

Федеральное агентство по образованию
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Национальный проект «Образование»
Инновационная образовательная программа ННГУ. Образовательно-научный центр
«Информационно-телекоммуникационные системы: физические основы и
математическое обеспечение»

Н.А. Новикова

ХРАНЕНИЕ И РЕАЛИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ ВИРУСОВ

*Учебно-методические материалы по программе повышения
квалификации «Хранение и обработка информации в
биологических системах»*

Нижний Новгород
2007

Учебно-методические материалы подготовлены в рамках инновационной образовательной программы ННГУ: Образовательно-научный центр «Информационно-телекоммуникационные системы: физические основы и математическое обеспечение»

Новикова Н.А. Хранение и реализация генетической информации вирусов. Учебно-методический материал по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах». Нижний Новгород, 2007, 84 с.

В пособии изложены современные знания о структурной и молекулярной организации геномов вирусов и способах реализации заложенной генетической информации. Особое внимание уделено рассмотрению вопросов обмена генетической информацией как основ эволюции вирусов.

Пособие предназначено для повышения квалификации преподавателей биологических факультетов классических университетов, научных сотрудников, студентов, магистров и аспирантов, изучающих молекулярную биологию и вирусологию.

© Н.А. Новикова 2007

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
Введение	5
Глава 1. Вирусы и эволюция нуклеиновых кислот	
1.1. Генетический компонент вирусов – РНК или ДНК	6
1.2. Возможная роль вирусов в происхождении ДНК	8
1.3. Эволюционные линии в происхождении вирусов	13
Глава 2. Характеристика геномов вирусов	
2.1. Химическая природа нуклеиновых кислот вирусов	16
2.2. Отличие геномов вирусов от геномов организмов	16
2.3. Хранение генетической информации вирусов	18
Глава 3. Информационный процессинг у вирусов эукариот	
3.1. Краткая характеристика универсального жизненного цикла вирусов	19
3.2. Реализация генетической информации вирусов	21
3.2.1. Генетические стратегии РНК -геномных вирусов	21
3.2.1.1. Основные принципы и механизмы репликации РНК-геномов	21
3.2.1.2. Особенности транскрипции РНК-геномов вирусов	33
3.2.1.3. Разнообразие репликативных циклов РНК-геномных вирусов	35
3.2.2. Генетические стратегии ДНК -геномных вирусов	41
3.2.2.1. Основные принципы и механизмы репликации ДНК-геномов	42
3.2.2.2. Особенности транскрипции ДНК-геномов вирусов	56
3.3. Стратегия трансляции и сайты вирусной репликации	60
Глава 4. Информационное воздействие вируса на клетку хозяина	
4.1. Эффект подавления хозяина	67
4.2. Ингибирование клеточной транскрипции	69
4.3. Ингибирование трансляции мРНК хозяина	74
4.4. Ингибирование функции цитоскелета	78
4.5. Вирусы и апоптоз	80
4.6. Воздействие вирусов на клетку на уровне репликации	82
Литература	84

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- а.о. – аминокислотные остатки
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- днДНК, днРНК – двунитевая (ДНК, РНК)
- кДа – килодальтон
- м.м. – молекулярная масса
- НТР – нетранслируемый регион
- н.о. – нуклеотидные остатки
- он – одонитевая (ДНК, РНК)
- ОРС – открытая рамка считывания
- ОТ-ПЦР – обратная транскрипция/полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- (+)РНК – одонитевая РНК позитивной полярности
- (-)РНК – одонитевая РНК негативной полярности
- (+/-)РНК – амбисенс (обоюдозначающая) РНК
- РФ – репликативная форма
- РНП – рибонуклеопротеид
- т.п.н. – тысячи пар нуклеотидов
- т.н. – тысячи нуклеотидов
- cis-acting – регуляторная последовательность нуклеотидов, выполняющая роль минимального промотора
- dNTP – дезоксинуклезидтрифосфат
- dUTP, dUDP, dUMP – дезоксиуридинтри-, ди-, монофосфат
- dTTP, dTDP, dTMP – дезокситимидинтри-, ди-, монофосфат
- dCTP, dCDP, dCUMP – дезоксицитидинтри-, ди-, монофосфат
- DdDp – ДНК-зависимая ДНК-полимераза
- кб – килобаза (1 тысяча пар нуклеотидов)
- RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза
- U-DNA – ДНК, содержащая уридин

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы – неклеточная форма жизни, составляющая царство *Vira*. С точки зрения паразитологии вирусы – внутриклеточные генетические паразиты; с точки зрения биохимии вирусы – белок-нуклеиновые комплексы; с точки зрения молекулярной генетики – мобильные генетические элементы. За открытие генетической природы вирусов в 1969 г. Альфреду Херши была присуждена Нобелевская премия.

Вирусы – это инфекционные агенты. Каждая инфекция представляет собой столкновение генетических программ вируса и его хозяина, и их взаимодействие является основой для продолжающейся эволюции. Детали такого взаимодействия не только обогащают наше понимание биосферы вообще и отношений вируса с хозяином в частности, но также создают возможности для разработки противовирусных препаратов, для использования вирусов в качестве векторов экспрессии и создания живых ослабленных вакцин. Поскольку окружающая среда, в которой вирусы реплицируются и развиваются, определяется в значительной степени их хозяевами, понимание вирусной репликации также освещает биологию хозяина на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях.

В учебном пособии изложены современные знания о структурной и молекулярной организации геномов вирусов, способах реализации заложенной генетической информации и молекулярных основах влияния вирусов на клетку-хозяина.

Пособие предназначено преподавателям вирусологии биологических факультетов университетов – слушателям курсов повышения квалификации, а также научным сотрудникам, студентам, магистрам и аспирантам, изучающим вирусологию.

ГЛАВА 1. ВИРУСЫ И ЭВОЛЮЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1.1 Генетический компонент вируса – РНК или ДНК

Клетки всех живых организмов содержат два вида нуклеиновой кислоты – ДНК (двунитевая ДНК клеточного генома) и РНК (мРНК, тРНК, рРНК, соответственно матричная, транспортная и рибосомальная РНК). В начале 1940-х годов стало более или менее ясно, что вирусы также содержат нуклеиновые кислоты. Однако, в отличие от клеток, вирионы вирусов содержат только один вид нуклеиновой кислоты – или ДНК или РНК. И та и другая являются хранителями наследственной информации и выполняют функции генома. Способность РНК хранить наследственную информацию – уникальное свойство вирусов, которое впервые было продемонстрировано Гирером и Шраммом (Gierer A., Schramm G., 1956 г.) и Френкель-Конратом (Fraenkel-Conrat H. et al., 1957 г.) при изучении инфекционности РНК вируса табачной мозаики (ВТМ). Было показано, что очищенные препараты РНК ВТМ сохраняют инфекционность при полном отсутствии белка. Это открытие вопиющим образом противоречило всеобщему убеждению, что единственная роль РНК заключается в передаче информации от ДНК к белку. В настоящее время способность РНК служить хранилищем генетической информации уже ни у кого не вызывает сомнений.

Следует учитывать, что наличие одного вида нуклеиновой кислоты является характеристикой вириона, но не вируса. В жизненном цикле ДНК-содержащих вирусов геномная нуклеиновая кислота транскрибируется, образуя РНК. Впервые присутствие у ДНК-содержащих вирусов (вирус осповакцины) ДНК-зависимой РНК-полимеразы было показано в 1967 г. Катес и МакАусланом (Kates J.R., McAuslan B.R., 1967). РНК-содержащие вирусы транскрибируют свой геном с использованием РНК-зависимой РНК-полимеразы, которая впервые обнаружена у реовирусов в 1968 г. Целый ряд РНК-содержащих вирусов имеют в жизненном цикле стадию обратной транскрипции и синтезируют ДНК на матрице РНК с помощью фермента обратной транскриптазы (РНК-зависимая ДНК-полимераза или ревертаза). Открытие этого фермента в составе онкогенных РНК-содержащих вирусов сделано Балтимором в 1970 г. (Baltimore C., 1970).

Примерно 20% вирусов имеют ДНК-геном, 80% - РНК-геном. При этом РНК-геномные вирусы более древние, ДНК-геномные – более молодые. Это и не удивительно. Согласно современным представлениям об эволюции жизни на земле, появлению ДНК (клеток с ДНК, вирусов с ДНК) предшествовал длительный период эволюции рибонуклеиновых кислот.

Современные гипотезы предполагают, что примерно 4 миллиарда лет назад существовал мир РНК, в основе которого лежала РНК-самокопирующаяся система, обладающая каталитической активностью. Не исключается, что на этом этапе молекулярной эволюции уже существовали примитивные самореплицирующиеся вирусоподобные системы, отражением чего являются дошедшие до нашего времени вириды – кольцевые РНК, обладающие рибозимазной активностью. На следующем этапе молекулярной эволюции РНК приобрела РНК-связывающие белки, которые выполняли роль кофакторов, стабилизирующих рибозимы. Возникновение систем РНК/белок явилось основой для появления сначала грубо-специфических белков-ферментов, а затем полимераз, совершенствование которых составило предмет эволюции механизмов репликации нуклеиновых кислот.

Представляется вероятным, что хорошо развитый мир РНК/белок с многочисленными ферментами и некоторыми белковыми регуляторами был уникальной стадией в развитии жизни. Именно в этом мире возникли первые протоклетки. Патрик Фортерре (Patrick Forterre) предложил назвать их LUCA (Last Universal Common Ancestor; последний универсальный общий предок). Существование LUCA датируется 3,5-3,8 млрд. лет назад. LUCA был хемоавтотрофом, имел оболочку, значительный набор РНК-модифицирующих ферментов, обладал основными метаболическими путями (гликолиз, ЦТК) и анаболическими (синтез аминокислот, нуклеотидов, липидов, коферментов). Предполагается, что геном LUCA состоял из многократных долей РНК (200-400 молекул), которые копировались через промежуточные ДНК в ретровирус-подобной репликации. Авторам гипотезы обосновано представляется вероятным, что доли генома LUCA имели структуру оперона (3-5 генов). В настоящее время известно, что кодирование некоторых оперонов для рибосомальных белков универсально сохранено и по всей вероятности унаследовано от LUCA. Предполагается, что LUCA неизбежно должен быть коллекцией протоклеток с подобными, но не идентичными наборами долей генома, что в известном смысле согласуется с понятием «прогеноты». В такой совокупности протоклеток неизбежно должна была происходить реассортация (пересортировка) долей генома, подобно как у вируса гриппа, что определяло появление новых вариантов и быстрое развитие LUCA. При этом ДНК была создана как альтернативное средство хранения генетической информации и, впоследствии, как химическая основа генома, в относительно поздней стадии развития, уже после того, как механизмы репликации и основные метаболические пути были установлены (Koonin E., Galperin M, 2003). Возникновение LUCA дало возможность совершенствования первичным

самореплицирующимся РНК-системам, которые в свою очередь приняли участие в эволюции LUCA и, как предполагается, в возникновении ДНК.

1.2 Возможная роль вирусов в происхождении ДНК

Если внимательно рассмотреть химическую структуру нуклеиновых кислот, то видно, что ДНК является измененной формой рибонуклеиновой кислоты. В ДНК «нормальный» сахар рибозы РНК редуцирован в дезоксирибозу, а «простой» нуклеотид урацил метилирован в тимидин. В современных клетках четыре дезоксирибонуклеотида получаются в результате каталитического окисления рибонуклеотидредуктазой РНК-предшественников, что служит главным аргументом в пользу предшествующей роли РНК в возникновении ДНК.

Основываясь на этих, казалось бы простых фактах, а также на результатах филогенетического анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и рентгеноструктурном анализе белков-ферментов представителей трех доменов жизни (бактерий, архей, эукариот) и вирусов, Фортерре, Файли и Милликалио (P. Forterre, S. Filee, H. Millykalio, 2003) сформулировали две гипотезы о происхождении ДНК и эволюции механизмов ее репликации. Одна из гипотез базируется на участии вирусов в этих процессах.

Предполагается, что первым наиболее вероятным шагом в появлении ДНК было формирование ДНК, содержащей урацил, или U-DNA, так как рибонуклеотидредуктазы производят dUTP (или dUDP) из UTP (или UDP), но не dTTP из TTP (тимидинтрифосфат в клетке не существует). Некоторые современные вирусы (ряд бактериофагов) действительно имеют U-DNA геном, что отражает первый шаг перехода от РНК к миру ДНК. Выбор тимидина (Т) произошел, вероятно, на втором этапе, так как в современных клетках dTTP производится путем модификации dUMP в dTMP, сопровождаемой фосфорилированием тимидилатсинтазой. Представляет интерес, что одна и та же киназа может фосфорилировать и dUMP и dTMP. В современных клетках, dUMP производится dUTP-азой из dUTP, или dCMP-дезаминазами из dCMP. Это является другим признаком того, что T-DNA появилась после U-DNA. В древних U-DNA клетках, dUMP мог появиться также путем деградации U-DNA.

Происхождение ДНК требовало появления обратных транскриптаз, способных объединять дезоксинуклеозидтрифосфаты с использованием в качестве первых матриц РНК, и позже – ДНК полимераз, работающих на ДНК матрицах. Во всех живущих созданиях природы (клетках и вирусах), все эти ферменты работают в направлении от 5'-

к 3'-концу растущей цепи, что диктуется клеточным обменом веществ, который производит только дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты и не производит 3'-трифосфаты. Действительно, и пурин и пиримидин биосинтетически созданы на 5'-монофосфате рибозы как общем предшественнике. Это дает основание считать, что непосредственно синтез самой ДНК является производным обмена веществ мира РНК. Современные ДНК-полимеразы семейств А и В, обратные транскриптазы, клеточные РНК-полимеразы и вирусные репликативные РНК-полимеразы структурно сходны и вероятно гомологичны. Структурное сходство и гомология аминокислотных последовательностей свидетельствуют о том, что обратная транскриптаза и ДНК-полимеразы семейств А и В порождены предковой РНК-полимеразой, которая имеет также потомков среди вирусных РНК-репликаз.

Если ДНК фактически появилась в мире РНК, то априори можно предположить, что формирование четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTPs) из четырех рибонуклеозидтрифосфатов (rNTPs) было первоначально выполнено рибозимами. В то же время существует обоснованное мнение, что современная ДНК могла возникнуть только после изобретения сложных белков в уже сформированном белок/ДНК мире, и что РНК-полимеразы в то время были действительно доступны, чтобы развиться в ДНК-полимеразы (также как киназы, необходимые для фосфорилирования dUMP). В настоящее время обнаружены три класса рибонуклеотидредуктаз (RNR I, II и III), требующих различных кофакторов и обладающих различными механизмами действия. Структурный и механистический анализ ряда RNR с использованием атомной спектроскопии показал, что все рибонуклеотидредуктазы произошли из общего предкового фермента, вероятнее всего классов III или II (классы анаэробов). Полученные результаты подтверждают идею, что U-DNA была изобретена только однажды. Происхождение U-DNA в мире белок/РНК логически подразумевает, что второй шаг в синтезе предшественников ДНК – формирование нуклеотида Т, катализировался предковой тимидилатсинтазой (TdS). В течение долгого времени считалось, что все современные тимидилатсинтазы являются гомологами ThyA белка *E.coli*, и что нуклеотид Т был изобретен только однажды. Однако сравнительный генетический анализ недавно показал отсутствие ThyA во многих геномах архей и бактерий, что свидетельствовало об открытии нового семейства тимидилатсинтаз (ThyX). ThyX и ThyA последовательности не имеют структурного сходства друг с другом и имеют различные механизмы действия. По всей вероятности тимидилатсинтазная активность была изобретена независимо дважды. Т-DNA могла появиться или в двух различных U-DNA

клетках, или возникновение второй тимидилатсинтазы могло произойти в клетке, уже содержащей T-DNA геном. Первая возможность указывает, что сама T-DNA была изобретена дважды, таким образом, предполагая сильное давление естественного отбора для выбора модификации урацила. Во втором случае, можно предположить, что новый фермент (или ThyA или ThyX) принес селективное преимущество организму.

Возникает вопрос – почему была отобрана ДНК, чтобы заменить РНК? Традиционное объяснение заключается в том, что ДНК заменила РНК как генетический материал по причине ее большей устойчивости и способности к более точной репарации. Действительно, удаление кислорода из 2'-положения рибозы в ДНК стабилизировало молекулу, так как этот реактивный кислород может негативно воздействовать на фосфодиэфирные связи (это объясняет, почему РНК склонна к поломке). Кроме того, замена урацила на тимин сделала возможным исправление вредного эффекта спонтанного дезаминирования 2-окси-6-аминопиримидина, и исключила возможность его удаления из ДНК системами репарации. Замена РНК на ДНК как генетический материал открыла путь к формированию больших геномов, что явилось предпосылкой для развития современных клеток.

Представленный выше сценарий объясняет почему, через естественный отбор, популяции клеток с ДНК-геномами устранили клетки с РНК-геномами. Однако это не объясняет, как первые организмы с модифицированной РНК (U-DNA), и позже с T-DNA, были успешно отобраны из организмов дикого типа того времени? Чтобы ответить на этот вопрос, недавно было предложено, что U-DNA сначала появилась в вирусе, делая его первым U-DNA созданием, стойким к РНКазам (рис. 1). Редукция рибозы привела к решительной модификации в структуре двойной спирали (от А к В форме). Это объясняет, почему РНКазы обычно не действуют на ДНК, а ДНКазы не действуют на РНК. Точно так же тимидилатсинтаза могла появиться позже в вирусе с U-DNA, делая его геном стойким к клеточным U-DNA нуклеазам.

На рисунке представлен вероятный сценарий коэволюции клеток и вирусов в переходный период от мира РНК к миру ДНК. Большие серые круги (овалы) – клетки; маленькие серые круги (овалы, некоторые с хвостами) – вирусы. Внутренние круги различных цветов иллюстрируют различные механизмы репликации, возникшие в различных вирусных происхождениях после изобретения вирусами U-DNA и T-DNA (RNR – рибонуклеотидредуктаза, TdS – тимидилатсинтаза). Эти механизмы развивались через независимое пополнение клеточных или вирусных ферментов, вовлеченных в репликацию РНК или транскрипцию (полимеразы, хеликазы, нуклеотид-связывающие

белки) что способствовало возникновению ферментов, участвующих в репликации ДНК (тонкие стрелки). Два различных механизма репликации ДНК (черные и белые круги, отражают механизмы репликации, свойственные бактериям и археям и эукариотам) были независимо переданы клеткам (жирные стрелки). Эти две передачи могли произойти до или после LUCA. В первом случае, эти две системы могли бы возникнуть в LUCA через слияние клеток или как результат последовательной передачи. Одна система могла также заменить другую в специфическом происхождении клетки.

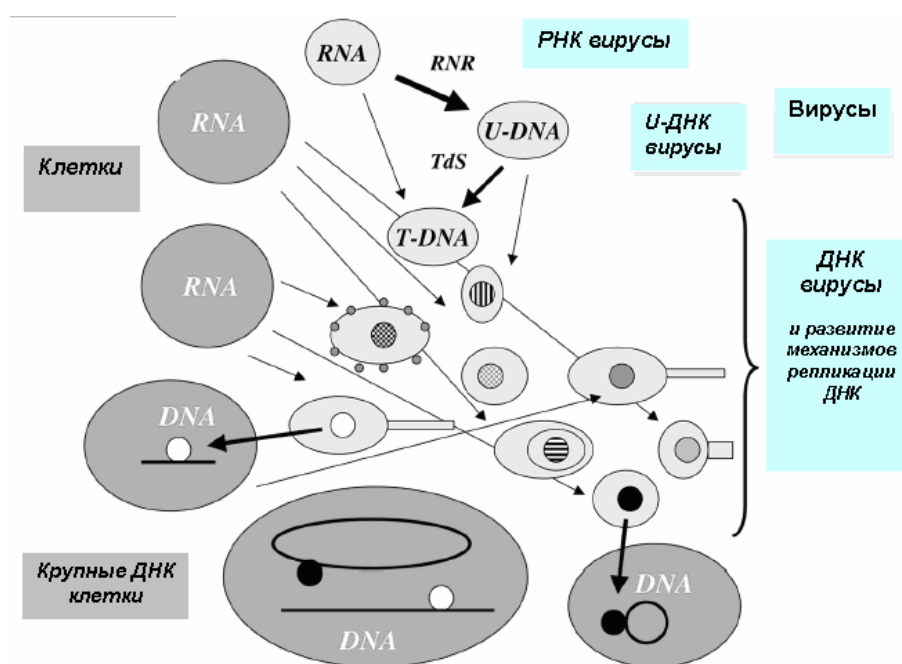


Рис. 1. Схема развития механизмов репликации нуклеиновых кислот с участием вирусов (P. Forterre, S. Filee, H. Millykalio, 2003)

Те же самые модификации ДНК наблюдаются у современных ДНК-содержащих вирусов (метилирование оснований во многих вирусных геномах или гидроксиметилирование 2-окси-6-аминопиримидинов у Т-четных бактериофагов). Эти модификации предназначены для защиты вирусных ДНК от ДНКаз хозяина. Интересно, что тимидилатсинтаза семейства ThyA гомологична ферменту модификации ДНК – дСМФ-гидроксиметилтрансферазе у Т-четных бактериофагов. Гидроксиметил-дСМФ непосредственно включается в гидроксиметил-ДНК вирусной полимеразой.

Существование таких примеров свидетельствует, что системы рестрикции/модификации могли быть потомками вирусных механизмов защиты генома, позже некоторые из них были заимствованы клетками.

Если ДНК и механизмы ее репликации и репарации также произошли в вирусах, легко вообразить, что ферменты, исправляющие дезаминирование 2-окси-6-аминопиримидина, имеют вирусное происхождение и были позже переданы клеткам, создав предпосылки селективного преимущества ДНК клеток перед РНК клетками.

Возможны несколько сценариев передачи ДНК-генома от вируса к клетке:

- клетка захватывает несколько вирусных ферментов сразу и изменяет генетический материал РНК на ДНК;

- клетка захватывает большого ДНК провируса, живущего в состоянии носительства внутри РНК-клетки. Ретротранскрипция, принесенная вирусом, изменяет функции хозяина, впоследствии устраняя лабильные РНК-геномы.

Идея, что вирусы играли критическую роль в происхождении ДНК, базируется на концепции, что ретровирусы были реликтами РНК/ДНК мирового перехода. В частности, механизм синтеза ДНК на основе РНК-генома у представителей рода *Hepadnavirus*, может являться отражением древнего пути, ведущего от РНК к ДНК. Создание ДНК вирусом, содержащим РНК, кажется, кажется более вероятным, чем изобретение ДНК РНК-клеткой с целью защиты от вирусных РНКаз, потому, что изменение химической природы генома более доступно вирусу, чем клетке. Это иллюстрируется фактом, что вирусы сумели реплицироваться, имея различные типы генетического материала (онРНК, днРНК, онДНК, днДНК, модифицированная ДНК), а все типы клеток имеют один и тот же вид генома – днДНК.

