолжаются примерно 10 недель.

Вирусы гриппа обычно характеризуются узкой видовой специфичностью. Вирусы человека могут заражать свиней (и наоборот), но, как правило, недостаточно эффективно передаются в новом хозяине. Вирусы птиц способны вызывать заболевание

у человека при проникновении в нижние отделы дыхательных путей, но при этом заболевшие не заражают окружающих.

Специфичность по отношению к хозяину в первую очередь определяется способностью гемагглютинина «узнавать» определенные сиаловые кислоты на поверхности клеток хозяина (в соответствии с их доминирующим типом). В частности, вирусы гриппа человека распознают сиаловые кислоты, присоединенные посредством α2→6 связи к полисахаридным цепочкам на поверхности клеток; вирусы гриппа уток — сиаловые кислоты, присоединенные посредством α2→3 связи. Поскольку на поверхности эпителиальных клеток свиньи присутствуют сиаловые кислоты обоих типов, предполагается, что эти животные служат «смесительным сосудом», т. е. источником появления новых реассортантов. Эпидемия 2009 г. подтверждает это. Вирус так называемого «свиного» гриппа оказался тройным реассортантом, ведущим происхождение от вирусов гриппа свиньи, человека и птиц.

Исследования показали, что виды птиц могут различаться по типу доминирующих рецепторов. Утки обладают рецепторами только α2→3 типа, а куриные (отряд *Galliformes*), в том числе перепела, — рецепторами обоих типов.

Специфичность вирусов гриппа никогда не бывает абсолютной, напротив, они, как правило, способны репродуцироваться в организме многих видов животных в отсутствие явных симптомов заболевания. Однако при определенных условиях бессимптомная инфекция может перерасти в тяжелую. Благоприятными для вируса может быть стресс, какое-либо сопутствующее заболевание, а также вызванное вакцинацией понижение иммунного статуса. Например, случаи гибели тигров от гриппа птиц H5N1 в зоопарках Юго-Восточной Азии были связаны с вакцинацией против вируса панлейкопении кошек. При тяжелых формах заболевания вирус может за один-два пассажа адаптироваться к новому хозяину, если при этом поблизости в достаточном количестве оказываются восприимчивые особи.

Антивирусные препараты. Существует несколько классов химиопрепаратов, активных в отношении вирусов гриппа. Одними из первых были открыты препараты адамантанного ряда, к которым относятся амантадин и ремантадин. Это небольшие амфифильные молекулы с гидрофобным адамантанным ядром и протонированной аминогруппой. Они блокируют протонный канал, образованный белком M2. Оба препарата действуют в основном на стадиях проникновения и раздевания вируса. Аминогруппа ремантадина затягивается в протонный канал, и он необратимо блокируется гидрофобным адамантанным ядром. Подавление данной функции белка M2 приводит к тому, что вирусный геном не высвобождается в цитоплазму, и при слиянии поздних эндосом с лизосомами вирионы разрушаются лизосомными ферментами. В итоге из-за блокирования протонного канала выход вирусного потомства резко снижается.

Недостаток препаратов адамантанного ряда состоит в том, что к ним быстро вырабатывается резистентность. Например, замена в первичной последовательности белка M2 остатка Ser-31 на Asn приводит к снижению чувствительности вируса гриппа A к ремантадину. Пандемический вирус гриппа 2009 г. («свиной» грипп) уже имел эту замену и поэтому оказался устойчив к ремантадину. Препараты адамантанного ряда не действуют на вирусов гриппа B, поскольку их ионный канал устроен иначе, чем у гриппа A.

Ко второму, более распространенному, классу антигриппозных препаратов относятся ингибиторы NA, в частности занамивир («Реленца») и озельтамивир («Тамифлю»). Они являются структурными аналогами сиаловых кислот и необратимо связываются с активным центром NA. В соответствии с функцией NA эти препараты действуют на поздней стадии цикла репродукции вируса, блокируя отсоединение вирионов от цитоплазматической мембраны. Ингибиторы NA действуют и на вирусов гриппа А, и на вирусов гриппа В. Резистентность к ингибиторам NA приобретается гораздо медленнее, чем к ремантадину. Тем не менее по данным ВОЗ в конце 2009 г. ~99% циркулирующих штаммов вируса гриппа H1N1 было устойчиво к озельтамивиру.

Практический вывод таков: перед приемом антивирусного препарата необходимо иметь представление о том, чувствителен ли к нему циркулирующий штамм вируса или нет.

Помимо ингибиторов NA и блокаторов ионного канала, образованного капсидным белком M2, существуют менее специфические препараты, например арбидол, который одновременно является ингибитором гемагглютинина и слабым индуктором интерферона. Среди неспецифических препаратов следует упомянуть такие, как ингавирин и триазавирин.

Вакцины против гриппа. Из-за высокой вариабельности вирусов гриппа необходимо постоянно следить за антигенными свойствами циркулирующих штаммов и ежегодно корректировать состав вакцин. На данный момент наиболее распространены «субъединичные» вакцины, приготовленные из очищенных поверхностных белков вируса гриппа. К ним относятся отечественная вакцина «Гриппол», а также импортные вакцины «Агрипал» и «Инфлювак». Субъединичные вакцины индуцируют образование антител с высоким титром, однако обладают узкой направленностью, т. е. они эффективны только в отношении штаммов, на основе которых были приготовлены. Более широким спектром действия характеризуются живые атенуированные вакцины, например отечественная вакцина на основе штамма А/Ленинград/76.

6.6.5.2. Семейство *Paramyxoviridae*

Название этого семейства (греч. para — в стороне) отражает как сходство, так и значительное отличие от семейства *Orthomyxoviridae*. Семейство *Paramyxoviridae* — одно из самых многочисленных и пополняемых новыми представителями. Как правило, первичным признаком принадлежности к нему служит спиральная форма нуклеокапсида, выявляемая на электронно-микроскопических препаратах.

Парамиксовирусные инфекции обычно сопровождаются ярко выраженными клиническими проявлениями и могут приводить к заболеванию с летальным исходом; случаи массовой гибели наземных и морских млекопитающих в дикой природе часто связаны именно с вирусами данного семейства.

Структура семейства. Семейство *Paramyxoviridae* подразделяется на подсемейства *Paramyxovirineae и Pneumovirineae*. Представители подсемейства *Paramyxovirineae,* как правило, вызывают системные поражения, а вирусы подсемейства *Pneumovirineae* — респираторные инфекции, часто переходящие в хроническую фор-

му. Между этими подсемействами имеются и другие различия, например у вирусов подсемейства *Paramyxovirineae* более толстый жесткий нуклеокапсид, чем у вирусов подсемейства *Pneumovirineae*

Важнейшими родами подсемейства *Paramyxovirineae* являются *Avulavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* и *Rubulavirus*.

Род Avulavirus (от лат. **av**is — птица, **ul**cer — язва и **la**ryngitis — ларингит). К нему относятся парамиксовирусы птиц. Типовой вид — вирус ньюкасльской болезни (***Newcastle disease virus***, NDV), впервые выявлен в 1926 г. в городе Ньюкасль (Великобритания). Данная инфекция весьма актуальна для промышленного птицеводства.

Род Henipavirus (от сокр. ***Hendra и Nipah***). Генипавирусы, исключительно опасные для млекопитающих, в том числе для человека, широко распространены в Австралии и Юго-Восточной Азии. Парамиксовирус *Hendra virus* был открыт после того, как в 1994 г. в конно-спортивном комплексе на территории района Хендра (пригород г. Брисбейна, штат Квинсленд, Австралия) он вызвал гибель тренера и 13 лошадей. В свою очередь, парамиксовирус *Hipah virus* привел в 1999 г. к вспышке венерических и респираторных заболеваний в г. Кампун Найпа (штат Негери Сембилан, Малайзия). Природными хозяевами генипавирусов служат растительноядные рукокрылые из рода *Pteropus* (летучие лисицы).

Род Morbillivirus (от лат. **morb**us — мор и англ. **ill**ness). К нему относятся наиболее известные парамиксовирусы млекопитающих — вирус кори (*Measles virus*), вирус чумы копытных (*Rinderpest virus*), вирус чумы мелких копытных (***Peste des petits ruminants virus***, PPRV), вирус чумы плотоядных (***Canine distemper virus***, CDV), вирус чумы тюленей (***Phocine distemper virus***, PhDV), морбилливирусы китообразных (***Cetacean morbillivirus***, CeMV) и др. Многие из них обладают взаимным антигенным родством.

Род Respirovirus. В соответствии со своим названием, эти парамиксовирусы вызывают респираторные заболевания у человека и животных. К данному роду относятся вирусы 1- и 3-го типов парагриппа человека (***Human parainfluenza virus***, PIV1 and PIV3) и вирус парагриппа мышей (***Murine parainfluenza virus***, MPV), или вирус Сендай (*Sendai virus*). Вирус Сендай, впервые выделенный в г. Сендай (о-в Хонсю, Япония) в 1976 г., широко используется для получения гибридов при производстве моноклональных антител.

Род Rubulavirus (от лат. **rub**or — краснота, **ul**cer — язва и **la**rynx — горло). Представители данного рода — вирус эпидемического паротита человека, или свинки (*Mumps virus*), вирусы 2- и 4-го типа парагриппа человека (*Human parainfluenza virus 2 & 4*), а также рубулавирус свиней (*Porcine rubulavirus*).

В подсемейство *Paramyxovirineae* входят рода *Pneumovirus* и *Metapneumovirus*.

Род Pneumovirus. К данному роду относятся бычий респираторно-синцитиальный вирус (***Bovine respiratory syncytial virus***, BRSV), респираторно-синцитиальный вирус человека (***Human respiratory syncytial virus***, HRSV) и пневмовирус мышей (*Pneumovirus of mice*).

Род Metapneumovirus (греч. meta — вместо). Представителями этого рода являются метапневмовирус индеек (*Avian metapneumovirus*) и метапневмовирус человека (*Human metapneumovirus*). Последний по клиническим признакам вызываемого им заболевания практически не отличается от респираторно-синцитиального вируса.

Строение вириона. Геномная РНК парамиксовирусов, связанная с белком N (сокр. англ. **n**ucleocapsid), образует спиральный нуклеокапсид, структура которого отчетливо выявляется на негативно контрастированных препаратах.

Ряд парамиксовирусов имеет полиморфные капсиды размером от 120 нм до 300–400 нм, окруженные липопротеиновой мембраной (рис. 101). Характерной чертой вириона парамиксовирусов служат два поверхностных белка: 1) рецепторный белок, использующийся для прикрепления к клеткам-мишеням; 2) специализированный белок слияния F (сокр. англ. **f**usion), с помощью которого осуществляется слияние вирусной и клеточной мембран.

Рецепторные белки парамиксовирусов сильно различаются по строению и функциям. У вируса кори рецепторным белком служит белок H (сокр. англ. **h**emagglutinin), у вируса парагриппа — белок HN (сокр. англ. **h**emagglutinin–**n**euraminidase), обладающий нейраминидазной активностью; у респираторно-синцитиального вируса — уникальный белок G (сокр. англ. **g**lycosylated), молекулярная масса которого при гликозилировании увеличивается в 2,5 раза.

Белки слияния парамиксовирусов более консервативны. Белок F синтезируется в форме предшественника (F0), который расщепляется хозяйскими протеазами на субъединицы F1 и F2, соединяющиеся затем дисульфидными связями. Мономеры белка F образуют функционально активные тримеры, в центр которых ориентированы гидрофобные домены слияния (~20 а.о.). Помимо двух основных гликопротеинов оболочка вируса RSV и некоторых других парамиксовирусов содержит малый гидрофобный белок SH (сокр. англ. small **h**ydrophobic), который участвует в блокировании апоптоза инфицированных клеток. Мембрана вирионов выстлана матриксным белком M (сокр. англ. **m**atrix). Внутри частицы находится спиральный рибонуклеопротеин (нуклеокапсид), образованный геномной РНК в комплексе с белком N. При разрушении вирионов под воздействием осмотического шока фрагменты нуклеокапсида выходят во внешнюю среду и легко выявляются под электронным микроскопом (рис. 102).

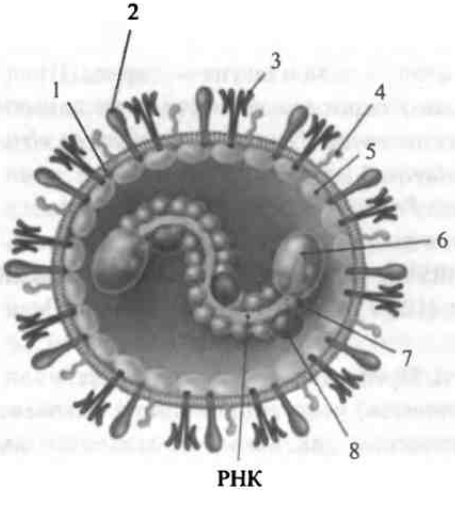


Рис. 101. Схема вириона парамиксовируса (по: Hall, 2001).

1 — билипидный слой; 2 — рецепторный белок HN (у вируса парагриппа PIV3) или рецепторный белок G (у респираторно-синцитиального вируса RSV); 3 — белок слияния F; 4 — малый белок SH (у респираторно-синцитиального вируса RSV); 5 — матриксный белок M; 6 — белок L (РНК-полимераза); 7 — белок N; 8 — белок P (фосфопротеин).

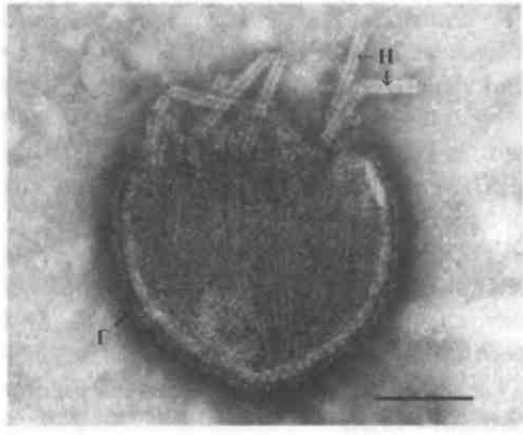


Рис. 102. Вирион вируса парагриппа. Нарушенная оболочка (фотография получена А. К. Сироткиным).

Негативно контрастированный препарат (масштаб — 100 нм).

Н — фрагменты спирального нуклеокапсида; Г — гликопротеины оболочки.

Измерение длины нуклеокапсида вируса Сендай, проведенное с помощью криоэлектронной томографии, показало, что в одну частицу может упаковаться 1–6 геномных копий. Длина нуклеокапсида, содержащего одну геномную копию, составляет ~1 мкм; диаметр нуклеокапсида вируса кори и других представителей подсемейства *Paramyxovirineae* ~20 нм, а диаметр нуклеокапсида представителей подсемейства *Pneumovirineae* ~14 нм.

С нуклеокапсидом связана РНК-зависимая РНК-полимераза, состоящая из большой субъединицы L (сокр. англ. **l**arge) и вспомогательного белка P (сокр. англ. **ph**os**ph**oprotein). Количество полимеразных комплексов, приходящихся на одну частицу, неизвестно; предполагается, что оно в среднем равно числу геномных копий.

Строение генома. Геном парамиксовирусов (~15 тыс. н.) состоит из белок-кодирующих генов и некодирующих межгенных последовательностей.

У представителей подсемейства *Paramyxovirineae* гены расположены в следующем порядке: 3′ — N (ген белка N) — P/C/V (гены фосфопротеина/белка C/белка V) — M (ген белка матрикса) — F (ген белка слияния) — H/HN (гены гемагглютинина/гемагглютинина-нейраминидазы) — L (ген РНК-зависимой РНК-полимеразы) — 5′ (рис. 103).

У представителей подсемейства *Pneumovirineae* (на примере вируса RSV) порядок расположения генов следующий: 3′ — NS1 (ген неструктурного белка 1) — NS2 (ген неструктурного белка 2) — N — P — M — SH (ген малого гидрофобного белка) — G (ген рецепторного белка G) — F — M2 (ген регулятора транскрипции) — L — 5′.

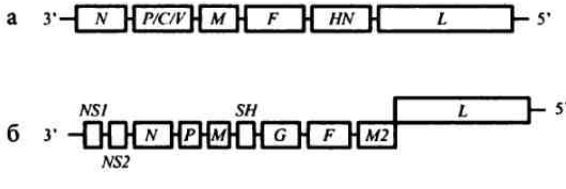


Рис. 103. Геномы парамиксовирусов.

