



УДК 577.113.5:578.832.1А

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЕРВИЧНЫХ СТРУКТУР М-ГЕНОВ
РЕМАНТАДИНУСТОЙЧИВОГО И РЕМАНТАДИНЧУВСТВИТЕЛЬНОГО
ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А/FPV/Weybridge (H7N7)**

*Каргинов В. А., Блинов В. М., Сафронов П. Ф.,
Мажаев Л. В., Головин С. Я., Немесов С. В.,
Салохвалов Е. И.*, Шарова П. К.*, Юферов В. И.*,
Урываев Л. В.*, Букринская А. Г.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.;*

** Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Академии
медицинских наук СССР, Москва*

Проведены синтез и клонирование ДНК, комплементарных М-генам ремантадинчувствительного и ремантадинрезистентного штаммов вируса гриппа А/FPV/Weybridge (H7N7). Первичные структуры кДНК определяли методом Максама — Гилберта. Выявлены три нуклеотидные замены, две из которых приводят к изменению аминокислотных остатков в составе белков М₁ и М₂. Сделано предположение о существовании кодируемого «минус»-цепью РНК полинуклеотида М₃ длиной 68 аминокислотных остатков. Обсуждается характер аминокислотных замен в белках М₂ и М₃ и их возможная связь с устойчивостью к ремантадину.

В настоящее время существуют два способа профилактики гриппа — вакцинация и предупредительный прием химиотерапевтических средств. Основной недостаток первого — постоянное появление новых антигенно-измененных вариантов вируса и вследствие этого быстрое снижение защитного эффекта при вакцинации старыми вариантами вируса гриппа. Применение химических профилактических средств также приводит к появлению новых, устойчивых к ним вариантов. В частности, последствием широкого использования аналогов адамантана для профилактики и лечения гриппа стало появление устойчивых к ним штаммов вируса гриппа. Для целенаправленного поиска новых, более эффективных производных адамантана уже недостаточно их простого перебора. Необходимо изучать молекулярные основы такой устойчивости с целью направленного синтеза более «неудобных» для вируса гриппа аналогов этого соединения.

В работах [1, 2] было показано, что, вероятнее всего, амантадинустойчивость определяется изменениями в структуре М-гена вируса гриппа. Авторы работы [3] определили первичную структуру М-генов амантадинустойчивых и чувствительных штаммов вируса гриппа и локализовали соответствующие замены аминокислот.

Задача настоящей работы — выявление характера аминокислотных замен в М-белках, приводящих к появлению устойчивости к ремантадину — аналогу адамантана, разрешенному к применению в СССР.

С этой целью нами были клонированы в составе плазмид рАТ153 и рBR322 и секвенированы методом Максама — Гилберта кДНК М-генов ремантадинчувствительного и устойчивого вариантов вируса гриппа А/FPV/Weybridge H7N7-подтипа.

Ремантадинустойчивый штамм был выделен Пушкарской и Львовым [4] в результате семи пассажей исходного вирусного штамма на культуре фибробластов куриных эмбрионов (ФЭК) при повышающихся концентрациях ремантадина — от 1,25 до 20 мкг/мл; причем ремантадин в концентрации 25 мкг/мл в 1000 раз подавлял инфекционный титр

чувствительного исходного штамма и практически не снижал титр резистентного варианта.

В определенных нами нуклеотидных последовательностях М-генов исходного штамма вируса гриппа А/FPV/Weybridge и его устойчивого к ремантадину варианта (рис. 1) обнаружены три нуклеотидных различия в положениях 93, 349 и 804. Замены в положениях 349 и 804 приводят к изменению аминокислотных остатков в белках М₁ (Phe¹⁰⁹ → Leu¹⁰⁹) и М₂ (Ser³¹ → Asn³¹) (первыми указаны аминокислоты в исходном штамме). Замена в белке М₂ совпала с мутацией Ser → Asn, встречающейся в ряде амантадинустойчивых вариантов нескольких штаммов вируса гриппа [3]. В этой же работе [3] было показано, что помимо мутации в положении 31 наблюдаются замены аминокислот в положениях 27, 30, 34 в белке М₂ и отсутствуют замены в белке М₁. В нашем случае замена Phe → Leu в белке М₁ носит консервативный характер — гидрофобная аминокислота заменялась на гидрофобную. Мало вероятно, что она играет какую-либо роль в устойчивости к ремантадину.

