

## ROBUSTNESS OF VIRUSES

V. I. AGOL

*There are inherited and acquired types of viral resistance to adverse environmental conditions. While inherited resistance requires high fidelity of replication, acquired resistance is caused by replication errors making viral variants. These processes, having general biological significance, are illustrated by the properties of some viruses.*

**Устойчивость вирусов к неблагоприятным условиям может быть наследственной или приобретенной. Наследственная устойчивость требует точного копирования генома, а приобретенная основана на ошибках репликации, создающих вирусные варианты. Эти общебиологические закономерности проиллюстрированы свойствами некоторых вирусов.**

## “ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ” ВИРУСОВ

В. И. АГОЛ

Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

Вирусы могут проявлять поразительную устойчивость к разнообразным неблагоприятным внешним факторам. Более того, во многих случаях они легко приспосабливаются к новым условиям, например вредоносным химическим соединениям, в том числе даже таким, с какими им ранее не приходилось встречаться (например, к новым лекарствам). Практическое значение живучести вирусов очевидно. Не менее интересны фундаментальные закономерности, лежащие в ее основе. В статье использованы примеры, почерпнутые преимущественно из данных изучения двух групп вирусов: пикорнавирусов и аденовирусов. Пикорнавирусы — это мелкие вирусы животных, у которых строго упорядоченная (икосаэдрическая) белковая оболочка обволакивает однонитевой РНК — геном длиной 7,5–8 тыс. нуклеотидов (например, возбудители полиомиелита, гепатита А, ящура). Аденовирусы, вызывающие, в частности, острые респираторные заболевания человека (ОРВИ, ОРЗ), крупнее, также имеют икосаэдрическую оболочку, и их геном представлен двунитевой молекулой ДНК, в которой около 36 тыс. пар нуклеотидов.

### ВИДОВАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

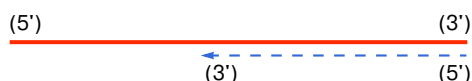
Структура конкретного вируса хорошо приспособлена к условиям, существующим в его экологической нише. Например, некоторые пикорнавирусы и аденовирусы размножаются преимущественно в желудочно-кишечном тракте. Соответственно они не обращают внимания на кислый pH желудочного сока, пищеварительные протеолитические ферменты, детергенты желчи и другие агрессивные факторы. Такая устойчивость действительно поразительна: ведь, чтобы вызвать инфекционный процесс в чувствительной клетке, эти вирусы должны освободить заключенную в белковой оболочке нуклеиновую кислоту при температуре тела, нейтральном pH и других мягких физиологических условиях. Другими словами, эти вирусы в зависимости от обстоятельств либо исключительно стабильны, либо чрезвычайно лабильны. Это парадоксальное сочетание свойств обусловлено биологически целесообразным устройством белковой оболочки (капсида) вирусов.

Хотя капсиды всех пикорнавирусов построены по общему плану, кислотоустойчивость характерна именно для тех представителей этой группы, которые размножаются в кишечнике. Другие пикорнавирусы

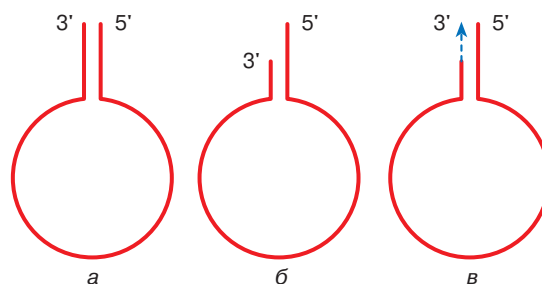
(например, риновирусы также возбудители ОРВИ, паразитирующие в клетках слизистой верхних дыхательных путей), напротив, легко разрушаются при небольшом сдвиге pH в кислую сторону. Таким образом, детали вирусной архитектуры очень важны.

