

А. А. ТАШЕНОВА, Н. П. КАБЫШЕВА, Н. Б. АХМАТУЛЛИНА

РОЛЬ МУТАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ГРИППА В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

(Институт общей генетики и цитологии МОН РК, г. Алматы)

Получена коллекция мутантов вируса гриппа при воздействии химическими мутагенами на отдельные фрагменты РНП, содержащие определенные гены. Изучены биологические и генетические свойства выделенных мутантов. Выявлена дифференциальная чувствительность гемагглютиниона у мутанта и нативного вируса к воздействию редуцирующих агентов. Выдвигается предположение о преимущественной роли гена нуклеопротеидного белка в патогенности вирусов гриппа.

Вирусы представляют весьма удобную модель для изучения проблемы направленного мутагенеза, тесно связанной с познанием роли отдельных генов. Вирус гриппа сохраняет свою актуальность и в настоящее время. Его антигенная изменчивость, обусловленная уникальной организацией генома, не сравнима ни с какими другими объектами живой природы. Вирусы гриппа различных штаммов способны рекомбинировать и обмениваться фрагментами геномов, что приводит к появлению все более и более патогенных вариантов, которые могут передаваться от животных и птиц человеку. В этой связи необхо-

димо определить, каким геном (или генами) определяется признак патогенности вируса, связь его с мутационными изменениями тех или иных генов. Для решения этой проблемы мы использовали разработанный нами метод получения направленных мутаций у вирусов с фрагментированным геномом, суть которого заключается в воздействии различными мутагенными факторами на отдельные гены в составе РНП вируса [1, 2], с последующим воздействием на них мутагенными факторами и получением биологически активных реассортантов при заражении чувствительных клеток смесью фрагментов РНП. Каждый раз

мутагенной обработке подвергался/лись ген (гены), входящие в состав одного фрагмента РНП. Отбор мутантных клонов осуществляли по признакам размера бляшек (S) и термочувствительности (ts). Одним из условий характеристики мутационных изменений белков являлся электрофоретический анализ их полипептидного состава.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использован вирус чумы птиц А/FPV, штамм Вейбридж, антигенная формула Н7N7. Вирус активно репродуцируется при 37°C в 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах ($\lg_{\text{ЭИД/50}} = 9,0$), а также в культуре куриных фибробластов ($\lg_{\text{БОЕ/мл}} = 8-9$), образуя под агаровым покрытием крупные бляшки диаметром 4-5 мм.

Очистку и концентрацию вируса, определение его инфекционной и гемагглютинирующей активности, получение клеток куриных фибробластов (КФ) проводили по общепринятым методам [3].

РНП из препарата очищенного вируса выделяли путем центрифугирования разрушенного неионным детергентом (NP40) вируса в линейном градиенте глицерина (15-50%) при 18 000 об/мин в течение 17 часов (центрифуга L3-50 "Beckman", ротор SW27.2). Далее полученные классы РНП (4 класса) в отдельности подвергались воздействию химическими мутагенами. В качестве мутагенов использованы нитрозометилмочевина (НММ) и нитрозогуанидин (НГ). Заражение клеток КФ смесью фрагментов РНП, содержащей один обработанный мутагеном фрагмент, проводили методом трансфекции с использованием ДЕАЕ-декстрана [4].

Для изучения частоты ts-мутантов, индуцированных изучаемыми мутагенами, исходный вирус был тщательно селекционирован до достижения наибольшей однородности популяции. Критерием первичного отбора мутантного фенотипа служили размеры бляшек, формируемых мутантами под агаровым покрытием и их изменение в опытах со сменой температурного режима (37°C и 40°C). Мелкобляшечные изоляты инкубировали при перmissive и non-permissive температурах, после чего трижды клонировали методом из бляшки в бляшку.

