













Мутации в геноме вирусов гриппа птиц подтипов H1 и H5, ответственные за адаптацию к млекопитающим

Т. А. Тимофеева^{1#} , И. А. Руднева¹ , Н. Ф. Ломакина¹ , Е. Б. Тимофеева¹ ,
И. М. Куприянова¹ , А. В. Ляшко¹ , Д. Н. Щербинин¹ , А. А. Шилов¹ , М. М. Шмаров^{1,2} ,
Е. Л. Рязанова^{1,2} , Л. В. Мочалова³ , Б. И. Тимофеев¹ 

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098, Россия

²Первый Московский государственный университет им. И. М. Сеченова, Ломоносовский просп., 2/62, Москва, 101000, Россия

³Всероссийский институт научной и технической информации Российской академии наук, ул. Усиевича, 20, Москва, 125315, Россия

АННОТАЦИЯ

Вирусы гриппа птиц подтипов H1 и H5 участвовали в формировании высокопатогенных вариантов вирусов, вызвавших пандемии и панзоотии в XX–XXI веках. С целью оценки зоонозного потенциала вирусов этих подтипов, выделенных от диких уток в черте Москвы, была проведена адаптация вирусов к размножению в легких мышей, изучены их фенотипические свойства и идентифицированы генетические изменения, возникшие при адаптации. Изначально апатогенные для мышей вирусы A/duck/Moscow/4970/2013 (H1N1) и A/duck/Moscow/4182-C/2010 (H5N3) после 7–10 пассажей через легкие мышей изменили фенотип на патогенный. Полногеномное секвенирование выявило в адаптированных к мышам вирусах 2 аминокислотные замены в вирусе гриппа H1N1 (Glu627Lys в белке PB2 и Asp35Asn в гемагглютинине (HA) — нумерация по H3) и 6 мутаций в белках вируса H5N3 (Glu627Lys в PB2, Val113Ala в PB1, Ser82Pro в PB1-F2, Lys52Arg в HA2, Arg65Lys в NP и Ser59Ile в NA). Возрастание вирулентности для мышей, скорее всего, обусловлено общей для обоих вирусов заменой – Glu627Lys в белке PB2. Замена Asp35Asn в HA адаптированного к мышам вируса гриппа H1N1 ассоциирована с возрастанием значения рН конформационного перехода HA с 5.0 до 5.5 относительно HA дикого вируса. Обнаруженные в адаптированном варианте H5N3 мутации в белках HA, NA и PB1-F2 — уникальные. Мутации Glu627Lys в PB2, Arg65Lys в NP и Val113Ala в PB1, скорее всего, носят адаптационный характер.

Ключевые слова: вирус гриппа А, гемагглютинин H1, гемагглютинин H5, адаптация к млекопитающим, адаптационные мутации, вирулентность, изменение фенотипа, межвидовая смена хозяина, стабильность гемагглютинина

Получена: 11 октября 2021

Принята к печати: 3 ноября 2021

Опубликована: 21 декабря 2021

#Для корреспонденции: Тимофеева Татьяна Анатольевна, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098, Россия, e-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru

Цитирование: Тимофеева ТА, Руднева ИА, Ломакина НФ, Тимофеева ЕБ, Куприянова ИМ, Ляшко АВ, Щербинин ДН, Шилов АА, Шмаров ММ, Рязанова ЕЛ, Мочалова ЛВ, Тимофеев БИ. Мутации в геноме вируса гриппа птиц подтипов H1 и H5, ответственные за адаптацию к млекопитающим. MIR J 2021; 8(1), 50–61. doi: 10.18527/2500-2236-2021-8-1-50-61.













Авторские права: © 2021 Тимофеева и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.



Благодарности: Авторы глубоко признательны доктору биологических наук А. С. Гамбарян (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН) за любезно предоставленные вирусы и консультативную помощь.

Конфликт интересов: Авторы не преследуют коммерческих или финансовых интересов.

Mutations in the genome of avian influenza viruses of the H1 and H5 subtypes responsible for adaptation to mammals

T. A. Timofeeva^{1*} , I. A. Rudneva¹ , N. F. Lomakina¹ , E. B. Timofeeva¹ , I. M. Kupriyanova¹ ,
A. V. Lyashko¹ , D. N. Shcherbinin¹ , A. A. Shilov¹ , M. M. Shmarov^{1,2} , E. L. Ryazanova^{1,2} ,
L. V. Mochalova³ , B. I. Timofeev¹ 

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N. F. Gamaleya, 18 Gamaleya St., 123098, Moscow, Russia

²I. M. Sechenov First Moscow State University, 2/62 Lomonosov Pr., Moscow, 101000, Russia

³All-Russian Institute for Scientific and Technical Information of the Russian Academy of Sciences, 20 Usievicha Str., Moscow, 125315, Russia

ABSTRACT

Avian influenza viruses of H1 and H5 subtypes were involved in the formation of highly pathogenic viruses that caused pandemics and panzootics in the 20th–21st centuries. In order to assess the zoonotic potential of viruses of these subtypes, two viruses of H1N1 and H5N3 have been isolated from wild ducks in Moscow and adapted to growth in mouse lungs. Their phenotypic properties were studied, and the genetic changes that occurred during adaptation were identified. The original A/duck/Moscow/4970/2013 (H1N1) and A/duck/Moscow/4182-C/2010 (H5N3) viruses were apathogenic for mice but became pathogenic after 7–10 passages in mouse lungs. Complete genome sequencing revealed 2 amino acid substitutions in the proteins of the H1N1 mouse-adapted variant (Glu627Lys in PB2 and Asp35Asn in hemagglutinin (HA) – numbering according to H3) and 6 mutations in the proteins of H5N3 virus (Glu627Lys in PB2, Val113Ala in PB1, Ser82Pro in PB1-F2, Lys52Arg in HA2, Arg65Lys in NP, and Ser59Ile in NA). The increase in virulence is most likely due to a common substitution in the protein PB2 Glu627Lys as revealed in both viruses. The replacement of Asp35Asn in HA of the mouse-adapted H1N1 virus is associated with an increase in the pI value of the HA transition from 5.0 for 5.5 in comparison to the HA of parent virus. The found mutations in HA, NA, and PB1-F2 proteins of the adapted H5N3 variant are unique. The mutations Glu627Lys in PB2, Arg65Lys in NP, and Val113Ala in PB1 are most likely host adaptive.

Keywords: influenza A virus, H1 hemagglutinin, H5 hemagglutinin, adaptation to mammals, adaptive mutations, virulence, phenotype change, host range change, hemagglutinin stability

Received: October 11, 2021

Accepted: November 3, 2021

Published: December 21, 2021

***For correspondence:** Tatyana Timofeeva, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N. F. Gamaleya 18 Gamaleya St., 123098, Moscow, Russia, e-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru

Citation: Timofeeva TA, Rudneva IA, Lomakina NF, Timofeeva EB, Kupriyanova IA, Lyashko AV, Shcherbinin DN, Shilov AA, Shmarov MM, Ryazanova EL, Mochalova LV, Timofeev BI. Mutations in the genome of avian influenza viruses of the H1 and H5 subtypes responsible for adaptation to mammals. *MIR J* 2021; 8(1), 50–61. doi: 10.18527/2500-2236-2021-8-1-50-61.

