

УДК 577.2.08

РАЗВИТИЕ МЕТОДОЛОГИИ АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ РНК И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ

Обзор

© 2019 С.К. Василенко*

ГНЦ ВБ «Вектор», 630559 р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия;
электронная почта: vasilen@vector.nsc.ru, vasilenko37@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.06.2019

После доработки 27.07.2019

Принята к публикации 05.08.2019

В обзоре рассмотрены три самостоятельных блока исследований. В первом блоке описывается открытие, выделение, исследование специфичности РНКаз из змеиных ядов (РЗЯ) и их применение при изучении макроструктуры РНК. Было установлено, что РЗЯ неспецифичны к первичной структуре РНК, но специфичны к спиральной конформации субстрата независимо от способа его образования: двойная спираль, одиночная или гибридная. РЗЯ гидролизуют РНК до коротких олигомеров с 5'-концевым фосфатом. На примере исследования кинетики и анализа продуктов гидролиза тРНК показаны возможности РЗЯ в исследованиях макроструктуры РНК. Во втором блоке рассматривается реализация сформулированного автором принципа анализа первичной структуры нуклеиновых кислот и описывается метод прямого секвенирования РНК, в создании которого автор принимал участие. В третьем блоке рассмотрены результаты генотипирования и этиологического контроля эпидемических вирусов гриппа А, циркулировавших на территории СССР с 1968-го по 1992-й гг. Разработанный метод сравнительного анализа первичных структур геномов вирусных изолятов позволил выявить и охарактеризовать эпидемические штаммы вируса гриппа, появившиеся в циркуляции вследствие реактивации инактивированных вакцин.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: змеиные яды, рибонуклеаза, РНК, макроструктура, первичная структура, молекулярная вирусология.

DOI: 10.1134/S0320972519110010

Предложение опубликовать в юбилейном номере журнала «Биохимия» результаты моей более, чем полувековой, научной деятельности я воспринял с большой благодарностью, поскольку считаю, что своим биохимическим образованием и подготовкой к самостоятельным исследованиям я, в первую очередь, обязан своей Alma mater – кафедре биохимии биологического факультета МГУ, в который я поступил в 1954 г., сразу после окончания средней школы в Костроме. Со второго курса я был зачислен на кафедру биохимии животных. В то время еще были живы и трудились профессора и преподаватели, которые получали образование до революции и в своем служении опирались на традиции, заложенные отцами российской биологии. Наиболее ярким представителем «старой гвардии» факультета был тогда основатель кафедры биохимии животных профессор Сергей Евгень-

евич Северин, выдающийся ученый и прекрасный педагог. Мне крупно повезло, что я прошел обучение на кафедре, руководимой С.Е. Севериным. Помню первое наше знакомство с кафедрой и преподавательским составом. Мне запомнилась вступительная лекция Сергея Евгеньевича, в которой он обрисовал перспективу нашего обучения. Как я понял, главной мыслью лекции было то, что невозможно за столь короткий срок подготовить законченного, квалифицированного специалиста. Задача университетского курса и, в частности, кафедры – привить студентам базовые знания и экспериментальные навыки, которые должны помочь им правильно ориентироваться в начале трудовой деятельности. Казалось, Сергей Евгеньевич мало занимался младшими курсами, хотя и был в курсе всех житейских ситуаций кафедры. С нами, в основном, занимались сотрудники кафедры, которые очень внимательно и строго следили за лабораторной практикой закрепленных за ними студентов. Эту строгость я испытал на себе. Не

* Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

помню уже, что это был за эксперимент, над которым я работал целую неделю и получил хорошие результаты. При приемке оказалось, что я по небрежности завысил температуру опыта на несколько градусов. Это завышение никак не повлияло на конечный результат, но тем не менее меня заставили снова повторить все с начала при нужной температуре. Сгорая я посчитал это придикой, но со временем оценил мудрость такого решения. Этот инцидент я запомнил на всю жизнь и незаметно для себя изменил свое отношение к чистоте выполнения экспериментов. Высокий уровень владения выпускниками кафедры биохимии МГУ техникой эксперимента неоднократно отмечался российскими и зарубежными специалистами.

Со старшекурсниками С.Е. Северин работал достаточно плотно, регулярно участвуя в обсуждении хода выполнения курсовых и дипломных работ, которые он чаще критиковал (иногда довольно жестко), чем хвалил. Часто он неожиданно переходил к темам, не связанным с предметом семинарского обсуждения. Помню начатый им разговор о роли мировоззрения в формировании естествоиспытателя. В другой раз была лекция о роли этики в общении между людьми. Многие из нас и слов таких не знали. Следует помнить, что это был 1958 год, и стражи идеологии были еще в силе, да и прочитать об этом было негде. Позже я понял, что Сергей Евгеньевич готовил нас к самостоятельной трудовой деятельности и расставлял акценты и поведенческие маркеры. Эти беседы Сергея Евгеньевича для меня были бесценными, в трудные минуты его заветы помогали мне находить решения как научных, так и житейских проблем. На последнем курсе С.Е. Северин предложил быть руководителем моей дипломной работы. Естественно, я с радостью согласился. Мне была предложена поисковая тема, в которой на основе косвенных данных предполагалось исследовать возможное влияние паращитовидной железы на окислительное фосфорилирование. Нам удалось подтвердить высказанное предположение, и защита диплома прошла успешно. Я вправе считать себя учеником С.Е. Северина, поскольку испытал на себе его большое влияние, и память о нем пронес через многие годы.

По завершении учебы в МГУ меня распределили в Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения АН СССР в лабораторию, тогда еще кандидата химических наук, Д.Г. Кнорре. На собрании лаборатории долго выбирали направление наших будущих исследований и пришли к выводу, что лучше всего заняться исследованием первичной структуры ри-

бонуклеиновых кислот. При распределении ролей и тематик будущих исследований мне достались (почти по жребию) разработка методологии анализа нуклеотидной последовательности в полирибонуклеотидах (в то время умели определять только нуклеотидный состав нуклеиновых кислот, а об их первичной структуре еще только мечтали) и далее подготовить необходимый для этого инструментарий, куда в первую очередь входил набор рибонуклеаз и фосфодиэстераз (ФДЭ) с различной специфичностью. Д.Г. Кнорре посоветовал обратить особое внимание на ФДЭ из змеиных ядов – фермент, последовательно отщепляющий монорибонуклеотиды с 3'-конца полинуклеотида. Как он полагал, кинетический анализ конечных продуктов гидролиза РНК этим ферментом может дать полезную информацию об очередности нуклеотидов в цепи. Вскоре я отправился за змеиными ядами в Ташкент и привез оттуда образцы ядов пяти видов змей. С этого начались растянувшиеся на многие годы исследования возможностей нуклеаз змеиных ядов в исследованиях структуры РНК.

Исследование РНКаз из змеиных ядов мы проводили с перерывами с 1963-го по 1982-й гг. Большинство исследований было выполнено в моей лаборатории в Новосибирском институте биоорганической химии СО АН СССР и после моего перехода – в Новосибирском институте молекулярной биологии Главмикробиопрома. РНКазы были обнаружены во всех тестируемых ядах среднеазиатских змей. Исследование ферментативных свойств РНКаз выявило их уникальную специфичность к спиральной конформации субстрата. Ферменты с такой специфичностью были описаны нами впервые, и уже более полувека они остаются уникальными, поскольку РНКазы с такой специфичностью больше не были обнаружены. К сожалению, статьи, обобщающей всю накопленную информацию, написано не было, поэтому я воспользовался возможностью исправить этот недостаток в настоящем обзоре. Крайне интересными и во многом парадоксальными оказались результаты исследования кинетики гидролиза природных РНК РНКазами змеиных ядов. Эта информация также изложена подробно, поскольку полученные данные послужили основой для использования РНКаз в исследованиях пространственной структуры РНК и их специфических комплексов с белками.

Результаты наших исследований в свое время были доложены на научных конференциях, опубликованы в центральных научных журналах, получили признание в научном мире и заметно повлияли на формирование представле-

ний о структурной организации РНК и РНП. В настоящее время они стали частью истории биологической науки. В связи с этим я решил не вносить в обзор довольно обширный блок исследований, связанный с участием РНКаз из змеиных ядов в изучении макроструктуры специфических комплексов тРНК с аминоксил-тРНК-синтетазами и с фактором элонгации EF-Tu, а также работы по изучению макроструктуры бактериальных рибосом. При желании, с материалами можно познакомиться в научных публикациях, изданных в то время [1–5]. Из всего объема информации этого блока в обзоре отмечены только данные, имевшие в то время приоритетное значение.

