

В. А. ИВАНИСЕНКО, Н. А. КОЛЧАНОВ



# ВИРУСА ГРИППА



Пожалуй, невозможно найти человека, который хотя бы один раз в жизни не болел гриппом. Большинство же из нас поневоле «общается» с этим инфекционным агентом многократно. Об этом свидетельствует и огромное число лекарств, призванных облегчить безобидный только на первый взгляд недуг. Увы, грипп относится к тому ряду болезней, о которых говорят, что ими болеют без лечения 7 дней, с лечением — неделю. Что же обеспечивает вирусам гриппа такую феноменальную стойкость к лекарственным средствам и атакам нашей иммунной системы? Ответ на этот вопрос, возможно, лежит в прямом смысле на поверхности — на поверхности самого гриппозного вириона...

# ИОННЫЙ

Геном вируса гриппа, как известно, способен мутировать исключительно высокими темпами благодаря случайным «ошибкам» при тиражировании своей наследственной информации. Частота нуклеотидных замен в его наследственном материале в сотни тысяч раз выше, чем в геноме человека.

Именно эта особенность вируса лежит в основе эффективного механизма, защищающего его от иммунной системы человека, поскольку приводит к появлению таких штаммов, с которыми не могут связываться антитела, ранее наработанные в организме в ответ на инфекцию или вакцинацию. Мутантный штамм поэтому активно размножается до тех пор, пока в организме не будут выработаны новые специфичные антитела.

Молекулярные механизмы, обеспечивающие проникновение вируса внутрь клетки-мишени, до сих пор остаются предметом многих научных исследований. Главная цель последних — помочь в разработке лекарственных препаратов, способных предотвратить инфицирование клетки вирусом. Остановить болезнь на начальной стадии крайне важно — это означает не дать вирусной частице создать армию своих клонов, готовых к заражению других здоровых клеток.

В настоящее время в связи с возможностью новой пандемии гриппа, причиной которой может стать мутированный штамм так называемого птичьего гриппа, исследования вируса гриппа типа А (к нему относится большинство штаммов гриппа млекопитающих и птиц) приобрели еще большую актуальность. Создание новых эффективных средств профилактики и лечения этого заболевания требует глубокого понимания сложных механизмов межмолекулярных взаимодействий, процессов регуляции работы генов как вируса, так и организма хозяина.



Владимир Александрович ИВАНИСЕНКО, кандидат биологических наук, руководитель группы компьютерной протеомики и молекулярного дизайна Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск)



Николай Александрович КОЛЧАНОВ, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией теоретической генетики, зам. директора Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск)

Не только для широкого круга читателей, но и для многих специалистов необычным и малоизвестным подходом в этой области являются методы компьютерного моделирования, позволяющие реконструировать закономерности молекулярной эволюции и проводить своего рода виртуальные «эксперименты» как с отдельно взятыми молекулами, так и с молекулярно-генетическими системами. Благодаря этим методам можно выявить перспективные молекулярные мишени для создания лекарственных препаратов нового поколения против различных вирусных и бактериальных инфекций.