По данным работы [3], определяющими в амантадинчувствительности вируса гриппа являются замены в белке М₂. Полученные нами экспериментальные результаты вполне укладываются в эту версию. Вместе с тем нам хотелось бы высказать некоторые дополнительные соображения относительно молекулярных причин явления устойчивости к ремантадину.

Ранее мы сообщали [5], что в нуклеотидной последовательности М-гена вируса гриппа AUSSR/90/77 наблюдается взаимная комплементарность 5'- и 3'-концевых областей. Аналогичная картина имеет место и в случае М-гена штамма А/FPV/Weybridge (рис. 2). Отметим, что иницирующий кодон для белков М₁ и М₂ входит в состав предполагаемой дуплексной структуры (рис. 2а). Если в таком же виде изобразить концы «минус»-цепи РНК (рис. 2б), то выявляется любопытный факт. В положении, идентичном положению иницирующего кодона для белков М₁ и М₂, располагается АТG-кодон, с которого может начинаться считывание гипотетического белка М₃ длиной 68 аминокислотных остатков (рис. 1 и 2б). Поскольку районы, предшествующие обоим АТG-кодонам, практически идентичны, все сигналы, необходимые для специфической трансляции белков М₂ и М₁, могут присутствовать и перед иницирующим кодоном белка М₃ (рис. 2в). Аналогичная открытая рамка трансляции наблю-

Сравнение аминокислотных последовательностей участков белков М₂ и М₃, связанных с устойчивостью к амантадину

Штамм		Белок М ₂ , участок 25—35	Белок М ₃ , участок 56—66
Чувствительные	Weybridge	PLVIAASIIGI	DPNDTCGNNER
	Mallard [8]	PLVIAASIIGI	DPNDTCGNNER
	Rostock [9]	PLIIAASIIGI	DPNDTCGNNER
	USSR [5]	PLVVAASIIGI	NPNDTCGNNKR
	Singapore [10]	PLVVAASIIGI	DPNDTCGNNER
	Udorn [11]	PLVVAASIIGI	DPNDTRSNNKR
	A/Bangkok [12]	PLVVAASIIGI	DPNDTRSNNKR
Резистентные	PR8 [13]	PLTIAAKFIGI	DPNEFCGNSER
	PR8 Mount Sinai [14]	PLTIAANIIGI	DPNDICGNSER
	PR8 Cambridge [15]	PLAIAANIIGI	DPNDICGNSER
	B/Lee/40 [16]	ILSICSFIIISA	
	Rostock [3]	PLSTAASIIGI	DPNDTCGNSER
	Singapore [3]	PLAIAATNIIGI	DPNDICGNSER
	Bellamy [3]	PLVVAANIIGI	DPNDICGNSER
	Weybridge [3]	PLAIAATNIIGI	DLNDICGNSER
Weybridge *	PLVIAANIIGI	DPNDICGNSER	
	SW/IW [17]	HTIAAKFIGI	NPNEFCGNSDM

* Наши данные.

H-конец M₁: M S L L T E V E T Y V L
H-конец M₂: M S L L T E V E T (продол-

5' AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCAGGTCGAAACGTACGTTCT 60
3' TCGTTTTTCGTCACATCTATAAATTTCTACTCAGAAGATTGGCTCCAGCTTTCACATGCAAGA

S I I P S G P L K A E I A Q R I E D V F
жение M₂ с 739-го нуклеотида) (A)

CTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGAATGGAAGATGTCCTT 120
CAGATAGTAGGGCAGTCCCGGGCAGTTTCGGCTCTAGCGGCTCTTAACTTCTACAGAA

A G K N T D L E A L M E W L K T R P I L

TGCAGGGAAGAACACAGACCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCGATCCT 180
ACGTCSCCTTCTGTGTCTGGAACCTCCGAGAGTACCTTACCGATTCTGTCTCGGCTAGGA

S P L T K G V L G F V F T L T V P S E R

TGCACCTCTGACTAAGGGCGTTTTAGGGTTTGTGTTTACGCTCACCGTCCCCAGTGAGCG 240
CAGTGGAGACTGATTCSCCAAAATCCCAACACAAATGCGAGTGGCACGGCTCACCTCGC

G L Q R R R F V Q N A L N G N G D P N N

AGG ACTGCAGCGTAGACGCTTGTCCAAAATGCCCTAAAATGGGAACGGGATCCGAATAA 300
TCCTGACGCTCCCATCTCGGAACAGCTTTTACGGGATTTACCTTGCSCCTAGGCTTATT