а — геном вируса парагриппа (PIV3; подсемейство *Paramyxovirineae*); б — респираторно-синцитиального вируса (RSV; подсемейство *Pneumovirineae*).

Объяснение в тексте.

Синтез мРНК происходит по так называемому «stop-start» механизму. Нуклеотидная последовательность каждого гена заканчивается стоп-сигналом (англ. gene end signal), в котором имеется полиU-«тракт», состоящий из нескольких уридиловых остатков. РНК-полимеразы парамиксовирусов, в отличие от РНК-полимераз ортомиксовирусов, способны осуществлять кэпирование и полиаденилирование мРНК. РНК-полимераза останавливается на участке полиU и полиаденилирует мРНК, присоединяя несколько десятков остатков А. Следующая за стоп-сигналом межгенная последовательность 3′–GAA–5′ не транскрибируется. Заканчивая транскрипцию гена, полимераза стартует заново и при недостатке субстрата может открепиться от матрицы. Таким образом, чем дальше от 3′-конца расположен ген, тем меньше вероятность его транскрибирования. Вследствие этого концентрация вирусных мРНК в клетке обратно пропорциональна расстоянию соответствующих генов от 3′-конца геномной РНК.

С каждого гена, за исключением гена P, считывается одна мРНК. В процессе транскрипции гена P образуется несколько типов мРНК, которые транслируются с образованием белков P, C и V. Транскрипт, кодирующий белок C, синтезируется путем считывания внутренней ORF со второго старт-кодона, а транскрипт белка V образуется в результате «редактирования» РНК (англ. RNA editing), которое у парамиксовирусов имеет место только у представителей подсемейства *Paramyxovirineae*.

Механизм редактирования РНК похож на механизм полиаденилирования и заключается в том, что РНК-полимераза останавливается на U-богатом сайте (у вируса кори он имеет структуру 3′–YAA$(U)_5$CCC–5′) и присоединяет гуаниловый остаток к мРНК. Это приводит к сдвигу триплета и, соответственно, к образованию разных белковых продуктов. Белки P и V имеют одинаковую аминокислотную последовательность от N-конца до сайта редактирования; богатый цистеином C-конец белка V содержит мотив «цинковых пальцев».

Основная функция белка C (сокр. англ. **c**apsid) и белка V (сокр. англ. **v**irion) состоит в подавлении системы интерферона путем присоединения к транскрипционным факторам STAT1 и/или STAT2 (см. раздел 1.7.5). У представителей подсемейства *Pneumovirineae*, например у вируса RSV, эту функцию выполняют неструктурные белки NS1 и NS2 (сокр. англ. **n**on-**s**tructural), гены которых расположены на 3′-конце геномной РНК и экспрессируются в первую очередь.

Геном некоторых парамиксовирусов (вируса кори, вируса парагриппа, вируса чумы плотоядных, вируса Хендра, вируса Найпа и др.) подчиняется «правилу шести», т. е. число нуклеотидов кратно шести. Дело в том, что одним из компонентов полимеразного комплекса служит белок N, на субъединицу которого приходится ровно шесть нуклеотидов. При несовпадении количества нуклеотидов с числом, кратным шести, репликация вируса значительно тормозится.

Цикл репродукции. Парамиксовирусы размножаются в цитоплазме. Их онтогенез начинается с адсорбции вирионов на клетках хозяина. Вирусы рода *Morbillivirus* (вирус кори, вирус чумы плотоядных и др.) инфицируют лимфоциты и эпителиальные клетки, используя рецепторы SLAM (сокр. англ. **s**ignaling **l**ymphocyte **a**ctivation **m**olecule) и CD46, соответственно. Связывание с рецептором активирует белок F, который обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембран. Вирусный рибонукле-

опротеин проникает в цитоплазму, где RdRP осуществляет транскрипцию генома по «стоп-старт» механизму; как отмечалось, полимеразы парамиксовирусов обладают кэпирующей и полиаденилирующей активностью.

По мере накопления продуктов трансляции вирусных мРНК происходит переключение с транскрипции на репликацию. Вирусная полимераза синтезирует полноразмерную реплику геномной РНК, служащую матрицей для синтеза геномной РНК потомства.

Рибонуклеопротеины вирусного потомства либо упаковываются в вирионы, либо начинают очередной цикл размножения. Поверхностные гликопротеины процессируются в аппарате Гольджи и экспонируются на клеточной мембране. К цитоплазматическим доменам вирусных рецепторов присоединяется белок М, что стимулирует отпочкование вирионов. Процесс отпочкования и упаковки носит малоупорядоченный характер, что проявляется в образовании множества полиплоидных вирионов (по крайней мере, in vitro).

В культуре клеток, инфицированных парамиксовирусом, образуются синцитии. Слияние клеточных мембран обеспечивается вирусным белком F. Свойство белка F парамиксовирусов вызывать слияние клеточных мембран ранее использовали для получения моноклональных антител (синтезирующие антитела мышиные гибридомы конструировали путем слияния спленоцитов с клетками миеломы, опосредованного вирусом Сендай или его белком F). Однако при анализе поражений, вызываемых парамиксовирусами в организме животных, синцитии удается обнаружить крайне редко. По-видимому, in vivo функция белка F проявляется не столько в образовании синцитиев, сколько в эффективном проникновении рибонуклеопротеина вирусного потомства в соседние клетки через поры, образованные этим белком. Таким способом вирус получает возможность распространиться в организме, минуя стадию образования вирионов и избегая воздействия со стороны иммунной системы. Иногда данный процесс называют абортивной инфекцией. В настоящее время появились данные о том, что сборка вирионов и переключение с абортивной инфекции на продуктивную контролируется белком М. Например, вирус подострого склерозирующего панэнцефалита (*Subacute sclerosing panencephalitis virus*, SSPEV; *вариант вируса кори*), имеющий дефектный ген белка М, персистирует и распространяется в центральной нервной системе путем клеточного слияния. Следует отметить, что многие парамиксовирусы вообще «склонны» вызывать у своего хозяина персистентную инфекцию.

Подавление иммунного ответа. Парамиксовирусы используют несколько стратегий подавления иммунного ответа хозяина.

Во-первых, представители рода *Morbillivirus* (вирус кори, вирус чумы плотоядных и т. д.), непосредственно инфицируют клетки иммунной системы, в том числе моноциты, макрофаги и дендритные клетки, используя рецепторы SLAM. По этой причине инфекция сопровождается продолжительной иммуносупрессией и системным поражением органов, что нередко приводит к гибели хозяина.

Во-вторых, на раннем этапе инфекции неструктурные вирусные белки подавляют клеточный сигналинг, в частности активацию генов интерферона. Эту функцию осуществляют белки V/C (у представителей подсемейства *Paramyxovirineae*) и NS1/NS2 (у представителей подсемейства *Pneumovirineae*). Подавление сигналинга про-

исходит путем связывания вирусных белков с проводниками сигнала STAT1/STAT2, а также посредством блокирования киназ, активирующих сигнальные пути. Например, белок V вируса кори служит субстратом фосфорилирования для клеточной киназы IKKα (сокр. англ. **I-k**appa-B **k**inase **α**), препятствуя фосфорилированию клеточного фактора IRF7.

Некоторые парамиксовирусы весьма оригинальным способом подавляют иммунный ответ. Так, вирус RSV образует растворимую форму рецепторного белка G, который связывается с антителами и блокирует опосредованное ими узнавание инфицированных клеток цитотоксическими лимфоцитами. Аналогичный механизм подавления адаптивного иммунного ответа использует вирус Эбола (сем. *Filoviridae*).

Антигенная вариабельность и противовирусный иммунитет. Несмотря на эффективное подавление иммунного ответа на ранней стадии инфекции, парамиксовирусы индуцируют стойкий, часто пожизненный, иммунитет. В отличие от вируса гриппа, постоянно ускользающего от популяционного иммунитета в силу антигенного дрейфа, парамиксовирусы в антигенном отношении более стабильны и однородны. У вируса кори имеется только один серотип (на фоне 20 генотипов).

Относительная антигенная стабильность парамиксовирусов широко используется в производстве вакцин. Включение в состав вакцины одного-двух доминирующих серотипов обеспечивает многолетнюю защиту от заболевания. Более того, между вирусами рода *Morbillivirus* существует антигенное родство, в частности антисыворотка против вируса кори частично нейтрализует вирус чумы плотоядных и наоборот. Ранее это свойство использовалось ветеринарами. Например, при лечении чумы плотоядных («чумки» собак) широко использовался человеческий коревый иммуноглобулин. В свою очередь, первые попытки вакцинации тюленей для предотвращения их массовой гибели предпринимались с использованием коммерческой убитой вакцины против «чумки» собак.

Взаимное антигенное родство морбилливирусов подтверждается результатами филогенетических исследований. Сравнительный анализ РНК вирусов рода *Morbillivirus* показал высокую степень их взаимного сходства. Считается, что все они в недалеком прошлом произошли от общего предка. Предполагается, что массовая гибель тюленей в разных районах мира в 1980–1990-х годах XX в. была вызвана интродукцией вируса чумы плотоядных в популяцию тюленей с последующей адаптацией к новому хозяину.

Разработать эффективную вакцину против всех парамиксовирусов не удается. В течение многих лет непреодолимым препятствием для вакцинологов остается респираторно-синцитиальная инфекция, вызываемая вирусом RSV. Актуальность разработки вакцины обусловлена тем, что он является основной причиной тяжелых бронхитов и бронхиолитов у детей младшего возраста. Вирус RSV обычно персистирует в организме и вызывает аутоиммунные и иммунопатологические реакции, в частности он является одним из факторов, способствующих развитию астмы. У многих пациентов RSV-инфекция сопровождается повышенным уровнем иммуноглобулина E и интерлейкина IL4. Попытки традиционным способом создать инактивированную формалином цельновирусную вакцину потерпели неудачу: у вакцинированных пациентов развивалась гиперчувствительность к вирусным белкам, что при встрече с диким вирусом

приводило к развитию тяжелых осложнений. Недавно открытый родственник вируса RSV — метапневмовирус человека (*Human metapneumovirus*, HMPV) — оказался в этом отношении столь же коварным. При клиническом испытании все разработанные до настоящего времени варианты вакцин против вирусов RSV и HMPV показали свою непригодность из-за возникающих иммунопатологических реакций.

Парамиксовирусы диких млекопитающих часто являются причиной зоонозов (т. е. заболеваний животных, которые могут передаваться человеку). В качестве примера можно назвать представителей рода *Henipavirus*, регулярно вызывающих тяжелые пневмонии и энцефалиты у сельскохозяйственных рабочих в Австралии и Юго-Восточной Азии. Природными хозяевами этих вирусов являются питающиеся растительными плодами летучие лисицы. Частые случаи заболевания домашних животных и людей связывают с сокращением территории тропических лесов и миграцией летучих лисиц ближе к поселениям человека. Вирусный «сезон» в Австралии приходится на зиму (июль–август), когда эти рукокрылые начинают свои набеги на фруктовые плантации. Например, август 2011 г. был отмечен многочисленными случаями гибели лошадей от вируса Хендра. Летучие лисицы переносят инфекцию в субклинической форме, активно выделяя вирус со слюной и мочой; зараженные плоды подбирают свиньи и лошади, которые при этом инфицируются и затем могут передать инфекцию человеку. Вирус Хендра преимущественно инфицирует лошадей. Для человека опаснее вирус Найпа (летальность до 70%), легко передающийся через загрязненные продукты питания, например пальмовый сок. Для проникновения в клетки-мишени вирусы Хендра и Найпа используют высококонсервативные рецепторы ephrinB2/B3, представленные на эндотелии сосудов и в центральной нервной системе млекопитающих. Так же, как и у остальных парамиксовирусов, вирионы вирусов Хендра и Найпа содержат неструктурные белки V и W, которые подавляют иммунный ответ хозяина через блокирование клеточного сигналинга. Белки V и W синтезируются с транскриптов, образующихся в результате редактирования РНК: если РНК-полимераза добавляет в сайт редактирования один нуклеотид G, то синтезируется белок V, если два — синтезируется белок W. Специфические лекарственные средства против вирусов Хендра и Найпа до сих пор не разработаны.

Повышенное внимание к семейству *Paramyxoviridae* обусловлено не столько беспокойством в связи со вспышками заболеваний, вызываемых его представителями, сколько задачами биоинженерии. Например, парамиксовирус NDV оказался перспективным агентом при терапии рака. Еще в 1990-х годах было показано, что он селективно поражает злокачественные клетки. С появлением «обратной» генетики стало возможным усилить его онколитические свойства, одновременно снижая его токсичность по отношению к нормальным клеткам.

6.6.5.3. Семейство *Rhabdoviridae*

Вирусы семейства *Rhabdoviridae*, относящегося к порядку *Mononegavirales* (см. раздел 6.2), распространены очень широко и заражают таких разных животных, как насекомые, рыбы и млекопитающие; кроме того, известны фиторабдовирусы, хозяевами которых служат растения (см. раздел 5.5.4.2).

Вызываемые рабдовирусами заболевания человека и животных, в частности бешенство и эфемерная лихорадка крупного рогатого скота, характеризуются высокой летальностью. Эффективные методы их лечения отсутствуют; профилактическая вакцинация не препятствует передаче инфекции, а в случае заражения не гарантирует скорое выздоровление.

В природных очагах инфекции рабдовирусы передаются от основных хозяев вторичным хозяевам через механические повреждения кожных покровов, векторами-переносчиками, а также половым путем. Поражая центральную нервную систему высших животных, рабдовирусы повышают активность и агрессивность поведения особи, что дополнительно способствует распространению инфекции. Тем не менее они не обладают промискуитетом; в частности, их передача между животными и растениями, скорее всего, невозможна.

Рабдовирусы имеют следующие особенности:

— вирионы содержат несегментированную ssРНК(–);

— вирионы оболочные, с гликопротеиновыми пепломерами на поверхности;

— размножение начинается с транскрипции, которую осуществляет РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRP), ассоциированная с нуклеокапсидом;

— транскрибируются моноцистронные мРНК;

— сборка частиц происходит в цитоплазме в ассоциации с клеточными мембранами (исключением служат представители рода *Nucleorhabdovirus*, размножающиеся в ядре растительной клетки).

Структура семейства. В семейство *Rhabdoviridae* входят 6 родов, а также около 85 видов, находящихся вне рода. Представители родов *Cytorhabdovirus* и *Nucleorhabdovirus* инфицируют растения и передаются насекомыми (см. раздел 5.5.4.2).

К родам *Ephemerovirus, Lyssavirus* и *Vesiculovirus* относятся рабдовирусы человека и животных; они имеют большое значение для медицины и ветеринарии.

Род Ephemerovirus (от лат. ephemerus — недолговечный). Типовым видом рода является вирус быстротекущей лихорадки крупного рогатого скота (***Bubalus ephemeric fever virus***, BEFV), представители рода переносятся членистоногими; они причиняют огромный ущерб животноводству в (суб)тропических зонах Австралии, Азии и Африки.

Род Lyssavirus (от греч. Lyssa — Лисса, божество безумия). Типовым видом рода является вирус бешенства (***Rabies virus***, RABV). Этот род — самый обширный, он включает в себя более 10 видов, в числе которых этиологические агенты болезней млекопитающих, прежде всего бешенства (человек — «тупиковый» хозяин). Подавляющее большинство видов вируса бешенства, которые чаще всего приурочены к определенным ареалам, выделено от летучих мышей. Лиссавирус австралийских летучих мышей (***Australian bat lyssavirus***, ABLV) распространен в Австралии и на Филиппинских о-вах; лиссавирус 1-го типа европейских летучих мышей (***European bat lyssavirus 1***, EBLV 1) обнаружен в Центральной и Восточной Европе, в том числе на территории Российской Федерации; лиссавирус 2-го типа европейских летучих мышей (***European bat lyssavirus 2***, EBLV 2) — в северной и западной Европе. В то же время типовой вид RABV распространен на всех континентах за исключением Австралии.