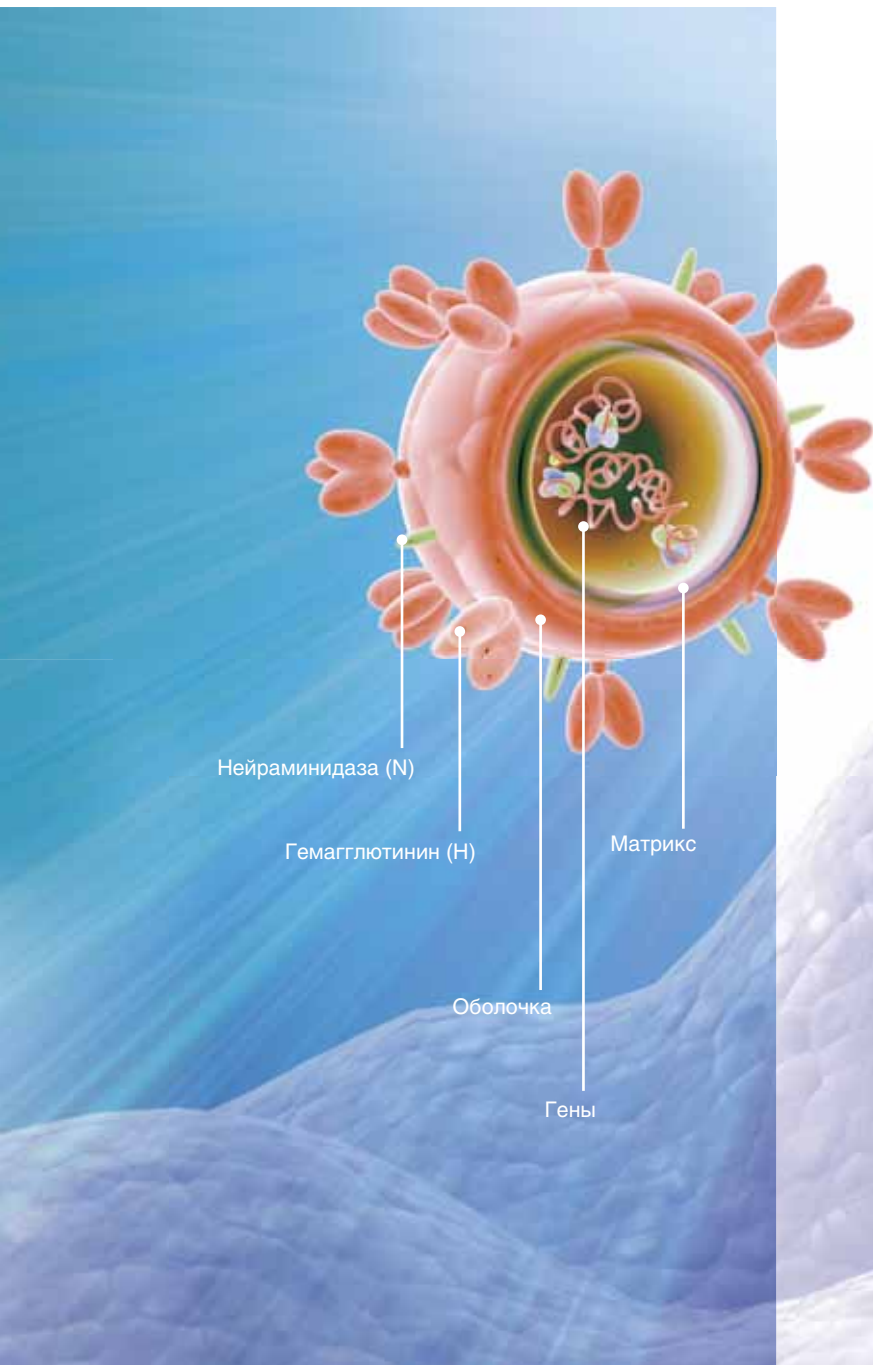
В лаборатории теоретической генетики ИЦиГ СО РАН компьютерные методы и подходы в эволюционной биологии и протеомики

(науки о белках) активно развиваются в течение последних 15 лет. Одним из важнейших объектов исследований в настоящее время стал вирус гриппа А, точнее — *гемагглютинин*, один из его поверхностных белков.

## Гемагглютинин — «абордажный крюк» вируса

Прежде чем перейти непосредственно к результатам компьютерного моделирования, необходимо ближе познакомиться со строением и «образом жизни» гриппозного вириона, особенно с его структурно-функциональными белковыми структурами.

Генетический материал вируса защищен оболочкой из особого бел-



В центре вириона находится наследственный материал вируса — молекулы РНК и ряд белков, необходимых ему на первых стадиях жизни в клетке хозяина. Поверхностные белки — гемагглютинин и нейраминидаза — отвечают за способность вирусной частицы проникать в клетку. Они же являются своеобразными «маячками» для защитных антител, вырабатываемых иммунной системой инфицированного организма