M D R A V K L Y K K L K R E Y T F H G A

CATGGATACGCCGTCGAAGCTATACAAAGAAGCTAAAGAGAGAGATAACATTCATGGAGC 360
GTACCTATCTCGGCAGTTCGATATGTTCTTCCATTTCTCTCTATTTGTAAGGTACCTCG

K E V A L S Y S T G A L A S C M G L I Y

CAAGCACTGTCACCTCAGTTACTACTGGTGCCTTGCAAGTTGCATCGGCTCATATA 420
GTTCTTCCACCGTGAATGAGATGACCACCGTCAACGTTCAACGTACCCAGAGTATAI

N R M G T V T T E V A L G L V C A T C E

CAACAGAAATGGAACTCTGACCACAGAGGTCGCCATTAGGCCATGTTGTTGCCACTTGTGA 480
GTTCTTACCCTTCACACTGGTGTCTCCACCGTAATCCGATCACACACCGGTGAACACT

Q I A D S H H R S H R Q M V T T T N P L

GCAAAATGCTGACTCACAICATCGGCTCACAGACAGATGGTEACCACCACCFATCCACT 540
CGTTTANCCACTGAGTGTAGTSCCAGACTCTCTGTCTACCACIGGTGGTGGTATAGGTCG

I R H E N R M V M A S T T A K A M E Q M

AAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTAATGCCACGACTACGCCTAAGGCTATGGAGCAAA 600
TTAGTCCGTAATTTCTCTTACCAATACCGGTCGTATCCCGATTCGGATACCTCGTTA

A G S S E Q A E T M R V A S Q A R Q I

CGCTGGGTCACGTAACAGGCGAGCGGAAGCCATGGAGGTTCCTAGTCAAGGCTAGGCAGAT 660
CCAAACCCAGTTCCTTGTCCCTCCCTTCGGTACCTCCAACCAACAGTCCGATCCGTCFA

G Q A M R T V Q T H P S S S A G L K D D

CCGACCCGATCAGGACAGTTCCGACTCATCCTAGCTTCAGTCTGGTCTGAAAGATGA 720
CCGCTCCCTTACTTCTGTCAACCCCTGAGTAGGATCGAGGTCACCACCAGACTTCTACT

L L E N L Q A Y Q K R M G V A L Q R F K OH-
 M₂: P T R N G W E C S C S D S конец M₁

TCTCCTTGAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAGCTGCACGGATTCAA 780
 AGACGAACTTTTAAACGTCGGGATGGTCTTTGCCTACCCTCAGCTCGACGTCGCTAACTT

S D P L V I A A ^(N) S I I G I L H F I L W I
 (A)

GTGATCCTCTCGTTATTGCCCGCAAGTATCATTTGGGATCTTGCACTTTATATTGTGGATTG 840
 CACTAGGAGAGCAATAACGGCGGTATAGTAACCCSTAGAACCTGAAATATAACACCTAAC

OH- : T I R E N N G C T D N P D Q V K Y Q P N
 конец (H)

M₃ L D R L F F K C I Y R R F K Y G L K R G

TTGATCGTCTTTTCTTCAAATCTATTTATCGTGGCTTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGC 900
 AACTAGCAGAAAAGAAGTTTACATAAATAGCAGCGAAATTTATGCCAAACTTTTCTCCCG

K I T K E E F T N I T A K F V T Q F S P
 P S T E G V P E S M R E E Y R Q E Q Q N

CTTCTACGGAAGGAGTGCCTGACTCTATGAGGGAAGAATATCGGCAGGAACAGCAGAATG 960
 GAAGATGCCTTCTCACGGACTCAGATACTCCCTTCTTATAGCCGTCCTGTGCTCTTAC

R R R F S H R L R H P F F I P L F L L I
 A V D V D D G H F V N I E L E OH-конец M₂

CTGTGGATCTTGACGATGGTCAATTTGTCAACATAGAGCTGGAGTTAAAAAACTCCTTGT 1020
 GACACCTACAACCTGCTACCAGTAAACAGTTGTATCTCGACCTCATTTTTTGTGATGGAACA

S H I N Y I T M : H-конец M₃

TTCTACT 3'
 AAGATGA 5' 1027

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность кДНК М-гена вируса гриппа А/FPV/Weubridge (H7N7) и кодируемые ею аминокислотные последовательности. Кругами обозначены нуклеотиды и аминокислоты, встречающиеся в ремантадинустойчивом штамме, подчеркнуты иницирующие и терминирующие кодоны

дается и для всех секвенированных «минус»-цепей М-генов вируса гриппа, а длина гипотетического белка М₃ во всех случаях равна 68 аминокислотам.

