

41. Geisbert T.W., Young H.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Kagan E., Hensley L.E. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in Ebola hemorrhagic fever: over expression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *J. Inf. Dis.* 2003; 188 (11): 1618–29.
42. Semina N.A., Kovaleva E.P. Diseases of health workers caused by especially dangerous infections associated with laboratory contaminations. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2005; 1 (20): 23–8. (in Russian)
43. Johnson R., Cai V., Wahl-Jensen V., Fang Y., Friedrich T., Radoshitzky S.R., et al. Simian hemorrhagic fever virus as a model for risk group 4 pathogens. In: *Fundamental and Applied Aspects of Medical Primatology: Proceedings of the Second International Conference.* Sochi–Adler; 2011; 1: 227–33.
44. Johnson R.F., Dodd L.E., Yellayi S., Gu W., Cann J.A., Jett C. et al. Simian hemorrhagic fever virus infection of rhesus macaques as a model of viral hemorrhagic fever: clinical characterization and risk factors for severe disease. *Virology.* 2011; 421 (2): 129–40.
45. Simian haemorrhagic fever – SHF. In: Lapin B.A., Dzhikidze E.K., Shevtsova Z.V., Stasilevich Z.N. *Modeling of human infectious diseases in laboratory primates* [Modelirovanie infektsionnykh zabollevaniy cheloveka na laboratornykh primatakh]. Sochi: Sterh LLC; 2011: 184–8. (in Russian)
46. Vatter H.A., Brinton M.A. Differential responses of disease-resistant and disease-susceptible primate macrophages and myeloid dendritic cells to simian hemorrhagic fever virus infection. *J. Virol.* 2014; 88 (4): 2095–106. Epub ahead of print 2013 Dec 11.
47. Lauck M., Sibley S.D., Hyeroba D., Tumukunde A., Weny G., Chapman C.A. et al. Exceptional simian hemorrhagic fever virus diversity in a wild African primate community. *J. Virol.* 2013; 87 (1): 688–91.
48. Kuhn J., Jahrling P.B., Calisher C.H., eds. *Simian Hemorrhagic Fever.* Archives of Virology Supplement Vol. 21. London: Springer; 2015.

Получена 16.01.14

Received 16.01.14

© НАЙХИН А.Н., ЛОСЕВ И.В., 2015

УДК 578.832.083.3

Найхин А.Н., Лосев И.В.

## Роль консервативных и гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов внутренних белков вирусов гриппа А в формировании цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа

ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург

Цитотоксический Т-клеточный иммунитет имеет важное значение в предотвращении развития гриппозной инфекции и смягчении ее тяжести. Сведения о механизмах индукции вирусспецифических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (ВЦТЛ) у людей способствуют лучшему пониманию эпидемиологии гриппа и путей совершенствования его вакцинопрофилактики. В последние годы благодаря появлению новых иммунологических и генно-инженерных методик в мировой литературе накоплен материал об особенностях формирования ВЦТЛ-иммунного ответа к различным эпитопам внутренних белков вирусов гриппа А. В настоящем обзоре обобщены эти сведения. Основное внимание уделяется: (i) формированию гетеросубтипического ВЦТЛ-иммунного ответа к консервативным иммунодоминантным сайтам; (ii) механизмам ухода от контроля гриппозной инфекции хозяинскими ВЦТЛ с помощью эволюционных эскап-мутаций; (iii) роли хозяйского HLA-гаплотипа на развитие этого типа иммунного ответа. Обсуждается важность цитируемых материалов для функциональной и прикладной иммунологии, а также для вакцинного дела.

Ключевые слова: *противогриппозный иммунитет; цитотоксический Т-клеточный иммунитет к вирусам гриппа А; иммунодоминантные консервативные и вариабельные эпитопы вирусов гриппа А; эскап-мутаций.*

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2015; 60 (1): 11–16.*

Naikhin A.N., Losev I.V.

### The impact of conservative and hypervariable immunodominant epitopes in internal proteins of the influenza A virus on cytotoxic T-cell immune responses

Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, 197376, St. Petersburg, Russia

The cytotoxic T-cell immune response plays an important role in the prevention of influenza infection and reducing of the illness severity. The knowledge about mechanisms of the virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell induction in humans is necessary for better understanding of influenza epidemiology and vaccine development. Due to application of new immunological and genetic methods in last years, considerable amount of data became available in the literature about CD8<sup>+</sup> T-cell immune responses to different influenza A viruses. This review summarizes these data. The main attention is paid to (i) heterosubtypic CTL responses to conservative immunodominant sites; (ii) mechanisms of viral escape from the virus-specific CTLs by means of evolutionary escape-mutations; (iii) influence of the HLA haplotype on CD8<sup>+</sup> T-cell immune responses. The importance of these data for immunology and vaccinology is discussed.

