БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 10, с. 1450 – 1459

УДК 578.23

ИЗМЕНЕНИЯ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА ЧЕЛОВЕКА H3N2 В ХОДЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЦИРКУЛЯЦИИ*

© 2019 А.Г. Гамбарян[1], А. Балиш[2], А.И. Климов[2], А.Б. Тузиков[3], А.А. Чинарев[3], Г.В. Пазынина[3], Н.В. Бовин[3]**

[1] *ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819 Москва, Россия; электронная почта: al.gambaryan@gmail.com*

[2] *Отделение по гриппу, Центры по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, GA 30333, США*

[3] *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 03.04.2019
После доработки 05.06.2019
Принята к публикации 15.06.2019

Ранее было показано, что аминокислоты 155Thr, 158Glu и 228Ser гемагглютинина имеют решающее значение для распознавания Neu5Gc. В данном исследовании показано, что способность связывать рецептор, терминированный Neu5Gc, также может быть связана с аминокислотой 145: вирусы 1972–1999 гг. с Lys145 связывали Neu5Gc, тогда как вирусы с Asn145 не связывали. Спорадическое появление и исчезновение способности связывать олигосахариды Neu5Gc, а также отсутствие остатков Neu5Gc в составе гликоконъюгатов человека указывают на неадаптивную природу этого свойства. Ранее показано, что вирусы гриппа A (H3N2) 1968–1989 гг., в отличие от вирусов H1N1, не различают Neu5Aca2-6Galβ1-4Glc (6'SL) и Neu5Aca2-6Galβ1-4GlcNAc (6'SLN). Вирусы H3N2, изолированные после 1993 г., наподобие вирусов H1N1, приобрели способность различать 6'SL и 6'SLN. Мы определили, что преимущественное сродство к 6'SLN постепенно увеличивалась с 1992 по 2003 г. После 2003 г. вирусы утратили способность связывать ряд сиалозидов, включая 6'SL, которые являлись хорошими рецепторами для более ранних вирусов H3N2, и только 6'SLN сохранил высокое сродство к более поздним человеческим вирусам H3N2. Это свойство коррелирует с приобретением новых сайтов гликозилирования в положениях 122, 133 и 144, а также с заменами Glu190Asp и Gly225Asp в гемагглютинине. Эти же замены ответственны за рецепторный фенотип вирусов H1N1 человека. Конвергентная эволюция рецепторной специфичности подтипов H1N1 и H3N2 указывает на то, что 6'SLN является оптимальным природным человеческим рецептором для вирусов гриппа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус гриппа, гемагглютинин, сиалосахариды, рецепторная специфичность, H3N2.

DOI: 10.1134/S0320972519100075

Вирусы гриппа являются РНК-вирусами с негативной цепью и сегментированными геномами. Они содержат восемь сегментов РНК, которые кодируют от 10 до 11 белков. Вирусная частица содержит два основных гликопротеина оболочки: гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA). Естественным резервуаром вирусов гриппа являются дикие водные птицы, в которых циркулируют вирусы с 16 антигенными подтипами HA и 9 подтипами NA. Вирусы водных птиц иногда передаются другим диким и домашним животным. В редких случаях они приспосабливаются к новым видам и образуют устойчивые специфические для хозяина линии. Считается, что все известные линии вирусов гриппа домашней птицы и млекопитающих, включая людей, происходят от вирусов диких водных птиц [1].

Сиаловые кислоты являются минимально необходимыми детерминантами клеточных ре-

Принятые сокращения: PBS – фосфатно-солевой буфер; BSA – бычий сывороточный альбумин; КЭ – куриные яйца с эмбрионом; HA – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; РСУ – рецептор-связывающий участок; Sia – сиаловая кислота (либо Neu5Ac, либо Neu5Gc); Glyc-PAA – гликозилированный полиакриламид; Glyc-PAA-biot – биотинилированный гликозилированный полиакриламид.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-109, 26.08.2019.

** Адресат для корреспонденции.

цепторов для вирусов гриппа [2, 3]. Сиалилолигосахаридные фрагменты гликопротеинов и гликолипидов на клеточной поверхности демонстрируют значительное структурное разнообразие, и структура углеводной цепочки может влиять на способность сиаловой кислоты служить рецепторной детерминантой вируса гриппа. Одной из основных характеристик рецепторной специфичности вирусов гриппа является способность различать дисахаридные мотивы Neu5Acα2–3Gal и Neu5Acα2–6Gal [4, 5]. Вирусы гриппа человека A и B с высоким сродством связывают сахариды, терминированные Neu5Acα2–6Gal, и не связывают Neu5Acα2–3Gal-терминированные рецепторы [6]. Напротив, вирусы гриппа A птиц, независимо от их субтипа, не связывают Neu5Acα2–6Gal. Они имеют более высокое сродство к олигосахаридам, терминированным Neu5Acα2–3Gal, чем к свободной нейраминовой кислоте (Neu5Ac), что свидетельствует о специфических взаимодействиях между рецептор-связывающим участком (РСУ) HA и галактозой, связанной с сиаловой кислотой 2–3 связью. Сравнение аминокислотных последовательностей HA разных субтипов выявило, что остатки в положениях 138, 190, 194, 225, 226 и 228 консервативны в РСУ вирусов гриппа субтипов H1–H12, выделенных из диких уток. В H3 HA ранних вирусов H3N2 человека были заменены аминокислоты 226 и 228, а в H1 HA вирусов H1N1 человека были заменены аминокислоты 138, 190, 194 и 225 [7, 8].

Человеческие штаммы H1N1 связывают Neu5Acα2–6Galβ1–4GlcNAc трисахарид (6'SLN) с более высоким сродством, чем Neu5Acα2–6Galβ1–4Glc (6'SL), в то время как ранние человеческие вирусы H3N2 не различали эти две структуры [5, 8, 9, 10]. После 1992 г. вирусы человеческого гриппа H3N2 приобрели новые свойства; а именно, они утратили способность расти в куриных эмбрионах (КЭ) и агглютинировать эритроциты кур [11, 12, 13].

В течение 1993–2003 гг. в HA вирусов H3N2 человека появились несколько аминокислотных замен в положениях, которые ранее были консервативными и ответственными за связывание с рецептором. Так, была обнаружена замена Glu190Asp [12]. Ile, а затем Val стали преобладающим остатком в положении 226 H3 HA вместо Leu, типичного для HA более ранних изолятов H3N2 человека [13–15]. Возникли новые потенциальные сайты гликозилирования в 122, 133 и 144 положениях. Отбор антигенно отличных вариантов H3N2 может способствовать изменению рецепторной специфичности. Замены аминокислот 156, 158, 189 и 193 влияют на связывание с минорными гликанами человеческого типа YDS, 6-STF и специфичным для свиней рецептором Neu5Gc-Tn [16].