Ранее в работах [6, 7] было показано, что открытые рамки трансляции наблюдаются в 5'-концах негативных цепей генов белков NS и NP, причем каждый из кодируемых полипептидов имеет протяженные гидрофобные сигнальные последовательности, с помощью которых они могут закрепляться в мембране. Анализ аминокислотной последовательности белка М₃ также выявил наличие гидрофобной сигнальной последовательности на N-конце этого полипептида (рис. 1). Кроме того, в С-концевой области белка М₃ в ремантадинчувствительном варианте имеется потенциальный сайт гликозилирования.

Мы проанализировали характер аминокислотных замен в белках М₂ и М₃ в областях, различающихся в ремантадинчувствительном и ремантадинрезистентном вариантах, а также сравнили полученные результаты с данными о первичных структурах этих областей для других штаммов (таблица). Выяснилось, что аминокислоты, находящиеся в положениях 27 и 31 белка М₂ и в положениях 60 и 64 белка М₃ (см. таблицу), являются критическими в плане устойчивости к амантадину. В белке М₂ обе критические аминокислоты входят в состав гидрофобной якорной области; при переходе от чувствительного варианта к резистентному происходит замена по крайней мере одной из двух аминокислот (а чаще всего

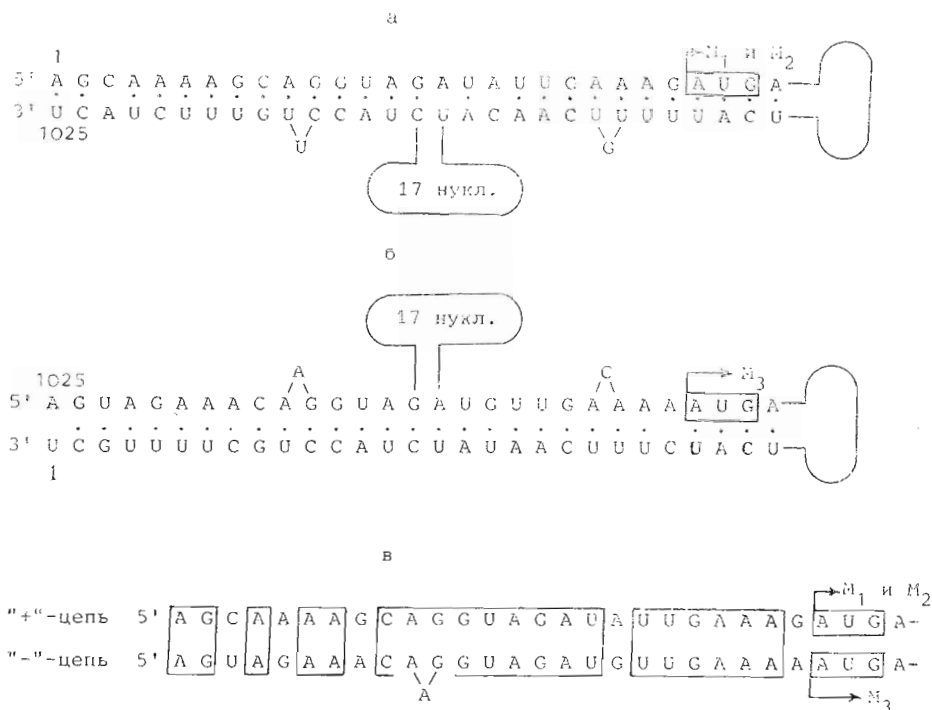


Рис. 2. Вероятная вторичная структура концевых областей «плюс»- (а) и «минус»-цепи (б) М-гена; в — сравнение 5'-концевых участков «плюс»- и «минус»-цепей М-гена. В рамки взяты гомологичные участки, рамками со стрелкой помечены стартовые кодоны

обеих) на более гидрофильную. Эти же две нуклеотидные замены должны приводить к прямо противоположным изменениям в гипотетическом белке M_3 : гидрофильные аминокислоты Thr и Asn, встречающиеся во всех амантадинчувствительных штаммах, заменяются на более гидрофобные. При этом во всех резистентных штаммах, за исключением штамма Rostock, исчезает потенциальный сайт гликозилирования.

Знание этих особенностей, как нам кажется, позволяет предсказывать устойчивость или чувствительность штамма к ремантадину, основываясь на данных по первичной структуре М-гена. В частности, пользуясь этими критериями, можно предположить, что штамм SW/IW будет устойчив к ремантадину (таблица). Каков конкретный механизм, посредством которого такие аминокислотные замены влияют на устойчивость вируса к действию ремантадина, в настоящий момент сказать трудно. Вероятнее всего, они сказываются на стадии проникновения вируса в клетки хозяина. Ответ на этот вопрос могут дать только дальнейшие эксперименты.