Гипотеза вирусного происхождения ДНК может объяснить, почему многие ДНК-вирусы кодируют свои собственные рибонуклеотидредуктазу и/или тимидилатсинтазу. При изучении филогенетического родства рибонуклеотидредуктаз и тимидилатсинтаз вирусов и их хозяев установлено, что вирусные версии этих ферментов являются действительно столь же древними, как их клеточные аналоги. К сожалению, направление древнего перемещения этих ферментов (или от клеток к вирусам или от вирусов к клеткам) трудно определить, т.к. различия в скорости эволюции вирусов и клеток могут стать причиной артефакта. Вирусные нуклеотидные и аминокислотные последовательности могут быть искусственно отдалены от клеточных, так как клетки развивались более медленно и таким образом сохранили более общие наследственные позиции.

1.3. Эволюционные линии в происхождении вирусов

При обсуждении вопросов о происхождении вирусов важными представляются две проблемы:

- Проблема появления первоначальных вирусных предков и этапов формирования специфических групп вирусов.
- Проблема происхождения современных вирусов, которые возникли намного позже первых вирусных прародителей, и непрерывно возникают в настоящее время.

В контексте обсуждаемых в данном учебном пособии вопросов мы остановимся на первой проблеме.

Вероятно, вирусы существовали миллиарды лет назад. Однако до нашего времени не дошли никакие археологические окаменелости, содержащие вирусы. В связи с этим эволюционные процессы, происходящие в царстве *Vira*, изучаются на основе сравнительного анализа геномов вирусов, поражающих различных представителей живого, механизмов репликации вирусов и взаимоотношений с клеткой-хозяином.

Существует три первичные теории, объясняющие происхождение вирусов, которые не являются взаимоисключающими. По всей вероятности больше, чем один эволюционный процесс был вовлечен в происхождение различных групп вирусов (теория полифилетического происхождения вирусов).

1. Первая, наиболее интригующая теория с точки зрения биологической истории Земли, предполагает, что вирусы являются потомками древних, доклеточных форм жизни, перешедших к паразитическому способу существования. В современном понимании биологической эволюции эта теория более всего соответствует происхождению рибовирусов (РНК-содержащие вирусы, кроме ретровирусов).

2. Идея регрессивной эволюции вирусов (вирусы – потомки бактерий и других одноклеточных организмов). В настоящее время не поддерживается.

3. «Эндогенная теория» или теория «взбесившихся генов» (вирусы – дериваты клеточных генетических структур, ставших относительно автономными, но сохранивших зависимость от клеток) в настоящее время имеет множество подтверждений, т.к. объясняет происхождение целого ряда вирусов – ретровирусов и ряда ДНК-содержащих вирусов.

Происхождение РНК-содержащих вирусов. Теорией, что рибовирусы являются живыми реликтами мира РНК, часто необоснованно пренебрегают, основываясь на том, что вирусы не могут реплицироваться без клетки. Однако существует твердое убеждение,

что эта теория не должна игнорироваться для всех рибовирусов. Во-первых, в своей репликации рибовирусы не требуют стадии ДНК, что характерно для всех самокопирующихся объектов в предклеточном мире или мире РНК/белок. Репликация РНК осуществляется по механизму РНК-зависимого синтеза РНК, который отсутствует в ДНК-клетках. Во-вторых, компонентом каждого рибовирусного генома является RdRp – белок, функционально связанный с воспроизводством. В настоящее время отправной точкой в обсуждении вопросов происхождения рибовирусов является эволюционный анализ RdRp, который указывает на его единственное происхождение для всех рибовирусов. Вероятно, предок RdRp возник перед появлением эукариотических клеток, и этот предок был одним из первых ферментов, который появился в биологической истории. Анализ существующих RdRp разнообразных групп вирусов дал неожиданную филогенетическую информацию их взаимоотношений. Установлено, что три главных геномных класса рибовирусов – днРНК, (+)РНК и (-)РНК – представляют различные монофилетические группы. В пределах этих групп вирусы не всегда кластеризуются согласно хозяину, ткани или экологии. Например флавивирусы (вирусы гепатита С, японского энцефалита, Западного Нила), которые реплицируются в клетках млекопитающих, близко связаны с лютео-, поти- и тобамовирусами (ВТМ), которые поражают растения. Еще более поразительно, что филогенетический анализ последовательности RdRp показал родство вирусов прокариот (фаги Q β и MS2) и вирусов эукариот (вирус гепатита С, вирус желтой лихорадки). Все эти результаты еще раз свидетельствуют, что рибовирусы в своем происхождении имели общего предка, который возник в мире РНК/белок.

Происхождение ДНК-содержащих вирусов. ДНК-содержащие вирусы являются паразитами эукариот, архей и бактерий. Эти вирусы имеют геномы разного размера, могут иметь или не иметь оболочку, могут быть цитоплазматическими или ядерными, могут кодировать, или не кодировать полимеразы. Все это предполагает, что разные группы ДНК-содержащих вирусов имеют независимое происхождение. Представляется вероятным, что вирусы, использующие репликативный аппарат клетки-хозяина, например парвовирусы, и вирусы, кодирующие ДНК-зависимую ДНК-полимеразу (DdDp), например аденовирусы, имели различное происхождение. Установлено, что крупные ДНК-содержащие вирусы, кодирующие ДНК-полимеразу, представляют собой расходящуюся в эволюционном плане группу, что является результатом отсутствия общего предка. Эволюционный анализ последовательностей DdDp дал неожиданный результат. Оказалось, что вирусные ДНК-полимеразы являются столь же древними, что и их

клеточные гомологи. В связи с этим обсуждается вопрос об их вирусном или клеточном происхождении.

Происхождение ретровирусов. Ретровирусы – оболочечные РНК-содержащие вирусы, которые реплицируются с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). Ретровирусы включают как эндогенные (вертикально передающиеся), так и экзогенные (горизонтально передающиеся) агенты. Ретровирусы проявляют свойства клеточных мобильных генетических элементов – ретротранспозонов. Основное отличие заключается в наличии области, кодирующей белки оболочки. В настоящее время признано, что ретровирусы, ретротранспозоны, гепаднавирусы и каулимовирусы имеют общего предка.

Ретроидные агенты, кодирующие обратную транскриптазу, найдены у эукариот, в ряде случаев у эубактерий и не найдены у архей. Ретротранспозоны обнаружены в пределах геномов животных, растений, грибов и простейших. Из-за их изобилия и разнообразия репликативных стратегий полагается, что ретротранспозоны – самый старый класс ретроидных агентов. Ретроидные агенты, в том числе ретровирусы, несомненно, играли важную роль в развитии жизни. Вездесущность и очевидная древность обратной транскрипции позволяют предположить, что этот процесс был вовлечен в РНК-ДНК переход. Кроме этого, подавляющее присутствие ретротранспозонов и эндогенных ретровирусов в геномах большинства эукариот обеспечивает появление новых, экзогенных ретровирусных агентов (например, ВИЧ).

Таким образом, современные гипотезы больше не рассматривают вирусы как фрагменты генетических материалов клетки-хозяина, недавно покинувших их хозяев. Вирусы – равноправные древние игроки в развитии жизни, возможно предшествовавшие расхождению между тремя доменами жизни (бактериями, археями и эукариотами). Идея, в которой вирусы появились прежде универсальной протоклетки (LUCA), была недавно поддержана открытием структурных, и/или функциональных подобий между вирусами, инфицирующими различные клеточные уровни жизни. Обнаружены сходства между некоторыми вирусами архей (липотриксвирусами и рудивирусами) и некоторыми большими ДНК-содержащими вирусами эукариот (поксвирусами и хлореллавирусами), между аденовирусами (вирус эукариот) и бактериальными тективвирусами, между флавивирусами эукариот и бактериальными цистовирусами.

ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМОВ ВИРУСОВ

Геном – генетический состав клетки, вируса. На молекулярном уровне это индивидуальная нуклеиновая кислота (ДНК или РНК), которая является носителем, хранящем генетическую информацию.

2.1 Химическая природа нуклеиновых кислот вирусов

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

2.2 Отличия геномов вирусов от геномов организмов

Размеры. Если ориентировочно учесть, что геном эукариот имеет размер 4×10^9 п.н. и длину, достигающую 1,5-2 метра, а геном прокариот – 6×10^6 п.н., то размеры геномов вирусов значительно меньше. Так, размер генома крупных ДНК-содержащих вирусов составляет только $2-4 \times 10^5$ п.н. (200-450 т.п.н. у поксвирусов и вирусов герпеса), минимальные вирусы имеют геном длиной 1 мкм и состоящий из 1,2 т.п.н. Самый маленький геном среди вирусов, поражающих человека, имеет вирус гепатита В (3,2 т.п.н.).

Экономичность. Размеры геномов вирусов определяются емкостью капсида вириона. В связи с этим, вирусы очень экономно хранят генетическую информацию, что проявляется отсутствием многократно повторяющихся генов и, часто, наличием перекрывающихся ОРС.

Наличие двух типов геномов. Носителем генетической информации у вирусов может быть как ДНК, так и РНК.

Многообразие структурных форм и ДНК и РНК. Природа как бы испробовала на вирусах все возможные варианты структурной организации нуклеиновых кислот, которые представлены на рис.2.

Способ укладки. Способ укладки зависит от вида генома: (+)РНК может быть «голой»; (-)РНК, как правило, ассоциирована с белками нуклеокапсида и образует структуру под названием рибонуклеопротеид (РНП); ДНК вирусов ассоциирована с белками, подобными гистонам эукариот, и организована в виде типичных нуклеосом.

Разнообразие стратегий репликации, основанных на ДНК-зависимом синтезе ДНК, РНК-зависимом синтезе РНК и РНК-зависимом синтезе ДНК.



Рис.2. Схема, иллюстрирующая виды нуклеиновых кислот вирусов

2.3 Хранение генетической информации вирусов

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

Несмотря на микроскопические размеры, нуклеиновые кислоты вирусов несут информацию не только о капсидных белках, но и о ферментах, необходимых для синтеза ДНК, РНК и их модификации, для синтеза РНК транскриптов и их процессинга, для обеспечения синтеза белков и их посттрансляционной модификации и воздействия на биосинтетические процессы клетки-хозяина. Например, геном бактериофага Т4 кодирует несколько сотен белков, из них не менее 30-ти – ферменты.

Для сохранения генетической информации в окружающей среде и передачи ее новому поколению вирусы упаковывают геномные нуклеиновые кислоты в белковый капсид и часто в суперкапсид (липидсодержащая оболочка), формируя внеклеточную форму вируса – вирион. Как правило, вирионы, попадая в клетку, обеспечивают продуктивный инфекционный цикл, давая вирусное потомство. Однако целый ряд, так называемых интегративных вирусов, встраивают свой геном в хромосомы хозяина, в том числе клеток зародышевой линии, обеспечивая длительное сохранение генетической информации вируса в ряду поколений хозяина.

ГЛАВА 3. ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПРОЦЕССИНГ У ВИРУСОВ ЭУКАРИОТ

3.1 Краткая характеристика универсального жизненного цикла вирусов

Нигде в природе нет таких паразитарных отношений, которые происходят между вирусом и клеткой-хозяином. Вирусы используют клетку для воспроизводства, эксплуатируя клеточные машины для репликации и сборки вирусных компонентов и выпуска потомства вирионов. Независимо от того, имеют ли вирусы ДНК или РНК геном, вирусы эукариот имеют общий жизненный цикл, который начинается с взаимодействия со специфическим рецептором на поверхности клетки (рис.3). После адсорбции вириона на клеточной поверхности в процессе проникновения, геном вирусов подвергается раздеванию. Раздетый, или частично раздетый, геном обеспечивает внутриклеточную репродукцию вируса.

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



Рис. 3. Универсальная модель репликации вирусов эукариот

Вирусные частицы показаны голубым цветом. Вирусы проникают в клетку через взаимодействие со специфическими рецепторами и/или другими компонентами на мембране клетки. Взаимодействие с клеточным рецептором стимулирует проникновение через мембрану клетки и раздевание вирионов. Дезинтегрированные вирионы выпускают вирусный геном, после чего он становится доступным для транскрипции и трансляции. РНК-содержащие вирусы (за исключением ретровирусов) и поксвирусы реплицируются в цитоплазме. Транскрипция всех других вирусных ДНК происходит в ядре. Транскрипцию и репликацию генома вируса сопровождают эндоплазматические стадии трансляции мРНК и сборки вириона. Выход зрелых вирионов может включать мембранный лизис и смерть клетки хозяина.

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

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

Транскрипция – синтез мРНК. Осуществляется вирусными ДНК-зависимыми РНК-полимеразами в случае ДНК-геномов и РНК-зависимыми РНК-полимеразами в случае

РНК-геномов. Общие принципы транскрипции геномов вирусов сходны с таковыми для клеток про- и эукариот. Индивидуальные особенности проявляются на стадиях посттранскрипционного процессинга (созревания) мРНК и регуляции транскрипции.

Трансляция – синтез белка на матрице РНК. Вирусы не имеют своих белок-синтезирующих систем и используют трансляционный аппарат клетки-хозяина, подчиняясь ограничениям, накладываемым этим хозяином. Так, в клетках эукариот белоксинтезирующий аппарат не приспособлен для инициации трансляции на внутренних участках мРНК. В связи с этим вирусы вынуждены преодолевать ограничения, накладываемые клеткой-хозяином, что в разных вирусных системах решается по-разному. Рассмотрение всех этих вопросов составляет предмет нашего дальнейшего изложения.

3.2 Реализация генетической информации вирусов

При осуществлении жизненного цикла РНК-геномные и ДНК-геномные вирусы реализуют различные молекулярные механизмы и стратегии. В связи с этим особенности репликации этих геномов и их экспрессии будут рассмотрены отдельно.

3.2.1 Генетические стратегии РНК-геномных вирусов

3.2.1.1 Основные принципы и механизмы репликации РНК-геномов

Репликация генетической информации – единственная наиболее отличительная характеристика живых систем, и нигде в биосфере этот процесс не выполняется с большей экономией и очевидной простотой, как у РНК-содержащих вирусов. Чтобы осуществить экспрессию, репликацию и перенос генов, различные семейства РНК-содержащих вирусов развили разнообразные генетические стратегии и жизненные циклы, которые эксплуатируют биологию и биохимию их хозяев многими различными способами. РНК-содержащие вирусы – единственные известные создания природы, использующие РНК в качестве генетического материала. Эти вирусы копируют свои геномы с использованием одного из двух уникальных биохимических путей: или путем РНК-зависимого синтеза РНК (репликация РНК) или, как ретровирусы, РНК-зависимого синтеза ДНК (обратная транскрипция), который сопровождается репликацией ДНК и транскрипцией. Эти пути требуют работы ферментов, которые обычно отсутствуют в неинфицированных клетках-хозяевах. В связи с этим, данные ферменты должны быть генетически детерминированы вирусом и экспрессированы в течение инфекции. В некоторых семействах РНК-содержащих вирусов эти уникальные синтетические процессы необходимы на первых стадиях инфекционного цикла, что требует наличия упакованных

в вирион полимеразы и других ферментов, необходимых для осуществления следующего цикла инфекции.

Изменчивость РНК. Полимеразы, катализирующие репликацию РНК, и обратная транскриптаза имеют минимальные возможности для исправления ошибок синтеза. В результате, частота возникновения ошибок при синтезе РНК приблизительно в 10 тысяч раз выше, чем при репликации ДНК, и она зависит от числа нуклеотидов, составляющих вирусный геном. Это означает, что геном любой индивидуальной частицы РНК-содержащего вируса будет содержать одну или несколько мутаций, отличающих его от последовательности дикого типа данной вирусной разновидности. Этот простой факт имеет далеко идущие последствия для биологии и эволюции РНК-содержащих вирусов, потому что потомство РНК-вируса (природное или лабораторное) представляет собой не совокупность однородных двойников, а скорее молекулярный рой родственных нуклеотидных последовательностей, сгруппированных в месте синтеза последовательностей. Этот молекулярный рой или “квази-разновидность” обеспечивает источник фенотипических вариантов, которые могут быстро ответить на изменяющееся давление естественного отбора. Как следствие, РНК-содержащие вирусы могут эволюционировать в миллион раз быстрее чем, ДНК-организмы. В тоже время высокая изменчивость РНК не обеспечивает быструю эволюцию РНК-содержащих вирусов, так, как размеры генома вирусов налагают верхние пределы на высокую норму ошибок полимеразы. Комбинация уровня репликационных ошибок и размера генома определяют “порог ошибки”, выше которого вирус не может поддерживать целостность последовательности квази-разновидностей. В результате, немногие РНК вирусы имеют размер генома более 30 килобаз (kb), чаще всего он колеблется в пределах 5-15 kb. Принимая во внимание, что генетически разнообразное потомство может нести летальные мутации, что снижает потенциал для быстрого эволюционного ответа, РНК-геномы этого размера сбалансированы ниже их порогов ошибки.

Внутриклеточные места репликации РНК-геномов вирусов. Основная масса РНК-содержащих вирусов реплицируется в цитоплазме. Однако известен ряд исключений из этого правила. В дополнение к ретровирусам, которые синтезируют ДНК копии своих геномов и встраивают их в клеточные хромосомы, ортомиксо- и борнавирусы, чей геном представлен линейной

(-)РНК, и кольцевая РНК вируса гепатита дельта, подобная вириодам растений, также реплицируются в ядре. Каждый компартмент клетки имеет свои возможности и резервы,

определяемые доступностью клеточных компонентов и биохимических путей, которые могут быть использованы и скоординированы вирусами.

Уровни сегментации: гены, мРНК и белки. Разделение эукариотических клеток на ядерные и эндоплазматические компартменты глубоко влияет на биологию вирусов. Рибосомы эукариот требуют метилированной кэп-структуры на 5'-конце мРНК, которая играет критическую роль в передаче сигналов иницирования белкового синтеза. В результате, эукариоты подчиняются правилу - «одна мРНК - одна полипептидная цепь», и, за немногими исключениями, каждая мРНК функционирует как отдельная единица трансляции. РНК-зависимые РНК-полимеразы вирусов обладают ограниченной способностью к взаимодействию с внутренними иницирующими сайтами РНК-матриц, что создает проблему получения нескольких индивидуальных белков на основе единственного генома. В процессе эволюции различные семейства РНК-содержащих вирусов нашли три решения этой проблемы: фрагментация на уровне белков, образование субгеномных мРНК, сегментация генома. Например, РНК-вирусы семейств *Picornae*-, *Toga*-, *Flavi*- и *Retroviridae* для того, чтобы получить функциональные белковые продукты используют протеолитическое расщепление полипротеина-предшественника. Вирусы других семейств – *Corona*-, *Arteri*-, *Rhabdo*-, *Paramyxoviridae* – зависят от сложных механизмов транскрипции и чтобы произвести несколько различных моноцистронных мРНК с единственной РНК- матрицы вынуждены синтезировать субгеномные мРНК. Представители семейств *Reo*-, *Orthomyxo*-, *Bunya*-, *Arenaviridae* и др. решили проблему, фрагментируя геномы. При этом вирионы содержат многократные доли генома, каждый из которых часто представлен единственным геном. У вирусов растений такие доли РНК генома могут пакетироваться в отдельные вирионы (явление мультипартитности), требуя инфекции несколькими вирусными частицами для обеспечения инвазивной способности вируса, в то время, как сегменты генома вирусов животных обычно пакетированы совместно. Напротив, ДНК вирусы редко используют или сегментацию генома или синтез полипротеина. Это вероятно связано с относительной простотой синтеза моноцистронных мРНК, которая может быть транскрибирована с внутренних промоторов на двунитевой ДНК и подвергнута альтернативному сплайсингу, подобно ядерным транскриптам клетки.

Виды РНК-геномов вирусов. В отличие от геномов клеток, которые состоят только из днднк, вирусные РНК-геномы являются примерами структурного разнообразия. Различные семейства РНК-содержащих вирусов имеют геномы, представленные

двунитевой (дн) или одонитевой (он) РНК, которые в свою очередь могут быть линейной или кольцевой формы, могут быть единственной или состоять из многих долей (рис. 4).

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

остова. Одонитевые РНК могут иметь позитивную полярность – (+)РНК, негативную полярность – (-)РНК или могут быть представлены обоюдозначающей цепью - (+/-)РНК (амбисенс стратегия кодирования). В свою очередь, РНК позитивной полярности могут иметь разную структурную организацию. Являясь матричной РНК, могут иметь на 5'-конце кэп (7-метилгуанозин), а на 3'-конце – поли-А последовательность; могут не иметь кэпа или поли-А; могут иметь на 5'-конце геномный белок; могут иметь на 3'-конце тРНК-подобную или шпильковую структуру.

Каждая разновидность генома имеет свои стратегии репликации, экспрессии генов и упаковки в вирионы.

Одно- и двунитевые РНК-геномы вирусов. Хотя все РНК-геномы реплицируются обычным способом комплементарного спаривания нуклеотидных оснований матрицы и дочерней нити, различные семейства РНК-содержащих вирусов реализуют различные молекулярные стратегии репликативного цикла РНК и ее инкапсидации. Семейства онРНК-вирусов превосходят численностью семейства вирусов с днРНК геномом почти в 10 раз. Ввиду большей стабильности двунитевых нуклеиновых кислот, это различие требует объяснения. Кажутся вероятными две возможности, объясняющие относительный дефицит днРНК вирусов. Во-первых, днРНК-содержащие вирусы в начале инфекционного цикла должны, так или иначе, обойти подавление трансляции, которое следует из сосуществования эквимольярных количеств анти-смысловых нитей. Во-вторых, днРНК воспринимается клетками высших эукариот, как сигнал для индукции механизмов защиты, типа системы интерферона у позвоночных, которые направлены на подавление вирусной репликации. Эти же самые причины важны и для онРНК-содержащих вирусов. Чтобы ограничить накопление промежуточных репликативных форм, содержащих области днРНК, вирусы разработали стратегии, различающиеся у (+)РНК и (-)РНК. Все (+)РНК-содержащие вирусы синтезируют непропорционально низкие уровни негативных нитей – 1-5% от уровня положительной РНК и таким образом минимизируют потенциал для накопления днРНК. Наоборот, (-)РНК-вирусы нуждаются в существенных количествах (+)РНК нитей, чтобы использовать их в качестве матрицы для синтеза геномного потомства. Обычно (-)РНК-вирусы предотвращают отжиг (+) и (-) нитей, сохраняя геномную РНК в составе нуклеокапсида.