Позже появилась замена Gly225Asp. Интересно отметить, что Asp190 и Asp225 консервативны у вирусов H1N1 человека и ответственны за узнавание рецептора Neu5Acα2–6Galβ1–4GlcNAc. Было показано, что изоляты H3N2 1998 и 1999 годов, в отличие от ранних изолятов, связывали 6'SLN с бóльшим сродством, чем 6'SL [17].

Вследствие реконструкции РСУ, адаптация вирусов к куриным эмбрионам стала проходить по новым схемам аминокислотного замещения [18]. Масштабный мутационный анализ RBS вирусов A/WSN/33 (H1N1) и A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) выявил множество компетентных по репликации мутантов, еще не обнаруженных в природе [19].

Самые ранние вирусы человека H3N2 преимущественно связывали короткие разветвленные сиалилированные гликаны, в то время как более поздние вирусы связывали длинные полилактозаминовые цепи, терминированные сиаловой кислотой, и не связывали короткие сиалилированные гликаны [20]. Ранние человеческие вирусы H3N2 связывали широкий спектр аналогов человеческого рецептора, тогда как изоляты 2006–2011 гг. преимущественно связывали удлиненные, разветвленные мультивалентные рецепторы. Эти рецепторы с удлиненными ветвями имеют потенциал для увеличения сродства за счет одновременного связывания с двумя субъединицами одного тримера гемагглютинина [21, 22].

В данной работе мы исследовали рецептор-связывающие свойства широкого набора вирусов гриппа H3N2 человека, выделенных с 1968 по 2003 г.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. 96-луночные планшеты фирмы «Costar» (США), конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена и о-фенилендиамин фирмы «Boehringer Mannheim» (Германия). α-Бензилсиалозид (SBn) и 6'SLN (9-NAc) синтезированы как описано в [23, 24]. Синтез немеченых гликозилированных полиакриламидов (Glyc-PAA) (30 кДа) и биотинилированных полимеров, Glyc-PAA-biot (1000 кДа) были описаны в работах [25, 26]. Структуры аналогов рецепторов и их сокращенные наименования приведены в табл. 1.

Вирусы были получены из коллекции Центра по контролю за заболеваниями (США). Вирусы культивировали 48 ч в клетках MDCK в среде

Таблица 1. Структура олигосахаридов, пришитых к полиакриламиду

Биотинилированные полимеры	Обозначения
Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-PAA-biot	3'SL
Neu5Acα2-6Galβ1-4Glcβ-PAA-biot	6'SL
Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ-PAA-biot	6'SLN
Neu5Gcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ-PAA-biot	6`SLN(Gc)
Немеченые полимеры	
Neu5Acα-OCH2C6H4- PAA	SBn
Neu5Acα2-6Galβ1-4Glcβ-PAA	6'SL
Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ-PAA	6'SLN
(Neu5Acα2-62-6G*-GN-M)2-3,6-M-GN-GNβ-PAA	YDS
Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc-PAA	LSTb
Neu5Acα2-6GalNAcα-PAA	STn
Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAcα-PAA	6STF
Neu5Acα2-6Galβ1-4-(6-O-Su)GlcNAcβ-PAA	Su-6`SLN
9-N-Ac-Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ-PAA	6'SLN(9-NAc)

MEM при 37 °C и инактивировали 0,1%-ным глютаровым альдегидом. Культуральные жидкости осветляли низкоскоростным центрифугированием, после чего вирусы собирали путем высокоскоростного центрифугирования, ресуспендировали в 0,1 M NaCl, 0,02 M Tris-буфере (pH 7,2), который содержал 50%-ный глицерин. Хранили при –20 °C.

Анализ прямого связывания с Glyc-PAA-biot (1000 кДа) проводили как описано ранее [8]. Планшеты покрывали очищенным вирусом гриппа с титром 4–8 ед гемагглютинации (100 мкл/лунку) при 4 °C в течение 2 ч с последующим промыванием фосфатно-солевым буфером (PBS). После этого добавляли в лунки по 100 мкл блокирующего раствора (PBS, с добавлением 0,1%-ного BSA), инкубировали 1 ч, а затем промывали холодным PBS, содержащим 0,05%-ный Tween 20 (отмывочный раствор). Glyc-PAA-biot титровали с двукратными разведениями на рабочем буфере (PBS с 0,01%-ным Tween-20, 0,1%-ным BSA и 1 мкМ ингибитора нейраминидазы, оселтамивир карбоксилата), добавляли в лунки по 50 мкл и инкубировали планшеты в течение 2 ч при 4 °C. Начальная концентрация Glyc-PAA-biot составляла 0,5 мкМ по сиаловой кислоте. Планшеты промывали холодным отмывочным раствором и инкубировали со стрептавидин-пероксидазой в рабочем буфере при 4 °C в течение 1 ч. После промывки активность пероксидазы в лунках анализировали с использованием субстратного раствора о-фенилендиамина.

Конкурентное связывание. Сродство вируса к Glyc-PAA (30 кДа) определяли в реакции ингибирования связывания фетуина как описано ранее [27]. Анализ основан на конкуренции между исследуемым аналогом рецептора и стандартным препаратом меченного пероксидазой фетуина за центры связывания на иммобилизованном вирусе. Инкубацию проводили в течение 1 ч при 4 °C в рабочем буфере. Данные были выражены в терминах констант аффинности (K_{aff}), формально эквивалентных константам диссоциации комплекса вирус/рецепторный аналог. Константы рассчитывали по концентрациям остатков сиаловой кислоты в растворе.

Статистика. Расчет констант диссоциации и величины стандартного отклонения определяли с помощью программы «Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучали рецептор-связывающие свойства вирусов гриппа человека H3N2, выделенных и пассированных в клетках MDCK или куриных эмбрионах. Для более адекватного сравнения адаптированные к КЭ вирусы в последнем пассаже выращивали в клетках MDCK.

