

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 578.287

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ I155T, K156Q, K156E И N186K
В ГЕМАГГЛЮТИНИНЕ НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ
И РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСОВ ГРИППА А/Н5N1

© 2020 г. Т. А. Тимофеева^{а, *}, Г. К. Садыкова^а, Н. Ф. Ломакина^а, А. С. Гамбарян^б, И. А. Руднева^а,
Е. Б. Тимофеева^а, А. А. Шилов^а, Е. Ю. Боравлева^б, М. М. Журавлева^а,
П. А. Иванов^а, Е. Л. Рязанова^{а, с}, А. Г. Прилипов^а

^аНаучно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

^бФедеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова
Российской академии наук, Москва, 108819 Россия

^сПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991 Россия

*e-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru

Поступила в редакцию 06.05.2020 г.

После доработки 25.05.2020 г.

Принята к публикации 27.05.2020 г.

Продолжающаяся циркуляция вирусов гриппа А подтипа Н5 может стать причиной возникновения новых пандемически опасных вариантов вируса, способных передаваться от человека к человеку. Возникновение таких вариантов, в первую очередь, обусловлено мутациями в гемагглютине (НА) – гликопротеине, который расположен на поверхности вириона и считается основным антигенным компонентом вируса гриппа. Ранее нами обнаружены мутации в НА вируса гриппа Н5N1, способствующие ускользанию вируса от иммунного ответа. Теперь проведено исследование роли этих мутаций в изменении других характеристик вируса, не относящихся к антигенным, а также способности их закрепления в вирусной популяции. В ген НА рекомбинантного вируса гриппа А/Н5N1 (VNН5N1-PR8/CDC-RG) были введены мутации методом сайтспецифического мутагенеза. Полученные варианты вируса исследовали и сравнивали по следующим параметрам: кинетика репликации в куриных эмбрионах, термостабильность, репродуктивная активность при различных температурах (33, 37 и 40°C) и вирулентность для мышей. Аминокислотные замены I155T, K156Q, K156E+V138A и N186K в разной степени способствовали снижению термостабильности, уровня репликации в куриных эмбрионах и вирулентности для мышей. Мутации K156Q и N186K понижали репродуктивную активность вируса при повышенной температуре (40°C). Анализ частоты встречаемости этих мутаций в природных изолятах указывает на то, что мутации K156E/Q и N186K имеют мало шансов закрепиться в процессе эволюции, в отличие от мутации I155T, которая в наибольшей степени ответственна за антигенный дрейф. Мутации A138V и N186K носят адаптационный характер в вирусах млекопитающих.

Ключевые слова: вирус гриппа А, гемагглютинин Н5, аминокислотные замены, сайтспецифический мутагенез, фенотипические свойства, обратная генетика

DOI: 10.31857/S0026898420060129

Высокопатогенные вирусы гриппа птиц подтипа Н5, циркулирующие в последние годы в Азии, Африке и Европе, содержат в своем составе ген гемагглютинина НА Н5, который филогенетически берет свое начало от штамма А/goose/Guangdong/1/96 (Н5N1) (GsGD-lineage – гуангдонгская линия), выделенного в 1996 году во время эпизоотии в Китае [1]. С тех пор вирусы гриппа Н5N1 неоднократно становились причиной опустошительных эпизоотий среди птиц и вызвали панзоотию в 2005 году, жертвами которой ста-

ли разные виды птиц, млекопитающих и люди. Единичные случаи инфицирования человека высокопатогенным вирусом гриппа птиц Н5N1 впервые были зарегистрированы в 1997 году в Китае, в последующие годы случаи и число инфицированных варьировало в зависимости от эпизоотической обстановки в регионе. На 28 февраля 2020 года, по данным ВОЗ, за период 2003–2020 гг. в мире зарегистрирован 861 лабораторно подтвержденный случай инфицирования человека, из них 455 – со смертельным исходом (<https://>

www.who.int/influenza/human_animal_interface/2020_01_20_tableH5N1.pdf?ua=1).