Яркий пример биологической “предусмотрительности” дает механизм репликации аденовирусной ДНК. Дело в том, что в молекуле ДНК есть особо уязвимые участки — ее концы. Существует класс клеточных ферментов (так называемые экзонуклеазы), разрушающих именно концы молекул нуклеиновых кислот. Однако у аденовирусов поврежденные концы ДНК могут регенерировать. В линейных цепочках нуклеиновых кислот различают 5'- и 3'-концы. Биосинтез новой цепи всегда идет в 5' → 3'-направлении. Поскольку в двунитевой структуре цепи обычно антипараллельны (имеют противоположную направленность), матричная цепь всегда считывается в 3' → 5'-направлении (рис. 1). У аденовирусов есть по крайней мере два разных способа восстановить утраченную концевую последовательность нуклеотидов. Один из них заключается в следующем. Утеря конца двунитевой молекулы означает, что на одной из нитей укорочен 5'-конец, а на другой — 3'-конец. При репликации генома этого вируса происходит образование промежуточных одонитевых молекул ДНК. Нуклеотидная последовательность обеих полноразмерных одонитевых молекул такова, что их концы взаимно комплементарны и поэтому способны взаимодействовать друг с другом, образуя структуру, называемую “ручкой сковородки” (рис. 2, а). Регенерация утерянного по какой-либо причине 3'-конца цепи (рис. 2, б) большой проблемы для вируса не представляет, поскольку структура полноразмерной ДНК может быть восстановлена в результате копирования 5'-конца этой же молекулы (рис. 2, в).

Возможна регенерация концевых нуклеотидов генома и у пикорнавирусов (рис. 3). К 5'-концу вирусной РНК, на котором находятся два уридилловых остатка (UU), ковалентно присоединен вирусный белок, называемый VPg. Синтез цепи вирусной РНК на матрице комплементарной (–) нити начинается при участии нуклеотид-белкового комплекса: к затравочному белку VPg сначала нематричным способом присоединяется динуклеотид UU, который соответствует 5'-концу вирусной РНК. Удаление одного-двух концевых остатков уридилловой кислоты из РНК некоторых пикорнавирусов не лишает их инфекционности, поскольку эти нуклеотиды все равно приносят с собой VPg–UU. Ясно, что у по-



**Рис. 1.** Полярность матричной (сплошная линия) и вновь синтезируемой (пунктир) цепей нуклеиновых кислот

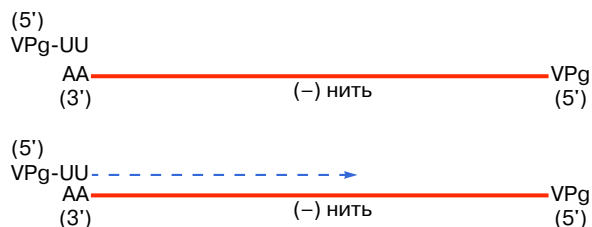
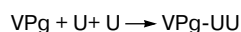


**Рис. 2.** Схема, объясняющая возможность “регенерации” концов аденовирусной ДНК. Схема регенерации 3'-концевого участка цепи ДНК. Комплементарные концы промежуточной полноразмерной одонитевой ДНК взаимодействуют друг с другом и образуют “ручку сковородки” (а). При делеции 3'-концевого участка (б) он может быть полностью восстановлен в результате копирования 5'-конца той же цепи (в)

томства укороченных РНК воссоздается нормальная концевая последовательность.

Особый класс вирусной помехоустойчивости связан с дублированием генов или (значительно чаще) с дублированием функций генов. Например, у многих аденовирусов есть два участка, кодирующие так называемые вирус-ассоциированные РНК (VA1 и VA2). Эти похожие (хотя и неидентичные), относительно низкомолекулярные РНК не кодируют белков, но препятствуют подавлению белкового синтеза, которое могло бы произойти в результате защитных мероприятий зараженной клетки. Поскольку обе вирус-ассоциированные РНК действуют сходным образом, инактивация одного из VA-генов не приводит к серьезным неприятностям. Случай дубликации (точнее, трипликации) генов известен и у пикорнавирусов: у вируса ящура есть три весьма сходных гена, кодирующие VPg. Вирус остается жизнеспособным (хотя и ослабленным) при сохранении хотя бы одного из них.