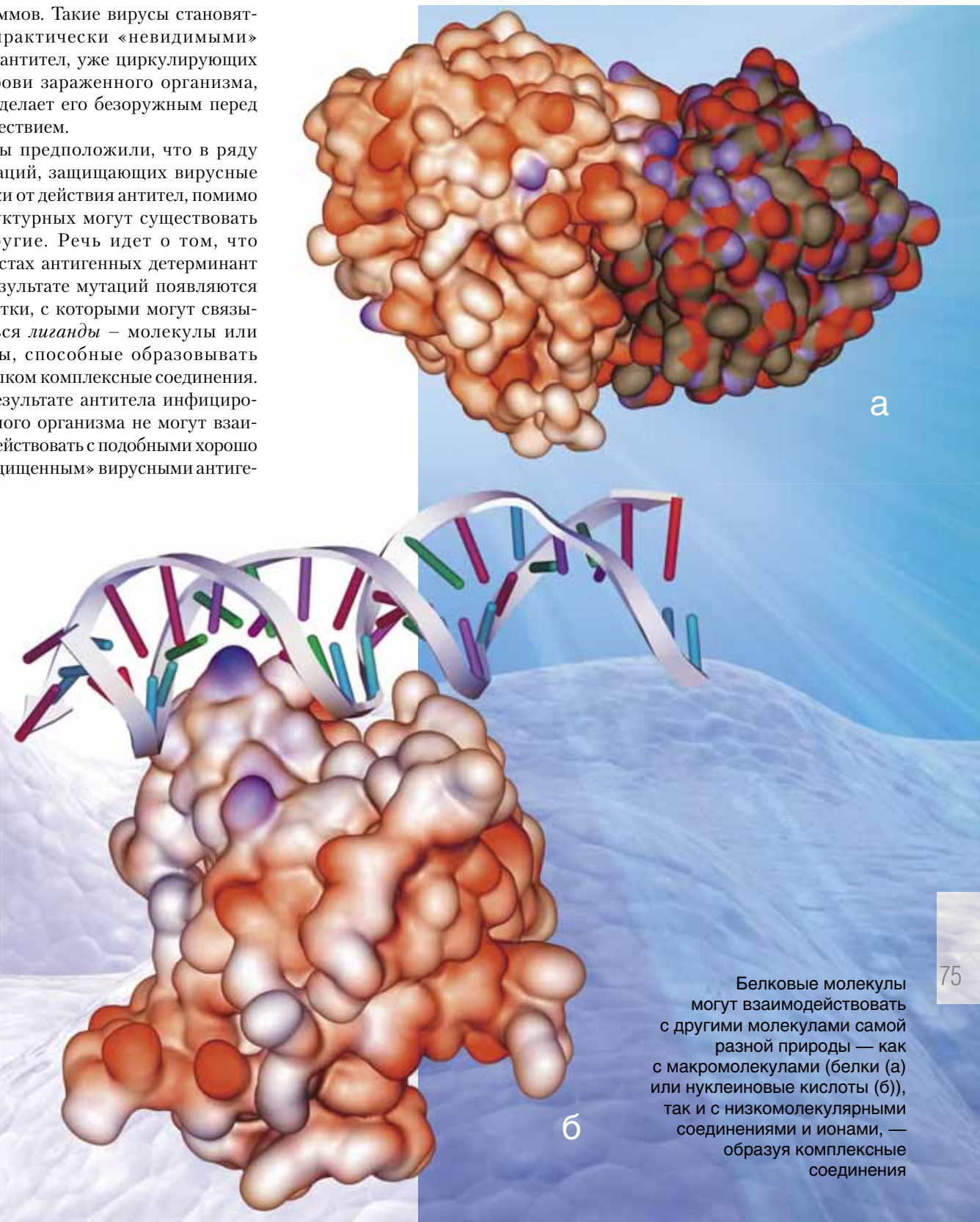
ка, вокруг которой располагается мембрана из липидов (жироподобных веществ). В ней удерживаются молекулы трех белков: *гемагглютинина*, *нейраминидазы* и *белка М2*, формирующего особые *ионные каналы*. При помощи гемагглютинина вирус прикрепляется к клеточной мембране, а нейраминидаза ее разрушает, открывая вирусу путь внутрь клетки. Затем внутри вириона-захватчика благодаря ионным каналам изменяется кислотность среды (рН), чем создаются условия для освобождения генетического материала из вирусной капсулы.

Таким образом, гемагглютинин играет одну из важнейших ролей при инфицировании вирусом клетки-мишени. На поверхности вирусной оболочки он присутствует в виде *тримеров*, т. е. комплексов из трех молекул. Каждая молекула, в свою очередь, состоит из двух субъединиц: одна обеспечивает первичный контакт с клеткой, вторая отвечает за слияние с клеточной мембраной. Процесс слияния также далеко не прост и сопровождается значительными перестройками самой молекулы гемагглютинина, в результате которых из внутренней части глобулы белка высвобождается «спрятанный» там особый пептид слияния.

