

## pH-зависимые перестройки в структуре вируса гриппа А

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва

Вирус гриппа имеет два структурных модуля: внутренний рибонуклеопротеид (РНП), содержащий вирусную геномную РНК, и наружную липидную оболочку, в которую встроены трансмембранный белок ионных каналов М2 и вирусные гликопротеиды гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА), формирующие шипы (спайки) на поверхности вирионов. Оба модуля связаны в вирионе посредством матричного белка М1. Изучено влияние кислой среды с pH 4,2–4,5 на вирус гриппа, выращенный в культуре клеток почки собаки (линия MDCK). Вирус A/Aichi/2/68 (H3N2), синтезированный в MDCK, содержал нерасщепленную форму гемагглютинина HA0 (мол. масса 78 кД). Такие вирионы были резистентными к кислой среде и непроницаемыми для фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК), используемой в качестве контрастирующего красителя для электронной микроскопии, и не снижали своих инфекционных свойств после кислотной обработки. После расщепления поверхностного гемагглютинина HA0 на HA1+HA2 трипсином вирус приобретал чувствительность к кислой среде и после кислотной обработки становился проницаемым для ФВК, а также терял инфекционную активность и имел более жесткую связь вирусного РНП с белковым матриком М1. Эти данные указывают на то, что структурная форма расщепленного гемагглютинина на поверхности вириона координирует трансмембранное взаимодействие между внешними и внутренними компонентами вируса гриппа.

Ключевые слова: *вирус гриппа; структура; кислый pH.*

### pH-dependent rearrangements in the influenza A virus

Zhirnov O. P., Manykin A. A.

D.I. Ivanovsky Institute of Virology of Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

The Influenza virus possesses two modules: internal ribonucleoprotein (RNP) containing the viral genome RNA and external lipid envelope with transmembrane ionic channel protein M2 and embedded glycoproteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) forming surface spike ends. These modules are combined in a whole virion by the matrix protein M1. The effect of the acidic pH 4,2–4,5 on the influenza virus grown in MDCK-H cells was tested. The A/Aichi/68 (H3N2) virus synthesized in MDCK-H cells was shown to contain uncleaved HA0 (m.w. 78 kD) and provide low infectivity. This virus was resistant to acidic medium and non-permeable to the phosphotungsten acid (PTA) used in electron microscopy as a contrast stain, and did not reduce infectious potential after acidic treatment. The trypsin-activated virus containing cleaved HA1 (56 kD)+HA2 (22 kD) was sensitive to acidic exposition resulting in the appearance of permeability to PTA, reduction of infectivity, enhancement of the M1-RNP interlink. These data indicate that the structural form of the cleaved HA1+HA2 surface hemagglutinin coordinates a transmembrane interaction between surface and internal virus components.

Key words: *influenza virus; structure; acidic pH.*

### Вступление

Вирус гриппа А относится к оболочечным вирусам. Этот вирус имеет два структурных модуля: внутренний рибонуклеопротеид (РНП), содержащий вирусную геномную РНК, и наружную двуслойную липидную оболочку, в которую встроены вирусные гликопротеиды гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА), формирующие шипы (спайки) на поверхности вирионов, и трансмембранный белок ионных каналов М2 [8]. Оба указанных модуля соединены в вирионе так называемым матричным белком М1, который частично погружен во внутренний липидный листок мембраны и дополнительно взаимодействует с внутренним РНП [1, 10]. Для выполнения этой функции М1 содержится в вирионе в количестве около 1000 молекул, достаточном для формирования белковой сети по всей внутренней сфере вирусной частицы, имеющей диаметр около 100 нм [12].

Природа межмолекулярных взаимодействий внутри вирусной частицы и их трансмембранные контакты и чувствительность к внешней среде остаются малоизвестными. В частности, известно, что связь вирусного РНП с матриком М1 внутри вириона чувствительна к кислому pH в диапазоне 4–5,5 [12]. При таком pH матричный белок М1 теряет связь с РНП и становится легко растворимым, несмотря на свои высокогидрофобные свойства

[13]. Этот механизм имеет критическое значение при внедрении вируса в клетку-мишень, когда в кислой среде клеточной эндосомы происходят последовательное слияние липидных мембран вируса и эндосомы, диссоциация белка М1 из вириона и внутриклеточный выход из вириона свободного вирусного РНП. Этот процесс получил название вирусного разведения [7]. Процесс разведения критически зависит от структурной формы поверхностного НА. Этот белок синтезируется в форме предшественника HA0 (мол. масса 75 кД) и затем расщепляется клеточной протеазой трипсиновой специфичности на два фрагмента – HA1 (56 кД) и HA2 (22 кД), которые сохраняют дисульфидную связь. В вирионах могут присутствовать обе формы, HA0 и HA1/HA2, но при этом вирионы с HA0 не способны выполнять функцию слияния липидных мембран вируса и клеточной эндосомы и поэтому оказываются неинфекционными из-за неспособности внедряться в клетку-мишень, а вирионы, содержащие хотя бы часть молекул в расщепленной форме HA1/HA2, имеют высокую сливающую мембраны активность и высокую инфекционность для клеток-мишеней [16].