Чаше можно наблюдать частичное дублирование функций вирусных белков. Чем крупнее геном, тем больше примеров такого рода. У аденовирусов



**Рис. 3.** Схема инициации полиовирусной РНК (пунктир) на комплементарной (–) матрице при участии VPg–UU

весьма распространен альтернативный сплайсинг, в результате которого один ген обеспечивает образование нескольких молекул мРНК, различающихся по расположению и длине участков (интронов), удаляемых из этих молекул в процессе созревания (посттранскрипционного процессинга). Соответственно образуется несколько белков, которые в некоторых случаях близки по структуре (например, различаются наличием дополнительных доменов). Родственные белки могут проявлять схожую (хотя и неодинаковую) биологическую активность. Поэтому мутации в некоторых местах данного гена, инактивирующие один из белков, могут остаться без последствий для другого белка этого же семейства (например, если они попадут в интрон соответствующей РНК). В результате функция, контролируемая этим геном, будет нарушена лишь частично (если вообще нарушена) и вирус не потеряет жизнеспособности.

В приведенном примере белки со сходной функцией были хотя и разными, но сходными. Бывает и частичное перекрытие функций совсем неродственных вирусных белков. Например, несколько разных аденовирусных белков препятствуют развитию апоптоза (программируемой смерти), который индуцируют другие белки этого вируса. Помимо всего прочего перекрытие функций может рассматриваться как страховка против возможных генетических повреждений.

У аденовирусов, как и у других вирусов с крупным геномом, наряду с абсолютно обязательными (эссенциальными) генами, без участия которых репродукция невозможна, есть и такие, которые требуются либо для интенсификации какого-либо процесса, либо только при особых условиях. В качестве примера приведем так называемую область Е3, захватывающую около 10% генома и кодирующую несколько белков, помогающих преодолевать защитные функции макроорганизма. Серьезные травмы этого участка ДНК (например, делеции или замена чужеродными генами) для вируса несмертельны.

Рассмотренные свойства, придающие вирусам устойчивость, относятся к числу тех, которые выработаны в процессе эволюции и имеются у всех (или большинства) представителей данного вида. Для того чтобы их сохранить в потомстве, необходима высокая точность воспроизведения (репликации) генетического материала.

## ПРИБРЕТЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

Природа не только снабдила вирусы средствами, обеспечивающими их жизнеспособность при стандартных условиях, но также и предусмотрела возможность индивидуального приспособления к неожиданно возникающим обстоятельствам. Приобретенная приспособленность обусловлена мутационными изменениями, то есть ошибками, происходящими при репликации генома. Разумеется,

полезными оказываются не любые мутации, а те из них, при которых измененная макромолекула (белок или нуклеиновая кислота) полностью или частично сохраняет способность выполнять свою обычную работу, но при этом может выполнять ее и в необычных условиях.

Здесь мы сталкиваемся с важнейшей биологической закономерностью: уникальная, высокоспецифическая функция может быть обеспечена отнюдь не единственной структурой биологической макромолекулы. Функция может сохраняться и при весьма значительных модификациях структуры, поскольку ключевое значение имеют особым образом пространственно организованные *участки* молекулы. Способы же, какими эта пространственная организация достигается, могут сильно варьировать.

Вирусы с их хорошо известной изменчивостью представляют собой богатый источник иллюстраций на эту тему. Можно обнаружить (или создать) мутантные, но функционально активные формы любого вирусного белка. Большую практическую важность имеет способность вирусов менять свою внешность (поверхность капсида), чтобы стать неузнаваемыми для иммунных систем организма. Трудность вакцинации против некоторых вирусных заболеваний (например, гриппа) в значительной степени связана именно с этим обстоятельством. Важно, что изменение поверхностных свойств капсида при этом не затрагивает его функциональных способностей (связанных со стабильностью вирусной частицы, способностью заражать клетку и т. д.).