Род Vesiculovirus. Типовой вид представлен штаммом Индиана вируса везикулярного стоматита (***Vesicular stomatitis Indiana virus***, VSIV). Вирусы этого рода выделе-

ны от насекомых, рыб и млекопитающих. Они передаются членистоногими и широко распространены в западном полушарии; в то же время в Северной и Центральной Америке они встречаются только локально. У человека они вызывают легкое заболевание, однако у домашнего скота (коров, лошадей и свиней) поражение принимает тяжелую форму, и летальность достигает 2%.

Вирус везикулярного стоматита крупного рогатого скота (*Vesicular stomatitis vesiculovirus*, VSV) служит модельным объектом при изучении механизмов внутриклеточного транспорта и репродукции рабдовирусов. Он инфицирует широкий круг хозяев и размножается в клеточных культурах; методики его выделения и очистки хорошо разработаны.

Род Novirhabdovirus. Типовым видом является вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (*Infectuous haemopoetic tissue necrosis virus*, IHNV). К этому роду относятся вирусы морских и пресноводных рыб, адаптированные к размножению в организме холоднокровных животных. Свое название род получил от общего для него белка NV, не входящего в состав вириона (сокр. англ. — non virion), — продукта гена *nv*, локализованного между геном гликопротеина и геном полимеразы. Новирабдовирусы распространены повсеместно, однако их отдельные виды имеют свой ареал. Они передаются с икрой, эктопаразитами, а также переносятся водными течениями.

Филогенетические связи внутри семейства *Rhabdoviridae* реконструируются путем оценки сходства нуклеотидных последовательностей генов рецепторного белка или генов полимеразы. Как выяснилось, наиболее однородными являются лиссавирусы, на основании чего принято считать этот род эволюционно самым молодым среди рабдовирусов.

Строение вириона. Вирионы рабдовирусов имеют форму палочки (греч. rhabdo — палка) размером 150–430×80–100 нм. Один конец частицы (пулевидный вариант) или оба конца (бацилловидный вариант) могут быть закруглены (рис. 104).

Оболочка вириона образуется путем отпочкования, и ее липидный состав определяется кругом хозяев. На поверхности, за исключением плоского основания пулевидного вириона, расположены характерные ряды выступов, состоящих из молекул вирусного гликопротеина G (65–90 кДа). Этот белок играет ключевую роль в адсорбции, он определяет хозяйскую специфичность и тканевой тропизм вируса.

Спиральный нуклеокапсид состоит из ssРНК(–) и капсидного белка N (47–62 кДа). N-концевые домены протомеров ассоциированы с 9-нуклеотидными участками геномной РНК; С-концевые домены стабилизируют эти участки; центральные домены обеспечивают агрегацию протомеров. С нуклеокапсидом связаны два бел-

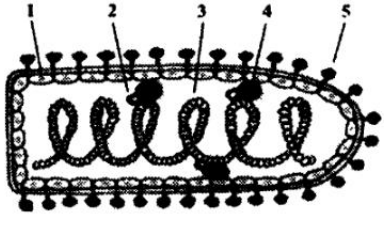


Рис. 104. Схема вириона рабдовируса.

1 — матрикс; 2 — фосфопротеин; 3 — нуклеокапсид; 4 — полимераза; 5 — гликопротеин оболочки.

ка репликации — белок L (РНК-зависимая РНК-полимераза; 220–250 кДа) и белок P (фосфопротеин; 35–50 кДа), входящие в состав полимеразного комплекса. Нуклеокапсид, в отличие от свободной геномной РНК, обладает инфекционностью, хотя эффективность заражения выше при неповрежденной оболочке.

Внутренняя поверхность оболочки выстлана белком матрикса M (20–30 кДа). Его третичная структура у всех рабдовирусов исключительно консервативна. Этот белок способствует сохранению спиральной укладки капсомеров, связывается с гликопротеином, а также обеспечивает взаимодействие между оболочкой и нуклеокапсидом.

Строение генома. Геном всех рабдовирусов, размер которого составляет 1,1–14,9 тыс. н., устроен единообразно.

«Идущая впереди» (англ. leading) 3′-концевая последовательность и «идущая позади» (англ. trailing) 5′-концевая последовательность фланкируют гены пяти белков: 1) белка N нуклеопротеина; 2) фосфопротеина P; 3) белка матрикса M; 4) гликопротеина G; 5) мультифункционального белка L, который, в частности, выступает в качестве РНК-полимеразы (рис. 105).

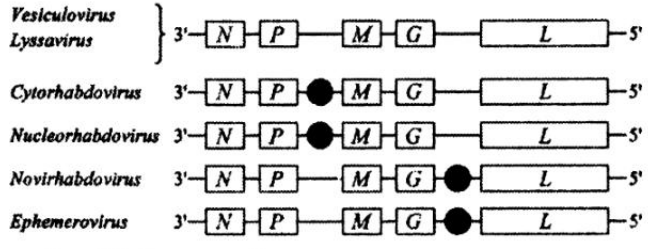


Рис. 105. Геномы рабдовирусов.

G — ген гликопротеина оболочки; *L* — ген мультифункционального белка репликации; *N* — ген структурного белка нуклеокапсида; *M* — ген белка матрикса (белка морфогенеза); *P* — ген фосфопротеина.

Черные кружки — дополнительные рамки считывания.

Регуляторные участки высококонсервативны и подразделяются на три группы: 1) полиU-последовательности на 3′-конце каждого гена, которые у рабдовирусов VSV и RABV имеют структуру $AC(U)_7$; 2) короткие, длиной 2–6 н., нетранскрибируемые последовательности в межгенной области; 3) консервативный триплет UUG в начале каждой ORF.

Цикл размножения. Адсорбция осуществляется благодаря сродству между гликопротеином G оболочки вируса и рецептором на поверхности клетки-мишени. В качестве рецептора вирус везикулярного стоматита (VSIV) предположительно использует фосфатидилсерин, а новивирусы — фибронектин. Для лиссавирусов рецепторами служат никотин-ацетилхолиновый рецептор, постоянно присутствующий на волокнах мышечной и нервной ткани, а также нейротропиновый рецептор и нейронадгезионные молекулы.

На примере вируса VSV установлено, что проникновение осуществляется путем клатрин-опосредованного эндоцитоза. Закисление среды в первичной эндосоме стимулирует изменение конформации белка G, в результате чего вирусная мембрана сливается с мембраной эндосомы и нуклеокапсид проникает в цитоплазму (см. рис. 14). Вирусу таким образом удается избежать попадания в фаголизосому.

В цитоплазме геномная РНК всегда находится в комплексе с белком N. Первичная транскрипция осуществляется белком L согласно «stop-start» механизму (репликаза прекращает действовать в конце каждой ORF, на время теряет связь с матрицей и возобновляет свое действие в начале следующей ORF; так она проходит всю матрицу от 3′-конца до 5′-конца).

Наибольшее число мРНК транскрибируется на 3′-конце, наименьшее — на 5′-конце, что позволяет регулировать количественное соотношение вирусных белков. Данный механизм регуляции, связанный с консервативной локализацией генов, используется всеми представителями порядка *Mononegavirales*.

Связанный с нуклеокапсидом мультифункциональный белок L осуществляет в цитоплазме посттранскрипционную модификацию вирусных мРНК (у него идентифицировано 6 функциональных доменов, однако какой из них отвечает за кэпирование, а какой за полиаденилирование, неизвестно).

После накопления достаточного количества копий белка N репликаза начинает пропускать стоп-сигналы на концах ORF и переходит к образованию полноразмерных реплик генома (комплекс транскрипции и репликазный комплекс различаются стехиометрическим соотношением белков L и P). Репликативным интермедиатом является РНК(+), которая, как и РНК(–), всегда соединена с капсидным белком. РНК(+) служит матрицей для синтеза геномных РНК, в то время как РНК(–) используется и для транскрипции, и для репликации. На ранних этапах инфекции количество РНК(+) и РНК(–) одинаково, однако позднее начинают преобладать РНК(–). Исследования, проведенные на мутантах вируса VSV, показали, что ключевую роль в этом играют концевые фланкирующие последовательности, которые определяют степень сродства репликазного комплекса к сайту *ori*.

Созревание обеспечивается взаимодействием с клеточными мембранами, а также с шаперонами, которые доставляют вирусные белки к месту сборки вириона. Белок G синтезируется на полисомах; посттрансляционное гликозилирование осуществляется в аппарате Гольджи. Белки G и M первоначально встраиваются в цитоплазматическую мембрану; в подмембранной области аккумулируются нуклеокапсиды; зрелые частицы образуются в процессе отпочкования.

Патогенез. С медицинской точки зрения самым значимым представителем семейства *Rhabdoviridae* является вирус бешенства RABV, патогенез которого изучен лучше всего.

Заражение происходит при попадании слюны животного в мышечную ткань человека (это могут быть ссадины, царапины, но чаще всего — укусы). Известны случаи заражения через слизистые оболочки (со слюной или аэрозолями). Вирус может размножаться в мышечной ткани непосредственно в зоне первичного заражения, или предварительно транспортируется в центральную нервную систему через чувствительные и двигательные нервные окончания.

Имеются данные, что вирус RABV эксплуатирует действующие в аксонах механизмы ретроградного транспорта по микротрубочкам (с участием динеина); связь нуклеокапсида с белками цитоскелета обеспечивает белок P; скорость перемещения составляет 50–100 мм·сут$^{-1}$.

Вирус размножается в спинном мозге, в стволовой части головного мозга и в таламусе; затем он распространяется по всей центральной нервной системе. Механизм межнейронного транспорта не ясен, хотя известно, что в нем участвует гликопротеин G. После активного размножения в нейронах вирус центробежно распространяется по органам и выделяется наружу со слюной.

Симптомы бешенства проявляются не сразу; инкубационный период составляет от 6 дней до 3 месяцев (к этому моменту вирус диссеминирует в организме). Клиническую картину составляют психомоторное возбуждение, обильное потоотделение, высокая температура, приступы гидро/аэро/фото/акустофобии, паралич конечностей. Поскольку заболевание не сопровождается морфофукциональными изменениями нейронов, механизм патогенеза требует расшифровки. Непосредственной причиной 100%-ной летальности бешенства в отсутствие комплексной терапии служит дисфункция дыхательной и сердечно-сосудистой систем.

Наряду с заболеваниями бешенством на территории Бразилии, Индии и Нигерии зарегистрированы единичные случаи легких лихорадок рабдовирусной этиологии. Переносчиками инфекции служат москиты; выздоровление наступает через 1–2 дня.

Экология. Бешенство является зоонозной инфекцией, т. е. оно передается человеку от больных животных. Основными животными-носителями в Европе являются летучие мыши и лисицы; на Ближнем Востоке — волки и собаки; в Африке — антилопы, мангусты и собаки, в Северной Америке — еноты, лисицы, насекомоядные летучие мыши и скунсы. Случаи передачи от человека к человеку крайне редки.

Человек в 99% случаев заражается от бешеных собак, которые, в свою очередь, получают вируса от того или иного первичного носителя. Самые распространенные из них — летучие мыши, поэтому любое нанесенное ими ранение следует рассматривать как потенциально опасное. Известны случаи воздушно-капельного заражения при посещении пещер, населенных стаями рукокрылых. Анализ вирусоносительства в природных популяциях разных географических зон существенно расширяет представления о генетическом разнообразии лиссавирусов, а также об их эволюции.

Сравнительное изучение генотипов вируса RABV показало, что они циркулируют в географически изолированных зонах, и их миграция между отдельными странами и, тем более, между континентами ограничена возможностью физического контакта носителей. Предполагается, что прародиной вируса бешенства была Индия, на территории которой его генетическое разнообразие наиболее велико.

Репликация генома лиссавируса, как и всех РНК-содержащих вирусов, сопровождается многочисленными ошибками. В результате даже у индивидуальных носителей его популяция генетически гетерогенна, что способствует адаптации к новому хозяину; случайная межвидовая передача приводит к очень быстрому распространению заболевания в дикой природе; соответственно возрастает и число заболевших людей.

Научно обоснованным примером успешной адаптации к новому хозяину и широкой экспансии вируса RABV служит передача бешенства от собак к обыкновенным

лисицам (*Vulpes vulpes*), произошедшая на северо-востоке Европы в 30-е годы XX в. В течение последующих 60 лет вирус распространился в популяции хозяина на север и на юг, и к настоящему времени лисицы стали основным резервуаром вируса бешенства на Евразийском континенте.

Лечение, профилактика и контроль распространения бешенства. Основные методы борьбы с бешенством — это принудительное сокращение численности популяции носителей вируса, а также ограничение контактов между домашними и дикими животными. Весьма эффективна обязательная иммунизация кошек и собак. Известны также примеры успешной иммунизации лисиц на значительных территориях; в частности, таким путем удалось полностью прекратить распространение бешенства в ряде кантонов Швейцарии.

С учетом тяжести и высокой летальности заболевания к любому укусу вышеуказанными животными следует относиться как к потенциально опасному. Первичная антирабическая (лат. rabies — бешенство) помощь состоит в тщательной обработке раны мыльным раствором, детергентом или 70%-ным этанолом (с целью нейтрализации и удаления слюны животного), а также в инфильтрации раневой области антирабическим иммуноглобулином (для предотвращения распространения вируса).

Большое значение имеет вакцинирование. В анналах медицинской вирусологии хранится первый опыт успешного лечения заболевания (1885). Чтобы спасти от смерти двух жертв нападения бешеных собак — 9-летнего эльзасца Йозефа Майстера (J. Meister) и 15-летнего жителя департамента Юра, Жана Жупиля (J. Jupille) — Луи Пастер иммунизировал их путем инъекции препарата ослабленного (аттенуированного) вируса; в обоих случаях болезнь не развилась. Это послужило основой совершенствования и широкого применения данного метода; в настоящее время в большинстве стран используются высокоиммуногенные вакцины на основе аттенуированного вируса, размноженного в культуре диплоидных клеток человека. Схемы проведения вакцинации различаются, однако признается необходимость вводить вакцину в первые сутки предполагаемого или доказанного инфицирования.

6.6.5.4. Вирус гепатита D (вне семейства)

Вирус гепатита D (***Hepatitis delta virus***, HDV) представляет собой вирус-сателлит вируса гепатита B (*Hepatitis B virus*, HBV; см. раздел 6.6.7.1). Более 15 млн человек, инфицированных вирусом HBV, одновременно являются носителями вируса HDV.

Вирус HDV принадлежит к роду *Deltavirus*; вероятно, его ближайшими родственниками служат вироиды (см. раздел 5.5.3.5).

В его геноме, минимальном из всех известных вирусных геномов (1679 н.), закодирован только один белок — дельта-антиген HDAg (сокр. англ. **h**epatitis **D** **a**ntig**e**n), представленный двумя изоформами.

Нуклеокапсид диаметром 36 нм окружен мембранной оболочкой, в состав которой входят липиды хозяйского происхождения и три формы S-антигена вируса HBV (вируса гепатита B). Таким образом, вирус HDV не может формировать полноценные частицы, не используя белки другого вируса; соответственно, он заражает человека только при суперинфекции вирусом HBV.

Внутренний нуклеокапсид вируса HDV содержит кольцевую молекулу РНК(–), 74% нуклеотидов которой комплементарно спарено друг с другом, а также ~200 молекул дельта-антигена HDAg (продукта гена вируса HBV).

Вирус HDV, по-видимому, используют те же рецепторы, что и вирус HBV.

Нуклеокапсид вируса HDV после попадания в цитоплазму доставляется в ядро благодаря сигналу ядерной локализации, который имеется у молекулы дельта-антигена HDAg. Вирус HDV не кодирует собственную РНК-полимеразу и поэтому эксплуатирует РНК-полимеразы клетки-хозяина, каким-то образом заставляя их синтезировать РНК на матрице РНК.

В зараженной клетке образуются три формы РНК — кольцевая геномная минус-нить, кольцевая антигеномная плюс-нить и линейная антигеномная плюс-нить (ее 3′-конец полиаденилирован и она используется в качестве мРНК для трансляции дельта-антигена HDAg). Кольцевая геномная минус-нить синтезируется в ядре с помощью РНК-полимеразы II; кольцевая и линейная антигеномные плюс-нити синтезируются в ядрышке РНК-полимеразой I.

Репликация осуществляется по механизму «катящееся кольцо»; конкатемер разрезается на «мономерные» молекулы геномной РНК, которые замыкаются в кольца благодаря собственной рибозимной активности. Соответствующая 85-нуклеотидная последовательность сходна с рибозимом одного из интронов человека; это позволяет предположить, что вирус HDV происходит от фрагмента человеческого транскриптома.