В первой серии экспериментов были использованы пять меченых аналогов рецепторов: меченый пероксидазой фетуин и четыре биотин-меченых зонда, Glyc-PAA-biot (1000 кДа), (остаток Glyc = 3'SL, 6'SL, 6'SLN и 6'SLN (Gc)) в тесте прямого связывания (формулы и молекулярные модели остатков приведены в табл. 1 и на рис. 1). Результаты анализа представлены в табл. 2. Для удобства чтения данные представлены в качественной форме: максимальное связы-

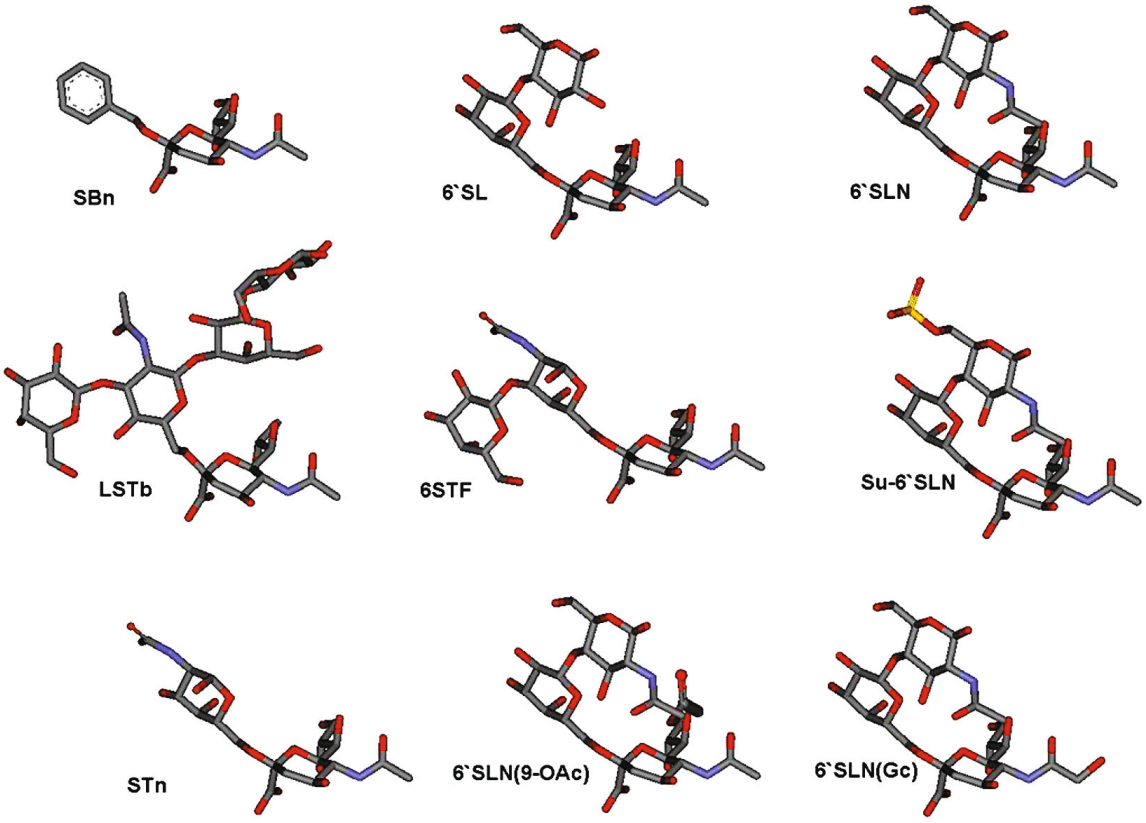

Рис. 1. Структура тестированных сиалосахаридов.
С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

вание выражается тремя звездочками, в десять раз слабее связывание – двумя звездочками, низкое связывание – одной звездочкой, а отсутствие связывания – знаком минус.

Распознавание связи между сиаловой кислотой и галактозой (α2–3 против α2–6). В соответствии с ранее полученными данными [10, 17] ни один из вирусов, изолированных в культуре клеток MDCK не связывался с 3'SL, в то время как все адаптированные к КЭ вирусы связывали его несмотря на то, что они были выращены MDCK в последнем пассаже (табл. 2).

Связывание вируса с фетуином. Фетуин является гликопротеином, который содержит в основном би- и древовидные *N*-гликаны, оканчивающиеся мотивами Siaα2–3Galβ1–4GlcNAc- и Siaα2–6Galβ1–4GlcNAc [28]. Все вирусы, выделенные до 1999 г., и все адаптированные к КЭ вирусы связывают фетуин с высоким сродством. Большинство вирусов после 1999 г. утратили способность связывать фетуин; это свойство коррелирует с появлением новых сайтов гликозилирования (SG) в 122, 133 и 144-м положениях. Вирусы Texas/41/99 и Alaska/37/99, в которых отсутствовал SG122, и вирусы A/New York/68/2003 и A/New York/72/2003, утратившие SG144 вторично, частично связывали фетуин. Потеря SG126 восстановливала способность связывать фетуин на следовых уровнях. Следовательно, изобилие новых сайтов гликозилирования (122, 133 и 144) имеет решающее значение для неспособности связывать фетуин.

Распознавание типа сиаловой кислоты (*N*-ацетилнейраминовая или *N*-гликолилнейраминовая). Способность тестируемых H3N2 вирусов распознавать *N*-гликолилнейраминовую кислоту очень нерегулярна. Как ранние, так и поздние вирусы с Trp155, не связывают 6'SLN(Gc). Вирус A/Port Chalmers/73 связывал *N*-ацетилнейраминовую и *N*-гликолилнейраминовую кислоты с одинаковым сродством, что хорошо согласуется с работами Anders et al. и Suzuki, в которых показано, что вирусы H3N2 с Tyr155 распознают Neu5Gcα2–6Gal [29, 30]. Хорошо связывают 6'SLN(Gc) также все вирусы 1990-х гг. с сочетанием Lys145 и His155. Штаммы с заменой Lys145Asn 6'SLN(Gc) не связывают. Вирусы, выделенные после 2002 г., не связывают Neu5Gc-рецептор даже при наличии Lys145 и His155. Возможно, это связано с дальнейшей пере-