ОБНАРУЖЕНИЕ, ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РИБОНУКЛЕАЗ ИЗ ЗМЕИНЫХ ЯДОВ

Обнаружение и общая характеристика РНКаз из змеиных ядов. При сравнительном анализе фосфодиэстеразной активности ядов нескольких видов змей было обнаружено, что в разных ядах скорость расщепления бис-(пара-нитрофенил)фосфата не коррелирует со скоростью расщепления природных РНК. Это послужило основанием для предположения существования в змеиных ядах, наряду с фосфодиэстеразами, также и эндонуклеаз, не тестируемых реакцией с синтетическим субстратом. При последующем

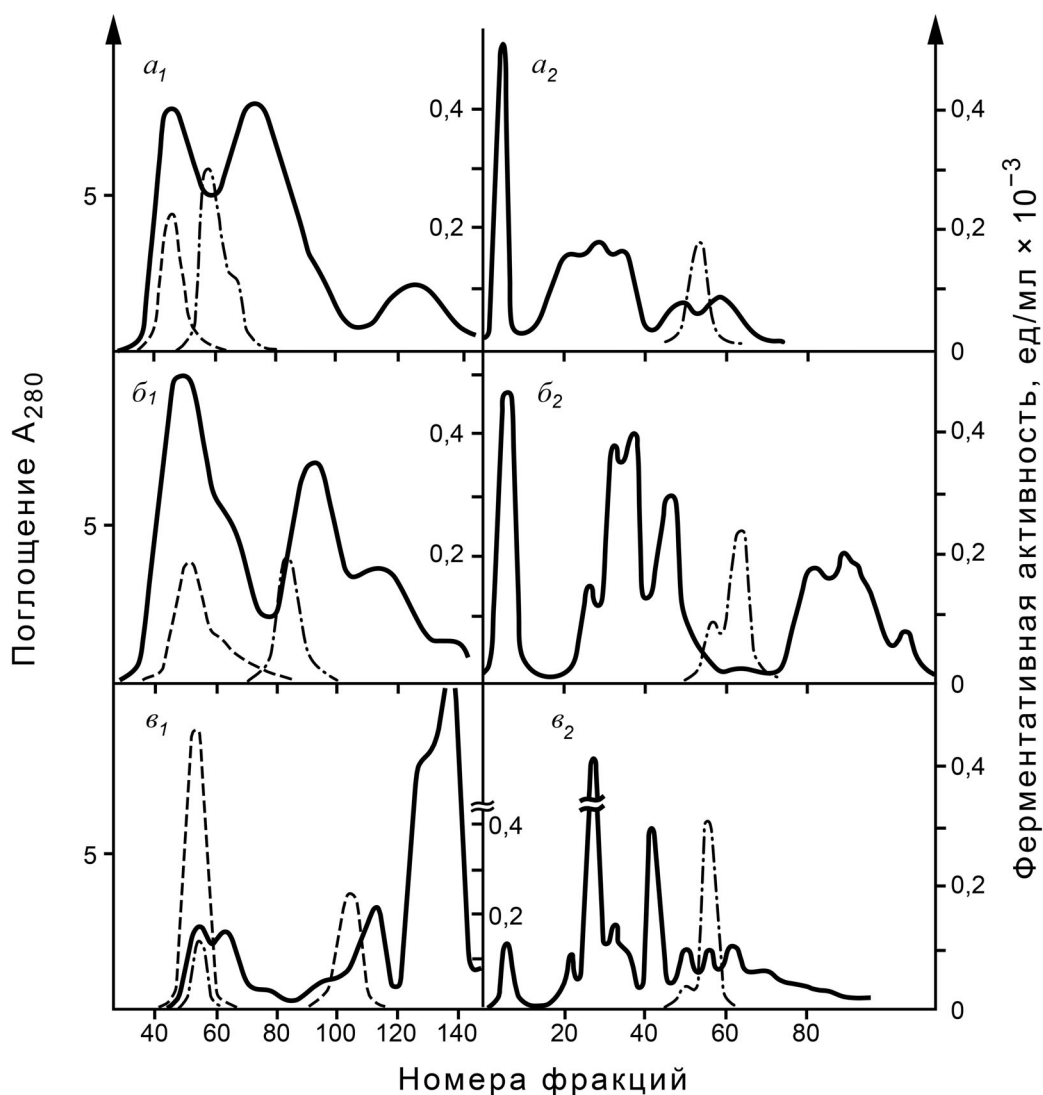


Рис. 1. Хроматографические профили выделения РНКаз из змеиных ядов. *a* – Шитомордника, *б* – гюрзы, *в* – кобры; 1 – гель-хроматография на сефадексе G-75 (3,0 × 120 см), 2 – рехроматография РНКазных фракций на SE-целлюлозе (1,0 × 60 см). Сплошная линия – поглощение при 280 нм; штриховая – ФДЭ активность; штрихпунктирная – РНКазная активность

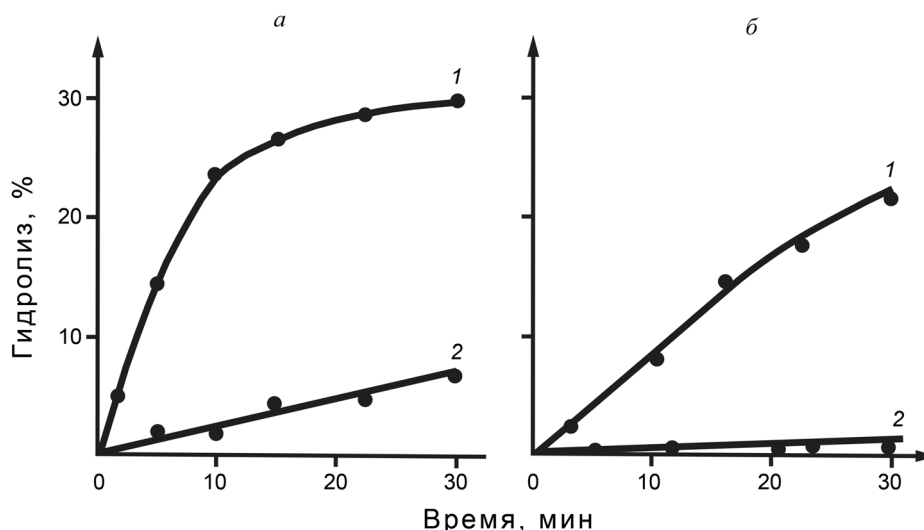


Рис. 2. Сравнение кинетических кривых гидролиза РНКазой из яда кобры: а – poly(U), б – poly(G), в составе двойной спирали (1) и в свободном виде (2)

хроматографическом анализе ядов пяти видов змей во всех случаях удалось обнаружить у них эндорибонуклеазную активность и количественно отделить ее от фосфодиэстеразной. В дальнейших исследованиях были использованы яды гюрзы (*Vipera lebetina*), кобры (*Naja naja oxiana*) и щитомордника (*Agkistrodon Palassii*), поскольку они, с одной стороны, содержали наибольшее количество фермента, а с другой стороны, такой выбор источников давал возможность сравнивать свойства нуклеаз из ядов змей, относящихся к разным таксономическим группам. Разработанная нами процедура выделения из ядов РНКаз и фосфодиэстераз заключалась в их последовательном фракционировании гель-фильтрацией на сефадексе G-75 и хроматографией на SE-целлюлозе (рис. 1) [6–9].

Препараты РНКаз были очищены (100–400)× и полностью освобождены от интерферирующих примесей. РНКазная активность в яде кобры была выше, чем в ядах гюрзы и щитомордника, соответственно, в 15–20 и в 5–10 раз. Оптимум pH РНКаз находился в пределах значений 7,6–8,0, молекулярные массы ферментов, измеренные SDS-электрофорезом, соответствовали величинам 17 кДа – у гюрзы и кобры и 35 кДа – у щитомордника. Установлено также, что у кобры и гюрзы активная форма ферментов состоит из двух одинаковых субъединиц, частично диссоциирующих в условиях гель-хроматографии.