Некоторые мРНК дельта-вируса подвергаются хозяйскому редактированию под воздействием аденозиндезаминазы, которая превращает аденин в положении 196 в гуанин (в результате stop-кодон UAG становится кодоном UGG). Это приводит к синтезу изоформы дельта-антигена HDAg большей длины.

В то время как «короткая» изоформа дельта-антигена HDAg возвращается из цитоплазмы в ядро и участвует в репликации вируса, «длинная» изоформа не может пройти через ядерную пору и служит инициатором сборки нуклеокапсида в цитоплазме. Синтез «короткой» и «длинной» изоформ дельта-антигена HDAg строго сбалансирован.

Большое значение в цикле репродукции вируса HDV имеют посттрансляционные модификации дельта-антигена HDAg, которые регулируют и преимущественный синтез той или иной формы РНК вируса, и взаимодействие вируса HDV с S-антигеном вируса HBV при сборке вириона (см. выше).

По статистике каждый пятый человек, одновременно зараженный гепатитами B и D, умирает от рака печени; резко возрастает и вероятность быстрого развития цирроза или острой печеночной недостаточности.

Вакцинация против гепатита B полностью предохраняет и от гепатита D.

6.6.6. ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ, СОДЕРЖАЩИЕ ssРНК(+) И ИМЕЮЩИЕ СТАДИЮ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ. СЕМЕЙСТВО *RETROVIRIDAE*

Возможность обратной транскрипции, или синтеза ДНК на матрице РНК, не допускалась «центральной догмой молекулярной биологии», сформулированной в 1958 г. Френсисом Криком (F. Crick): ДНК → РНК (транскрипция) → белок (трансляция).

В действительности оказалось, что РНК может служить матрицей для синтеза ДНК, т.е. обратная транскрипция все-таки существует. Ее катализирует РНК-зависимая ДНК-полимераза, она же обратная транскриптаза (англ. reverse transcriptase), или ревертаза (англ. revertase; от лат. reversus — обращенный вспять).

Этот неканонический фермент был открыт в 1970 г. одновременно в лабораториях двух американских молекулярных биологов Говарда Темина (H. Temin) и Дэвида Балтимора (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1975 г.).

Вначале предполагали, что обратная транскриптаза имеется только у ssРНК(+)-вирусов из семейства *Retroviridae* (от лат. retro — назад). Позднее оказалось, что аналогичные ферменты существуют и у ряда dsДНК-вирусов, которые принадлежат к семействам *Caulimoviridae* и *Hepadnaviridae* (см. разделы 5.5.5.1 и 6.6.7.1). Оказалось также, что обратную транскрипцию может катализировать теломераза (РНК-содержащий ферментный комплекс, обеспечивающий репликацию повторов на концах хромосом эукариотов).

Обратная транскриптаза ретровируса иммунодефицита человека (ВИЧ; см. ниже) представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц p66 (66 кДа) и p51 (51 кДа; образуется в результате протеолитического отщепления С-концевого домена от субъединицы p66). Данный фермент обладает тремя активностями: 1) РНК-зависимой ДНК-полимеразной активностью, которая обеспечивает синтез минус-нити ДНК на матрице геномной РНК(+); 2) ДНК-зависимой ДНК-полимеразной, осуществляющей синтез плюс-нити ДНК на матрице минус-нити ДНК; 3) РНКазной, которая катализирует разрушение РНК в межмолекулярном гибриде РНК–ДНК.

Вирионы ретровирусов содержат не только обратную транскриптазу, но и сопутствующую ей интегразу; она катализирует встраивание dsДНК-реплики генома ретровируса в произвольные локусы хромосомной ДНК клетки-хозяина.

Ретровирусы подразделяются на две основные группы. К первой группе относятся «экзогенные» ретровирусы, которые осуществляют инфекционный цикл и непосредственно передаются от хозяина к хозяину. Во вторую группу входят «эндогенные» ретровирусы, которые встраиваются в геном хозяина, реплицируются в качестве провирусов и передаются с половыми клетками.

Эндогенизация ретровирусов сопровождается мутациями генов их структурных белков, что приводит к потере способности формировать вирионы. Таким путем возникли ретротранспозоны (потомки эндогенных ретровирусов, расселяющиеся внутри генома хозяина благодаря обратной транскрипции).

Ретротранспозоны имеются у таких далеких друг от друга организмов, как дрожжи, дрозофила и млекопитающие. Перед транспозицией ретротранспозон образует транскрипт, где, в частности, закодирована обратная транскриптаза; на этой матрице синтезируется dsДНК, которая затем встраивается в случайно выбранный участок хромосомы (путем сайтспецифичной рекомбинации с помощью транспозазы, закодированной в вышеуказанном РНК-транскрипте). На долю ретротранспозонов приходится 5–8% хромосомной ДНК человека; видимо, это неслучайно и свидетельствует о какой-то важной, еще не выясненной, роли этих мобильных генетических элементов.

Хотя ретротранспозоны относятся к квазивирусным семействам *Metaviridae* и *Pseudoviridae*, они не образуют капсидов и могут передаваться только вертикально

при размножении клеток-хозяев, поэтому в нашем учебнике они специально не рассматриваются.

Полноценные ретровирусы относятся к **семейству *Retroviridae***. Они передаются через кровь, половым путем, с грудным молоком, а также трансплацентарно (плоду от матери).

Структура семейства. Семейство *Retroviridae* подразделяется на подсемейства ***Orthoretrovirineae*** и ***Spumaretrovirineae***.

Подсемейство *Orthoretrovirineae* (от греч. orthos — прямой; в *данном случае* — собственно ретровирусы) содержит 6 родов, в которые входят многие широко известные ретровирусы.

Подсемейство *Spumaretrovirineae* (от лат. spuma — пена; в *клетках, зараженных этими вирусами, образуется множество вакуолей*) содержит единственный род *Spumavirus*, который сначала был обнаружен у шимпанзе (*Pan troglodytes*), позднее у других обезьян и человека, а затем у других групп млекопитающих. Патогенные представители среди них неизвестны, что делает их удобными объектами для безопасного изучения молекулярной биологии ретровирусов. Другая особенность вирусов этого рода состоит в том, что обратная транскрипция начинается еще в вирионе, до момента попадания геномной РНК в ядро клетки-хозяина.

Ретровирусы условно подразделяются на «простых» и «сложных». К простым ретровирусам относятся представители родов *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus* и *Gammaretrovirus*. Их геномы состоят лишь из трех генов — *gag*, *pol* и *env* (см. ниже), которые имеются у всех ретровирусов. К сложным ретровирусам принадлежат представители родов *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* и *Spumavirus*. Их геномы разнообразны по набору генов и кодируют, в том числе, неструктурные белки, которые регулируют транскрипцию и служат факторами патогенности.

Род Alpharetrovirus. К этому роду принадлежат вирусы птиц, вызывающие лейкозы, миелобластозы и саркомы. Наиболее известными представителями являются вирус эритролейкемии птиц (***Avian sarcoma leukosis virus***, ASLV) и вирус саркомы Рауса (***Rous sarcoma virus***, RSV), инфицирующий кур.

Род Betaretrovirus. К нему относятся онкогенные вирусы, заражающие представителей нескольких групп млекопитающих.

Род Gammaretrovirus. Вирусы этого рода вызывают лейкемии у грызунов, кошачьих, приматов и сумчатых, а также у пресмыкающихся и птиц. По последним данным они способны вызывать рак предстательной железы у человека (поскольку они выявляются в клетках 40% опухолей), а также связаны с загадочным синдромом «хронической усталости».

Род Deltaretrovirus. В этот род входят «Т-лимфотропные» вирусы, которые инфицируют в основном приматов, в том числе человека. Они поселяются в Т-хелперах 1, вызывая их интенсивную пролиферацию. В результате этого нарушается баланс между количеством Т-хелперов 1 и Т-хелперов 2, что снижает иммунный статус организма-хозяина и резко усиливает опасность возникновения Т-лимфомы.

Род Epsilonretrovirus. К этому роду относятся вирусы, заражающие рыб; так, они служат причиной саркомы у судака.

Род Lentivirus. Объединяет вирусов, которые инфицируют представителей ряда семейств млекопитающих (кошачьих, непарнокопытных, парнокопытных и приматов), вызывая у них болезни крови или иммунодефициты.

К лентивирусам, в частности, принадежит самый «знаменитый» вирус — ***Human immunodeficiency virus*** (HIV), или вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Он представлен двумя разновидностями в ранге видов — HIV-1 и HIV-2, которые вызывают синдром приобретенного иммунодефицита — СПИД (англ. acquired immunodeficiency syndrome, AIDS), однако различаются по темпу развития вызываемого ими заболевания. Первым был описан менее агрессивный вирус HIV-2; что отражено в образном названии рода *Lentivirus* (от лат. lentus — медлительный).

Изучение филогении лентивирусов указало на источник возникновения ВИЧ — возбудителя СПИДа, «чумы» XX в., которой в настоящее время болеет до 30 млн жителей Земли. Выявленных и предполагаемых носителей латентной инфекции, как минимум, на порядок больше.

В группе лентивирусов вначале был открыт вирус инфекционной анемии лошадей (***Equine infectious anemia virus***, EIAV); следом за ним был описан вирус артритозного энцефалита коз и овец (***Caprine arthritis encephalitis virus***, CAEV); по определению, они относятся к вирусам, которые вызывают заболевание с продолжительным инкубационным периодом.

В конце 1970-х годов американский вирусолог Доротея Морган (D. Morgan), сотрудник лаборатории выдающегося организатора исследований ретровирусов Роберта Галло (R. Gallo), по личной инициативе разработала метод культивирования Т-лимфоцитов. Используя его, Бернард Пойеч (B. Poiesz) и Фрэнсис Ручетти (F. Ruscetti), работавшие в той же лаборатории, открыли в 1980 г. первого патогенного лентивируса человека. Это был вирус HTLV-1 (сокр. англ. ***Human T-cell Leukemia Virus***) — возбудитель лейкемии, при которой происходит злокачественная трансформация Т-лимфоцитов.

Множественность случаев синдрома приобретенного иммунодефицита, также вызванного поражением Т-лимфоцитов, дало основание Роберту Галло в 1982 г. предположить, что возбудителем данного заболевания является лентивирус из группы HTLV (в своей конкретной части это предсказание не сбылось). Открытие истинного возбудителя СПИДа не заставило себя ждать, и в мае 1983 г. сотрудники парижского Пастеровского института Люк Монтанье (L. Montagnier) и Франсуаза Барре (F. Barré) поместили в журнале «Science» сенсационное сообщение о присутствии ретровируса в лимфатических узлах гомосексуалиста, больного СПИДом. Первоначально новый инфекционный агент был назван вирусом, ассоциированным с лимфоаденопатией (***Lymphoadenopathy Associated Virus***, LAV). Позднее этот вирус, который, как выяснилось, распространен преимущественно в Западной Африке, был переименован, теперь его называют «вторым» вирусом иммунодефицита человека (HIV-2). Люк Монтанье и Франсуаза Барре за это открытие были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине (2008), третьим лауреатом которой стал первооткрыватель онкогенных папилломавирусов Харальд цур Хаузен.

Поиски вирусов, родственных HIV-2, у человека и других млекопитающих, в первую очередь у обезьян, вскоре увенчались успехом. Дендрограмма на основе

сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *pol*, кодирующего обратную транскриптазу, показала, что «первый» вирус иммунодефицита человека HIV-1 (преимущественно распространенный в Азии, Америке, Европе и Центральной Африке) и вирус HIV-2 имеют разное происхождение. Ближайшим родственником вируса HIV-1 оказался вирус иммунодефицита обезьян (*Simian immunodeficiency virus*, SIV). Вариант этого вируса, вирус SIVcpz (инфицирующий шимпанзе), и вирус HIV-1 рассматриваются как подвиды одного вида. Другой вариант этого вируса, вирус SIVsmm (инфицирующий мартышкообразных обезьян мангобеев), близок к вирусу HIV-2. Вирусы SIV не патогенны для своих природных хозяев, однако заражение ими обезьян других видов приводит к заболеванию, сходному со СПИДом человека. В частности, вирус SIVsmm очень опасен для близких родственников мангобеев — азиатских макак. Таким образом, гетерологичную передачу вирусов SIV можно считать доказанной, и предполагается, что человек приобрел вирусов иммунодефицита от обезьян в результате двух независимых актов инфицирования.

Строение вириона. Частицы ретровирусов имеют сложное строение. Хотя у отдельных видов их морфология различается, общий план строения вирионов, диаметр которых составляет 80–100 нм, практически одинаков.

Капсид состоит из ~2 тыс. молекул капсомерного белка NC (сокр. англ. **nucleocap**sid); у вируса ВИЧ их 1572. При образовании нуклеокапсида капсомеры связываются с двумя копиями геномной РНК(+). РНК-белковое взаимодействие осуществляется как по специфическим *pac*-сайтам в молекулах геномной нуклеиновой кислоты, так и неспецифично, поскольку белок NC положительно заряжен.

Молекулы геномной РНК упакованы по принципу «голова к голове»; в комплексе с ними находятся две молекулы тРНК клеточного происхождения, необходимые для инициации обратной транскрипции (см. ниже). Помимо этих РНК в состав частицы ретровируса входит еще около ста разных тРНК, а также несколько молекул 5S-РНК и 7S-РНК, функции которых не ясны.

Вирион имеет мембранную оболочку, которая приобретается при выходе из клетки путем отпочкования. В ее состав входят два вирусных гликопротеина — TM (сокр. англ. **trans**membrane) и SU (сокр. англ. **s**urface **u**nit), которые образуют выросты, нерегулярно распределенные по поверхности частицы. В промежутке между оболочкой и капсидом находятся молекулы мембрано-ассоциированного белка матрикса MA (сокр. англ. **ma**thrix). Помимо структурных белков в состав ретровирусной частицы входит 50–100 молекул обратной транскриптазы. Чтобы осуществить обратную транскрипцию in vitro, достаточно повредить мембранную оболочку вириона, добавить субстраты реакции полимеризации (дезоксирибонуклеозидтрифосфаты) и кофакторы (катионы металлов). Наряду с обратной транскриптазой в вирионе содержится соизмеримое количество (50–100) молекул интегразы, отвечающей за встраивание реплики ретровирусного генома в геном клетки-хозяина. Еще один неструктурный белок — протеаза, обеспечивает созревание полипротеина Gag–Pol (см. ниже) после выхода вирусной частицы из клетки-хозяина.

Строение генома и репликация геномной нуклеиновой кислоты путем обратной транскрипции. Геном ретровирусов состоит из двух идентичных молекул ssРНК(+) размером 7–11 тыс. н., т. е. он является монопартитным и диплоидным.

В качестве матрицы для обратной транскрипции достаточно одной молекулы РНК; соответственно, в геном клетки-хозяина интегрируется только одна реплика вирусного генома.

Между двумя геномными молекулами РНК происходит интенсивная рекомбинация — характерный для ретровирусов феномен, который называется «выбором копии» (англ. copy choice). Вероятно, таким путем удается избежать копирования часто возникающих повреждений и собрать из двух молекул РНК полноценную матрицу для обратной транскрипции.

Геномная РНК кэпирована и полиаденилирована. На ее концах находятся длинные, около 600 н., повторы (англ. long terminal repeat, LTR). Недалеко от 3′-конца расположен полипуриновый «тракт» (англ. polypurine tract, *ppt*), а на расстоянии чуть больше 100 н. от 5′-конца — сайт связывания праймера (англ. primer binding site, *pbs*), необходимый для осуществления обратной транскрипции.

Остановимся на ключевых этапах этого сложного, во многом уникального процесса; сразу же отметим, что полноразмерная нить РНК-комплементарной ДНК (кДНК) синтезируется в три этапа, с использованием трех разных матриц (рис. 106).

На первом этапе геномная РНК начинает считываться не с 3′-конца (тогда кДНК синтезировалась бы в традиционном направлении 5′→3′). Напротив, из-за специфического расположения сайта связывания праймера (*pbs*), синтез ДНК(–) на матрице РНК(+) начинается с копирования короткого 5′-концевого участка. В качестве праймера используется частично расплетенная молекула тРНК (тРНК^{Lys} или, у большинства ретровирусов млекопитающих, тРНК^{Pro}); при этом восемнадцать 3′-концевых нуклеотидов праймера отжигаются на сайте *pbs*. Продукт реакции, в составе которого остается праймер, обозначается как «strong-stop» минус-ДНК, поскольку, завершив данный этап синтеза, обратная транскриптаза временно прекращает свою работу. Скопированный участок геномной РНК разрушается РНКазным доменом субъединицы p66 обратной транскриптазы.