Key words: *anti-influenza immunity; cytotoxic T-cell immune responses to influenza A viruses; immunodominant conservative and variable epitopes of influenza A viruses; escape-mutations.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(1): 11–16. (In Russ.)*

Для корреспонденции: Найхин Анатолий Нойевич, д-р мед. наук, проф.; e-mail: vaccine@mail.ru  
Correspondence to: Anatoliy Naykhin, MD, PhD, DSc, Prof; e-mail: vaccine@mail.ru

Наиболее изученные консервативные иммунодоминантные ВЦТЛ-эпитопы внутренних белков вирусов гриппа А [4, 8, 12, 14, 16–23]

Эпитоп	Аминокислотная последовательность	HLA-рестрикция
NP <sub>44-52</sub>	CTELKLSDY	A1
NP <sub>174-184</sub>	ILRGSVAHK	B27
NP <sub>265-273</sub>	RRSGAAGAAVK	A3
M1 <sub>58-66</sub>	GILGFVFTL	A*0201
M1 <sub>128-135</sub>	ASCMGLIY	B*3501
PB1 <sub>591-599</sub>	VSDGGPNLY	A1

Исследования цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) проводятся со второй половины 70-х годов прошлого века, т. е. с момента их четкой идентификации. Эти исследования были основаны на анализе цитотоксического иммунного ответа к цельным вирионам вирусов гриппа А и их отдельным белкам. В конце XX – начале XXI века сформировался новый подход к изучению данного вопроса, основанный на тестировании пулов ЦТЛ, проявляющих специфичность к различным эпитопам внутренних и внешних белков вириона. Переход на новое качество в анализе Т-клеточного цитотоксического иммунного ответа связан с возможностью использования новых технологических приемов, а именно:

– идентификация вирусспецифических ЦТЛ (ВЦТЛ) фенотипа CD8<sup>+</sup> не только в традиционном цитотоксическом тесте с применением радиоизотопов, но и в таких методиках, как ELISPOT и цитометрическая фиксация внутриклеточных цитокинов после вирусной стимуляции *in vitro* мононуклеаров периферической крови (МПК);

– стимуляция МПК как цельными вирусами, так и их генно-инженерными вариантами: обратногогенетическими структурами с аминокислотными заменами в пределах изучаемых эпитопов, отдельными синтетическими пептидами и мультимерными антигенпрезентирующими комплексами, включающими различные МНС-молекулы в сочетании с вирусными пептидами;

– использование обширного массива компьютерных биоинформативных баз данных по аминокислотному секвенсу различных штаммов, а также по построению трехмерных моделей белковых структур вириона с вычленением иммунофункциональных сайтов.

В настоящем обзоре предпринята попытка обобщить накопившиеся за последние годы данные о продукции ЦТЛ, специфичных к консервативным и гипервариабельным иммунодоминантным эпитопам внутренних белков вируса гриппа А. В цитируемых работах использовались перечисленные выше методики в тех или иных композиционных вариантах.

ВЦТЛ фенотипа CD8<sup>+</sup> играют важную роль в контроле вирусных инфекций посредством цитолитического разрушения зараженных клеток с последующей их элиминацией из организма. В отношении гриппозной инфекции доказана роль ВЦТЛ в снижении тяжести заболевания и предотвращении инфицирования как в экспериментальных опытах на мышах [1], так и при заражении добровольцев [2].

ВЦТЛ контролируют вирусную инфекцию, в том числе и гриппозную, путем распознавания в клетке пептидов, которые возникают в результате процессинга вирусных белков протеосомными антигенпрезентирующими клетками. Далее эти обработанные протеины транспортируются в эндоплазматический ретикулум, где они связываются с комплементарными молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (МНСI). Этот комплекс транспортируется в мембрану инфицированных клеток для узнавания ВЦТЛ через их Т-клеточный рецептор (TCR).

При процессинге вирусных белков генерируется большое количество пептидов, но в конечном счете только некоторые из них презентуются в комплексе с молекулами МНСI и узнаются ВЦТЛ для последующего запуска лизиса клеток-мишеней. Эти комплексы названы иммунодоминантными [3]. Наличие иммунодоминантных комплексов продемонстрировано при изучении цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа у людей [4] и животных [5].

Привлечение в комплексы молекул МНСI не является случайным, поскольку они формируют ВЦТЛ-иммунный

ответ к вирусам гриппа А в проекции на аллельное многообразие человеческой популяции по человеческому лимфоцитарному антигену, т. е. по HLA-гаплотипу. Именно HLA-гаплотип и определяет набор иммунодоминантных эпитопов, которые могут быть узнаны ВЦТЛ. Данный феномен называется HLA-рестрикцией ВЦТЛ-иммунного ответа. У людей различают три серотипа HLA-молекул (A, B, C) с их аллельными вариантами. У линейных мышей СВА ВЦТЛ-иммунный ответ развивается к иммунодоминантным эпитопам, рестриктированным по H-2\* [6].