РНКазы из ядов змей, зарегистрированные как РНКазы V_1 , были охарактеризованы, как металлозависимые РНК-гидролазы, активируемые ионами магния, и ингибируемые ионами цинка и меди, меркаптосоединениями и хелатирующими агентами [7–9]. Конечными продук-

тами предельного РНКазного гидролиза полирибонуклеотидов были короткие олигорибонуклеотиды с фосфатным остатком на 5'-конце молекулы [10, 11]. РНКазы V_1 оказались неспецифичными к первичной структуре РНК. ДНКазная активность РНКазы V_1 была приблизительно в 600 раз ниже РНКазной, что может быть связано с наличием примесей ДНКаз в препарате фермента. За исключением молекулярных масс РНКазы V_1 из разных источников по ферментативным свойствам были практически идентичными.

Специфичность РНКаз змеиных ядов к макроструктуре полирибонуклеотидов. Специфичность РНКаз к гомополирибонуклеотидам. Несмотря на отсутствие специфичности РНКаз V_1 к природе азотистых оснований, скорости гидролиза ими синтетических гомополирибонуклеотидов существенно различались и убывали в ряду poly(A), poly(C), poly(I), poly(U), а poly(G) была практически устойчива к гидролизу. Такие различия в чувствительности РНКазы V_1 к разным гомополимерам объясняли влиянием вторичной структуры, конформация и стабильность которой, как известно, определяется природой азотистого основания. Подтверждение такого предположения было получено при сравнении скоростей гидролиза poly(U) и poly(G) в свободном виде и в составе комплементарной двойной спирали. Как показано на рис. 2, в комплексе с poly(A) скорость гидролиза poly(U) возрастала ~10×, а скорость гидролиза poly(G) в комплексе с poly(C) была одинаковой со скоростью гидролиза poly(C). Ответ на вопрос, в какой мере спиральная конформация субстрата обязательна для его гидролиза РНКазы V_1 , был получен при

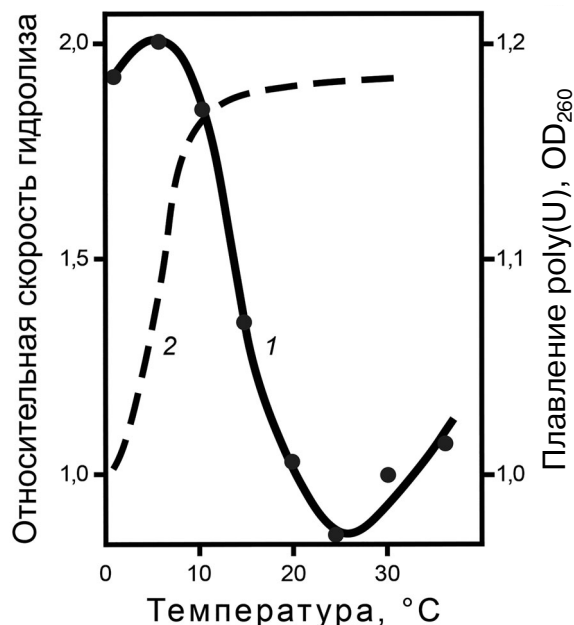


Рис. 3. Зависимость относительной скорости гидролиза poly(U) от температуры (1), кривая плавления poly(U) (2)

исследовании зависимости скорости гидролиза poly(U) от температуры. Как показано на рис. 3, в определенном температурном интервале выполняется обратная зависимость между скоростью гидролиза и температурой реакции. Такая зависимость, необычная для традиционных представлений термодинамики ферментативных реакций, становится объяснимой только при допущении, что непосредственному гидролизу фосфодиэфирной связи в месте его непосредственного контакта с ферментом должно предшествовать стадия преобразования участка poly(U) в спиральную конформацию [12, 13].

Субстратные свойства гибридных спиралей РНК–ДНК были изучены на примере гидролиза ^{32}P -радиоактивных транскриптов. Как показано на рис. 4, РНК в составе гибридной спирали деградировала даже быстрее, чем сама РНК. Способность РНКазы V_1 гидролизовать РНК в составе гибридной спирали может лишний раз свидетельствовать о том, что фермент специфичен к спиральной конформации полирибонуклеотида независимо от способа ее образования (двойная, гибридная или однотяжевая спираль). Учитывая такую специфичность фермента, можно предположить, что петлевые участки РНК, которые не могут принять спиральную конформацию в силу фиксированного положения их концов, должны быть устойчивы к гидролизу. Такая специфичность РНКаз к спиральной структуре РНК была описана нами впервые. От своих ближайших аналогов, клеточных РНКаз процессинга, работающих котранскрип-

ционно при еще мало изученном промежуточном состоянии макроструктуры синтезируемой цепи РНК, РНКазы V_1 отличаются тем, что для реализации их активности требуется только спиральная конформация атакуемого участка цепи РНК. Условно, РНКазу из змеиного яда можно считать вырожденной РНКазой процессинга. Можно предположить, что ферменты такой специфичности не соответствуют и даже противоречат общей структуре метаболизма и могут существовать только в антиметаболических системах.

Специфичность РНКаз к природным полирибонуклеотидам. Цепи природных РНК в отличие от монотонной вторичной структуры гомополирибонуклеотидов организованы в сложные трехмерные образования с чередующимися спиральными и петлевыми участками. Выяснение влияния макроструктуры РНК на специфичность РНКазы из яда кобры важно как для анализа макроструктуры самой РНК, так и для макроструктуры РНП-комплексов. При исследовании продуктов начальных стадий гидролиза РНК фага MS-2, меченого на 3'-конце методом ферментативного лигирования ^{32}P , была показана высокая избирательность РНКаз к конкретным участкам цепи РНК. Так, места разрывов цепи оставались практически неизменными при всех исследованных глубинах гидролиза, что указывает на сохранение целостности макроструктуры РНК на ранних стадиях гидролиза. Сравнение высокочувствительным методом нуклеазных разрывов цепи РНК РНКазы V_1 кобры, гюрзы и щитомордника подтвердило полную идентичность их специфичности. Это

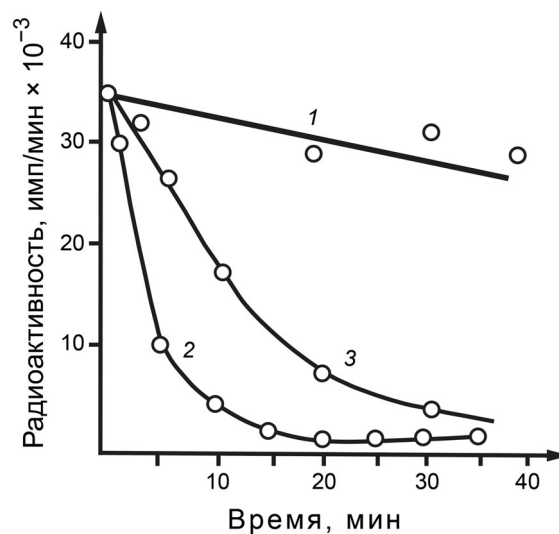


Рис. 4. Кривые гидролиза ДНК–РНК гибридных спиралей: 1 – РНКазой А, 2 – РНКазой из яда кобры, 3 – кривая гидролиза свободной РНК РНКазой из яда кобры

дает все основания считать РНКазы функционально значимыми компонентами змеиных ядов, хотя сами по себе они не считаются токсинами.

Биологическая роль РНКаз змеиных ядов остается непонятной. Во-первых, все субстраты этих ферментов могут находиться только внутри клеток. Следовательно, фермент должен преодолеть клеточную мембрану, не нарушая ее целостности, что представляется достаточно проблематичным. Из всех умозрительных гипотез наиболее реальной мне представляется предположение, что РНКазы могут быть предназначены для блокирования иммунного ответа организма на змеиные яды. Можно предположить, что РНКаз садится на один из рецепторов иммунной клетки, и с его помощью интернируется в цитоплазму, где закрепляется на мембране ядра и начинает разрушать выходящие из ядра мРНК, блокируя тем самым участие клетки в формировании иммунитета.

Кинетические особенности гидролиза РНКазами из змеиных ядов транспортных РНК. Рассмотренная выше высокая избирательность РНКазы V_1 к спиральным структурам РНК открывала новые возможности топографического анализа спиральных элементов в их молекуле. К началу наших исследований в этом направлении исследователи располагали только РНКазой, специфичными к неспиральным петлевым участкам РНК, которые обычно занимают меньше половины полинуклеотидной цепи РНК. Многочисленные исследования, в которых пытались определять области контакта РНК с белками-лигандами, показали только, что петлевые участки не участвуют в формировании специфических сайтов. Второй недостаток петлевых зон РНК связан с тем, что разрыв цепи в петле, в отличие от разрыва цепи в спиральной области РНК, приводит к более быстрому снижению стабильности макроструктуры РНК и к потере нативной конформации. Причина такого различия заключается в том, что разрыв связи в петле приводит к переходу малоподвижного петлевого участка в высокоподвижные концевые фрагменты, в то же время, при разрывах цепи внутри спирали ее конформация может сохраняться.