На следующем этапе происходит первая смена матрицы и начинается копирование 3′-конца геномной РНК благодаря отжигу «strong-stop» ДНК(–) на участке геномной РНК, прилегающем к последовательности полиА. Обратная транскриптаза синтезирует нить ДНК в продолжение последовательности «strong-stop» ДНК(–) до 5′-конца РНК-матрицы. По мере копирования матрица разрушается РНКазным доменом обратной транскриптазы. При этом выщепляется последовательность *ppt* размером 13–15 н., которая служит в качестве РНК-праймера для синтеза ДНК(+) еще до завершения синтеза минус-нити. Считается, что почти половина актов рекомбинации, лежащих в основе высокой изменчивости ретровирусных геномов, происходит именно на этом этапе. Синтез ДНК(+) продолжается практически до конца матрицы РНК и прекращается по достижении модифицированного основания в составе праймерной тРНК (обратная транскриптаза его «не понимает»). Продукт этой реакции обозначается как «strong-stop» ДНК(+). В итоге получается dsДНК-интермедиат из ДНК(–), которая является репликой вирусного генома, и «strong-stop» ДНК(+). После удаления тРНК-праймера с помощью РНКазного домена обратной транскриптазы однонитевый 3′-конец «strong-stop» ДНК(+) становится доступным для взаимо-

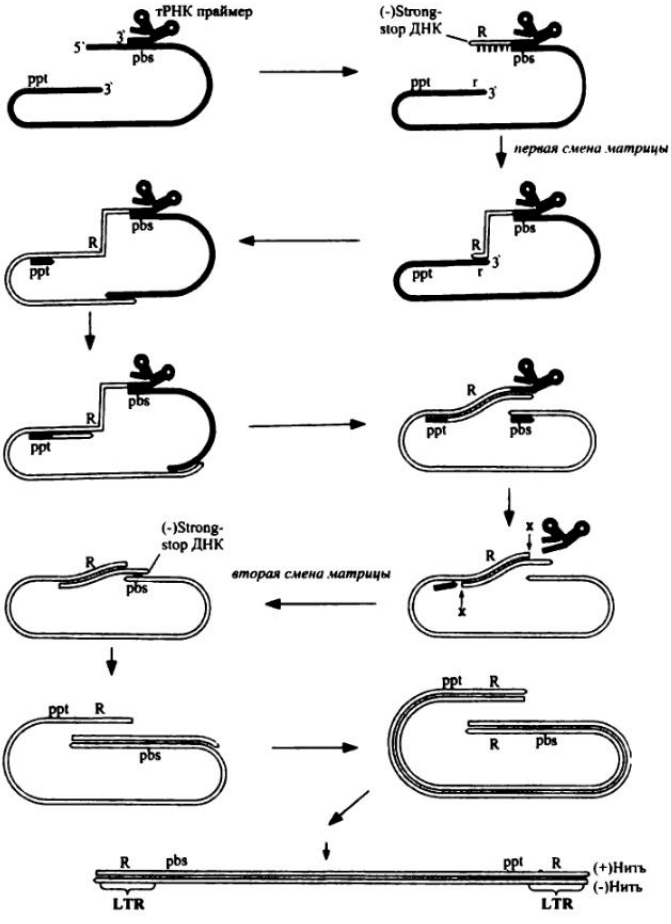


Рис. 106. Схема процесса обратной транскрипции у ретровирусов.

ppt — полипуриновый «тракт»; pbs — сайт связывания праймера; r и R — области гомологии плюс- и минус-нити ДНК, используемые при первой смене матрицы; X — сайты отщепления РНК-затравки от синтезированных нитей ДНК.

Объяснение в тексте.

действия с комплементарной ему последовательностью PBS на 3′-конце минус-нити ДНК.

Затем происходит вторая смена матрицы. Полученная на предыдущем этапе молекула ДНК используется для копирования обратной транскриптазой; собственно матрицей для образования плюс-нити на этот раз служит ДНК(–). Синтез минус-нити продолжается до 5′-конца «strong-stop» ДНК(+) по механизму вытеснения нити (еще одно свойство обратной транскриптазы). Когда фермент добирается до концов

обеих матричных нитей, синтез ДНК прекращается, в результате чего образуется ДНК с LTR на обоих флангах, что соответствует реплике генома вируса.

Молекула dsДНК может интегрироваться в состав генома клетки-хозяина, становясь провирусом. Фланговые LTR содержат последовательности, которые в геноме ретровируса расположены между сайтами *pbs* и *ppt*, т.е. между точками старта синтеза минус-нити и плюс-нити. Как станет ясно из дальнейшего изложения, эти последовательности играют важную роль в регуляции экспрессии вирусных генов.

Обратная транскриптаза катализирует полимеразные реакции с относительно низкой скоростью (1–1,5 нуклеотида в секунду, что на порядок медленнее, чем у эукариотных ДНК-полимераз), в результате чего на «переписывание» вирусного генома в ДНК-форму уходит 4 часа.

Обратная транскриптаза не обладает корректирующей функцией и относительно часто совершает ошибки (одну на 10^4–10^6 нуклеотидов; на один-четыре порядка больше, чем число ошибок у клеточных ДНК-полимераз). Однако ретровирусам это, по сути, даже выгодно, поскольку их изменчивость возрастает с увеличением частоты мутаций.

Интеграция ДНК-реплики ретровирусного генома в ДНК клетки-хозяина осуществляется по стандартному механизму ретротранспозиции (см. выше). Для ее начала необходимо, чтобы обратная транскрипция полностью завершилась; если у ДНК-реплики отсутствуют концевые повторы или если они неполноценны, интеграция не происходит.

Хромосомный сайт, служащий мишенью для интеграции, неконсервативен. Теоретически, последовательности любого ретровируса могут быть обнаружены в любой хромосоме клетки-хозяина. Тем не менее разные ретровирусы предпочтительно интегрируются в функционально различающиеся последовательности ДНК хозяина (что, вероятно, отражает роль хроматина и ДНК-связывающих белков в выборе сайта встраивания). Например, вирус ВИЧ, как правило, интегрируется в активно транскрибируемые гены, вирус лейкемии мышей — в промоторные участки по соседству с сайтами начала транскрипции, а вирус лейкоза птиц — в любые кодирующие последовательности.

Экспрессия генов. Транскрипция у ретровирусов (синтез геномной РНК и синтез полноразмерной пре-мРНК) осуществляется с одного и того же промотора, расположенного в upstream-LTR, тогда как downstream-LTR обеспечивает полиаденилирование полноразмерных транскриптов, необходимое для их стабильности и «соответствия» мРНК клетки-хозяина.

Как уже отмечалось, в геноме простых ретровирусов всегда есть ген *gag* (кодирует белки CA, MA, NC и другие капсидные белки), ген *pol* (кодирует обратную транскриптазу, интегразу и протеазу) и ген *env* (кодирует полипротеин, который после процессинга в аппарате Гольджи превращается в поверхностный гликопротеин SU и трансмембранный гликопротеин TM оболочки вириона). Эти гены взаимно перекрываются. Одновременно используется несколько рамок считывания, поэтому большое значение имеет процессинг транскриптов, а также посттрансляционный процессинг белков.

Пре-мРНК простых ретровирусов подвергаются «альтернативному» сплайсингу — это означает, что в отсутствие сплайсинга пре-мРНК используется в качестве мРНК для трансляции генов *gag* и *pol* (если пре-мРНК сплайсируется, то образуется мРНК гена *env*). При транскрипции генов *gag* и *pol* в составе одной мРНК вначале синтезируется полипротеин, разрезаемый вирусной протеазой на функциональные белки.

У сложных ретровирусов, помимо генов *gag*, *pol* и *env*, имеется ряд генов вспомогательных регуляторных белков. В данном случае транскрипция также осуществляется с общего промотора и охватывает весь провирусный геном.

«Альтернативный» сплайсинг играет огромную роль в экспрессии генов у сложных ретровирусов (в частности, у вируса ВИЧ таким путем синтезируется свыше 40 типов мРНК). При этом существуют три варианта образования мРНК.

Первый вариант, отсутствие сплайсинга, приводит к тому же результату, что и у простых ретровирусов (синтезируется мРНК препротеина Gag–Pol). Во втором варианте мРНК образуется после одиночного события сплайсинга; посередине нити пре-мРНК находится несколько 3′-сайтов сплайсирования, выбор одного из которых приводит к созреванию мРНК для полипротеина Env или одного из вспомогательных белков. В третьем варианте в результате нескольких событий сплайсинга образуются сложные мРНК, кодирующие регуляторные белки.

Выбор того или иного варианта образования мРНК зависит от стадии инфекционного цикла. Например, у вируса ВИЧ сначала образуются преимущественно мРНК ранних белков, в частности белков Tat и Rev. Белок Tat, главный регулятор транскрипции провирусного генома, вступает в комплекс с белками транскрипционного аппарата клетки-хозяина. В свою очередь, белок Rev обеспечивает экспорт из ядра в цитоплазму молекул мРНК, в которых имеются неудаленные интроны (т. е. тех мРНК, которые не подверглись сплайсингу и не образовали белковые комплексы, что свидетельствует о зрелости транскрипта и его пригодности для экспорта). Одновременно с этим белок Rev связывается с 250-нуклеотидной последовательностью неудаленного интрона, а также с экспортином-1 (белком-переносчиком, который принимает сигнал от белка Rev). Кроме того, белок Rev содержит сигнал ядерной локализации (короткая последовательность, обогащенная остатками катионных аминокислот), что позволяет ему играть роль челнока между ядром и цитоплазмой.

Цикл репродукции. Ретровирусы прикрепляются к поверхности клетки-хозяина в результате связывания гликопротеинов их оболочки с мембранными рецепторами. Для простых ретровирусов рецепторами служат в основном транспортные белки.

У представителей рода *Lentivirus*, в том числе у вируса ВИЧ, главным рецептором для поверхностных гликопротеинов оболочки вириона (SU) является гликопротеин CD4 — маркер таких антиген-презентирующих клеток, как дендритные клетки, М-клетки, макрофаги и Т-лимфоциты. Для взаимодействия вируса ВИЧ с рецептором необходим корецептор — как правило, один из хемокиновых рецепторов; сродство к разным корецепторам определяет клеточный тропизм разных вирусных штаммов.

В результате взаимодействия лиганда с рецептором оболочка вириона сливается с клеточной мембраной и капсид проникает в цитоплазму. Некоторые представители родов *Betaretrovirus* и *Gammaretrovirus* проникают в клетку, стимулируя эндоцитоз.

В цитоплазме в субвирусных частицах сразу же начинается обратная транскрипция, в результате чего образуется молекула dsДНК, концы которой готовы к взаимодействию с интегразой. Демонтаж частицы продолжается, и в итоге комплекс ДНК с белками нуклеокапсида и интеграза готовы поступить в клеточное ядро. Простые ретровирусы делают это в фазе митоза клеточного цикла, когда разрушается ядерная оболочка; вирус ВИЧ может использовать механизмы ядерного таргетинга.

В ядре вирусная ДНК немедленно встраивается в хромосомную ДНК с помощью интегразы; как уже отмечалось, это происходит случайным образом. Затем без подготовки осуществляется полная транскрипция генома провируса с помощью РНК-полимеразы II клетки-хозяина. Несплайсированные транскрипты либо переносятся в цитоплазму, где они в качестве мРНК вступают во взаимодействие с рибосомами, либо упаковываются в капсиды нового поколения вирионов. Некоторые транскрипты подвергаются сплайсингу. В частности, так образуется мРНК полипротеина Env, которая, выйдя из ядра, транслируется на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума. После процессинга зрелые белки SU и TM встраиваются в оболочку вирусной частицы. Остальные компоненты вириона — геномная РНК, а также незрелые препротеины Gag–Pol и Gag — скапливаются под цитоплазматической мембраной или на внутренних мембранах (у представителей рода *Betaretrovirus*). Окончательно вирион формируется в ходе отпочкования от клеточной мембраны.

У вируса ВИЧ структурные белки нуклеопротеина, капсида и матрикса входят в состав препротеина Gag в порядке, соответствующем последовательности образования «слоев» вириона. Самосборка частицы запускается взаимодействием белка NC с геномной РНК вируса. Белок MA связывается с субмембранным доменом белка TM, после чего остальные структурные компоненты вириона взаимно ориентируются для правильной сборки.

Ретровирусная частица созревает вне клеток хозяина — когда вирион отделился от клетки, внутри него активируется протеаза, которая разрезает препротеины Gag–Pol и Gag.

Зрелый вирион отличается от незрелого большей конденсированностью кора, и все его белки готовы выполнить свою функцию в следующем инфекционном цикле.

Патогенез. Ретровирусы, встраивая ДНК-реплику своего генома практически в любые участки хромосомы клетки-хозяина, часто изменяют характер экспрессии его генов, что может привести к малигнизации.

В начале 1900-х годов датчане ветеринар Олаф Банг (O. Bang) и врач Вильгельм Эллерман (V. Ellerman) установили, что эритролейкемия у кур передается с фильтратом тканей больной особи; в настоящее время установлено, что возбудителем является эндогенный ретровирус ASLV (сокр. англ. ***Avian sarcoma leukosis virus***). В 1911 г. американский вирусолог Пейтон Раус (P. Rous; Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1966 г.) «заочно» открыл первого онкогенного ретровируса — вируса саркомы кур, которого позднее назвали вирусом саркомы Рауса (***Rous sarcoma virus***, RSV), вводя бесклеточный экстракт опухоли здоровым цыплятам-плимутрокам.

В настоящее время наиболее опасными из ретровирусов, которые ассоциируются с возникновением злокачественных опухолей у человека, считаются «Т-лимфотропные» вирусы рода *Deltaretrovirus*.

ДНК представителей рода *Deltaretrovirus* часто интегрируется в хромосомы хозяина поблизости от протоонкогенов — генов, продукты которых в случае превышения нормы их синтеза нарушают ряд физиологических процессов и, как следствие, вызывают злокачественное перерождение клеток. Экспрессия протоонкогенов может многократно усиливаться благодаря сильным промоторам ретровирусов.

Другим потенциальным следствием случайной интеграции ретровируса в состав клеточного генома может быть нарушение экспрессии генов, которые отвечают за синтез белков, предохраняющих клетку от малигнизации.

СПИД. Говоря о патогенезе ретровирусных инфекций, следует особо остановиться на СПИДе, который вызывается вирусом ВИЧ. Об этой страшной болезни накоплена огромная информация, издается ряд научных журналов, публикующих множество экспериментальных статей. Рассмотрим основные аспекты СПИДа, обращая особое внимание на биологию вируса-возбудителя.

Вирус ВИЧ заражает любые клетки, на поверхности которых имеется иммуноглобулинный рецептор CD4. При половом контакте с инфицированным партнером первыми получают вируса дендритные клетки и макрофаги, патрулирующие эпителий половых органов, а также $CD4^+$ Т-лимфоциты (Т-хелперы 1), во множестве присутствующие в слизистых оболочках. Если вирус попадает в организм с грудным молоком, то входными воротами для него служат М-клетки Пейеровых бляшек. Наконец, если вирус проникает в кровяное русло, он неизбежно попадает в лимфатические узлы, где всегда присутствуют потенциальные клетки-хозяева, экспрессирующие рецептор CD4 (Т-лимфоциты). В лимфатические узлы также попадают антигенпрезентирующие клетки, которые могут передавать вирус ВИЧ.

В первые дни после инфекции развивается острая фаза болезни, когда носителями интенсивно размножающегося вируса становятся практически все $CD4^+$-клетки; большинство из них погибает. Затем вирус переходит в латентное состояние и сохраняется, главным образом в качестве провируса, локализуясь преимущественно в Т-клетках памяти — Т-лимфоцитах (которые образуются после встречи с конкретным антигеном и активируются, если он появляется вновь; они не размножаются и в малом количестве циркулируют в кровотоке).