У людей и лабораторных животных главными мишенями для ВЦТЛ являются иммунодоминантные эпитопы внутренних белков вирусов гриппа А, присутствующие на поверхностной мембране инфицированных клеток. Наибольшее количество таких эпитопов отмечено в нуклеопротеине (NP) и матриксном белке (M). На сегодняшний день в качестве иммунодоминантных описано 10 аминокислотных последовательностей NP, M, полимерного (PB1) и неструктурного (NS) белков: NP<sub>44-52</sub>, NP<sub>109-111</sub>, NP<sub>174-184</sub>, NP<sub>265-273</sub>, NP<sub>338-347</sub>, NP<sub>383-391</sub>, NP<sub>418-426</sub>, NS<sub>122-130</sub>, PB1<sub>591-599</sub>, M<sub>58-66</sub> [1, 7–13]. Эти последовательности презентуются в сочетании с HLA-молекулами A1, A3, B37, B8 и B27 [4]. Данные эволюционного биоинформативного компьютерного анализа показали, что у штаммов вирусов гриппа А (H3N2) 1957–2010 годов выделения иммунодоминантные эпитопы, взаимодействующие с TCR и направленные на индукцию CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, составляли не более 3–3,5% от всех изученных эпитопов [14–17]. При этом такие эпитопы присутствовали во всех вакцинных штаммах, использовавшихся в обозначенный промежуток времени.

Подавляющее большинство иммунодоминантных эпитопов всех внутренних белков вирусов гриппа А в эволюционном смысле являются консервативными и даже глубоко консервативными. В табл. 1 приведены наиболее изученные из них. Среди последних ярким примером может служить иммунодоминантный эпитоп матриксного белка M1<sub>58-66</sub>, презентуемый молекулами HLA-A\*0201, т. е. аллелью, в высокой степени преобладающей в человеческой популяции [18]. Этот эпитоп присутствует в разных подтипах вируса гриппа А. Доказано, что ВЦТЛ-иммунный ответ к вирусу гриппа А у HLA-A\*0201-позитивных людей более интенсивный, чем у негативных по этой аллели лиц [4].

Консервативные иммунодоминантные эпитопы внутренних вирусных белков обладают функциональными ограничениями, сдерживающими появление в них антигенных изменений [21]. По-видимому, именно этот феномен и определяет полноценное формирование гетеросубтипического Т-клеточного цитотоксического иммунитета, т. е. иммунитета, опосредованного перекрестно реагирующими ЦТЛ, специфическими к разным подти-

Гипервариабельные иммунодоминантные ВЦТЛ-эпитопы внутренних белков вируса гриппа А(Н3N2)

Эпитоп	Стартовая аминокислотная последовательность	Escape-мутации в эпитопе (аминокислотная замена)	HLA-рестрикция	Расположение escape-мутации	Временная эволюционная характеристика появления escape-мутации	Ссылка
NP <sub>103-111</sub>	KWMRELVLVY	K103R	B*1503	В зоне контакта с TCR	Циклический	[22]
NP <sub>251-259</sub>	AEIEDLIFS	S259L	B*4002		Та же	[22]
NP <sub>380-388</sub>	ELKSRWAI	R384G	B*0801	Якорный участок	Фиксированный	[16]
NP <sub>383-391</sub>	SRYWIRTR	R384G	B*2705		Та же	[16]
		R384K			Транзиторный	[16, 20]
NP <sub>418-426</sub>	LFPDKPTIM	P423S D421E M425V	B*3501	В зоне контакта с TCR	Фиксированный	[7]
NSI <sub>122-130</sub>	AIMDKNIL	D125E	A*0201			[43]
		I129M				

Примечание. Циклический – периодически повторяющиеся мутации; фиксированный – закрепленные мутации; транзиторный – отмеченные только в пределах одного сезона.

пам вирусов гриппа А, в том числе и зоонозного происхождения. В опытах *in vivo* и на основании эпидемиологических данных показано, что этот тип иммунитета может снижать тяжесть естественной и экспериментальной гриппозной инфекции [24–30].

Стратегия выживания всех вирусов основана на уходе от адаптивного иммунного ответа хозяина. Для этого они обладают набором специальных механизмов. В частности, уход от ВЦТЛ-иммунного ответа основан на предотвращении узнавания соответствующих эпитопов этими клетками путем разрегулирования взаимодействия вирусных пептидов с молекулами МНСI [31, 32]. Осуществляется это главным образом двумя альтернативными путями. Вирусы с крупным ДНК-геномом и большой кодирующей способностью могут экспрессировать в течение инфекции различные белки, которые интерферируют пути антигенного процессинга и презентации. Это продемонстрировано на ВИЧ-1 (Nef-белок), аденовирусах (белок E3/19K), герпес-вирусе (белок, кодирующий антигенную презентацию) [33–35]. Кроме того, данный феномен описан в отношении вируса хориоменингита [36, 37], гепатитов В [38, 39] и С. На примере ВИЧ, гепатита С и вируса Эпштейна–Барр доказано, что мутантные варианты, предшествующие новому актуальному вирусу, элиминируются из циркуляции в результате воздействия на них селективного пресса хозяйских ВЦТЛ на популяционном уровне [33, 37, 40–42].

Вирусы, использующие в процессе репликации РНК-полимеразу с низкой точностью воспроизведения или обратную транскриптазу, обычно имеют небольшие геномы. Последние не экспрессируют белки, которые предотвращают узнавание ВЦТЛ соответствующих эпитопов. Такие вирусы обладают другим механизмом адаптации – накопление в процессе антигенного дрейфа точечных мутаций в иммунодоминантных сайтах вследствие воздействия на них популяционного иммуноселективного пресса. Это относится к сайтам, которые узнаются как антителами, так и ВЦТЛ. Такие мутации, обозначенные как escape-мутации, могут содействовать закреплению новых дрейфовых вариантов вирусов гриппа А в человеческой популяции.