Copyright: © 2021 Timofeeva et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the material is not used for commercial purposes, provided that the original author and source are cited.



Acknowledgements: The authors are deeply grateful to Dr. A. Gambaryan, (Chumakov Federal Scientific Center for the Research and Development of Immune and Biological Products) for the provided viruses and scientific consultation.

Conflict of interest: Authors have no commercial or financial interests.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа птиц, как правило, бессимптомно присутствуют в природных первичных хозяевах, к которым относятся дикие птицы околотовного комплекса отрядов Гусеобразные (*Anseriformes*) и Ржанковые (*Charadriiformes*). Спорадически с разной степенью клинических проявлений они инфицируют другие виды диких и домашних птиц. Продолжительная циркуляция некоторых подтипов вируса

(H5 и H7) среди курообразных сопровождается накоплением мутаций, способствующих возрастанию вирулентности и возникновению высокопатогенных штаммов [1, 2]. Повышенное внимание к вирусам гриппа птиц, которые иногда пересекают межвидовой барьер и инфицируют людей и других млекопитающих, вызвано тем, что они представляют угрозу возникновения новых штаммов с зоонозным и пандемическим потенциалом.

Крупные эпидемии и пандемии гриппа в XX–XXI веках не обошлись без участия вирусов «птичьего» происхождения, сегменты которых вошли в состав генома патогенных для людей штаммов [3–5]. Полагают, что геном вируса гриппа подтипа H1N1, вызвавший в 1918 году опустошительную пандемию под названием «испанка», полностью состоял из генов вирусов гриппа «птичьего» происхождения [6, 7]. Альтернативная гипотеза предполагает, что пандемический вирус мог также возникнуть в результате реассортации между вирусами гриппа птиц и циркулировавшими за несколько лет до пандемии вирусами гриппа свиней и человека, а не вследствие непосредственного перехода вируса от птиц к людям [8]. В любом случае, отдельные гены вируса 1918 года до сих пор присутствуют в генофонде вирусов гриппа [9].

Высоковирулентные вирусы гриппа подтипа H5 неоднократно эволюционировали из низковирулентных предшественников, бессимптомно циркулировавших среди домашней птицы, и периодически становились виновниками опустошительных эпизоотий [1, 2]. Существующие ныне высоковирулентные вирусы подтипа H5 появились на Евразийском континенте в конце 1990-х годов и принадлежат линии, берущей начало от вируса подтипа H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 (GsGd). Позднее они были занесены перелетными птицами в Африку и на Американский континент. В некоторых районах они стали эндемичными. В результате реассортации высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 с низкопатогенными возникли новые варианты вирусов подтипов H5Nx высокопатогенного вируса гриппа, которые несут ген, кодирующий гемагглютинин (HA) линии GsGd (H5N2, H5N3, H5N4, H5N5, H5N6, H5N8). Некоторые из этих вирусов оказались зоонозными для людей (H5N1, H5N8, H5N6) [10]. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения, в феврале 2021 г в назофарингеальных образцах семи сотрудников, работавших во время вспышки птичьего гриппа на птицеферме в Астраханской области Российской Федерации, был обнаружен вирус гриппа H5N8 [11].

На водоемах Москвы обитает много диких уток, которые контактируют с людьми и животными. За период с 2006 по 2019 гг. в этих местах от крякв были выделены вирусы гриппа разных подтипов, в том числе H1 и H5 [12]. Цель настоящего исследования состоит в изучении вероятности перехода вирусов гриппа диких уток подтипов H1 и H5 к млекопитающим. Для этого мы адаптировали вирусы гриппа птиц подтипов H1 и H5 к размножению в легких мышей, изучили их фенотипические свойства и идентифицировали генетические изменения, возникшие при адаптации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы

Вирусы гриппа птиц A/duck/Moscow/4970/2013 (H1N1) и A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3) были любезно предоставлены д.б.н. А.С. Гамбарян (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Россия). Вирус A/duck/Moscow/4182-C/2010 (H5N3) был получен в результате однократного клонирования вируса A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3) в куриных эмбрионах методом предельных разведений. Вирусы A/duck/Moscow/4970/2013 (H1N1), A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3) (4182/H5) и A/duck/Moscow/4182-C/2010 (H5N3) (4182C/H5) депонированы в Государственную коллекцию вирусов Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (подразделение «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», Россия) под №№ 2848, 2849 и 2847 соответственно.

Адаптация вирусов к размножению в легких мышей

Группы беспородных мышей заражали интраназально вирусосодержащей аллантаической жидкостью, содержащей вирус 4970/H1 или 4182C/H5. Через 48 ч мышей усыпляли передозировкой диэтилового эфира. Легкие двух мышей гомогенизировали в 1.5 мл среды гидролизата лактальбумина без глутамина («ПанЭко», Россия). Легочную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 850 g, и супернатант использовали для следующего интраназального заражения мышей, а также для постановки реакции гемагглютинации (РГА) с целью определения титра вируса в легких. После последовательных 9 пассажей вируса 4970/H1 и 10 пассажей вируса 4182C/H5 в легких мышей вирусы однократно клонировали в куриных эмбрионах методом предельных разведений для получения однородной вирусной популяции.

Исследования выполнены согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003).

Постановка РГА

К серии двукратных разведений вирусосодержащей жидкости в буферном растворе (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.2) добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов. Реакцию проводили в круглодонных планшетах. Смесь вируса гриппа и эритроцитов инкубировали при 4°C в течение 20–30 мин. Титром вируса считали обратную величину последнего разведения, в котором наблюдалась агглютинация

эритроцитов, и выражали в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ) [13].

Определение инфекционности вирусов гриппа на куриных эмбрионах

Для определения 50%-й эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀) вируса 10-дневные куриные эмбрионы заражали 10-кратными серийными разведениями вируса (в объеме 100 мкл) в аллантоисную полость – по 5 эмбрионов на разведение. Через 48 ч инкубации при 37°C зараженные куриные эмбрионы охлаждали в течение ночи при 4°C, после чего в аллантоисной жидкости каждого эмбриона оценивали наличие вируса в РГА с 1%-й суспензией куриных эритроцитов. Значение ЭИД₅₀ вычисляли методом Рида и Менча (Reed & Muench) [14]. Титр вируса выражали в lgЭИД₅₀.

Определение 50%-ной летальной дозы (ЛД₅₀) вируса гриппа для мышей

Определение 50%-й летальной дозы (ЛД₅₀) вируса гриппа для мышей проводили на мышах линии BALB/c, которых заражали интраназально под легким эфирным наркозом вирусосодержащей жидкостью (по 80 мкл на мышь) в разных разведениях. Для каждого разведения использовали 6 животных.

В течение 14 суток оценивали изменение массы тела и выживаемость животных. Значение ЛД₅₀ вычисляли методом Кербера в редакции Ашмарина [15]. Вирулентность вирусов выражали как lgЭИД₅₀ в единице ЛД₅₀.