При исследовании гидролиза РНКазой V_1 природных РНК было обнаружено, что гидролиз проходит с автоускорением реакции. Такой феномен наблюдался впервые. Наиболее заметно этот феномен проявился при гидролизе транспортных РНК, его скорость возрастала в 3–4 раза после начальных разрывов нескольких ФДЭ-связей (рис. 5). Причину необычной кинетики гидролиза тРНК мы объяснили влияни-

ем ее третичной структуры и предположили, что нативные тРНК по субстратным свойствам отличаются от промежуточных продуктов их гидролиза. Это предположение было подтверждено при исследовании влияния на гидролиз тРНК ее свежих добавок в ходе реакции. Как показано на рис. 5, дополнительное введение в среду исходной тРНК на стадии ускорения реакции приводит к немедленному снижению скорости гидролиза до начальной. Такая зависимость свидетельствует, с одной стороны, о повышенном сродстве РНКазы V_1 к нативной тРНК, а с другой — указывает на то, что стабилизация фермент-субстратного комплекса сопровождается снижением скорости гидролиза. Увеличение стабильности тРНК–РНКазного комплекса мы объяснили снижением энтропийного фактора за счет более жесткой конформации нативной тРНК по сравнению с продуктами ее гидролиза. Такое объяснение представляется вполне естественным, если предположить наличие в молекуле фермента области первичного связывания субстрата, отличной от каталитического центра. Было сделано предположение, что такие центры есть в РНКазе III из *Escherichia coli* [14]. Ограниченная подвижность РНКазы относительно тРНК в его первичном комплексе может стать причиной затруднения перехода в компетентный гидролизу комплекс, что и выражается в замедлении начальной скорости гидролиза тРНК. Если принять, что внутренняя подвижность молекулы субстрата и стабильность фермент-субстратного комплекса находятся в обратной корреляции, то его наиболее стабильные варианты должны реализовываться, прежде всего, при взаимодействии фермента с максимально фиксированными элементами третичной структуры тРНК, что, в свою очередь, должно привести к ограничению набора ФДЭ-связей, первично атакуемых ферментом. Подтверждение этого предположения было получено при исследовании топографии первичных РНКазных разрывов в цепях у девяти разных тРНК: фенилаланиновой, валиновой, аспарагиновой и триптофановой из дрожжей, фенилаланиновой, метиониновой, глутаминовой и триптофановой из *E. coli* и триптофановой — из печени быка [1–4, 15, 16]. При наложении разрывов, образующихся в процессе гидролиза исследуемых тРНК на соответствующие модели макроструктуры, показано, что все они, без исключения, расположились в спиральных участках. В отличие от однозначно адресованных разрывов в центральной части молекулы, 3'-конец тРНК атакуется ферментом по пяти ФДЭ-связям, расположенным рядом, что, по-видимому, связано с повышенной гиб-

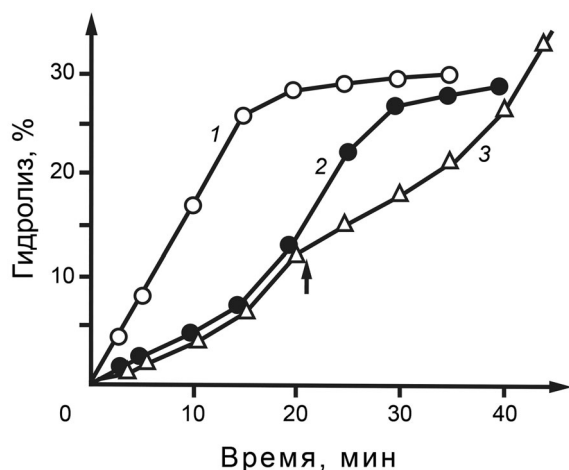


Рис. 5. Кинетические кривые гидролиза poly(A) (1) и дрожжевой тРНК (2). 3 — Кинетические кривые гидролиза РНКазой из яда кобры. На кривой гидролиза тРНК стрелкой отмечено время добавления в реакционную смесь свежей порции тРНК

костью этого участка тРНК. Измерение радиоактивности показало, что на ранних стадиях гидролиза на акцепторный стебель приходится ~80% всех разрывов. Помимо акцепторного стебля общими для всех тРНК оказались разрывы в антикодонном стебле в положениях 28—30 и 41—43. Остальные спиральные участки были достаточно устойчивы к гидролизу. Разрывы связей в D-стебле в положении 13 обнаружены только у тРНК^{Phe}, у тРНК^{Trp} из всех трех источников разрывы РНКазой акцепторного стебля проходили только по положениям 65 и 69. На основе этих данных нами был предложен механизм образования фермент-субстратного комплекса. Фермент связывается центром первичного взаимодействия с наименее подвижной центральной частью тРНК, а его каталитический центр при этом может взаимодействовать только с ближайшими к месту первичного связывания участками. Чем подвижнее эти участки, тем больше может возникнуть вариантов компетентного гидролизу комплекса [17]. В поддержку такого механизма свидетельствует расположение атакуемых РНКазой связей на третичной структуре тРНК вокруг центральной вогнутой части молекулы в радиусе 20—25 Å. Следует отметить, что некоторые результаты наших исследований не потеряли своего значения и сегодня. В первую очередь это касается самой рибонуклеазы из змеиных ядов, которая до сих пор не имеет аналогов и остается единственным ферментом, способным тестировать спиральные области в структуре РНК, не нарушая при этом ее пространственной структуры.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ АНАЛИЗА ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ РНК

В 1963 году на рабочем совещании, посвященном проблемам расшифровки нуклеотидной последовательности тРНК, я предложил новый подход к расшифровке нуклеотидной последовательности в олигонуклеотидах. Суть предложения заключалась в следующем: продукты неполного гидролиза олигонуклеотида фосфодиэстеразой змеиного яда, которая последовательно отщепляет 5'-нуклеотиды с 3'-конца молекулы субстрата, разделяются ионообменной хроматографией по молекулярным массам в условиях, когда олигонуклеотиды выходят с колонки в порядке нарастания их полимерности с шагом в один нуклеотид. Последующий 3'-концевой анализ промежуточных продуктов (при их щелочном гидролизе 3'-конец переходит в нуклеозид) должен определить всю нуклеотидную последовательность в олигонуклеотиде [18]. Мое предложение было одобрено участниками совещания, которые поддержали наше предложение выполнять эту работу совместно с ИХПС (позже Институт биоорганической химии) АН СССР. Индивидуальных РНК тогда у нас еще не было, и для получения модельного олигонуклеотида пришлось использовать суммарную РНК, гидролизат которой РНКазой А фракционировали хроматографией в 7М мочеvine. Суммарную пентануклеотидную фракцию рехроматографировали в кислой среде. Для дальнейших исследований была выбрана фракция с нуклеотидным составом 2G2A1C. На выделение и очистку пентарибонуклеотида ушло ~2 месяца и всего несколько дней — на определение его первичной структуры [19]. На несколько месяцев раньше нашей идентичная по замыслу работа вышла из лаборатории Холли. В этой лаборатории методом противоточного распределения уже было выделено несколько индивидуальных тРНК, и благодаря новому способу секвенирования олигонуклеотидов им удалось достаточно быстро установить первичную структуру аланиновой тРНК. Это была первая первичная структура природной РНК. За эту работу в 1968 г. Холли получил Нобелевскую премию. В появившихся вскоре работах по модификации метода хроматография была заменена на двумерный электрофорез в полиакриламидном геле, что существенно упростило процедуру реализации метода, который стал общепринятым. Сформулированный нами и группой Холли принцип впоследствии лег в основу широко известного химического метода секвенирования ДНК Максама и Гилберта.