Наступает бессимптомная стадия заболевания, во время которой популяция вируса становится генетически гетерогенной в результате накопления мутаций. Незаметно снижается количество циркулирующих $CD4^+$ Т-клеток, поскольку они погибают по мере размножения вируса.

На поздней стадии развития СПИДа количество Т-клеток критически уменьшается; размножение вируса в тканях лимфатических узлов приводит к дегенерации последних, а сами вирусы приобретают: способность заражать широкий круг клеток-хозяев; цитотоксичность к участникам клеточного иммунного ответа; устойчивость к противовирусным антителам; в некоторых случаях тропизм к разным тканям.

В этот период развития заболевания любая оппортунистическая инфекция может оказаться летальной. На фоне СПИДа у людей с нарушенной иммунной системой часто развиваются другие заболевания вирусной этиологии. Например, вирус ВИЧ долго считали причиной развития саркомы Капоши, однако в конце концов выяс-

нилось, что на фоне ослабления иммунного статуса эту форму рака вызывает вирус герпеса-8 человека.

Почему же иммунная система человека не в состоянии справиться с ВИЧ-инфекцией?

Дело в том, что вирус ВИЧ оказался искуснейшим «манипулятором», нарушая основы иммунитета и обращая его себе на пользу. Преимуществом вируса ВИЧ является способность длительно сохраняться в латентной форме; если сразу после первоначального инфицирования патогенный процесс подавлен, то затем постепенно (в течение нескольких лет) разрушается иммунная система. Главной мишенью вируса являются Т-хелперы 1. В норме они запускают каскад реакций иммунного ответа, снижают образование важнейшего иммуномедиатора IL-2 и других интерлейкинов; при заболевании они теряют способность размножаться, и их общее число падает. Остальные клетки иммунной системы (В-лимфоциты, моноциты и NK-клетки) перестают «понимать» медиаторные сигналы Т-клеток; нередко начинаются аутоиммунные реакции. Прекращают нормально функционировать и все $CD4^+$ антиген-презентирующие клетки, поскольку они также заражаются вирусом.

В инфицированном организме вырабатываются нейтрализующие антитела против вируса ВИЧ. Однако их титр никогда не бывает высоким, и в каком-то смысле они даже служат не защитой, а стимулом для изменчивости вируса. Параллельно синтезируется некоторое количество антител, которые перекрывают эпитопы оболочки вируса, и без того мало доступные по причине особой конформации их гликопротеинов. Такие антитела почему-то слабо распознаются клетками иммунной системы. В некоторых случаях эти «усиливающие» антитела (англ. enhancement antibodies) придают вирусу способность взаимодействовать с дополнительными рецепторами на поверхности клеток-мишеней и проникать в них путем эндоцитоза. Таким образом, гуморальный иммунный ответ, самое мощное оружие иммунной системы, при заражении вирусом ВИЧ также оказывается полностью нарушенным.

Отмеченные особенности вируса ВИЧ создают огромные проблемы при поисках способов терапии СПИДа. Многие меры защиты от вирусных инфекций связаны со стимуляцией иммунной системы, а этот вирус полностью разрушает ее координированное действие, что в данном случае может приводить к непредсказуемым последствиям, в том числе «с обратным знаком».

Невозможно также бороться с вирусом ВИЧ, уничтожая все зараженные $CD4^+$-клетки, поскольку это привело бы к невосполнимой потере иммунной памяти.

Перспективное направление в разработке терапии СПИДа — это поиски препаратов, подавляющих размножение вируса, в первую очередь процесс обратной транскрипции, которая как таковая практически отсутствует у эукариотов. В данном случае достигнуты определенные успехи. Так, если в последнем триместре беременности мать однократно принимает препарат зидовудин или ламивудин (нуклеозидные аналоги, конкурирующие с динуклеозидтрифосфатами и подавляющие активность обратной транскриптазы), ребенок в 99% случаев рождается не инфицированным вирусом ВИЧ. Применение высокоактивной антиретровирусной терапии (англ. **h**ighly **a**ctive **a**nti**r**etroviral **t**herapy, HAART), когда пациент одновременно проходит курс ле-

чения ингибитором обратной транскриптазы и ингибитором протеазы, позволяет на долгие годы затормозить развитие заболевания.

В то же время вакцинация от СПИДа пока нереальна, поскольку не выяснены многие аспекты влияния вируса ВИЧ на иммунную систему (не выявлены даже наиболее иммуногенные эпитопы вирусных белков). Скорость мутационной изменчивости этого вируса, попавшего в человеческий организм, очень велика, что исключает возможность разработки долгосрочных вакцин, в то время как неудачная вакцинация может стимулировать развитие инфекции.

6.6.7. ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ, СОДЕРЖАЩИЕ dsДНК И ИМЕЮЩИЕ СТАДИЮ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ. СЕМЕЙСТВО *HEPADNAVIRIDAE*

Наряду с семейством *Retroviridae* в сборную группу ретровирусов входят еще два семейства — *Caulimoviridae* (вирусы, инфицирующие растения; см. раздел 5.6.5.1) и *Hepadnaviridae* (вирусы, инфицирующие животных). Их представители также используют обратную транскрипцию при репликации генома.

Механизмы и значение обратной транскрипции у гепаднавирусов следует рассмотреть отдельно, поскольку геномной нуклеиновой кислотой в данном случае является не ssРНК(+), а dsДНК.

Вирусы **семейства *Hepadnaviridae*** (от греч. hepar — печень и сокр. англ. DNA) проявляют ярко выраженный тропизм в отношении гепатоцитов.

Структура семейства. Семейство *Hepadnaviridae* содержит два рода — *Avihepadnavirus* и *Orthohepadnavirus*. Все гепаднавирусы обладают высокой специфичностью по отношению к хозяину.

Вирусы рода *Avihepadnavirus* (лат. avis — птица) вызывают гепатит В у аистов, гусей, уток и цапель.

Вирусы рода *Orthohepadnavirus* (греч. orthos — прямой; в *данном случае* — собственно гепаднавирусы) вызывают гепатит В у грызунов — земляных белок, луговых собачек, сурков и сусликов, а также у приматов — шерстистых обезьян Нового Света, человекообразных обезьян (гиббонов, горилл, орангутанов и шимпанзе) и человека. Эти вирусы передаются через кровь, лимфу и тканевую жидкость, а также при половом контакте и трансплацентарно.

Строение вириона. Вирус гепатита В человека (*Hepatitis B virus*, HBV) — один из самых мелких вирусов животных; его диаметр равен 42 нм. Икосаэдрический капсид (T=4) заключен в мембранную оболочку. Часто встречаются неполноценные вирионы, лишенные нуклеокапсида и состоящие только из оболочки, содержащей гликопротеиновый поверхностный антиген HBsAg (сокр. англ. **h**epatitis **B** surface **a**nti**g**en), который в избытке синтезируется в зараженной вирусом клетке. Вероятно, роль таких частиц заключается в том, чтобы принять на себя основной удар противовирусного иммунного ответа.

Строение генома и способ репликации геномной ДНК. Геном вируса гепатита В человека представлен кольцевой молекулой ДНК размером 3,2 тыс. п.н.

Характерная особенность вирусов семейства *Hepadnaviridae* состоит в том, что их геномная ДНК — лишь частично двунитевая молекула (плюс-нить ДНК является

неполной, а в минус-нити имеется разрыв). Кроме того, к 5′-концу минус-нити ДНК ковалентно присоединена молекула вирусной полимеразы. Такое строение геномной ДНК связано со способом ее репликации.

В 1982 г., спустя 12 лет после открытия обратной транскрипции, американские вирусологи Джесси Саммерс (J. Summers) и Уильям Мэйсон (W. Mason), изучавшие механизм репродукции вируса гепатита В уток (***Duck hepatitis B virus***, DHBV), показали, что репликация ДНК-генома может осуществляться не напрямую, а через РНК-интермедиат. Иными словами, они впервые установили, что ретровирусы могут быть не только РНК-содержащими, но и ДНК-содержащими.

Рассмотрим этот вариант обратной транскрипции на примере вируса HBV (рис. 107).

Геномная ДНК вириона, имеющая одну недостроенную нить (англ. gapped DNA — ДНК с брешью), при инфекции доставляется в ядро, где происходит репаративный синтез ДНК, и молекула приобретает форму завершенного кольца. Вирус HBV не имеет гена интегразы, и поэтому его ДНК, как правило, не встраивается в хромосомную ДНК клетки-хозяина; кольцевая молекула геномной вирусной ДНК сохраняется в ядре в качестве эписомы, с которой транскрибируются вирусные РНК, в том числе прегеномная РНК размером 3,5 тыс. н.

Транскрипция прегеномной РНК начинается с сайта геномной ДНК, находящегося в upstream-положении от 12-нуклеотидного прямого повтора dr I (сокр. англ. **di**rect **r**epeat) и прекращается на сигнальной последовательности полиаденилирования, расположенной в downstream-положении от него. В результате этого прегеномная РНК имеет на обоих концах прямые повторы длиной ~200 н. и оказывается длиннее своей матрицы (поскольку участок ДНК между сайтом инициации транскрипции и сайтом полиаденилирования скопирован дважды).

Кэпированная с 5′-конца и полиаденилированная по 3′-концу молекула прегеномной РНК поступает в цитоплазму, где она служит матрицей для синтеза двух белков — капсидного белка С (молекулы которого сразу же начинают образовывать субвирусную частицу на основе «своей» молекулы прегеномной РНК) и входящего в состав вириона белка Р (вирусной полимеразы). Белок Р (90 кДа) является уникальной автопраймирующей обратной транскриптазой — один из аминокислотных остатков Tyr (точнее, его гидроксильная группа) в N-концевом домене связывает первый нуклеотид при синтезе минус-нити ДНК.

Обратная транскрипция инициируется благодаря тому, что белок Р связывается с консенсусной последовательностью вблизи 5′-конца молекулы прегеномной РНК, принимает необходимую конформацию и осуществляет полимеризацию 3–4 нуклеотидов. Образовавшаяся цепочка «перебрасывается» на консенсусную последовательность на 3′-конце прегеномной РНК (напомним, что концы этой молекулы идентичны), т. е. происходит первая смена матрицы.

В ходе реакции полимеризации белок Р сохраняет ковалентную связь с 5′-концом минус-нити ДНК. Достраивание минус-нити ДНК продолжается по всей длине РНК-матрицы вплоть до 5′-конца; по ходу этого процесса матрица расщепляется благодаря РНКазной активности белка Р. Когда синтез минус-нити ДНК завершается, остается нерасщепленным кэпированный 15–18-нуклеотидный конец молекулы прегеномной РНК, содержащий реплику повтора dr I (которая становится праймером для

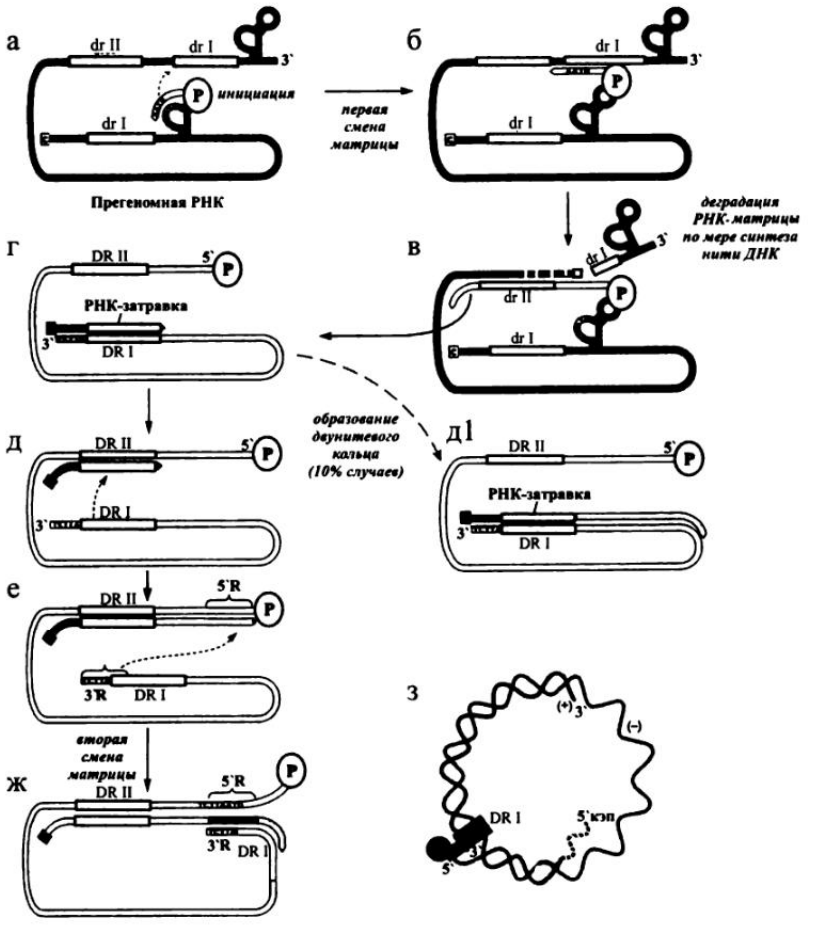


Рис. 107. Схема процесса обратной транскрипции у гепаднавирусов.

а — инициация обратной транскрипции, взаимодействие консенсусной последовательности на 5′-конце прегеномной РНК с белком Р; б — продолжение синтеза после первой смены матрицы; в — удаление РНК-затравки и разрушение транскрибированной цепи РНК за счет РНКазной активности белка Р; г — завершение синтеза минус-нити, использование оставшегося фрагмента РНК в качестве праймера для синтеза плюс-нити ДНК; д — транслокация РНК-праймера к 5′-концу матричной минус-нити ДНК; д1 — синтез кольцевой dsДНК (5–10% случаев); е — беспрепятственный синтез ДНК до 5′-конца матричной минус-нити; ж — вторая смена матрицы, продолжение синтеза плюс-нити; з — геном с недостроенной нитью.

DR — прямой повтор в ДНК; dr — прямой повтор в РНК.

синтеза плюс-нити ДНК). Если праймер остается на исходном месте (5–10% случаев), то конечным продуктом становится dsДНК, концы которой замыкаются в кольцо. Однако в большинстве случаев праймер по неизвестной причине транслоцируется на гомологичную последовательность, расположенную вблизи 5′-конца минус-нити

ДНК. Синтез плюс-нити ДНК продолжается до конца матрицы (по аналогии с синтезом «strong-stop» ДНК(+) у представителей сем. *Retroviridae*).

Затем так же, как у ретровирусов, благодаря гомологии между 5′-концевой и 3′-концевой последовательностями минус-нити ДНК происходит вторая смена матрицы, и синтез плюс-нити возобновляется. При этом синтезируемая молекула ДНК замыкается в кольцо. Синтез плюс-нити ДНК продолжается до конца матрицы (у вирусов гепатита В птиц) или прекращается на середине минус-нити (у вирусов млекопитающих), оставляя кольцо геномной ДНК релаксированным.

Причина преждевременной остановки синтеза плюс-нити не ясна. Возможно, что в ходе этого процесса постепенно изменяется конформация молекулы ДНК в практически собранном капсиде, что, в свою очередь, влияет на его внешнюю форму и служит сигналом для приобретения мембранной оболочки. Когда формирование частицы заканчивается, нуклеотиды перестают проникать внутрь нее, и синтез ДНК прекращается.

Таким образом, геном представителей семейства *Hepadnaviridae* реплицируется путем обратной транскрипции. В чем биологический смысл этого явления у ДНК-вирусов?

Обратим внимание на то, что у РНК-ретровирусов интегрированная реплика генома воспроизводится совместно с хозяйской ДНК, в то время как геномная ДНК вируса HBV реплицируется в ядре как автономная эписома за счет новых и новых раундов обратной транскрипции. Таким образом, для представителей семейства *Hepadnaviridae* обратная транскрипция — это способ гарантировать хроническую инфекцию клетки. Кроме того, из-за частых ошибок обратной транскриптазы и благодаря широким возможностям для внутригеномной рекомбинации в геноме вируса HBV накапливаются мутации, что позволяет успешнее уклоняться от иммунной системы хозяина.

Геном гепаднавирусов, несмотря на его малый размер, несет информацию о семи белках. Их рамки считывания взаимно перекрываются, и в результате альтернативного сплайсинга синтезируется несколько мРНК.

Известны функции большинства белков вируса HBV (как уже отмечалось, белок P играет роль обратной транскриптазы).

