

Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Игнатъева А.В.

Антигенная структура гемагглютини́на вируса гриппа А

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития РФ

Гемагглютинин вируса гриппа является высоко вариабельным поверхностным гликопротеином. Описаны 17 антигенных подтипов гемагглютини́на вируса гриппа А. Гемагглютинин является главной мишенью вируснейтрализующих антител. Локализация и структура антигенных сайтов гемагглютини́на вируса гриппа А подтипа Н3 были описаны более 30 лет тому назад. В последующие годы антигенные сайты гемагглютини́на подтипов Н1 и Н2 были картированы с использованием трёхмерной модели гемагглютини́на подтипа Н3. Были также получены предварительные данные о локализации антигенных сайтов гемагглютини́на подтипа Н5. После того, как были опубликованы данные о трёхмерной структуре гемагглютини́на подтипов Н5 и Н9 по данным рентгеноструктурного кристаллографического анализа, мы провели детальное картирование антигенной структуры гемагглютини́на этих подтипов. Мутанты, резистентные к моноклональным антителам (эскейп-мутанты) были отобраны и использованы в перекрёстных иммунологических реакциях с моноклональными антителами, мутантные гены гемагглютини́на были секвенированы, и локализация антигенно значимых аминокислотных остатков была определена в трёхмерной структуре молекулы гемагглютини́на. Для подтипа Н5 были выявлены в латеральной петле и на вершине глобулы два антигенных сайта, соответствующие сайтам А и В у подтипа Н3. После появления и распространения высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) мы провели антигенное картирование его гемагглютини́на, которое выявило быструю эволюцию антигенной структуры в пределах подтипа Н5. Это заключение было подтверждено анализом аминокислотных позиций, распознаваемых моноклональными антителами против вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1), выделенного в Отделе экологии вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» и принадлежащего к Цинхай-Сибирской ветви вирусов H5N1, распространившейся в Западной Сибири, Европе, Африке и на Ближнем Востоке. Гемагглютинин подтипа Н9 резко отличался от всех картированных к настоящему времени подтипов, так как он не содержал антигенного сайта, аналогичного сайту А у подтипа Н3. После появления и распространения пандемического вируса H1N1 2009 года мы провели картирование позиций аминокислотных остатков, распознаваемых моноклональными антителами против штамма A/IV-Moscow/01/09 (H1N1) pdm09, первого штамма пандемии 2009 года, изолированного в России, в Отделе экологии вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского». Антигенно значимые аминокислотные замены у эскейп-мутантов были сосредоточены в ограниченной области глобулы гемагглютини́на, и они вызывали снижение аффинности гемагглютини́на к аналогам сигналов клеточных рецепторов, что может служить объяснением ограниченного антигенного дрейфа пандемического вируса 2009 года.

Ключевые слова: *вирус гриппа А, гемагглютинин, антиген, эпитопное картирование, подтип, вариация.*

Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V.

Antigenic structure of influenza A virus hemagglutinin

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Russian Ministry of public health

The hemagglutinin of influenza virus is a highly variable surface glycoprotein. 17 antigenic subtypes of the influenza A virus hemagglutinin have been described. The hemagglutinin is the primary target of virus-neutralizing antibodies. The location and structure of the antigenic sites in the hemagglutinin molecule of the influenza A virus H3 subtype were revealed three decades ago. Later the antigenic sites of H1 and H2 subtypes were mapped with the use of the H3 three-dimensional model, the only one available at the time. Preliminary data on the location of antigenic sites of the H5 hemagglutinin were also presented. After the X-ray crystallographic structures of the H5 and H9 hemagglutinins were reported, we performed the mapping of the antigenic structure of the H5 and H9 hemagglutinins in greater detail. The virus mutants resistant to monoclonal antibodies (escape mutants) were selected and used in immune cross-reactions with the monoclonal antibodies. The mutant hemagglutinin genes were sequenced, and the location of the antigenically relevant amino acid residues in the three-dimensional structure of the hemagglutinin molecule was determined. For the H5 subtype two antigenic sites analogous to sites A and B of the H3 subtype were revealed at the lateral loop and at the distal end of the hemagglutinin globule. After the appearance and spread of the highly pathogenic H5N1 influenza virus we performed the antigenic mapping of its hemagglutinin. The mapping revealed a rapid evolution of the antigenic structure of the H5 hemagglutinin. This conclusion was confirmed by the analysis of amino acid positions recognized by monoclonal antibodies against A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) influenza virus isolated at the Virus Ecology Department of the D.I. Ivanovsky Institute of Virology and belonging to the Qinghai-Siberian variant having spread in Western Siberia, Europe, Africa and Middle East. The H9 hemagglutinin was shown to differ sharply from any subtype analyzed so far, since it did not contain an antigenic site corresponding to site A in the H3 subtype. After the appearance and spread of the pandemic 2009 influenza H1N1 virus, we mapped the amino acid positions recognized by the monoclonal antibodies against the strain A/HIV-Moscow/01/09 (H1N1) pdm09, the first strain of the pandemic 2009 virus isolated in Russia at the Virus Ecology Department of the D.I. Ivanovsky Institute of Virology. The amino acid changes in the hemagglutinin of the escape mutants occurred in a limited area of the hemagglutinin globule, and they induced a decrease of the hemagglutinin affinity to the sialic analogs of cell receptors, which may explain a limited range of antigenic drift of the 2009 pandemic virus.