Секвенирование генома методом Сэнгера

Вирусную РНК выделяли из аллантоисной жидкости инфицированных куриных эмбрионов с использованием коммерческого набора QIAamp Viral RNA mini kit («Qiagen», Германия) согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили при 42°C в течение 1 ч в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 8 мкл РНК, 1 мкл праймера uni12 с концентрацией 50 нг/мкл (13.5 нМ), 10 мкл воды, 1 мкл 10 мМ dNTP, 5 мкл 5x буфера и 100 ед. MMLV (ООО «Альфа Фермент», Москва). Полученную кДНК использовали в ПЦР со специфическими концевыми праймерами для синтеза полноразмерных сегментов генома [16]. Амплифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1.0–1.3% агарозном геле в присутствии бромистого этидия и элюировали из геля набором Diatom DNA Elution (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Секвенирование проводили с концевыми или внутренними праймерами [17] с использованием набора BrightDye™ Terminator

Cycle Sequencing Kit v3.1 (NimaGen, Нидерланды) с последующим анализом на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Для сборки и анализа нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ DNASTAR Sequence Analysis Software Package (DNASTAR Inc., США).

Нуклеотидные последовательности полного генома вирусов 4970/H1 (MW897994–MW897999, MF969258, MF969259) и 4970MA/H1 (MW898002–MW898009) депонированы в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) под указанными номерами. Для всех сегментов вирусов 4182C/H5 и 4182C–MA/H5 нумерация дана по штамму дикого типа 4182/H5. Последовательности 8 генных сегментов вируса 4182/H5 депонированы в GenBank под номерами KF885672–KF885679.

Анализ термостабильности HA вируса гриппа

Осветленную низкоскоростным центрифугированием вирусосодержащую аллантоисную жидкость разводили фосфатным буферным раствором (PBS) до 128 ГАЕ и разливали по 120 мкл в тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0.5 мл (SSI, США), которые инкубировали в термоциклере Master-cycler Gradient 5331 (Eppendorf, Германия) при разных температурах в диапазоне от 50°C до 70°C в течение 40 мин, после чего немедленно переносили в лед. Контрольные пробы хранили 40 мин при температуре 0°C. По истечении инкубации титр вируса в каждом образце определяли в РГА.

Определение рецепторсвязывающей активности вирусов

Определение рецепторсвязывающей активности вирусов проводили с синтетическими аналогами клеточных рецепторов, представляющих сиалоолигосахариды, конъюгированные с высокомолекулярным полиакриламидом [18]. Использовали следующий набор сиалоолигосахаридов: Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ (3'SL), Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ (3'SLN), Neu5Acα2-3Galβ1-4(6-O-su)GlcNAcβ (6-su-3'SLN), Neu5Acα2-6Galβ1-4Glcβ (6'SL), Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ (6'SLN), Neu5Acα2-6Galβ1-4(6-O-su)GlcNAcβ (6-su-6'SLN). Рецепторсвязывающую активность вирусов оценивали методом ингибирования HA активности вирусов сиалогликоконъюатами [19, 20]. К последовательным двукратным разведениям сиалогликоконъюатов добавляли равные объемы вирусосодержащей аллантоисной жидкости, разведенной до 4 ГАЕ в буфере 0.01 М трис-HCl (pH 7.2), содержащем

0.15 М NaCl и 10 мкМ ингибитора нейраминидазы (2,3-дидегидро-2,4-дидезокси-4-амино-N-ацетил-D-нейраминовая кислота; Sigma, США), и инкубировали в течение 30 мин при 4°C, после чего добавляли в каждую лунку такой же объем 0.5% суспензии куриных эритроцитов и выдерживали 45 мин при 4°C. Реакцию проводили в 96-луночных круглодонных планшетах. Результат оценивали по максимальному разведению сиалогликоконъюгата, при котором еще наблюдалось торможение гемагглютинации, и выражали как концентрацию (мкМ) сиаловой кислоты в этом разведении.

Определение рН конформационного перехода НА методом гемолиза эритроцитов

Осветленную низкоскоростным центрифугированием вирусосодержащую аллантоисную жидкость разводили PBS до 128 ГАЕ. К 250 мкл полученного вирусного образца добавляли по 50 мкл 2.5% куриных эритроцитов, разведенных в том же буфере, и инкубировали, периодически встряхивая, при 4°C в течение 1 ч. Эритроциты с адсорбированным на них вирусом центрифугировали при 2800 об/мин в течение 1 мин при 4°C, после чего супернатант осторожно удаляли, а к осадку добавляли 250 мкл 0.1 М MES-буфера с рН в интервале от 5.0 до 7.0 и инкубировали, периодически встряхивая, в течение 1 ч при 37°C. Положительным контролем служил осадок эритроцитов без вируса с добавлением 0.5% Tween-20 в PBS, а отрицательным – осадок эритроцитов без вируса с добавлением 250 мкл MES (рН 7.0). После инкубации пробы центрифугировали 1 мин при 2800 об/мин, отбирали 170 мкл супернатанта и переносили в плоскодонный 96-луночный планшет для измерения оптической плотности при длине волны 415 нм на приборе iMark Microplate Reader (BioRad, США). По результатам измерения строили график, по которому определяли значение рН конформационного перехода НА [21].

Анализ моделей конформационного изменения НА термодинамическими и молекулярно-динамическими методами

Данные банка третичных структур белков (PDB; <https://www.rcsb.org/>) для НА вируса гриппа дикой утки A/WDK/JX/12416/2005 (H1N1) (PDB ID: 3HTO) были использованы для расчета методами молекулярной динамики с помощью пакета программ GROMACS [22]. Для исследования кислотно-щелочных свойств модели белка использовали программу PROPKA, версия 3.4.0 [23]. Для оценки потенциалов взаимодействий использовали модель AMBER [24].

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью параметрического t-теста Стьюдента (рН конформационного перехода НА, стабильность НА) и непараметрических критериев Фридмана (ANOVA) и Манна–Уитни (титр вирусов) при критическом уровне значимости $p < 0.05$. Для проведения соответствующих расчетов использовали программы MS Office Excel 2016 и Statistica 8.0. Полученные результаты представлены как среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение (Mean \pm SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Адаптация вирусов к росту в легких мышей

Адаптацию вирусов гриппа птиц 4970/H1 и 4182C/H5 к размножению в легких мышей проводили путем многократного последовательного пассирования. При таком экспериментальном подходе происходит селекция варианта, способного более активно размножаться в легочной ткани лабораторных мышей, вследствие чего после серии пассажей вирус вызывает у животных летальную легочную инфекцию. После 9 пассажей вируса 4970/H1 и 10 пассажей вируса 4182C/H5 в легких мышей с последующим однократным клонированием в куриных эмбрионах были получены адаптированные варианты A/duck/Moscow/4970-MA/2013 (H1N1) (4970MA/H1) и A/duck/Moscow/4182-C-MA/2010 (H5N3) (4182C-MA/H5), соответственно, и депонированы в Государственную коллекцию вирусов Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (подразделение «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», Россия) под № 2921 и № 2922 соответственно. При адаптации к мышам возросла вирулентность вирусов H1 и H5, при этом вирус 4970MA/H1 оказался более вирулентным, чем 4182C-MA/H5 (Таблица 1). Исходный вирус 4182C/H5 рос в куриных эмбрионах до титра 8.9 lgЭИД₅₀ и не обладал патогенными свойствами для мышей. На 7-м пассаже в легких мышей наблюдали характерные признаки инфекции. После 10-го пассажа заражение вирусом в дозе 5.3 lgЭИД₅₀ приводило к гибели 50% особей. Исходный вирус 4970/H1 также не вызывал гибели мышей. После 9 пассажей через легкие наблюдали 50%-ю гибель мышей при интраназальном заражении вирусом в дозе 3.9 lgЭИД₅₀.