Ранее считалось, что escape-мутации сосредоточены в структуре поверхностных белков этих вирусов, т. е. в гемагглютинине (НА) и нейраминидазе (НА). В последние годы появились работы, документирующие существование таких мутаций в иммунодоминантных ВЦТЛ-эпитопах внутренних белков вирусов гриппа А. На сегодняшний

день escape-мутации обнаружены в пяти иммунодоминантных эпитопах NP и в одном NSI (табл. 2).

Показано, что вирусы гриппа А [4, 7, 16, 22, 44], подобно другим вирусам [31, 32, 45], могут резко снижать ВЦТЛ-иммунный ответ у людей при наличии escape-мутаций в перечисленных в табл. 2 гипервариабельных антигенных эпитопах. Это связано с тем, что выявленные естественные дрейфовые мутации с различными аминокислотными заменами в данных эпитопах ослабляют и даже отменяют презентацию комплементарных молекул МНСI у людей, соответственно позитивных по гаплотипу HLA. Тем самым обеспечивается уход от узнавания вариабельных сайтов вирусного белка хозяйскими ВЦТЛ. Удаление или замена escape-мутаций приводят к восстановлению узнавания ВЦТЛ соответствующего антигенного сайта [16, 46, 47]. Эволюционный аминокислотный сиквенс-анализ разных штаммов вируса гриппа А(H1N1) и А(H3N2), изолированных в течение длительных отрезков времени (от 10 до 73 лет), показал, что escape-мутации в структуре NP появляются на отдельных этапах антигенного дрейфа и быстро (в течение одного сезона) закрепляются в человеческой популяции [22]. Феномен их быстрой фиксации объяснен в теоретической модели [48].

По базам данных аминокислотного сиквенса актуальных и ранее циркулировавших штаммов вируса гриппа А определено число ко-мутаций, ассоциированных с escape-мутацией NP-R384G [49]. В других работах, основанных на анализе репродукции вируса гриппа А/Гонконг/1/68(H3N2) с набором различных ко-мутаций в NP (E375G, M239V, D127E, R65K), показано, что мутация R384G резко снижала репродукцию этого штамма, а введение только одной ко-мутации E375G восстанавливало его урожайность [50, 51]. Это свидетельствует о том, что в природе способность escape-мутаций в иммунодоминантных сайтах NP супрессировать репликацию вирусов гриппа А компенсируется наличием ко-мутаций, которые восстанавливают их репродуктивную активность.

Известна повышенная способность элиминировать раковые и вирусинфицированные клетки цитотоксическими Т-клетками с высокой функциональной avidностью [52–55]. На основе использования различных синтетических пептидов проведен сравнительный анализ функциональной avidности разных клонов человеческих ВЦТЛ, реагировавших *in vitro* с консервативными (NP<sub>44-52</sub>, NP<sub>174-184</sub>, NP<sub>265-273</sub>, M1<sub>58-66</sub>, P1<sub>591-599</sub>) и вариабельными (NP<sub>380-388</sub>, NP<sub>383-391</sub>, NP<sub>418-426</sub>) эпитопами [8]. Самые

высокие показатели avidности зафиксированы у клонов ВЦТЛ, реагировавших с переменными штаммами, особенно с NP<sup>418-426</sup>. Это свидетельствует о том, что наибольший вклад в популяционный селективный пресс на вирусы гриппа А оказывают именно клоны ВЦТЛ с высокой функциональной avidностью. В результате в иммунодоминантных переменных сайтах внутренних белков вирусов накапливаются escape-мутации, что, во-первых, снижает узнавание ВЦТЛ этих сайтов, во-вторых, повышает репродуктивную активность нового вируса. Все вместе это способствует персистенции последнего в человеческой популяции и удлинению нового этапа селекции штаммов.

Удаление методом обратной генетики гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов NP<sup>383-391</sup> или NP<sup>418-426</sup> вирусов гриппа А результировалось в значительном снижении уровня IFN $\gamma$ -экспрессирующих CD8<sup>+</sup>-Т-клеток после стимуляции *in vitro* этими модифицированными вирусами культур лимфоцитов доноров, позитивных соответственно по HLA-B\*2705 и HLA-B\*3501 [20, 56]. Кроме того, это сопровождалось и торможением литической активности ВЦТЛ в отношении вирусзараженных клеток-мишеней. В целом приведенные данные показали, что потеря только одного из гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов NP существенно влияет на функциональную активность ВЦТЛ, что проявляется снижением продукции IFN $\gamma$  и их литической активности. Биологический смысл данных феноменов пока до конца не ясен, ибо по сути они направлены как бы против самого вируса, т. е. обеспечивают торможение его репликации. Возможно, что сохранение IFN $\gamma$ -продуцирующей и литической активности Т-клеток при контакте с новым вирусом каким-то образом влияет на дальнейшую эволюцию escape-мутаций.