О высокой пластичности капсидных белков пикорнавирусов говорит также возможность включения в их структуру чужеродных антигенных детерминант для получения химерных вакцин. Заманчиво, например, иметь штамм непатогенного пикорнавируса, который в результате пересадки участка белковой оболочки какого-либо опасного вируса мог бы быть использован для иммунизации против вызываемого опасным вирусом заболевания. Попытки такого рода неоднократно предпринимались, но за рамки лабораторных экспериментов они пока, к сожалению, не вышли. Для наших рассуждений, однако, важно, что регулярная структура вирусного капсида и связанные с этой структурой функции при таких «трансплантациях» могут сохраняться.

Качественно сходная вариабельность наблюдается и у других вирусных белков, в том числе и таких, которые выполняют весьма тонкую, например ферментативную, работу. Поэтому изобретение лекарств, препятствующих размножению того или иного вируса (а таких изобретений было множество), редко заканчивается появлением этого лекарства в аптеке. Оказывается, что соответствующий вирусный белок способен очень быстро изменяться таким образом, что лекарство перестает мешать его работе. Встречается и более парадоксальная ситуация: привыкание к лекарству может приводить к

тому, что вирус становится от него зависимым, как наркоман от наркотиков. В общем виде вирусная “токсикомания” объясняется просто: лекарство вызывает определенные изменения в вирусном белке и нарушает его функцию. В результате мутаций белок как бы нейтрализует негативное воздействие лекарства и функция поддерживается при комбинированном действии лекарства и мутации. Если же лекарство убрать, то функция опять будет нарушена, на этот раз в результате противолечебной мутации.

Важнейший фактор помехоустойчивости — функциональная эквивалентность семейства сходных структур — наблюдается и на уровне нуклеиновых кислот, в частности в их концевых участках. В 5'-нетранслируемой области (5НТО) пикорнавирусных РНК имеется протяженный (несколько сот нуклеотидов), структурированный элемент (IRES), необходимый для инициации синтеза белка — к этому месту присоединяются рибосомы (подробнее об этом см. [2]). Мутации этого элемента не только сказываются на трансляционной активности вирусных матриц (поскольку изменяется их способность связывать рибосомы), но и сопровождаются изменением биологических свойств вируса. Так, низкая нейровирулентность (аттенуированный фенотип) вакцинных штаммов полиовируса обусловлена среди прочего и определенной структурой их IRESов, характеризующихся пониженной трансляционной активностью, в частности в клетках центральной системы. В организме вакцинированных довольно быстро отбираются варианты (ревертанты), приобретающие большую конкурентоспособность вследствие утери аттенуирующих мутаций (заметим, что неприятными последствиями для вакцинируемого это обычно не сопровождается). Нейровирулентность ревертантов и белоксинтезирующая активность их РНК повышаются. Обычно это результат мутаций в IRESе, которые стабилизируют шпильчатую (спиральную) структуру одного из его элементов, причем мутации могут происходить в разных местах этой шпильки. Таким образом, функционально равнозначными оказываются молекулы РНК с разной последовательностью нуклеотидов, что, естественно, повышает помехоустойчивость вируса. Явление того же порядка (сохранение работоспособности у неидентичных структур) наблюдается и на другом конце молекулы РНК некоторых пикорнавирусов.

Особый тип геномных перестроек может происходить при одновременном размножении двух вариантов вируса в условиях, недостаточно благоприятных для каждого из них. Вакцинные штаммы вируса полиомиелита хотя и способны неплохо размножаться в кишечнике вакцинированных, все же, по-видимому, не полностью адаптированы к этой нише. Во всяком случае при использовании живой противополиомиелитной вакцины, содержащей одновременно три серотипа вируса, вакцинирован-

ные дети начинают быстро выделять не только ревертанты, но и межтипные рекомбинанты, то есть вирусы, разные участки генома которых соответствуют участкам РНК разных родителей. Можно предположить, что эти рекомбинанты лучше приспособлены к размножению в кишечнике.