Белок C представляет собой структурный белок капсида, другое его название — HBcAg (сокр. англ **h**epatitis **B** **c**apsid **a**nti**g**en). С этого же гена считывается белок E (E-антиген), роль которого неясна.

Белок S, или HBsAg (сокр. англ **h**epatitis **B** **s**urface **a**nti**g**en), является основой мембранного гликопротеина. Его ген может транскрибироваться с трех разных сайтов, поэтому на поверхности вириона экспонированы «короткая», «средняя» и «длинная» формы этого антигена.

Наконец, белок X выполняет регуляторную функцию при экспрессии вирусных генов и модулирует несколько сигнальных путей гепатоцита.

Цикл размножения. Вирусы семейства *Hepadnaviridae* репродуцируются только в гепатоцитах — их практически невозможно поддерживать в клеточной культуре.

Для заражения клетки достаточно одного вириона (рис. 108). Инфекционный цикл начинается с взаимодействия между S-антигеном вируса и неустановленным клеточным рецептором, на роль которого претендуют гепарансульфат (входит в со-

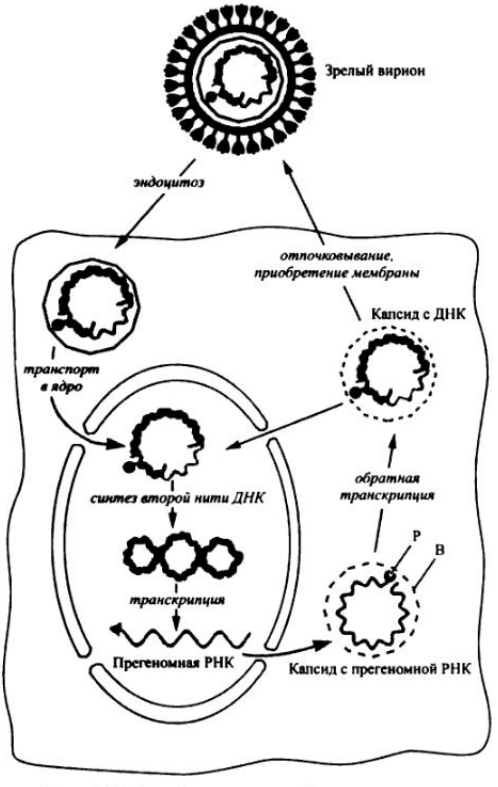


Рис. 108. Инфекционный цикл вируса гепатита В.

став углеводной части мембранных гликопротеинов гепатоцита) и карбоксипептидаза (трансмембранный белок; синтезируется, в частности, в клетках печени и имеет высокое сродство к S-антигену вируса гепатита В уток).

Затем, по-видимому, путем кавеолин-опосредованного эндоцитоза вирус проникает в цитоплазму и транспортируется по микротрубочкам цитоскелета к внешней мембране ядерной оболочки. Там капсид разрушается, и ДНК вируса проникает в нуклеоплазму через комплекс ядерной поры. В ядре достраивается плюс-нить геномной ДНК, и кольцевая dsДНК служит матрицей для транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II хозяина.

Образующиеся транскрипты — короткие мРНК и прегеномная РНК — экспортируются в цитоплазму. Там на прикрепленных рибосомах короткие мРНК транслируются в белки оболочки вириона, которые попадают в эндоплазматический ретикулум. Прегеномная РНК транслируется в белок С, а также с меньшей эффективностью в белок Р. Белок Р сразу же присоединяется к 5′-концу собственной матричной молекулы (прегеномной РНК). Одновременно с формированием капсида вокруг прегеномной РНК в вирионах начинается процесс обратной транскрипции.

На ранних этапах инфекции синтезированная ДНК в комплексе с белками вновь направляется в ядро (где, соответственно, увеличивается число замкнутых кольцевых вирусных матриц), и цикл повторяется.

В ядре инфицированной клетки образуется 10–30 эписом вирусного происхождения. По мере того, как накапливается достаточное количество молекул мембранных антигенов вирусной оболочки, начинается отпочкование ДНК-содержащих капсидов в полость цистерн эндоплазматического ретикулума, на мембранах которого скапливаются белки оболочки вириона.

Получившие оболочку вирионы направляются по секреторному пути и выходят из гепатоцита посредством экзоцитоза. После этого они готовы инфицировать соседние клетки. Часть из них попадает в кровь, где у больных гепатитом В выявляются вирусные антигены и антитела к ним.

Патогенез. У гепатита В короткая острая стадия, которая, как правило, протекает незаметно. В 30–50% случаев инфекция переходит в хроническую форму; в осталь-

ных случаях иммунная система успешно справляется с вирусом, и заболевшие либо полностью излечиваются, либо становятся латентными носителями вируса, хотя прямая угроза их здоровью отсутствует (если только не ослаблен иммунитет).

Хронический гепатит В может протекать бессимптомно или проявляться в форме слабого хронического воспаления печени, однако в любом случае в течение нескольких лет развивается цирроз.

Гепатоциты — это медленно делящиеся клетки; поэтому при хронической инфекции цикл развития вируса также продолжителен; зараженные гепатоциты погибают не сразу, и цирроз печени развивается медленно.

При гепатите В многократно увеличивается вероятность развития карциномы печени, поскольку геномная ДНК вируса может в результате незаконной рекомбинации случайно интегрироваться в произвольные сайты хромосом клетки-хозяина, что нарушает баланс экспрессии протоонкогенов. Другой опасностью, повышающей вероятность развития патологий печени, служит постоянная и, по сути дела, аутоиммунная реакция организма на присутствие клеток, зараженных вирусом.

Эпидемиология и лечение гепатита В. По оценкам ВОЗ, во всем мире до 350 млн человек больны гепатитом В или являются носителями вызывающего его вируса HBV. Подавляющая часть заражений (8–20% населения Земли) приходится на Китай, страны Юго-Восточной Азии и Африки, в то время как в Западной Европе, Северной Америке и Австралии носителями HBV является ~2% жителей.

У вируса HBV выделяют восемь групп генотипов (различие их нуклеотидных последовательностей не менее 8%), которые характеризуются четким географическим распределением, проявляют разную патогенность (общий ход течения болезни, вызываемые осложнения) и имеют свои особенности в плане терапии.

В очагах распространения болезни передача вируса осуществляется вертикальным путем — трансплацентарно (от матери к ребенку).

Препараты, применяемые при терапии гепатита В, подразделяются на две группы — иммуностимулирующие и ингибирующие обратную транскрипцию. Лекарственное лечение никогда не позволяет полностью изгнать вирус из организма; единственный абсолютно эффективный способ борьбы с гепатитом В — это вакцинация. С 1986 г. используется рекомбинантная вакцина на основе S-антигена оболочки вируса HBV, которую получают с помощью гетерологичного синтеза клетками дрожжей.

Рекомендуемая литература

Авакян А. А., Быковский А. Ф. Атлас анатомии и онтогенеза вирусов человека и животных. М.: Изд-во «Медицина», 1970. 270 с.

Зильбер Л. А. Вирусная теория происхождения злокачественных опухолей. М.: Изд-во «Медгиз», 1946. 72 с.

Киселев В. И., Киселев О. И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки. М.: Изд-во «Медицина», 2003. 43 с.

Лидский П. В., Агол В. И. Как полиовирус изменяет клетку // Вопр. вирусологии. 2006. Т. 51. С. 4–11.

Львов Д. К. (ред.). Медицинская вирусология. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. 656 с.

Пинаев Г. П., Богданова М. С. (ред.). Методы культивирования клеток. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. 278 с.

Тарасевич Л. М. Вирусы насекомых. М.: Изд-во «Наука», 1975. 198 с.

Albertini A. A., Schoehn G., Weissenhorn W. et al. Structural aspects of rabies virus replication // Cell. Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65. P. 282–294.

Arias C. F., Dector M. A., Segovia L. et al. RNA silencing of rotavirus gene expression // Virus Res. 2004. Vol. 102. P. 43–51.

Beaud G. Vaccinia virus DNA replication: a short review // Biochimie. 1995. Vol. 77. P. 774–779.

Berg T. P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review // Avian Pathol. 2000. Vol. 29. P. 175–194.

Bonami J. R., Sri Widada J. Viral diseases of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*: a review // J. Invertebr. Pathol. 2011. Vol. 106. P. 131–142.

Bonning B. C., Miller W. A. Dicistroviruses // Annu. Rev. Entomol. 2010. Vol. 55. P. 129–150.

Buller M. R., Palumbo G. J. Poxvirus pathogenesis // Microbiol. Rev. 1991. Vol. 55. P. 80–122.

Bushman F., Lewinsky M., Ciuffi A. et al. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration // Nat. Rev. Microbiol. 2005. Vol. 3. P. 848–858.

Cann A. J. Principles of Molecular Virology (4 ed.) // Academic Press. San Diego, CA (USA). 2005. 352 pp.

Cuthbert J. A. Hepatitis A: old and new // Clin. Microbiol. Rev. 2001. Vol. 14. P. 38–58.

Davison A. J. Herpesvirus systematics // Vet. Microbiol. 2010. Vol. 16. P. 52–69.

Davison A. J., Benko M., Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses // J. Gen. Virol. 2003. Vol. 84. P. 2895–2908.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer // Clin. Sci. 2006. Vol. 110. P. 525–541.

Doyle A., Griffiths J. B. (Eds). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology // J. Willey & Sons. Chichester (UK). 1998. 354 pp.

Eaton B. T., Broder C. C., Middleton D. et al. Hendra and Nipah viruses: different and dangerous // Nat. Rev. Microbiol. 2006. Vol. 4. P. 23–35.

Ferreira P. G., Costa-e-Silva A., Aguas A. P. Liver disease in young rabbits infected by calicivirus through nasal and oral routes // Res. Vet. Sci. 2006. Vol. 81. P. 362–365.

Finsterbusch T., Mankertz A. Porcine circoviruses — small but powerful // Virus Res. 2009. Vol. 143. P. 177–183.

Flint S. J., Enquist L., Racaniello V. et al. Principles of Virology (3 ed.) // ASM Press. Washington, DC (USA). 2008. 456 pp.

Freshney R. I. Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique and Specialized Applications (4 ed.) // Wiley-Liss. NY (USA). 2000. 600 pp.

Glass R. I., Bresee J., Jiang B. et al. Rotavirus and rotavirus vaccines // Adv. Exp. Med. Biol. 2006. Vol. 582. P. 45–54.

Glass R. I., Parashar U. D., Estes M. K. Norovirus gastroenteritis // Natl. Engl. J. Med. 2009. Vol. 361. P. 1776–1785.

Goff S. P. Host factors exploited by retroviruses // Nat. Rev. Microbiol. 2007. Vol. 5. P. 253–263.

Goldsmith C. S., Miller S. E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses // Clin. Microbiol. Rev. 2009. Vol. 22. P. 552–563.

Grubman M. J., Baxt B. Foot-and-mouth disease // Clin. Microbiol. Rev. 2004. Vol. 17. P. 465–493.

Hale B. G., Randall R. E., Ortín J. et al. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses // J. Gen. Virol. 2008. Vol. 89. P. 2359–2376.

Hall C. B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus // New Engl. J. Med. 2001. Vol. 21. P. 1917–1928.

Hayat M. A. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications (4 ed.) // University Press. Cambridge (UK). 2000. 543 pp.

Horimoto T., Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses // Clin. Microbiol. Rev. 2001. Vol. 14. P. 129–149.

Hueffer K., Parrish C. R. Parvovirus host range, cell tropism, and evolution // Cur. Opin. Microbiol. 2003. Vol. 6. P. 392–398.

Hughes S. A., Wedemeyer H., Harrison P. M. Hepatitis delta virus // Lancet. 2001. Vol. 378. P. 73–85.

Iordanskiy S. N., Bukrinsky M. I. Reverse transcription complex: the key player of the early phase of HIV replication // Future Virol. 2007. Vol. 2. P. 49–64.

de Jong J. C., Rimmelzwaan G. F., Fouchier R. A. et al. Influenza virus: a master of metamorphosis // J. Infect. 2000. Vol. 40. P. 218–228.

Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E. et al. Fields' Virology (5 ed.) // Wiliams & Wilkins. Philadelphia (USA). 2006. Vol. I–II. 3312 pp.

Kuo J. Electron Microscopy: Methods and Protocols (2 ed.) // Humana Press. Totowa, New Jersey (USA). 2007. 615 pp.

Lenaerts L., De Clercq E., Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections // Rev. Med. Virol. 2008. Vol. 18. P. 357–374.

Mahy B. W. J., van Regenmortel M. H. V. Encyclopedia of Virology (3 ed.) // Academic Press. San Diego, CA (USA). 2008. Vol. I–V. 3680 pp.

Martin D., Gutkind J. S. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer // Oncogene. 2008. Vol. 2, Suppl. S31–S42.

Mueller S., Wimmer E., Cello J. Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event // Virus Res. 2005. Vol. 111. P. 175–193.

Nemerow G. R., Pache L., Reddy V. et al. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies // Virology. 2009. Vol. 384. P. 380–388.

Nermut M. V., Stevens A. C. (Eds.). Animal Virus Structure // Elsevier. Amsterdam. 1989. 444 pp.

Patient R., Hourioux C., Roingeard P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles // Cell Microbiol. 2009. Vol. 11. P. 1561–1570.

Ravindra P. V., Tiwari A. K., Sharma B. et al. Newcastle disease virus as an oncolytic agent // Indian J. Med. Res. 2009. Vol. 130. P. 507–513.

Schat K. A. Chicken anemia virus // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2009. Vol. 331. P. 151–183.

Shchelkunov S. N., Marennikova S. S., Moyer R. W. Orthopoxviruses pathogenic for humans // Springer. Berlin e.a. 2005. 425 pp.

Skjesol A., Skjaeveland I., Elnaes M. et al. IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection // Virol. J. 2011. Vol. 8. P. 396.

Stevenson P. G. Immune evasion by gamma-herpesviruses // Cur. Opin. Immunol. 2004. Vol. 16. P. 456–462.

Subramaniam S., Bartesaghi A., Liu J. et al. Electron tomography of viruses // Cur. Opin. Struct. Biol. 2007. Vol. 17. P. 596–602.

Taubenberger J. K., Morens D. M. 1918 influenza: the mother of all pandemics // Emerg. Infect. Dis. 2006. Vol. 12. P. 15–22.

Vanhecke D., Asano S., Kochovski Z. et al. Cryo-electron tomography: methodology, developments, and biological applications // J. Microscopy. 2011. Vol. 242. P. 221–227.

Yanagi Y., Takeda M., Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism, and pathogenesis // J. Gen. Virol. 2006. Vol. 87. P. 2767–2779.

Zuckermann A. (Ed). Principles and Practice of Clinical Virology (6 ed.) // Wiley-Blackwell. Chichester (UK). 2009. 969 pp.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом разделе принято резюмировать изложенный материал. Однако мы изменим традиции и ограничимся главным — перечнем достижений и перспектив современной вирусологии.

Вирусология конца XX — начала XXI в. обязана своими громкими успехами методическому арсеналу, который используется при анализе архитектуры вирионов и вирусных геномов. Это разнообразные методы электронной микроскопии (сканирующая, низковольтная просвечивающая, криоэлектронная и т.д.), а также высокопроизводительные методы амплификации и дешифровки нуклеотидных последовательностей (PCR в разных модификациях, высокопроизводительное секвенирование). Благодаря этим методам, с одной стороны, обнаружены новые детали строения вирусных частиц, с другой стороны, выявлены ранее неизвестные особенности организации вирусных геномов.

Богатая и многосторонняя информация о вирусах, особенно об их взаимоотношениях с хозяевами, которая была рассеяна по труднодоступным журналам и книжным изданиям, в настоящее время размещается на сайтах и в базах данных, свободно посещаемых через интернет.

На современном этапе вирусология не ограничивается традиционным анализом вирусов животных, растений и бактерий, который продиктован практическими соображениями; в поле ее зрения попали ранее неизвестные или по той или иной причине игнорируемые вирусы других групп живых организмов: архей, протистов, водорослей и грибов. Стали привычными еще недавно экзотические понятия — биоразнообразие вирусов, метагеном вирусов, виросфера и т.д.

Обнаружены новые, в частности необычные типы строения, а также ранее неизвестные способы проникновения, размножения и сборки вирусов.