Таблица 2. Связывание вирусов с сиалогликоконьюгатами

Вирусы		Позиция в НА							Фет	Сиалогликоконьюгаты			
		122	133	144	145	155	190	225		3'SL	6'SL	6'SLN	6'SLN (Gc)
Aichi/2/68	E				Ser	Thr	Glu	Gly	+++	+	+++	+++	–
USSR/039/68	E				Ser	Thr	Glu	Gly	+++	+	+++	+++	–
Canada/228/68	E				Ser	Thr	Glu	Gly	+++	+	+++	+++	–
Taiwan/1/69	E				Ser	Thr	Glu	Gly	+++	+	+++	+++	–
Canada/2/70	E				Ser	Thr	Glu	Gly	+++	+	+++	+++	–
Port Chalmers/1/73	E				Ser	Tyr	Glu	Gly	+++	+	+++	+++	+++
Seoul/23/91	E				Lys	His	Glu	Gly	+++	++	+++	+++	++
Seoul/46/91	E				Lys	His	Glu	Gly	+++	+	+++	+++	++
Kasauli/149/92	E				Lys	His	Glu	Gly	+++	+	+++	+++	++
Umea/01/92	M				Lys	His	Glu	Gly	+++	–	+++	+++	++
Umea/02/92	M				Lys	His	Glu	Gly	+++	–	+++	+++	++
Indonesia/3946/92	M				Lys	His	Glu	Gly	+++	–	+++	+++	++
Qingdao/53/92	E				Asn	His	Glu	Gly	+++	++	++	++	–
Russia/125/93	M				Lys	His	Glu	Gly	+++	–	+++	+++	++
Stockholm/1/93	M				Asn	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	nt
Georgia/3/93	M				Asn	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	nt
New York/3/93	M				Asn	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	nt
Wyoming/1/93	M				Asn	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	–
Washington/26/93	M				Asn	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	–
Hong Kong/1/94	M				Lys	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	++
Hong Kong/55/94	M				Lys	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	++
Wuhan/359/95	E				Lys	His	Asp	Gly	+++	+	+++	+++	+
Spain/351/95	M				Lys	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	++
Changwon/9/95	M				Asn	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	–
Canada/17/96	M				Asn	His	Asp	Gly	+++	–	+++	+++	–
Texas/41/99	M		SG	SG	Lys	His	Asp	Gly	++	–	++	+++	nt
Alaska/37/99	M		SG	SG	Lys	His	Asp	Gly	++	–	++	+++	+
Egypt/8811/99	M	SG	SG		Lys	His	Asp	Gly	+	–	+	+++	nt
California/32/99	E	SG	SG		Lys	His	Asp	Gly	+++	++	++	+++	+
Fujian/411/2002	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	nt
England/01/21/2003	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	nt
Wisconsin/32/2003	M	SG	SG	SG	Gln	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	nt
Hong Kong/797/2003	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	nt
Nebraska/6/2003	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	–
Texas/33/2003	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	–
Texas/39/2003	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	nt
Texas/40/2003	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	nt
Texas/42/2003	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	nt
Wyoming/3e/2003	E	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	+++	+	+	+++	nt
Chile/8266e/2003	E	SG	SG		Lys	Thr	Asp	Asp	+++	+	++	+++	–
New York/16/2003	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	nt
New York/68/2003	M	SG	SG		Lys	His	Asp	Asp	++	–	+	+++	–
New York/72/2003	M	SG	SG		Lys	His	Asp	Gly	++	–	++	+++	–
New York/74/2003	M	SG	SG	SG	Lys	Thr	Asp	Asp	–	–	–	+++	nt

стройкой РСУ, включающей замены аминокислот 190, 225 и 226.

Распознавание 6'SL vs 6'SLN. Способность различать 6'SLN и 6'SL изменялась у вирусов человека H3N2 с 1968 по 2003 гг. Вирусы, выделенные с 1968 по 1992 г., связывают эти соединения с одинаковым сродством. У вирусов H3N2, выделенных после 1993 г., сродство 6'SLN выше, чем 6'SL. После 2002 г. вирусы, как правило, полностью теряли способность связывать 6'SL. A/New York/68/2003 and A/New York/72/2003 без SG144 являются исключениями из этого правила; они связывают 6'SL на низком уровне. Первые признаки увеличения сродства к 6'SLN по сравнению с 6'SL наблюдались у вирусов 1993 г., в которых Glu заменил Asp в положении 190 (табл. 3). Эта тенденция усилилась после появления новых сайтов гликозилирования (табл. 2). Вирусы с SG144 и с заменой Gly225/Asp утратили способность связывать 6'SL, тем не менее сродство к 6'SLN оставалась высоким.

Рецепторная специфичность вирусов к Sia(2–6)-концевым рецепторам с различными сахаридными корами. Рецептор-связывающий фенотип вирусов H3N2 человека тестировали с использованием Neu5Acα2–6Gal-терминированных ре-

Таблица 3. Сродство (K_{aff}, μM) вирусов к сиалогликоконьюгатам*

Вирусы		Позиция в HA			Сиалогликоконьюгаты					
		190	225	226	SBn	6'SL	6'SLN	STn	LSTb	YDS
Aichi/2/68	E	Glu	Gly	Leu	1	1	1	50	50	2
USSR/039/68	E	Glu	Gly	Leu	1	1	1	50	50	2
Canada/228/68	E	Glu	Gly	Leu	1	1	1	50	50	2
Taiwan/1/69	E	Glu	Gly	Leu	1	1	1	50	50	2
Canada/2/70	E	Glu	Gly	Leu	1	1	1	50	50	2
Port Chalmers/1/73	E	Glu	Gly	Leu	4	2	2	100	100	2
Seoul/23/91	E	Glu	Gly	Leu	1	1	1	30	30	1
Seoul/46/91	E	Glu	Gly	Leu	2	2	2	30	100	10
Kasauli/149/92	E	Glu	Gly	Leu	1	1	1	30	30	1
Umea/01/92	M	Glu	Gly	Leu	0,3	0,3	0,3	50	50	1
Umea/02/92	M	Glu	Gly	Leu	0,3	0,3	0,3	50	50	1
Indonesia/3946/92	M	Glu	Gly	Leu	0,3	0,3	0,3	50	50	1
Qingdao/53/92	E	Glu	Gly	Leu	1	1	1	3	3	3
Stockholm/1/93	M	Asp	Gly	Leu	0,3	0,3	0,2	1	2	2
Wyoming/1/93	M	Asp	Gly	Leu	0,2	0,2	0,1	0.2	0,2	0,2
Hong Kong/55/94	M	Asp	Gly	Leu	0,2	0,5	0,2	1	0,5	1
Spain/351/95	M	Asp	Gly	Leu	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
Wuhan/359/95	E	Asp	Gly	Ile	1	1	0,4	10	10	5
Texas/41/99	M	Asp	Gly	Val	1	1	0,1	50	50	2
Alaska/37/99	M	Asp	Gly	Val	1	2	0,1	100	100	3
New York/72/2003	M	Asp	Gly	Val	3	3	0,1	100	100	2
Wyoming/3/2003	M	Asp	Asp	Ile	>50	>50	1	nt	nt	nt
Texas/33/2003	M	Asp	Asp	Val	>50	>50	0,5	nt	nt	nt
New York/68/2003	M	Asp	Asp	Ile	>50	50	0,5	40	40	5

* Значения K_{aff} формально эквивалентны константам диссоциации комплексов вирусов с рецепторными аналогами. Чем выше значения K_{aff}, тем ниже сродство. Приводятся данные, усредненные из трех экспериментов. Стандартные ошибки не превышали 60% средних значений.