В настоящей работе предпринята попытка изучить влияние кислого pH наружной среды на внутривирионные контакты молекул и биологические свойства вирио-

нов и определить участие наружных гликопротеидов в передаче внешнего воздействия кислой среды на внутреннюю структуру вириона. Обнаружено, что короткая экспозиция вирионов в слабокислой среде приводит к усилению внутривирионного взаимодействия между матриксом М1 и РНП, которое, по всей вероятности, затрудняет выход свободного РНП после растворения липидной оболочки вируса. Медиатором влияния кислого рН служил НА, поскольку только его расщепленная форма НА1+НА2 вызывала проницаемость вириона для кислой среды и проникновение контрастного красителя внутрь вириона при электронной микроскопии. Вирионы с нерасщепленным гемагглютинином НА0 оказывались устойчивыми к влиянию кислого рН и непротекаемыми для кислой среды и контрастного вещества при электронно-микроскопическом исследовании. Полученные данные указывают на то, что расщепление поверхностного гликопротеида НА0 вызывает трансмембранную перестройку внутренней структуры вириона, в результате которой вирус становится чувствительным к внешнему воздействию кислым рН. Таким образом, можно заключить, что в вирусе гриппа существует трансмембранный механизм кооперативного взаимодействия внутренних структур с наружными гликопротеидами и ионными каналами липидной оболочки вируса.

### Материалы и методы

**Вирус и клетки.** Культуры эпителиальных клеток почки сабаки (МДСК-Н) культивировали в минимальной среде Дульбеко (DMEM) с добавлением 10% фетальной сыворотки коров (Gibco BRL) и антибиотиков (гентамицин, 25 мкг/мл; пенициллин – 50 ЕД/мл; стрептомицин – 50 мкг/мл). Культура клеток получена из коллекции клеточных культур Института вирусологии г. Марбурга (Германия).

**Выращивание и фракционирование вируса.** Вирус гриппа штамм А/Аichi/2/68 (H3N2) выращивали в культуре МДСК-Н в среде DMEM без сыворотки в течение 15 ч. Вирусосодержащую культуральную жидкость осветляли центрифугированием при 8500 об/мин в течение 20 мин и далее осаждали через раствор глицерола, содержащего неионный детергент NP-40 [12]. Образцы культуральной жидкости центрифугировали через 2 мл 35% раствора глицерола, приготовленного на фосфатном буфере (ФБ) (10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,2; 2,7 мМ KCl; 137 мМ NaCl) при 20 000 об/мин в течение 90 мин в роторе SW-55.1 (Spinko L7). Полученные вирусные осадки суспендировали в ФБ и подвергали обработке различными рН в течение 30 мин. Далее вирусные образцы в объеме 3 мл помещали в пробирку для ротора SW-55.1 и подслаивали 2,7 мл 30% раствора глицерола, содержащего 100 мМ NaCl, 2,5 мМ Na-ацетатного буфера (рН 4,2), 0,3% NP-40 либо глицерол аналогичного состава, но содержащий 20 мМ трис-HCl (рН 8,0) вместо Na-ацетатного буфера. Сформированные пробирки центрифугировали в роторе SW-55.1 при 27 000 об/мин в течение 3 ч при 10°C для осаждения субвирусных структур вируса. Осадки (фракция субвирусных частиц) после центрифугирования растворяли в 0,5% растворе додецилсульфата натрия (ДСН) и анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГ).

**Очистка вирусов.** Культуральную жидкость в объеме 2,5 мл центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 мин (5°C) для удаления клеточных обломков. Полученный супернатант наслаивали на 2,5 мл 20% сахарозы, приготовленной на ФБ, и центрифугировали в роторе SW 55.1 (Spinko L7) при 25 000 об/мин в течение 2 ч (10°C). Полученные вирусные осадки суспендировали в 1% ДСН и исследовали с помощью электрофореза в ПАГ.

**Электрофорез в ПАГ и вестерн-блот (ВБ) анализ.** Полипептиды вирусных препаратов и субвирусных фракций фракционировали в ПАГ, содержащем ДСН, и из геля белки переносили на нитроцеллюлозную бумагу Protran 0,45 мк (Schleicher & Schuell, Германия) полусухим методом [14]. Мембрану промывали в ФБ, инкубировали 2 ч в 3% обезжиренном молоке и далее в течение 2 ч в ФБ, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) и специфические антитела к вирусным белкам NP и М1. Затем мембрану обрабатывали видоспецифическим конъюгатом пероксидазы хрена (Dako, ) с последующей усиленной идентификацией позитивных компонентов с помощью усиленной хемилюминесценции (ECL) с суперсубстратом (Pierce, ) [14].

