

Дмитриев Г.В., Борисова Т.К., Файзулов Е.Б., Десяткова Р.Г., Зверев В.В.

Генетические детерминанты аттенуации вируса краснухи

ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им И.И. Мечникова» РАМН, 105064, г. Москва

Вакцинация является наиболее экономичным и доступным средством борьбы с краснухой. В настоящий момент в мире зарегистрировано девять живых аттенуированных вакцин, основанных на разных штаммах вируса краснухи (ВК). Тем не менее механизмы аттенуации ВК изучены не полностью, поэтому актуальными являются изучение механизмов ослабления диких вариантов ВК, поиск ключевых мутаций, ведущих к аттенуации, а также выявление характерных фенотипических проявлений, которые могут служить маркерами аттенуации и использоваться наряду с секвенированием для контроля генетической стабильности вакцинных штаммов. При сравнении нуклеотидных аминокислотных замен отечественного штамма С-77 с соответствующими позициями известных полноразмерных последовательностей холодоадаптированных вакцинных штаммов ВК краснухи и их диких штаммов-предков при их наличии обнаружены общие закономерности генетических изменений, возникающие при холодовой адаптации.

Ключевые слова: краснуха; аттенуация вируса; мутации.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2014; 59(6): 12–15.

Rubella virus genetic determinant of attenuation

Dmitriev G. V., Borisova T. K., Faizulov E. B., Desiatskova R. G., Zverev V. V.

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences, 105064, Moscow, Russia

Vaccination is the most effective and available way to prevent Rubella. Presently, 9 vaccine strains were registered. Nevertheless, the molecular mechanisms of the attenuation were poorly elucidated for the rubella virus. However, the study of these mechanisms identifying genotypic and phenotypic markers of attenuation, which together with sequence analysis could be used for the genetic stability control of vaccine strains, is still of current interest. Common trends of genetic changes in the process of adaptation to cold were found due to comparison of nucleic acid and amino acid sequences of the Russian strain C-77 with corresponding positions of the known rubella virus strains and its wild type progenitors, if available.

Key words: rubella; virus attenuation; mutations.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2014; 59(6): 12–15. (In Russ.)

Вирусная этиология краснухи была доказана в 1938 г. Хиро и Тасака. Вирус краснухи (ВК) впервые был выделен в культуре в 1961 г. Т.Х. Уэллером, П.Д. Паркманом и Ф.А. Невои в США, и в том же году на основе дикого штамма М33 был получен первый аттенуированный вакцинный штамм HPV-77, пассированный на клетках почки зеленой мартишки (AGMK) [1].

Путем многократного пассирования клинических изотипов ВК на различных линиях клеток разработано несколько штаммов, которые были использованы для создания живой аттенуированной вакцины против краснухи [1]. Описание пассажной истории полученных вакцинных штаммов представлено в табл. 1.

На данный момент в мире зарегистрировано девять живых аттенуированных вакцин, основанных на разных штаммах ВК (HPV-77/DE5, Wistar RA27/3, Cendehill, BRD-2, Matsuba vaccine, TCRB19 vaccine, Takahashi vaccine, Matsuura vaccine, и TO-336 vaccine), полученных путем пассирования изолятов вируса при пониженной температуре [2]. Линии клеток различались для разных штаммов, а количество пассажей варьировало от 30 до 90. Для всех вакцинных штаммов аттенуация проводилась при пониженной температуре (от 28 до 35°C) и сопровождалась накоплением мутаций и приобретением термочувствительного фенотипа. Количество и локализация за-

мен у разных штаммов различалась. Так, в штамме TO-336 vaccine обнаружено 6 аминокислотных замен, возникших в процессе аттенуации, а в штамме Matsuura vaccine – 19, что может быть обусловлено различными линиями клеток, на которых проводилось пассирование, и разным количеством пассажей. Для получения штамма TO-336 vaccine проводили 7 пассажей на клетках VMK (velvet monkey kidney), 20 пассажей на первичных клетках почки морской свинки и 3 пассажа на клетках RK. Для штамма Matsuura vaccine проводили 14 пассажей на клетках VMK, 65 пассажей на культуре клеток амниона куриных эмбрионов и 11 пассажей на перепелиных эмбриональных фибробластах [1]. Пассирование вируса в культуре клеток при пониженной температуре создает для него селективные условия двух видов – возникает необходимость адаптации к новому хозяину и пониженной температуре. Таким образом, при анализе мутаций, возникших в процессе холодовой адаптации, важно дифференцировать случайные мутации и мутации, ответственные за адаптацию к новому хозяину и культивированию при пониженной температуре.