рН конформационного перехода НА

Методом гемолиза эритроцитов в присутствии вируса при разных значениях рН определили, что значение рН конформационного перехода НА адаптированного

Таблица 1. Фенотипические свойства исходных 4970/Н1 (H1N1) и 4182С/Н5 (H5N3) вирусов и адаптированных к размножению в легких мышей вариантов

Вирусы	Сокращенное название	pH перехода ^a	Вирулентность для мышей, lgЭИД ₅₀ ^b	Температура инактивации НА, °С
A/duck/Moscow/4970/2013 (H1N1)	4970/Н1	5.0±0.2	> 7.5±0.2	57.5±0.2
A/duck/Moscow/4970-МА/2013 (H1N1)	4970МА/Н1	5.5±0.2	3.9±0.2	57.5±0.2
A/duck/Moscow/4182-С/2010 (H5N3)	4182С/Н5	5.5±0.2	> 8.9±0.2	60.1±0.2
A/duck/Moscow/4182-С-МА/2010 (H5N3)	4182С-МА/Н5	5.5±0.2	5.3±0.2	60.1±0.2

^aЗначения pH конформационного перехода НА представлены как Mean±SD по данным трех независимых экспериментов.

^bВирулентность для мышей представлена как lgЭИД₅₀ в единице ЛД₅₀. Меньшее значение соответствует большей вирулентности.

варианта 4970МА/Н1 возросло на 0.5 единиц по сравнению с исходным вирусом 4970/Н1 (5.5 против 5.0), что характерно для вирусов с повышенной вирулентностью для птиц и мышей [25]. Для вирусов подтипа Н5 (4182 С/Н5 и 4182 С-МА/Н5) значение pH конформационного перехода НА (5.5) не изменилось (Таблица 1).

Термостабильность НА вирусов гриппа

При анализе термостабильности НА обнаружено различие в температуре инактивации НА между вирусами разных подтипов: 57.5°С для вирусов гриппа подтипа Н1 и 60.1°С для вирусов подтипа Н5 (Рис. 1).

Следует заметить, что в пределах одного подтипа термостабильность адаптированных вариантов не отличалась статистически достоверно ($p > 0.5$, Стьюдент т тест) от таковой родительского вируса (Таблица 1).

Рецепторная специфичность вирусов гриппа

Рецепторную специфичность вирусов оценивали по взаимодействию с синтетическими аналогами клеточных сиалированных углеводных цепей – олигосахаридами, терминированными звеньями Neu5Acα2-3Gal (3`SL, 3`SLN и 6-Su-3`SLN), характерными для рецепторов вирусов гриппа птиц и поэтому получившими название рецепторов «птичьего» типа, или Neu5Acα2-6Gal (6`SL, 6`SLN и 6-Su-6`SLN), характерными для рецепторов вирусов гриппа человека (рецепторы «человеческого» типа). Все изученные нами вирусы проявляли высокое и приблизительно одинаковое сродство к аналогам клеточных рецепторов «птичьего» типа: 3`SL, 3`SLN и 6-Su-3`SLN (Таблица 2). Ни один из вариантов вирусов гриппа подтипов Н5 и Н1 не взаимодействовал с аналогами клеточных рецепторов «человеческого» типа (6`SL, 6`SLN, 6-Su-6`SLN). Таким образом, все исследованные штаммы Н1 и Н5 подтипов, включая исходные авирулентные для мышей и вирулентные, полученные путем адаптации вирусов к росту в легких мышей, проявили сродство только к аналогам клеточных рецепторов «птичьего» типа – углеводным цепям, терминированным Neu5Acα2-3Gal-звеньями (Таблица 2).

Секвенирование генома исходных и адаптированных вариантов вирусов

Чтобы установить причины фенотипических изменений при адаптации вирусов диких уток к мышам, мы провели полногеномное секвенирование исходных и адаптированных вариантов вирусов. Вариант 4182С/Н5 отличался от вируса дикого типа 4182/Н5 только двумя аминокислотными заменами в НА: Ala188/200Glu и Asp264/277Asn (нумерация по зрелому белку Н3/нумерация по Н5). Эти замены остались неизменными в адаптированном к мышам варианте. Кроме того в адаптированном варианте 4182С-МА/Н5 обнаружены мутации в шести вирусных белках: две в поверхностных гликопротеинах – одна в НА (субъединица НА2, Lys52Arg) и одна в нейраминидазе (NA, Ser59Ile), одна в неструктурном белке PB1-F2 (Ser82Pro), остальные – во внутренних белках PB2 (Glu627Lys), PB1(Val113Ala) и нуклеопротеине (NP, Arg65Lys).

В вирусе гриппа подтипа Н1 в процессе адаптации к мышам (4970МА/Н1) аминокислотные замены появились только в двух белках: НА1 (Asp35/52Asn) (в нумерации Н3/Н1; Таблица 3) и PB2 (Glu627Lys).

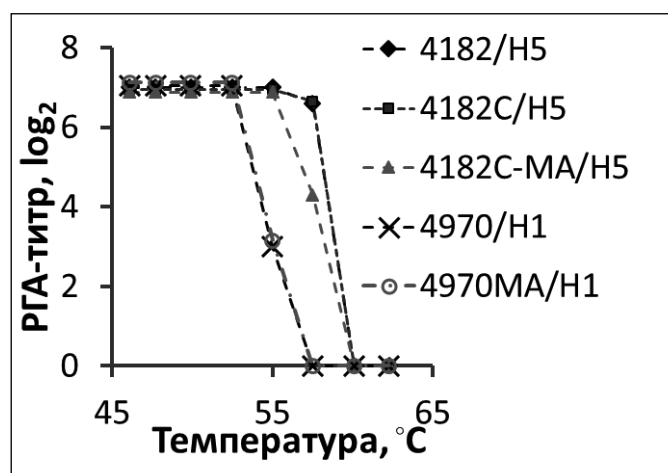


Рис. 1. Термостабильность НА исследуемых вариантов вирусов гриппа 4970/Н1 (H1N1) и 4182С/Н5 (H5N3). По оси ординат указан титр вируса после 40 мин инкубации при температурах, указанных на оси абсцисс.

Таблица 2. Сродство вирусов 4970/Н1 (Н1N1) и 4182С/Н5 (Н5N3) и адаптированных к мышам вариантов к аналогам клеточных рецепторов птиц и человека

Вирусы	Сиалогликоконъюгаты ([Neu5Ac], мкМ) ^а					
	Аналог рецепторов птиц			Аналог рецепторов человека		
	3'SL	3'SLN	6-Su-3'SLN	6'SL	6'SLN	6-Su-6'SLN
4970/Н1	0.25	0.125	0.25	> 4	> 4	> 4
4970МА/Н1	0.25	0.25	0.25	> 4	> 4	> 4
4182С/Н5	0.25	0.063	0.5	> 4	> 4	> 4
4182С-МА/Н5	0.25	0.125	0.25	> 4	> 4	> 4

^аКонцентрация в пересчете на сиаловую кислоту (N-ацетилнейраминовую кислоту), по данным одного из трех типичных экспериментов. Меньшее значение концентрации соответствует большему сродству вируса к сиалозиду.