**Метод вирусных центров в клеточной культуре.** 2-Дневную культуру клеток МДСК-Н инкубировали в течение 1 ч при 37°C с разведениями вирусов, приготовленными на среде DMEM. Через 7–8 ч клеточные культуры фиксировали 4% пара-формальдегидом и последовательно инкубировали с вирусными анти-Н3-антителами и антивидовым конъюгатом пероксидазы хрена. Единичные инфицированные клетки (вирусные центры) окрашивали тетраметилбензидиновым субстратом "True Blue" (KPL). Центры инфекции (ЦОЕ – центробразующие единицы) подсчитывали на 1 мл исследуемой суспензии в световом микроскопе при 75-кратном увеличении [15].

**Электронная микроскопия.** Культуральную жидкость, содержащую вирус, осветляли при 8500 об/мин в течение 15 мин и наносили на медные электронно-микроскопические сетки, на которых монтировали формвар-углеродные пленки. Перед нанесением материала пленки выдерживали в газовом разряде в вакуумной установке в течение 30 с для обеспечения гидрофильности подложек. Подложки промывали 3 раза в ФБ и 1 раз деионизированной водой для удаления неадсорбированного на подложке материала и солей. Затем нанесенный материал контрастировали 1% раствором ФВК с рН 7 в течение 2 мин. Полученные вирусные препараты исследовали в электронном микроскопе JOEL-100S (Япония) при увеличении 20 000.

### Результаты

Вирус А/Аichi/2/68 (H3N2) размножали в культуре клеток МДСК (линия Н) и анализировали форму его гемагглютинина. Установили, что вирус, продуцируемый этими клетками, содержал только нерасщепленный гемагглютинин НА0 (мол. масса 75 кД). В результате обработки вируса трипсином происходил переход НА0 в расщепленное состояние НА1+НА2 (мол. масса 50 и 25 кД соответственно) (рис. 1). При определении инфекционной активности полученных вирусных препаратов выявили более чем 1000-кратное усиление инфекционности вируса после обработки трипсином (табл. 1).

Полученные образцы вируса с НА0 и НА1/НА2 испытывали на чувствительность к кислой среде. С этой целью вирус инкубировали в течение 30 мин в среде DMEM, разведенной в 2 раза водой и содержащей 3 мМ Na-ацетатного буфера с рН 4,2. После инкубации для нормализации рН добавляли 1 М трис-HCl (рН 8,0) до конечной концентрации 100 мМ. В контрольных образцах к вирусу добавляли одновременно 1 М трис-HCl и Na-ацетатный буфер до аналогичных конечных концентраций. Полученные образцы контрольного и обработанного кислым рН вируса исследовали: инфекционность методом образования инфекционных центров; структуру вируса с помощью электронной микроскопии; устойчивость связи внутреннего РНП с белковым матриксом М1 методом фракционирования субвирусных структур

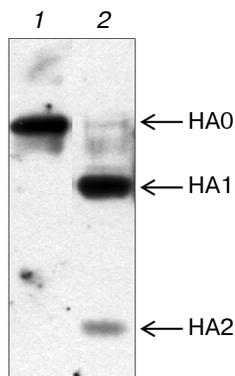


Рис. 1. Профиль НА у вируса гриппа A/Aichi/2/68 в культуре клеток MDCK-H.

Клеточную культуру MDCK-H заражали вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2) с множественностью инфекции 1 и инкубировали 15 ч в среде ДМЕМ без сыворотки. Культуральную жидкость делили на две части, одну из которых обрабатывали трипсином 10 мкг/мл в течение 1 ч (дор.2), а другую оставляли без обработки (дор. 1). Вирус осаждали через раствор глицерола и подвергали электрофорезу в ПАГ с последующим ВБ-анализом. Белки HA0 и HA1/HA2 идентифицировали с помощью анти-H3-антител и антивидового пероксидазного конъюгата методом усиленной хемилюминесценции.

после растворения наружной липидной мембраны нейонным детергентом.