цепторов с различным строением предлежащей цепочки (табл. 1, рис. 1). α-Бензилсиалозид (SBn) и 6'SLN (9-NAc) синтезированы; остальные сиалосахариды встречаются в природных гликопротеинах или гликолипидах и были выделены из биологического сырья. Для конкурентного анализа были использованы немеченые сиалогликополимеры с низкой мол. массой (30 кДа) [25]. В табл. 3 приводятся значения K_{aff}, формально эквивалентные константам диссоциации рецепторных аналогов к вирусам. Все вирусы, связывались с 6'SLN и 6-O-Su-6'SLN с одинаковым сродством, и ни один из протестированных вирусов не связывал с 6'SLN (9-NAc) и 6-STF. Поэтому данные для 6-O-Su-6'SLN, 6'SLN (9-NAc) и 6-STF в таблице не приводятся.

Равное сродство к 6'SLN и его сульфатированному аналогу 6-O-Su-6'SLN неудивительно, поскольку сульфогруппа, присоединенная к O-6 *N*-ацетилглюкозамина, направлена из рецептор связывающего участка в воду. Также неудивительно отсутствие связывания с 6'SLN (9-NAc), поскольку 9-NAc-группа стерически не помещается между C-9 Neu5Ac и поверхностью рецептор-связывающего кармана в области 183, 190 и 228 аминокислот [3]. Отсутствие связывания с 6-STF может быть объяснено перекрыванием фрагмента Galb с фрагментом аминокислотной цепи 222–226 в RBS.

Все протестированные вирусы показали высокое сродство к 6'SLN. Сродство к 6'SLN-содержащему двухантенному олигосахариду YDS было ниже, чем к 6'SLN. Разница увеличивается с годом изоляции и может быть объяснена стерическим перекрыванием второй антенны YDS с углеводными фрагментами HA вблизи RBS. Результаты конкурентного анализа совпадают с результатами анализа прямого связывания.

Вирусы, изолированные до 1999 г., имели почти равное сродство к 6'SL и 6'SLN, тогда как после 1999 г. сродство вирусов к 6'SL понижено, вплоть до полного отсутствия связывания. Сродство к STn и LSTb было одинаковым для всех протестированных вирусов. Оно был очень низким для вирусов с 1968 по 1992 г. (вплоть до вируса Umea/02/92). Вирусы Qingdao/53/92, Stockholm/1/93, Wyoming/1/93, Spain/351/95 связывают STn и LSTb почти так же хорошо, как и 6'SLN. Все эти вирусы имеют замену Glu-190Asp. У вируса Wuhan/359/95 (с заменой Leu-226Ile) сродство к этим олигосахаридам резко понижено. Более поздние вирусы, с Ile или Val226, а также SG133 и SG144, практически не связывали STn и LSTb.

Ранее было показано, что бензилсиалозид (табл. 1) хорошо ингибирует связывание вирусов H3N2 человека с природными рецепторами [31, 32]. Действительно, для всех протестированных вирусов, кроме трех (три последних пункта, табл. 3), сродство к SBn равно сродству к 6'SLN. В то же время три вируса с заменой Gly225Asp в HA, а именно Wyoming/3/2003, Texas/33/2003 и NewYork/68/2003 утратили сродство к SBn и 6'SL. Вероятно, объемный гидрофильный Asp полностью нарушает гидрофобное взаимодействие бензильного кольца с Val226.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе была рассмотрена эволюция рецепторной специфичности вирусов H3N2 человека 1968–2003 гг. в контексте замен аминокислот в РСУ и строения рецепторных сиалосахаридных цепочек. Две замены Gln226Leu и Gly228Ser отличают HA ранних вирусов человека от консенсусной последовательности вирусов гриппа птиц. Эти замены повысили сродство вируса к Neu5Acα2-6Gal и снизили сродство к Neu5Acα2–3Gal, но предпочтение первого варианта не было абсолютным – сродство к незаякоренному 3'SL было всего в 5 раз ниже, чем к 6'SL [31, 32]. Комплекс концевого рецептора Neu5Acα2-3Gal с HA вируса Aichi/2/68 был успешно закристаллизован и получена полная трехмерная структура этого комплекса [33]. Ранние вирусы человека H3N2 связывались с ганглиозидами, терминированными Neu5Acα2–3Gal; эта способность впоследствии уменьшилась и была полностью утеряна [7].

По данным Anders и Suzuki, способность распознавать форму Neu5Gc нейраминовой кислоты зависит от аминокислот в положениях 155, 158 и 228 [29, 30]. В нашем исследовании способность связываться с Neu5Gc-рецептором для вирусов 1992–1999 гг. коррелировала с парой аминокислот 145 и 155: вирусы с Lys145 и His155 связывали Neu5Gc-рецептор, в то время как вирусы с Asn145, His155 и Lys145, Thr155 не связывали (табл. 2). Предполагаемое расположение Lys145 относительно *N*-гликолильной группы *N*-гликолилнейраминовой кислоты показано на рис. 2. По-видимому, аминогруппа Lys145 была способна образовывать водородную связь с *N*-гликолильной группой.

Нерегулярное появление и исчезновение сродства к Neu5Gc-фрагменту указывает на неадаптивный характер этого свойства. Neu5Gc-фрагмент отсутствует на клетках человека; следовательно, способность связывать эту форму сиаловой кислоты не могла дать вирусу избирательное преимущество. Спорадическое появление этой способности, по-видимому, является случайным результатом аминокислотных замен в гипервариабельных областях антигенных сайтов.