Вскоре моей группе пришлось сменить тематику и переключиться на исследование свойств РНКаз из змеиных ядов и на выделение индивидуальных тРНК. Потребность в прямом секвенировании РНК возникла снова после того, как мы начали заниматься молекулярной вирусологией РНК-содержащих вирусов. Существовавшие в то время методы секвенирования РНК страдали общим недостатком: необходимый для анализа гидролиз РНК был ферментативным и проходил в условиях, при которых вторичная и третичная структуры РНК серьезно препятствовали достижению равномерной фрагментации ее цепи. Оптимальную для анализа равномерность фрагментации цепи удавалось получить только при гидролизе РНК в денатурирующих условиях химическими способами. С другой стороны, при химическом способе фрагментации РНК непросто выстроить продукты гидролиза в порядке, соответствующем нуклеотидной последовательности. При анализе перспективы разработки полноценного метода прямого секвенирования РНК мы пришли к выводу, что успех станет возможным только при выполнении сразу обоих условий: равномерность фрагментации цепи РНК в сочетании с надежным способом концевой анализа продуктов ее деградации. Первоначально нами рассматривалось два независимых способа секвенирования РНК. Согласно первому варианту предполагалось ввести с помощью полинуклеотидкиназы радиоактивный P^{32} фосфат в 5'-конец РНК и затем провести ее частичный гидролиз 5'-эндорибонуклеазой совместно с ФДЭ змеиного яда таким образом, чтобы распределение разрывов по цепи было, по мере возможности, равномерным. После этого гидролизат следовало обработать Т4РНК-лигазой, которая сшивает неспиральные фрагменты РНК внутримолекулярно, замыкая их в кольца. При кольцевой форме фрагмента РНК 5'-концевой P^{32} фосфат переходит в фосфодиэфирную связь и становится устойчивым к фосфатазе. После удаления фосфатазой 5'- P_i фосфатных остатков у не участвовавших в циклизации фрагментов РНК гидролизат нужно фракционировать электрофорезом в акриламидном геле. Положение на электрофореграмме радиоактивных полос будет соответствовать положению нуклеотида в цепи РНК, а природа нуклеотида будет определяться по идентификации радиоактивного нуклеотида в щелочном гидролизате элюированного из геля фрагмента. Это происходит потому, что при циклизации фрагмента РНК и последующем его щелочном гидролизе радиоактивный фосфат переходит на 3'-концевой нуклеотид исходного фрагмента. Предложенная схема метода представлялась на-

дежной, поскольку была собрана из многократно испытанных блоков. Не ясными оставались два момента: предельная длина фрагментов, способных циклизироваться лигазой и влияние на циклизацию остаточной вторичной структуры гидролизата. Второй способ был проще первого, но имел больше неопределенностей. Предполагалось провести мягкий химический гидролиз примерно в 2–4 разрыва на молекулу РНК и затем, с помощью полинуклеотид фосфокиназы присоединить $^{32}P_i$ к освободившимся при гидролизе 5'-гидроксилам. После этого радиоактивную реакционную смесь предполагалось разделить электрофорезом в полиакриламидном геле, радиоактивные фракции вырезать из геля, подвергнуть щелочному гидролизу и разделить электрофорезом. Идентификация проявленных радиоактивных пятен определяется по их электрофоретической подвижности, а порядок нуклеотидов в цепи РНК соответствует порядку радиоактивных полос в полиакриламидном геле. До экспериментальной проверки рассмотренная схема нового способа секвенса РНК представлялась мне чисто гипотетической, и я до конца не был уверен в ее реальности. Вскоре я по приглашению отправился на полгода во Францию, в Страсбургский институт молекулярной и клеточной биологии. Там я познакомился с английским биохимиком Джоном Стэнли, который заканчивал стажировку и был относительно свободен. Я поделился с ним своей идеей и предложил ему проверить ее на практике. После некоторых раздумий и колебаний он согласился, за два дня составил детальный план, распечатанный по дням, собрал все необходимые приборы и реактивы, обсудил со мной неясные для него моменты и приступил к реализации наших замыслов. Следует отметить, что в институте уже в течение 10 лет занимались структурным анализом нуклеиновых кислот, и все необходимые нам для работы приборы и реактивы уже были в наличии, что очень облегчило нашу задачу. В то время я был плотно занят своей основной работой и несколько отошел от наших замыслов. Каково же было мое удивление, когда ровно через две недели после начала работы появился сияющий Джон с проявленной рентгеновской пленкой, усыпанной черными пятнами. Мы тут же начали читать по пятнам первичную структуру тРНК^{Phe} *Bacillus steatermophilus*, взятую в работу, и сравнивать ее с уже известной структурой тРНК^{Phe} *Bacillus steatermophilus*. Невероятно, но получилось полное совпадение структур, и для этого понадобилось всего 5 мкг тРНК, почти в миллион раз меньше, чем мы предполагали в 1962 году! Наш успех сразу стал известен всему институту. Джон в течение двух

дней подробно объяснял всем, что к чему. Вскоре он написал статью и улетел в Лондон договариваться о ее публикации в журнале Nature. Там ему обещали опубликовать статью в ближайшее время. Действительно, она вышла в июльском номере 1978 года, через четыре месяца после получения нами первых результатов [20]. Метод был испробован в нескольких лабораториях и получил полное подтверждение. Он нашел применение при анализе первичной структуры РНК, из-за третичной структуры которой блокировалась транскрипция. К таким участкам РНК относятся, например, некоторые области РНК вирусов и вирионов. Метод появился незадолго до создания первых секвенаторов нуклеиновых кислот. Автоматы быстро обесценили практически все ручные методы. Это затронуло также и наш метод, поскольку вскоре были найдены условия перевода РНК со сложной третичной структурой в кДНК. Но метод все же имеет некоторые преимущества перед автоматическим анализом. О первом преимуществе было упомянуто выше, кроме того, метод позволяет фиксировать и идентифицировать минорные основания в цепи РНК. Возможно, он найдет применение в будущем при диагностике тяжелых заболеваний, связанных с нарушением синтеза минорных оснований.

Наш метод содержит одну еще не решенную загадку: несмотря на то, что гидролиз РНК проводится в формамиде в гарантированно денатурирующих условиях, при которых реакционная способность всех ФДЭ-связей должна быть одинаковой, порядок распределения мест их разрывов в цепи РНК существенно отличается от случайного. По правилам статистического распределения такого быть не может. Создается впечатление, что после первого разрыва цепь РНК становится устойчивой к дальнейшему гидролизу. Я могу предложить только свое объяснение. Особенность проводимой реакции гидролиза состоит в том, что формально она проходит в формамиде в безводной среде. Свободная вода, попавшая в реакционную смесь случайно, должна при 100 °С быстро испариться. И в то же время мы наблюдаем, что разрыв цепи РНК происходит путем обычного гидролиза с участием воды. В противном случае останется не объяснимым образование 5'-гидроксильной группы в месте разрыва цепи. Вероятнее всего в реакции участвует связанная с РНК или с формамидом гидратационная вода. В контрольном опыте было показано, что гидролиз РНК в формамиде проходит интенсивней, чем в деионизованной воде, следовательно, формамид должен выполнять роль катализатора гидролиза, а для этого надо обязательно войти в специфический

контакт с ФДЭ-связью. Известно, что стабильность комплекса находится в обратной корреляции с его подвижностью. В нашем случае тепловая подвижность ФДЭ-связей напрямую связана с подвижностью полинуклеотидной цепи. В центре полинуклеотидной цепи разрыв вообще может стать невозможным. Поэтому на начальных стадиях гидролиза происходит точечный гидролиз преимущественно исходных молекул РНК. Свидетельством в пользу предложенной гипотезы может служить феномен: на обоих концах молекулы РНК участки длиной в 13 нуклеотидов имели только по одному пятну на каждый нуклеотид. Из этого следует, что тринадцатичленные фрагменты уже не способны к повторному гидролизу в используемых условиях. Ближайшие к концам молекулы разрывы ФДЭ-связей, вероятнее всего, появились при первых актах гидролиза нативных молекул РНК.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭТИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОВРЕМЕННОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВИРУСА ГРИППА ЧЕЛОВЕКА

Генотипирование эпидемических штаммов вирусов гриппа А, циркулировавших на территории СССР в 1968–1989 гг. и исследование случаев выхода вакцинных штаммов в эпидемическую циркуляцию. В 1985 году руководимый мною отдел переключился на анализ первичной структуры генов эпидемиологически актуальных вирусов. С 1986 по 1990 гг. в лаборатории моего ученика Н.А. Петрова было секвенировано более 100 000 нуклеотидов в нескольких десятках генов гемагглютинина и ~100 других генов вирусов гриппа А, а также некоторых других вирусов. Это стало возможным благодаря применению новой схемы прямого определения первичной структуры вирусных РНК на основе комбинации ферментативной деструкции радиоактивного праймера на матрице вирусного генома и химического секвенирования. Такая технология позволяет использовать для анализа практически неочищенный суммарный нуклеотидный материал, выделяемый из концентрата осветленной аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, зараженных вирусом гриппа. С помощью сравнительного анализа первичных структур генов циркулирующих вирусных вариантов предстояло ответить на ряд вопросов, касающихся жизнедеятельности и эпидемиологии вирусов гриппа А, а именно, выяснить, насколько вероятна реверсия вакцинных штаммов вирусов гриппа А в процессе их естественной циркуляции. Кроме этого, предстояло исследовать специфику и за-

кономерности антигенного дрейфа доминирующих вирусов гриппа подтипа А(Н3N2).