Инфекционность вирусных препаратов определяли методом инфекционных центров в клеточной культуре MDCK-H. Для того чтобы определить реальную и потенциально возможную инфекционность, каждый вирусный образец исследовали в двух вариантах: без и с обработкой препарата трипсином соответственно. Предобработка трипсином позволяла установить потенциальную инфекционность препарата после ее активации в результате расщепления HA0 на HA1/HA2. В табл. 2 приведены результаты типичного эксперимента. Вирус, содержащий HA0, имел низкий уровень инфекционности, который возрастал более чем в 1000 раз после обработки трипсином (препарат №1 в табл. 1). Обработка такого вируса кислым рН не изменяла его инфекционных свойств (препарат №2 в табл. 1). Вполне очевидно, что вирус, содержащий расщепленный HA1/HA2, имел сходный высокий уровень реальной и потенциальной

Таблица 1

Инфекционная активность вируса A/Aichi/2/68 после обработки трипсином и кислым рН

Вирус*	№ препарата	Обработка кислым рН	Повторная обработка трипсином	Инфекционный титр, ЦОЕ/мл
Неактивированный вирус с HA0	1	-	-	$0,25 \cdot 10^4$
		-	+	$0,73 \cdot 10^7$
	2	+	-	$0,11 \cdot 10^4$
		+	+	$0,56 \cdot 10^7$
Активированный вирус с HA1+HA2	3	-	-	$0,43 \cdot 10^7$
		-	+	$0,78 \cdot 10^7$
	4	+	-	$0,21 \cdot 10^4$
		+	+	$0,11 \cdot 10^4$

Примечание. \* – вирус гриппа A/Aichi/2/68 выращивали в культуре клеток MDCK-H (препарат № 1, 2), обрабатывали трипсином (препарат № 3, 4), экспонировали в кислой среде с рН 4,2 и затем повторно обрабатывали трипсином, как описано в «Материалах и методах». Инфекционную активность полученных образцов культуральной жидкости определяли методом инфекционных центров в монослое MDCK-H в ЦОЕ на 1 мл исходной культуральной жидкости.

инфекционности (препарат №3 в табл. 1). Однако после обработки такого вируса кислым рН отметили заметное снижение его инфекционных свойств практически до эндогенного уровня (препарат №4 в табл. 1). Важно указать, что при определении гемагглютинирующей и нейраминидазной активности вируса до и после обработки кислым рН наблюдали отсутствие изменений обеих активностей в результате кратковременного действия кислого рН (не показано). Полученные данные свидетельствуют, что кислый рН вызывает изменение внутренней структуры вируса и передача такого воздействия внутрь вируса специфически зависит от расщепленной формы гемагглютинина HA1/HA2.

Для исследования структуры вирионов применили метод электронной микроскопии с контрастированием ФВК в нейтральной среде. В препарате нативного вируса с HA0 обнаруживали типичные вирусные частицы преимущественно округлой формы диаметром около 90 нм, на поверхности которых выявляли характерные шипы размером около  $10 \pm 2,1$  нм, представляющие собой структуры из HA и NA (см. табл. 2, рис. 2, а). При инкубации суспензии нативного вируса гриппа с HA0 при кислых рН не отмечали заметных изменений размера и формы частиц и также наблюдали округлые частицы с шипами по периферии липидной оболочки. Лишь на некоторых частицах отметили слабое локальное разрушение шипов оболочки (рис. 2, б).

При инкубации нативного вируса гриппа с трипсином мы наблюдали преимущественно округлые вирионы обычного размера с хорошо выявляемыми шипами на поверхности частиц (см. табл. 2, рис. 2, в). На рис. 2, г–ж представлены вирионы, активированные трипсином и дополнительно обработанные кислым рН. На этих микрофотографиях выявляли уменьшение количества шипов на поверхности частиц; на некоторых вирионах обнаружили зоны с полным отсутствием шипов (частичное отсутствие шипов показано толстой стрелкой на рис. 2, з). В вирионах с частичным отсутствием шипов определяли структуры грибовидных шипов, типичных для NA, в то время как гемагглютининовые столбикообразные шипы различить не удавалось. Вполне вероятно, что шипы HA теряли свою структуру в результате кислотной трансформации, тогда как нейраминидазные шипы сохраняли свою структуру.

В активированных вирионах с HA1/HA2, экспонированных в кислой среде, удавалось различить внутреннюю структуру в результате протекания ФВК внутрь вириона (см. рис. 2, г–ж). Центральная зона таких вирионов

Таблица 2

Размер частиц вируса гриппа до и после экспозиции в кислой среде

Препарат вируса*	Экспозиция в кислой среде	Диаметр вирионов, нм
Неактивированный вирус с HA0	-	$91,7 \pm 16,8$
	+	$88,3 \pm 14,5$
Активированный вирус с HA1/HA2	-	$79,8 \pm 17,9$
	+	$84,6 \pm 19,5$

Примечание. \* – вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) выращивали в культуре клеток MDCK-H, обрабатывали трипсином и далее экспонировали в кислой среде с рН 4,2, как описано в «Материалах и методах». Обработанные образцы культуральной жидкости исследовали в электронном микроскопе без предварительной очистки ультрацентрифугированием. Приведены средние величины диаметра вирусных частиц без учета поверхностных шипов и стандартное отклонение значений.