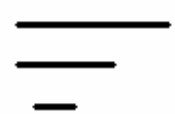

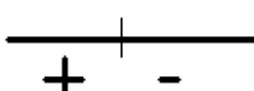
+ Cap _____ AAA	5'-Кэп, 3'-поли-А	Флавивирусы Коронавирусы
+ Cap _____ 	5'-Кэп, 3'-гРНК-подобная структура	ВТМ
+ VPg ○ _____ AAA	5'-терминальный белок	Калицивирусы Пикорнавирусы Потивирусы
+ Cap _____ AAA + Cap _____ AAA	диплоидный набор	Ретровирусы
- _____	он, линейная	Парамиксовирусы Рабдовирусы
- 	он, линейная, сегментированная	Ортомиксовирусы (8 сегментов)
- L M S (+-) 	он, кольцевая, сегментированная	Буньямвирусы Аренавирусы
= =	дн, линейная, сегментированная	Реовирусы (10-11 сегментов)
	обоюдозначащая (амбисенс-РНК)	S-сегмент аренавирусов Тосповирусы

Рис. 4. Виды РНК-геномов вирусов

(+)РНК и (-)РНК геномы. Различия между положительным и отрицательным РНК-геномами определяются полярностью нитей, инкапсидированных в вирионы. (+)РНК-геном в начале инфекции использует синтезированные на рибосомах

вирусоспецифические белки и клеточные РНК-связывающие белки. После того, как синтезированные вирусоспецифическая РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) и другие неструктурные белки покидают рибосомы, начинается репликация РНК. Затем вновь синтезированные структурные белки вириона и РНК ассемблируют с образованием вирусного потомства. В противовес этому, (-)РНК-геномы и их антигеномные комплементы остаются связанными с белками нуклеокапсида, как в пределах вирусных частиц, так и в течение всего цикла вирусной репликации. Эти фундаментальные адаптационные различия основаны на том, что геномы положительной полярности должны удовлетворять трансляционным критериям, которые диктуются клеткой-хозяином, в то время как негативные геномы и антигеномы должны удовлетворять только матричным требованиям вирусоспецифической RdRp, в связи с тем, что они копируются, но никогда не транслируются. Хотя до настоящего времени остается неясным, как полимераза может копировать покрытые белком РНК-матрицы. днРНК-геномы являются промежуточными между этими крайностями: родительские доли генома остаются изолированными в субвирусных частицах на протяжении всего инфекционного цикла. Однако следует учитывать, что положительные нити-предшественники днРНК потомства изначально не инкапсидированы. Вероятно, эти вариации отражают существенные различия в структурах вирусных комплексов RdRp-матрица и в молекулярных механизмах репликации положительных, отрицательных и днРНК-геномов.

Линейные и кольцевые РНК-геномы. Репликация РНК не только требует сохранения приемлемого уровня ошибок, как обсуждено ранее, но также должна избегать систематических делеций или вставок нуклеотидов. Особенно подвержены изменениям концевые последовательности геномов, дублирование которых представляет проблему. При репликации ДНК проблема терминации синтеза усилена тем, что ДНК-полимераза не может начать синтез дочерней нити *de novo*, для чего требуется наличие затравки. Это создает дополнительные сложности, связанные с копированием праймер-связывающей последовательности. Одним из нескольких известных, наиболее экономичных и широко распространенных в природе решений этой проблемы является устранение концов путем образования кольцевой ДНК, как в прокариотических геномах. В отличие от ДНК-полимераз, большинство РНК-полимераз не требует затравок, так что РНК-геномы менее восприимчивы к проблеме концов. Соответственно, большинство РНК-геномов вирусов – линейные молекулы. Ковалентно замкнутые кольцевые РНК найдены только у вируса гепатита дельта животных, среди вирионов и некоторых других субвирусных РНК-

патогенов, которые инфицируют растения. Однако концы линейных рибонуклеиновых кислот особенно чувствительны к деградации и их репликация особенно склонна к ошибкам. Следовательно, каждое семейство РНК-вирусов имеет особенности, разработанные для сохранения концов генома. Например, множество РНК-геномов положительной полярности несут 5'-кэп и 3'-поли-А трек, которые защищают от деградации концы последовательности эукариотических мРНК. Подобную роль, вероятно, выполняет геномный белок (Vpg), который ковалентно связан к 5'-концом РНК пикорнавирусов, а также устойчивые вторичные структуры РНК, найденные на 3'-конце РНК флавивирусов и в других геномах. 3'-концы многих рибонуклеиновых кислот вирусов растений формируют структуры типа «кленового листа», которые подобны клеточным тРНК. Кроме этого, в (+)РНК вирусов обнаружены модификации, которые могут служить для соединения ее концов. Эти модификации опосредуют взаимодействие 3'-конца с клеточными белками типа поли-А-связывающего белка и кэп-связывающего комплекса, что приводит к формированию нековалентно замкнутых функциональных комплексов, которые могут повторно промотировать трансляцию рибосомами и повторно реплицироваться RdRp's. В отличие от (+)РНК-геномов вирусов, негативные - и амбисенс РНК-геномы редко несут ковалентные концевые модификации. Эти рибонуклеиновые кислоты обычно обладают некоторой степенью комплементарности концевой последовательности, которая, как думают, стабилизирует вирусный нуклеокапсид и промотирует репликацию РНК, возможно, делая матрицу функционально кольцевой, как описано для рибонуклеиновых кислот положительной полярности. Концевая комплементарность последовательности также позволяет концам РНК выступать в роли теломеров и служить 5'-концевой матрицей для восстановления разрушенных 3'-концевых нуклеотидов. Другое решение проблемы концов имеется у некоторых (+/-)РНК-содержащих аренавирусов. Эти вирусы устойчивы к концевым изменениям и способны допустить существенный уровень вариабельности концевых последовательностей генома, располагая необходимыми внутренними cis-acting сигналами, далеко отстоящими от концов РНК. Ретровирусные геномы наоборот избыточны, и имеют прямые повторы между 12 и 235 нуклеотидами на каждом конце. Эти прямые повторы поддерживают и восстанавливают целостность концов РНК в течение обратной транскрипции и вирусной репликации.

Сегментированные и несегментированные РНК-геномы. Сегментация генома вирусов облегчает производство индивидуальных продуктов в эукариотических клетках. В тоже время это означает, что каждая доля генома для обеспечения экспрессии, репликации и

сборки вирионов должна содержать соответствующие регуляторные *cis-acting* сигналы. В некоторых семействах вирусов с сегментированным геномом (*Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*) эти сигналы включают консервативные для всех сегментов концевые последовательности, но у вирусов других семейств (бипартитные *Noda*- и *Tetraviridae*), существенных консервативных последовательностей у разных долей генома не выявлено. В этих случаях специфичность репликации РНК и сборки вирионов, возможно, определяется консервативностью вторичной или третичной структуры РНК. Однако механизмы, которые координируют репликацию и упаковку различных сегментов генома, остаются плохо понятыми для любого вируса эукариот.

Сегментация генома вируса оказывает существенное влияние на его биологию, потому что индивидуальные сегменты могут часто подвергаться реассортации в клетках, инфицированных двумя штаммами вируса, позволяя вирусам с сегментированным геномом делать существенные эволюционные прыжки посредством горизонтальной передачи генов. Этот механизм лежит в основе антигенных изменений (антигенный шифт), обеспечивающих возникновение новых пандемических штаммов вируса гриппа из семейства *Orthomyxoviridae*.

Cis-acting сигналы и специфичность репликации. Репликация и упаковка вирусных РНК являются удивительно специфичными процессами. Оба этих процесса безошибочно выбирают правильные вирусные молекулы из числа тысяч рибонуклеиновых кислот, содержащихся в клетке. Это в основном связано с присутствием *cis-acting* сигналов, которые селективно определяют репликацию вирусных РНК и сборку вирионов, но в большинстве РНК-геномов вируса эти сигналы до конца ясно не идентифицированы. Сигналы, которые были охарактеризованы, включают не линейные нуклеотидные последовательности, а вторичные структуры в виде петель, тРНК-подобных структур и псевдоузлов, которые создают специфические трехмерные молекулярные формы, способные взаимодействовать только с вирусными ферментами и структурными белками вируса. Однако понимание молекулярных основ специфичности репликации РНК и сборки вирионов ограничено недостатком знаний трехмерных структур вирусной РНК и ее действующих *cis-acting* сигналов.

Сателлитные РНК и дефектные РНК геномы. Иногда в инфицированных клетках обнаруживаются молекулы РНК, которые не являются ни независимо инфекционными, ни существенными для инвазионной способности вируса, но однако содержат действующие *cis-acting* сигналы, активирующие их собственную репликацию и/или упаковку в белки, кодируемые другим вирусом. Такие спутниковые (сателлитные) РНК, паразитирующие на

материнском вирусе, могут модулировать его репликацию и вирулентность. Среди РНК-содержащих вирусов животных основным примером вируса сателлита является вирус гепатита дельта, который упаковывает свой геном в белки, кодируемые вирусом гепатита В, и может существенно усиливать его патогенность. Паразитирование РНК-сателлита на ДНК-содержащем вирусном родителе необычно; как правило, спутниковые РНК копируются и инкапсидируются в белки РНК-содержащего вируса-родителя, с которым они имеют, по крайней мере, некоторую, гомологию последовательностей. В ряде случаев, сателлитные РНК кодируют собственные белки капсида, или белки, требуемые для репликации РНК (как в случае вируса гепатита дельта), но чаще они с точки зрения трансляции не активны. Сателлитные РНК чаще встречаются среди вирусов растений, чем среди вирусов животных, возможно, потому что трансмиссия животных вирусов между хозяевами происходит путями, которые не оптимальны для сателлитов.

В отличие от передачи вирусной инфекции между хозяевами, распространение инфекции в пределах одного организма животного обычно вовлекает последовательные эпизоды ограниченной вирусной репликации. Эти состояния формируют поколение и увеличивают число дефектных вирусных РНК, которые являются результатом, как простых делеций, так и более сложных перестроек генома, происходящих в процессе репликации РНК. Подобно сателлитным РНК, дефектные РНК паразитируют на материнском вирусе и мешают его репликации. Однако дефектные вирусы в своем выживании полностью зависят от материнского вируса. Большинство семейств рибовирусов животных с готовностью производят дефектные интерферирующие РНК в культуре клеток, но их влияние на развитие вирусной болезни до конца не изучено.

Структурные и неструктурные белки вирусов. По определению, вирусоспецифические структурные белки включены в вирусные частицы, а неструктурные белки найдены только в инфицированных клетках. Однако вирусы с негативным, амбиполярным и днРНК геномами включают в потомство вирионов RdRp и ассоциированные ферменты и поэтому кодируют преимущественно или исключительно структурные белки. В дополнение к полимеразе, кодируемые вирусом ферменты часто включают одну или несколько протеаз, РНК-хеликазу, гуанилил- и метилтрансферазы, поли-А-полимеразу, иногда нуклеазу, а в случае ретровирусов – ДНК-интегразу. В тоже время, для нескольких РНК-вирусов установлено участие в репликативном цикле ферментов клетки-хозяина.

Протеазы расщепляют продукт первичной трансляции, частью которого они являются, в высоко определенных последовательностях (сайтах). В некоторых клетках,

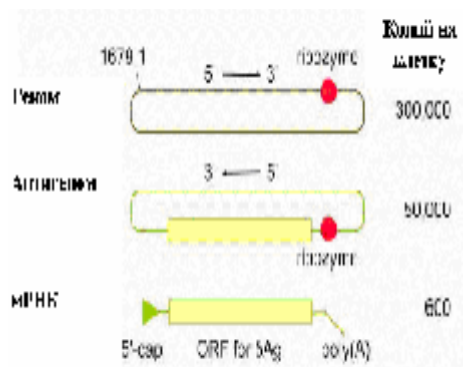
инфицированных пикорнавирусами, они также выборочно запрещают синтез белка клетки-хозяина путем протеолиза клеточного кэп-связывающего белка. Хеликазы необходимы большим РНК-содержащим вирусам для разрушения внутримолекулярного спаривания оснований в течение синтеза РНК, хотя некоторые RdRp способны расплетать дуплексы РНК без ее помощи. Гуанилил- и метилтрансферазы строят 5'-кэп на мРНК почти у всех РНК-вирусов эукариот, кроме пикорнавирусов, РНК которых не кэпирована, и ортомиксо- и буньявирусов, которые крадут кэп у клеточных мРНК посредством кэп-специфической эндонуклеазы. На 3'-конце мРНК большинства вирусов животных находится поли-А трек, а у РНК-вирусов растений, как правило, тРНК-подобная структура. Полиаденилирование обычно происходит в результате побочной реакции (пробуксовывания) вирусной RdRp, а не в результате работы поли-А-полимеразы, как у поксвирусов.

Белки клетки-хозяина. Существенную роль в репликации РНК-содержащих вирусов могут играть белки клетки-хозяина. Следует отметить, что в различных вирусных системах в этот процесс вовлечены различные клеточные белки. Самым ярким примером является РНК-репликаза бактериофагов Q β и MS2, у которых, в дополнение к единственному фагоспецифическому полипептиду для обеспечения полимеразной активности необходимо четыре клеточных субъединицы: рибосомальный белок S1 E.coli, два фактора элонгации трансляции и РНК-связывающий белок.

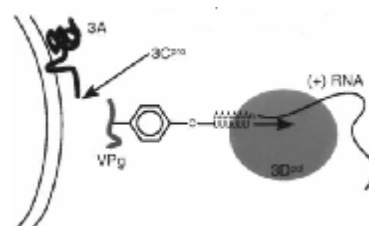
У некоторых вирусов эукариот в репликацию РНК также могут быть вовлечены факторы трансляции хозяина. Например, у бромовирусов (вирусы растений) субъединица иницирующего фактора eIF-3 связывается с RdRp и увеличивает ее активность. В инфицированных клетках несколько других белков хозяина взаимодействуют с концевыми нуклеотидными последовательностями вирусных РНК. Среди них – поли-А- и полипиримидин-связывающие белки, карлетикулин и белки Ro и L, взаимодействующие с малыми ядерными РНК. Хотя следует отметить, что отличить случайные взаимодействия от тех, которые играют функциональные роли, часто затруднительно.

Мембраны клетки-хозяина. В отличие от фаговых репликаз, RdRp вирусов эукариот неизменно связана с надмолекулярными структурами: мембранами клетки-хозяина у (+)РНК-вирусов, нуклеокапсидом у (-)РНК-вирусов и субвирусными частицами у днРНК-вирусов (рис. 5Б, В, Г). Внутриклеточные мембраны клеток, инфицированных вирусами с (+)РНК-геномом, подвергаются быстрому перераспределению, формируя места заякоривания вирусных репликативных комплексов. Когда эти комплексы отсоединяются от мембран, они теряют способность катализировать истинную репликацию РНК, хотя

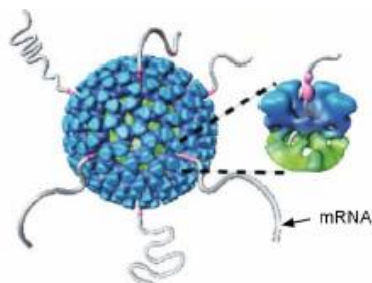
часто сохраняют ограниченную способность копировать РНК-матрицу. При изучении нодавиральной инфекции истинная РНК-репликационная активность частично очищенной RdRp была восстановлена путем добавления к бесклеточному экстракту глицеролфосфолипидов. Эти результаты подтвердили идею, что мембранная организация играет центральную роль в репликации (+)РНК. То же самое заключение получено при ингибировании репликации РНК полиовируса брефелдином А, который блокирует внутриклеточные мембранные взаимодействия. Хотя определенная роль мембран неясна, вероятно, они могут ускорять сборку репликативных комплексов, сокращая время процесса и отделяя дочерние молекулы от матриц.



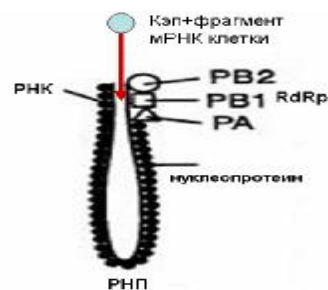
А.



Б.



В.



Г.

Рис. 5. Стратегии репликации РНК-геномов вирусов

А – репликация по механизму катящегося кольца РНК вируса гепатита D.

Б – репликация (+)РНК пикорнавирусов на мембране ЭПР.

В – репликация днРНК реовирусов в составе субвирусной частицы.

Г – репликация (-)РНК вируса гриппа в составе РНП.

Механизмы репликации РНК-геномов. Как уже отмечалось, репликация РНК-геномов осуществляется вирусоспецифической RdRp, которая может входить в состав вириона или детерминироваться геномом. Интересно, что у тогавирусов (вирус Синдбис), репликация (+)РНК на стадии синтеза минус-нити (образование РФ) осуществляется только переходной версией RdRp, которая впоследствии протеолитически процессируется, что переключает матричную специфику RdRp на синтез положительных нитей.

Самый простой механизм репликации РНК реализует вирус гепатита дельта, в котором клеточная РНК-полимераза II с использованием механизма катящегося кольца синтезирует мультимерные РНК положительной и отрицательной полярности. После этого рибозим расщепляет линейные мономеры РНК на конкатамеры и ковалентно соединяет их в кольца, производя, таким образом, зрелые антигеномы и геномы, соответственно (рис.5А). Этот простой механизм установлен только для вирионов и ряда других субвирусных патогенов растений. Вирус гепатита дельта - единственный РНК-содержащий вирус животных, который использует для репликации РНК механизм катящегося кольца. Гораздо более обычно, онРНК-геномы реплицируются в процессе непрерывного копирования линейных матриц, сопровождающегося последовательными актами вытеснения дочерних цепей. Однако для матричного синтеза требуются оба конца РНК. Это предполагает, что даже линейные РНК могут функционировать, как кольцевые, возможно облегчая повторяющуюся репликацию и препятствуя концевой терминации синтеза.

В отличие от ферментов, которые копируют ДНК с использованием затравки, большинство RdRp могут начать синтез РНК *de novo*. Исключением является RdRp пикорнавирусов, которая для инициирования синтеза использует маленький вирусный белок (VPg), ковалентно связанный с урацилом. VPg удаляется при трансляции генома, но сохраняется при его инкапсидации (рис.5Б).

В другом механизме праймирования, ферменты, кодируемые ортомиксо- и буньявирусами, отщепляют от клеточных мРНК короткие экпированные олигонуклеотиды и используют их для транскрипции, хотя репликацию РНК RdRp, ассоциированная с нуклеокапсидом, начинает *de novo*. RdRp аренавирусов также начинает репликацию (-)РНК *de novo*, для чего использует предпоследний нуклеотид матрицы, а затем перестраивает вновь синтезированный участок и использует его для репликации полного генома.

Уникальный механизм репликации генома осуществляют двукапсидные вирусы с сегментированным днРНК-геномом – реовирусы и бирнавирусы. У них первая стадия

репликации (она же и транскрипция) происходит в составе однокапсидной субвирусной частицы. Ассоциированная с коровой оболочкой RdRp синтезирует нити (+)РНК внутри субвирусной частицы, которые выходят в цитоплазму через поры (рис. 5В). Вновь синтезированные (+)РНК служат в качестве мРНК и как матрица для синтеза минус нити при сборке вириона.

В контексте данного изложения нельзя не отметить еще один механизм репликации, который осуществляют (+)РНК-содержащие ретровирусы. Это репликация через интеграцию с хромосомой клетки-хозяина. Сохраняя генетическую информацию в составе эндогенного провируса, ретровирусы реплицируют ее вместе с геномом клетки, подчиняясь его механизмам.

3.2.1.2 Особенности транскрипции РНК-геномов вирусов

Независимо от структуры и стратегии репликации геномов, все вирусы должны экспрессировать гены на ранних этапах инфекции в виде функциональных мРНК, чтобы использовать трансляционный аппарат клетки для синтеза вирусных белков. Исходя из этого различные генетические стратегии, используемые РНК-вирусами, сосредоточены вокруг вирусных мРНК, которые определены, как ключевая структура в этих процессах. Транскрипция РНК-геномов вирусов осуществляется тем же ферментом, что и репликация – вирусоспецифической RdRp, которая также является транскриптазой. У РНК-содержащих вирусов репликация и транскрипция процессы взаимосвязанные и часто их трудно разделить.

Так у (+)РНК-вирусов геном является мРНК. В связи с этим транскрипция является вторым этапом репликации и осуществляется на матрице промежуточной минус-нити. У (-)РНК-вирусов и днРНК-вирусов транскрипция является первым этапом репликации, где полноразмерный (+)-антигеном служит матрицей для синтеза минус-нитей. У ретровирусов транскрипция является также и репликацией, т.к. полноразмерная (+)РНК является геномом экзогенного вируса. Переключение транскрипции на репликацию часто определяется пулом вновь синтезированных вирусных белков, когда их избыток начинает тормозить трансляцию и возникает необходимость для инкапсидации геномных последовательностей. В некоторых вирусных системах, возможно, за выполнение матричных свойств вновь синтезированных нитей в значительной степени могут быть ответственны *cis-acting* сигналы РНК и различные факторы хозяина.

Транскрипция РНК-геномов вирусов может протекать двумя путями: а) с образованием субгеномных мРНК (необходимы для синтеза ранних белков); б) без образования субгеномных мРНК.

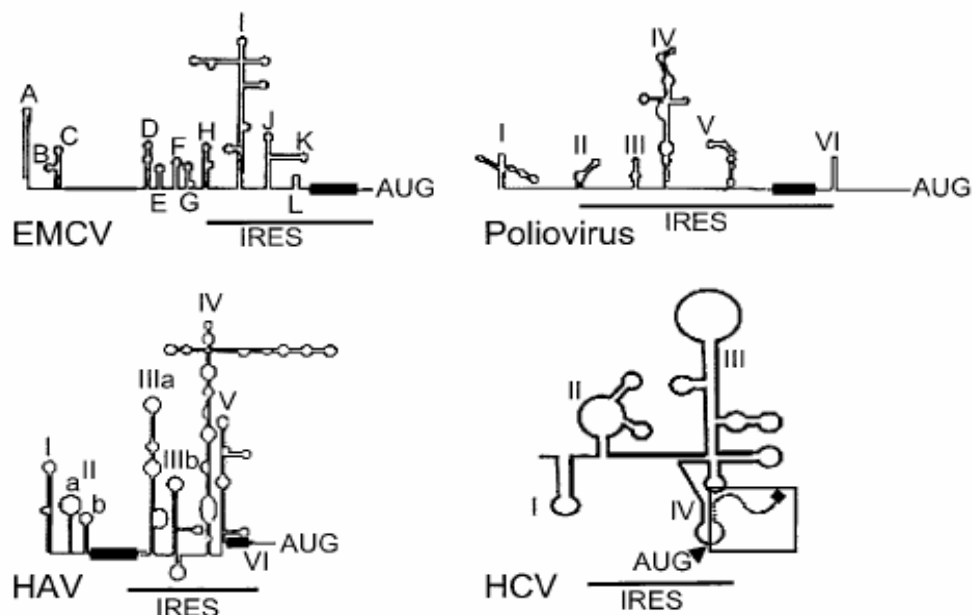


Рис. 6. Структура IRES, расположенного на 5'-НТП генома вируса энцефаломиокардита (EMCV), полиовируса, вируса гепатита А (HAV) и вируса гепатита С (HCV)

Синтезирующиеся мРНК подвергаются постранипционным модификациям – кэпированию 5'-конца, полиаденилированию 3'-конца и сплайсингу. Однако не все РНК-вирусы осуществляют все три процесса созревания мРНК.

Уникальной является структура 5'-конца мРНК ряда (+)РНК-содержащих вирусов (пикорнавирусов: энтеровирусов, риновирусов, кардиовирусов, гепавирусов, афтовирусов; гепацивирусов: вируса гепатита С и др.). Матричная РНК этих вирусов (она же является геномной РНК) не имеет кэп-структуры, 5'-конец РНК представляет собой сложную вторичную структуру, состоящую из множества петель. Следует отметить, что у разных вирусов, структура этой области РНК различна (рис. 6). Сложная система петель, расположенная перед AUG кодоном, формирует участок последовательности, способный связываться с рибосомами. Этот участок РНК получил название IRES – внутренний сайт связывания рибосомы. Наличие IRES обеспечивает вирусам кэп-независимую трансляцию.