Для детального изучения биологических свойств, белкового состава и генетического анализа мутанты с наиболее выраженными феноти-

ческими изменениями были накоплены пассированием в 10-дневных куриных эмбрионах, после чего вирусосодержащий материал очищали и концентрировали общепринятыми методами. Выделение РНК и электрофорез нуклеиновых кислот проводили по методу [5] в 2,8% ПААГ при 70 V в течение 14 часов. Электрофорез белков – по методу Лэммли [6].

Результаты и их обсуждение. Роль изменчивости конкретных белков в их биологической активности обычно изучают путем сравнительного изучения структуры и функций разных вариантов (мутантных форм) этих белков. В этой связи нами получена коллекция мутантов вируса гриппа путем воздействия мутагенными факторами различного механизма действия, как на цельный вирус, так и на отдельные гены в составе изолированных фрагментов РНП. Отработаны условия разделения генома вируса на 4 изолированных фрагмента центрифугированием в ступенчатом градиенте глицерина (15-50%) при 18 тыс. об/мин из суспензии вирионов, предварительно разрушенных неионным детергентом NP40. Электрофоретический анализ белкового и нуклеинового состава полученных фрагментов показал, что все они имели одинаковый белковый состав: белки полимеразного комплекса, нуклеопротеин (NP) и матриксный белок (M1). Нуклеиновый состав РНП был определен с помощью ПЦР путем амплификации полноразмерных генов вируса [2]. Для идентификации использовали праймеры для амплификации генов NA, NP, M и NS. Фрагмент РНП 1 включает гены белков полимеразного комплекса (PB1, PB2 и PA), РНП 2 – ген гемагглютинина (HA), РНП 3 – ген нуклеопротеина (NP), и по-видимому, ген нейраминидазы (NA) и РНП 4 – гены матриксного (M1) и неструктурного (NS) белков.

После идентификации состава фрагментов РНП, нашей задачей было получение биологически активных реассортантов вируса при заражении клеток смесью полученных проб. Для этого был применен метод трансфекции с ДЕАЕ-декстраном [4] с использованием вируса-помощника в очень низкой дозе (0,5-1 БОЕ/кл), не позволяющей эффективное инфицирование клеток. Положительный результат позволил провести направленное воздействие мутагеном на конкретные гены, идентифицированные нами в составе выделенных фрагментов РНП. Каждый раз

мутагенному воздействию подвергали пробу, содержащую материал одного фрагмента, после чего проводили ее разведение в 10 раз, что исключало действие мутагена на гены, содержащиеся в пробах других фрагментов РНП при их смешивании и последующем заражении чувствительных клеток. Таким способом были выделены мутанты, содержащие мутации только в одном или двух генах.

Полученная нами коллекция мутантов вируса гриппа включала 62 мутанта, которые были распределены в 2 группы: в группе 1 - 24 ts-мутанта, выделенных при воздействии химическими мутагенами на цельный вирус и полный комплекс РНП, в группе 2 - 38 ts и S⁻-мутантов, полученных при действии на отдельные гены в составе фрагментов РНП. При анализе 2-ой группы 24% составили ts-мутанты с изменениями в генах Р белков (РНП 1); 40% - в генах НА (РНП 2); 28% - в генах NP и NA (РНП 3) и 8% - в генах М белков (РНП 4).

Целью настоящей работы было проведение сравнительного изучения биологических свойств мутантов, имевших изменения в генах гемагглютинина и нуклеопротеидного белка. Как известно, эти белки отвечают за кардинальные свойства вируса: первый определяет способность к адсорбции и проникновению в чувствительную клетку, второй является типоспецифическим антигеном.