Как уже упоминалось выше, иммунодоминантные консервативные эпитопы внутренних белков вируса гриппа А формируют за счет индукции кроссреактивных ЦТЛ гетеросубтипический цитотоксический иммунитет населения против всех подтипов этого возбудителя. Его индукция особенно важна в случае возникновения пандемии, когда у популяции отсутствует В-клеточная иммунологическая память к HA и/или NA возбудителя. В связи с этим отдельно изучен вопрос об узнавании гомо- и гетерологичных вариантов вирусов гриппа А (H1N1) и А (H3N2) человеческими рестриктивными по HLA-B\*3501 клонами ЦТЛ, проявляющими специфичность к разным природным escape-мутациям в пределах эпитопа NP<sup>418-426</sup> [46]. Небольшая пропорция таких ЦТЛ, специфических к одному мутантному варианту, реагировала с другими мутантными вариантами. Эти данные служат доказательством существования пула кроссреактивных ЦТЛ, специфичных не только к консервативным эпитопам NP разных подтипов вируса гриппа А, но и к гипервариабельным эпитопам этого белка. В экспериментальном опыте на мышах, экспрессирующих молекулы HLA-B\*2705 и трансгенных по этой аллели, показано, что полноценный ВЦТЛ – иммунный ответ к гипервариабельному иммунодоминантному эпитопу NP<sup>383-391</sup> вируса А/PR/8/34(H1N1) развивался только в том случае, когда животные были предварительно заражены гетерологичным вирусом А (H3N2) [57]. Совокупность приведенных данных свидетельствует в пользу того, что, во-первых, пул перекрестно реагирующих ЦТЛ, специфичных к иммунодоминантным гипервариабельным сайтам NP, продуцирует в организме только при наличии предшествующих контактов с циркулирующими подтипами вируса гриппа А, во-вторых, этот пул может увеличиваться по мере возрастания числа инфицированных гетеросубтипическими вариантами и, в-третьих,

данный пул, оказывая иммуноселективный прессинг, способствует возникновению escape-мутаций в переменных сайтах NP.

И наконец, в экспериментальном опыте *in vivo* проведено влияние гипервариабельных сайтов NP на тяжесть проявления гриппозной инфекции [13, 57]. Удаление природной escape-мутации NP-R384G из вируса А/PR/8/34 (H1N1) вызвало снижение тяжести первичной инфекции у мышей с рестрикцией по HLA-B\*2705. При этом показатели аттенуации вируса коррелировали с увеличением интенсивности ВЦТЛ-иммунного ответа. По-видимому, в природе возникновение escape-мутаций в гипервариабельных иммунодоминантных участках NP циркулирующего вируса гриппа А сопровождается не только ослаблением ВЦТЛ-иммунного ответа хозяина, но и как следствие повышением патогенности данного вируса.

Обобщая с теоретических позиций представленный в настоящем обзоре материал, можно отметить следующее.

Подавляющее большинство иммунодоминантных эпитопов внутренних белков вируса гриппа А являются консервативными, т. е. не подверженными антигенному дрейфу под влиянием популяционного иммуноселективного пресса со стороны хозяйских ВЦТЛ. Их антигенный дрейф сдерживается функциональными самоограничениями, скорее всего, на уровне вирусного генома. Функциональная активность этих иммунодоминантных консервативных эпитопов определяет наличие у населения гетеросубтипического ВЦТЛ-иммунитета к разным подтипам вируса гриппа А.

Некоторые иммунодоминантные ВЦТЛ-эпитопы внутренних белковых структур вирусов гриппа А, рестриктивные по тем или иным HLA-аллелям, в антигенном смысле относятся к переменным и гипервариабельным. Антигенные изменения таких эпитопов ассоциированы с ускользанием от их узнавания вирус-специфическими CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитами за счет появления escape-мутаций в якорных последовательностях или последовательностях, контактирующих с TCR. Это приводит к разрегулированию процесса связывания вирусных пептидов с комплементарными молекулами MHC I и препятствует качественной презентации хозяйским ВЦТЛ. В результате нарушается контроль гриппозной инфекции данными клетками.

Даже единичные природные аминокислотные замены в гипервариабельных ВЦТЛ-эпитопах вирусных внутренних белков влияют на многие патогенетические признаки: количественные показатели ВЦТЛ-иммунного ответа и функциональную активность данных клеток (лизис инфицированных клеток-мишеней, выработка IFN $\gamma$ ), репликативные свойства вируса, тяжесть гриппозной инфекции.

Аккумуляция escape-мутаций в переменных иммунодоминантных ВЦТЛ-эпитопах внутренних белков вирусов гриппа А связана с повышенным иммуноселективным воздействием ВЦТЛ с высокой функциональной активностью, что ускоряет появление escape-мутаций, как следствие пролонгирует персистенцию вируса на органном и популяционном уровне.

Среди пула перекрестно реагирующих ВЦТЛ существует небольшая по численности субпопуляция этих клеток, которые узнают различные естественные escape-мутации в пределах гипервариабельного иммунодоминантного эпитопа (NP<sup>418-426</sup>). По-видимому, число таких кроссреактивных ВЦТЛ может увеличиваться после повторных инфицирований людей разными подтипами вируса гриппа А, что приводит к возникновению ВЦТЛ-

иммунитета против новых escape-мутаций, селекционированных под влиянием иммунопресса.