Key words: *influenza A virus, hemagglutinin, antigen, epitope mapping, subtype, variation.*

Вирус гриппа А является наиболее распространенным возбудителем инфекционных заболеваний человека. Он быстро эволюционирует. Наиболее вариabельны поbерхностные белки вируса, гемагглютинин и нейраминидаза. Гемагглютинин является мишенью для нейтрализующих антител, играющих основную роль в защите от вирусной инфекции. Заболевание, вызванное вирусом с гемагглютинином какого-либо подтипа, или вакцинация таким вирусом, не дает иммунитета против вирусов других подтипов. Количество известных антигенных подтипов гемагглютинина по мере выделения и характеристики новых вариантов вируса возрастает. К настоящему времени, описаны уже 17 антигенных подтипов гемагглютинина вируса гриппа А [30]. Гемагглютинины вирусов, циркулирующих в настоящее время в человеческой популяции, относятся к подтипам Н1 и Н3. Остальные подтипы встречаются у вирусов, циркулирующих у птиц, свиней, лошадей, тюленей, китообразных, летучих мышей. Однако вирус с гемагглютинином подтипа Н2 вызвал пандемию в 1957 г. и циркулировал до 1968 г., а вирусы гриппа птиц с гемагглютинином Н5 и Н7 вызывают у людей спорадические случаи заболеваний с высокой смертностью. Естественно, что свойства гемагглютинина привлекают самое пристальное внимание исследователей. Гемагглютинин вируса гриппа А был одним из первых вирусных белков, для которых стала известна трёхмерная структура молекулы по данным рентгеноструктурного анализа [33].

Молекула гемагглютинина синтезируется как единая полипептидная цепь, которая в дальнейшем подвергается протеолитическому расщеплению на 2 субъединицы, НА1 и НА2. В вирусной частице гемагглютинин представляет собой тример, состоящий из трёх мономеров, соединенных нековалентными связями. Молекулу гемагглютинина можно разделить на стебель, основание которого находится на липидном слое мембраны, и на глобулу, обращенную наружу. Глобула образована только полипептидной цепью НА1, а стебель – цепями НА1 и НА2.

Использование картины трёхмерной структуры молекулы в сочетании с техникой получения эскейп-мутантов, то есть мутантов, резистентных к нейтрализующему действию того или иного моноклонального антитела, позволяет осуществить картирование антигенных участков в трёхмерной структуре молекулы. При этом выявляются позиции аминокислотных остатков, распознаваемых нейтрализующими антителами. Впервые это было сделано для гемагглютинина подтипа Н3 [26, 32]. В результате антигенного картирования выявили пять зон (сайтов) связывания антител, обозначенных А, В, С, D и Е. Сайт А представлен петлёй, которая выдаётся с поbерхности глобулы (у гемагглютинина подтипа Н3 аминокислотные остатки 140–145). Сайт В образован внешними остатками аминокислот альфа-спирали, прилегающими к краю рецептор-связывающего кармана (аминокислотные остатки 155–164 и 187–196). Сайт С представляет собой выступ в третичной структуре у дисульфидной связи на границе стебля и глобулы, образованный аминокислотными остатками 53, 54, 275, 276, 278. Сайт D находится вблизи поbерхности контакта между мономерами (аминокислотные остатки 172–174, 201–220, 242, 244), а сайт Е на боковой стороне глобулы (аминокислотные остатки 63–83).

С 1981 по 2001 гг. единственным подтипом гемагглютинина, для которого была известна трёхмерная структура по данным рентгеноструктурного анализа, оставался гемагглютинин подтипа Н3. Тем не менее, были предприняты попытки антигенного картирования гемагглютининов подтипов Н1 [7], Н2 [31] и Н5 [23]. При этом для определения локализации аминокислотных замен у эскейп-мутантов и дрейфовых вариантов гемагглютинина использовали трёхмерную модель гемагглютинина подтипа Н3. Использование трёхмерной структуры одного подтипа для антигенного картирования других подтипов может дать лишь приблизительное представление о локализации антигенных сайтов в трёхмерной структуре молекулы. Поэтому вынужденное использование только структуры Н3 являлось существенным ограничивающим фактором для точного картирования антигенных зон. Тем не менее, для подтипов Н1 и Н2 была получена важная информация о локализации и структуре антигенных сайтов. В гемагглютинине подтипа Н1

были выявлены 5 антигенных сайтов: антигенному сайту А в структуре Н3 соответствует сайт Са2 в Н1, сайту В в Н3 соответствуют сайты Sa и Sb в Н1, сайту D в Н3 соответствует сайт Ca1 и сайту Е в Н3 – сайт Сb в Н1 [7]. Для подтипа Н2 удалось выявить 6 антигенных сайтов Сайты I-A, I-B и I-C формируют в структуре НА / Н2 антигенные области, которые содержат участки, соответствующие сайтам А, В и D, а сайты I-D и II-B эквивалентны сайтам Е и С подтипа Н3. Кроме антигенных сайтов, соответствующих сайтам гемагглютинаина Н3, в стебле гемагглютинаина подтипа Н2 находится дополнительный антигенный сайт II-A [31]. Попытка антигенного картирования гемагглютинаина подтипа Н5 тоже была предпринята с использованием трёхмерной структуры Н3 [23]. При этом были получены весьма ограниченные данные, поскольку были идентифицированы только 6 аминокислотных замен для 5 сайтов, то есть для каждого сайта была определена только его локализация в той или иной части молекулы, но не границы и структура.