В результате реассортации геномов между вирусами гриппа А, циркулирующими в природе, появились высокопатогенные штаммы с измененным набором генов, но сохранившие в своем составе *НА* H5 гуангдонгской линии [2]. Так, в 2010 году в Китае от домашней утки впервые выделили вирус гриппа подтипа H5N8 [3]. В настоящее время H5N6 сменил H5N1 как доминирующий подтип высокопатогенных вирусов гриппа в южном Китае, преимущественно распространившись среди домашних уток [4, 5] (<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2020/>).

Высокопатогенные вирусы гриппа птиц H5Nx представляют серьезную угрозу как для сельского хозяйства, так и для общественного здравоохранения. Циркуляция вирусов гриппа птиц подтипа H5 в окружающей среде может привести к приобретению этими вирусами мутаций, благоприятствующих распространению в человеческой популяции. На текущий момент высокопатогенные вирусы гриппа H5 не способны передаваться от человека к человеку. Но если это случится, то мировое сообщество потрясет новая пандемия. Этим и объясняется неослабевающий интерес к вирусам гриппа подтипа H5.

Объектом нашего исследования стал гемагглютинин (НА) вируса гриппа H5N1. Это один из гликозилированных белков вирусной оболочки, отвечающий за взаимодействие с клеточным рецептором и слияние вирусной и клеточной мембран в процессе проникновения вируса в клетку [6]. Кроме того, НА служит главной антигенной детерминантой, стимулирующей иммунный ответ инфицированного организма.

Быстрая эволюция вирусов гриппа обусловлена двумя процессами: накоплением мутаций в вирусных белках и реассортацией сегментов генома между разными штаммами. Мутации возникают спонтанно при репликации вирусного генома из-за ошибок вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, у которой отсутствует корректирующая способность. В обычных условиях возникшие мутанты немногочисленны и менее жизнеспособны, чем родительский штамм. Однако в определенных условиях: адаптация к новому хозяину, воздействие иммунного ответа, изменение температурного режима — это разнообразие мутантов (квазивиды) служит исходным материалом для селекции вариантов вируса, более приспособленных к новым условиям [7].

В наших предыдущих работах по исследованию антигенной изменчивости вирусов гриппа H5N1 в условиях иммунного давления были получены жизнеспособные мутанты (эскейп-мутанты, от английского “escape” — избегать, ускользать) с

заменами в белке НА [8–10]. Некоторые из этих мутаций могут иметь плейотропный эффект, то есть помимо изменения антигенных свойств влиять на рецепторную специфичность, вирулентность и термостабильность вируса, что может способствовать успешному распространению и расширению круга хозяев мутантных вариантов и формированию вирусов с пандемическим потенциалом. Более того, проведенный нами скрининг природных изолятов вирусов гриппа H5 НА по позициям аминокислотных остатков, характерных для эскейп-мутантов, ответственных за связывание с антителами, показал, что некоторые из этих присущих эскейп-мутантам замен присутствуют в вирусах, выделенных не только от птиц, но и от людей и свиней. В связи с этим назрела необходимость исследовать влияние аминокислотных замен в таких позициях на различные фенотипические характеристики вируса с целью выявления их способности закрепляться в вирусной популяции.