С практической точки зрения иммуноэпитопный анализ вирусов гриппа А открывает перспективу разработки новых подходов к совершенствованию иммуногенности гриппозных вакцин (особенно живых) в части индукции ВЦТЛ-иммунного ответа.

Первый из них касается манипуляций с escape-мутациями. При анализе представленного материала складывается впечатление, что исключение методом обратной генетики таких мутаций из иммунодоминантных эпитопов внутренних вирусных белков вакцинного штамма может реализоваться в усилении и/или расширении продукции перекрестно реагирующих ЦТЛ, специфичных к консервативным эпитопам, т. е. в стимуляции полноценного гетеросубтипического CD8<sup>+</sup>-Т-клеточного иммунитета. Введение такой вакцины в случае возникновения угрозы пандемического распространения новых вирусов гриппа А будет способствовать стимуляции у людей ВЦТЛ-иммунологической памяти к консервативным антигенным последовательностям, общим для всех подтипов вирусов гриппа А, в том числе и зоонозного происхождения. Хотя подобный препарат и не предотвратит развитие пандемии, но, безусловно, будет способствовать снижению тяжести инфекции и смертности населения. В настоящее время активно разрабатывается направление по использованию в дизайне вакцин консервативных иммунодоминантных ВЦТЛ-эпитопов внутренних белков вируса гриппа А [14, 15, 17, 19, 23, 58–60].

Второй подход связан с анализом существующего принципа приготовления живых гриппозных вакцин с точки зрения индукции ВЦТЛ-иммунитета. Он основан на обратногогенетическом или реассортационном включении полного набора внутренних белков вирусов гриппа от холодоадаптированных доноров аттенуации: А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в России и А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) в США. В процессе пассирования этих штаммов при пониженной температуре они приобрели присущие только им точечные мутации в генах почти всех внутренних белков вируса гриппа А. Вопрос о вовлечении этих мутаций в зоны иммунодоминантных эпитопов остается открытым. Если в этом плане обнаружатся какие-либо негативные иммунологические последствия, то их можно устранить методом обратной генетики.

Третий подход опирается на анализ популяционного ВЦТЛ-иммунного ответа. Так, с момента прекращения циркуляции вирусов гриппа А (H2N2) прошло более 45 лет. За это время в циркулирующих штаммах вирусов гриппа А (H1N1) и А (H3N2) накопилось определенное число дрейфовых аминокислотных замен в пределах иммунодоминантных эпитопов внутренних белковых структур вириона. Именно с такими мутантными штаммами и контактировало население. В результате у людей генерировались клоны ЦТЛ иммунологической памяти, специфические к данным эпитопам этих подтипов вируса гриппа А. В то же время вакцинация живыми вакцинами индуцирует клоны ЦТЛ, специфические к эпитопному профилю внутренних белков донора аттенуации подтипа А (H2N2). Иммунологические последствия такого несоответствия требуют специального изучения. И в этом случае обратная генетика дает возможность иммунокоррекции вакцинных штаммов.

И, наконец, четвертый подход касается оценки иммуногенности гриппозных вакцин по индукции цитотоксического Т-клеточного иммунитета. На сегодняшний день он основан только на анализе общего пула ВЦТЛ. Такой анализ не конкретизирует поствакцинальный

иммунный ответ ни по его эпитопной направленности (иммунодоминантность, вариабельность, консервативность ВЦТЛ-эпитопов внутренних белков), ни по HLA-аллельной принадлежности вакцинируемых лиц. Между тем именно эти характеристики являются основополагающими во влиянии на качественные и количественные параметры ВЦТЛ-иммунного ответа на вакцинные штаммы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 14-15-00034.

## ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Taylor P.M., Askonas B.A. Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. *Immunology*. 1986; 58 (3): 417–20.
2. McMichael A.J., Gotch F.M., Noble G.R., Beare P.A. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N. Engl. J. Med.* 1983; 309 (1): 13–7.
3. Yewdell J.W. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Immunity*. 2006; 25: 533–43.
4. Boon A.C., de Mutsert G., Graus Y.M., Fouchier R.A., Sintnicolaas K., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. The magnitude and specificity of influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in humans is related to HLA-A and -B phenotype. *Virology*. 2002; 76: 582–590.
5. Chen W., Pang K., Masterman K.A. et al. Reversal in the immunodominance hierarchy in secondary CD8<sup>+</sup> T cell responses to influenza A virus: roles for cross-presentation and lysis-independent immunodominance. *J. Immunol.* 2004; 173: 5021–7.
6. Belz G.T., Xie W., Doherty P.C. Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza A virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J. Immunol.* 2001; 166: 4627–33.
7. Boon A.C., de Mutsert G., Graus Y.M. et al. Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 2002; 76 (5): 2567–72.
8. Boon A.C., de Mutsert G., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. The hypervariable immunodominant NP<sub>418–426</sub> epitope from the influenza A virus nucleoprotein is recognized by cytotoxic T lymphocytes with high functional avidity. *J. Virol.* 2006; 80 (12): 6024–32.
9. DiBrino M.T., Tsuchida T., Turner R.V. et al. An HLA-B35-restricted epitope modified at an anchor residue results in an antagonist peptide. *Eur. J. Immunol.* 1993; 26: 335–339.
10. Huet S., Nixon D.F., Rothbard J.B. Structural homologies between two HLA B27-restricted peptides suggests residues important for interaction with HLA B27. *Int. Immunol.* 1990; 2: 311–6.
11. McMichael A.J., Gotch F.M., Rothbard J. HLA B37 determines an influenza virus nucleoprotein epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1986; 164: 1397–406.
12. Rimmelzwaan G.F., Kreijtz J.H., Bodewes R., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Influenza virus CTL epitopes, remarkably conserved and remarkably variable. *Vaccine*. 2009; 27: 6363–5.
13. Sutton J., Rowland-Jones S., Rosenberg W. et al. A sequence pattern for peptides presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA B8 revealed by analysis of epitopes and eluted peptides. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 447–453.
14. Heiny A.T., Miotto O., Srinivasan K.N., Khan A.M., Zhang G.L., Brusich V. et al. Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS ONE* (2007) / www.plosone.org/ Issue 11/e1190.
15. Tan P.T., Heiny A.T., Miotto O., Salmon J., Marques E.T., Lemonnier F., August J.T. Conservation and diversity of influenza A (H1N1) HLA-restricted T cell epitope candidates for epitope-based vaccines. *PLoS ONE* (2010) / www.plosone.org/ vol. 5/ Issue 1/e8754.
16. Voeten J.T.M., Bestebroer N.M., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 2000; 74 (15): 6800–7.
17. Wu K.-W., Chien C.-Y., Li S.-W., King C.-C., Chang C.-H. Highly conserved influenza A virus epitope sequences as candidates of H3N2 flu vaccine targets. *Genomics*. 2012; doi: 10.1016/j.ygeno.2012.06.003.
18. Marsh S., Parham P., Barber L. *The HLA facts book*. Academic Press, London, United Kingdom, 2000.
19. Assarsson E., Bui H.-H., Sidney J., Zhang Q., Glenn J., Oseroff C. et al. Immunomic analysis of the repertoire of T-cell specificities for influenza A virus in humans. *J. Virol.* 2008; 82 (24): 12 241–51.