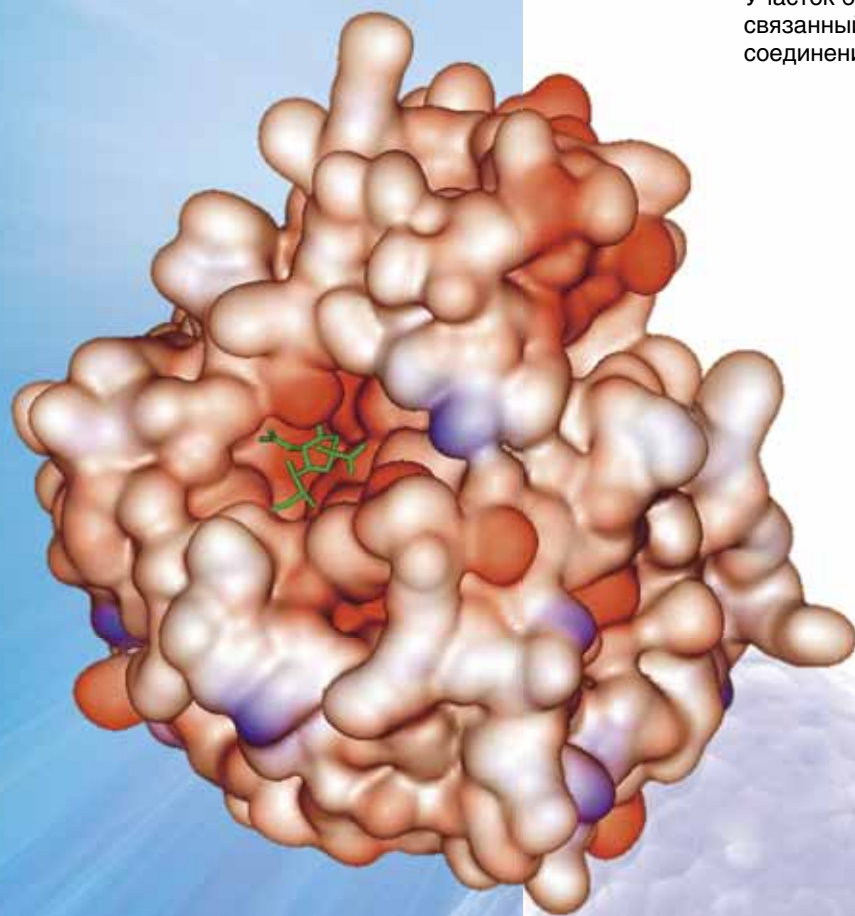
Для инфицированного организма поверхностные белки вируса, включая гемагглютинин, представляют объект, требующий пристального внимания, поскольку являются *антигенами* — веществами, по которым иммунная система распознает инфекционный интервента. В вирусных белках можно выделить так называемые *антигенные детерминанты* — участки, с которыми предпочтительно связываются антитела, специфические защитные белки иммунной системы. Мутации, вызывающие структурные изменения в подобных местах, т. е. меняющие форму и расположение антигенных детерминант, как раз и приводят к образованию новых вирусных

штаммов. Такие вирусы становятся практически «невидимыми» для антител, уже циркулирующих в крови зараженного организма, что делает его безоружным перед нашествием.

Мы предположили, что в ряду мутаций, защищающих вирусные белки от действия антител, помимо структурных могут существовать и другие. Речь идет о том, что в местах антигенных детерминант в результате мутаций появляются участки, с которыми могут связываться *лиганды* — молекулы или ионы, способные образовывать с белком комплексные соединения. В результате антитела инфицированного организма не могут взаимодействовать с подобными хорошо «защищенными» вирусными антиге-



Белковые молекулы могут взаимодействовать с другими молекулами самой разной природы — как с макромолекулами (белки (а) или нуклеиновые кислоты (б)), так и с низкомолекулярными соединениями и ионами, — образуя комплексные соединения



Участок белковой молекулы, связанный с низкомолекулярным соединением

нами. Проверка этой гипотезы была осуществлена с применением разработанных в нашей лаборатории компьютерных методов молекулярного моделирования.

### Что увидел компьютер

В принципе белковые молекулы могут взаимодействовать с другими молекулами самой разной природы: с макромолекулами, в числе которых могут быть белки или нуклеиновые кислоты, носители генетической информации; с низкомолекулярными соединениями; а также с различными ионами. И в этом смысле белки вирусов ничем не отличаются от белков дру-

гих живых организмов, в том числе человека.