В представленной работе исследованы мутации в позициях 138, 155, 156 и 186 НА H5 (здесь и далее нумерация по подтипу H3 [11]), которые были обнаружены нами ранее в эскейп-мутантах [9, 12], а также Watanabe и др. [13] в патологическом материале от пациентов, инфицированных вирусом гриппа H5N1. С целью выяснить влияние замен I155T, K156Q, K156E+V138A и N186K в НА на фенотипические характеристики методом обратной генетики мы получили мутанты вакцинного штамма VNH5N1-PR8/CDC-RG (H5N1), которые отличались только заменами в НА. Исследованы вирулентность, термостабильность и температурная зависимость репликативной активности полученных мутантов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реконструкция вирусов. Исходный рекомбинантный вирус VNH5N1-PR8/CDC-RG (H5N1) и мутанты на его основе получены методом обратной генетики. Для реконструкции вируса использовали любезно предоставленную доктором Р. Вебстером (Dr. R. Webster, St. Jude Children’s Research Hospital, Memphis, США) систему из восьми плазмид [14], две из которых содержали ДНК-копии генов *НА* и *НА* вируса гриппа A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), а остальные — 6 сегментов генома вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). В использованной нами системе НА отличается от исходного A/Vietnam/1203/2004(H5N1) (GenBank, AY818135) заменой A138V и укороченным сайтом нарезания: QIETRG вместо QRERR-RKKRG. Модификация полиосновного пептида в сайте нарезания обеспечивает снижение высокой вирулентности, присущей высокопатогенным вирусам гриппа H5N1. Нуклеотидные замены для получения мутантов вводили с помощью коммерческого набора QuikChange XL Site-Di-

rected Mutagenesis Kit (“Stratagene”, США). Сборку вируса проводили плазмидной трансфекцией смешанной культуры НЕК-293Т–МДСК [14].

Вирусы, полученные в результате трансфекции, однократно пассировали в 10-дневных куриных эмбрионах заражением в аллантоисную полость. Зараженные куриные эмбрионы инкубировали 48 ч при 37°C, после чего охлаждали в течение ночи при 4°C. Вирусосодержащую аллантоисную жидкость собирали в стерильных условиях и оценивали в ней содержание вируса по титру в реакции гемагглютинации (РГА) [15], выраженном в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ). Препараты хранили при –80°C.

Полимеразная цепная реакция и секвенирование. Вирусную РНК выделяли из вирусосодержащей аллантоисной жидкости с использованием набора RNeasy Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Обратную транскрипцию и ПЦР проводили с праймерами к гену *HA* [16]. Продукты амплификации очищали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (“Qiagen”). Секвенирование выполнено методом Сэнгера с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) и автоматического ДНК-секвенатора DNA ABI Prism 3130 (“Applied Biosystems”). Для анализа нуклеотидных последовательностей применяли пакет программ DNASTAR Sequence Analysis Software Package (“DNASTAR Inc.”, США).

Определение инфекционности вирусов гриппа на куриных эмбрионах. Для определения 50%-ной эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀) 10-дневные куриные эмбрионы заражали в аллантоисную полость 10-кратными серийными разведениями вируса – по 5 эмбрионов на разведение. Через 48 ч инкубации при 37°C зараженные куриные эмбрионы охлаждали в течение ночи при 4°C, после чего в аллантоисной жидкости каждого эмбриона оценивали наличие вируса в РГА с 0.75%-ной суспензией куриных эритроцитов. Среднее значение ЭИД₅₀ для каждого вируса вычисляли методом Рида и Менча (Reed & Muench) [17].

Кинетика накопления вирусов гриппа в куриных эмбрионах. Вирусосодержащей аллантоисной жидкостью (1000 ЭИД₅₀) заражали 10-дневные куриные эмбрионы (по пять эмбрионов на каждый временной интервал) и инкубировали при 37°C в течение 18, 24, 36 и 48 ч. По истечении каждого временного интервала эмбрионы охлаждали в течение ночи при 4°C, затем в аллантоисной жидкости каждого эмбриона определяли содержание вируса методом РГА.

Репродуктивная активность вирусов гриппа при различных температурах. Десятидневные куриные эмбрионы заражали в дозе 1000 ЭИД₅₀/эмбрион (по четыре эмбриона на каждую температурную точку) и инкубировали в термостате (“Binder”,

Германия) при температурах 33, 37 и 40°C в течение 48 ч. По истечении времени инкубации из каждого эмбриона отбирали аллантоисную жидкость и определяли содержание вируса методом РГА. Из проб, полученных при одинаковой температуре, готовили объединенную пробу, соединяя в равных объемах соответствующие аллантоисные жидкости. Объединенные пробы титровали по инфекционности (см. “Определение инфекционности вирусов гриппа на куриных эмбрионах”).