В 2001 г. в исследовании трёхмерной структуры гемагглютининов по данным рентгеноструктурного анализа был сделан важный шаг вперед. Была опубликована трёхмерная структура гемагглютининов подтипов Н5 и Н9 [10, 11]. Этой работой была создана основа для картирования антигенных сайтов этих подтипов, причем уже не заведомо приблизительного, на основе трёхмерной структуры другого подтипа, а достаточно точного, на основе трёхмерной модели гемагглютинаина того подтипа, который картируется.

В лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» было проведено детальное антигенное картирование молекулы гемагглютинаина Н5 с использованием трёхмерной модели молекулы этого подтипа [14]. В качестве вируса дикого типа был использован штамм A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), адаптированный к мышам, полученный в лаборатории субвирусных структур ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» [27]. Моноклональные антитела против разных вирусов подтипа Н5 были предоставлены Р. Вебстером (Детская клиника Сент-Джуд, Мемфис, США) и В. Хиншо (Университет Висконсин-Мэдисон, Мэдисон, США). У полученных эскейп-мутантов 5 аминокислотных замен в позициях 140–145 в субъединице НА1 (здесь и далее нумерация по подтипу Н3) были локализованы в латеральной петле глобулы гемагглютинаина, образующей сайт А у гемагглютинаина подтипа Н3 [32] и сайт Са у подтипа Н1 [7] (табл. 1). Аминокислотные замены в позициях 156, 157 и 189 локализованы в сайте В у подтипа Н3, а замены в позициях 129 и 131 находятся вне антигенных сайтов у гемагглютинаина подтипа Н3, но у подтипа Н1 они попадают в сайт Sa, который в основном соответствует сайту В у Н3. Замены в позициях 145 и 156 были идентифицированы ранее у эскейп-мутантов подтипа Н5 [23]. Таким образом, данные, полученные при антигенном картировании гемагглютинаина вируса A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), впервые позволили выявить детальную структуру двух антигенных сайтов в молекуле гемагглютинаина подтипа Н5 [14], для которых ранее была известна только приблизительная локализация [23].

Таблица 1. Сопоставление антигенных сайтов разных подтипов НА вируса гриппа А (в скобках даны позиции аминокислотных остатков в нумерации по подтипу Н3).

Подтипы гемагглютинаина			
Н1	Н2	Н3	Н5
Ca2 (140–145, 224, 225)	I-B (137)	A (133, 137, 140–146)	5 (140, 142–145)
Sa (128, 129, 156-167)	I-A (162, 248)	B (155–160, 186–197)	1 (120, 122, 124–126, 128-129, 131, 133, 155-157, 166, 189, 193)
—	II-B (273)	C (53, 54, 275–278)	—
Ca1 (169, 173, 207, 240)	I-C (131, 222)	D (172-174, 201–207, 217–220, 242, 244, 246)	—
Cb (77–83, 122)	I-D (80)	E (62, 63, 78–83, 122)	2 (62)
—	II-A (40–41)	—	3 (46)

Вирусы, содержащие гемагглютинин подтипа H5, до 1997 г. рассматривались как патогенные агенты, опасные, главным образом, для птиц. В 1997 г. в Гонконге были отмечены заболевания человека в результате заражения высоковирулентным вирусом гриппа А птиц подтипа H5N1. С 2004 г. в 15 странах зарегистрированы заболевания людей с высокой летальностью, вызванные данным вирусом. К настоящему времени суммарное количество подтвержденных случаев заболевания людей вирусом гриппа H5N1 насчитывает 602 человека, из которых 355 погибли. С 2005 г. эпизоотии среди птиц, вызванные вирусом H5N1 отмечены в России, Украине и в Центральной Европе. Гемагглютинин высоковирулентных вирусов подтипа H5N1 отличался от вирусов подтипа H5 предыдущих лет выделения по антигенной специфичности, выявляемой в иммунных реакциях, а также по некоторым особенностям трёхмерной структуры, определяемой по данным рентгеноструктурного анализа [19, 29]. Это побудило нас провести анализ антигенной структуры гемагглютинина вируса A/Vietnam/1203/04 (H5N1), выделенного от человека. В качестве вируса дикого типа был использован вирус-реассортант, предоставленный Р. Донисом (CDC, Атланта, США). Вирус содержит 6 генов внутренних и неструктурных белков вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) и гены поверхностных гликопротеинов (гемагглютинина и нейраминидазы) вируса A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Ген гемагглютинина этого вируса модифицирован сайт-специфическим мутагенезом путем удаления полиосновного участка в области сайта нарезания, что резко снижает вирулентность вируса и позволяет использовать его для работы в обычных условиях, без специальных мер защиты. Для селекции эскейп-мутантов были использованы 7 моноклональных антител против вируса A/Vietnam/1203/04 (H5N1) и одно антитело против вируса A/chicken/Pennsylvania/8125/83 (H5N2), способное реагировать с вирусом A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Были получены 13 эскейп-мутантов. Секвенирование мутантных генов гемагглютинина и перекрёстные иммунологические реакции с моноклональными антителами [13] выявили антигенную значимость аминокислотных замен в позициях 143, 144 и 145 в сайте, соответствующем сайту А у подтипа H3, и в позициях 126, 155, 156, 166, 193 в сайте, соответствующем сайту В у гемагглютинина подтипа H3 и сайтам Sa и Sb у гемагглютинина подтипа H1. Замены в позициях 126, 155, 166 и 193 не были обнаружены при картировании гемагглютинина вируса A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), что, возможно, отражает антигенные особенности гемагглютинина вирусов подтипа H5N1. Данные, полученные нами при картировании гемагглютинина вируса A/Vietnam/1203/04 (H5N1), позволили существенно расширить распознаваемую антителами область в трёхмерной модели гемагглютинина подтипа H5.