На данный момент крайне мало известно о молекулярных механизмах аттенуации живых аттенуированных вакцин, и вакцина против краснухи не исключение. Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей вакцинных штаммов и их штаммов-предков может

Вакцинные штаммы ВК

Штамм		Год регистрации	Страна	Пассажная история
вакцинный	дикий			
HPV-77.DE5	M33	1961	США	77 п. – АГМК; 5 п. – утиные эмбрионы
HPV-77 DK12	M33	1961	США	77 п. – АГМК; 5 п. – клетки почки собаки
Cendehill	-	1963	Бельгия	3 п. – VMK; 51 п. – RK-13
RA27/3	-	1964	США	4 п. – почка эмбриона человека (НЕК); 17–25 п. – WI-38
TO-336 vaccine	TO-336 gmk5	1967	Токая, Япония	7 п. – VMK; 20 п. – первичные клетки почки морской свинки; 3 п. – RK
TCRB19 vaccine	-	1967	Токио, Япония	1 п. – VMK; 53 п. – клетки почки крупного рогатого скота; 3 п. – RK
Matsuura vaccine (MEQ11)	Matsuura. B3	1966	Осака, Япония	14 п. – VMK; 65 п. – клетки амнионов куриных эмбрионов; 11 п. – фибробласты перепелиных эмбрионов
Matsuba vaccine (SK)	Matsuba.GMK3	1969	Кумамото, Япония	1 п. – VMK; 60 п. – клетки почки свиньи; 6 п. – RK
Takahashi vaccine (KRT)	Takahashi RVi/Matsue. JPN/68	1968	Мацуэ, Япония	4 п. – VMK; 36 п. – первичные клетки тестикул кролика; 1 п. – RK
BRD-2	BRD-1 (2BS)	1980	Китай	30 п. – диплоидные клетки человека

дать важную информацию для понимания молекулярных основ процесса аттенуации вакцинных штаммов.

Несмотря на то что детерминанты аттенуации для ВК до сих пор точно не установлены, на основании ряда проведенных исследований определены домены в геноме ВК, мутации в которых приводят к аттенуации ВК, а также выявлены точечные мутации, вызывающие фенотипические изменения ВК. Так, в результате ряда исследований, использующих методы «обратной генетики» (создание инфекционного молекулярного клона и сайт-направленный мутагенез), обнаружены вероятные генетические детерминанты аттенуации, а с их помощью выявлен «минимальный генотип» штамма ВК, необходимый для аттенуации [2]. В этих работах обсуждается возможность в перспективе получить методами «обратной генетики» штаммы, обладающие достаточной иммуногенностью, стабильностью и минимальной реактогенностью, что необходимо для вакцинных штаммов.

Путем пассирования клинических изолятов ВК на различных линиях клеток разработано несколько отечественных ослабленных штаммов ВК, но на данный момент для производства вакцины против краснухи используют зарубежный штамм вируса.

Штамм С-77 был выделен Р. Г. Десятковой из носового смыва больного манифестной формой краснухи в 2001 г. Полученный вариант штамма С-77 характеризовался стабильной репродукцией вируса, достигавшего титров 10^5 – 10^6 БОЕ/мл, и обладал геммагглютинирующей активностью, варьировавшей от 2 до 32 ГЕ/0,2 мл. Также в испытаниях на животных отмечены изменение свойств штамма в сторону повышения цитопатической, бляшкообразующей активности и снижение антигенности по мере увеличения пассажа пассирования. Установлено, что адаптированные варианты отечественных штаммов приобрели различия со свежесделенными дикими штаммами и сходство с вакцинным штаммом RA27/3. Для получения ослабленных вариантов са39 и са46 штамм С-77 (wt) длительно культивировали в культуре клеток Vero: 34 пассажа при температуре 35°C, 4 и 11 пассажей при 33°C соответственно [3].