Таблица 3. Мутации в вирусах гриппа 4970/Н1 (Н1N1) и 4182С/Н5 (Н5N3), возникшие при адаптации к мышам, и их предполагаемая роль

Вирусы, белки	Аминокислотный остаток в составе		Локализация (функция)	Ссылки
	Подтип Н1N1	4970 ^а		
PB2	627Glu	627Lys	Домен 627 (возможный контакт с клеточными факторами хозяина, специфичность относительно вида хозяина, детерминанта патогенности)	[26] [27] [28]
HA1	35Asp ^b	35Asn ^b	Стеблевой участок HA (конформационное изменение HA, проникновение вируса в клетку)	[29]
Подтип Н5N3	4182С ^а	4182С-МА ^а		
PB2	627Glu	627Lys	См. выше	[26–28]
PB1	113Val	113Ala	Вне активного центра (транскрипция и репликация, точная роль участка 15–187 неизвестна)	[30, 31]
PB1-F2	82Ser	82Pro	Неструктурный белок (индуцирует апоптоз в зависимости от типа клеток, возможно модулирует активность полимеразы PB1; специфичность относительно штамма вируса, вида хозяина и типа клеток)	[32]
HA2	51Lys	51Arg	Стеблевая часть HA (высококонсервативный участок, конформационное изменение HA, проникновение вируса в клетку)	[25, 33, 34]
NP	65Arg	65Lys	1–77 – область связывания с РНК 1–161 – домен взаимодействия с PB2	[35] [36]
NA	59Ser	59Ile	Стеблевой участок	[37]

^аПриведены обозначения вирусов согласно Таблице 1.

^бНумерация HA по подтипу Н3: позиция 35 соответствует позиции 52 в HA подтипа Н1.

На основании сопоставления результатов секвенирования HA вирусов гриппа подтипа Н1 с полученными значениями рН конформационного перехода HA можно предположить, что изменение последнего вызвано заменой Asp35/52Asn в цепи HA1. Чтобы подтвердить это предположение, мы провели дополнительное исследование с использованием термодинамических и молекулярно-динамических методов.

Анализ моделей конформационного изменения HA термодинамическими и молекулярно-динамическими методами

В соответствии с современными представлениями [25, 34, 38], конформационный переход HA обусловлен изменениями в пространственном расположении электрических зарядов в зависимости от рН среды. Так, закисление среды приводит к протонизации основных аминокислот (Lys, Arg, His)

и нейтрализации отрицательного заряда кислых аминокислотных кислот (Asp, Glu), вследствие чего меняется конформация белка.

Математическая оценка влияния мутации Asp35/52Asn в цепи HA1 на рН конформационного перехода HA выполнена на трехмерной модели HA вируса гриппа дикой утки A/WDK/JX/12416/2005 (Н1N1) (PDB ID: 3НТО), который наиболее близок по первичной структуре штамму 4970/Н1. Вирусы различаются по 12 аминокислотным остаткам, которые расположены вне интересующего нас N-концевого участка цепи HA1 (позиции 1–52/1–59). Мутация Asp35/52Asn, появившаяся в адаптированном вирусе 4970МА/Н1, была внесена в модельную молекулу (3НТО/52N) путем замены атома кислорода на атом азота с последующей коррекцией длины связи C–N.

В модели (PDB, 3НТО) отсутствуют 62 аминокислоты на C-конце субъединицы HA2, соответствующие

трансмембранному домену, но логично предположить, что этот фрагмент не влияет на способность белка изменять конформацию при низком значении рН, так как он недоступен для растворителя и, следовательно, не подвержен протонированию.

Следует отметить, что в оригинальном файле кристаллической структуры (PDB, ЗНТО) представлен один мономер НА, состоящий из субъединиц НА1 и НА2, а модель тримера получена математически – путем добавления двух копий мономера, повернутых на $+120^\circ$ и -120° относительно оси тримера, и, следовательно, не полностью соответствует структуре тримера в растворе. Чтобы приблизить математические модели тримера ЗНТО и мутанта ЗНТО/52Asn к наиболее вероятной конформационной форме в естественных условиях, методами молекулярной динамики [22] мы минимизировали энергию моделей в водном растворе 0.15 М NaCl при рН 5.0. Так были получены модели НА в условиях, близких к физиологическим.

В программе PROPKA рассчитан заряд тримеров НА при разных значениях рН (Таблица 4). Из Таблицы 4 видно, что, несмотря на формальное увеличение электростатического заряда НА мутанта на +3 *e* в результате замены Asp52Asn, его заряд при рН 5.0 равен +49.93 *e*, что заметно больше, чем заряд исходного белка, равный +24.51 *e*. Логично предположить, что конформационный переход НА индуцируется электростатическим отталкиванием, возрастающим по мере увеличения заряда при закислении среды, поэтому ионизация мутантного НА/52Asn до заряда, сравнимого с зарядом исходного НА/52Asp, наступает при более высоком (около 6.0) рН. Таким образом, рН конформационного перехода НА адаптированного к мышам варианта сдвинут в область более высоких значений относительно рН родительского вируса. Эти расчеты согласуются с экспериментальными данными, полученными для вирусов 4970/Н1 и 4970МА/Н1 методом гемолиза эритроцитов (Таблица 1). Значения рН конформационного перехода НА составили 5.0 и 5.5 соответственно. Мутация Asp52Asn в НА вируса 4970МА/Н1 привела к сдвигу рН конформационного перехода НА на 0.5 единиц.

ОБСУЖДЕНИЕ

Два вируса гриппа подтипов Н1Н1 и Н5Н3, выделенные от диких уток, не обладали патогенными для мышей свойствами, но приобрели их после 7–10 серийных пассажей через легкие мышей. В вирусе подтипа Н1Н1 в результате адаптации мутации появились в двух белках: НА (субъединица НА1, Asp35/52Asn)

Таблица 4. Влияние мутации Asp52Asn в НА вируса гриппа A/WDK/JX/12416/2005 (H1N1) (PDB, ЗНТО) на изменение заряда молекулы НА при разных значениях рН

рН	Заряд молекулы, <i>e</i> ^a	
	НА/52Asp	НА/52Asn
0.00	140.69	179.67
1.00	138.63	177.75
2.00	128.96	167.82
3.00	99.74	134.90
4.00	55.98	87.96
5.00	24.51	49.93
6.00	13.32	27.80
7.00	9.33	14.87
8.00	3.96	7.02
9.00	-6.12	-3.05
10.00	-36.84	-33.86
11.00	-86.00	-83.64
12.00	-128.94	-126.40
13.00	-159.93	-157.64
14.00	-179.60	-177.16

^a*e* – элементарный заряд, соответствующий абсолютному значению заряда протона/электрона.