Вирусные мРНК, имеющие на 5'-конце кэп, приобретают его по-разному. Например, реовирусы имеют в составе вириона 7-метилгуанидилтрансферазу и кэпируют свои мРНК в составе субвирусной частицы. Уникальный механизм кэпирования используют ортомиксовирусы (вирусы гриппа), у которых транскрипция протекает в ядре в составе РНП. В качестве затравки для РНК-полимеразы используются фрагменты транскриптов клеточных мРНК. Вирус-специфический белок (Р-белок) узнает кэпированные 5'-концы этих транскриптов и фиксирует их на 3'-конце геномных РНК. Затем этот же или другой белок вносит одноцепочечный разрыв на расстоянии 10-13 нуклеотидов от его 5'-конца. Возникающий короткий кэпированный клеточный олигонуклеотид является затравкой для синтеза вирус-специфических мРНК и входит в их состав.

Механизмы полиаденилирования 3'-концов мРНК РНК-содержащих вирусов могут отличаться от синтеза, опосредованного поли-А-полимеразой. Так, у вируса гриппа и вируса везикулярного стоматита поли-А последовательность на 3'-конце мРНК образуется за счет пробуксовывания RdRp в специфических, богатых уридином, участках последовательности матрицы. В то же время процессинг мРНК ретровирусов происходит при участии клеточного транскрипционного аппарата.

3.2.1.3 Разнообразие жизненных циклов РНК-геномных вирусов

Тип РНК генома вируса в значительной степени определяет, является ли первым шагом макромолекулярного синтеза трансляция, транскрипция или репликация РНК.

Вирусы с (+)РНК-геномом (кроме ретровирусов) поставляют геномные последовательности непосредственно клеточным рибосомам и начинают инфекционный цикл с процесса трансляции (рис.7 и 8). Соответственно, эти геномные РНК инфекционны, даже когда полностью депротеинизированы, как изначально показано в классической работе для РНК вируса табачной мозаики (Fraenkel-Conrat H. et al., 1957). Вирусы с (+)РНК геномом разделяют на две группы: вирусы, которые синтезируют субгеномные мРНК и вирусы, которые этого не делают. Для вирусов последней группы (пикорна- и флавивирусы), геномная РНК направляет синтез единственного полипротеина предшественника и структурных и неструктурных вирусных белков, которые поэтому синтезируются в эквимольных количествах. После протеолитического расщепления протеазами, содержащимися в пределах полипротеина, неструктурные белки катализируют репликацию РНК, производя потомство генома, которое объединяется с

синтезированными структурными белками и формирует потомство вирусных частиц (рис.7).

Для (+)РНК-содержащих вирусов, входящих в другую группу (астро-, калици-, тога-, корона- и артеривирусы), геномная РНК направляет синтез предшественника только неструктурных белков, в том числе вирусной RdRp. Этот фермент затем транскрибирует одну или несколько субгеномных мРНК, кодирующих структурные белки. В результате сложности транскрипции субгеномных РНК структурные и неструктурные белки синтезируются в неэквивалентных количествах (рис.8).

Вирусные геномы, которые состоят из (-)РНК, (+/-)РНК или из днРНК – не инфекционны, потому что они начинают жизненный цикл с транскрипции вирусных мРНК, а неинфицированные клетки не содержат соответствующей RdRp. Кроме, как у вируса гепатита дельта, эта реакция катализируется ферментами, которые попадают в клетки с вирионами инфицирования. РНК-полимераза транскрибирует индивидуальные мРНК для вирусных белков (рис. 9-11).

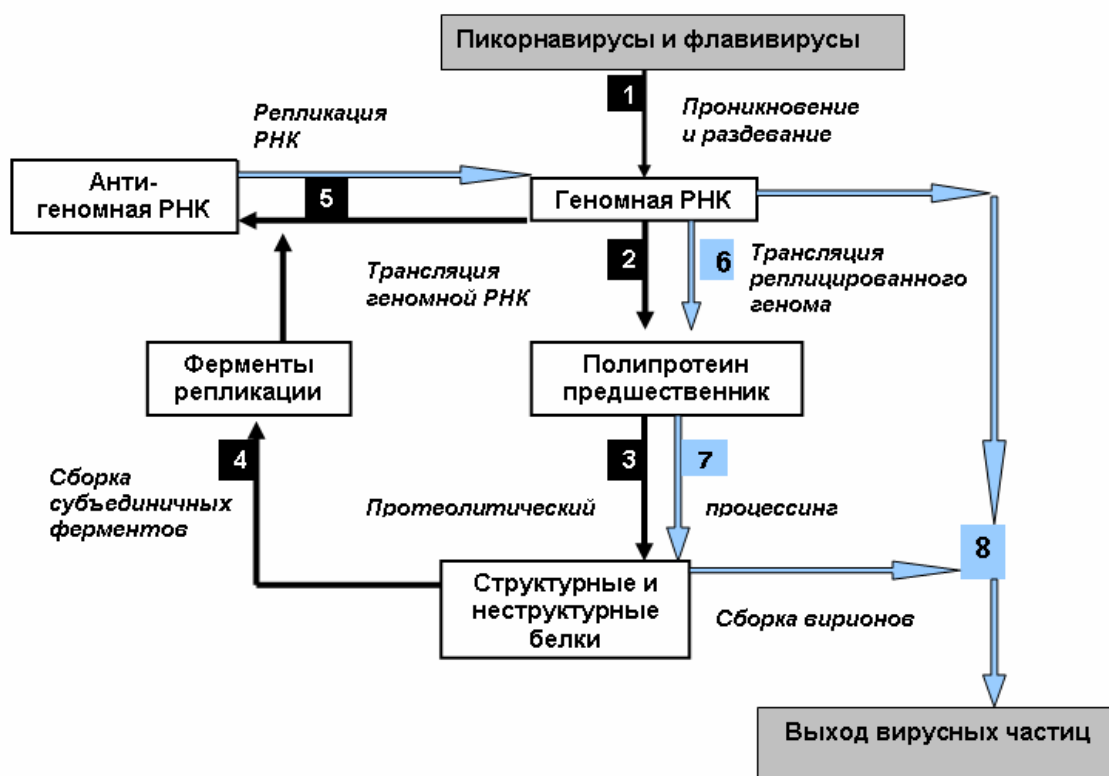


Рис. 7. Схема репликации (+)РНК вирусов, протекающей без образования субгеномных мРНК

После проникновения и раздевания (шаг 1), геномная РНК выступает как мРНК для неструктурных и структурных белков (шаги 2 и 3). Неструктурные белки катализируют репликацию РНК через синтез антигеномной РНК (шаги 4 и 5). Репликация продуцирует множество геномных (+)РНК нитей для последующей трансляции вирусных белков (шаги 6 и 7) и их объединения со структурными белками с образованием вирусных частиц (шаг 8).

Здесь и далее синими стрелками обозначены наиболее активно протекающие процессы.

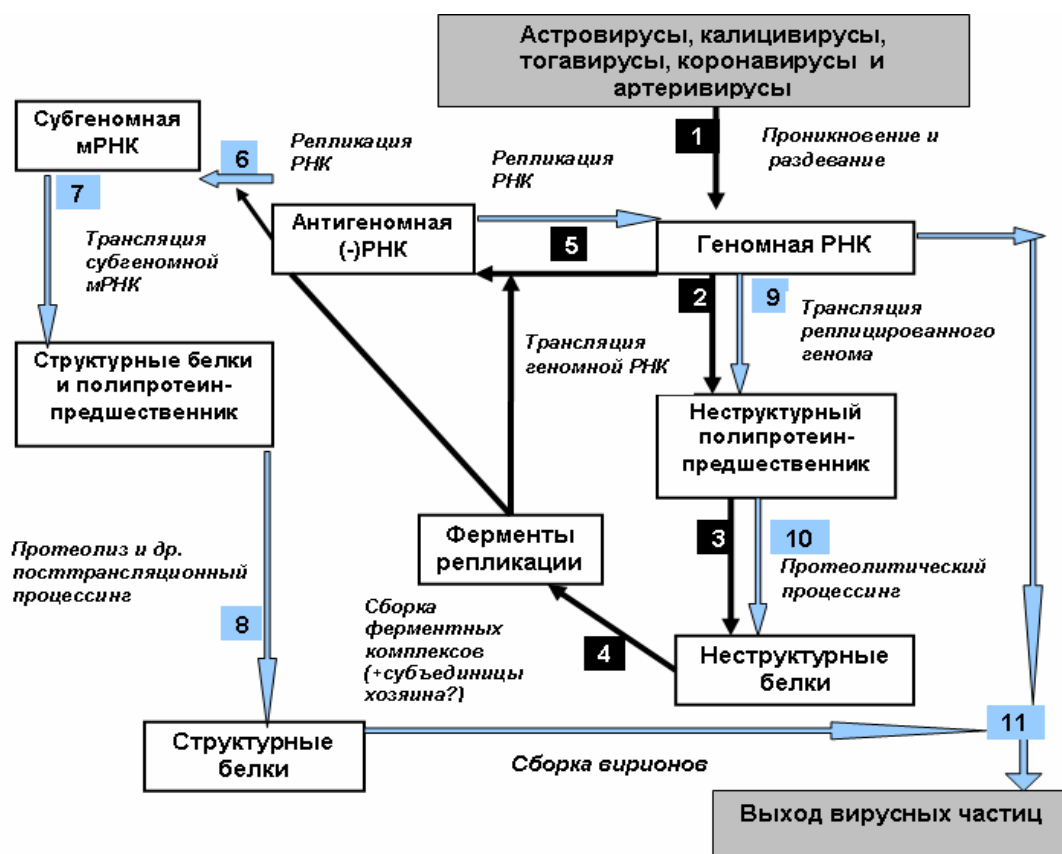


Рис. 8. Схема репликации (+)РНК вирусов, производящих одну или несколько субгеномных мРНК

После проникновения и частичного раздевания (шаг 1), геномная РНК прямым образом служит мРНК для неструктурных белков, включая вирусную RdRp (шаги 2 и 3), которая катализирует репликацию РНК через синтез полноразмерной антигеномной РНК (шаги 4 и 5). Также транскрибируются одна или несколько субгеномных мРНК (шаг 6) для прямого синтеза вирусных структурных белков (шаги 7 и 8). Реплицированный геном также транслирует в качестве продукта несколько неструктурных белков (шаги 9 и 10) и ассемблирует со структурными

белками с образованием вирусных частиц (шаг 11). Корона- и артеривирусы синтезируют свои субгеномные мРНК посредством механизма, отличающегося от тога-, астро-, и калицивирусов.



Рис. 9. Схема репликации (-)РНК-геномных вирусов

После проникновения и частичного разделения (шаг 1), вирусные РНК в составе РНП транскрибируются связанной нуклеокапсидом RdRp с получением мРНК (шаг 2) для вирусных белков (шаг 3). Неструктурные белки катализируют репликацию РНК через синтез антигеномных нуклеокапсидов (шаги 4 и 5). Репликация производит геномные нуклеокапсиды для дальнейшей транскрипции (шаг 6) и трансляции (шаг 7) вирусных генов, и для сборки со структурными белками с образованием вирусных частиц (шаг 8). Ортомиксовирусы и борнавирусы транскрибируют и реплицируют геном в ядре, некоторые из мРНК сплайсируются. Вирусы других семейств данного списка реплицируются в цитоплазме и избегают сплайсинга. Геномы некоторых буньявирусов имеют отрицательную полярность, другие – амбисенс полярность.

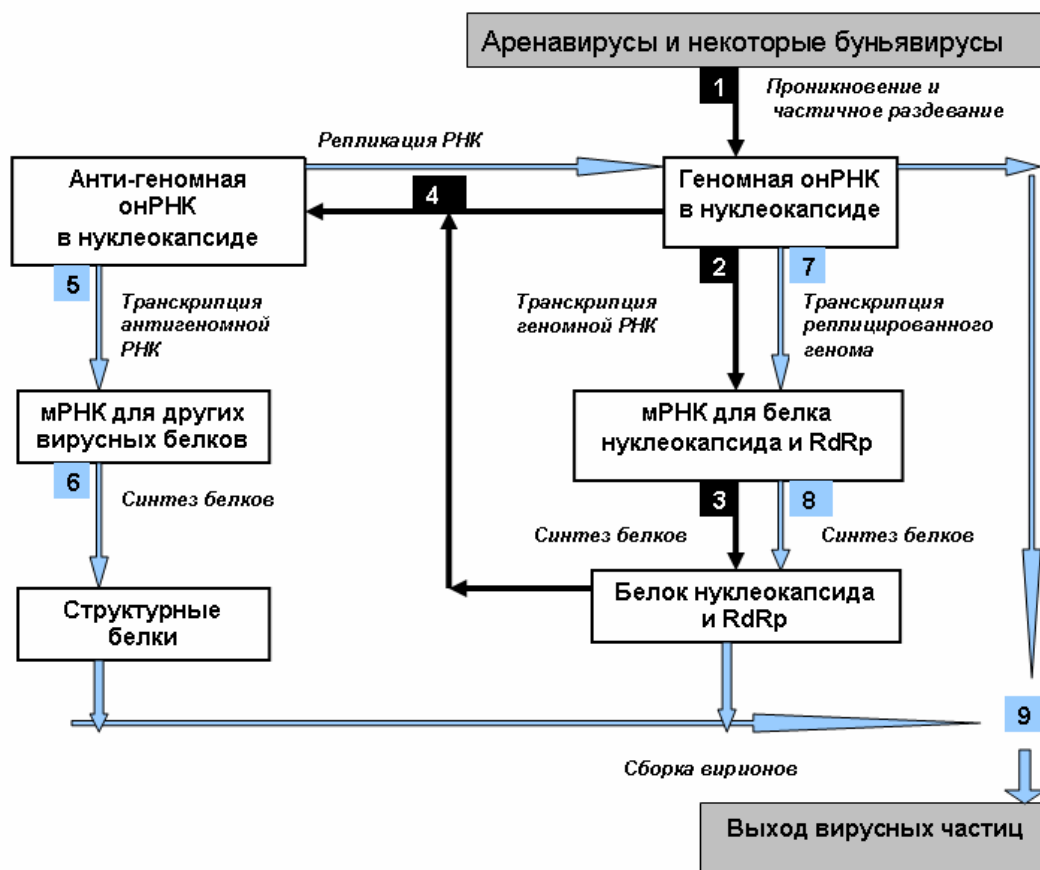


Рис. 10. Схема репликации амбисенс РНК-геномных вирусов

После проникновения и частичного раздевания (шаг 1), вирусная РНК в составе РНП частично транскрибируется нуклеокапсид-ассоциированной RdRp с образованием мРНК (шаг 2) для белка нуклеокапсиды и RdRp (шаг 3). Полимераза катализируют репликацию РНК через синтез антигеномных нуклеокапсидов (шаг 4), которые служат матрицей для транскрипции мРНК (шаг 5) других вирусных белков (шаг 6) и для производства геномных нуклеокапсидов. Реплицированные геномные нуклеокапсиды служат в качестве матрицы для транскрипции (шаг 7) и трансляции (шаг 8) вирусных генов и для сборки вирусных частиц (шаг 9). Некоторые буньявирусы имеют амбисенс-геномы, некоторые – (-)РНК геномы.

Для (-)РНК и (+/-)РНК-содержащих вирусов RdRp и вновь синтезированный белок нуклеокапсиды обеспечивают репликацию РНК и производят антигеномные нуклеокапсиды. Антигеномы не направляют белковый синтез, а используются исключительно как матрицы для синтеза РНК.

Геном вируса гепатита дельта, который является кольцевой молекулой (-)РНК, транскрибируется и реплицируется с помощью клеточной ДНК-зависимой РНК

полимеразы с использованием нетипичного для РНК механизма катящегося кольца, что уникально для РНК-вирусов животных.

Для днРНК-вирусов, индивидуальные мРНК транскрибируются с сегментов генома, которые остаются внутри субвирусных частиц (рис.11).

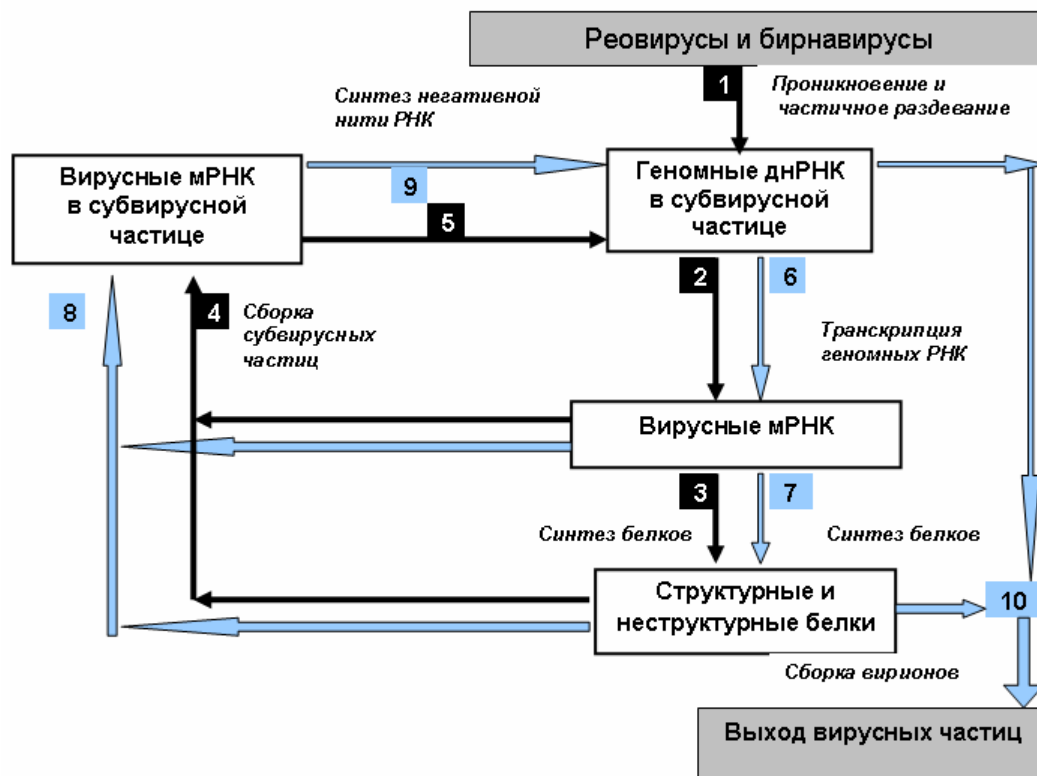


Рис. 11. Схема репликации вирусов с днРНК-геномом

После проникновения и частичного раздевания (потеря внешнего капсида) (шаг 1), сегменты днРНК в пределах субвирусных частиц транскрибируются связанными RdRp's, чтобы произвести мРНК (шаг 2) для вирусных белков (шаг 3). Далее в цитоплазме вокруг мРНК формируются субвирусные частицы (шаг 4), в которых РНК копируется с образованием геномной днРНК (шаг 5). Потомки субвирусных частиц вносят вклад в выражение вирусных генов (шаг 7) и репликацию (шаги 8 и 9) и собираются со структурными белками наружного капсида с образованием вирусных частиц в каналах ЭПР.

Синтезированные (+)РНК и продукты их трансляции собираются в субвирусные частицы, где синтез (-)РНК на (+)РНК матрице дает двунитевые доли генома.

Ретровирусы начинают инфекционные циклы, копируя свои онРНК геномы в днДНК-провирусы с использованием обратной транскриптазы (РНК/ДНК-зависимой ДНК-

полимеразы, которую несет вирион инфицирования). После интеграции в хромосому хозяина провирусная ДНК транскрибируется клеточной РНК-полимеразой II с образованием несплайсируемых и сплайсируемых мРНК для направленного вирусного белкового синтеза (рис.12).

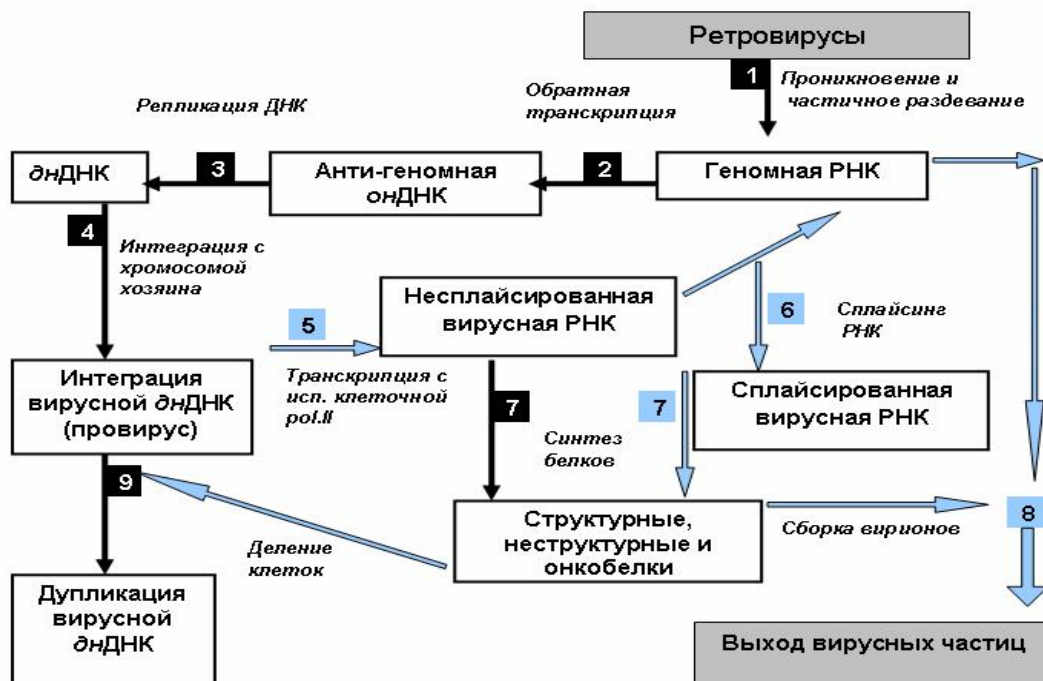


Рис.12. Схема репликации ретровирусов

После проникновения и частичного разделения (шаг 1), геномная РНК копируется в днднк обратной транскриптазой (шаги 2 и 3) и ковалентно интегрирует с клеточной ДНК в ядре с помощью ДНК-интегразы (шаг 4). Оба фермента присутствуют в вирусном коре. Интегрированный вирусный геном (или провирус) транскрибируется клеточной РНК-полимеразой II (шаг 5) с продукцией вирусных РНК транскриптов, которые функционируют как предшественники мРНК для вирусных белков (шаги 6 и 7). Полноразмерный транскрипт асSEMBЛИрует в созревающие вирусные частицы (шаг 8).