## ПОВРЕЖДЕНИЕ ГЕНОМА МОЖЕТ ПРИВОДИТЬ К ЕГО ПЕРЕСТРОЙКЕ

В предыдущем разделе рассмотрены случаи, когда функция вирусного белка или нуклеиновой кислоты могла быть с более или менее равным успехом выполнена семейством сходных молекул. Помехоустойчивость вирусных генетических систем может проявляться и в том, что восстановление функции происходит не путем возврата (полного или частичного) к исходной структуре, но в результате создания существенно новой структуры. Известные примеры касаются прежде всего 5НТО РНК пикорнавирусов.

Восстановление нарушенной (в результате удаления нескольких нуклеотидов) регуляторной трансляционной функции 5НТО полиовируса может осуществляться разными способами, в том числе за счет самостоятельного выбрасывания протяженных (длинной несколько десятков или даже более сотни нуклеотидов) эволюционно-консервативных районов РНК. Возникающие при этом геномы имеют столь значительные (хотя и локальные) отличия от РНК полиовируса, что в каком-то смысле их можно рассматривать как шаг на пути к возникновению нового вида вируса. Многие биологические свойства этих вариантов не меняются (например, антигенность) или меняются мало (например, размножение в клетках стандартных тканевых культур), другие же могут драматически модифицироваться (например, резко падает нейровирулентность).

Возможности для появления таких перестроек в кодирующей области генома более ограничены, но все же существуют. Введение дополнительного три-нуклеотида в определенное место гена одной из полиовирусных протеаз оказалось почти убийственным. Однако у одного из выживших ревертантов имела вставка 15 чужеродных нуклеотидов (происходивших, судя по последовательности, из клеточной рибосомной РНК), кодирующих пять новых аминокислотных остатков.

## МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ

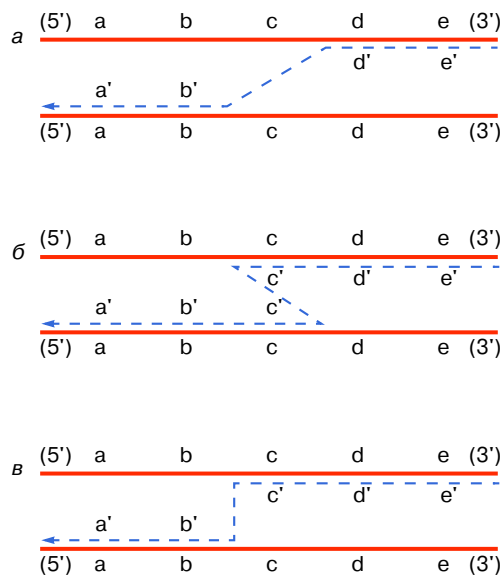
Приспособление вирусов к новым условиям или требованиям, как и залечивание генетических травм, предполагает, что репликация вирусного генома не должна быть абсолютно точной. Уровень допустимых ошибок должен находиться в пределах определенного коридора: если он слишком мал — ограничиваются возможности адаптации (и эволюции), если слишком велик — возникают проблемы с сохранением наследственных свойств. Существуют

два вида репликативных ошибок: включение некомплементарных нуклеотидов (точечные мутации) и геномные перестройки (делеции, вставки, перенос протяженных участков за счет рекомбинации).