Штамм ВК С-77 относится к генотипу 1h, который широко распространен на территории России. При сравнении геномов вариантов са и wt штамма С-77 обнаружено 13 нуклеотидных отличий, из ко-

торых 6 приводили к замене аминокислоты. Во фрагменте, кодирующем неструктурные белки (ОПС НСБ), обнаружено 8 нуклеотидных замен, из которых 4 ведут к замене аминокислоты. Во фрагменте, кодирующем структурные белки (ОПС СБ), обнаружено 5 нуклеотидных замен, из которых 2 ведут к замене аминокислоты (табл. 2) [4].

При сравнении аминокислотных замен штамма С-77 с соответствующими позициями известных полноразмерных последовательностей холодаадаптированных вакцинных штаммов ВК и их диких штаммов-предков при их наличии выявлены общие закономерности генетических изменений, возникающие при холодовой адап-

Таблица 2

Нуклеотидные и аминокислотные замены варианта са штамма С-77

Фрагмент	Мутации в нуклеотидной последовательности			Аминокислотные замены			
	позиция	wt	са39	уникальность*	позиция	wt	са
ОПС НСБ P150	164	ACC	TCC	Нет	21	Thr	Ser
	328	AGC	AGT	Да	-	-	-
	2320	AGC	AGT	Нет	-	-	-
	3165	TAC	TGC	Да **	1042	Tyr	Cys
	3357	AGT	ACT	Да	1106	Ser	Thr
P90	5360	CTC	TTC	Нет	1774	Leu	Phe
	6064	TTC	TTT	Да**	-	-	-
	6223	GTC	GTT	Нет	-	-	-
ОПС СБ C	6588	CTC	TTC	Да	27	Leu	Phe
	7392	GCC	GCT	Нет	-	-	-
	E2 7490	CAT	CAC	Нет	-	-	-
	8199	GCC	ACC	Да	564	Ala	Thr
E1 8957	GTC	GTT	Нет	-	-	-	

Примечание. * – сравнение проводилось с 97 нуклеотидными последовательностями диких штаммов ВК, представленными в GenBank NCBI (из них 24 последовательности с полноразмерным геномом, 44 последовательности, кодирующие ОПС СБ, 2 последовательности, кодирующие ОПС НСБ, 29 последовательностей, кодирующих протеазу); ** – обнаружено совпадение только с одной последовательностью из базы данных GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные замены, приводящие к уникальной замене аминокислоты (т. е. в данных позициях ни у одного из диких штаммов ВК не обнаруживалось такой же аминокислоты за исключением 1 штамма).

Сравнение аминокислотных замен варианта са штамма С-77, приобретенных в процессе аттенуации известными вакцинными и дикими штаммами вируса краснухи

Штамм (генотип)	ОПС НСБ								ОПС СБ			
	MT		протеаза				полимераза		С		Е2	
	164	21	3165	1042	3357	1106	5360	1774	6588	27	8199	564
C-77 wt (1h)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	CTC	Leu	CTC	Leu	GCC	Ala
C-77 ca39(1h)	TCC	Ser	TGC	Cys	ACT	Thr	TTC	Phe	TTC	Phe	ACC	Thr
C-77 ca46(1h)	–	–	TGC	Cys	–	–	–	–	–	–	–	–
Matsuba wt (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Matsuba vac (1A)	ACC	Thr	CAC	His	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Brd-1 wt (2A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGC	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Brd-2 vac (2A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
KRT wt (1A)	ACC	Thr	TAT	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
KRT vac (1A)	ACC	Thr	CAC	His	AGT	Ser	TTT	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
To-336 wt (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
To-336 vac (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Matsuura wt (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Matsuura vac (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
TCRB-19 vac (1A)	ACC	Thr	TGC	Cys	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Cendehil vac (1A)	ACC	Thr	CAC	His	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Ra 27/3 vac (1A)	TCC	Ser	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala

Примечание. Светлые строки – аттенуированные/вакцинные штаммы ВК, затемненные – дикие штаммы ВК, секвенирование не проводилось. Жирным цветом выделены совпадающие позиции аминокислотных замен и соответствующие им триплеты нуклеотидов варианта са39 штамма С-77 и вакцинных штаммов. Для штаммов, у которых не сохранились штаммы-предки, жирным цветом выделены аминокислоты, совпадающие с аминокислотами других вакцинных штаммов или вариантом са39 штамма С-77 и не встречающиеся ни у одного из диких штаммов-предков.