Мутанты вируса гриппа, полученные воздействием различными мутагенами на ген гемагглютинина. Воздействием химическими мутагенами на фрагмент РНП 2, содержащий ген НА, получено 15 ts мутантов, обладающих мелко и микробляшечным фенотипом (S⁻). Критерием отбора мутантов являлось сохранение (S⁻)-фенотипа в экспериментах со сменой температурного режима (37°/40°). Селекционированные мутанты при перmissive температуре (37°С) сохраняли достаточно высокую репродуктивную (в среднем, 7-8 lg_{БОЕ/мл}) и гемагглютинирующую (128 - 256 ГАЕ/мл) активности, у исходного штамма эти показатели составляли 9-9,5 lg_{БОЕ/мл} и 512-1024 ГАЕ/мл. Выявленные отличия биологических характеристик некоторых из полученных вариантов оказалось возможным связать с изменениями электрофоретических свойств белка НА (рис. 1), которые проявились в различной степени в зависимости от характера мутагена. Так,

у мутанта I_{Н81}, полученного при воздействии НММ, при восстанавливающих условиях электрофореза подвижность белка НА заметно снижена, что может свидетельствовать о реальном увеличении его молекулярной массы (рис. 1,а). Это наблюдение справедливо и для подвижности большой и малой субъединиц НА. Для белка НА мутанта I_{НГ6} (рис. 1,б) характерно отсутствие гомогенности при не восстанавливающих условиях электрофореза (-МЭ), а также появление нескольких электрофоретических форм белка НА при восстанавливающих условиях (+МЭ): нерасщепленный белок с замедленной подвижностью, а также 2 или 3 формы с подвижностью, характерной для большей субъединицы НА1, в то же время отмечается отсутствие меньшей субъединицы НА2, которая в этих условиях (12,5% ПААГ, + МЭ) обнаруживается в геле несколько выше белка М1.

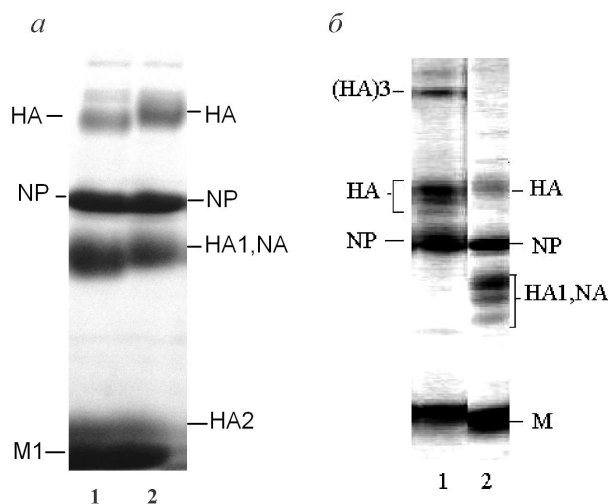


Рис. 1. Электрофоретические спектры мутантов, индуцированных воздействием химическими мутагенами на ген НА: а – белки мутанта I_{Н81} и вируса А/FPV: 1- контроль; 2- мутант; + МЭ; б – белки мутанта I_{НГ6}: 1 – (-МЭ); 2 - (+МЭ)

Поскольку действие восстанавливающих реагентов имеет своим следствием разрушение S-S- связей, можно предполагать, что мутационное повреждение белка НА коснулось изменения числа или положения цистеиновых остатков в молекуле. Другое объяснение может заключаться в появлении дополнительных сайтов расщепления в молекуле субъединицы НА1. Фенотипическое проявление этой мутации можно связать, в основном, с изменениями в молекуле НА. Как

известно, белок НА оказывает значительное влияние на биологические свойства вируса гриппа, в виду того, что его основными функциями являются адсорбция и проникновение вируса в клетку, и он обладает высокой антигенной изменчивостью.