Известно, что в межэпидемический период у циркулирующих возбудителей возрастает разнообразие в первичных структурах геномов и в антигенных характеристиках. Так в середине 80-х годов вирусы гриппа антигенного подтипа А(Н3N2) были представлены не менее, чем тремя антигенными подгруппами. Различия в первичной структуре генов всех этих штаммов полностью удовлетворяли закономерностям естественной изменчивости вирусов гриппа А, вызванной антигенным дрейфом. Однако наряду с вирусами, доминирующими в данный момент в эпидемическом процессе, отмечались случаи изоляции так называемых «антигенных анахронизмов», атипичных по отношению к процессу естественной изменчивости. Такие «атипичные анахронизмы» были обнаружены на территории СССР и в соседних странах. В проделанной нами работе приводятся данные сравнительного анализа геномов ряда вирусов гриппа антигенного подтипа А(Н1N1), которые позволяют предположить их прямую связь с вакцинными штаммами, созданными на основе вируса А/PR/8-34(Н1N1).

Вирусы гриппа подтипа А/Монголия/128/86(Н1N1) были выделены в Монголии в 1985–1986 гг. у детей (5 штаммов). Изоляты подтипа А/Москва/771/88(Н1N1) выделены в феврале 1988 г. у взрослых (3 штамма). Последовательность оснований у вирусных геномов устанавливали путем элонгации 5'-меченных олигонуклеотидных праймеров ревертазой на матрице суммарной вирионной РНК с последующим секвенированием продуктов дестройки химическим методом. Секвэнс генов вируса гриппа А/Москва/771/88(Н1N1) выявил его родство с реассортантным вакцинным штаммом А/Киев/59/79(Н1N1), широко применявшимся в 1981–1985 гг. в качестве инактивированной вакцины. У вируса А/Москва/771/88 в гене гемагглютинаина (НА) были сохранены все четыре уникальные молчащие замены, отличающие ген НА штамма А/Киев/59/79/Р от всех остальных изолятов подтипа А(Н1N1). Кроме этого, были выявлены две дополнительные мутации С-737-Т и А-912-Г. Частичное секвенирование генов *NP*, *PB1*, *PB2*, *PA*, *M* и *NS* вируса А/Москва/771/88 показало полное их совпадение с соответствующими генами вакцинного штамма. Единственным отличием можно считать замену Т-58-А в гене *M*, такую же, как у лабораторного варианта А/PR/8/34 – родительского для применявшегося в СССР варианта. Второй «антигенный анахронизм» – А/Монголия/128/86(Н1N1) оказался родственным другому вакцинному

штамму – А/Ленинград/54/1, применявшемуся в составе инактивированной вакцины в 1979–1981 гг. Ген НА вируса А/Монголия/128/86 содержал все уникальные замены, присущие гену НА вакцинного штамма и отличался от него лишь одной молчащей мутацией в позиции 536. Анализ первичных структур генов *PB2*, *PB1*, *NP*, *NS* и *M* показал, что все они, как и вакцинный штамм происходили от лабораторного варианта вируса А/PR/8/34(Н1N1). В гене *M*, как и у вируса А/Москва/771/88, была замена Т-58-А, что говорит об общности их происхождения. Кроме этого, нами также были найдены доказательства родственной связи целого ряда выделенных в 1982 г. вирусов подтипа (Н3N2) с применявшейся в СССР в 1974–1982 гг. живой аттенюированной вакциной А/1533/17(Н3N2). Таким образом, при детальном исследовании первичной структуры геномов большинства атипичных вирусных изолятов удастся установить их прямую связь с применяемыми ранее цельновирионными вакцинными препаратами, как инактивированными реассортантными, так и аттенюированными пассажными [21–26]. Теоретически, появление отдельных генов вакцинных штаммов в эпидемической циркуляции могло бы происходить в результате их «захвата» вирулентными вирусами путем реассортации, однако в исследованных нами случаях признаков такой реассортации не обнаружено – все гены вирусных «анахронизмов» имели связь только с генами соответствующего вакцинного штамма. Трезвая оценка сложившейся ситуации с противогриппозными вакцинами заставляет высказывать опасение, что чисто технические усовершенствования методов инактивации вирусных препаратов не смогут гарантировать полное исключение возможности контаминации биосферы вакцинными штаммами. Поэтому представляется целесообразным пересмотр общей стратегии вакцинопрофилактики гриппа и отказ от широкого применения цельновирионных вакцин [26].

Динамика мутаций у вирусов антигенного подтипа А(Н3N2) за время их циркуляции с 1968 по 1977 гг. Вирусы гриппа антигенного подтипа А(Н3N2) после продолжительного перерыва вновь появились в человеческой популяции в 1968 г., вызвав пандемию, и с тех пор сохраняют эпидемическую активность, подвергаясь при этом антигенному дрейфу. В первое десятилетие смена доминирующих вариантов проходила достаточно быстро, через каждые 1–3 года, и приводила к необратимому изменению предшествующей антигенной разновидности. Столь длительное существование (более 20 лет) эпидемического процесса с участием вирусов гриппа

А(Н3N2) дает редкую возможность изучения быстрых микроэволюционных процессов в динамике природных популяций. Общеизвестно, что определяющей молекулярной основой антигенного дрейфа служит накопление мутаций в гене *НА*, сопровождаемое сменой доминирующего варианта. Ведущей причиной закрепления новых мутаций оказывается непрерывное возрастание коллективного иммунитета популяции хозяина. Отбор и закрепление дрейфовых мутаций обеспечивается непрерывной циркуляцией вируса от одной хозяйской особи к другой в частично иммунной популяции.

С целью выяснения характерных особенностей современных антигенных подгрупп вирусов группа А(Н3N2) и закономерностей антигенного дрейфа за 20 лет нами определена первичная структура антигенного белка гемагглютинина (НА), наиболее типичного представителя этой подгруппы, выделенного на территории СССР, а также ряда международных эталонов и вирусов прошлых лет: А/Гонконг/1/68, А/Виктория/36/72, А/Ленинград/538/4, А/Ленинград/337/76, А/Ленинград/385/80, А/Филиппины/2/82, А/СССР/31/85, А/СССР/3/85, А/СССР/3/86,

А/СССР/281/86, А/Рига/9977/86, А/Виктория/7/87, А/Сычуань/2/87, А/СССР/21/88/ [26–33].

Анализ конкретных мутаций аминокислот НА современных на тот момент вирусов гриппа А(Н3N2) обнаружил, что больше половины из них представляют собой повторные мутации в тех же положениях молекулы, по которым уже происходили замены в ходе антигенного дрейфа с 1968 г. Более того, основная часть таких повторных мутаций оказались реверсиями, восстанавливающими в данном участке структуру белка более раннего дрейф-варианта или прототипа А/Гонконг/1/68.

Вне зависимости от разнообразия первичных структур и антигенных свойств вирусов гриппа А(Н3N2) в различных подгруппах, все они подчинялись общим закономерностям антигенного дрейфа, который представляет собой следствие саморазвития эпидемического процесса во взаимодействии популяций хозяина и вируса. Мутации в генах вируса четко делятся на две принципиально разные группы. Одна из них — это «молчащие» мутации, которые из-за вырожденности генетического кода не изменяют структуру белка и не оказывают прямого влияния на антигенный дрейф. На рис. 6 показана динамика накопления таких молчащих нуклеотидных замен в гене *НА* вирусов гриппа А(Н3N2) за 20 лет непрерывного дрейфа (кривая 1). Анализ сделан на материале более 50 структур генов в области, кодирующей самую изменчивую тяжелую субъединицу белка НА. Максимальный разброс значений в каждой точке кривой не превышал трех замен, т.е. величины их прироста за год. Вид кривой 1 говорит о случайном характере нуклеотидных замен, их практической нейтральности для функционирования вируса и о постоянной скорости их накопления. На нейтральную функцию «молчащих» замен может указывать и равномерность их распределения по всей длине гена. В силу постоянства скорости и случайности образования как прямых, так и обратных «молчащих» мутаций весь эволюционный путь вирусной популяции за этот обозримый период времени оказывается запечатленным в первичной структуре его генов. Всю историю эволюционного пути любого изолята можно расшифровать реконструкцией его филогенетических связей с другими родственными изолятами.