и PB2 (Glu627Lys). В вирусе подтипа Н5Н3 мутации были выявлены в шести вирусных белках: НА (субъединица НА2, Lys52Arg), NA (Ser59Ile), PB2 (Glu627Lys), PB1 (Val113Ala), PB1-F2 (Ser82Pro) и NP (Arg65Lys). К изменению вирулентности могут привести мутации в любых вирусных белках, если они затрагивают функционально важные участки и сайты взаимодействия вирусных белков как между собой, так и с вирусной РНК и клеточными компонентами хозяина.

Поверхностный гликопротеин НА обеспечивает связь вирусной частицы с клеточными рецепторами и проникновение вирусного генома в цитоплазму клетки. Запуск инфекционного процесса начинается в эндосоме клетки при закислении среды до рН (рН-перехода), при котором происходит необратимое изменение конформации НА (предварительно расщепленного клеточной протеазой на субъединицы НА1 и НА2), которое приводит к слиянию вирусной мембраны с клеточной мембраной внутри эндосомы, ее разрушению и выходу вирусного генома в цитоплазму. Значение рН-перехода НА варьирует в зависимости от подтипа вируса гриппа и круга его хозяев [25]. Структура сайта активации (протеолитического расщепления) НА, расположенного на границе субъединиц НА1 и НА2, считается основной детерминантой патогенности вирусов гриппа подтипа Н5 [33]. В исследованных нами вирусах 4970/Н1 и 4182/Н5 в процессе адаптации к мышам в молекуле НА не терпели изменений ни сайт протеолиза, ни область взаимодействия с рецептором. Адаптированные варианты вирусов сохранили присущую родительским

вирусам специфичность к клеточным рецепторам «птичьего» типа.

В адаптированном варианте 4182С–МА/Н5 обнаружена мутация Lys51Arg в субъединице НА2, которая находится вблизи пептида слияния, примыкающего N-концом к сайту протеолитического расщепления. Аминокислота Lys51 инвариантна во всех подтипах НА. Ионизируемые остатки вблизи пептида слияния могут быть важны для инициации конформационного изменения НА, которое приводит к слиянию мембран вириона и эндосомы на стадии проникновения вируса в клетку [25, 33, 34]. Появившаяся в НА вируса 4182С–МА/Н5 замена Lys51Arg не повлияла на значение рН конформационного перехода НА (Таблица 1), вероятно, вследствие того, что в данном случае положительно заряженный Lys заменен на положительно заряженный Arg.

Аминокислота в позиции 35/52 в субъединице НА1 вируса 4970/Н1 расположена в верхней части стеблевого участка НА на границе с глобулярным доменом НА, который находится с внешней стороны липидной оболочки вириона. По данным IRD (Influenza Research Database, <http://www.fludb.org>), в этой позиции наблюдается полиморфизм. Так, в вирусах гриппа птиц превалирует остаток Asp (95.3%), наличие Asn составляет 3.5%, а единичные изоляты содержат Gly или Ser. В вирусах гриппа человека и млекопитающих также преобладает Asp (88.5–99.5%), значительно меньшую долю составляет Asn (0.4–11.3%) и крайне редко присутствуют Glu, Gly, His, Ser, Thr, Tyr или Val. Заметим, что в период с 2009 года по настоящий момент в вирусах гриппа человека доля вирусов гриппа с Asn35 снизилась до 0.3%. Связь аминокислоты в позиции 35 с видовой принадлежностью хозяина кажется маловероятной. Однако замена Asp35/52Asn в НА1 вируса 4970 МА/Н1 приводит к изменению заряда в этой позиции (понижение отрицательного заряда). Учитывая, что это единственная замена в НА, логично предположить, что изменение значения рН конформационного перехода НА в адаптированном к мышам варианте по сравнению с родительским вирусом обусловлено именно этой мутацией.

Второй поверхностный гликопротеин НА представляет собой фермент сиалидазу, который отщепляет остатки нейраминовой кислоты с углеводных цепей на поверхности клеток. Считается, что при выходе вирусных частиц из клетки НА, разрушая рецепторы НА на поверхности клетки, облегчает отпочковывание вирионов. Позиция 59 расположена в стеблевой части НА, соединяющей трансмембранный домен на N-конце с 1-го по 29-й аминокислотный остаток (а.к. о.) и домен, называемый «головой»,

где находится каталитический центр фермента. Пространственная структура трансмембранного и стеблевого доменов пока не установлена [37]. Именно в этой области НА подтипа N1 высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 встречаются делеции разной длины (от 15 до 22 а.к. о.), которые ассоциированы с повышенной вирулентностью [39]. В позиции 59 преобладает аминокислотный остаток Ser (94.2%), крайне редко встречаются Asn (1.9%), Gly и Thr (0.8% и 0.4% соответственно). Идентифицированная нами мутация Ser59Ile, появившаяся в НА варианта 4182С–МА/Н5, уникальна.

Белок NP покрывает все 8 сегментов вирусного РНК-генома, образуя с ними рибонуклеопротеиды (РНП), в каждый из которых входят и белки полимеразного комплекса: PB2, PB1 и PA, – присутствие которых необходимо для репликации вирусной РНК. Мутация Arg65Lys в NP вируса 4182С–МА/Н5 расположена в N-концевой части молекулы – между двумя доменами, образующими бороздку, где происходит связывание РНК. Поверхность бороздки выстлана несколькими положительно заряженными остатками Arg, среди которых находится и Arg65. Эти остатки высококонсервативны в вирусах гриппа А, В и С [35]. Как ранее показано Li с соавторами [36], замена Arg65Ala в молекуле NP, то есть положительно заряженного аминокислотного остатка на нейтральный, существенно не влияла на ферментативную активность полимеразного комплекса. Обнаруженная нами замена Arg65Lys (обе положительно заряженные аминокислоты) в 4182С–МА/Н5, скорее всего, не влияет на характер взаимодействия NP с РНК. В результате проведенного скрининга по аминокислотному остатку в позиции 65 белка NP вирусов гриппа по базе данных IRD мы обнаружили, что во всех вирусах гриппа птиц, за редким исключением, это место занимает Arg. В вирусах гриппа человека подтипов H1, H2 и разных подтипов вирусов млекопитающих также в позиции 65 белка NP находится Arg. Заслуживают внимания вирусы гриппа человека подтипа H3N2, которые появились в 1968 году и до 1992 года имели только NP с Arg65. Замена Arg65Lys появилась в 1993 году и к 1997 году стала преобладать, а в последующие годы совсем вытеснила Arg в этой позиции. Около 20000 изолятов вируса гриппа содержат Lys65. Среди них вирусы гриппа человека исключительно подтипа H3N2, несколько изолятов того же подтипа от свиней и собак; небольшая группа вирусов H1N1 и H1N2, выделенных от людей и собак, а также 5 штаммов H7N7, выделенных от лошадей в 1956–1966 гг. Присутствие мутации Arg65Lys в вирусах H3N2 человека может быть не только связано с их

адаптацией к организму хозяина, но и обусловлено определенным сочетанием (сцепленностью) белков в вирусах этого подтипа. Таким образом, мутацию Arg65Lys в белке NP вируса гриппа можно считать условно адаптационной к млекопитающим.