тации (табл. 3) [4]. Сравнение проводили со следующими штаммами:

Matsuba vaccine (GenBank AB588193), Matsuba GMK3 (GenBank AB588189), Brd-2 Vac (GenBank AY258323), Brd-1 (GenBank AY258322), Takahashi vaccine (GenBank AB222608), RVi/Matsue.JPN/68 GenBank AB003453.1), а также тремя вакцинными штаммами, для которых не сохранены дикие штаммы-предки: TCRB19 vaccine (GenBank AB588188), Cendehill (GenBank AF188704) и Wistar RA27/3 (GenBank FJ211588). Перечисленные вакцинные штаммы относятся к генотипу 1a, за исключением китайских штаммов BRD-1 и BRD-2, которые относятся к генотипу 2A. В позиции 21 ОПС НСБ вакцинного штамма Wistar RA27/3 так же как и у варианта са штамма С-77, находится аминокислота Ser, тогда как у варианта wt – Thr. Наличие в этой же позиции аминокислоты Thr у других диких штаммов, вакцинных штаммов и их предков, а также отсутствие дикого штамма-предка у RA27/3 не позволяют судить о значимости этой замены для процесса аттенуации ВК (табл. 3) [4].

У некоторых вакцинных штаммов в триплетях, соответствующих аминокислотным заменам штамма С-77, выявлены замены нуклеотидов, не ведущие к замене аминокислот. Так, у вакцинного штамма BRD-2 в ОПС НСБ в домене, кодирующем протеазу, в позиции 3358 имеет место нуклеотидная замена цитозина на тимин (AGC-AGT), при этом замены аминокислоты не происходит. У варианта са штамма С-77 в этом же триплете выявлена замена гуанина на цитозин в позиции 3357 (AGT-ACT), сопровождающаяся заменой аминокислоты Ser1106Thr. Данная нуклеотидная замена является уникальной, т. е. ни у одного из диких штаммов ВК не обнаруживалось такого же нуклеотида в данной позиции. У вакцинного штамма Takahashi vaccine в ОПС НСБ в домене, кодирующем полимеразу, в позиции 5362 имеет место нуклеотидная замена цитозина на тимин (TTC-TTT), при этом замены аминокислоты также не происходит. У варианта са штамма С-77 в этом же триплете выявлена замена цитозина на тимин в позиции 5360 (CTC-TTC), сопровождающаяся заменой аминокислоты Leu1774Phe (см. табл. 2).

В позиции 6223 у варианта са штамма С-77 обнаружена нуклеотидная замена, не ведущая к замене аминокислоты; замена в той же позиции отмечена в вакцинном штамме BRD-2 [4].

В позиции 1042 ОПС НСБ штамма С-77 выявлена аминокислотная замена Tyr на Cys. В результате сравнительного анализа в этой же позиции имеет место замена Tyr на His в японских штаммах Matsuba и Takahashi vaccine. Также у двух вакцинных штаммов TCRB-19 и Cendehill, для которых не сохранились штаммы-предки, в этой позиции находятся аминокислоты Cys и His соответственно. Важно отметить, что у всех диких штаммов ВК, представленных в базе данных GenBank (NCBI), в этой позиции находится аминокислота Tyr, за исключением одного штамма.

Результаты исследований разных групп ученых сходятся в том, что мутации, локализованные в генах, которые кодируют НСБ, и в частности протеазу, которая участвует в протеолитическом процессинге НСБ, ведут к появлению холодоадаптированного фенотипа [2, 5–7]. Выявлено 4 значимые мутации в области, кодирующей НСБ, из них 2 в области, кодирующей протеазу. Две группы японских ученых в 2009–2011 гг. обнаружили ряд мутаций в этой области, ведущих к снижению репродукции ВК при повышенной температуре [2, 5, 7].