В ходе анализа антигенной структуры гемагглютинина вируса A/Vietnam/1203/04 (H5N1) было обнаружено, что два моноклональных антитела обладают необычными свойствами. Моноклональные антитела VN04-13 и 777/1 распознавали аминокислотные остатки, локализованные в разных антигенных сайтах. Так, резистентность к моноклональному антителу VN04-13 возникала как при аминокислотной замене в позициях 140 и 145, локализованных в сайте, соответствующем сайту А у подтипа H3, так и при замене в позиции 193 в сайте, соответствующем сайту В у подтипа H3. Способность некоторых моноклональных антител перекрывать два антигенных сайта в гемагглютинине подтипа H5 обусловлена, вероятно, близостью этих сайтов в трёхмерной структуре молекулы, что является особенностью гемагглютинина H5, отличающей его от гемагглютинина подтипа H3.

Вирус H5N1 при распространении быстро эволюционировал. Возникли многочисленные варианты, различающиеся как по набору генов внутренних и неструктурных белков, так и по антигенным свойствам поверхностных гликопротеинов. Вариант, впервые выделенный в районе озера Цинхай в Китае и принадлежащий к субклайду 2.2 [8], широко распространился в Западной Сибири, в Европе, на Ближнем Востоке, в Африке. Особенности антигенной структуры гемагглютинина этого варианта вируса H5N1 представляли значительный интерес. Поэтому нами было проведено

исследование антигенных эпитопов, распознаваемых нейтрализующими моноклональными антителами против штамма A/duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1), выделенного сотрудниками отдела экологии вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» и принадлежащего к Цинхай-Сибирской ветви вирусов H5N1 [5]. Моноклональные антитела были получены в лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» [3] и использованы для селекции эскейп-мутантов. В качестве вируса дикого типа был использован не штамм A/duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1), против которого были получены моноклональные антитела, а вирус A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), использованный в наших первых исследованиях по картированию антигенных сайтов гемагглютинина H5 [14]. Этот выбор вируса дикого типа был обусловлен не только низкой вирулентностью вируса A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), позволяющей работать с ним в обычных условиях, но и желательностью использования одного и того же гемагглютинина при сопоставлении специфичности моноклональных антител против разных вариантов вируса. Были получены 15 эскейп-мутантов [25]. Перекрестные иммунологические реакции с моноклональными антителами и секвенирование мутантных генов гемагглютинина позволили выявить у эскейп-мутантов не только идентифицированные в предыдущих работах замены в позициях 126, 143, 145 и 166, но и новые аминокислотные замены в 5 позициях (120, 124, 125, 125a и 128), а также замену в позиции 122, описанную ранее для вируса A/turkey/Ontario/7732/66 (H5N9). При этом позиция 122, описанная Philpott et al. [23] как принадлежащая к сайту, не имеющему аналогов у подтипа H3, оказалась частью единого протяженного сайта, включающего аминокислотные остатки, соответствующие сайту B у H3 и сайту Sa у подтипа H1. В целом картирование с использованием моноклональных антител против гемагглютинина вируса A/duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1) позволило не только выявить особенности эпитопов, распознаваемых антителами против вирусов Цинхай-Сибирского генотипа, но и существенно расширить картину локализации и структуры антигенных сайтов гемагглютинина H5.

В целом, проведенная нами работа по антигенному картированию молекулы гемагглютинина подтипа H5 позволила раскрыть не только локализацию, но и детальную структуру двух наиболее важных антигенных сайтов, локализованных в латеральной петле и на дистальной поверхности глобулы, но и получить столь детальное представление об антигенной структуре гемагглютинина H5, какое было ранее достигнуто только для гемагглютининов подтипов H1 и H3 (рис. 1.A).

Среди других подтипов гемагглютинина вируса гриппа A особого внимания заслуживает гемагглютинин подтипа H9. Вирус с гемагглютинином этого подтипа циркулирует преимущественно среди птиц, но он неоднократно был выделен от свиней, а также вызывал спорадические случаи заболеваний человека [22]. После публикации трёхмерной структуры гемагглютинина этого подтипа [10, 11] возникла возможность определения локализации и структуры его антигенных сайтов. Эта работа была выполнена нами с использованием панели моноклональных антител против вируса A/swine/Hong Kong/9/98 (H9N2), полученных в Отделе вирусологии и молекулярной биологии Детской Клиники Сент-Джуд (Мемфис, США). В качестве вируса дикого типа для генерации эскейп-мутантов был использован вариант вируса A/swine/Hong Kong/9/98 (H9N2), адаптированный к мышам. Селекция 18 эскейп-мутантов с последующей характеристикой их в перекрестных иммунологических реакциях с моноклональными антителами и секвенированием мутантных генов позволила выявить 9 аминокислотных позиций, распознаваемых антителами. Данные перекрестных иммунологических реакций показали, что эти позиции сгруппированы в два частично перекрывающихся антигенных эпитопа [15]. В трёхмерной структуре гемагглютинина антигенные сайты локализованы на дистальной поверхности глобулы гемагглютинина [16]. В один сайт входят аминокислотные остатки 157 и 162, в другой – остатки 135, 145, 193 и 226, а остатки 133, 188 и 189 находятся в зоне перекрывания. При этом аминокислотные