Подобные универсальные взаимодействия лежат в основе метаболических путей, транспортных молекулярных потоков, путей передачи сигналов... На поверхности белков находятся специальные места «посадки» молекул-лигандов — *функциональные сайты*, — которые своей уникальной структурой и обеспечивают специфическое связывание с этими молекулами.

А теперь давайте вернемся к нашему «герою» — гемагглютину — и посмотрим результаты компьютерного анализа. Прежде всего отметим, что поверхность гемагглютина в отличие от других белков в высокой степени обогащена местами посадки различных ионов.

Более того — на ней присутствует большое число потенциальных мест такой посадки, которые могут превратиться в «действующие» сайты связывания уже в результате одиночной мутации, т. е. замены всего лишь одной пары нуклеотидов!

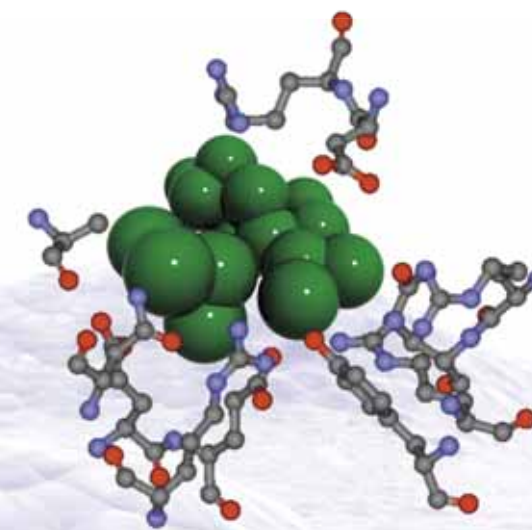
Возможно, именно эти свойства гемагглютина позволяют вирусу гриппа с легкостью ускользать от нашей иммунной системы, обеспечивая его высокую эпидемичность. Аргументом в пользу этого соображения является тот факт, что выявленные участки связывания ионов практически перекрываются с участками расположения антигенных детерминант.

Как известно, антитела, вырабатываемые в результате иммунного ответа на инфекцию, связываются с