Особого внимания заслуживает замена Tyr на Cys в позиции 1042 в протеазном домене штамма С-77. Данная мутация локализуется в протеазном домене полипротеина p150 [4] и является уникальной, т. е. у диких штаммов ВК в этой позиции практически всегда имеет место аминокислота Tyr, данная мутация сохранялась и в варианте са46 штамма С-77 [4].

В вакцинном штамме TCRB-19 в данной позиции также находится аминокислота Cys, а в штаммах Matsuba и Cendehil – Tyr и His соответственно. Замена Tyr на His в позиции 1042 в вакцинном штамме Takahashi vaccine сопровождалась появлением фенотипа ts, что доказано методами обратной генетики [4]. При обратной замене гистидина на тирозин в позиции 1042 генома вакцинного штамма Takahashi vaccine наблюдался значительный

рост интенсивности репродукции полученного штамма при 39°C, однако при замене тирозина на гистидин в позиции 1042 в геноме дикого штамма-предка RVi/Matsue. JPN/68 наблюдалось лишь незначительное снижение репродукции вируса при 39°C, что свидетельствует о наличии дополнительных детерминант холодовой адаптации [5]. Японские ученые обнаружили, что молекулярный клон дикого штамма RVi/Matsue. JPN/68 с заменой Y1042H и T1497I (домен хеликазы) обладал сопоставимыми показателями роста с вакцинным штаммом Takahashi vaccine при температуре культивирования 39°C. Интенсивность репродукции данного клона была существенно ниже, чем у дикого штамма RVi/Matsue. JPN/68 и у клона с единственной заменой Y1042H [5].

Кроме этого, нельзя исключать вклад в развитие холодадаптированного фенотипа и других замен, в том числе и не ведущих к замене аминокислот [5]. Совокупность таких замен, возникших в процессе холодовой адаптации, может способствовать репликации вируса при пониженной температуре или приводить к снижению стабильности геномных структур при повышенной температуре и, как следствие, снижать эффективность репликации вируса. Также к снижению репродукции при повышенной температуре может приводить и совокупность как транс-, так и цис-действующих факторов. Выявлено, что сниженная интенсивность репродукции при температуре культивирования 39°C вакцинного штамма Takahashi (KRT) обусловлена подавлением синтеза РНК. Интенсивность репликации РНК у молекулярного клона с обратной заменой H1042Y при 39°C была на прежнем уровне. В то же время у дикого штамма-предка с заменой Y1042H также наблюдалось ослабление репликации при 39°C в сравнении с исходным диким штаммом Takahashi rvi/Matsue. jpn/68 [5]. Изменения в интенсивности репликации РНК возникали только при наличии замены в позиции 1042.

У ВК нерасщепленный неструктурный полипротеин р200 необходим для синтеза комплементарной полноразмерной РНК отрицательной полярности, которая является матрицей для синтеза геномной РНК. В синтезе геномной РНК участвуют продукты процессинга полипротеина р200 – белки р150 и р90. Таким образом, регуляция этих двух этапов репликации генома ВК осуществляется с помощью процессинга НСБ [8]. Обнаруженные нами в штамме С-77, а также выявленные у вакцинного штамма Takahashi KRT и ТО-336 vaccine замены в участке генома, который кодирует протеазу, могут вызывать снижение активности вирусной протеазы при повышенной температуре культивирования, а также снижать конформационную стабильность процессированных и неprocessированных НСБ, что в результате может приводить к снижению репликации ВК при повышенной температуре [5].

Протеазный домен вируса краснухи содержит богатый цистеином участок связывания ионов Ca_2^+ и Zn_2^+ , которые необходимы для протеазной активности и репликации ВК [7]. Кроме того, данный участок содержит домен связывания кальмодулина (кальцийсвязывающий белок), который также играет важную роль в протеазной активности и репликации ВК [9]. Мутации в этом домене приводят к снижению его конформационной стабильности при высокой температуре [9], что является возможной причиной приобретения термочувствительного фенотипа некоторых вакцинных штаммов ВК.