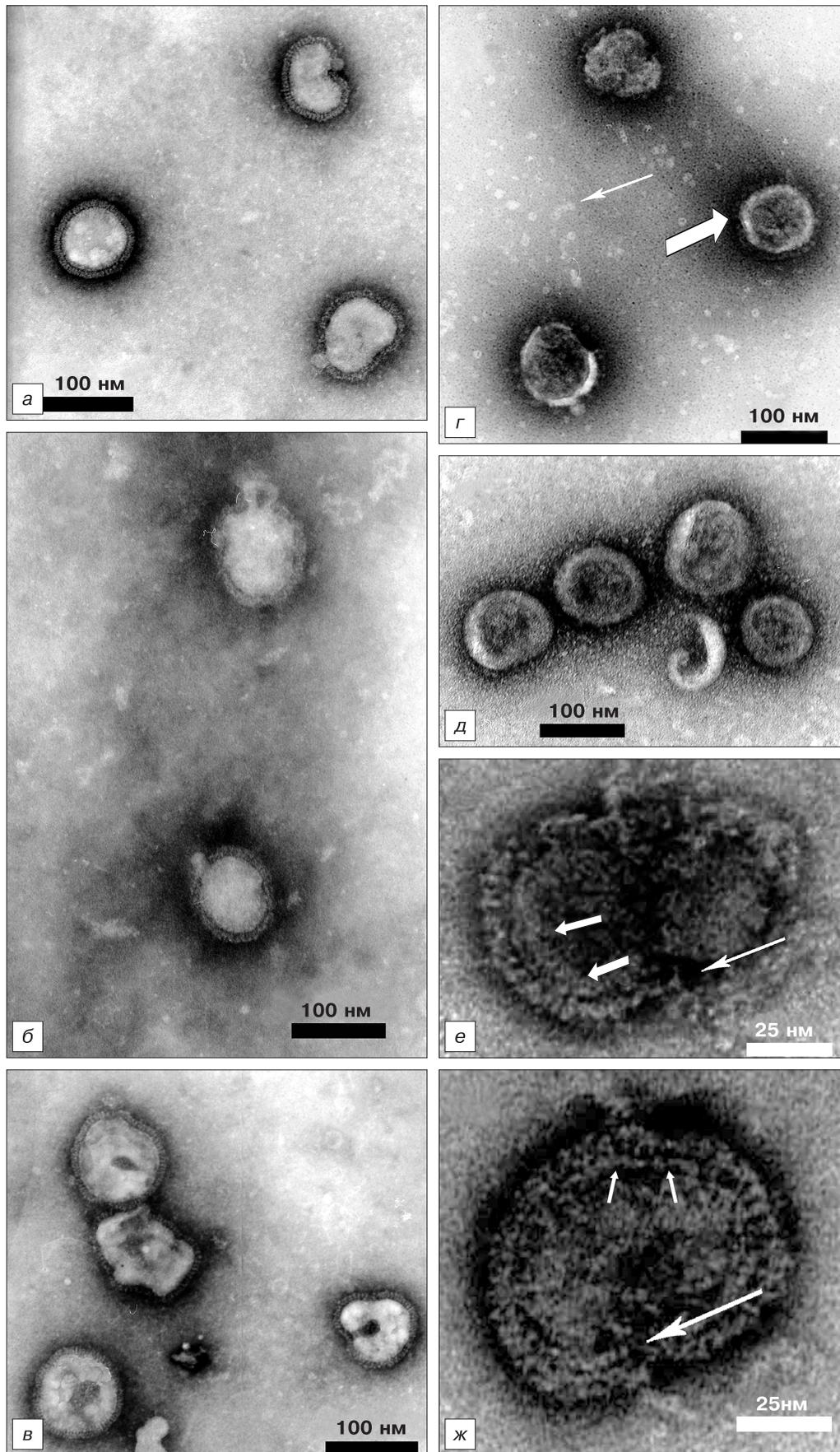


Рис. 2. Электронная микроскопия вируса гриппа А после обработки кислым рН.

Образцы культуральной жидкости, полученной в MDCK-Н, осветляли для удаления клеточных обломков, делили на две части, одну из которых обрабатывали трипсином для расщепления  $HA_0 \rightarrow HA_1 + HA_2$ . Затем образцы *б* и *г-ж* обрабатывали при рН 4,2 в течение 30 мин и нейтрализовали до рН 8,0. Препарат *а* – интактный вирус с  $HA_0$ ; *б* – интактный вирус с  $HA_0$ , обработанный рН 4,2; *в* – активированный вирус с  $HA_1/HA_2$ ; *г-ж* – активированный вирус с  $HA_1/HA_2$ , обработанный рН 4,2 (*г* и *д* – при обычном увеличении, *е* и *ж* – при высоком).