Мутанты вируса гриппа, индуцированные воздействием химическими мутагенами на гены нуклеопротеидного белка и нейраминидазы. Мутагенным воздействием на фрагмент РНП 3, содержащий ген NP, получено 8 мутантов, которые не размножались при непермиссивной температуре (t_s), некоторые из них утратили способность к репродукции в клетках МДСК (hr), а также обладали измененными электрофоретическими свойствами белков (рис. 2). Как видно из рис. 2,а белок NP мутанта Π_{N7} при не восстанавливающих условиях электрофореза отличается увеличением соотношения быстро мигрирующего компонента. Вероятно, это обусловлено отсутствием части внутримолекулярных дисульфидных (-S-S-) связей, обычно образующихся при солюбилизации вируса ДСН, т.е. изменения белка NP носят, скорее всего, структурный характер. Одним из подходов к изучению природы изменчивости вируса гриппа является определение чувствительности его белков по отношению к различным факторам. Исходя из обнаруженной нами сравнительно большей мутационной изменчивости этого вируса в условиях прямого

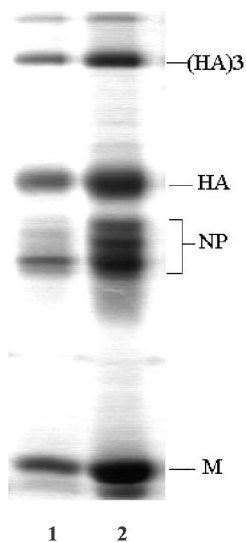


Рис. 2. Белковый спектр мутантов, индуцированных мутагенным воздействием на фрагмент РНП 3: 1 - белки мутанта Π_{N7} ; 2 - белки вируса А/FPV; электрофорез в не редуцирующих условиях (-МЭ)

воздействия на РНП 2, нас заинтересовали изменения чувствительности -S-S-связей белка НА к действию меркаптоэтанола (МЭ), как редуцирующего агента, у соответствующих мутантов. Для исследования был выбран мутант $I_{НГ6}$, полученный воздействием НГ, у которого белок НА характеризовался наиболее выраженными изменениями электрофоретических свойств (см. рис. 1,б).

Как известно, биологическая активность многих вирусов зависит от сохранности дисульфидных связей, определяющих нативную конформацию их белков. В этом отношении наружные гликопротеиды вируса гриппа отличаются тем, что они обогащены цистеиновыми остатками и имеют внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи. Так, наружные сегменты расщепленного, физиологически активного белка НА вируса А/FPV содержат 12 цистеиновых остатков и 6 дисульфидных связей, из которых 4 располагаются в большей субъединице, 1 – в малой и один мостик связывает обе субъединицы между собой. Поскольку перед нами стояла задача не только определения чувствительности -S-S- связей в белках к действию восстановителя, но и способности их к реформации, мы исключили из наших экспериментов влияние такого фактора как ацетилирование разрушенных -S-S-связей, с тем, чтобы не препятствовать реокислению SH-групп и реформации дисульфидных мостиков. Полученные данные представлены на рис. 3 и 4.

Как видно из рис. 3, у изучаемых вирусов под действием МЭ снижалась биологическая активность. При этом наблюдались различия в степени снижения инфекционной и гемагглютинирующей

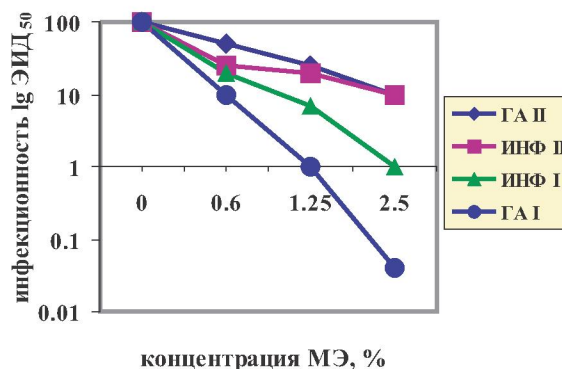


Рис. 3. Биологическая активность вирусов, обработанных меркаптоэтанолом: ИНФ I, ИНФ II – инфекционность нативного вируса (I) и мутанта $I_{НГ6}$ (II); GA I, GA II – гемагглютинирующая активность нативного вируса (I) и мутанта $I_{НГ6}$ (II)