остатки в антигенных сайтах сгруппированы совершенно иначе, чем у других подтипов гемагглютинаина. Остатки 157, 162 и 193 входят в сайт В у подтипа Н3, а у подтипа Н9 остатки 157 и 162 локализованы в одном сайте, а 193 – в другом. Напротив, остатки 145 и 193 у подтипа Н3 в разных сайтах, а у подтипа Н9 – в одном (рис. 1.Б). Столь резкие отличия гемагглютинаина подтипа Н9 от подтипа Н3 и от всех остальных картированных к настоящему времени подтипов коррелируют с особенностями трёхмерной структуры гемагглютинаина Н9, который, в отличие от других подтипов, не имеет латеральной петли [10, 11].

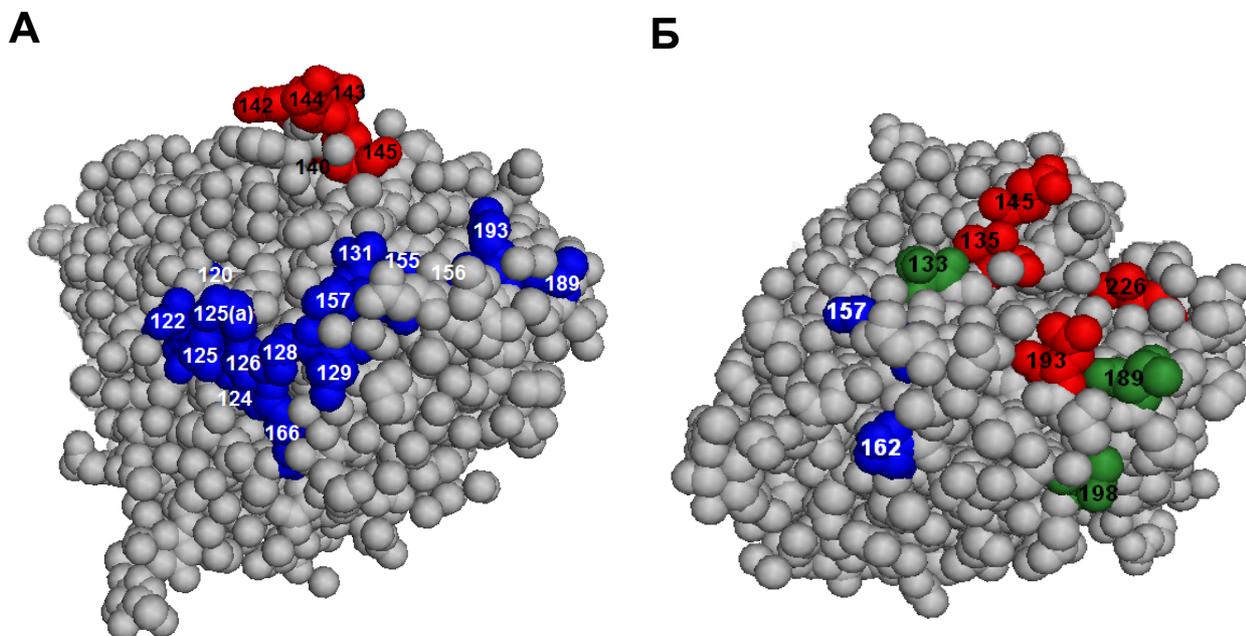


Рисунок 1. Локализация антигенных сайтов в трёхмерной структуре гемагглютинаина подтипов Н5 (А) и Н9 (Б). Вид с вершины глобулы. Нумерация аминокислотных остатков по подтипу Н3. Трёхмерная структура построена по данным Protein Data Bank (номера файлов PDB 1JSM, 1JSD). Для подтипа Н5 сайт, аналогичный сайту А у Н3, обозначен красным цветом, сайт, аналогичный сайту В – синим. Для Н9 сайты обозначены красным и синим, зона перекрытия – зеленым.

Распределение аминокислотных остатков по антигенным сайтам для разных подтипов гемагглютинаина с учетом полученных нами данных, а также номенклатура антигенных сайтов у разных подтипов, представлены в табл. 1. Следует отметить, что номенклатура, предложенная для подтипов Н2 и Н5, не получила сколько-нибудь широкого распространения, и антигенные сайты обычно обозначаются так, как предложено либо для подтипа Н3, либо для подтипа Н1.