Ранние вирусы H3N2 человека не были адаптированы к определенному сиалилолигосахариду в респираторном эпителии человека. Первоначальные замены в HA: Gln226Leu и Gly228Ser обеспечивают взаимодействия с метиленовой группой галактозы, смежной с 2-6Sia. Миметики рецепторов общей структуры Neu5Acα-OCH2-R, содержащие гидрофобный агликон, такие как бензилсиалозид и даже α-метилсиалозид, имеют хорошее сродство к ранним вирусам H3N2 [31]. Если асиаловая часть аналога углеводного рецептора стерически не препятствовала связыванию, различные соединения с 2–6 связанной сиаловой кислотой обладали практически равным сродством к вирусам [9, 31]. По мере появления в человеческой популяции иммунной прослойки к H3N2 вирусам, у вирусов возникли новые сайты гликозилирования в HA в положениях 126 и 246, что снижало нейтрализующее действие антител. Но при этом некоторые природные рецепторы могли становится недоступными для вируса. Так, способность связываться с ганглиозидами GM3 и 3-SPG снижалась с приобретением сайтов гликозилирования в положении 126 и исчезала с приобретением 246SG [7].

Когда аминокислота Glu190, консервативная для вирусов гриппа птиц, была заменена на Asp, вирусам стали доступны по меньшей мере два новых природных сиалосахара (STn и LSTb). Вирусы с Asp190 и Leu226 связывают их с высоким сродством. После замены Leu226Ile/Val эта способность была потеряна. Поскольку аминокислоты 190 и 225 тесно контактируют с концевой частью рецептора – сиаловой кислотой и прилегающей областью галактозы, они не могли напрямую влиять на удаленные остатки моносахаридов. Вероятно, замены в этих положениях слегка разворачивают сиаловую кислоту, что приводит к более или менее успешному расположению STn и LSTb в РСУ.

Одновременно с тем, что STn и LSTb становятся доступными для вируса, 6'SLN становится рецептором с наибольшим сродством, и дальнейшая эволюция усилила эту тенденцию. Сродство к STn, LSTb и 6'SL исчезало один за другим, а сродство к 6'SLN оставалось высоким. После замены Gly225Asp первоначальный механизм распознавания рецепторов (посредством гидрофобного взаимодействия 226 аминокисло-

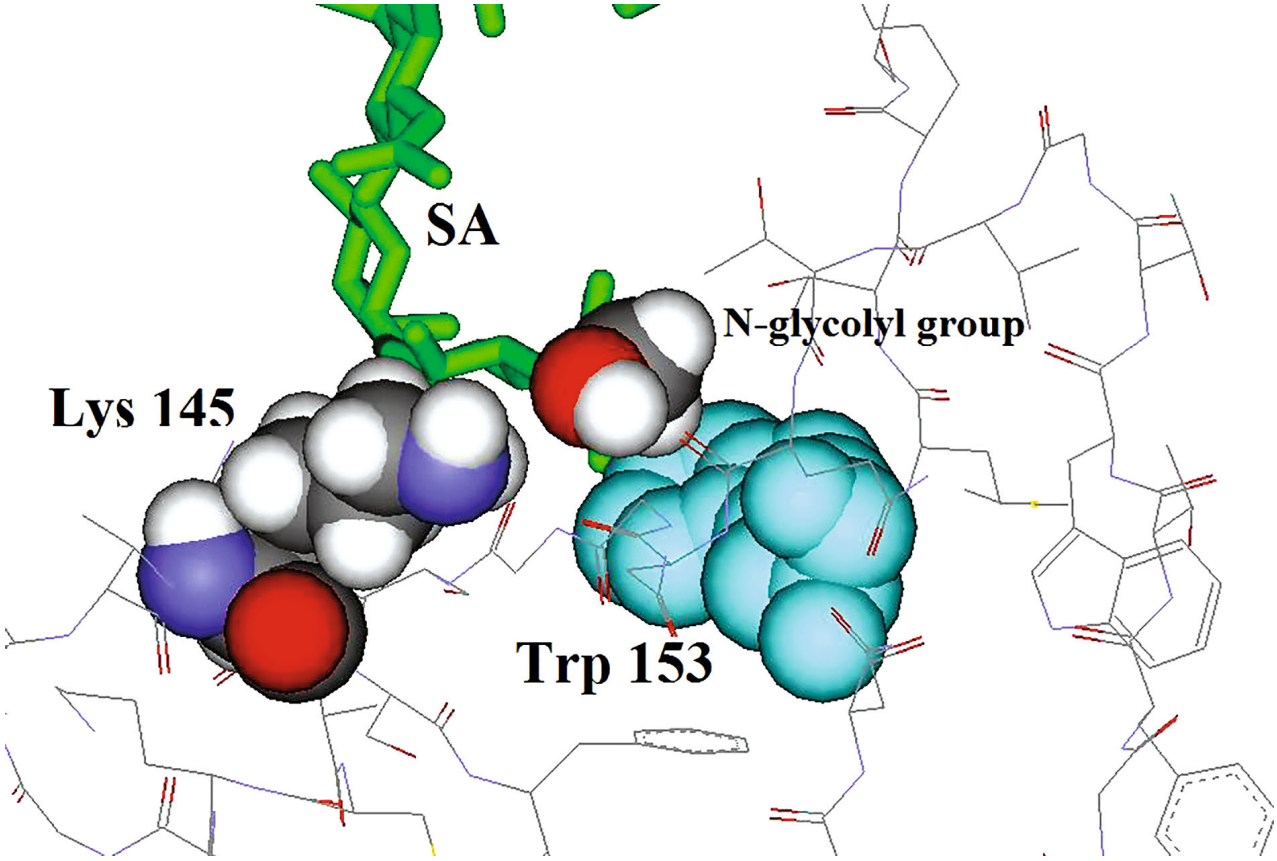

Рис. 2. Предполагаемое расположение Lys145 в сайте связывания рецептора H3 HA. Помечены Trp153, Lys145 и *N*-гликолильная группа сиаловой кислоты (SA). Lys145 вместо Ser145 и *N*-гликолильная группа вместо *N*-ацетильной были встроены в модель с помощью программного обеспечения DS ViewerPro 5.0, Accelrys Inc., с использованием трехмерной модели X-31 HA в комплексе с пентасахаридом LSTc [33].
С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals/journal/biokhsm/

ты с метиленовой группой галактозы) был утрачен, а РСУ вирусов подвергся глубокой реконструкции. Вместо Leu226 и Ser228 в РСУ вирусов H3N2 после 2003 г. мы обнаруживаем Asp190, Asp225, Val226 и Ser228, которые отличают эти вирусы от вирусов гриппа птиц.