Белки PB1, PB2 и PA образуют полимеразный комплекс вируса гриппа, выполняющий транскрипцию и репликацию вирусной РНК в ядре хозяйской клетки [26, 30]. В белке PB1 находится каталитический центр фермента полимеразы. Роль гомологичной замены Val113Ala в PB1 варианта 4182С–МА/Н5 не совсем понятна. Аминокислота в позиции 113 не входит в состав консервативных мотивов, формирующих активный центр фермента. На трехмерной структуре (PDB: 4WSB) она расположена в середине гетеротримера, где просматривается небольшая полость, экранируемая выступающими частями полимеразного комплекса. По данным IRD, в этой позиции наблюдается полиморфизм с преобладанием трех аминокислотных остатков: Val, Ile, Ala – и крайне редко встречаются Phe, Thr, Leu, Ser, Met. Соотношение доминирующих аминокислот (Val, Ile, Ala) в вирусах гриппа, выделенных от птиц, человека и свиньи за период с 1918 по 2021 гг., существенно различается в зависимости от вида хозяина. В вирусах гриппа птиц чаще встречается Val (72.4%), затем Ile (27.2%) и Ala (0.1%), в вирусах человека примерно в равной степени присутствуют две аминокислоты, из которых Ala (50.5%) ненамного превосходит Val (47.6%), а в вирусах свиней преобладает Ile (65.9%), Val (32.3%) встречается примерно в два раза реже, а Ala наблюдается лишь в 0.4%. Не исключено, что в адаптированном к мышам вирусе 4182С–МА/Н5 мутация Val113Ala связана с адаптацией к клеточным факторам нового хозяина, которые вирус использует на определенных этапах своего жизненного цикла.

Неструктурный белок PB1-F2 кодируется тем же сегментом, что и белок PB1, в результате сдвига рамки считывания на +1 нуклеотид. По данным разных авторов, PB1-F2 обладает плеiotропным действием: может (1) индуцировать апоптоз в зависимости от типа клеток, (2) стимулировать воспаление и (3) влиять на активность вирусной полимеразы, взаимодействуя с субъединицей PB1. Эти свойства белка PB1-F2 обычно рассматривают в аспекте патогенности, но четкого понимания этой взаимосвязи пока нет. Некоторые эффекты PB1-F2 являются специфичными для штамма, хозяина и типа клеток [32]. В этой связи роль мутации Ser82Pro в PB1-F2 вируса 4182С–МА/Н5 неясна.

Белок PB2 также входит в состав гетеротримера вирусной полимеразы (PB2, PB1 и PA). Природа

аминокислотного остатка в позиции 627 зависит от вида хозяина. В вирусах гриппа птиц это Glu, а в вирусах человека и других млекопитающих – Lys [27]. При адаптации вирусов «птичьего» происхождения к мышам и хорькам Shi с соавторами [40] обнаружили мутацию Glu627Lys. Остаток Lys в позиции 627 находили и в высокопатогенных вирусах гриппа птиц H5N1 и H7N9, изолированных от людей [40, 41]. Замену Glu627Lys считают адаптационной. Позиция 627 расположена в С-концевой части белка PB2 – в домене, который так и называют «домен-627» (538–693 а.к. о.), – и находится в тесном контакте с соседним доменом сигнала ядерной локализации (NLS-домен, 694–741 а.к.о.), который взаимодействует с импортином хозяйской клетки, чтобы транспортировать вирусные РНП из цитоплазмы в ядро [26]. Пока нет четких данных о том, с какими факторами хозяина, напрямую или опосредованно, связан домен-627 и каков механизм их взаимодействия. По разным предположениям, это могут быть белки семейства импортинов [26], регулятор транскрипции ANP32A [42, 43] и другие [44].

Ранее Yamayoshi с соавторами [28] обнаружили, что замена Glu627Lys в белке PB2 вирусов гриппа птиц приводит к усилению полимеразной активности, эффективности репликации и повышению вирулентности при культивировании вирусов в клетках млекопитающих и в опытах на мышах. В нашей работе также показано, что адаптация вирусов гриппа диких птиц, 4970/Н1 и 4182/Н5, к мышам ведет к появлению мутации Glu627Lys в PB2 и повышению вирулентности. Не исключено, что ведущую роль в изменении вирулентности исследованных нами вирусов гриппа Н1 и Н5 играет именно эта аминокислотная замена. Из анализа мутаций, обнаруженных в других белках этих вирусов (см. выше), следует, что их вклад в изменение вирулентности, скорее всего, менее значителен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно заключить, что в лабораторных условиях удалось за 7–10 пассажей адаптировать вирусы гриппа подтипов Н1 и Н5, выделенные от диких уток, к размножению в легких мышей. Изначально апатогенные для мышей вирусы изменили фенотип на патогенный. Адаптированный к мышам вирус гриппа подтипа Н1, 4970 МА/Н1, оказался более вирулентным, чем 4182С–МА/Н5, несмотря на меньшее количество приобретенных мутаций. Так, в результате 9 пассажей изолята 4970/Н1 в легких мышей возникло только две мутации в двух вирусных белках (Glu627Lys в PB2 и Asp35/52Asn в HA1), которые,

по-видимому, и привели к возрастанию вирулентности. В то же время в вирусе гриппа подтипа H5, 4182C/H5, в результате 10 пассажей через легкие мышей появились мутации в шести белках; из них три: Lys51Arg в HA2, Ser59Ile в NA и Ser82Pro в PB1-F2 – оказались уникальными, тогда как остальные: Glu627Lys

в PB2, Arg65Lys в NP и Val113Ala в PB1, – скорее всего, носят адаптационный характер. Общей для обоих адаптированных к мышам вирусов гриппа подтипов H1 и H5 оказалась замена Glu627Lys в белке PB2, которая давно признана адаптационной мутацией и детерминантой патогенности.