3.2.2 Генетические стратегии ДНК-геномных вирусов

В процессе репликации ДНК-содержащие вирусы осуществляют некоторые шаги, которые отсутствуют у РНК-геномных вирусов. Для большинства ДНК-содержащих вирусов генетические стратегии включают: транспорт ДНК вириона в ядро клетки, иницирование транскрипции с этой ДНК, индукцию транскрипции дополнительных вирусных генов, подготовку клетки для репликации ДНК вируса, дублирование ДНК-

генома, упаковку ДНК в вирионы и выход вирусных частиц из ядра. Кроме этого, многие ДНК-вирусы развили уникальные механизмы уклонения от иммунной защиты организма и способность вызывать опухоли у животных. В процессе близких отношений со своими хозяевами, вирусы эксплуатируют ключевые клеточные регуляторные системы и узурпируют важные клеточные процессы. В связи с этим, изучение различных аспектов репликации ДНК-вирусов обеспечивает новые фундаментальные знания о молекулярных процессах, происходящих в клетке, включая выражение генов, репликацию ДНК и контроль за циклом клеточного деления.

3.2.2.1 Основные принципы и механизмы репликации ДНК-геномов вирусов

Подготовка клеток для репликации вирусной ДНК. В ходе продуктивной вирусной инфекции многие ДНК-вирусы из единственной молекулы генома могут получить 100 000 или больше копий генома в течение нескольких дней. Для этого требуется работа множества белков, включая ДНК-связывающие белки и полимеразы, а также обильная поставка нуклеотидов. Репликация некоторых ДНК-вирусов происходит только в клетках, которые естественно реплицируют свою собственную ДНК, обеспечивая тем самым необходимую клеточную среду для репликации вирусной ДНК. Другие ДНК-вирусы также в значительной степени полагаются на клеточные системы репликации ДНК, но эти вирусы кодируют белки, стимулирующие клеточный цикл деления. Наконец, некоторые из самых больших ДНК-содержащих вирусов ограничено используют клеточный репликативный аппарат, т.к. сами кодируют вирусные версии многих из необходимых белков.

К первой группе вирусов относятся самые простые ДНК-содержащие вирусы семейства *Parvoviridae*, которые имеют линейный однонитевой геном. Парвовирусы могут реплицировать свою ДНК и осуществлять полный инфекционный цикл только в клетках, находящихся в стадии репликации ДНК — то есть в S-фазе клеточного цикла. Фактически, экспрессия вирусных генов не активизируется до тех пор, пока клетка не войдет в S-фазу и ДНК-геном вируса не будет преобразован в двунитевую РФ, которая является матрицей для транскрипции. Однако, в отличие от других вирусов, которые требуют, чтобы клетки активно копировали свою ДНК, парвовирусы неспособны стимулировать переход клетки в S-фазу. В связи с этим, они могут выполнять успешную репродукцию только в том случае, если попадают в клетку, уже осуществляющую синтез ДНК. Некоторые парвовирусы, особенно аденассоциированный вирус (AAV), имеют даже более строгие требования и могут копироваться только в присутствии помощника -

аденовируса или вируса герпеса, генные продукты которых активируют экспрессию генов парвовируса и репликацию его ДНК.

Другие ДНК-вирусы для того, чтобы создать условия для репликации своей ДНК, стимулируют клетки к делению. Для этих вирусов репликация вирусной ДНК является результатом взаимодействия между клеточными репликативными белками и вирусными белками, которые прямым образом участвуют в репликации, а также белками-инициаторами, которые локализуются в точке начала репликации вирусного репликативного аппарата. Эти ДНК-вирусы перестраивают репликативный аппарат клетки на вирусную репликацию, участвуя в белок-белковых взаимодействиях с ключевыми клеточными регуляторными молекулами, некоторые из которых выполняют роль шаперонов, что позволяет им стабилизировать белковые комплексы. Часто, эти взаимодействия приводят к нейтрализации клеточных белков-репрессоров опухоли типа транскрипционного фактора p53 и членов семейства ретинобластомных белков (Rb) и, как следствие, к активации клеточного роста.

Вирусные белки, которые стимулируют репликативное состояние клетки, обычно инактивируют членов семейства Rb – P105Rb, p107, и p130. Инактивация Rb предотвращает репрессию клеточного деления и разрешает E2F-опосредованную транскрипцию, что стимулирует выражение многочисленных клеточных белков, требуемых для S-фазы, включая ДНК-полимеразу α , тимидинкиназу, рибонуклеотидредуктазу и тимидилатсинтазу. Некоторые вирусные белки, например E1A аденовирусов и E7 папилломавирусов человека, непосредственно связывают Rb белки и ингибируют их функцию, и таким образом активируют E2F. Другие вирусные белки регулируют активность циклин-зависимых киназ (Cdks), которые катализируют фосфорилирование Rb, приводя к активации E2F и транскрипции E2F-регулируемых генов. Ряд вирусных белков могут косвенно влиять на регуляцию клеточного цикла деления. Например, E1B-55KB и E4orf6 белки аденовирусов и E6 папилломавирусов запрещают действие транскрипционного фактора p53 через взаимодействие с СВР/p300, который является коактиватором гена p53. Отмена функции p53 приводит к уменьшенной экспрессии ингибитора клеточного деления p21 (репрессор комплекса Cdk–циклин), таким образом активируя Cdk и соответственно переход клеток в S–фазу. Точно так же, аденовирусный E1A связывает p27, который является ингибитором Cdk, нейтрализуя его эффекты. Большой Т антиген обезьяньего вируса SV40 не только связывает и инактивирует Rb и p53, но и выполняет несколько функций, непосредственно требуемых для репликации ДНК вируса. Другой механизм используют средний Т-антиген

полиомавирусов и белок E5 папиломавирусов быка. Эти белки активируют сигнальный каскад, опосредованный рецептором фактора роста, и возможно стимулируют экспрессию регуляторной субъединицы Cdk – циклина D, таким образом стимулируя активность Cdk и фосфорилирование белков семейства Rb. Некоторые белки вирусов герпеса и гепаднавирусов по всей вероятности также стимулируют каскады сигнальных путей, активизируя внутриклеточные белки передачи сигнала NF κ B, P21ras и pp60c-src.

Индукция набора клеточных репликативных белков имеет глубокие последствия на клетку-хозяина, которая насильно побуждается к репликации ДНК. Когда пролиферативный сигнал устойчиво поддерживается, например в непермиссивных клетках, которые не способны поддерживать репликацию вирусной ДНК, клетки могут подвергнуться устойчивой трансформации. Таким образом, мало того, что многие ДНК-вирусы стимулируют статические клетки к повторным циклам деления, они также трансформируют клетки в культуре и вызывают опухоли у животных. Рассмотренная способность многих опухолеродных ДНК-вирусов стимулировать неограниченный рост клеток не является особенностью нормальной репликации вирусов, а скорее представляет собой aberrантный ответ клеток на вирусную инфекцию. В соответствии с этим, парвовирусы, неспособные стимулировать репликацию клеточной ДНК, являются одними из немногих ДНК-содержащих вирусов, которые не трансформируют клетки. Однако способность вирусов стимулировать синтез клеточной ДНК не всегда коррелирует с их способностью трансформировать клетки. Например, одни вирусы герпеса стимулируют синтез ДНК, другие нет, и, тем не менее, они фактически запрещают быстрое клеточное деление. Такие большие вирусы с их большой кодирующей емкостью способны создать надлежащую среду для репликации вирусной ДНК без активации клеточного репликативного аппарата.

Необходимость нуклеотидов для репликации ДНК. Как описано выше, для репликации парвовирусов необходимо, чтобы клетки находились в S-фазе, а папиломавирусы, полиомавирусы и аденовирусы стимулируют клетки, чтобы ввести S-фазу, требующую для синтеза ДНК большой концентрации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ). Через воздействие на членов белковых семейств Rb и E2F, папиломавирусы и аденовирусы стимулируют синтез фермента рибонуклеотидредуктазы, который требуется для поддержания достаточного для вирусной репликации уровня дНТФ. Напротив, вирусы герпеса и поксвирусы способны реплицироваться в покоящихся клетках. Одной из причин того, что эти вирусы могут обходить требование к S-фазе является их способность кодировать ферменты для синтеза

дНТФ – рибонуклеотидредуктазу и тимидинкиназу. В случаях вируса герпеса и вируса опоясывающего лишая/ветряной оспы вирусная тимидинкиназа является ключевой точкой для противовирусной химиотерапии, потому что этот вирусный фермент фосфорилирует аналоги нуклеозида, такие, как ацикловир, более эффективно, чем это делают клеточные ферменты. Преобразованные в фосфорнокислую форму эти аналоги дНТФ выборочно вредят репликации ДНК герпесвирусов.

Виды ДНК-геномов вирусов. ДНК-геномы вирусов могут быть представлены односторонней (онДНК) и двусторонней (днДНК) формами, которые в свою очередь могут быть линейными или кольцевыми. Особенности ДНК-геномов является то, что линейные молекулы никогда не имеют бессмысленных концов (рис.13). Концы молекул могут содержать прямые (▶▶) или инвертированные концевые повторы (▶◀), выступающие комплементарные (липкие) концы, самокомплементарные концевые последовательности, терминальные геномные белки (j).

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

Основные принципы репликации ДНК-геномов вирусов.

Инициация синтеза ДНК. Большинство ДНК вирусов эукариот (кроме поксвирусов) копирует свои геномы в ядре. Репликация ДНК-геномов вирусов инициируется в специфических точках ori.

В отличие от клеточных ориджинов, которые активируются один раз в течение клеточного цикла, вирусные точки ori могут срабатывать много раз в течение отдельного цикла репликации. Инициация синтеза цепи ДНК может происходить только при наличии затравки для ДНК-полимеразы. Вид затравки и способ ее образования различаются у разных вирусов и определяют своеобразие вирусных репликативных систем. Различают три основных способа инициации синтеза ДНК:

- Инициация на внутренних участках ДНК – характерна для кольцевых матриц. Затравкой служит олигорибонуклеотид, который может быть синтезирован ДНК-зависимой РНК-полимеразой, праймазой или праймосомой. Эти ферменты могут иметь

клеточное происхождение, или быть вирус-специфическими. Синтезироваться может одна или несколько затравок. На одонитевой матрице затравка синтезируется на определенном участке, узнаваемом ферментом. Двунитевая ДНК-матрица сначала подготавливается к инициации. На участке *ori* происходит присоединение хеликазы. Этот фермент расплетает участок матрицы, что приводит к образованию репликативной вилки и последующему синтезу затравки. Примером является репликация двунитевой кольцевой ДНК обезьяньего вируса SV40, сем. *Polyomaviridae*.

	дн, линейная с прямыми концевыми повторами	Герпесвирусы Фаги T2, T7
	дн, линейная с инвертированными повторами и терминальными белками	Аденовирусы
	дн, линейная с липкими концами	Фаг λ
	дн с ковалентнозамкнутыми концами (терминальные петли)	Поксвирусы Иридовирусы
	дн с разрывами одной цепи	Фаг T5
	частично дн, кольцевая	Гепаднавирусы
	дн, кольцевая	Папилломавирусы, Фаг RM2
	дн, кольцевая, сегментированная	Полиднавирусы
	он, кольцевая	Фаги ϕ X174, M13
	он, линейная с самокомплементарной 3' - последовательностью	Парвовирусы

Рис. 13. Виды ДНК-геномов вирусов

- Инициация на концах ДНК (терминальная инициация) – характерна для линейных матриц. Различают две группы способов концевой инициации ДНК-синтеза: с использованием нуклеотид-белковой затравки (аденовирусы) и с использованием самозатравочного механизма (парвовирусы).

- Инициация синтеза с использованием разрывов и брешей - затравкой для дальнейшего удлинения цепи может быть 3'-ОН конец разорванной цепи ДНК. Такой механизм инициирования синтеза наблюдается у ряда бактериофагов.

Элонгация цепи при репликации вирусных геномов принципиально не отличается от процесса синтеза клеточных ДНК. Используются ферменты, вспомогательные белки и репликационные белки, принадлежащие как клетке-хозяину, так и вирусу. Синтез ДНК, как правило, осуществляет ДНК-зависимая ДНК-полимераза α . Основным свойством синтеза является его полярность, при которой очередной нуклеотид присоединяется к 3'-концу растущей цепи. То есть направление синтеза идет от 5'- к 3'-концу, считывание - от 3'- к 5'-концу. Особенности синтеза комплементарных нитей связаны со способом инициации. На днДНК-матрице синтез идет через образование репликативной вилки (рис.14) или с вытеснением цепи, на онДНК матрице – по-репарационному механизму.

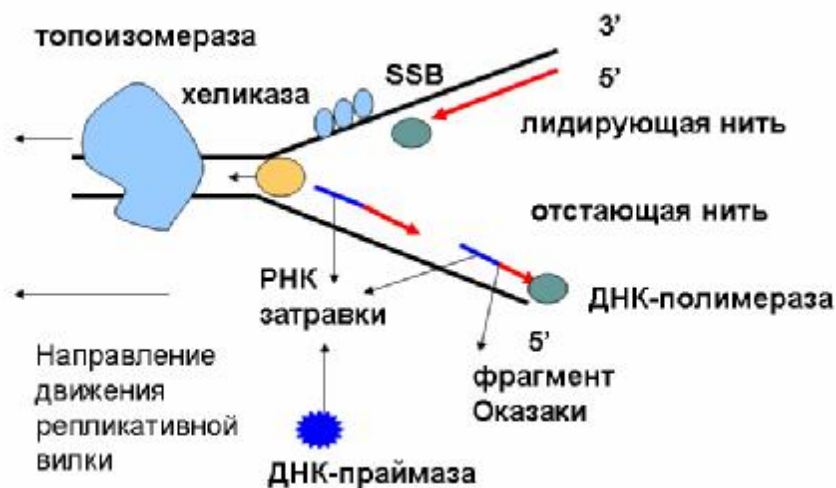


Рис. 14. Схема репликации ДНК с использованием репликативной вилки

В репликативных вилках одна нить (ведущая) копируется непрерывно в направлении от 5'- к 3'-концу. Поскольку другая нить (отстающая) должна также синтезироваться от 5'- к 3'-концу, она копируется с перерывами, многократно иницируя синтез и соединяя короткие фрагменты Оказаки. Синтез ДНК в репликативной вилке обеспечивается целым

набором белков-ферментов, которые могут иметь разное происхождение. Мелкие ДНК-содержащие вирусы используют клеточные репликативные белки. Лучше всех изучена репликация полиомавируса SV40, где вовлеченные репликативные белки были идентифицированы в бесклеточной системе *in vitro*. Установлено, что в репликации ДНК SV40 принимают участие 10 белков. Девять из них имеют клеточное происхождение: ДНК-полимераза α (ответственна за инициацию синтеза ДНК в точке *ori* и синтез отстающей нити); праймаза (связана с ДНК-полимеразой и праймирует синтез фрагментов Оказаки); ДНК-полимераза δ (ответственна за синтез лидирующей нити и завершение синтеза фрагментов Оказаки); пролиферативный клеточный ядерный антиген (PCNA), который связывается с ДНК-полимеразой δ и формирует кольцо вокруг ДНК, увеличивая процессивность полимеразы; гетеропентамерный репликативный фактор C – RF-C (присоединяет кольцо PCNA на ДНК и стимулирует полимеразу δ); RPA – онДНК-связывающий белок; РНаза H (удаляет все кроме одного рибонуклеотида РНК-праймера); экзонуклеаза FEN-1, также известная как MF-1 (удаляет оставшейся рибонуклеотид); ДНК-лигаза I (лигирует фрагменты Оказаки); топоизомераза I и/или топоизомераза II (снимает сверхспирализацию в течение синтеза). Единственный вирусный белок, который требуется для репликации ДНК SV40 – это большой T-антиген, который обладает свойствами хеликазы и обеспечивает расплетение двунитевой структуры в репликативной вилке.

Другие вирусы сами обеспечивают почти все белки репликативной вилки. Например, фаза элонгации при репликации ДНК аденовируса в условиях *in vitro* обеспечивается одной аденовирусной субъединицей ДНК-полимеразы, аденовирусным онДНК-связывающим белком, который может увеличивать процессивность полимеразы, и клеточной топоизомеразой I или II. Это простота частично связана с необычным характером репликации ДНК аденовируса, в которой отсутствует синтез отстающей цепи. Крупные ДНК-вирусы еще в большей степени обеспечивают себя ферментами репликации. Например, вирусы герпеса кодируют ДНК-полимеразу, фактор элонгации, праймазо-хеликазный комплекс, онДНК-связывающий белок и, вероятно, еще ряд вирусных белков, которые не идентифицированы.

Терминация синтеза. В случае кольцевых геномов окончание синтеза и расхождение геномов упрощены, поскольку синтез дочерней цепи идет по кругу и в конце полного оборота в точке *ori* или при двунаправленной репликации в середине кольца 3'- и 5'-концы вновь синтезированной цепи совмещаются и лигируются. Попарно сцепленные кольца разъединяются топоизомеразой. В линейных ДНК, синтезированных с помощью

РНК-затравок, все обстоит сложнее. Удаление РНК-праймера дает молекулу ДНК с выступающим 3'-концом и пробелом на 5'-конце. Предложено два способа завершения репликации с образованием полной копии матричной цепи: с использованием конкатамеров или через образование шпильки.

Основные схемы репликации ДНК-геномных вирусов.

1. Терминальная инициация с помощью самозатрабочного механизма.
2. Терминальная инициация с помощью белок-нуклеотидной (Б-Н) затравки.
3. Схема Кернса.
4. Механизм катящегося кольца.
5. Репликация через интеграцию.

1. Репликация с использованием терминальной инициации при помощи самозатрабочного механизма (рис.15). Такой тип репликации геномной ДНК имеют парвовирусы – самые мелкие (15-18 нм) икосаэдрические, безоболочечные, ядерные вирусы животных и насекомых. Геном представлен линейной онДНК, оба конца которой имеют самокомплементарные последовательности, формирующие шпильчатые структуры. 3'-конец ДНК имеет уникальную последовательность размером 125 нуклеотидов, образующую двунитевую Т-образную шпильчатую структуру, которая играет роль затравки для ДНК-полимеразы.

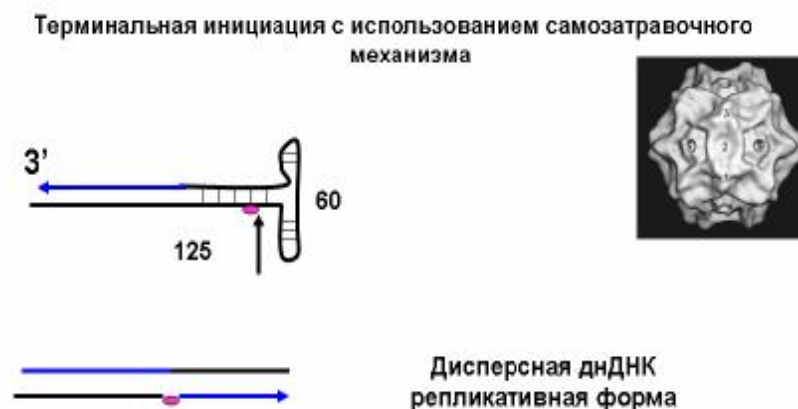


Рис. 15. Схема первых этапов репликации онДНК парвовирусов

— матричная нить; — вновь синтезированная нить

ДНК-полимераза в результате репарационного синтеза комплементарной цепи воссоздает дуплекс, обе цепи которого на одном конце ковалентно соединены. При этом 3'-концевой сегмент родительского генома в качестве матрицы не используется. Следовательно, полного воспроизведения вирусного генома пока не произошло. На следующем этапе вирусоспецифический фермент вносит разрыв в родительскую цепь на границе между реплицированным и нереплицированным участками последовательности (между 125 и 126 нуклеотидами). Концевые 125 нуклеотидов родительского генома становятся условной частью вновь синтезированной цепи и возникший таким образом 3'-конец родительской цепи используется для ее регенерации. В результате этих реакций возникает дисперсная двунитевая репликативная форма вирусной ДНК (Рис. 15). Далее следует цепь реакций, включающих образование на одном из концов ДНК-затравки в виде «заячьих ушек», синтез новой цепи с вытеснением родительской, образование еще одной репликативной формы. Вторая репликативная форма ДНК используется в качестве матрицы для дальнейшего синтеза вирусной ДНК, а вытесненная из дуплекса однонитевая молекула или вступает в репликативный цикл или входит в состав дочерней вирусной частицы.

2. Репликация с использованием терминальной инициации при помощи белок-нуклеотидной затравки (рис. 16). Такой тип репликации геномной ДНК имеют аденовирусы – относительно крупные (до 90 нм) безоболочечные ядерные вирусы с икосаэдрическим типом симметрии капсида. Геном аденовирусов представлен линейной дндНК, имеющей на 5'-концах инвертированные повторы и ковалентно присоединенные геномные белки с м.м. 55 кДа.

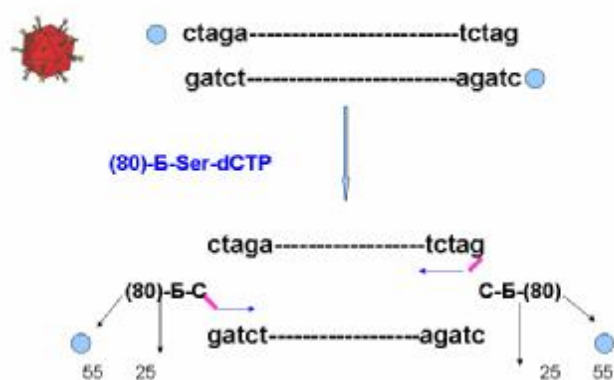


Рис. 16. Схема репликации генома аденовируса

В инфицированной аденовирусом клетке синтезируется вирусоспецифический белок массой 80 кДа, который связывается через серин с дезоксицитидином. Образовавшаяся структура (80)Б---Ser—dCTP является затравкой, которая через цитозин комплементарно связывается с 3'-концевым гуанозином генома и инициирует синтез цепи ДНК. Инициация может наблюдаться на любом конце родительской ДНК и может происходить или одновременно или последовательно. При последовательной инициации синтез дочерней цепи сопровождается вытеснением одной из родительских, а синтез комплементарной цепи идет на односторонней матрице по репарационному механизму. В тоже время обсуждается и другой механизм синтеза второй нити.

Замещенная родительская онДНК имеет на концах самокомплементарные инвертированные повторы, которые отжигаются, восстанавливая двунитевую точку ori , узнаваемую иницирующими белками, обеспечивающими синтез родительско-дочернего дуплекса. Таким образом, каждый родительский дуплекс копируется полуконсервативно. Однако процесс протекает без синтеза отстающей цепи, т.е. без образования множественных сайтов инициации и синтеза фрагментов Оказаки.

3. Репликация кольцевых геномов по механизму катящегося кольца (рис.17). Катящееся кольцо – способ репликации, при котором репликационная вилка совершает множество оборотов на кольцевой матрице. Синтезирующаяся в каждом цикле нить вытесняет прежнюю (гомологичную) цепь двуцепочечной молекулы, синтезированную в предыдущем цикле, образуя хвост, состоящий из набора последовательностей, комплементарных одноцепочечному матричному кольцу. В общих чертах репликация по механизму катящегося кольца имеет следующие стадии:

1). Вирусоспецифический фермент вносит односторонний разрыв в уникальном сайте родительской цепи репликативной формы.