20. Berkhoff E.G., Boon A.C., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Sint-nicolaas K., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. A mutation in the HLA-B82705-restricted NP<sub>383-391</sub> epitope affects the human influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *J. Virol.* 2004; 78 (10): 5216–22.
21. Berkhoff E.G., de Wit E., Geelhoed-Mieras M.M., Boon A.C., Symons J., Fouchier R.A. et al. Functional constraints of influenza A virus epitopes limit escape from cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 2005; 79: 11 239–46.
22. Berkhoff E.G., Geelhoed-Mieras M.M., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Assessment of the extent of variation in influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes by using virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell clones. *J. General Virology.* 2007; 88: 530–5.
23. Stanekova Z., Vareckova E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology J.* 2010; 7: 351.
24. Найхин А.Н. Противогриппозный иммунитет: отечественный вклад в изучение проблемы и перспективные направления развития исследований. *Мед. академ. журнал.* 2010; 10 (4): 249–55.
- [Naikhin A.N. Anti-influenza immunity: the contribution of Russian scientists to the research work and promising directions. *Med. Academic J.* 2010; 10 (4): 249–55]. (in Russian)
25. Найхин А.Н., Чиркова Т.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Донина С.А., Руденко Л.Г. Стимуляция гомо- и гетерологической Т-клеточной иммунологической памяти у волонтеров, привитых живой реассортантной гриппозной вакциной типа А(Н5N2). *Вопросы вирусологии.* 2012; 1: 38–42.
- [Naikhin A.N., Chirkova T.V., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Donina S.A., Rudenko L.G. Stimulation of homo- and heterologic T-cell immunological memory in volunteers inoculated with live influenza A (H5N2) reassortant vaccine. *Voprosy virusologii.* 2012; 1: 38–42]. (in Russian)
26. Найхин А.Н. Гетеросубтипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация. *Вопросы вирусологии.* 2012; 57 (3): 4–9.
- [Naikhin A.N. Heterosubtypic immunity to influenza A viruses: epidemiological data, involvement of different immunological factors, vaccination. *Voprosy virusologii.* 2012; 57 (3): 4–9]. (in Russian)
27. Epstein S.L. Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland Family Study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature. *J. Infect. Dis.* 2006; 193 (1): 49–53.
28. Grebe K.M., Yewdell J.W., Bennink J.R. Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? *Microbes Infect.* 2008; 10 (July (9)): 1024–9.
29. Kreijtz J.H., Bodewes R., van Amerongen G. et al. Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice. *Vaccine.* 2007; 25 (January(4)): 612–20.
30. Kreijtz J.H., de Mutsert G., van Baalen C.A. et al. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus. *J. Virol.* 2008; 82 (11): 5161–6.
31. Koup R.A. Virus escape from CTL recognition. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 779–82.
32. Oldstone M.B. How viruses escape from cytotoxic T lymphocytes: molecular parameters and players. *Virology.* 1997; 234: 179–85.
33. Borrow P., Lewicki H., Wei X. et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* 1997; 3: 205–11.
34. Jugovic P., Hill A.M., Tomazin R. et al. Inhibition of major histocompatibility complex class I antigen presentation in pig and primate cells by herpes simplex virus type 1 and 2 ICP47. *J. Virol.* 1998; 72: 5076–84.
35. Khanna R., Burrows S.R., Argaet V., Moss D.J. Endoplasmic reticulum signal sequence facilitated transport of peptide epitopes restores immunogenicity of an antigen processing defective tumour cell line. *Int. Immunol.* 1994; 6: 639–45.
36. Moskophidis D., Zinkernagel R.M. Immunobiology of cytotoxic T-cell escape mutants of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 1995; 69: 2187–93.
37. Pircher H.D., Moskophidis D., Rohrer U. et al. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature.* 1990; 346: 629–33.
38. Bertoletti A., Costanzo A., Chisari F.V. et al. Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 933–43.
39. Bertoletti A., Sette A., Chisari F.V. et al. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature.* 1994; 369: 407–10.
40. Borrows J.M., Borrows S.R., Poulsen L.M. et al. Unusually high frequency of Epstein-Barr virus genetic variants in Papua New Guinea that can escape cytotoxic T-cell recognition: implications for virus evolution. *J. Virol.* 1996; 70: 2490–6.
41. de Campos-Lima P.O., Levitsky V., Brooks J. et al. T cell responses and virus evolution: loss of HLA A11-restricted CTL epitopes in Epstein-Barr virus isolates from highly A11-positive populations by selective mutation of anchor residues. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1297–305.
42. Guglietta S., Garbuglia A.R., Pacciani et al. Positive selection of cytotoxic T lymphocyte escape variants during acute hepatitis C virus infection. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35: 2627–37.
43. Man S., Newbery H., Crotzer V.I. et al. Definition of human T cell epitope from influenza A non-structural protein 1 using HLA-A21 transgenic mice. *Inf. Immunol.* 1995; 7: 597–605.
44. Rimmelzwaan G.F., Fouchier R.A., Osterhaus A. Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: a correlate of protection and a basis for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology.* 2007; 18: 529–36.
45. Ploegh H.L. Viral strategies of immune evasion. *Science.* 1998; 280: 248–53.
46. Boon A.C., de Mutsert G., van Baarle D., Smith D.J., Lapedes A.S., Fouchier R.A. et al. Recognition of homo- and heterosubtypic variants of influenza A viruses by human CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* 2004; 172: 2453–60.
47. Portela A., Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* 2002; 83 (April (Pt 4)): 723–34.
48. Gog J.R., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Grenfell B.T. Population dynamics of rapid fixation in cytotoxic T lymphocyte escape mutants of influenza A. *PNAS.* 2003; 100 (19): 11 143–7.
49. Macken C., Lu H., Goodman J., Boykin L. The value of a database in surveillance and vaccine selection. Options for the control of influenza IV. *Elsevier Science.* Amsterdam. The Netherlands, 2001: 103–6.
50. Rimmelzwaan G.F., Berkhoff E.G., Nieuwkoop N. J. et al. Functional compensation of a detrimental amino acid substitution in a cytotoxic-T-lymphocyte epitope of influenza A viruses by comutations. *J. Virology.* 2004; 78 (16): 8946–9.
51. Rimmelzwaan G.F., Berkhoff E.G., Nieuwkoop N.J., Smith D.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Full restoration of viral fitness by multiple compensatory co-mutations in the nucleoprotein of influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte escape mutants. *J. General Virology.* 2005; 86: 1801–5.
52. Alexander-Miller M.A. High-avidity Cd8<sup>+</sup> T cell: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol. Res.* 2005; 31: 13–24.
53. Derby M., Alexander-Miller M., Tse R., Berzofsky J. High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *J. Immunol.* 2001; 166: 1690–7.
54. O'Connor D.H., Allen T.M., Vogel T.U. et al. Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* 2002; 8: 493–9.
55. Zeh H.J., Perry-Lalley III.D., Dudley M.E. High-avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J. Immunol.* 1999; 162: 989–94.
56. Berkhoff E.G., Geelhoed-Mieras M.M., Verschuren E.J., Baalen C.A., Gruters R.A., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. The loss of immunodominant epitopes affects interferon- $\gamma$  production and lytic activity of the human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in vitro. *J. Clinical and Exp. Immunol.* 2007; 148: 296–306.
57. Bodewes R., Geelhoed-Mieras M.M., Nieuwkoop N.J., Hanson J.A., David C.S., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Redundancy of the influenza A virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in HLA-B\*2705 transgenic mice limits the impact of a mutation in the immunodominant NP<sub>383-391</sub> epitope on influenza pathogenesis. *Virus Research.* 2011; 155: 123–30.
58. Carrat F., Flahault F. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine.* 2007; 25: 6852–62.
59. Elhefnawi M., ALAidi O., Mohamed N., Kamar M., El-Azab I., Zaba S., Siam R. Identification of novel conserved functional motifs across most influenza A viral strains. *Virology J.* 2011; 8: 44.
60. Li C., Rappuoli R., Xu X.-N. Correlates of protection against influenza infection in humans – on the path to a universal vaccine? *Current Opinion in Immunology.* 2013; 25: 470–6.

Поступила 30.12.13

Received 30.12.13