У пикорнавирусов, как и у других РНК-содержащих вирусов, нет механизма удаления ошибочно включенных нуклеотидов. Реплицирующий фермент (РНК-полимераза) работает с высокой, но не абсолютной точностью. Поэтому вероятность точечных мутаций весьма высока и у полиовируса оценивается величиной порядка  $6 \cdot 10^{-4}$  на акт репликации. Учитывая размеры пикорнавирусного генома (7–8 тыс. нуклеотидов), это означает, что в среднем каждый акт репликации сопровождается хотя бы одной мутацией. При этом следует принимать во внимание, что вирусы дают огромный урожай: так, одна зараженная клетка может производить тысячи или даже десятки тысяч инфекционных частиц вируса полиомиелита. Таким образом, любая популяция вирусных частиц содержит коллекцию геномов, у каждого из которых одна или несколько позиций отличается от средней; ясно, что эти вирионы могут различаться по свойствам. Такие гетерогенные вирусные популяции обозначают термином “квазивид”. Запрограммированная “невнимательность” при копировании генетического материала вносит важнейший вклад в адаптационный потенциал вирусов. Среди мутантов вполне могут оказаться вирусы, более приспособленные к каким-либо нестандартным условиям.

В основе геномных перестроек у пикорнавирусов важнейшую роль играет репликационная смена матриц. Синтез цепи по какой-то причине преждевременно останавливается, эта цепь (или ее 3'-конец) отделяется от матрицы и перемещается на другое место этой же матрицы или на другую молекулу РНК. В первом случае наблюдаются делеции или вставки (дубликации), а во втором наряду с делециями (рис. 4, а) и вставками (рис. 4, б) может происходить рекомбинация (рис. 4, в). Причины преждевременной остановки синтеза неизвестны, но среди возможных — ошибочное включение нуклеотидов. Если это предположение верно, то в основе точечных мутаций и геномных перестроек пикорнавирусных геномов может лежать общий механизм. Другое потенциальное препятствие для элонгации — шпильчатые элементы.

Чем определяется место “приземления” отделившегося от матрицы 3'-конца строящейся цепи? Предпочтителен, очевидно, комплементарный участок, протяженность которого может составлять, по видимому, всего несколько нуклеотидов. Но если речь идет о столь коротких отрезках, то в длинной молекуле вирусной РНК они должны встречаться достаточно часто. Чтобы рекомбинация была точной (а это важнейшее условие получения жизнеспособного потомства), необходим выбор единственно “правильного” места. Делу могут способствовать

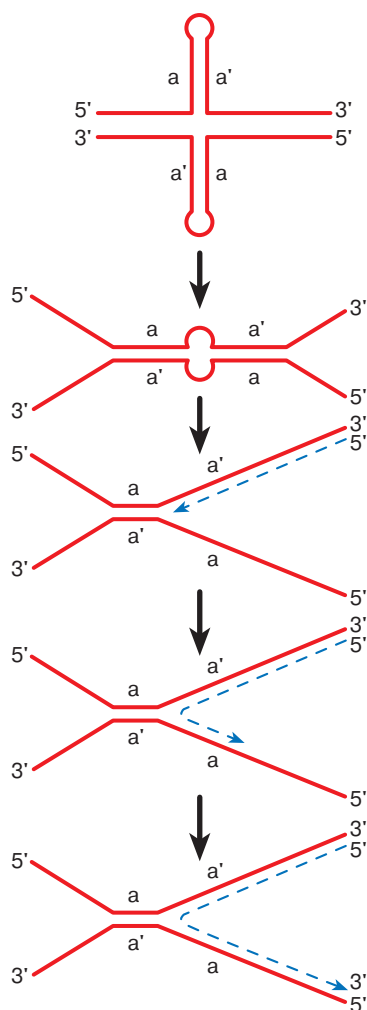


**Рис. 4.** Схема возникновения геномных перестроек при рекомбинации между двумя молекулами РНК. Возникновение делеции (а) и повтора (б), точная рекомбинация (в). Латинскими буквами обозначены разные участки генома

локальные элементы вторичной структуры (шпильки). Такие шпильки возникают вследствие взаимной комплементарности соседних участков молекулы РНК. Но, как показано на рис. 5, эти же участки могут облегчать сближение гомологичных участков двух разных молекул РНК и тем самым помогать выбору правильного места рекомбинации.