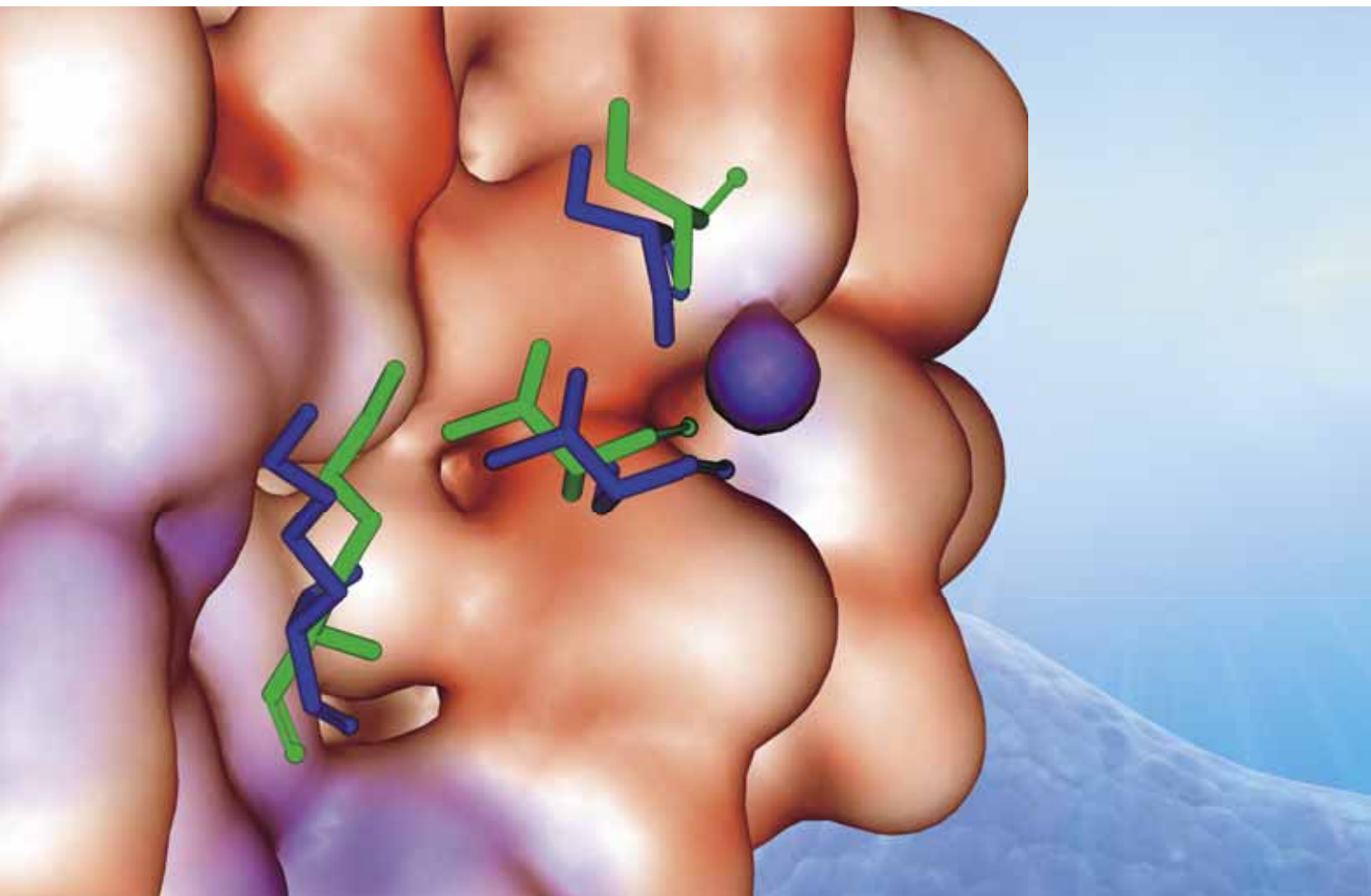


Группа компьютерной протеомики и молекулярного дизайна: слева направо — к. ф.-м. н. Э. С. Фомин, аспиранты Е. Э. Аман, П. С. Деменков, С. С. Пинтус

В лаборатории теоретической генетики ИЦиГ СО РАН создана база данных (PDBSite), содержащая информацию о пространственных структурах более чем 30 тыс. различных функциональных участков (сайтов) белков, включая каталитические центры ферментов, сайты взаимодействий белок-белок, белок-ДНК/РНК, белок-лекарственные препараты и т. д. В базе в удобном для поиска и использования виде хранятся данные о физико-химических, структурных и эволюционных характеристиках этих сайтов, полученные с помощью компьютерного анализа экспериментально расшифрованных комплексов. Эти сведения успешно используются для распознавания функциональных сайтов в пространственных структурах малоизученных белков путем определения их структурного сходства с известными. Например, в результате анализа структуры гемагглютина — поверхностного белка вируса гриппа — выяснилось, что один из его участков схож с сайтом связывания сульфат-иона ( $SO_4$ ), что свидетельствует о потенциальной способности этого белка связываться в этом участке с сульфат-ионом



Пример «экстрагированного» из белка сайта связывания белка с низкомолекулярным лигандом, информация о котором заносится в базу данных PDBSite



Распознавание сайта связывания иона  $SO_4$  в пространственной структуре гемагглютинаина, поверхностного белка вируса гриппа А, выполненное программой PDBSiteScan

антигенными детерминантами, что приводит к нейтрализации вирусных частиц и их дальнейшему разрушению под действием иммунной системы. Очевидно, что связывание иона с антигенной детерминантой будет препятствовать образованию устойчивого комплекса антиген-антитело, в результате чего вирус будет «щитом» отгорожен от воздействия иммунной системы.

Подтверждением нашей гипотезы «ионного щита» вируса гриппа стала еще одна особенность, которую удалось обнаружить у гемагглю-

тинаина: предполагаемые сайты связывания ионов на его молекуле совпадают с уже известными участками, отвечающими за адаптивную молекулярную эволюцию этого белка.