представляла собой гетерогенное по плотности поле, при этом электронно-плотные зоны занимали практически большую часть вириона. На некоторых вирионах можно различать протяженные структуры, напоминающие по размеру и форме вирусный нуклеопротеид. На рис. 2, *з* в поле зрения можно видеть свободные лежащие спиралевидные сегменты РНП, вышедшие из разрушенных клеток, которые по форме напоминали структуры внутри вириона (показано тонкой стрелкой на рис. 2, *з*). На рис. 2, *е*, *ж* представлены два вириона вируса гриппа, в которых лучше визуализирована внутренняя структура вириона и его РНП. Внутри вириона можно различать светлую зону (мембрану), отделяющую сердцевину вириона от гемагглютининовой структуры оболочки, которая обычно трактуется как матрикс М1. Можно отметить ее разрушение на протяженных участках внутри вириона (показано длинными стрелками на рис. 2, *е*, *ж*). Кроме того, на периферии сердцевины вириона удавалось выявить протяженные спиральной формы образования, граничащие с липидной мембраной, которые можно идентифицировать как РНП вируса (показано толстой стрелкой на рис. 2, *е*). Такая периферическая локализация РНП являлась характерным признаком внутренней перестройки вириона после экспозиции в кислой среде, что выявляли ранее и другие авторы [5]. В вирионах после обработки кислой средой наблюдали также разрыхление и деструкцию матрикса М1, что показано длинной стрелкой на рис. 2, *е*, *ж*.

Таким образом, можно заключить, что важной особенностью вирусных частиц с HA0 и обработанных и необработанных кислым рН (препараты *а* и *б* соответственно) и с HA1/HA2, необработанных кислым рН (препарат 2в), состояла в недоступности их внутренней структуры для контрастирующего агента, в результате чего в препарате доминировали светлые неоконтрастированные частицы. Напротив, в образцах вируса с HA1/HA2 после кислотной обработки доминировали темные частицы с контрастированной сердцевиной (препарата *з-ж*). Последнее наблюдение указывало на то, что обработка кислым рН вируса с расщепленным HA1/HA2 изменяла проницаемость его липидной мембраны и делала его проницаемым для ФВК и кислой среды. Эти данные говорят о том, что сочетание двух факторов, а именно кислой среды и расщепленной формы HA, приводило к структурной перестройке вируса, в результате которой вирионы становились проницаемыми для кислой среды и теряли способность заражать клетки-мишени.

Возникает вопрос, изменялась ли внутренняя структура вируса после его обработки кислой средой. Для ответа на него применяли описанный нами ранее метод фракционирования внутренних субвирусных структур после разрушения его наружной липидной мембраны неионным детергентом [12, 13]. При этой процедуре растворение липидной мембраны проводили в ходе седиментации вируса через 25% глицерол, содержащий детергент NP-40, приводящей к осаждению субвирусных структур РНП, которые связаны с матриксом М1. Соотношение белка М1 и NP (главного компонента РНП) в полученных фракциях позволяло судить о связи матрикса М1 и РНП в вирионе. На рис. 3 показаны результаты типичного эксперимента. Как видно, при фракционировании вируса с HA0, необработанного и обработанного кислой средой, выделялись субвирусные структуры с содержанием белка М1, составляющим около 10% такового в цельном вирусе. После инкубации в кислой среде вируса с HA1/HA2 содержание М1 в субвирусной фракции повышалось до 80–90% от такового в составе интактного вируса. Эти результаты указывали на то, что обработка кислой средой вируса с расщепленным HA1/HA2 усиливала связь белкового матрикса М1

с вирионным РНП и делала ее более устойчивой к сочетанному воздействию неионного детергента и ионной силы раствора хлористого натрия.

### Обсуждение

В работе установлено, что вирус гриппа A/Aichi/2/68 с нерасщепленным HA0 и вирус с расщепленным гемагглютинином HA1/HA2 имеют типичную округлую форму диаметром около 100 нм, но различаются по чувствительности к кислой среде. Неинфекционные вирионы с HA0 устойчивы к кислому рН 4,2–4,5, не изменяют свою внутреннюю структуру и сохраняют инфекционные свойства после экспозиции в кислой средой. Инфекционные вирионы с HA1/HA2 чувствительны к кислому рН и после непродолжительного контакта с кислой средой изменяют свою внутреннюю структуру в результате проницаемости наружной липидной мембраны и воздействия кислой среды на внутренние компоненты вирусной частицы. В результате структурных перестроек под влиянием кислого рН вирус терял способность заражать клетки-мишени. Обнаруженная структурная кислотная перестройка вириона, в котором HA имеет функциональную HA1/HA2 форму, вероятно, связана с внутривирионной конформационной трансформацией матриксного белка М1 и РНП, которая приводит к усилению их связи и затруднению (или даже полной невозможности) процесса разведения вирионов при внедрении в клетки-мишени.