Аминокислотные замены в отличие от «молчащих» мутаций различных штаммов непосредственно отражаются в фенотипе вируса и подвергаются действию отбора.

График числа отличий от прототипа А/Гонконг/1/68 в области НА1 (рис. 6, кривая 2) построен также на материале более 50 структур, и

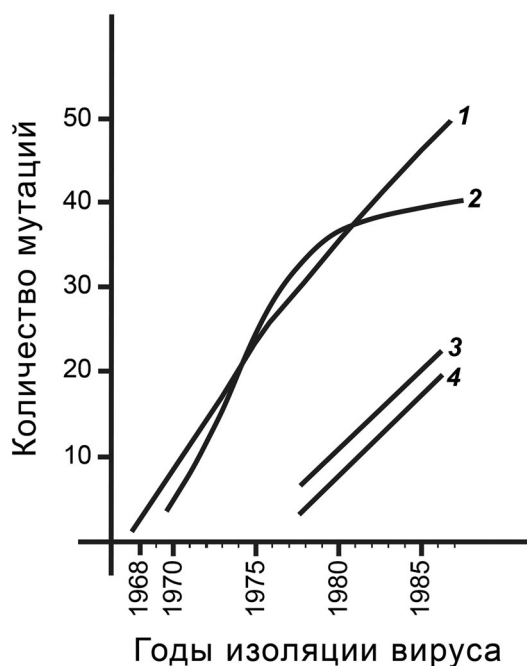


Рис. 6. Нарастание числа отличий от гена и белка прототипного штамма в процессе его антигенного дрейфа. 1 — «Молчащие» нуклеотидные замены в гене *НА* вирусов гриппа А(Н3N2) прототипа А/Гонконг/1/68(Н3N2); 2 — аминокислотные отличия от прототипа А/Гонконг/1/68(Р3Т2); 3 — «молчащие» замены нуклеотидов в гене *НА* вирусов гриппа А(Н1N1) относительно гена прототипа А/СССР/20/77(Н1N1); 4 — отличия аминокислот в белке НА1 вирусов гриппа А(Н3N2) относительно гена прототипа А/СССР/20/77(Н1N1)

разброс точек для каждого года не превышает двух замен. В первое десятилетие дрейфа аминокислотные замены накапливались линейно, однако во втором десятилетии этот процесс значительно замедлился и в конце — практически остановился. Это касается практически всей современной популяции вирусов А/(H3N2), независимо от их принадлежности к весьма различным антигенным подгруппам. Линейность накопления аминокислотных замен в начальной фазе дрейфа говорит об их случайности и практической нейтральности к выполнению молекулой НА своих многочисленных функций в жизненном цикле вируса гриппа. В условиях растущего иммунного пресса со стороны хозяина многие новые варианты НА обеспечивают временное селективное преимущество. Однако, сам характер замен и число положений в молекуле, допускающих такие квазисвободные изменения, очень ограничены. Можно предположить, что давление иммунного пресса хозяина постепенно искажает нативную структуру прототипного белка, и в итоге накопление замен мешает белку функционировать. Поэтому отбор становится двунаправленным и стабилизирует число отличий на уровне 40–50. При этом замены продолжают закрепляться, но происходят они, в основном, в одних и тех же ограниченных участках антигенных детерминант и часто приводят к реверсиям-восстановлениям структуры белка более ранних вариантов. Переход вирусов А/(H3N2) к фазе стабилизированного дрейфа говорит о том, что они практически исчерпали потенциал изменчивости, который позволял им существовать в эпидемическом режиме более 20 лет, по крайней мере в человеческой популяции. Из такой ограниченности дрейфа следует, что эпидемическая фаза существования вируса гриппа А человека также ограничена. Неизбежный антигенный дрейф ведет в некотором смысле в эволюционный тупик. Через определенные промежутки времени вирусы гриппа человека должны обновлять свой генофонд за счет генов НА из животных резервуаров, где антигенный дрейф незначителен, либо путем сохранения интактных вирусных геномов в человеческой популяции в условиях отсутствия циркуляции и неизбежно связанного с ней дрейфа.

Выше были рассмотрены более или менее завершённые комплексные исследования. Кро-

ме этих работ приходилось также заниматься и не столь масштабными исследованиями, некоторые из которых, по моему мнению, достойны упоминания в обзоре. Прежде всего, сюда можно отнести секвенирование вирусных геномов, не относящихся к семейству ортомиксовирусов: главным образом пикорна- и поксвирусов. В семействе пикорнавирусов (Picornaviridae) были установлены первичные структуры генов вирусов энцефаломиокардита и вируса ящура, а в семействе поксвирусов (Poxviridae) — ~10 000 нуклеотидных пар генов осповакцины и натуральной оспы. С 1982 г. началось сотрудничество нашего центра с институтом ящура МСХ СССР во Владимире. Мы внедрились там, тогда еще новую, технологию структурного анализа вирусных геномов и совместно установили первичные структуры генов белка VP1 у нескольких штаммов вируса ящура, циркулировавшего на территории СССР в конце 70-х гг. Некоторые из них оказались продуктами реактивации штаммов, применяемых в качестве инактивированных вакцин [34]. Результаты получили большой резонанс, и не только в научной среде. В результате на предприятиях, производящих противоящурную вакцину, была изменена методология вирусной инактивации и установлен более жесткий контроль технологического процесса.

Мы были среди первых, кто начал внедрять в эпидемиологические исследования структурный анализ вирусных геномов. Методические разработки нашего центра ГНЦ ВБ «Вектор» активно внедрялись в другие вирусологические центры, совместно с которыми (институтом гриппа АМН СССР, институтом вирусологии им. Ивановского АМН СССР и институтом ящура МСХ СССР) была проведена серия исследований в новой области эпидемиологии, получившей позже название «молекулярная эпидемиология». Начиная с начала 80-х гг. и вплоть до внедрения в научную практику автоматических секвенаторов Россия лидировала в этой области науки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boutorin, A.S., Remy, P., Ebel, J.P., and Vasilenko, S.K. (1982) Comparison of the hydrolysis patterns of several tRNAs by cobra venom ribonuclease in different steps of the aminoacylation reaction, *Eur. J. Biochem.*, **121**, 587–595.
2. Favorova, O.O., Fasiolo, F., Keith, G., Ebel, J.P., and Vassilenko, S.K. (1981) Complexes of aminoacyl-tRNA synthetases and tRNA. Studies by partial cobra venom RNase hydrolysis, *Biochemistry*, **20**, 1006–1010.