Приведенные выше данные позволяют с высокой степенью уверенности утверждать, что замена Туг на Сус в позиции 1042 в протеазном домене штамма С-77 является не случайной и не следствием адаптации к культуре клеток Vero, а прямо связана с приобретенным холодадаптированным фенотипом. Таким образом, в результате сравнительного анализа полноразмерных геномов вариантов wt

и са39 штамма С-77 выявлены вероятные генетические детерминанты аттенуации ВК. 5 из 13 выявленных нами нуклеотидных замен в позициях 2320, 6223, 7392, 7490 и 8957, приобретенных в процессе холодовой адаптации штамма С-77, по всей вероятности, являются случайными, так как не ведут к замене аминокислоты и не являются уникальными. Хотя полностью исключать их роль в приобретении холодадаптированного фенотипа штаммом С-77 нельзя. Две нуклеотидные замены в позициях 328 и 6064 также не ведут к замене аминокислот, но являются уникальными, поэтому представляют больший интерес. Нуклеотидная замена в позиции 164 сопровождается заменой аминокислоты Thr21Ser. Данная нуклеотидная замена не является уникальной, но аминокислота Ser в этой позиции находится у вакцинного штамма Wistar RA27/3 и не встречается ни у одного штамма-предка других вакцинных штаммов. Одна нуклеотидная замена в позиции 5360 ведет к замене аминокислоты, но не является уникальной. Наибольший интерес представляют нуклеотидные замены в позициях 3165, 3357, 6588, 8199, так как они ведут к замене аминокислот, не характерных для диких штаммов ВК, что рассматривается нами как свидетельство высокой роли в приобретении холодадаптированного фенотипа варианта са штамма С-77 или адаптации к новому хозяину (клеткам Vero). Замена аминокислоты Туг на Сус в позиции 1042 OPC НСБ, соответствующая нуклеотидной замене в позиции 3165, по всей вероятности, играет ключевую роль в приобретении холодадаптированного фенотипа варианта са штамма С-77, что согласуется с последними данными литературы.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

- Best J. M. Rubella vaccines: past, present and future. *Epidemiol. Infect.* 1991; 107: 17–30.
- Noriyuki O., Hitoshi A., Toru K. et al. Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine virus phenotypes. *Vaccine*. 2011; 29: 1863–73.
- Zverev V.V., Desyatskova R.G., Yuminova N.V., Lotte V.D., Stepanov A.V. *Laboratory characteristic of attenuated Rubella virus strains adapted to Vero cell. Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2008; 4: 46–53. (in Russian) [Зверев В.В., Десяткова Р.Г., Юминова Н.В., Лоте В.Д., Степанов А.В. Лабораторная характеристика ослабленных вариантов отечественных штаммов вируса краснухи, адаптированных к культуре клеток Vero. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2008; 4: 46–53].
- Dmitriev G.V., Borisova T.K., Fayzuloev E.B., Zabayka Yi.I., Desyatskova R.G., Zverev V.V. Studying of molecular mechanisms of rubella virus attenuation evidence from Russian strain C-77. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2012; 3: 28–34. (in Russian) [Дмитриев Г.В., Борисова Т.К., Файзулов Е.Б., Забияка Ю.И., Десяткова Р.Г., Зверев В.В. Изучение молекулярных механизмов аттенуации вируса краснухи на примере отечественного штамма С-77. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2012; 3: 28–34].
- Sakata M., Nakayama T. Protease and helicase domains are related to the temperature sensitivity of wild-type rubella viruses. *Vaccine*. 2011; 29(5): 1107–13.
- Sakata M., Komase K., Nakayama T. Histidine at position 1042 of the p150 region of a Takahashi vaccine live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity. *Vaccine*. 2009; 27: 234–42.
- Zhou Y., Tzeng W.P., Ye Y., Huang Y., Li S., Chen Yu. et al. A cysteine-rich metalbinding domain from rubella virus non-structural protein is essential for viral protease activity and virus replication. *Biochem. J.* 2009; 417(2): 477–83.
- Liang Y., Gillam S. Rubella virus RNA replication is cis-preferential and synthesis of negative- and positive-strand RNAs is regulated by the processing of nonstructural protein. *Virology*. 2001; 282: 307–19.
- Zhou Y., Tzeng W.P., Wong H.C. et al. Calcium-dependent association of calmodulin with the rubella virus nonstructural protease domain. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(12): 8855–68.

Поступила 30.09.13
Received 30.09.13