Вирус гриппа А очень быстро эволюционирует, и поэтому перед исследователями стоит задача не только антигенного картирования гемагглютининов тех подтипов, которые не были ранее картированы, но также выявления особенностей антигенной структуры новых вариантов вируса, появляющихся в ходе эволюции тех подтипов, которые уже были ранее картированы. Такая задача делается особенно актуальной, если появляется новый вариант вируса гриппа человека, вызывающий мощную эпидемическую вспышку. Пандемия 2009 г. была вызвана новым вариантом вируса гриппа А подтипа Н1Н1 [9], возникшим в результате скрещивания двух вирусов гриппа свиней: классического североамериканского и европейского [21]. Новый вирус значительно отличался по антигенным свойствам от циркулировавшего в предшествующие годы вируса подтипа Н1Н1 [28]. Представлялось важным выявить особенности антигенных эпитопов, распознаваемых в молекуле НА антителами к пандемическому вирусу 2009 г.. Следует отметить, что для подтипа Н1 ещё в 1982 г. были выявлены аминокислотные остатки, образующие антигенные сайты [7]. Поэтому при картировании антигенной структуры гемагглютинаина вируса 2009 г. задача

состояла не в выявлении новых областей молекулы, вовлеченных во взаимодействие с антителами, а в идентификации тех аминокислотных остатков в пределах уже известных сайтов, которые распознаются именно антителами против пандемического вируса. В научной литературе имеются лишь два сообщения [18, 20], в которых были получены и охарактеризованы эскейп-мутанты пандемического вируса, причем были выявлены лишь 4 аминокислотные позиции, распознаваемые моноклональными антителами (позиции 125, 157, 158 и 166). Это побудило нас провести антигенное картирование гемагглютинина пандемического вируса 2009 г. [24]. Для селекции эскейп-мутантов нами были использованы моноклональные антитела против первого изолята пандемического вируса на территории России, штамма A/IV-Moscow/01/09 (H1N1) pdm09 [4], полученные в лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» [2]. В качестве вируса дикого типа для селекции эскейп-мутантов был использован вирус-реассортант, содержащий гены гемагглютинина и нейраминидазы штамма A/IV-Moscow/01/09 (H1N1) pdm09, а остальные гены высокопродуктивного штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) [1]. Селекция 27 эскейп-мутантов была проведена в 2 этапа. На первом этапе были получены 18 эскейп-мутантов. Пять эскейп-мутантов первого поколения были использованы для селекции 11 эскейп-мутантов второго поколения. Перекрёстные иммунологические реакции и секвенирование мутантных генов гемагглютинина позволили выявить позиции 5 аминокислотных остатков, распознаваемых нейтрализующими моноклональными антителами против вируса A/IV-Moscow/01/09 (H1N1) pdm09, из которых 4 позиции (129, 156, 158 и 159) были локализованы в антигенном сайте Sa, и одна позиция (190) в сайте Sb (рис. 2).

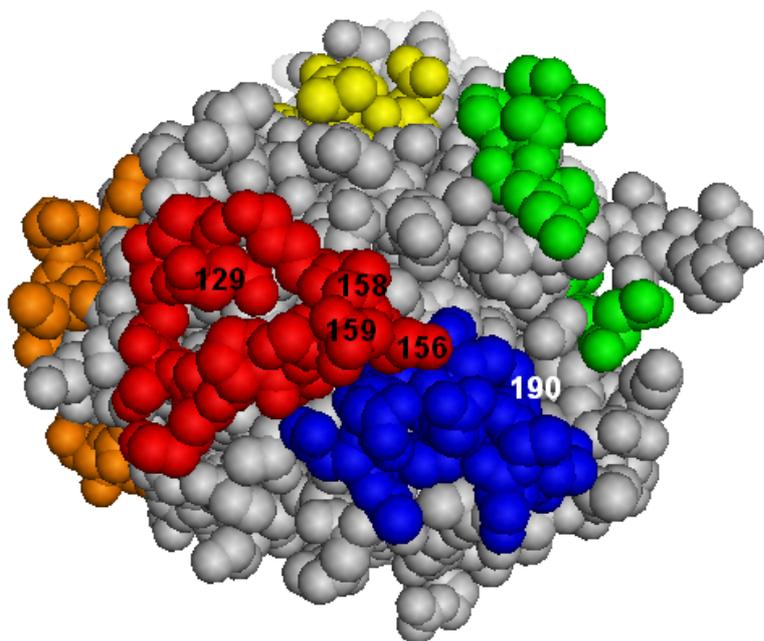


Рисунок 2.
Локализация аминокислотных замен у эскейп-мутантов вируса гриппа A/IV-Moscow/01/09 (H1N1) pdm09 в антигенных сайтах подтипа H1. Аминокислотные позиции обозначены в нумерации H3. Трёхмерная структура построена по данным Protein Data Bank (номер файла PDB 3LZG). Красным, синим, оранжевым, зеленым и желтым обозначены сайты Sa, Sb, Ca1, Ca2, Cb.

Наши данные показывают, что область молекулы HA, индуцирующая образование вируснейтрализующих антител, у пандемического вируса 2009 г. соответствует ограниченной области на вершине глобулы HA и не охватывает всю варьирующую при дрейфе область молекулы HA подтипа H1. Возможно, что ограниченность варьирующей области, на которую указывают наши данные, частично объясняет слабо выраженный антигенный дрейф нового пандемического вируса.