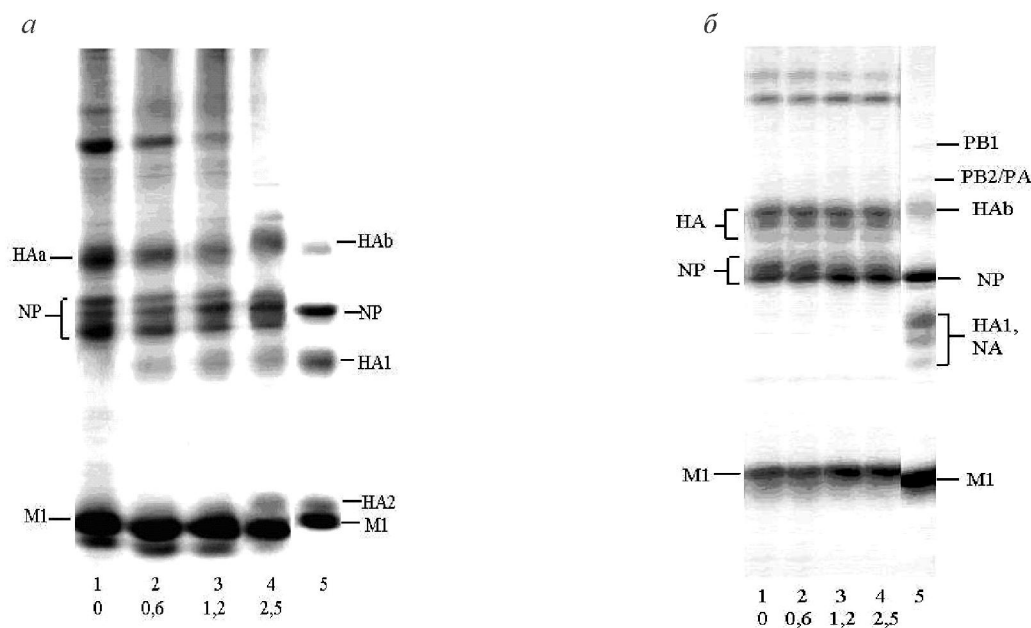


Рис. 4. Белковый состав вируса A/FPV и мутанта I_{N81} , обработанных меркаптоэтанолом: а – белки вируса A/FPV; б – белки мутанта I_{N81} ; 1-4 – МЭ обработаны нативные вирусы (A/FPV и мутант I_{N81}); концентрации МЭ (в %) указаны цифрами внизу рисунка; электрофорез в не редуцирующих условиях (-МЭ); 5 – белки вируса и мутанта I_{N81} солюбилизованные ДСН; электрофорез в редуцирующих условиях (+МЭ)

активности исходного и мутантного вирусов. У мутанта эти изменения коррелировали между собой, в то время как у исходного вируса снижение гемагглютинирующей активности опережало уровень снижения инфекционности.

Определенную ясность в понимание этих данных вносит изучение электрофоретических спектров вирусных белков (рис. 4). Обработка исходного вируса возрастающими концентрациями МЭ (от 0,6 до 2,5 %) привела к постепенному переходу HA из быстрой электрофоретической формы (HAa) в медленную (HAб), и к постепенному разрушению межцепочечного дисульфида с появлением большой и малой субъединиц – HA1 и HA2 при одновременном присутствии медленной электрофоретической формы. Это обстоятельство, по-видимому, связано с гетерогенностью популяции белка HA вируса A/FPV, которая проявляется в восстанавливающих условиях электрофореза (см. рис. 4,а; трек 5). Изучаемый мутант I_{N81} характеризовался несколько иными электрофоретическими свойствами. Все использованные концентрации МЭ (0,6-2,5%) не оказали влияния на подвижность и электрофоретические свойства белка HA, который в положении мономера обладал такой же гетерогенностью, как белок NP (см. рис. 4,б). Для