Авторы выражают признательность Т. П. Микрюковой за большую работу по очистке вируса и выделению РНК.

Экспериментальная часть

В работе использовался штамм вируса гриппа A/FPV/Weybridge из музея Института вирусологии АМН СССР им. Д. И. Ивановского.

Все процедуры, связанные с наработкой и очисткой вируса, выделением РНК, получением и клонированием кДНК, секвенированием ДНК, описаны нами ранее в работах [5, 18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Lubeek M. D., Schulman J. L., Palese P. J. // J. Virol. 1978. V. 28. № 3. P. 740–746.
2. Hay A. J., Kennedy N. C. T., Skehel J. J., Appleyard G. // J. Gen. Virol. 1979. V. 42. № 1. P. 189–191.
3. Hay A. J., Wolstenholme A. J., Skehel J. J., Smith M. H. // EMBO J. 1985. V. 4. № 11. P. 3021–3024.
4. Лушкарская Н. Л., Львов Д. К. // Вопр. вирусол. 1980. Т. 24. № 3. С. 303–306.

5. Самохвалов Е. И., Каргинов В. А., Чижиков В. Е., Блинов В. М., Юферов В. П., Василенко С. К., Урываев Л. В., Жданов В. М. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1080–1087.
6. Baez M., Taussing R., Zazra J. J., Young J. F., Palese P. // Nucl. Acids. Res. 1980. V. 8. № 23. P. 5845–5858.
7. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Нересов С. В., Петров Н. А., Сафронов П. Ф. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 369–374.
8. Hay A. J., Zambon M. C. // Virology. 1985. V. 155. № 3. P. 608–613.
9. McCauley J., Mahy B. W. J., Inglis S. C. // J. Gen. Virol. 1982. V. 58. № 2. P. 211–215.
10. Hay A. J., Wolstenholme A. J., Shekel J. J., Smith M. H. // EMBO J. 1985. V. 4. № 11. P. 3021–3024.
11. Lamb R. A., Lai C. J. // Virology. 1981. V. 112. № 2. P. 746–751.
12. Ortin J., Martinez C., del Rio L. et al. // Gene. 1983. V. 23. № 2. P. 233–239.
13. Winter B., Fields S., Brownlee G. G. // Nature. 1981. V. 292. P. 72–75.
14. Hamish A., McCauley J., Waterfield M., Gething M. // J. Virol. 1980. V. 107. № 2. P. 548–551.
15. Winter G., Fields S. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 9. P. 1965–1974.
16. Briedis D. J., Lamb R. A., Shoppin P. W. // Virology. 1982. V. 116. № 2. P. 581–588.
17. Nakajima K., Nobusawa E., Nakajima S. // Virology. 1984. V. 139. № 1. P. 194–198.
18. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Гуроров В. В., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Нересов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Сандахчиев Л. С. // Биоорганич. химия. 1984. Т. 10. № 11. С. 1535–1543.

Поступила в редакцию
15.I.1987

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE M-GENE PRIMARY STRUCTURES
AND CORRESPONDING AMINO ACID SEQUENCES
OF REMANTADINE-SENSITIVE AND REMANTADINE-RESISTANT
STRAINS OF THE INFLUENZA VIRUS A/FPV/Weybridge (H7N7)**

KARGINOV V. A., BLINOV V. M., SAFRONOV P. F., MAMAEV L. V.,
GOLOVIN S. Y., NETESOV S. V., SAMOKHVALOV E. I.*, SHAROVA N. K.*,
YUFEROV V. P.*, URIVAEV L. V.*, BUKRINSKAYA A. G.*

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltzovo, Novosibirsk Region;
** D. I. Ivanovski Institute of Virology, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

Full-length DNA copies of M-gene of remantadine-sensitive and remantadine-resistant variants of the influenza virus strain A/FPV/Weybridge (H7N7) have been synthesised and cloned. Complete nucleotide sequences of both cDNAs were determined by the Maxam – Gilbert method. There are three nucleotide substitutions, two of which lead to amino acid changes in M₁ and M₂ proteins. The existance of M₃ protein, a polypeptide 68 amino acids long, encoded by the negative strand of RNA, is suggested. Amino acid changes in M₂ and M₃ proteins and their relation to the remantadine resistance are discussed.