Адаптивными обычно считаются такие мутации, которые повышают приспособленность несущего их организма. И действительно, мутации, повреждающие антигенные детерминанты, являются для вируса гриппа адаптивными. Одним из основных механизмов адаптивной эволюции поверхностного белка

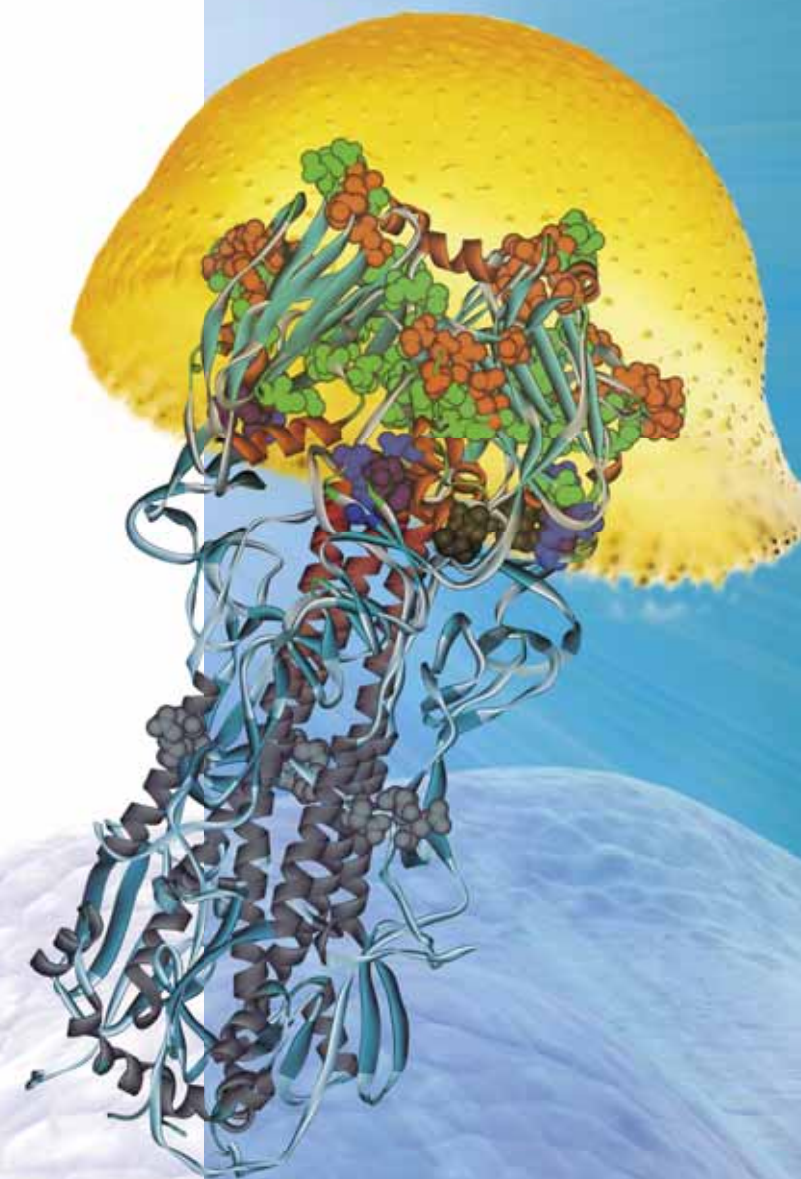
вируса гриппа, очевидно, как раз и является возникновение сайтов связывания ионов в этих важнейших для воспроизводства и выживания вируса участках.

Результаты исследования недвусмысленно свидетельствуют, что новое поколение вакцин для нейтрализации вируса гриппа должно конструироваться с учетом возможного связывания белком — крайнего и эффективного механизма защиты вируса, основанного на

результатах одиночных мутационных событий. Нельзя не учитывать и другие возможные последствия формирования «ионного щита»: например, заряженные частицы на поверхности вируса могут облегчать его слияние с клеточной мембраной и проникновение в клетку.

Высказанные нами предположения, позволившие сформировать новый взгляд на проблему механизмов защиты вирусов от атаки иммунной системы организма-хозяина, а также обнаружить новых молекулярных участников, задействованных в процессе проникновения вируса внутрь клетки, безусловно, требуют дальнейшего анализа и экспериментальной проверки.

Однако то, что ионы могут быть важными факторами, регулирующими жизненный цикл вируса гриппа, уже не вызывает сомнения. Как и то, что исследования подобных молекулярных механизмов будут содействовать открытию новых фармакологических мишеней и созданию эффективных вакцин и лекарственных препаратов.



**В пространственной структуре поверхностного белка вируса гриппа обнаружено множество сайтов связывания различных ионов (а также потенциальных мест такой посадки), благодаря чему вокруг вируса может формироваться своеобразный ионный щит, защищающий его от атак иммунной системы**