сравнения приведен спектр белков этого же мутанта, полученный в восстанавливающих условиях электрофореза, т.е. в присутствии МЭ после солюбилизации белков додецилсульфатом натрия (ДСН) (рис. 4,б, трек 5). Как видно, при действии МЭ белок HA представлен здесь несколькими электрофоретическими формами: обнаруживаются медленная форма HAб и три полосы под белком NP, мигрирующие с разной скоростью, причем две из них движутся быстрее, чем обычно HA1 и HA2. Можно предположить, что они представляют собой обе субъединицы гемагглютинина, HA1 и HA2. Это предположение подкрепляется отсутствием какого-либо материала в зоне геля, где обычно в восстанавливающих условиях электрофореза обнаруживается малая субъединица, HA2. Таким образом, по-видимому, мутационное повреждение белка HA в результате действия НГ коснулось изменения числа или положения цистеиновых остатков в молекуле HA, результатом чего могло быть образование -S-S-связи между субъединицами несколько проксимальнее на протяжении HA1. Можно думать о перемещении сайта расщепления между субъединицами HA1 и HA2 в результате изменения позиции остатка Arg326. Таким образом, изучаемый мутант оказался более

устойчивым к действию восстанавливающих факторов, чем исходный вирус. Полученные данные позволяют придти либо к выводу о большей экранированности -S-S-связей за счет более компактной третичной структуры белка НА, либо, что вероятнее, о приобретении более высокой способности к реформации за счет сближения цистеиновых остатков в молекуле белка НА вируса-мутанта. Эти данные могут быть интерпретированы также, исходя из механизма действия восстанавливающих реагентов, и установленной ранее [7, 8] дифференциальной чувствительности -S-S- связей в наружных гликопротеидах вируса гриппа.

Изучение чувствительности репродуцирующихся в культуре клеток различных мутантов вируса гриппа к действию радиации позволило выявить большую чувствительность мутантов, имеющих изменения в гене NP, по сравнению с мутантами по гену НА. При изучении влияния γ -радиации в различных дозах (10, 20 и 50 Гр) на биологические свойства мутантов I_{НГ6} и I_{Н81}, содержащих мутации в гене, кодирующем гемагглютинин (НА) не выявлено значительного отличия биологической активности от таковой контрольного вируса. Снижение инфекционности контрольного вируса и мутантов составляло 1,5 lg БОЕ/мл и 1,4-1,1 lg БОЕ/мл, соответственно, при облучении в дозе 50 Гр (рис. 5). Количество бляшек, образуемых облученными мутантами под агаровым покрытием, было примерно одинаковым при облучении в дозах 10 и 50 Гр, в

то же время отмечено значительное уменьшение их размеров при дозе 50 Гр, что может свидетельствовать о возникновении дополнительной мутации по (S⁻)-признаку. Это приводило к некоторому подавлению скорости репродукции, но, по видимому, не связано с нарушением процессов адсорбции и проникновения вирусных частиц.

Несколько иная картина наблюдалась при изучении действия радиации на биологическую активность мутанта IIN7, имеющего мутации по гену NP (рис. 5).

При облучении в дозах 10-50 Гр снижение инфекционности было более выражено, чем в контроле (2,2 lg БОЕ и 1,5 lg БОЕ, соответственно). Это наблюдение, свидетельствующее о более существенном снижении инфекционной активности при γ -облучении мутанта, имеющего повреждения в гене NP, подтверждает выводы, сделанные нами ранее. В наших исследованиях о роли отдельных генов в проявлении биологических свойств вируса гриппа была подчеркнута возможная главенствующая роль гена NP в патогенности [9].