3. Boutorin, A.S., Clark, B.F.C., Ebel, J.P., Kruse, T.A., Petersen, H.U., Remi, P., and Vasilenko, S.K. (1981) A study of the interaction of *E. coli* elongation factor – Tu with aminoacyl-tRNAs by partial digestion with cobra venom RNase, *J. Mol. Biol.*, **152**, 593–608.
4. Vasilenko, S.K., Carbon, F., Ebel, J.P., and Ehresman, Sh. (1981) Topography of 16S RNA in 30S subunits and in 70S subunits. Accessibility to cobra venom ribonuclease, *J. Mol. Biol.*, **152**, 699–721.
5. Василенко С.К. (1985) *Рибонуклеазы змеиных ядов; ферментативные свойства и применение для исследования макроструктуры РНК и РНП*. Дис. докт. биол. наук, Новосибирск, с. 235–286.
6. Василенко С.К. (1963) Выделение фосфодиэстеразы и фосфомоноэстеразы из яда гюрзы *Vipera lebetina* методом хроматографии на сульфэтил-целлюлозе, *Биохимия*, **28**, 602–605.
7. Бабкина Г.Т., Василенко С.К. (1964) Нуклеазная активность ядов среднеазиатских змей, *Биохимия*, **29**, 268–272.
8. Василенко С.К., Бабкина Г.Т. (1965) Выделение и свойства рибонуклеазы из яда кобры *Naja oxiana*, *Биохимия*, **30**, 705–712.
9. Василенко С.К., Райт В.К. (1975) Метод выделения высокоочищенной рибонуклеазы из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana*, *Биохимия*, **40**, 578–583.
10. Василенко С.К., Сербо Н.А., Венямина А.Г., Болдырева Л.Г., Будкер В.Г., Кобец Н.Д. (1976) Препаративное получение 5'-олигонуклеотидов с помощью рибонуклеазы из яда кобры, *Биохимия*, **41**, 260–263.
11. Василенко С.К. (1985) *Рибонуклеазы змеиных ядов; ферментативные свойства и применение для исследования макроструктур РНК и РНП*. Дис. докт. биол. наук, Новосибирск, с. 56–71.
12. Василенко С.К. (1985) *Рибонуклеазы змеиных ядов; ферментативные свойства и применение для исследования макроструктур РНК и РНП*. Дис. докт. биол. наук, Новосибирск, с. 73–91.
13. Магарил С.А., Василенко С.К., Райт В.К., (1981) Особенности гидролиза синтетических полирибонуклеотидов эндорибонуклеазой из яда кобры *Naja oxiana*, *Биохимия*, **45**, 408–413.
14. Nicholson, A. (2014) Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA-cleavage, *Wiley Interscip. REV. RNA*, **5**, 31–48.
15. Ebel, J.P., Remy, P., Baltzinger, M., Ehrlich, R., Jefeve, J.F., Renaud, M., Fasiolo, F., Keith, G., Favorova, O.O., and Vasilenko S.K. (1980) Aminoacyl-tRNA synthetase, interaction with their ligands, in *Enzyme regulation and mechanism of action*, Proc. FEBS Special Meeting on Enzymes, Cavtat, Dubrovnik, 1979 (Eildner, P., and Rien, B., eds.), Pergamon Press, N. Y., pp. 211–221.
16. Ebel, J.P., Renaud, M., Dietrich, A., Fasiolo, F., Keith, F., Favorova, O.O., Vassilenko, S.K., Baltzinger, M., Remy, P., Bonnet, J., and Giege, R. (1979) Interaction between tRNA and aminoacyl-tRNA sintetase in the valine and phenylalanine system from yeast, in *Transfer RNA, Structure, Properties, and Recognition* (Shimmel, S., and Soll, D., eds) Cold Spring Harbour Laboratory Press, N.Y., pp. 325–343.
17. Василенко С.К., Буторин А.С., Маев С.П., Витюгов Ф.И., Болдырева Л.Г., Райт В.К. (1983) Специфичность нуклеазы из яда кобры *Naja naja oxiana* к макроструктуре полирибонуклеотидов, *Мол. биол.*, **17**, 818–823.
18. Василенко С.К. (1963) *Информационный бюлл. Совета по молекулярной биологии АН СССР* (Москва), № 2, с. 19.
19. Василенко С.К., Демушкин В.П., Будовский Э.И., Кнорре Д.Г. (1965) Определение нуклеотидной последовательности в олигонуклеотидах, *ДАН СССР*, **162**, 604–607.
20. Stanley, J., and Vasilenko, S.K. (1978) A different approach to RNA sequencing, *Nature*, **274**, 87–89.
21. Петров Н.А., Нетесов С.В., Блинов В.М., Василенко С.К. (1986) Эволюция гена гемагглютинина подтипа НЗ вируса гриппа А человека, *Мол. Генет.*, **11**, 7–14.
22. Беклемишев А.Б., Блинов В.М., Петров Н.А., Василенко С.К. (1986) Первичная структура полноразмерной ДНК-копии гена гемагглютинина вируса гриппа А/Киев 8/59/79(Н1N1), *Биоорган. Химия*, **12**, 375–383.
23. Петров Н.А., Гринев А.А., Василенко С.К., Жилинская И.Н., Парамонова М.С., Голубев Д.Б. (1988) Первичная структура гемагглютинина вируса гриппа при серийных пассажах на куриных эмбрионах, *Бюлл. Эксп. Биол.*, **11**, 596–598.
24. Петров Н.А., Киселев О.И., Гринбаум Е.Б., Лузянина Т.И., Полежаев Ф.И., Василенко С.К. (1990) Возможность циркуляции вакцинных штаммов вирусов гриппа А в биосфере, *ДАН СССР*, **315**, 725–728.
25. Петров Н.А., Василенко С.К., Гринев А.А., Киселев О.И., Гринбаум Е.Б., Лузянина Т.И. (1988) Первичная структура гена гемагглютинина вариантов вируса А/СССР/2/85(Н3N2) В сб. науч. тр. *Проблемы конструирования гриппозных вакцин*, (под ред. Корнеевой Э.П.), ВНИИ гриппа, Санкт-Петербург, с. 54–60.
26. Петров Н.А., Василенко С.К. (1990) Современное разнообразие вирусов гриппа А человека на молекулярном уровне, *Мол. Генет.*, **12**, 3–10.
27. Сандахчиев Л.С., Петров Н.А., Яхно М.А., Лузянина Т.И., Гринев А.А., Василенко С.К., Гринбаум Е.Б., Голубев Д.Б., Говоркова Е.А., Жданов В.М. (1988) Первичная структура геномов современных гонконгоподобных штаммов вирусов гриппа А(Н3N2), *ДАН СССР*, **302**, 1494–1497.
28. Жданов В.М., Петров, Н.А., Гринев А.А., Яхно М.А., Исаченко В.А., Горбунов Ю.А., Вторушина Н.А., Нетесов С.В., Василенко С.К., Сандахчиев Л.С. (1989) Первичная структура гемагглютинина вирусов гриппа А(Н3N2), изолированных в СССР в 1985 г., *Вопр. Вирусол.*, **2**, 155–160.
29. Сандахчиев Л.С., Петров Н.А., Василенко С.К., Лузянина Т.Я., Гринбаум Е.Б., Горбунов Ю.А., Вторушина И.А., Голубев Д.Б. (1989) Первичная структура атипичных вирусов гриппа А (Н3N2) 1982–1985, *ДАН СССР*, **308**, 477–480.
30. Петров Н.А., Гринбаум Е.Б., Литвинова О.М., Лузянина Т.Я., Василенко С.К., Киселев О.И., Сандахчиев Л.С. (1990) Структура генома вируса гриппа А/Ленинград/22/81/(Н1N1), *Мол. Генет.*, **7**, 17–21.
31. Петров Н.А., Василенко С.К., Горбунов Ю.А., Киселев О.И., Сандахчиев Л.С. (1990) Первичная структура гена гемагглютинина штамма А/Рига/9977/86 дрейфового варианта вируса гриппа А(Н3N2), *Вопр. Вирусол.*, **5**, 372–373.
32. Медведева М.Н., Петров Н.А., Василенко С.К. (1990) Характеристика гемагглютинина персистентных вариантов вируса гриппа А/Виктория/35/72(Н3N2), *Вопр. Вирусол.*, **5**, 374–376.
33. Петров Н.А. (1991) *Молекулярно-этиологический анализ современного разнообразия вирусов гриппа А человека*. Дис. докт. биол. наук, Москва, с. 24–34.
34. Онищенко А.М., Петров Н.А., Блинов В.М., Василенко С.К., Сандахчиев Л.С., Бурдов А.П., Ивановенков В.П., Перевозчикова Н.А. (1986) Первичная структура ДНК-копии гена белка VP1 вируса ящура А₂₂, *Биоорг. Химия*, **12**, 416–419.

**DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR ANALYZING RNA STRUCTURE
AND ITS APPLICATION IN MOLECULAR BIOLOGY AND VIROLOGY****Review****S. K. Vasilenko****State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, 630559 Koltsovo,
Novosibirsk Region, Russia; E-mail: vasilen@vector.nsc.ru*

Received June 20, 2019

Revised July 27, 2019

Accepted August 5, 2019

The review covers three independent blocks of research. The first block includes discovery, isolation, and investigation of snake venom RNases (SVR) with emphasis on the study of RNA macrostructure. It has been established that SVR are not specific toward the primary structure of RNA but specific toward the RNA helical conformation (double, single, or hybrid helix). SVR hydrolyze RNA to short oligomers with 5'-terminal phosphate. Analysis of tRNA hydrolysis products and kinetic studies of the hydrolysis exemplify possibilities of using SVR for investigation of RNA macrostructure. The second block is devoted to the realization of the formulated by the author principle for analyzing the primary structure of nucleic acids and to the method of direct RNA sequencing in which establishing the author was involved. The third block considers the results of genotyping and etiologic control of the epidemic influenza A viruses that circulated on the USSR territory since 1968 to 1992. The developed method for comparative analysis of primary structures of genomes of viral isolates enabled detection and characterization of the epidemic influenza virus strains emerged in circulation as a consequence of reactivation of inactivated vaccines.

Keywords: snake venoms, ribonuclease, RNA, macrostructure, primary structure, molecular virology