Однако комплементарность между 3'-концом недостроенной цепи и ее “посадочным местом” иногда может быть неполной или отсутствовать совсем. И хотя для обеих ситуаций предложены объясняющие модели, проблема не может считаться окончательно решенной.

Недавно группой А.Б. Четверина (Институт белка РАН) было показано, что некоторые случаи РНК-рекомбинации обусловлены не сменой матрицы, а прямой химической реакцией между молекулами РНК, приводящей к сшиванию участков разных молекул. В определенных случаях сама молекула РНК может играть роль сшивающего фермента (способность определенных молекул РНК — рибозимов — катализировать разнообразные химические реакции требует особого рассмотрения). В проводящихся в нашей лаборатории (А.П. Гмыль и др.) совместно с А.Б. Четвериним опытах по рекомбинации между фрагментами полиовирусной РНК также обнаружены факты, вполне укладывающиеся в рибозимоподобную модель возникновения некоторых рекомбинантов. Тем не менее вопрос этот требует дальнейшего изучения.



**Рис. 5.** Схема точной рекомбинации между РНК-геномами. Самокомплементарные (шпильчатые) области обозначены *a* и *a'*. Гомологичные участки двух родственных, но различающихся молекул РНК образуют межмолекулярный дуплекс в результате взаимодействия комплементарных последовательностей. Вновь синтезируемая цепь (пунктир) начинает копировать одну матрицу (сплошная линия), а затем «перепрыгивает» на другую

Каков бы ни был механизм геномных перестроек у пикорнавирусов, само это явление встречается весьма часто. В тех случаях, когда восстановление функции поврежденного регуляторного элемента вирусной РНК могло быть достигнуто за счет либо точечной мутации, либо геномной перестройки (делеции или вставки), частоты обнаружения этих двух типов изменений у ревертантов были одного порядка. Подобные перестройки, вероятно, происходят и в других районах РНК, но, поскольку делеция или вставка в кодирующей части генома имеет высокий

шанс оказаться летальной, можно предположить, что в зараженной клетке накапливается значительная доля мертвых геномов. Такова цена способности вирусов залечивать свои генетические раны.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные примеры помехоустойчивости были выбраны достаточно произвольно и касались лишь двух групп вирусов. Не менее яркие примеры легко найти и у любых других вирусов, а также и у любых невирусных биологических объектов. Врожденная и приобретаемая устойчивость к неблагоприятным условиям – поистине универсальная закономерность. Принципиально важно, что эти два свойства предъявляют противоположные требования к точности воспроизведения генетического аппарата. В реальности достигается компромисс – золотая середина.

Наблюдение за тем, каким образом природа обеспечивает преодоление стандартных или непредвиденных трудностей, а также как она ликвидирует последствия генетических травм, позволило в некоторых случаях расшифровать конкретные молекулярно-биологические механизмы. Вероятно, когда-нибудь будет разработана теория, которая сформулирует требования к структурам, обеспечивающим выполнение определенных функций молекулами белка или нуклеиновой кислоты. В результате станет ясно, какие структурные элементы для этого абсолютно необходимы, какие влияют на эффективность и регулируемость процесса, а какие могут быть в широких пределах модифицированы без серьезных функциональных последствий.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусология: В 3 т. / Под ред. Б. Филдса, Д. Найпа. М.: Мир, 1989.
2. Агол В.И. Сюрпризы вируса полиомиелита // Природа. 1993. Вып. 11.
3. Агол В.И. Помехоустойчивость вирусов // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32, вып. 1. С. 54–61.

\* \* \*

Вадим Израилевич Агол, доктор биологических наук, профессор кафедры вирусологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, член-корреспондент Российской академии наук и Российской академии медицинских наук, зав. лабораторией биохимии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова. Автор более 200 научных работ и трех монографий.