Аминокислотные замены, выявленные нами у эскейп-мутантов подтипа H1 в позициях 129, 156, 158 и 159 приводили к снижению электростатического заряда

поверхности глобулы гемагглютинина. Известно, что снижение электростатического заряда вблизи от рецептор-связывающего кармана может приводить к ослаблению взаимодействия гемагглютинина с сиаловыми рецепторами [12]. Анализ рецептор-связывающей активности у эскейп-мутантов вируса A/IV-Moscow/01/09 (H1N1) pdm09 показал, что замена на аминокислоту, несущую отрицательный заряд, приводит к снижению связывания с α 2-3-сиалозидами [24]. Следует отметить, что выявленные нами аминокислотные замены у эскейп-мутантов пандемического вируса 2009 г., обеспечивающие устойчивость к нейтрализующим антителам, редко выявляются у изолятов циркулирующего вируса. Поиск в GenBank показал, что среди 9 019 аминокислотных последовательностей HA штаммов вирусов гриппа А подтипа H1N1, выделенных в 2009–2011 гг., только 163 штамма содержали те же аминокислотные замены, что были обнаружены у эскейп-мутантов, селекционированных моноклональными антителами к вирусу A/IV-Moscow/01/09 (H1N1) pdm09. Чаще других встречалась аминокислотная замена N129D, особенно в 2010–2011 гг., тогда как остальные замены быстро исчезли при циркуляции вирусов H1N1 (табл. 2). Возможно, что это обусловлено ослаблением жизнеспособности вируса в результате снижения сродства к клеточным рецепторам, которое показано в нашей работе для эскейп-мутантов с соответствующими заменами.

Таблица 2. Аминокислотные замены в HA у штаммов вируса гриппа А подтипа H1N1, выделенных в 2009-2011 гг., идентичные тем, которые были обнаружены у эскейп-мутантов.

Аминокислотные замены	Год		
	2009	2010	2011
N129D	6	78	30
N129S	1	0	4
K156E	11	3	1
G158E	15	1	1
N159D	3	1	3
D190N	5	0	0

Все приведенные выше данные касаются быстро варьирующих участков молекулы гемагглютинина, изменения которых ответственны за эволюцию внутри подтипа (в частности, за антигенный дрейф у вирусов гриппа человека). Однако в последние годы накапливается всё больше данных о консервативных антигенных эпитопах, сходных у штаммов в пределах подтипа, а иногда и в более широких пределах. Первый такой эпитоп, общий для вирусов подтипов H1, H2, H5 и H6, был описан в работе, выполненной в лаборатории субвирусных структур ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» [6]. Эпитоп локализован не на глобуле гемагглютинина, а на его стебле, в районе сайта разрезания. Связывание антитела с этим районом молекулы не должно мешать взаимодействию гемагглютинина с клеточным сиаловым рецептором, но, вероятно, препятствует слиянию оболочки вируса с клеточной мембраной. Распознавание этого участка антителами у гемагглютинина разных подтипов объясняется намного большей консервативностью этого участка полипептидной цепи гемагглютинина по сравнению с участками глобулы, окружающими рецептор-связывающий карман. Однако недавно был обнаружен консервативный эпитоп и на глобуле [17]. Детальное изучение таких консервативных эпитопов, в отличие от быстро варьирующих классических антигенных сайтов, важно не столько для понимания эволюции вируса гриппа А, сколько для перспектив получения в будущем биотехнологических противогриппозных вакцин широкого профиля.

Рациональное сочетание кристаллографических, иммунологических и молекулярно-генетических методов позволило за последние три десятилетия добиться очень глубокого

понимания связи между иммунологическими свойствами и структурными характеристиками гемагглютинаина вируса гриппа. Тем не менее, в этой области знания намного больше неизвестного, чем известного. Картирование антигенных сайтов в трёхмерной структуре молекулы проведено лишь для немногих подтипов гемагглютинаина. Кроме того, продолжающаяся эволюция вируса гриппа ставит перед исследователями новые неожиданные задачи даже в отношении исследования тех подтипов, для которых картирование уже было проведено, как мы это видим на примере пандемического вируса 2009 г.. Вирус гриппа продолжает оставаться не только проблемой для медицины и ветеринарии, но и интереснейшим объектом для молекулярной биологии вирусов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Игнатъева А.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А.* и др. Высокопродуктивный вирус-реассортант, содержащий гемагглютинин и нейраминидазу пандемического вируса гриппа A/Moscow/01/2009 (H1N1) // Вопросы вирусологии. – 2010. – Т. 56. – № 4. – С. 9–14.
2. *Климова Р.Р., Масалова О.В., Бурцева Е.И.* и др. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа A/IV-Moscow/01/09 (H1N1) swl, обладающие высокой вируснейтрализующей активностью // Вопросы вирусологии. – 2011. – Т. 56. – № 3. – С. 15–20.
3. *Куц А.А., Климова Р.Р., Масалова О.В.* и др. Получение и свойства моноклональных антител к высокопатогенному штамму вируса гриппа птиц А (H5N1), выделенного на территории Российской Федерации // Вопросы вирусологии. – 2008. – Т. 53. – № 5. – С. 9–14.
4. *Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г.* и др. Изоляция 24.05.09 и депонирование в государственную коллекцию вирусов (ГКВ 2452 от 24.05.09) первого штамма A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1) swl, подобного свиному вирусу А(H1N1) от первого выявленного 21.05.09 больного в Москве // Вопросы вирусологии. – 2009. – Т. 54. – № 5. – С. 10–14.
5. *Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г.* и др. Изоляция штаммов вируса гриппа А / H5N1 от домашних и диких птиц в период эпизоотии в Западной Сибири (июль 2005 г.) и их депонирование в государственную коллекцию вирусов (08 августа 2005 г.) // Вопросы вирусологии. – 2006. – Т. 51. – № 1. – С. 11–14.
6. *Смирнов Ю.А., Липатов А.С., Окуно И., Гительман А.К.* Общий антигенный эпитоп в гемагглютинине вирусов гриппа А (H1, H2, H5, H6) // Вопросы вирусологии. – 1999. – Т. 44. – С. 111–115.
7. *Caton A.J., Browlee G.G., Yewdell J.W., Gerhard W.* The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype) // Cell. – 1982. – V. 31. – P. 417–427.
8. *Chen H., Smith G.J., Zhang S.Y., et al.* Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl // Nature. – 2005. – V. 436. – P. 191–192.
9. *Dawood F.S., Jain S., Finelli L., et al.* Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans // N. Engl. J. Med. – 2009. – V. 360. – P. 2605–2615.
10. *Ha Y., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C.* X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98. – P. 11181–11186.
11. *Ha Y., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C.* H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes // EMBO J. – 2002. – V. 21. – P. 865–875.
12. *Kaverin N.V., Gambaryan A.S., Bovin N.V., et al.* Postreassortment changes in influenza A virus hemagglutinin restoring HA-NA functional match // Virology. – 1998. – V. 244. – P. 315–321.
13. *Kaverin N.V., Rudneva I.A., Govorkova E.A., et al.* Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies // J. Virol. – 2007. – V. 81. – P. 12911–12917.
14. *Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., et al.* Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants // J. Gen Virol. – 2002. – V. 83. – P. 2497–2505.