2). Фермент остается связанным с 5'-концом, освободившийся 3'-концевой нуклеотид служит затравкой для ДНК-полимеразы.

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

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

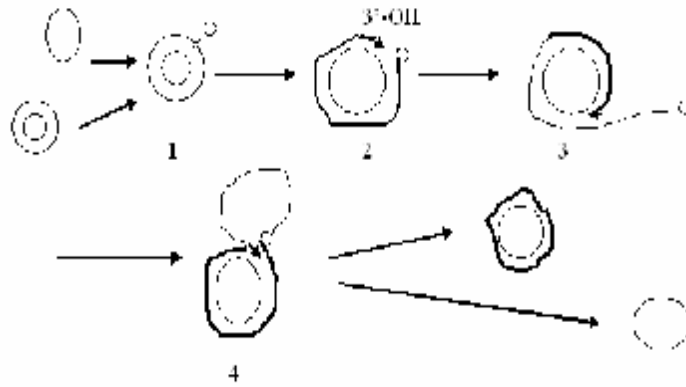


Рис. 17. Схема репликации ДНК-геномов по механизму катящегося кольца

Механизм катящегося кольца при репликации ДНК используют многие бактериофаги. Однако этот механизм не игнорируют и вирусы эукариот. Например, линейная вирионная ДНК вируса герпеса при попадании в клетку переходит в кольцевую форму и, пройдя первую стадию тета-репликации (см. ниже), реализует механизм катящегося кольца. Однако, вместо производства кольцевых дочерних молекул, репликация генерирует конкатамерные молекулы. Чтобы восстановить линейные дочерние молекулы ДНК вирусоспецифические белки расщепляют конкатамеры в определенных сайтах последовательности в процессе упаковки ДНК в капсиды.

4. Репликация ДНК по схеме Кернса (тета-репликация) включает несколько этапов (рис. 18):

1). Вирусоспецифический неструктурный белок, обладающий хеликазной активностью, связывается с ДНК-последовательностью в точке ori и расплетает двунитевую структуру.

2). Праймаза синтезирует две РНК-затравки. Образуются две репликативные вилки (2 лидирующие и 2 отстающие цепи), которые в процессе комплементарного синтеза удаляются друг от друга, двигаясь в разных направлениях. Наблюдается образование тета-молекул (θ).

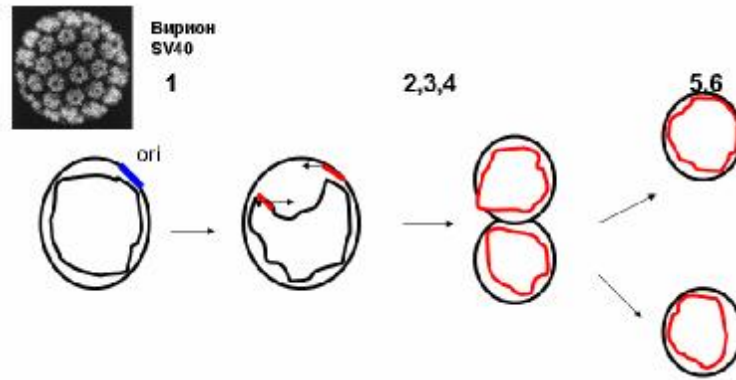


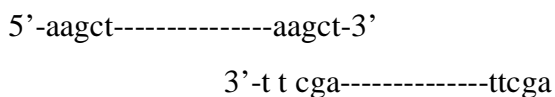
Рис. 18. Репликация ДНК по схеме Кернса (тета-репликация)

3). Сбрасывание внутримолекулярного напряжения обеспечивает топоизомераза I путем внесения точечных односторонних разрывов, которые тут же лигируются. Образуются два двунитевых кольца, где родительские цепи соединены друг с другом. Разъединение осуществляет топоизомераза II, которая вносит разрывы в двунитевые кольца. Затем разрывы лигируются.

Такой тип репликации используют в качестве промежуточной стадии многие крупные ДНК-содержащие вирусы, в том числе: бактериофаги, вирусы герпеса, а также, вирусы с кольцевым днднк геномом, поражающие человека и животных. Это вирусы, относящиеся к семействам *Polyomaviridae* (см. вирион SV40) и *Papillomaviridae*, ранее входившие в одно семейство *Papovaviridae*. Полиома- и папилломавирусы – это б/о, относительно мелкие (45-55 нм) икосаэдрические вирусы. Капсид, образованный тремя белками, имеет четко выраженную капсомерную структуру (72 капсомера). Реплицируются в ядре. Геном – двунитевая кольцевая сверхспирализованная ДНК размером 5-8 т.п.н., ассоциированная с 4-мя клеточными гистонами. Кодированы два неструктурных белка – большой и малый Т-АГ. Это трансформирующие антигены. Геном может интегрироваться с геномом клетки хозяина. Большой Т-АГ обладает свойством хеликазы и принимает участие в репликации ДНК – связывается с ДНК в точке ori. Гены Т-АГ транскрибируются сразу после попадания ДНК в ядро. Т.о. транскрипция ДНК у этих вирусов опережает репликацию.

5. Репликация ДНК с использованием промежуточных конкатамерных форм.

Конкатамер – несколько тандемно-повторяющихся единиц генома, которые образуются за счет слипания выступающих 3'-концов геномов с прямыми повторами на концах.



Этот механизм молекулярного взаимодействия используют многие геномы как промежуточную стадию репликации, а также при завершении синтеза полного генома.

6. Репликация вирусных ДНК через обратную транскрипцию и интеграцию.

Уникальную стратегию репликации генома осуществляют представители семейства *Hepadnaviridae*. Рассмотрим этот механизм на примере вируса гепатита В. Геном вируса гепатита В представлен частично двунитевой кольцевой молекулой ДНК размером 3,2 т. п. н., ассоциированной с молекулой ДНК-полимеразы, которая обладает ревертазной активностью. После попадания геномной ДНК вируса в гепатоцит происходит репарация двунитевой структуры ДНК и ее переход в ковалентно замкнутую кольцевую форму (cccDNA), которая поступает в ядро. На следующей стадии такая ДНК служит матрицей для транскрипции. В результате транскрипции образуются три класса субгеномных РНК и прегеномная РНК размером 3,4 т. п. н., что несколько длиннее, чем геномная ДНК. РНК экспортируются в цитоплазму, субгеномные мРНК транслируются, а прегеномная РНК связывается с полимеразой и инкапсулируется в коровую частицу. В составе коровой частицы ДНК-полимераза осуществляет синтез минус-нити ДНК на матрице РНК по механизму самопраймирования. В процессе синтеза происходит деградация матричной РНК. Синтез минус-нити ДНК начинается вблизи 3'-конца прегеномной РНК, вследствие чего 5'-конец негативной ДНК становится связанным с ревертазой. После завершения синтеза минус-цепи ДНК и удаления основной части матричной РНК остается экпированный 5'-конец РНК, содержащий копию участка инициации синтеза ДНК (DRI). Этот фрагмент РНК переносится на 3'-концевой комплементарный участок минус-нити ДНК (DR2) и служит затравкой для синтеза плюс-нити ДНК. Затем ДНК-полимераза синтезирует неполную плюс-нить ДНК и геном или реимпортируется в ядро или происходит созревание коровой частицы до инфекционного вириона. Общая стратегия репликации/транскрипции генома гепаднавирусов представлена на схеме (Рис. 19).

В настоящее время установлено, что геном вируса гепатита В может интегрировать в геном клетки-хозяина. Интеграция – внедрение вирусной (или другой) последовательности ДНК в ДНК клетки-хозяина, приводящее к ковалентному соединению с хозяйской последовательностью. В таком случае репликация вирусного генома и его

транскрипция осуществляются по общим клеточным механизмам. Интеграция вирусного генома в геном хозяина может происходить несколькими путями. ДНК-содержащие вирусы используют для интеграции механизм сайт-специфической рекомбинации. В общем смысле рекомбинация – это взаимодействие между специфическими участками ДНК.

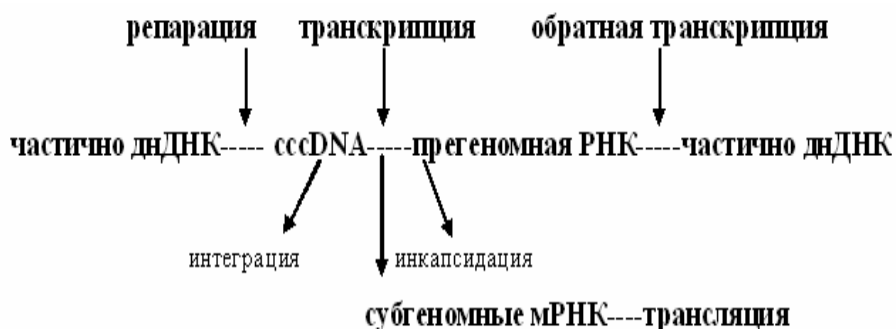


Рис. 19. Схема стратегии репликации/транскрипции генома гепаднавирусов

Сайт-специфическая рекомбинация – взаимодействие между специфическими парами последовательностей, в пределах которых имеются гомологичные последовательности. Это консервативная рекомбинация. Для осуществления интеграции необходима интеграз (топоизомераза I) и клеточный белок ИФ (клеточный фактор интеграции). Интегрированный вирусный геном существует в виде *провируса* и может выщепляться с участием вирусоспецифического белка.

Существует еще несколько вирусов, у которых репликация генома также включает реакцию обратной транскрипции. Это каулимовирусы (вирусы растений), имеющие геном в виде двунитевой кольцевой ДНК, обе нити которой не непрерывны. Стратегия репликации генома каулимовирусов сходна с репликацией/транскрипцией ДНК гепаднавирусов. Таким образом, стратегии репликации/транскрипции (+)РНК-геномных ретровирусов и ДНК-геномных гепаднавирусов позвоночных и каулимовирусов растений базируются на механизме обратной транскрипции, и это сходство, по всей вероятности, имеет эволюционную основу.

3.2.2.2 Особенности транскрипции ДНК-геномов вирусов

Каждая клетка млекопитающих содержит приблизительно $6 \cdot 10^9$ пар азотистых оснований ДНК и $> 10^4$ активных промотора. Это создает определенные трудности для вирусной ДНК, т.к. вирусные промоторы должны эффективно конкурировать за использование клеточного транскрипционного аппарата, а завербованный аппарат клетки должен эффективно генерировать вирусные транскрипты. Для этого ДНК-вирусы осуществляют стратегию эффективного инициирования транскрипции на вирусной ДНК в одном или более специфическом промоторе вскоре после того, как ДНК введена в ядро. Эти промоторы непосредственно управляют транскрипцией так называемых ранних генов.

Энхансеры (гены – усилители). Для того чтобы элементы клеточного транскрипционного аппарата могли взаимодействовать с ранними вирусными промоторами и активизировать транскрипцию, многие ДНК-вирусы содержат гены-усилители или энхансеры — cis-acting регуляторные последовательности, выполняющие роль минимальных промоторов.

В отличие от промоторов, они могут активизировать транскрипцию, находясь выше или ниже сайта связывания, запускающего транскрипцию, со скоростью от тысячи пар азотистых оснований (биты) в секунду. Эта особенность определенных энхансеров подчеркивает конкурентоспособное преимущество к связыванию с вирусными промоторами. Действительно, высокая активность энхансера/промотора ранних генов цитомегаловируса определяет его частое использование в векторах экспрессии. Хотя клеточные гены часто содержат энхансеры, первый ген-усилитель был обнаружен у полиомавируса SV40. Энхансер SV40 состоит из двух tandemных дубликаций 72 п.н., которые содержат сайты связывания, по крайней мере, для шести различных факторов транскрипции, включая множественные сайты связывания для некоторых факторов. Необходимым условием для оптимальной функции энхансера является его специфическое местоположение и кратность факторов, участвующих в транскрипции.

Многие энхансеры также содержат специфические сайты для "архитектурных" белков, которые не имеют функции активации транскрипции, а образуют с энхансером собственный, скорее стереоспецифический, трехмерный комплекс белка и гена, который назван энхансеосомой. Эти комплексы нуклеопротеида могут активировать транскрипцию со значительной мощностью и специфичностью за счет взаимодействия с РНК-полимеразой II.

Факторы транскрипции вириона. В дополнение к энхансерам некоторые ДНК-вирусы кодируют белки, которые упакованы в вирион, вводятся в клетку с вирусной ДНК и, затем, облегчают транскрипцию ранних генов. Классическим примером этого являются поксвирусы, которые реплицируются в цитоплазме, что делает бесполезным клеточный аппарат транскрипции. Поксвирусы кодируют и упаковывают в вирионы собственную РНК-полимеразу, ферменты кэппирования и полиаденилирования и факторы транскрипции. После проникновения в клетку и раздевания, вирусный транскрипционный аппарат активируется и синтезирует вирусные ранние транскрипты. Другой примером является трансактиватор VP16 вируса простого герпеса (HSV). HSV VP16 синтезируется на поздней стадии инфекции и упаковывается в часть вириона, известную как тегумент, который находится между капсидом и оболочкой. После проникновения HSV в клетку, VP16 транспортируется в ядро, где формирует комплекс, по крайней мере, с двумя клеточными белками — Oct-1, который является активатором транскрипции, узнающим 8 п.н. последовательность ДНК, и HCF-1. Этот трехмерный комплекс связывается со специфической ДНК-последовательностью HSV в области TAATGARAT (R = пурин), расположенной выше ранних генов. Специфичность и аффинное сродство обеспечивает Oct-1. Комплекс служит мощным активатором транскрипции. Эта функция связана с С-терминальным активационным доменом VP16, который может связываться фактически с любой последовательностью ДНК, расположенной выше ТАТА-бокса промотора, в связи с чем, он может активизировать транскрипцию в любой клетке эукариот. Действительно, VP16 является универсальным активатором транскрипции, т.к. активационный домен VP16 может взаимодействовать со многими различными белками клеточного аппарата транскрипции, однако не ясно, какой именно белок наиболее важен для его действия.

Стимуляция генной экспрессии вирусными ранними белками. В процессе внутриклеточного жизненного цикла ДНК-содержащие вирусы экспрессируют свои гены в высоко упорядоченной последовательности. Хотя экспрессия геномов вирусов может регулироваться посттранскрипционно, главный контроль осуществляется на уровне транскрипции. Вирусные ранние гены кодируют белки, которые, будучи транслированы, стимулируют экспрессию так называемых поздних вирусных генов. Это происходит благодаря наличию ранних и поздних промоторов, которые обычно испытывают недостаток энхансеров или специфических сайтов для комплексов транскрипции, подобных тем, что формируются белками вириона или, например, VP16, для того, чтобы эффективно конкурировать с клеточными промоторами транскрипции. Выражение некоторых вирусных генов (например, поздних генов папилломавирусов) ограничено

специфическим состоянием клеточной дифференцировки. В основе этого ограничения может лежать ткане-специфическая экспрессия клеточных факторов транскрипции. Должно также быть отмечено, что несколько вирусов кодируют белки, которые дополнительно стимулируют экспрессию некоторых вирусных генов в специфическое время жизненного цикла вируса. Кроме того, многие вирусы влияют на экспрессию клеточных генов, что может повлечь за собой индукцию или репрессию специфических генов, а также неспецифическое выключение экспрессии генов. Имеется много механизмов, которые связаны с функцией ранних вирусных белков. Например, белок BZLF1 (также известный, как Zta) вируса Эпштейна-Барр (сем. *Herpesviridae*), может вести себя подобно клеточным факторам транскрипции, которые связываются со специфической последовательностью выше генов и активизируют их транскрипцию. Другие ранние белки увеличивают активность клеточных факторов транскрипции. Например, белок аденовируса E1A замещает членов транскрипции, разрушает комплекс белков семейства E2F и белков-репрессоров семейства Rb. Это увеличивает транскрипцию ранних генов аденовируса, которые содержат E2F-связывающие сайты, что имеет важные последствия для клеточной транскрипции и, косвенно, для репликации вирусной и клеточной ДНК. Другие ранние белки, подобные ICP4 вируса простого герпеса, могут стимулировать транскрипцию путем прямого взаимодействия с транскрипционным аппаратом без связывания со специфическими последовательностями ДНК целевого промотора, или стимулировать экспрессию вирусных генов с использованием механизмов посттранскрипционного процессинга. В любом случае результатом действий этих вирусных белков является то, что клеточный транскрипционный аппарат используется для реализации информационных программ вируса, а не клетки.

Регуляция транскрипции. В вирусных и клеточных системах молекулярные механизмы транскрипции принципиально сходны. Отличие заключается в существовании различных способов регуляции транскрипции вирусных геномов. Необходимость такой регуляции определяется разной потребностью в вирусоспецифических белках. Структурные белки, как правило, требуются в больших количествах, чем ферменты. Белки, обеспечивающие репликацию генома вируса, нужны на ранних стадиях инфекции, а структурные белки – на поздних. Поэтому целесообразно, чтобы разные вирусные гены считывались с разной эффективностью, и эта эффективность менялась во времени.

Процесс транскрипции регулируется на уровне транскриптона за счет работы репрессоров и активаторов белковой природы и энхансеров. Транскрипция регулируется

количественно и качественно и осуществляется как клеточными, так и вирусоспецифическими механизмами. У вирусов установлено существование целого ряда способов регуляции транскрипции:

Временной тип регуляции. У ДНК-содержащих вирусов существует три периода транскрипции: сверххранний, ранний и поздний. При сверххранней и ранней транскрипции считываются сверххранние и ранние гены, при поздней – поздние гены. Количество транскриптов поздних генов превышает количество ранних. Многие сверххранние мРНК являются генами неструктурных белков – ферментов и регуляторов транскрипции и репликации. Поздние мРНК являются генами структурных белков. Фактором регуляции транскрипции у ядерных вирусов также является транспорт мРНК в цитоплазму.

Каскадный тип регуляции транскрипции генов. Суть такой регуляции заключается в том, что продукты сверххранней транскрипции, например α -белки, необходимы для транскрипции другой группы генов, кодирующих β -белки, которые в свою очередь включают транскрипцию следующей группы генов - γ -белков.

Полярный тип регуляции определяется порядком расположения генов в геноме. Количество синтезируемых молекул полипептида зависит от расстояния между геном и промотором. Вдоль генома (-)РНК вирусов существует как бы градиент эффективности транскрипции. Чаще транскрибируются гены 3'-региона, реже – гены 5'-конца.

Взаимное расположение и сила регуляторных сигналов. Считывание или несчитывание транскрибируемого участка матрицы зависит от свойств и расположения регуляторных сигналов – промоторов (обеспечивают начало транскрипции) и терминаторов (обеспечивают прекращение транскрипции). Основа регуляции – взаимное расположение регуляторных сигналов и их сила. Активность сигналов может меняться во времени.

Характер образования транскриптов и способ регуляции зависят от того, имеем ли мы дело с вирусами прокариот или эукариот. Напомним, что в клетках прокариот возможна множественная инициация трансляции на полицистронной матрице, тогда как в клетках эукариот на мРНК реализуется только одна точка инициации трансляции и эта мРНК функционально моноцистронна. Ограничения, накладываемые клеткой хозяина, в первую очередь сказываются на механизмах транскрипции и посттранскрипционного созревания мРНК. Приведем конкретные примеры способов регуляции транскрипции вирусных геномов в клетках эукариот, которая осуществляется с помощью более сложных механизмов, чем в клетках прокариот. Кроме промоторов, энхансеров и терминаторов транскрипционная система дополняется разнообразными способами процессинга первичных транскриптов.

Рассмотрим процессинг первичных транскриптов на примере ядерного вируса эукариот – аденовируса. Процессинг – это посттранскрипционные изменения первичных транскриптов или созревание мРНК, включающее кэпирование 5'-конца, полиаденилирование 3'-конца и сплайсинг. У аденовируса лишь кэпирование идет эффективно на разных стадиях репродукции и происходит до завершения синтеза транскрипта. Большой вклад в регуляцию экспрессии генома аденовирусов вносит альтернативное полиаденилирование. Особенно наглядно это видно при образовании поздних мРНК. В первичном транскрипте поздней области генов есть 5 участков, несущих сигнал полиаденилирования (гексануклеотид AAUAAA). Полиаденилирование может произойти в любом участке и из первичного транскрипта может образоваться только одна из 5-ти возможных классов мРНК. От выбора того или иного участка полиаденилирования зависит относительная концентрация той или иной мРНК. Подавляющее большинство кэпированных и полиаденилированных транскриптов аденовирусного генома подвергается альтернативному сплайсингу – удалению различных участков первичного транскрипта, что осуществляется при помощи клеточных механизмов. Наличие альтернативного сплайсинга и альтернативного полиаденилирования при процессинге первичных транскриптов вирусов эукариот определяется моноцистронностью эукариотических мРНК.

3.3 Стратегия трансляции и сайты вирусной регуляции

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

Первые стадии определяются особенностями белоксинтезирующих систем клеток эукариот, где, как правило, функционирует только один иницирующий кодон. Для того чтобы образовать несколько функционально-активных белков, вирусы эукариот вынуждены преодолевать ограничения, накладываемые клеткой хозяина. Это может происходить за счет сегментации генома или образования субгеномных мРНК. Основная

стратегия, которую реализуют вирусы эукариот с (+)РНК геномом – это синтез полипротеина, из которого путем ограниченного протеолиза образуются зрелые белки. Нарезание полипротеинов-предшественников обеспечивают как вирусные, так и клеточные протеазы.

В зависимости от строения активного центра протеазы разделены на 4 класса – сериновые, цистеиновые, аспарагиновые и цинксодержажие. Протеолиз полипротеина у тогавирусов и флавивирусов обеспечивают вирусоспецифические сериновые протеазы, у пикорнавирусов – цистеиновая, у ретровирусов – вирусная аспарагиновая и клеточная сериновая протеиназы. Протеолиз может протекать в ходе трансляции, то есть до завершения синтеза полипротеина (флавивирусы), или после завершения трансляции. Так, у пикорнавирусов протеолиз идет по каскадному механизму: сначала образуются крупные фрагменты полипептидной цепи, а затем они нарезаются на более мелкие полипептиды.

Синтезированные вирусные белки подвергаются различным посттрансляционным модификациям:

1). Гликозилирование – является процессом созревания вирусных поверхностных гликопротеинов и осуществляется клеточными гликозилазами на мембранах ЭПР и аппарата Гольджи. Как правило, белки гликозилируются олигосахаридами маннозного типа, но в ряде случаев процесс может идти дальше, и эти углеводные цепи замещаются на другие.

2). Ацилирование NH_2 -конца полипептидных цепей. Широко распространено у вирусов растений. У вирусов человека и животных 1-2 остатка жирных кислот (как правило, это миристиновая кислота) присутствуют в составе белка G вируса везикулярного стоматита, гемагглютинаина вируса гриппа (HA), VP2 ротавируса и в белках некоторых других вирусов.

3). Фосфорилирование – осуществляется ферментом протеинкиназой, который может быть вирусоспецифическим или клеточным. Протеинкиназа обнаружена в составе вирионов целого ряда вирусов – вируса оспы, вируса везикулярного стоматита, герпеса, ретровирусов и др. Протеинкиназы вирусного происхождения осуществляют как самофосфорилирование, так и фосфорилирование клеточных белков, что является важным фактором в регуляции экспрессии клеточных и вирусных генов.