Основываясь на полученных результатах, мы полагаем, что центральным (основным) геном, ответственным за кардинальный признак патогенности является ген NP, другие гены вируса гриппа выполняют вспомогательные функции, обеспечивающие патогенез вирусной инфекции в целом. Сложившаяся концепция о преобладающей роли белка гемагглютинина (НА) в проявлении патогенности и вирулентности основывается лишь на его функции, заключающейся в адсорбции и проникновении вируса. По нашему мнению, вирус с измененным (дефектным) геном NP не способен проявлять высокую патогенность, даже обладая высокой адсорбционной и проникающей способностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ташенова А.А., Исамбаева У.Ж., Едилова С.А., Ахметуллина Н.Б. Изучение биологических свойств мутантов вируса гриппа, индуцированных воздействием п-нитрозо-п-метилмочевинной на определенные гены // Вестник КазНУ. Сер. биологическая. 2004. Т. 23, № 2. С. 51-55.
2. Кабышева Н.П. Получение направленных мутаций у вируса гриппа. // Биотехнология. Теория и практика. 2009 (в печати).
3. Вирусология. Методы. М.: Мир, 1988. С. 33.
4. Luytjes W., Kristal M., Enami M. et al. Amplification, expression, and packaging of a foreign gene by influenza virus // Cell. 1989. V. 59. P. 1107-1113.

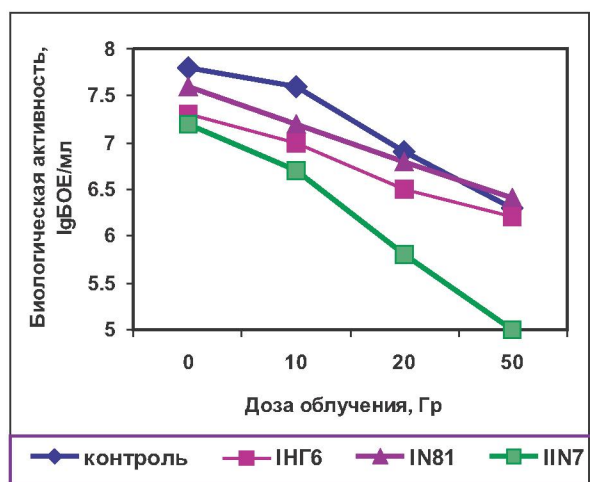


Рис. 5. Чувствительность к действию ионизирующей радиации мутантов вируса гриппа с повреждениями в генах, кодирующих белки НА и NP

5. *Palese P., Schulman J.L.* Differences in RNA patterns of influenza A viruses // *J. Virol.* 1976. V. 17. P. 876-884.

6. *Laemmli U.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680-685.

7. *Ташенова А.А., Селимова Л.М., Любовцева О.В., Зайдес В.М.* Биологические последствия разрывов и воссоединений дисульфидных связей в белках вируса гриппа // *Вопросы вирусологии.* 1986. №6. С. 666-674.

8. *Selimova L.M., Tashenova A.A., Zaides V.M.* Consolidation of intramolecular disulfide bonds as an element of intracellular maturation. *Virology.* 1990. V. 175. P. 131-138.

9. *Ташенова А.А., Кабышева Н.П., Ахматуллина Н.Б.* Проблема направленного мутагенеза и роль отдельных генов в патогенности вируса гриппа // *Конференция «Актуальные проблемы микробиологии»*, Алматы, 22-23 ноября 2007 г. С. 73-76.

Резюме

РНП-ның жеке фрагменттеріне химиялық мутагендермен әсер еткенде белгілі бір геннен тұратын грипп вирусының мутанттарының жинағы алынды. Алынған мутанттардың биологиялық және генетикалық қасиеттері зерттелді. Мутант және нативті вирустың редуциялайтын агенттерге гемагглютининнің дифференциалды сезімталдығы анықталды. Грипп вирусының патогенділігінде нуклеопротеид белок генінің ерекше ролі бар екендігі болжанады.

Summary

It was obtained collection of Influenza virus mutants by exposing chemical mutagens on separated RNP fragments containing some genes. It was studied biological and genetical properties of obtained mutants. It was revealed differential susceptibility of hemagglutinine of mutans and native virus to reducing agents. It is assumed preferred role of nucleoprotein gene in pathogenicity Influenza virus.