Анализ термостабильности гемагглютинина вирусов гриппа. Осветленную низкоскоростным центрифугированием вирусосодержащую аллантоисную жидкость разводили фосфатным буферным раствором до 128 ГАЕ и разливали по 120 мкл в 10 тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0.5 мл (“SSI”, США), 9 из которых термостатировали в термоциклере Master-cycler Gradient 5331 (“Eppendorf”, Германия) при разных температурах в диапазоне от 36.0 до 50.0°C в течение 40 мин, после чего немедленно переносили в лед. Контрольную пробу в это время (40 мин) хранили при температуре 0°C. По истечении инкубации титр вируса в каждом образце определяли методом РГА.

Определение патогенности вируса гриппа для мышей. Мышей линии BALB/c весом 8–10 г под легким эфирным наркозом заражали интраназально 10-кратными разведениями каждого вируса в дозах от 1 до 10⁶ ЭИД₅₀/мышь. Число мышей в каждой группе составляло 5 особей. За мышами наблюдали в течение 16 суток, осуществляя осмотр, взвешивание и подсчет выживших животных. Мышей квалифицировали как “инфицированные”, если в течение 5 суток их вес снижался до 90% и ниже от исходного. Значение 50%-ной инфекционной дозы (ID₅₀) и 50%-ной летальной дозы (LD₅₀) для каждого вируса вычисляли методом Рида и Менча (Reed & Muench) [17].

Статистическая обработка данных. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента, непараметрического критерия Фридмана (ANOVA) и Манна-Уитни. Критический уровень значимости *p* принимался равным 0.05. Для проведения соответствующих расчетов использовали такие программные средства, как MS Office Excel 2016 и Statistica 8.0. Полученные результаты представлены с помощью показателей описательной статистики: среднеарифметического значения и стандартного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение мутантных вирусов гриппа методом обратной генетики

Методом обратной генетики было получено 5 вариантов вируса гриппа H5N1. Первый вариант, RGVN, идентичен исходному вакцинному

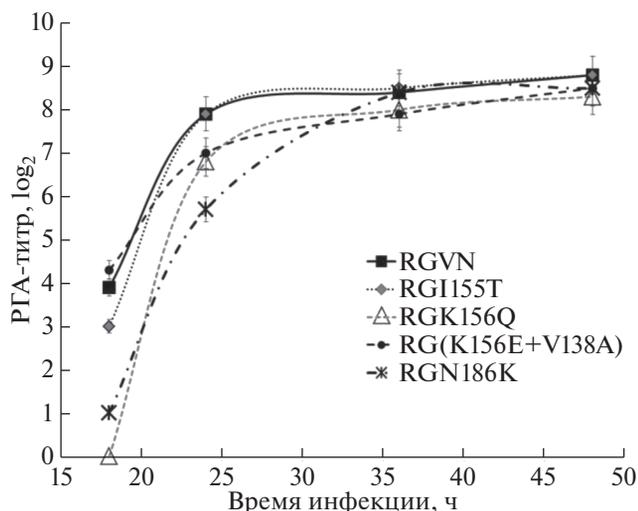


Рис. 1. Кинетика накопления HA-вариантов вируса гриппа А подтипа H5N1 в зараженных куриных эмбрионах при многоцикловой инфекции. Здесь и на следующем графике приведены средние значения со стандартным отклонением, рассчитанные на основе трех независимых экспериментов.

лась дополнительной заменой: K156E+V138A или K156E+T160A. Структура полученных мутантов подтверждена секвенированием.