Таким образом, в ходе эволюции вирусов H3N2 и H1N1 человека их рецепторный фенотип становился все более похожим, и аминокислотный состав РСУ стал ближе, чем в начале циркуляции вирусов H3N2. Вирусы человека H1N1 и H3N2 2003–2009 гг. имеют множество сайтов гликозилирования в верхней части HA и Asp в положениях 190 и 225; и те, и другие различают 6'SL и 6'SLN. Ранее была показана роль Asp190 и Asp225 в селективном сродстве вирусов H1N1 к 6'SLN [10]. Кристаллографический анализ молекулы H1 HA выявил водородные связи между Asp190 и азотом группы GlcNAc-3 в молекуле 6'SLN [34]. Вероятно, подобный же механизм ответственен за дискриминационное связывание 6'SL/6'SLN для вирусов H3N2. Такая конвергентная эволюция рецепторной специфичности подтипов H1N1 и H3N2 предполагает, что 6'SLN является оптимальным природным человеческим рецептором для вирусов гриппа.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 02-04-48109, 01-04-49300 и 14-04-00547 и 17-04-00148) и МНТЦ (грант 5-2464).

Благодарности. С глубоким прискорбием сообщаем, что наш коллега Александр Климов скончался.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит исследований, в которых в качестве объектов использовали людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses, *Microbiol. Rev.*, **56**, 152–179.
2. Paulson, J.C. (1985) Interactions of animal viruses with cell surface receptors, in *The receptors. Vol. 2* (Conn, M., ed.), pp. 131–219. Academic Press, Orlando, FL.
3. Wiley, D.C., and Skehel, J.J. (1987) The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 365–394, doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.002053.
4. Rogers, G.N., and D'Souza, B.L., (1989) Receptor-binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates, *Virology*, **173**, 317–322.
5. Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster R.G., and Paulson, J.C. (1994) Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates, *Virology*, **205**, 17–23, doi: 10.1006/viro.1994.1615.
6. Gambaryan, A.S., Tuzikov, A.B., Piskarev, V.E., Yamnikova, S.S., Lvov, D.K., Robertson, J.S., Bovin, N.V., and Matrosovich, M.N. (1997) Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl*N*-(acetyllactosamine), *Virology*, **232**, 345–350, doi: 10.1006/viro.1997.8572.
7. Matrosovich, M.N., Gambaryan, A.S., Teneberg, S., Piskarev, V.E., Yamnikova, S.S., Lvov, D.K., Robertson, J.S., and Karlsson, K.A. (1997) Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site, *Virology*, **233**, 224–234, doi: 10.1006/viro.1997.8580.
8. Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M.R., Donatelli, I., and Kawaoka, Y. (2000) Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals, *J. Virol.*, **74**, 8502–8512, doi: 10.1128/JVI.74.18.8502-8512.2000.
9. Gambaryan, A.S., Piskarev, V.E., Yamskov, I.A., Sakharov, A.M., Tuzikov, A.B., Bovin, N.V., Nifant'ev, N.E., and Matrosovich, M.N. (1995) Human influenza virus recognition of sialyloligosaccharides, *FEBS Lett.*, **366**, 57–60.
10. Gambaryan, A.S., Robertson, J.S., and Matrosovich, M.N. (1999) Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses, *Virology*, **258**, 232–239, doi: 10.1006/viro.1999.9732.
11. Grassauer, A., Egorov, A.Y., Ferko, B., Romanova, J., Katinger, H., and Muster, T. (1998) A host restriction-based selection system for influenza haemagglutinin transfectant viruses, *J. Gen. Virol.*, **79**, 1405–1409, doi: 10.1099/0022-1317-79-6-1405.
12. Nobusawa, E., Ishihara, H., Morishita, T., Sato, K., and Nakajima, K. (2000) Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides, *Virology*, **278**, 587–596, doi: 10.1006/viro.2000.0679.
13. Medeiros, R., Escriou, N., Naffakh, N., Manuguerra J.C., and van der Werf, S. (2001) Hemagglutinin residues of recent human A (H3N2) influenza viruses that contribute to the inability to agglutinate chicken erythrocytes, *Virology*, **289**, 74–85, doi: 10.1006/viro.2001.1121.
14. Fitch, W.M., Bush, R.M., Bender, C.A., and Cox, N.J. (1997) Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7712–7718, doi: 10.1073/pnas.94.15.7712.
15. Bush, R.M., Bender, C.A., Subbarao, K., Cox, N.J., and Fitch, W.M. (1999) Predicting the evolution of human influenza A, *Science*, **286**, 1921–1925, PMID: 10583948.
16. Wang, X., Ilyushina, N.A., Lugovtsev, V.Y., Bovin, N.V., Couzens, L.K., Gao, J., Donnelly, R.P., Eichelberger, M.C., and Wan, H. (2017) Amino acids in hemagglutinin antigenic site B determine antigenic and receptor binding differences between A(H3N2)v and ancestral seasonal H3N2 influenza viruses, *J. Virol.*, **91**, doi: 10.1128/JVI.01512-16.
17. Mochalova, L., Gambaryan, A., Romanova, J., Tuzikov, A., Chinarev, A., Katinger, D., Katinger, H., Egorov, A., and Bovin, N. (2003) Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs, *Virology*, **313**, 473–480.
18. Stevens, J, Chen, L.M., Carney, P.J., Garten, R., Foust, A., Le, J., Pokorny, B.A., Manojkumar, R., Silverman, J., Devis, R., Rhea, K., Xu, X., Bucher, D.J., Paulson, J.C., Cox, N.J., Klimov, A., and Donis, R.O. (2010) Receptor specificity of influenza A H3N2 viruses isolated in mammalian cells and embryonated chicken eggs, *J. Virol.*, **84**, 8287–8299, doi: 10.1128/JVI.00058-10.
19. Wu, N.C., Xie, J., Zheng, T., Nycholat, C.M., Grande, G., Paulson, J.C., Lerner, R.A., and Wilson, I.A. (2017) Diversity of functionally permissive sequences in the receptor-binding site of influenza hemagglutinin, *Cell Host Microbe*, **21**, 742–753, doi: 10.1016/j.chom.2017.05.011.
20. Gulati, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Couch, R.B., Griesemer, S.B., St George, K., Webster, R.G., and Air, G.M. (2013) Human H3N2 influenza viruses isolated from 1968 to 2012 show varying preference for receptor substructures with no apparent consequences for disease or spread, *PLoS One*, **8**, 66325, doi: 10.1371/journal.pone.0066325.
21. Yang, H., Carney, P.J., Chang, J.C., Guo, Z., Villanueva, J.M., and Stevens, J. (2015) Structure and receptor binding preferences of recombinant human A(H3N2) virus hemagglutinins, *Virology*, **477**, 18–31, doi: 10.1016/j.virol.2014.12.024.
22. Peng, W., de Vries, R.P., Grant, O.C., Thompson, A.J., McBride, R., Tsogtbaatar, B., Lee, P.S., Razi, N., Wilson, I.A., Woods, R.J., and Paulson, J.C. (2017) Recent H3N2 viruses have evolved specificity for extended, branched human-type receptors, conferring potential for increased avidity, *Cell Host Microbe*, **21**, 23–34, doi: 10.1016/j.chom.2016.11.004.
23. Bovin, N.V., Korchagina, E.Yu., Zemlyanukhina, T.V., Byramova, N.E., Galanina, O.E., Zemlyakov, A.E., Ivanov, A.E., Zubov, V.P., and Mochalova, L.V. (1993) Synthesis of polymeric neoglycoconjugates based on *N*-substituted polyacrylamides, *Glycoconj. J.*, **10**, 142–151.
24. Shilova, N.V., Galanina, O.E., Pochechueva, T.V., Chinarev, A.A., Kadykov, V.A., Tuzikov, A.B., and Bovin, N.V. (2005) High molecular weight neoglycoconjugates for solid phase assays, *Glycoconj. J.*, **22**, 43–51, doi: 10.1007/s10719-005-0280-y.
25. Gambaryan, A.S., and Matrosovich, M.N. (1992) A solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity, *J. Virol. Methods*, **39**, 111–123.
26. Hayase, T., Rice, K.G., Dziegielewska, K.M., Kuhlenschmidt, M., Reilly, T., and Lee, Y.C. (1992) Comparison of *N*-glycosides of fetuins from different species and human alpha2-HS-glycoprotein, *Biochemistry*, **31**, 4915–4921.
27. Anders, E.M., Scalzo, A.A., Rogers, G.N., and White, D.O. (1986) Relationship between mitogenic activity of influenza viruses and the receptor-binding specificity of their hemagglutinin molecules, *J. Virol.*, **60**, 476–482.
28. Suzuki, Y. (2001) Host mediated variation and receptor