15. *Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., et al.* Structural differences among hemagglutinins of influenza A virus subtypes are reflected in their antigenic architecture: analysis of H9 escape mutants // *J. Virol.* – 2004. – V. 78. – P. 240–249.
16. *Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., et al.* Differences and similarities in the structure in the structure of the antigenic epitopes on influenza A virus hemagglutinin molecule of different subtypes // *Options for the Control of Influenza, International Congress Series.* – 2004. – V. 1263. – P. 682–686.
17. *Krause J.C., Tsibane T., Tumpey T.M., et al.* A broadly neutralizing human monoclonal antibody that recognizes a conserved, novel epitope on the globular head of the influenza H1N1 virus hemagglutinin // *J. Virol.* – 2011. – V. 85. – P. 10905–10908.
18. *Krause J.C., Tumpey T.M., Huffman C.J., et al.* Naturally occurring human monoclonal antibodies neutralize both 1918 and 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – P. 3127–3130.
19. *Lipatov A.S., Govorkova E.A., Webby R.J., et al.* Influenza: emergence and control // *J. Virol.* – 2004. – V. 78. – P. 8951–8959.
20. *Manicassamy B., Medina R.A., Hai R., et al.* Protection of mice against lethal challenge with 2009 H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines // *PLoS Pathogens.* – 2010. – V. 6. – P. 1–14.
21. *Neumann G., Noda T., Kawaoka Y.* Emergence and pandemic potential of swine origin H1N1 influenza virus // *Nature.* – 2009. – V. 459. – P. 931–939.
22. *Peiris M., Yuen K.Y., Leung C.W., et al.* Human infection with influenza H9N2 // *Lancet.* – 1999. – V. 354. – P. 916–917.
23. *Philpott M., Hioe C., Sheerar M., Hinshaw V.S.* Hemagglutinin mutations related to attenuation and altered cell tropism of a virulent avian influenza A virus // *J. Virol.* – 1990. – V. 64. – P. 2941–2947.
24. *Rudneva I.A., Ignatieva A.V., Timofeeva T.A., et al.* Escape mutants of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus: Variations in antigenic specificity and receptor affinity of the hemagglutinin // *Virus Res.* – 2012. – V. 166. – P. 61–67.
25. *Rudneva I.A., Kushch A.A., Masalova O.V., et al.* Antigenic epitopes in the hemagglutinin of Qinghai-type influenza H5N1 virus // *Viral Immunol.* – 2010. – V. 23. – N 2. – P. 181–187.
26. *Skehel J.J., Stevens D.J., Daniels R.S., et al.* A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1984. – V. 81. – P. 1779–1783.
27. *Smirnov Y.A., Lipatov A.S., Van Beek R., et al.* Characterization of adaptation of an avian influenza A (H5N2) virus to a mammalian host // *Acta Virologica.* – 2000. – V. 44. – P. 1–8.
28. *Smith G.J., Vijayakrishna D., Bahl J., et al.* Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic // *Nature.* – 2009. – V. 459. – P. 1122–1126.
29. *Stevens J.O., Blixt T.M., Tumpey J.K., et al.* Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus // *Science.* – 2006. – V. 312. – P. 404–410.
30. *Tong S., Li Y., Rivailler P., et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109. – P. 4269–4274.
31. *Tsuchiya E., Sugawara K., Hongo S., et al.* Antigenic structure of the haemagglutinin of human influenza A/H2N2 virus // *J. Gen. Virol.* – 2001. – V. 82. – P. 2475–2484.
32. *Wiley D.C., Wilson I.A., Skehel J.J.* Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation // *Nature.* – 1981. – V. 289. – P. 373–378.
33. *Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C.* Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution // *Nature.* – 1981. – V. 289. – P. 366–373.