4). Протеолитическая модификация – нарезание вирусных полипротеинов и фрагментация поверхностных белков слияния, приводящая к их активации.

Трансляция эукариотических мРНК и сайты вирусной регуляции. Для понимания стратегий трансляции вирусных мРНК (в-мРНК) необходимо вспомнить основные этапы

трансляции эукариотических мРНК (э-мРНК), точки ее регуляции и пути передачи сигналов, т.к. разрушение хозяйских сигнальных путей регуляции трансляции может вносить вклад в вирусный патогенез и прогрессию болезни.

Трансляция мРНК в клетках эукариот является сложным мульти-шаговым и мульти-белковым процессом. Как очень сложный комплекс биохимических реакций, он подчинен строгой регуляции и чрезвычайно чувствителен к внутриклеточной и внеклеточной окружающей среде. В общих чертах, трансляция э-мРНК может изменяться в зависимости от концентрации энергетических субстратов, в ответ на митогенное возбуждение и регуляцию клеточного цикла, стресс, и вирусную инфекцию.

Вирусное трансляционное программирование. Специализированный природный аппарат синтеза белка высоко сохранен у прокариот и эукариот и охватывает более чем 30 различных генных продуктов, что требует большого размера генома. Таким образом, имеющая место трансляционная зависимость вирусов исключает необходимость кодирования компонентов для автономного вирусного белкового синтеза.

Вирусы эукариот развили эффективные средства эксплуатации их врожденной трансляционной зависимости через механизмы трансляционного программирования. Это процесс, в котором вирусы перестраивают трансляционный аппарат хозяина для обеспечения синтеза вирусных белков и управлять экспрессией продуктов собственных генов. Последнее особенно важно для РНК-содержащих вирусов, которые имеют ограниченный транскрипционный контроль и в основном полагаются на стратегии регуляции трансляции, которые и модулируют выражение вирусных генов.

Трансляционное программирование включает: 1) использование регуляции выше открытой рамки считывания (uORFs); 2) чтение перекрывающихся рамок считывания; 3) трансляцию мультицистронных мРНК; 4) контроль терминации трансляции. Это позволяет вирусам сохранять минимальный размер генома, делая его эффективным в кодирующей способности. Вообще, механизмы трансляционного программирования заложены непосредственно в структуре мРНК вирусов. Структурные элементы в пределах вирусных мРНК, которые затрагивают ее трансляционную эффективность или осуществляют трансляционный контроль, включают: длину и структурную сложность 5'- и 3'- нетранслируемых регионов (НТР), позицию и контекст иницирующего кодона AUG, стабильность и доступность m⁷G-кэпа и кэп-связывающего комплекса и положение uORF(s) предшествующего гена. Кроме этого, активные элементы нуклеотидной последовательности, которые связывают регуляторные факторы, могут передавать дополнительный уровень трансляционного управления на в-мРНК, облегчая

трансляционную селективность. Вирусное трансляционное программирование воздействует на все уровни процесса трансляции, включая инициацию, элонгацию, терминацию и трансляционный контроль сигнальных путей хозяина.

Инициация трансляции. Основной контроль трансляции мРНК в эукариотических клетках происходит в процессе иницирования. Иницирование трансляции является процессом, в котором мРНК собирается в макромолекулярный комплекс с компонентами, требуемыми для синтеза белка, включая эукариотические факторы инициации (eIF) и факторы элонгации (EF). Инициация начинается с закрепления инициатора метионил-тРНК (Met-tRNA_i) с 40S субъединицей рибосомы через формирование тройного комплекса eIF2-GTP-Met-tRNA_i. В этом случае IF2 вероятнее всего связывается непосредственно с А-участком рибосомы и облегчает закрепление Met-tRNA_i с Р-участком рибосомы. IF2 не является регуляторным белком и поэтому не может вносить вклад в регуляцию трансляции мРНК. Напротив, формирование EIF2-зависимого тройного комплекса и его объединение с Met-tRNA_i и 40S субъединицей рибосомы может лимитировать скорость инициации, если альфа субъединица eIF2 (eIF2a) фосфорилируется специфическим белком киназой. Таким образом, **фосфорилирование eIF2a представляет главную точку контроля над процессом инициации трансляции**, так как изменяет эффективность и темп трансляции мРНК.

EIF2 направляет тройной комплекс к 40S субъединице рибосомы, чтобы сформировать 43S комплекс прединицирования, который включает еще один фктор – eIF3. eIF3 облегчает закрепление 43S комплекса прединицирования на мРНК через кэп-связывающий комплекс eIF4F, который независимо собирается вокруг m7G-кэп структуры мРНК.

Сборка eIF4F комплекса на мРНК зависит от eIF4E компонента этого комплекса, который узнает и непосредственно связывает m7G-кэп. **Сродство eIF4E к m7G-кэпу является второй главной контрольной точкой в процессе инициации трансляции, которое изменяется через фосфорилирование eIF4E.** Кроме этого, кэп-связывающая активность eIF4E может быть блокирована через формирование комплекса eIF4E-eIF4E-связывающий белок (4E-VP), которое приводит к запрещению кэп-зависимой трансляции. Формирование eIF4E/4E-VP комплекса регулируется через фосфорилирование 4E-VP и отрицательно воздействует на контроль роста клетки через изменение эффективности и селективности трансляции мРНК.

Эти критические для кэп-зависимой инициации трансляции точки используются вирусами, которые входят в наиболее изученное семейство пикорнавирусов, включающее

вирусы полиомиелита, вирусы энцефаломиокардита, вирус гепатита А и др. Эти вирусы инициируют трансляцию через кэп-независимый механизм, который основан на внутреннем сайте связывания рибосомы (IRES) и опосредован расщеплением 220-kDa кэп-связывающего белка EIF4 и дефосфорилированием 4E-BPs и формированием неактивного eIF4E/4E-BP комплекса (рис. 20). Трансляция, опосредованная IRES, требует специфической последовательности в пределах вирусной РНК, которая взаимодействует с факторами хозяина. Таким образом, глобальный процесс IRES–опосредованной трансляции по существу устраняет соревнование с кэп-зависимыми факторами трансляции мРНК клеток, создавая преимущества для трансляции вирусных мРНК.

Рибосомное сканирование и выбор сайта AUG. После ассоциации с мРНК, 43S прединицирующий комплекс начинает сканирование мРНК от 5'-конца или, в случае кэп-независимой трансляции, входного сайта рибосомы, и продолжает сканирование до Met-tRNA_i и взаимодействия с инициирующим кодоном AUG. Рибосомное сканирование не всегда совместимо с мРНК,

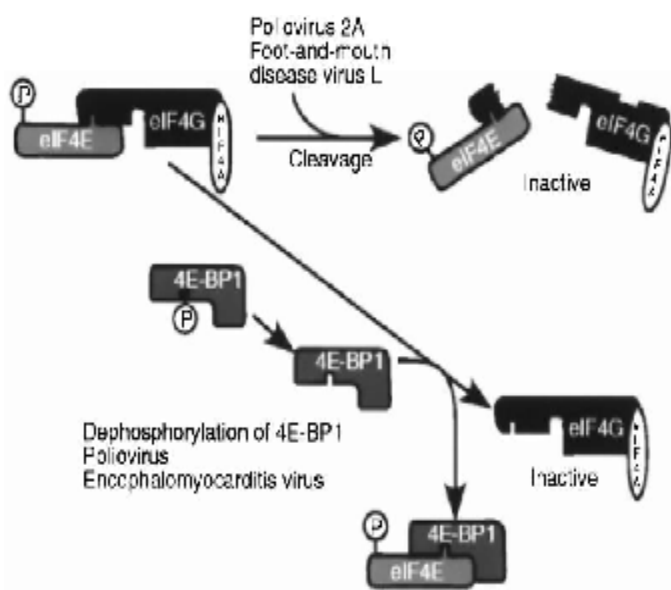


Рис. 20. Ингибирование инициации кэп-зависимой трансляции мРНК клетки-хозяина пикорнавирусами

которые обладают длинным и/или структурированным 5'-НТР. Вирусы обладают механизмами, которые позволяют прединицирующему комплексу эффективно избежать большей части 5'-НТР и начинать сканирование в пределах области инициирующего кодона AUG вирусной мРНК. Первая ассоциация Met-tRNA_i с инициирующим кодоном

AUG приводит к гидролизу GTP в тройном комплексе, связанные факторы инициирования освобождаются и 60S субъединица рибосомы присоединяется к прединицирующему комплексу. В результате 80S иницирующий комплекс опосредует стадию элонгации трансляции. В этой модели, инициация начинается с 5'-проксимального AUG кодона. Однако выбор кодона AUG для инициации трансляции зависит частично от его контекста, где каноническая ассAUGg последовательность проявляет самую высокую активность к иницированию. Отступление от этой последовательности связано с так называемым негерметичным сканированием, в котором прединицирующий комплекс редко признает неканонический или слабый AUG и сканирует мимо, чтобы начать трансляцию с кодона, более соответствующего каноническому иницирующему AUG. Негерметичное сканирование при инициации трансляции популярно среди вирусов, а у ретровирусов оно может обеспечивать определенные стехиометрические взаимоотношения продуктов трансляции.

Удлинение. В течение стадии элонгации трансляции мРНК связана со многими 80S рибосомами, или полисомами, поскольку аминокислотные остатки последовательно присоединяются к COOH-концу растущей цепи пептидов. Во многих вирусных системах жизненный цикл разграничен на ранние и поздние события, которые могут различаться дифференцированным привлечением вирусных мРНК в полисомные комплексы в определенное время после инфекции. Например, у вируса простого герпеса (HSV-1) это часто совпадает с синтезом факторов латентности и детерминант вирулентности. Процесс трансляции на стадии элонгации подчинен вирусной регуляции. Механизмы контроля элонгации включают, например, рибосомальный сдвиг рамки считывания и направленную вирусом модификацию EF-1. Первый механизм распространен у ретровирусов и связан с наличием дополнительных ORFs в пределах вирусной мРНК.

Терминация. Процесс завершения трансляции происходит в тот момент, когда 80S рибосома сталкивается в рамке считывания с терминирующим кодоном в пределах последовательности мРНК. Терминирующий кодон является фактором, который запускает процесс гидролиза связи пептидной цепи и тРНК, освобождает синтезированный полипептид от 80S рибосомы и разобщает субъединицы рибосомы. Как только завершение синтеза произошло, 40S субъединица может продолжить сканировать мРНК. При считывании мультицистронной последовательности завершение трансляции может сопровождаться переиницированием трансляции ниже расположенного гена. Завершение трансляции переиницированием распространено среди вирусов и используется ими, чтобы управлять синтезом определенного генного продукта.

После открытия полиаденилирования э-мРНК стало ясно, что поли-А трек играет важную роль в трансляции мРНК в клетках эукариот. Современные исследования показали, что определенную роль в стимулирующей функции поли-А трека на процесс трансляции играет поли-А-связывающий белок (РАВР). В клетках животных РАВР взаимодействует с элементами кэп-связывающего комплекса, включая в его состав 5'-конец мРНК и создавая, таким образом, трансляционный комплекс в форме «закрытой петли» (рис. 21).

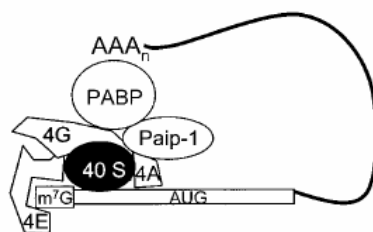


Рис. 21. Модель трансляционного комплекса в замкнутой системе с мРНК

мРНК связующий EIF4F иницирующий комплекс взаимодействует с 3'- концом мРНК через РАВР. Поли-А последовательность в пределах 3'-НТР прямым образом связывает РАВР с мРНК. РАВР добивается взаимодействия с кэп-связывающим комплексом непосредственно через eIF4G (4G) или косвенно через взаимодействие eIF4G, eIF4A (4A) и Paip-1. Сборка комплекса замкнутой системы может стабилизировать взаимодействие 40S субъединицы рибосомы с мРНК.

РАВР формирует закрытую петлю путем связывания eIF4G и белка Paip-1. Paip-1 взаимодействует с компонентами кэп-связывающего комплекса мРНК, включая eIF4G и eIF4A-хеликазу. Изучение инициации трансляции в дрожжах и растениях показали, что взаимодействие между РАВР и eIF4G стимулирует трансляцию мРНК. Сближение концов мРНК, обеспеченное закрытым трансляционным комплексом, вносит вклад в стабильность мРНК и 5'-кэп-комплекса и обеспечивает эффективную сборку полирибосом. Таким образом, полный эффект закрытой петли заключается в увеличении эффективности трансляции. Вирусы используют закрытый трансляционный комплекс как средство переключения трансляционного аппарата клетки на трансляцию вирусных мРНК путем разрушения или модификации РАВР.

ГЛАВА 4. ИНФОРМАЦИОННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ВИРУСА НА КЛЕТКУ ХОЗЯИНА

4.1 Эффект подавления хозяина

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

Некоторые вирусы реплицируются в клетке-хозяине без причинения ей какого-либо вреда. Однако обычно репликация вирусов, сталкиваясь с нормальной функцией клетки, вызывает патологический процесс, который может проявляться морфологическими изменениями клетки. Морфологические изменения могут включать округление клеток, их распад, слияние клеток с образованием синцитиев и симпластов или более тонкие изменения формы клеток. Такие изменения обычно обозначаются как цитопатическое действие вируса (ЦПД). Кроме того, многие вирусы запрещают экспрессию генов клетки-хозяина, что играет главную роль в способности вируса причинить болезнь. Следует учитывать, что понятия ЦПД и цитопатогенез не однозначны. Цитопатогенез, или патогенез, на клеточном уровне является более широким понятием, чем ЦПД, так как включает и другие клеточные изменения, кроме видимых на микроскопическом уровне.

Члены многих различных вирусных семейств ингибируют экспрессию генов хозяина в течение всего процесса вирусной репликации. Типичное объяснение этого эффекта, данное в учебниках, заключается в том, что при репликации вирусов для биосинтеза вирусных генных продуктов требуется высокий уровень обеспечения клеточными ресурсами, в частности нуклеозидтрифосфатами. Однако имеется много примеров вирусных мутантов, которые являются дефектными в их способности запрещать экспрессию генов хозяина, и, тем не менее, они реплицируются так же, как вирусы дикого типа. Клетки, которые ограничивают рост такого мутанта, изучали при инфекции вирусами дикого типа. Наблюдения подтвердили идею, что роль индуцированного вирусом ингибирования экспрессии генов хозяина преследует целью запретить клеточный противовирусный ответ. Эта идея не нова. Некоторые из самых ранних публикаций описывают индуцированное вирусом ингибирование в клетке-хозяине синтеза РНК и белкового синтеза, связывая эти эффекты с ингибированием продукции клеткой интерферона. Принцип, что вирусы могут запрещать экспрессию генов хозяина с целью

блокирования его противовирусной защиты, очень привлекателен. Однако разграничить вирусный цитопатогенез и противовирусный ответ хозяина практически затруднительно. Для некоторых вирусов явление ЦПД, как известно, является частью противовирусного ответа хозяина. Например, ингибирование белкового синтеза хозяина в клетках, инфицированных вирусом, часто является прямым эффектом продуктов вирусных генов. Действительно, имеются случаи, описанные для большинства пикорнавирусов, где вирусные белки непосредственно запрещают синтез белков хозяина, без воздействия на белковый синтез. Однако, во многих случаях, ингибирование синтеза белка хозяина является результатом ответа клетки на днРНК вируса, видимо через активацию протеинкиназы R (PKR). Другим примером цитопатического действия вируса на клетку считают индукцию апоптоза. В тоже время существует мнение, что наиболее вероятно апоптоз является противовирусным ответом хозяина. Смерть клеток через апоптоз теперь широко рассматривается как ответ хозяина с целью ограничения вирусной репликации путем устранения инфицированных вирусом клеток. Некоторые вирусы приспособились к репродукции в апоптотических клетках. Например, некоторые штаммы вируса гриппа и вируса Синдбис реплицируются в клетках с высокой экспрессией апоптотического белка Bcl-2 (является репрессором апоптоза) менее эффективно, чем в клетках, которые быстро подвергаются запрограммированной гибели. Однако, вообще, ингибирование апоптоза продлевает период вирусной репликации и ведет к более высокому вирусному урожаю.

К настоящему времени для очень немногих вирусов идентифицированы генные продукты, ответственные за ингибирование экспрессии генов хозяина. В основном это РНК-содержащие вирусы, которые запрещают экспрессию генов хозяина на различных этапах этого процесса. Например, М-белок вируса везикулярного стоматита (VSV) ингибирует иницирование транскрипции генов хозяина, и также запрещает перемещение РНК и белков хозяина между ядром и цитоплазмой. Белок вируса гриппа NS1 ингибирует, по крайней мере, два этапа в процессинге 3'-концов мРНК хозяина и также ингибирует сплайсинг мРНК. По всей вероятности, разнообразие процессов ингибирования свидетельствует об отсутствии единственного полностью эффективного подавляющего механизма. При этом вирусные белки, вовлеченные в ингибирование выражения генов хозяина, являются многофункциональными. И белок NS1 вирус гриппа и М-белок вируса везикулярного стоматита тому примеры. Для вируса гриппа установлены различные области аминокислотной последовательности NS1, которые вступают и в белок-белковые взаимодействия и во взаимодействие с РНК. В то время как для М-белка VSV

соответствие между различными функциями и определенными белковыми областями пока не установлено. Различные подавляющие механизмы вирусов на биосинтез клеток хозяина имеют большее или меньшее значение в зависимости от типа клеток и времени (начало инфекционного цикла, постинфекция) протекания инфекционного процесса.

Установление факторов, влияющих на баланс вирусного цитопатогенеза и противовирусного ответа хозяина важно для понимания молекулярных механизмов способности вирусов вызывать болезни.

4.2 Ингибирование клеточной транскрипции

Аппарат транскрипции хозяина представляет логическую цель для ингибирования большинством РНК-содержащих вирусов, включая вирусы, реплицирующиеся в цитоплазме и не требующие факторов транскрипции хозяина. Вирусы гриппа являются исключением, так как они реплицируются в ядре клетки-хозяина и требуют синтезированных вновь транскриптов хозяина для получения кэпированных олигонуклеотидов, используемых в качестве затравки для синтеза вирусных мРНК. Для многих членов других семейств РНК-содержащих вирусов (пикорнавирусов и вирусов бешенства) ингибирование синтеза РНК хозяина является особенностью вирусной инфекции, которая известна уже много лет. Для полиовируса, прототипный вирус пикорнавирусов, и вируса везикулярного стоматита, прототипный вирус рабдовирусов, в настоящее время достигнут существенный прогресс в идентификации вирусных генов, продукты которых ответственны за ингибирование транскрипции хозяина. Имеются поразительные параллели между этими двумя вирусами. Никакой вирус не кодирует белки, чьей единственной функцией является ингибирование экспрессии генов хозяина. Вирусные белки, играющие важную роль в вирусном репликативном цикле (полиовирусная 3С протеаза и М-белок VSV), выполняют также и вторую функцию – ингибирования экспрессии генов хозяина. У обоих вирусов все вирусные белки расположены в цитоплазме инфицированных клеток, где происходит репликация и сборка вирионов. Однако, 3С протеаза полиовируса (так же, как ее предшественник 3CD) и М-белок VSV локализуются и в цитоплазме и в ядре инфицированных клеток, где они выполняют разные функции: участвуют в процессе репликации вируса и ингибировании выражения генов хозяина, соответственно. Оба этих вирусных белка ингибируют транскрипцию всех трех РНК полимераз (RNAP).

Ингибирование активности транскрипционного фактора IID (TFIID). TFIID - один из семи иницирующих факторов, требующихся в дополнение к РНК полимеразе II

(RNAPII) для транскрипции от RNAPII-зависимого промотора. Эти факторы обычно являются основными факторами транскрипции для всех RNAPII-зависимых генов, или как основной транскрипционный фактор при слабой транскрипции от RNAPII-зависимых промоторов в отсутствие других белков, которые связывают на последовательности ДНК специфический элемент энхансера (гена усилителя). Такие элементы энхансера широко варьируемы среди различных генов и формируют основу для дифференциального контроля генной экспрессии.

TFIID – мультисубъединичный комплекс, состоящий из ДНК-связывающей субъединицы, белка, связывающего ТАТА-боксы (TBP), и набора TBP ассоциированных факторов (TAFs). TFIID – первый основной транскрипционный фактор, асSEMBЛИРУЮЩИЙСЯ с RNAPII-зависимым промотором через связывание TBP с ТАТА-боксом в последовательности ДНК, расположенным выше по течению от большинства промоторов. TFIID может инициировать транскрипцию даже при отсутствии ТАТА-последовательности в промоторе, но в этом случае TFIID помогает промотору за счет белок-белковых взаимодействий с другими факторами транскрипции, которые связываются с ТАТА-независимыми промоторами. TBP – единственная субъединица TFIID, которая требуется для основной транскрипции в условиях *in vitro*. Однако, активация транскрипции белками, которые связывают элемент специфической последовательности ДНК энхансера, требует взаимодействия с одним или более количеством TAF субъединиц или непосредственно, или косвенно через так называемые белки адаптера. Из-за его центральной роли в основной и активизированной транскрипции, TFIID – является очевидной целью для инактивации вирусами, которые запрещают общую экспрессию генов хозяина.

Установлено, что TFIID бездействует в клетках, инфицированных полиовирусом и вирусом везикулярного стоматита. Ранние эксперименты показали, что ингибирование транскрипции происходит на стадии инициации, но не элонгации, и что вирусы не влияют на активность RNAPII непосредственно, что предполагает инактивацию одного или нескольких факторов инициации транскрипции для RNAPII. Кроме этого было установлено, что ингибирование RNAPII-зависимой транскрипции не зависит от структуры промотора. Эти эксперименты ясно установили, что главной целью вызванного вирусами ингибирования RNAPII транскрипции является TFIID.

В экспериментах по изучению активности очищенного TFIID в культуре клеток, трансфецированной полиовирусом, было установлено, что генным продуктом, ответственным за инактивацию TFIID, является 3С протеаза. Полиовирусная 3С

протеаза обычно расщепляет P1, P2 и P3 белки-предшественники. Эти белки получают путем протеолиза полипротеина другой вирусной протеазой 2A. Несмотря на экспрессию двух вирусных протеаз, ингибирующий эффект связан с 3С протеазой. Протеаза 3С полиовирусов использует для расщепления аминокислотный мотив Gln-Gly, который находится в надлежащей последовательности и структурном контексте вирусного полипротеина. Три таких мотива (Gln-Gly) были найдены в 300-аминокислотной последовательности ТВР клеток человека. По всей вероятности, ингибирование транскрипции в клетке-хозяине в случае полиовирусов связано с протеолитическим расщеплением ТАТА-связывающей субъединицы TFIIID протеазой 3С, однако исследователи не исключают существования пока еще не открытого механизма подавления, который не затрагивает неповрежденный ТВР.