ЛИТЕРАТУРА

- Alexander DJ, Brown IH. History of highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech* 2009; 28(1), 19-38. doi: 10.20506/rst.28.1.1856.
- Lee DH, Criado MF, Swayne DE. Pathobiological origins and evolutionary history of highly pathogenic avian influenza viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2021; 11(2), a038679. doi: 10.1101/cshperspect.a038679.
- Шестопалов АМ. Старый знакомый – птичий грипп. *Наука из первых рук* 2006; 9(3), 26-34. <https://scfh.ru/papers/staryy-znakomyy-ptichiy-gripp/>.
- Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. *Ann NY Acad Sci* 2014; 1323(1), 115-39. doi: 10.1111/nyas.12462.
- Guan Y, Vijaykrishna D, Bahl J, Zhu H, Wang J, Smith GJ. The emergence of pandemic influenza viruses. *Protein Cell* 2010; 1(1), 9-13. doi: 10.1007/s13238-010-0008-z.
- Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005; 437(7060), 889-93. doi: 10.1038/nature04230.
- Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(1), 15-22. doi: 10.3201/eid1201.050979.
- Smith GJ, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LL, Chen H, et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(28), 11709-12. doi: 10.1073/pnas.0904991106.
- Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, et al. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe* 2014; 15(6), 692-705. doi: 10.1016/j.chom.2014.05.006.
- World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5N1 Evolution Working Group. Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Influenza Other Respir Viruses* 2014; 8(3), 384-8. doi: 10.1111/irv.12230.
- Influenza at the human-animal interface summary and assessment. Available: <https://www.who.int/publications/m/item/influenza-at-the-human-animal-interface-summary-and-assessment-15-april-2021>.
- Postnikova Y, Treshchalina A, Boravleva E, Gambaryan A, Ishmukhametov A, Matrosovich M, et al. Diversity and reassortment rate of influenza A viruses in wild ducks and gulls. *Viruses* 2021; 13(6), 1010. doi: 10.3390/v13061010.
- Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). Chapter 3.3.4 in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2021. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hygiene* 1938; 27, 493-7. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
- Ашмарин ИП. Вычисление LD₅₀ при малом числе подопытных животных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 1959; 30(2), 102-8.
- Stech J, Stech O, Herwig A, Altmeyden H, Hundt J, Gohrbandt S, et al. Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(21), e139. doi: 10.1093/nar/gkn646.
- Li OT, Barr I, Leung CY, Chen H, Guan Y, Peiris JS, Poon LL. Reliable universal RT-PCR assays for studying influenza polymerase subunit gene sequences from all 16 haemagglutinin subtypes. *J Virol Methods* 2007; 142(1-2), 218-22. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.01.015.
- Tuzikov AB, Gambaryan AS, Juneja LR, Bovin NV. Conversion of complex sialooligosaccharides into polymeric conjugates and their anti-influenza virus inhibitory potency. *J Carbohydr Chem* 2000; 19(9), 1191-200. doi: 10.1080/07328300008544143.
- Matrosovich MN, Mochalova LV, Marinina VP, Byrnamova NE, Bovin NV. Synthetic polymeric sialoside inhibitors of influenza virus receptor-binding activity. *FEBS Lett* 1990; 272(1-2), 209-12. doi: 10.1016/0014-5793(90)80486-3.
- Mochalova L, Gambaryan A, Romanova J, Tuzikov A, Chinarev A, Katinger D, et al. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken

- embryonated eggs. *Virology* 2003; 313(2), 473-80. doi: 10.1016/s0042-6822(03)00377-5.
21. Krenn BM, Egorov A, Romanovskaya-Romanko E, Wolschek M, Nakowitsch S, Ruthsatz T, et al. Single HA2 mutation increases the infectivity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 intranasal influenza vaccine candidate lacking NS1. *PLoS One* 2011; 6(4), e18577. doi: 10.1371/journal.pone.0018577.
 22. Abraham MJ., Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 2015; 1, 19-25. doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
 23. Sondergaard CR, Olsson MH, Rostkowski M, Jensen JH. Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa values. *J Chem Theory Comput* 2011; 7(7), 2284-95. doi: 10.1021/ct200133y.
 24. Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser KE, Simmerling C. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* 2015; 11(8), 3696-713. doi: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
 25. Russell CJ. Acid-induced membrane fusion by the hemagglutinin protein and its role in influenza virus biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 385, 93-116. doi: 10.1007/82_2014_393.
 26. Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S, Hart DJ. Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* 2008; 4(8), e1000136. doi: 10.1371/journal.ppat.1000136.
 27. Subbarao EK, London W, Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 1993; 67(4), 1761-4. doi: 10.1128/JVI.67.4.1761-1764.1993.
 28. Yamayoshi S, Fukuyama S, Yamada S, Zhao D, Murakami S, Uraki R, et al. Amino acids substitutions in the PB2 protein of H7N9 influenza A viruses are important for virulence in mammalian hosts. *Sci Rep* 2015; 5, 8039-43. doi: 10.1038/srep08039.
 29. Wang G, Li A, Zhang Q, Wu C, Zhang R, Cai Q, et al. 3HTO: The hemagglutinin structure of an avian H1N1 influenza A virus. 2009. doi: 10.2210/pdb3HTO/pdb.
 30. Pflug A, Guilligay D, Reich S, Cusack S. Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter. *Nature* 2014; 516, 355-60. doi: 10.1038/nature14008.
 31. Cusack S, Pflug A, Guilligay D, Reich S. 4WSB: Bat influenza A polymerase with bound vRNA promoter. 2014. doi: 10.2210/pdb4WSB/pdb.
 32. Krumbholz A, Philipps A, Oehring H, Schwarzer K, Eitner A, Wutzler P, Zell R. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med Microbiol Immunol* 2011; 200(2), 69-75. doi: 10.1007/s00430-010-0176-8.
 33. Steinhauer DA. Influenza A virus haemagglutinin glycoproteins. In Qinghua Wang & Yizhi Jane Tao (eds), *Influenza: Molecular Virology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2010, 69-108.
 34. Xu R, Wilson IA. Structural characterization of an early fusion intermediate of influenza virus hemagglutinin. *J Virol* 2011; 85(10), 5172-82. doi: 10.1128/JVI.02430-10.
 35. Tao YJ, Ye Q. Influenza A virus nucleoprotein. In Qinghua Wang & Yizhi Jane Tao (eds), *Influenza: Molecular Virology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2010, 53-68.
 36. Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, Ozawa M, et al. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 2009; 83(9), 4153-62. doi: 10.1128/JVI.02642-08.
 37. Штыря ЮА, Мочалова ЛВ, Бовин НВ. Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функция. *Acta Naturae (русскаяязычная версия)* 2009; 1(2), 28-34.
 38. Choi HS, Huh J, Jo WH. Electrostatic energy calculation on the pH-induced conformational change of influenza virus hemagglutinin. *Biophys J* 2006; 91(1), 55-60. doi: 10.1529/biophysj.105.070565.
 39. Zhou H, Yu Z, Hu Y, Tu J, Zou W, Peng Y, et al. The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS One* 2009; 4(7), e6277. doi: 10.1371/journal.pone.0006277.
 40. Shi J, Deng G, Kong H, Gu C, Ma S, Yin X, et al. H7N9 virulent mutants detected in chickens in China pose an increased threat to humans. *Cell Res* 2017; 27, 1409-21. doi: 10.1038/cr.2017.129.
 41. Le QM, Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Ito M, Kawaoka Y. Selection of H5N1 influenza virus PB2 during replication in humans. *J Virol* 2009; 83(10), 5278-81. doi: 10.1128/JVI.00063-09.
 42. Liang LB, Jiang L, Li JP, Zhao QQ, Wang JG, He XJ, et al. Low polymerase activity attributed to PA drives the acquisition of the PB2 E627K mutation of H7N9 avian influenza virus in mammals. *MBio* 2019; 10(3), e01162-19. doi: 10.1128/mBio.01162-19.
 43. Camacho-Zarco AR, Kalayil S, Maurin D, Salvi N, Delaforge E, Milles S, et al. Molecular basis of host-adaptation interactions between influenza virus polymerase PB2 subunit and ANP32A. *Nat Commun* 2020; 11(1), 3656-68. doi: 10.1038/s41467-020-17407-x.
 44. Bortz E, Westera L, Maamary J, Steel J, Albrecht RA, Manicassamy B, et al. Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins. *mBio* 2011; 2(4), e00151-11. doi: 10.1128/mBio.00151-11.