binding specificity of influenza viruses, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **491**, 445–451.
29. Byramova, N.E., Tuzikov, A.B., and Bovin, N.V. (1992) A simple procedure for the synthesis of the methyl and benzyl glycosides of Neu5Ac and 4-epi-Neu5Ac, *Carbohydr. Res.*, **237**, 161–175, doi: 10.1016/S0008-6215(92)84240-S.
30. Matrosovich, M.N., Mochalova, L.V., Marinina, V.P., Byramova, N.E., and Bovin, N.V. (1990) Synthetic polymeric sialoside inhibitors of influenza virus receptor-binding activity, *FEBS Lett.*, **272**, 209–212.
31. Matrosovich, M.N., Gambaryan, A.S., Tuzikov, A.B., Byramova, N.E., Mochalova, L.V., Golbraikh, A.A., Shenderovich, M.D., Finne, J., and Bovin, N.V. (1993) Probing of the receptor-binding sites of the H1 and H3 influenza A and influenza B virus hemagglutinins by synthetic and natural sialosides. *Virology*, **196**, 111–121, doi: 10.1006/viro.1993.1459.
32. Pritchett, T.J., Brossmer, R., Rose, U., and Paulson, J.C. (1987) Recognition of monovalent sialosides by influenza virus H3 hemagglutinin, *Virology*, **160**, 502–506.
33. Eisen, M.B., Sabesan, S., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1997) Binding of the influenza A virus to cell-surface receptors: structures of five hemagglutinin–sialyloligosaccharide complexes determined by X-ray crystallography, *Virology*, **232**, 19–31, doi: 10.1006/viro.1997.8526.
34. Gamblin, S.J, Haire, L.F, Russell, R.J, Stevens, D.J, Xiao, B., Ha, Y., Vasisht, N., Steinhauer, D.A., Daniels, R.S., Elliot, A., Wiley, D.C., and Skehel, J.J. (2004) The structure and receptor-binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin, *Science*, **303**, 1838–1842, doi: 10.1126/science.1093155.

CHANGES IN THE RECEPTOR BINDING PROPERTIES OF H3N2 VIRUSES IN PROLONGED CIRCULATION IN HUMANS

A. S. Gambaryan[1]*, A. Balish[2], A. I. Klimov[2], A. B. Tuzikov[3], A. A. Chinarev[3], G. V. Pazynina[3], and N. V. Bovin[3]

[1] *Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences, 108819 Moscow, Russia; E-mail: al.gambaryan@gmail.com*

[2] *Influenza Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30333, USA*

[3] *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

Received April 3, 2019
Revised June 5, 2019
Accepted June 15, 2019

It was previously shown that amino acids 155Thr, 158Glu, and 228Ser of H3N2 virus hemagglutinin (HA) are crucial for recognition of Neu5Gc. In this study, we have shown that the ability of the virus to bind the Neu5Gc-terminated receptor can also depend on the amino acid 145 of HA: virus isolates of 1972–1999 with Lys145 in HA could bind to the receptor, whereas those with Asn145 could not. Sporadic appearance and disappearance of the ability to bind Neu5Gc-terminated oligosaccharides as well as the absence of Neu5Gc residues in human glycoconjugates indicate the non-adaptive nature of this property. It was previously shown that the H3N2 virus isolates of 1968–1989, unlike H1N1 viruses, do not distinguish between Neu5Acα2-6Galβ1-4Glc (6′SL) and Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAc (6′SLN). The H3N2 viruses isolated after 1993 have acquired an ability to distinguish between 6′SL and 6′SLN, similar to H1N1 viruses. We determined that predominant affinity of H3N2 viruses for 6′SLN gradually increased from 1992 to 2003. After 2003, H3N2 viruses lost an ability to bind a number of sialosides including 6′SL that were good receptors for the earlier H3N2 isolates, and only 6′SLN retains high affinity for the later human H3N2 isolates. This property correlates with acquisition of new glycosylation sites at positions 122, 133 and 144 as well as with Glu190Asp and Gly225Asp replacements in HA. These replacements are also responsible for the receptor-binding phenotype of human H1N1 viruses. Convergent evolution of receptor specificity of the H1N1 and H3N2 subtypes indicates that 6'SLN is an optimal natural human receptor for influenza viruses.

Keywords: influenza virus, hemagglutinin, sialooligosaccharides, receptor specificity, H3N2