Создана современная систематика вирусов, которая наряду с фенотипическими признаками учитывает молекулярные и информационные особенности геномных нуклеиновых кислот.

На смену умозрительным гипотезам приходит объективная реконструкция происхождения и филогении отдельных групп вирусов, в частности «гигантских» ядерно-цитоплазматических ДНК-содержащих вирусов (NCLDV).

Восприятие вирусов только сквозь призму антропоцентризма уступает место пониманию их глобальной роли: они — одна из основных граней биоразнообразия, численно доминирующие живые существа и аккумуляторы биогенных элементов. Доказаны их экологическая функция в микробной петле и созидательное участие

в качестве векторов или интегрированных генетических элементов в эволюции клеточных геномов.

В практической сфере, с одной стороны, разработаны, внедрены или ждут внедрения новые антивирусные вакцины и химиопрепараты; с другой стороны, вырисовывается перспектива терапевтического использования некоторых вирусов, например онколитических пикорнавирусов и парамиксовирусов.

Многое еще предстоит узнать; в частности, остается без ответа вопрос о происхождении и эволюции РНК-содержащих вирусов.

Вирусология, исторически вышедшая из лона микробиологии, за последние десятилетия обрела самостоятельность и окончательно оформилась в одну из ведущих биологических наук, которая не только решает фундаментальные проблемы, но и приносит неоценимую практическую пользу.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Автопраймирование 338, 419
Адаптор
— Apaf 88
— Cardif 91
— MyD88 90
— TRIF 91
Адсорбция, *см.* прикрепление 43
— неспецифическая 281
— специфическая 281
— — первичное связывание 43
— — вторичное связывание 43
Амантадин 391
Амурин 161
Антиген
— видовой 285
— групповой 285
— дельта 406
Антигенный
— дрейф 388
— сдвиг 388
Антирецептор 44
Апоптин, *см.* белок смерти 283, 310
Апоптоз 85
Арбовирус 283
Аттенуация 287, 345
Ацикловир 312, 319

Бактериофаг, *см.* фаг 14
— адсорбция 144
— вирулентный, *см.* литический 138, 162, 168
— головка 34
— защита ДНК от рестрикции 150
— инъецирование нуклеиновой кислоты 53, 149
— количественный учет 142
— культивирование 142
— литический 138, 162, 168
— лямбда 182
— мю 171, 172
— одиночная кривая репродукции 41–42
— освобождение вирионов 161
— препаративное получение 143
— проникновение 148
— репликация генома 152
— рецепторы 44–47, 144–148
— транслокация 149
— Т-серия 137
— умеренный 138, 162, 168
— упаковка генома
— — механизм «headful» 159
— хвостовой отросток 34
Белок
— движения 248
— ДНК-изгибающий
— — Fis 164
— — IHF 164
— — Xis 164
— запаздывающий ранний 157
— каркасный 65, 158, 317
— матрикса 37, 410
— поздний 60, 157, 192
— предранний 157
— прикрепления вируса, *см.* белок VAP 43, 276
— ранний 157, 192
— самый ранний 157
— слияния 55, 282
— смерти, *см.* апоптин 283, 310
— структурный 192, 305, 348
— суперкапсидный 36
— теплового шока 343
— AGO1 82
— CPSF30 387
— DAF 370
— FADD 87
— FasL 87
— Gra, *см.* гранзим 87
— ITAF 370
— Ocr 150
— PABPII 387
— Rep 156, 252, 336
— SSB 188
— TAP 87
— Tap 154
— TP 306
— Tpg 154
— VAP, *см.* белок прикрепления вируса 43, 276
— Vpg 250, 261, 357, 369, 371
Бешенство 493–405
Бляшка 14
Бляшкообразующая единица (PFU) 41, 294

Вакцина
— история применения 11
— против гриппа 392
— Солка 377
— Сэбина 377
Вакцинация 329, 345
Вариола, *см.* оспа 328
Вариоляция 329
Вирион, *см.* вироспора; вирусная частица 25
— кор, *см.* нуклеокапсид; сердцевина 29
— морфогенез 67
— оболочка 28–29
— сборка капсида 65
— симметрия
— — икосаэдрическая 32
— — сложная 34
— — спиральная 33
— транслокация 49
— ферменты в составе 37
Вироид
— репликация
— — асимметричный вариант 267
— — симметричный вариант 268
— строение 266
Вириоплазма 275, 278, 343, 350
Вироплазма 35
Виросома, *см.* тельце Гварнери; тельце Пашена 332
Вироспора, *см.* вирион; вирусная частица 25
Виросфера 354
Вирофаг 220
Вирус
— адсорбция, *см.* прикрепление 43
— безоболочный 28
— ВИЧ 407, 409, 417
— выход потомства из клетки 67
— декапсидирование 58
— дефектный интерферирующий 64
— история открытия 10–13
— классификация Балтимора 96
— клеточный тропизм 43, 284, 349, 372
— названия 99–100
— оболочный 28
— — интернализация 55
— определение
— — для вида 98–99
— — для понятия 22–23, 28
— отпочкование 66–67
— партитность 25
— презентация генома 52
— прикрепление, *см.* адсорбция 42
— происхождение термина 11
— проникновение 52, 58
— раздевание
— — полное 52
— — частичное 52
— рецепция 43
— -сателлит 64, 220
— сердцевина, *см.* кор; нуклеокапсид 29
— серотип 287
— серотипирование 36
— систематика 95–97
— созревание 66, 283
— типовой вид 99
— фильтрующийся 11
— -хелпер 64
— хромосома 36
Вирусная инфекция
— абортивная 69
— латентная 71, 296, 298
— литическая 295
— медленная 71, 298
— острая 70, 297
— персистентная 70, 297
— продуктивная 69
— рестриктивная 69
— хроническая 71, 296, 298
Вирусная фабрика 217
Вирусная частица, *см.* вирион; вироспора 25
Вирусный репликон 293
Вирусоид 265
Вирусоподобная частица 127, 327

Гексон 32
Гемагглютинин 43, 382
Ген
— запаздывающий ранний 158
— перекрывающийся 39, 139
— поздний 60, 157
— ранний 60, 157
— самый ранний 59, 157
— «стелс» 281, 308
— *env* 408, 413
— *gag* 408, 413
— *pol* 408, 413
Геном вируса
— дефектный 63
— информационная емкость 38
— минимальный набор генов 39
— монолитный 35, 40
— партитный 36, 40, 226
— презентация 52
— размер 38
— сегментированный 36, 40
— стратегии 59, 62
Геномная нуклеиновая кислота 35
— декапсидирование 53, 58
— инкапсидирование, *см.* упаковка 65
— — сайзспецифичное 65
— — сайтспецифичное 65
— интернализация 52
— инъецирование 53
— — механизм 149

— кольцевая 35
— линейная 35
— нетранслируемый участок (UTR) 369
— упаковка, *см.* инкапсидирование 65
Геномпрезентирующий аппарат 53
Гепатит
— A 288, 367, 374–375
— B 288, 405, 418–423
— C 113, 288
— D 288, 405–406
— E 113, 288
Герпес 312, 319–322
Гиповирулентность 226
Гирус 216
Главный комплекс гистосовместимости 318
Гранзим, *см.* белок Gra 87
Грипп
— «азиатский» 389
— «Гонконг» 389
— «желудочный» 358
— «испанка» 389–390
— птиц 389–390
— «свиной» 389
— «сезонный» 387, 390

Дайсер-фермент 81, 271
Десмотубула 237
Домен
— DD 87

Желтая лихорадка 13

Затравочный комплекс 65
Зооноз 404

Изошизомер 76
Икосадельтаэдр 32
Икосаэдр 32
Иммунизация
— искусственная 11
Иммунитет 71
— приобретенный 345, 352, 358
Инсерционная последовательность 173
Интеграза 162–164
Интегрин 48
Интеин 223
Интермедиат Шапиро 174
Интерферон
— история открытия 89
— классификация 89
Интрон 223
Итерон 252

Кавеолин-окаймленная везикула 57
Кавеоль 57
Кавеосома 57
Капсид 28
— сборка 65
Капсомер 29
Каспаза 85
Катящееся кольцо, *см.* репликация, сигма-механизм 156–157
Квазивид 99, 337
Кишечные вирусы 372
Клатрин-окаймленная везикула 56
Клеточная культура
— адгезионная 292
— непермиссивность 293
— первичная 291
— перевиваемая 291
— поляризованная 292
— суспензионная 292
— HeLa 291
— MDCK 292
— Vero 292
Клеточная стенка
— бактерии 144
— растения
— — вторичная 236
— — первичная 236
Комплекс RISC 82
Конкатемер 65, 157
Концевая избыточность 155
Концевой повтор
— длинный 277, 411
— инвертированный 155, 306, 315, 331, 338
— прямой 155
Кор, *см.* нуклеокапсид; сердцевина 29
Корь 393, 397
Космида 184
Краснуха 294, 321
Криоэлектронная томография 302
Кэпирование
— механизм «cap-snatching» 378, 379, 385

Латеральное тело 331
Лентивирус 409
Лизин, *см.* эндолизин 67, 161, 169
Лизогенизация 161
Лизогения 16
Лизогенная конверсия 141, 165
Липкий конец 182, 315
Липопротеин высокой плотности 370

Мавирус 221
Макропиноцитоз 57
Марселевирус 219
Международный кодекс классификации и номенклатуры вирусов (ICVCN) 95
Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) 94

Метилтрансфераза
— DAM 74
— HEN1 82
Микробная петля 121
Микродомен
— raft 382, 386
Мимивирус 216
Модификация 73
Морон 124
Мотив
— Zn-finger 386, 396
— pan-handle 383

Негативное контрастирование 300
Нейраминидаза 382
Нуклеокапсид, *см.* кор; сердцевина 29

Окаймленное углубление 56
Органная культура 293
Орфан 133
Оспа, *см.* вариола 328
Отпочкование вируса 66

Параретровирус 63, 275
Пентон 32
Пепломер 29
Перфорин 87
Плазмида 138, 225, 384
Плазмогамия 40
Плазмодесма 237
Полиаденилирование 61
Полиомиелит 373–374
Полипуриновый тракт 411
Портал 159
Посттранляционный процессинг 258, 261
Потоцитоз 57
Прион 266
Провирус 63
Промотор 277, 309
Проникновение вируса 43
Протеинкиназа
— IKKα 398
— JAK, *см.* Янус-киназа 92
— PKR 92
Протомер 29
Протоонкоген 416
Протоспейсер 79
Профаг 162
— индукция 162
Псевдолизогения 167

Реассортация 40, 352
Ревертаза, *см.* транскриптаза, обратная 63, 407
Регуляторный элемент
— IRES 361, 369
Рекомбинация
— гомологическая 255
— — аберрантная 255
— негомологическая 255
— незаконная 164
Ремантадин 391
Репликативный интермедиат 59
Репликация
— *ori*-зависимая
— — линейной ДНК 154
— — тета-механизм 153
— *ori*-независимая
— — сигма-механизм, *см.* катящееся кольцо 155–157
Репродукция
— дисъюнктивный способ 27
— интегральный способ 27
Рестриктаза 17, 73
Рестрикция 72
Рестрикция/модификация 73–77
Ретровирус 62, 407
Ретротранспозон 407
Рецептор
— бактериофага 44–47
— вируса животных 47–48
— паттерн-распознающий 90
— CAR 281, 305, 397
— CD4 55, 281, 416
— Fas 87
— IFNAR 89, 308
— MDA5 91
— RIG1 91
— RLR 91
— SLAM 396
— TCR 87
— TLR 90
— ZBP1
Рибозим 268
РНК
— вирус-ассоциированная 81
— -интерференция 81
— малая 81
— — интерферирующая 81 270
— микро 81
— редактирование хозяином 344, 396
— -сайленсинг, *см.* сайленсинг 81
— сателлитная 64, 256
— субгеномная 256

Сайленсинг, *см.* РНК-сайленсинг 81
— антивирусный 84
— вирусная супрессия 85
— -комплекс, *см.* комплекс RISC 81, 270
— посттранскрипционный 81, 83
— транскрипционный 83
Сайт
— *att* 162

— CITE 257
— *cos* 183
— IRES 257
— *pac* 66, 160, 170
— *oriC* 153
— *terC* 154
Свинка 393
Сдвиг рамки считывания 258
Серотипирование 36
Сиаловая кислота 304, 382, 391
Сигнал ядерной локализации 282, 307
Синдром хронической усталости 321, 408
Сканирующая зондовая микроскопия 303
Слияние мембран 55
СПИД 409, 416–418
Сплайсинг 306, 385
— альтернативный 414
Суперкапсид 29

Тегумент 314
Тельце
— Гварнери, *см.* виросома 332
— Пашена, *см.* виросома 331
Терминаза 59
Трансдукция 167
— общая 140, 170
— специализированная 140, 171
Транскриптаза
— обратная, *см.* ревертаза 63, 407
Транскрипционный фактор
— IRF 91, 351
— NF-κB 91
Транскрипция
— обратная 63, 407
— — «strong-stop» механизм 411–413
— — «sop-start» механизм 396
Трансляция
— кэп-зависимая 256
— кэп-независимая 256
— нетранслируемый участок 193
— фактор инициации eIF 357
Транспозаза 174
Транспозиция
— репликативная 173
Транспозон 173
Трансфекция 339
Триангуляционное число 32

Ультрамикроб 12
Убиквитирование 351
Ультратонкий срез 301

Фаг, *см.* бактериофаг 14
Фагосома 57
Фаготерапия 14, 139
Фаготипирование 145
Фагоцитоз 57
Фактор
— вирулентности 165
— патогенности 166
Фитовирус
— переносчики 244–247
— неперсистирующий 244
— персистирующий
— — пропагативный 244
— — циркулентный 244
— транспорт 248
Фурин 386

Хиазма Холлидея 179
Холин 68, 161

Цианофаг 125
Циклоферон 311, 377
Цистрон 360
Цитокин 89, 334
Цитопатическое действие 294

Шип 55
Шпилька 154, 183, 222, 266, 306, 338, 383

Экзоцитоз 295, 318
Эклипс-период 42
Эксклюзионный диаметр 12, 49, 248
Экспортин 368
Эксцизионаза
— Xis 163
Эксцизия 163
Электронная микроскопия
— просвечивающая 299
— — низковольтная 301
— сканирующая 302
— — экологическая 302
Элементарное тело 25
Эндолизин, *см.* лизин 67, 161, 169
Эндосома
— ранняя 56, 368
— поздняя 57, 385
Эндоцитоз
— рецептор-опосредованный 56
Эписома 296, 322, 326
Эпифитотия 239

Янус-киназа 92
Ящур 12, 48, 366

А. В. Пиневич
А. К. Сироткин
О. В. Гаврилова
А. А. Потехин

ВИРУСОЛОГИЯ



«...Это долгожданная и высоко востребованная книга. На фоне дефицита отечественных и переводных изданий создан учебник, способствующий концептуальному пониманию вирусов как молекулярных паразитов, размножающихся в живой клетке. До сих пор у нас не было издания, которое на современном уровне излагало бы общую вирусологию и частные разделы этой науки.

В. В. Зарубаев,
НИИ гриппа МЗСР РФ

На первой стороне обложки — *Х. Миро.* Навстречу радуге. 1941. На четвертой стороне обложки — *Х. Миро.* Навстречу радуге. Фрагмент

Хуан (Хоан) Миро (1893-1983 гг.) — испанский живописец, скульптор, график, дизайнер, один из лидеров абстрактного и сюрреалистического направлений в искусстве XX века. Оставаясь верным принципу освобождения творческого подсознательного начала из-под контроля логики и разума, Миро отличался разнообразием и жизнерадостностью полотен. «Духовный отец» современного авангарда.

«...Вирусы, или ультрамикроскопические существа неклеточного строения, являются неотъемлемой частью органической жизни. Они бесчисленны, весьма разнообразны и встречаются во всех экологических нишах, в том числе экстремальных. Популяция вирусов в Мировом океане — крупнейший генофонд на планете — насчитывает до 10^{31} особей; в гидросфере с их участием ежесуточно возобновляется около 20% глобальной биомассы. Явление вирусного паразитизма наблюдается у всех основных групп живых организмов: бактерий, архей, протистов, грибов, водорослей, высших растений и животных [с. 7].

Издательский дом Санкт-Петербургского государственного университета