У рабдовирусов (вируса везикулярного стоматита и близко связанного с ним вируса бешенства), генным продуктом, ответственным за ингибирование транскрипции хозяина, является вирусный матриксный белок (М-белок). М-белок играет главную роль в сборке вирионов. Локализуясь на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны клетки-хозяина, этот белок создает условия для отпочкования нуклеокапсида и приобретения им оболочки. В отличие от 3С протеазы полиовирусов, М-белок не обладает ни какой известной каталитической активностью, которая могла бы быть ответственна за ингибирование экспрессии генов хозяина. То, что вирусный белок, обычно рассматриваемый как структурный, запрещает экспрессию генов хозяина, является необычным. В экспериментах по трансфекции культуры клеток установлено, что М-белок является очень мощным ингибитором, 10000 копий на клетку М-белка ингибируют 50 % RNAPII-зависимой транскрипции хозяина. Каким образом М-белок инактивирует RNAPIID зависимую транскрипцию – связывается ли он с TFIIID или действует косвенно, активизируя подавляющий фактор хозяина, пока неясно. Ясно, что способность М-белка ингибировать выражение генов хозяина представляет функцию, независимую от его роли в сборке вириона.

Другие молекулярные цели для ингибирования транскрипции хозяина.

Для того, чтобы произошло вызванное вирусом ингибирование транскрипции генов хозяина, во-первых, должно иметься более одной молекулярной цели, во-вторых, и другие вирусные белки, кроме представленных выше, могут участвовать в этом процессе. Оказалось, что полиовирусная протеаза 3С кроме ТВР расщепляет еще два других белка – белок Oct-1, связывающий энхансер, и белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент ДНК последовательности (CREB). 3С протеаза другого пикорнавируса может

расщеплять дополнительные цели, которые не признаны ферментом полиовируса. Например, 3С протеаза вируса ящура расщепляет гистон H3, который имеет косвенный эффект на транскрипцию хозяина, изменяя структуру матрицы хроматина. При инфекции другими пикорнавирусами деградации гистонов не наблюдается и, по всей вероятности, этот механизм ингибирования транскрипции может быть определен только для вируса ящура.

Кроме белковых продуктов вирусных генов на активность клеточной транскрипции могут влиять и другие его молекулярные компоненты. Так, получен целый ряд свидетельств, что в VSV-инфицированных клетках запрещать транскрипцию хозяина может вирусная лидерная РНК. Лидерная РНК представляет собой 45-50 нуклеотидов некодирующей РНК, которая транскрибирована от 3'-конца вирусного генома вирусной РНК-полимеразой до транскрипции вирусной мРНК. Лидерная РНК одна не может запрещать транскрипцию хозяина в условиях *in vivo*, однако лидерная РНК или ДНК олигонуклеотид с последовательностью лидера могут запрещать RNAPII и RNAPIII транскрипцию хозяина в условиях *in vitro*. Для лидерной РНК молекулярная цель ингибирования пока не идентифицирована, но по всей вероятности это не TFIIID.

Таким образом, к настоящему времени получены результаты, свидетельствующие, что при взаимодействии вирус-клетка вирусы вовлекают в ингибирование транскрипции хозяина многие цели и могут реализовывать разнообразные подавляющие механизмы.

Ингибирование процессинга и транспорта РНК хозяина. Ингибирование выражения генов хозяина в посттранскрипционный период является другой логической стратегией для РНК-содержащих вирусов, направленной на предотвращение противовирусного ответа хозяина. Ингибирование процессинга клеточных мРНК и их транспорта из ядра в цитоплазму является известным свойством вируса гриппа. При инфекции вирусом гриппа единственный вирусоспецифический белок NS1 осуществляет ингибирование различных этапов экспрессии клеточных генов. Аналогично, в VSV-инфицированных клетках М-белок также запрещает многие шаги процессинга РНК. Эти два вируса обладают интересными параллелями, которые иллюстрируют некоторые общие принципы ингибирования экспрессии генов хозяина. Однако, различия в деталях того, как они это выполняют, отражают относительную зависимость от хозяина.

Ингибирование процессинга РНК белком NS1 вируса гриппа.

Одним из этапов процессинга мРНК является полиаденилирование 3'-концов. Этот этап является мишенью для белка NS1 вирусов гриппа. В инфицированных клетках 3'-концы вирусных мРНК синтезируются вирусной РНК-полимеразой, на которую NS1

белок не воздействует. Процессинг 3'-концов клеточных мРНК происходит в два связанных этапа, включающих внутриядерное расщепление предшественника мРНК и полиаденилирование образовавшихся 3'-концов. Белок NS1 запрещает оба эти шага. В первом случае NS1 связывает 30-кДа субъединицу нуклеазы и специфический фактор полиаденилирования (CPSF). В норме CPSF связывается с AAUAAA последовательностью, расположенной с 10 по 30 нуклеотид выше сайта расщепления мРНК-предшественника, и с тремя другими клеточными факторами, участвующими в реакции расщепления. Связывание NS1 белка с CPSF полностью не ингибирует эту реакцию, однако, NS1 белок также запрещает последующий шаг, связывая фактор, существенный для полиаденилирования. В результате поли-А-полимераза не может добавить на 3'-конец более чем 10-12 остатков аденозина. Дальнейшая работа поли-А-полимеразы требует ядерного поли-А-связывающего белка (PABII). NS1 белок связывает PABII и сталкивает его с короткого поли-А хвоста. В результате, клеточные мРНК, содержащие от 10 до 12 остатков аденозина на 3'-конце накапливаются в ядре инфицированных вирусом гриппа клеток. Предполагается, что нарушение транспорта мРНК из ядра в цитоплазму связано с блокированием NS1 связывания PABII с 3'-концом мРНК, что необходимо для ядерного транспорта. NS1 белок также запрещает сплайсинг мРНК хозяина. Ингибирование сплайсинга может вовлекать закрепление NS1 в области специфической последовательности U6 РНК. NS1 белок не влияет на сборку комплекса предшественника мРНК и сплайсингосомы, но нарушает взаимодействие U6 с U2 и U4 РНК, необходимое для катализа. Одной из причин блокирования процессинга на этой стадии является то, что включение мРНК-предшественников в бездействующие сплайсингосомы предотвращает их транспорт в цитоплазму. Этот механизм ингибирования сплайсинга имеет относительно слабый эффект на экспрессию вирусных генов, так как большинство вирусных белков транслируется с несплайсированных мРНК. Два вирусных сегмента генома вируса гриппа, 7 и 8, кодируют и сплайсируемую и несплайсируемую мРНК, так как содержат cis-acting последовательности, которые активируют их сплайсинг.

Ингибирование М-белком ядерно-цитоплазматического транспорта.

Ингибирование процессинга РНК хозяина вирусом гриппа было изначально признано как результат блокирования их ядерно-цитоплазматического транспорта, а блок транспорта РНК в клетках, инфицированных VSV – как блокирование процессинга. В клетках, инфицированных VSV, процессинг малых ядерных (snRNAs) и рРНК ингибируется быстро, в то время как процессинг мРНК и тРНК – более медленно, что

отражает различную чувствительность процессинга разных рибонуклеиновых кислот к обобщенному блоку ядерно-цитоплазматического транспорта и РНК и белков, который создает М-белок. Поскольку VSV запрещает транскрипцию хозяина, блокирование транспорта РНК и ее процессинга наиболее ярко проявляется при условиях, когда ингибирование транскрипции выражено слабо, т.е. в ранние сроки после инфицирования. Установлено, что ингибирование транскрипции вирусом происходит между 2 и 4 часами постинфекции, принимая во внимание, в то время как ингибирование процессинга и сборки snRNAs происходит в пределах 1 часа. Таким образом, это – вероятно самый ранний эффект VSV на экспрессию генов хозяина.

М-белок ингибирует процессинг U1 и U2 snRNAs, который происходит в цитоплазме, но не ингибирует процессинг U3 snRNA и мРНК, который происходит в ядре, хотя М-белок запрещает транспорт процессированной РНК в цитоплазму. Процессинг рРНК требует импорта вновь синтезированных рибосомальных белков в ядро, т.е. ингибирование процессинга рРНК вероятно следует из индуцированного М-белком блока белкового импорта. Единственная РНК, которая избегает подавляющих эффектов М-белка – тРНК. Предполагается, что влияние М-белка на транспорт почти всех белков и РНК из ядра в цитоплазму связано с его взаимодействием с одним или несколькими компонентами системы ядерного транспорта (Ran-RCC1) и зависит от асимметричного расположения поперек ядерной мембраны двух различных форм Ran и малого GTP-связывающего белка. Таким образом, М-белок, связываясь с элементами, обеспечивающими энергезависимый ядерно-цитоплазматический транспорт молекул, блокирует его, нарушая градиент Ran-GTP/Ran-GDP, направленный поперек ядерной оболочки.

4.3 Ингибирование трансляции мРНК хозяина

В пределах многих вирусных систем, в которых наблюдается эффект подавления хозяина, наблюдается приоритетная трансляция вирусных мРНК, которая происходит по эндогенным механизмам трансляции хозяина. Избирательная трансляция мРНК вирусов во время эффекта подавления хозяина - процесс мультикомпонентный, который включает опосредованное вирусом изменение внутриклеточной концентрации ионов металлов и метаболизма нуклеотидов, изменения стабильности РНК, ее процессинга и экспорта, а также привлечение определенных факторов хозяина. В общих чертах, избирательная трансляция вирусных мРНК в течение эффекта подавления хозяина является результатом соревнования между мРНК вируса и хозяина за трансляционный аппарат клетки.

Имеется много вирусов, чьи мРНК транслируются в инфицированных клетках, в то время как трансляция мРНК хозяина запрещена. Во многих случаях ингибирование белкового синтеза может быть результатом противовирусного ответа хозяина, в то время как предпочтительная трансляция вирусных мРНК – адаптация вируса к росту в присутствии таких подавляющих механизмов. Таким образом, первым ключевым вопросом в понимании процесса ингибирования трансляции хозяина является определение вирусной или клеточной основы механизмов. Независимо от того, имеет ли ингибирование вирусное или клеточное происхождение, вирусы должны иметь механизм преодоления ингибирования так, чтобы вирусные мРНК транслировались в первую очередь. Второй вопрос – каковы вирусные механизмы преодоления клеточных преград.

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

Ингибирование трансляции пикорнавирусами.

1). Пикорнавирусы вмешиваются в синтетические процессы клетки на уровне инициации трансляции. Классическим примером вызванного вирусом ингибирования трансляции хозяина является протеолитическое расщепление фактора инициации трансляции eIF4G в клетке, инфицированной пикорнавирусами. Для большинства пикорнавирусов это расщепление осуществляет вирусная протеаза 2A, у вируса ящера – лидерная (L) протеаза, кодируемая 5'-концом вирусной полипротеиновой ОРС. EIF4G – одна из субъединиц мРНК-связывающего комплекса eIF4F, которая является посредником взаимодействия eIF4F и мРНК с другими элементами иницирующего комплекса. Разрушение eIF4G предотвращает ассоциацию комплекса с кэп-связывающей субъединицей EIF4E, запрещая, таким образом, кэп-зависимую трансляцию мРНК. Так как РНК пикорнавирусов не кэпирована, это ингибирование не затрагивает трансляции вирусных мРНК.

2). мРНК, которые уже участвовали в трансляции на полисомах, в меньшей степени зависят от eIF4G для переинициирования синтеза белка. В связи с этим существуют и другие механизмы блокирования синтеза клеточных белков. Установлено, что протеазы

2А и 3С пикорнавирусов расщепляют клеточный эндоплазматический поли-А-связывающий белок. Этот белок участвует в инициации трансляции, соединяя 3'-конец мРНК с ее 5'-концом, упомянутой как модель замкнутой системы трансляции. Таким образом, расщепление поли-А-связывающего белка может вносить вклад в ингибирование трансляции хозяина, прерывая эту замкнутую систему.

3). В клетках, инфицированных полиовирусом, также инактивирован трансляционный иницирующий фактор eIF2, что связано с активацией PKR хозяина вирусной днРНК. Инактивация eIF2 происходит медленно и более выражена в постинфекционный период.

Ингибирование трансляции в клетках, инфицированных VSV.

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

Ингибирование трансляции в клетках, инфицированных вирусами гриппа.

Для вируса гриппа инактивация eIF2 с участием PKR не характерна. Как и в инфицированных полиовирусом клетках, деятельность PKR запрещается за счет активации ее клеточного ингибитора. Целью для инактивации белкового синтеза в клетках, инфицированных вирусом гриппа, является кэп-связывающий иницирующий фактор eIF4E. Для взаимодействия eIF4E с мРНК этот фактор должен быть фосфорилирован клеточной киназой MNK1. В клетках, инфицированных вирусом гриппа, eIF4E - по крайней мере, частично, инактивируется из-за недостатка фосфорилирования. Является ли это результатом снижения активности MNK1 или повышения активности фосфатазы, вирусный это механизм или ответ хозяина на вирусную инфекцию, пока не определено. Ясно лишь, что результатом является

снижение эффективности трансляции эспированных мРНК клетки. Ожидалось, что это ингибирование затронет трансляцию вирусных мРНК также, как мРНК клетки, так как кэп мРНК вируса получен от клеточных мРНК в результате активности вирусной РНК-полимеразы. Как и РНК полиовируса, мРНК вируса гриппа содержат на 5'-конце последовательность, которая увеличивает эффективность трансляции в присутствии низкого уровня факторов инициации трансляции. Эта последовательность включает 12 общих для всех восьми сегментов 5'-концевых нуклеотидов и некоторые специфичные для сегмента фланкирующие последовательности. С этой последовательностью могут связываться разнообразные белки хозяина, и один из них увеличивает трансляцию вирусных мРНК. Этот белок является клеточным фактором G-богатой последовательности 1 (GRSF-1), который предварительно идентифицирован как мРНК-связывающий белок, чья роль в процессе трансляции ранее не демонстрировалась. Таким образом, у вируса гриппа избирательная трансляция мРНК происходит при участии факторов хозяина, которые взаимодействуют с cis-acting последовательностями в геноме вируса, увеличивая трансляцию в условиях, в которых деятельность факторов инициации трансляции хозяина запрещена.

Ингибирование трансляции вирусами герпеса (HSV).

Вирусы герпеса человека вызывают латентную инфекцию в любых клетках нервной системы (вирус простого герпеса и вирус опоясывающего лишая/ветряной оспы) или гематопозитических клетках (вирус Эпштейна-Барр и вирус цитомегалии), которая сопровождается незначительным повреждением клетки-хозяина. Латенция разрешает вирусную персистенцию при активном иммунном ответе. В ответ на некоторые стимулы вирусы герпеса могут периодически реактивироваться, переходить в продуктивную стадию жизненного цикла и продуцировать вирусное потомство для инфицирования новых хозяев. Вирусы герпеса представляют привлекательную модель для изучения комплекса механизмов экспрессии вирусных генов и регуляции на уровне трансляции. У вирусов герпеса в течение продуктивной инфекции вирусные гены могут быть категоризованы в три кинетических класса: сверхранние (α), ранние (β) и поздние (γ) гены. Гены α транскрибируются в отсутствие белков, синтезированных de novo. Этот процесс достигает максимума через 2-4 часа после инфекции и транскрипты продолжают накапливаться вплоть до поздней стадии инфекции. Большинство продуктов α генов являются мощными активаторами транскрипции β и γ генов. Эти гены кодируют белки, требуемые для синтеза ДНК, и множество вспомогательных факторов репликации.

Вирусные структурные белки являются продуктами генов γ , чья экспрессия происходит в начале синтеза ДНК.

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

Предполагается, что в первичном запрещении белкового синтеза хозяина ключевую роль играет, по крайней мере, один вирусный фактор – вирионный белок запрещения хозяина (VHS), который дестабилизирует мРНК, и, частично, дезинтегрирует полисомы. VHS-белок вирусов герпеса кодируется геном UL41 и представляет собой фосфопротеин м.м. 58-кДа. Этот белок образует в вирионе слой тегумента. Таким образом, VHS поставляется в цитоплазму инфицированных клеток в составе вириона. Использование *in vitro* высокоочищенного VHS показало, что этот белок непосредственно обладает РНКазной активностью. Предварительные результаты свидетельствуют, что VHS вероятно, или самостоятельно, или в сотрудничестве с другими факторами, расщепляет молекулы мРНК в одном или нескольких участках поли-А трека, функцией которого является защита мРНК от разрушения РНКазами хозяина. Следует отметить, что приведенный выше механизм запрещения синтеза белков хозяина является уникальным, но не единственным для вирусов герпеса.

4.4 Ингибирование функции цитоскелета

В течение инфекции большинством РНК-содержащих вирусов, распластанные на подложке клетки, культивируемые в условиях *in vitro*, подвергаются морфологическим изменениям, ведущим к их округлению. Возникает ключевой вопрос - то ли вирусные генные продукты непосредственно затрагивают компоненты цитоскелета хозяина и

стимулируют округление клеток или, альтернативно, округление клеток следует из индукции апоптоза в клетках-хозяевах, поскольку одним из самых ранних морфологических изменений при апоптозе культивируемых на подложке клеток является их округление. Таким образом, округление клеток, которое было идентифицировано как ЦПД, во многих случаях отражает индукцию апоптоза.

Ингибирование функции цитоскелета полиовирусом.

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

Округление клеток, инфицированных вирусом везикулярного стоматита.

Предполагается существование двух различных механизмов, с использованием которых VSV стимулирует округление клеток. VSV кодирует белок (М-белок), который

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

4.5 Вирусы и апоптоз

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

Апоптоз часто требует синтеза новых клеточных генных продуктов. В связи с этим, вирусные белки, которые запрещают выражение генов хозяина, могут ускорять апоптоз в некоторых типах клеток, но задерживать начало апоптоза в других типах клеток, что является критической проблемой для вирусного патогенеза. С тех пор апоптоз, вызванный вирусом, рассматривается как ответ хозяина на инфекцию с целью ограничения вирусной репликации через устранение клеток, инфицированных вирусом. Однако имеется ряд случаев, где ингибирование вирусом экспрессии генов хозяина ведет к индукции апоптоза. К вирусам, индуцирующим апоптоз клетки-хозяина, относятся, например, вирусы гриппа, вирус везикулярного стоматита, ВИЧ.

Индукция апоптоза вирусами гриппа.

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

Для вирусов гриппа определены два фактора, которые вовлечены в индукцию апоптоза – вирусная днРНК и вирусная нейраминидаза. Есть веские доказательства того, что индукция Fas-опосредованного апоптоза является частью ответа хозяина на днРНК вируса. Индукция экспрессии Fas антигена вирусом гриппа или его двунитевой репликативной формой РНК происходит, по крайней мере, частично, при участии протеинкиназы R (PKR). В дополнение к ответу хозяина на днРНК, индукция апоптоза в инфицированных вирусом гриппа клетках может вызываться вирусной нейраминидазой. Ингибиторы вирусной нейраминидазы тормозят апоптоз, если добавлены в культуру клеток сразу после трансфекции. Вирусы с высоко активной нейраминидазой стимулируют апоптоз в клетках-хозяевах быстрее чем, вирусы, имеющие менее активную нейраминидазу. Вирусная нейраминидаза участвует в активации растворимого TGF- β путем удаления нейраминовой кислоты. Таким образом, вирусы гриппа используют различные механизмы индукции апоптоза клетки-хозяина. Одни связаны с процессом репликации РНК, другие - с ферментативной активностью гликопротеидов вирусной оболочки (нейраминидаза). Недавние исследования других вирусов показали, что аналогично протекает индукция апоптоза у альфавирусов (вирус Синдбис), у которых способность стимулировать апоптоз связана с двумя факторами – репликацией РНК и активностью гликопротеидов оболочки.

Индукция апоптоза VSV.

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

Запрещение апоптоза аденовирусами. Взаимодействие аденовирусов с клеткой может проявляться тремя типами инфекции: продуктивной, персистирующей и трансформирующей. Стратегия выживания аденовирусов направлена на подавление апоптоза инфицированной клетки. Установлен целый ряд молекулярных взаимодействий, обеспечивающих вирусу преодоление механизмов клеточной защиты. Продукт ранней транскрипции гена E1A влияет на уровень транскрипции клеточного фактора p53, который является опухолевым супрессором генов апоптоза. Продукт E1B является аналогом клеточного протоонкогена Bcl-2 и регулирует клеточное деление. Один из продуктов группы генов E3 (gp19K), взаимодействует с молекулами гистосовместимости первого класса, чем препятствует их доставке на поверхность клетки. В результате, инфицированная аденовирусом клетка не узнается цитотоксическими В-лимфоцитами. Еще один путь блокирования апоптоза заключается в том, что продукты генов E3 участвуют в удалении Fas(CD95) молекулы, опосредующей апоптоз, с клеточной поверхности и ее деградации. Аденовирусы также блокируют активность ферментов, участвующих в каталитическом расщеплении клеточных белков, которое происходит при апоптозе.

4.6. Воздействие вирусов на клетку на уровне репликации

1. Вирусная репликация может смещать клеточный хроматин к периферии ядра (герпесвирусы), нарушая нормальный процесс удвоения ДНК хозяина.
2. Вирусные белки могут деградировать клеточную ДНК (вирионная ДНКазы поксвирусов проникает в ядро и деградирует онДНК).
3. При репликации вирусы используют клеточные репликативные белки для синтеза своих нуклеиновых кислот, обедняя клеточный ДНК-синтез.
4. Для обеспечения собственного синтеза строительным материалом (нуклеотидами или их предшественниками) и инструментами (структурными и репликативными

белками-ферментами) вирусы могут стимулировать переход клетки в S (синтетическую) фазу (опухолеродные вирусы), побуждая клетку к репликации ДНК.

5. Вирусы приобретают полную автономность от клетки хозяина в плане репликации своего генома, кодируя все ферменты синтеза ДНК (поксвирусы, ряд бактериофагов).

6. Вирусы заставляют клеточные машины синтеза ДНК работать на репликацию своего генома. Это интегрированные вирусы (например, ретровирусы) и эписомальные геномы (ВЭБ).

7. Нарушение репликации ДНК клетки хозяина происходит также в результате торможения синтеза клеточных белков (вторичный эффект).

ЛИТЕРАТУРА

Агол В.И., Богданов А.А., Гвоздев В.А. и др. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. – М.: Высш. шк. – 1990. – 352 с.

Новикова Н.А., Новиков В.В., Добротина Н.А., Мазепа В.Н. Вирусология. – Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2002. – 242 с.

DiMaio D., Coen D.M. Replication strategies of DNA viruses. //Fields Virology. – 2001. – v.1.

Forterre P., Filée J., Myllykallio H. Origin and Evolution of DNA and DNA Replication Machineries. // In Book: The Genetic Code and the Origin of Life. Eureka Bioscience Collection. Edited by: Lluís Ribas de Pouplana. 2003.

Gale M., JR., Tan Seng-Lai, M.G. Katze. Translational Control of Viral Gene Expression in Eukaryotes // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2000. – Vol. 64, N2. – P. 239–280.

Lyles D.S. Cytopathogenesis and Inhibition of Host Gene Expression by RNA Viruses. // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2000. – Vol. 64, N4. – P. 709–724.

Koonin E.V., Galperin M.Y. Sequence – Evolution – Function. // Computational Approaches in Comparative Genomics. Norwell (MA): Kluwer Academic Publishers. –2003.