С высказанным предположением о перестройке вируса согласуются прежние наблюдения о том, что белок М1, имеющий выраженные гидрофобные свойства, имеет повышенную чувствительность к кислой среде и приобретает хорошую растворимость в водных растворах с кислым рН в диапазоне рН 4–5, заметно изменяя при этом свою конформацию [6, 8]. Переход матрикса М1 из подмембранного слоя с упорядоченной спиральной организацией в аморфное внутривирионное распределение наблюдали ранее с помощью криоэлектронной микроскопии в filamentозных вирусных частицах вируса A/Udorn/72 (H3N2) при обработке кислым рН 4,9 [4]. В другой недавней работе по криоэлектронной микроскопии, посвященной изучению влияния кислого рН на инфекционный вирус гриппа А, авторы также пришли к выводу о перераспределении матрикса М1 из мембранно-связанного в ассоциированное с РНП состояние в вирионе после кислотной обработки [5].

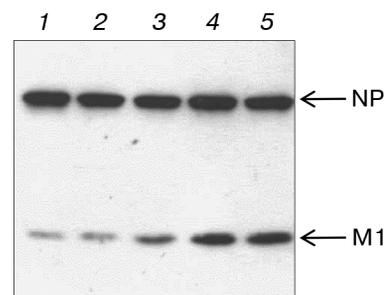


Рис. 3. Фракционирование вируса гриппа А в глицероле с неионным детергентом.

Образцы вируса A/Aichi/2/68 (H3N2) необработанные (1, 2) и обработанные (3, 4) трипсином экспонировали с рН 4,2 в течение 30 мин (2, 4) и нейтрализовали рН до 8,0. Полученные образцы культуральной жидкости наслаивали на слой глицерола, содержащего 0,2% неионного детергента NP-40 и 2,5 мМ ацетатного буфера с рН 4,2, и центрифугировали при 27 500 об/мин в течение 3 ч для осаждения субвирусных структур. Осадки (фракция субвирусных частиц) подвергали электрофорезу в ПАГ с последующим ВБ-анализом. Для идентификации вирусных белков использовали анти-NP- и анти-M1-антитела и пероксидазный антивидовой конъюгат по методу усиленной хемилюминесценции. Дорожка 5 – препарат исходного вируса.

Эти наблюдения хорошо согласуются с нашими данными об избирательности действия кислого рН на инфекционный вирус гриппа, содержащий расщепленный HA1/HA2, и перестройке его внутренней структуры и потери инфекционности в отличие от неактивированного вируса с HA0, который проявлял устойчивость к кислому рН и сохранял свои нативные свойства после кислотной экспозиции.

Хорошо известно, что расщепление белка HA0 → HA1/HA2 приводит к высвобождению NH<sub>2</sub>-терминального фузионного пептида в субъединице HA2, которое активирует его функцию по слиянию липидных мембран, присутствующую HA вирусом гриппа [16]. Наши данные по электронной микроскопии показали, что при обработке кислым рН у вируса с расщепленным HA1/HA2 возросла проницаемость липидной мембраны и, напротив, отсутствовал такой эффект у вируса с нерасщепленным HA0. Эти наблюдения, по всей вероятности, объясняются тем, что расщепление HA0 → HA1/HA2 приводило к перестройке липопротеидного комплекса, в результате которой ионные каналы, сформированные белком M2, приобретали способность активироваться кислым рН и транспортировать протоны H<sup>+</sup> внутрь вирусных частиц и закрывать его внутренний объем. Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что расщепление поверхностного гемагглютинина HA0 → HA1/HA2 имеет двойной эффект, который складывается не только из активации его собственной функции липидного слияния, но и его опосредованного влияния на структуру других компонентов липопротеидной мембраны, в частности ионных каналов M2, способствуя их активации в кислой среде.

Полученные данные о влиянии HA1/HA2 на проницаемость протонов через вирионную мембрану указывают на возможную кооперацию гемагглютинина HA1/HA2 и белка ионных каналов M2 в ходе рецепторного эндоцитоза вируса в клетке-мишени [7]. Так, при прохождении через клеточные эндосомы вирус оказывается в кислой среде с рН в диапазоне 4,5–5,5, инициирующей многовекторное действие HA1/HA по слиянию липидных мембран вируса и клетки и содействию канальной активности M2 и сольюбилизации M1, кооперативный эффект которых ведет к физиологичному раздвиганию вируса с выходом свободного РНП и началу вирусных синтезов. При воздействии кислого рН *in vitro* на вирус, содержащий расщепленный HA1/HA2, происходит кислотная активация компонентов липопротеидного комплекса вируса без его контакта и слияния с клеточными мембранами. Такое разъединение процессов и асинхронная активация вирусных компонентов приводят к аномальным взаимодействиям внутри вирусной частицы и нарушению запрограммированной синхронизации перечисленных процессов. Возникшая асинхронная перестройка в вирусе при последующем заражении клеток препятствует воспроизведению его полноценного внутриклеточного раздвигания.

Дифференцированное действие кислой среды на инфекционный вирус с HA1/HA2 и неактивированный с HA0 позволяет объяснить раннее наблюдение о различной стабильности вирусов гриппа А в кислой среде в зависимости от расщепления их HA [9]. Наши данные показывают, что присутствие HA0 обеспечивает большую стабильность неинфекционных вирионов в среде с кислым рН из-за его более ригидной и устойчивой к протеканию ионов структуры липопротеидного комплекса по сравнению с более лабильной и протекаемой мембраной у инфекционных вирионов с HA1/HA2. Быстрая инактивация инфекционных вирионов и более продолжительное сохранение неинфекционных вирионов могут происходить у вирусов гриппа водоплавающих птиц в открытых водоемах, вода которых имеет обычно кис-

лые значения рН [3]. Другой физиологической кислой средой, в которой оказывается вирус гриппа, служит полость желудка, куда попадает основная масса вируса из респираторного тракта с проглатываемым бронхиальным секретом со слюной у больных гриппом людей. Следовательно, в желудке будет происходить инактивация инфекционного вируса, тогда как эту полость может успешно проходить, сохраняя свой инфекционный потенциал, неинфекционный вирус с HA0, который может активироваться и становиться инфекционным уже в кишечнике под действием кишечных трипсино-подобных протеаз, которые, как известно, присутствуют в кишечном эпителии [2, 14]. Интересно, что по нашим оценкам, выполненным *in vivo*, популяция вируса гриппа H1N1 и H3N2, продуцируемая в респираторном тракте инфицированных мышей, лишь на 30–60 и 40–70% состоит из инфекционных вирионов с HA1/HA2 и неактивированных вирионов с HA0 соответственно (неопубликованные данные). Сходный смешанный состав популяции из инфекционного и неактивированного вируса гриппа в респираторном тракте и егохождение в кишечный тракт можно ожидать у людей, больных гриппом.

Работа выполнена при финансовой поддержке по грантам РФФИ и программы 293 Научного немецкого общества (DFG).

#### ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Baudin F., Petit I., Weissenhorn W., Ruigrok R.W. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*. 2001; 281(1): 102–8.
2. Bertram S., Glowacka I., Blazejewska P. et al. Tmprss2 and Tmprss4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J. Virol.* 2010; 84(19): 10016–25.
3. Brown J.D., Goekjian G., Poulson R., Valeika S., Stallknecht D.E. Avian influenza virus in water: infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Vet. Microbiol.* 2009; 36(1–2): 20–6.
4. Calder L.J., Wasilewski S., Berriman J.A., Rosenthal P.B. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(23): 10685–90.
5. Fontana J., Cardone G., Heymann J.B., Winkler D.C., Steven A.C. Structural changes in Influenza virus at low pH characterized by cryo-electron tomography. *J. Virol.* 2012; 86(6): 2919–29.
6. Harris A., Forouhar F., Qiu S., Sha B., Luo M. The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology*. 2001; 289(1): 34–44.
7. Luo M. Influenza virus entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 726: 201–21.
8. McHardy A.C., Adams B. The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000566.
9. Scholtissek C. Stability of infectious influenza A viruses to treatment at low pH and heating. *Arch. Virol.* 1985; 85(1–2): 1–11.
10. Sishkov A.V., Goldanskii V.I., Baratova L.A., Fedorova N.V. et al. The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(14): 7827–30.
11. Zhang K., Wang Z., Liu X. et al. Dissection of influenza A virus M1 protein: pH-dependent oligomerization of N-terminal domain and dimerization of C-terminal domain. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37786.
12. Zhirnov O.P. Solubilization of matrix protein M1/M from virions occurs at different pH for orthomyxo- and paramyxoviruses. *Virology*. 1990; 176(1): 274–9.
13. Zhirnov O.P. Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent. *Virology*. 1992; 186(1): 324–30.
14. Zhirnov O.P., Klenk H.D. Human influenza viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CACO-2 cells. *Virology*. 2003; 313: 198–212.
15. Zhirnov O.P., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N., Klenk H.D. Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 2011; 21: 169–74.
16. Zhirnov O.P., Klenk H.D., Wright P.F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antivir. Res.* 2011; 92(1): 27–36.

Поступила 24.01.13