Кинетика накопления вирусов гриппа в куриных эмбрионах

Накопление вирусов гриппа в куриных эмбрионах оценивали по титру в РГА через 18, 24, 36 и 48 ч после инфицирования [11]. К 48 часу инкубации все варианты достигали примерно одинаково высокого содержания вируса в аллантоисной жидкости, по-видимому, соответствующего предельному накоплению в данной системе культивирования. Для мутантов RGI155T и RG(K156E+V138A) кинетика накопления вируса мало отличалась от исходного вируса RGVN. Накопление вирусов RGK156Q и N186K происходило с отставанием, особенно выраженным для мутанта N186K (рис. 1). Таким образом, аминокислотные замены I155T, K156Q, K156E+V138A и N186K в вирусе гриппа H5N1 в разной степени влияли на его репликативную активность в куриных эмбрионах.

штамму VNH5N1-PR8/CDC-RG. В ген HA мутантов RGI155T, RGK156Q, RG(K156E+V138A) и RGN186K посредством сайтспецифического мутагена ввели мутации, приводящие к аминокислотным заменам в позициях 155, 156, 138 и 186 HA: I155T, K156Q, (K156E+V138A) и N186K соответственно. Не удалось получить мутант с единичной заменой K156E. В рекомбинантном вирусе эта мутация либо отсутствовала, либо сопровождалась

Термостабильность HA вирусов гриппа

При анализе термостабильности генно-инженерных мутантов обнаружены различия в температурном диапазоне инактивации HA исследуемых вариантов. У всех исследованных мутантов термостабильность была снижена по сравнению с исходным вирусом RGVN. Наиболее чувствительным к повышению температуры оказался вариант RGN186K (рис. 2). Таким образом, на осно-

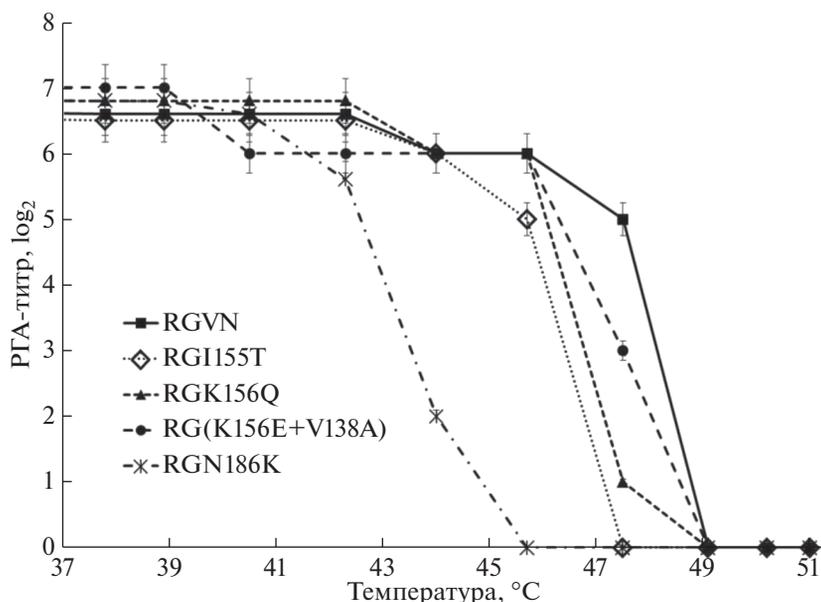


Рис. 2. Термостабильность HA исследуемых вариантов вируса гриппа А подтипа H5N1. По оси ординат указан титр вируса после 40 мин инкубации при указанных температурах.

вании результатов исследования гемагглютинирующей активности полученных мутантов вируса гриппа RGVN установлено, что аминокислотные замены в позициях 155, 156, (156 + 138) и 186 снижают термостабильность HA вируса гриппа H5N1.

Репродуктивная активность вирусов гриппа при различных температурах (RCT-признак)

Анализ RCT-признака показал, что все исследуемые варианты (включая исходный) наиболее эффективно размножаются при пониженной (33°C) температуре. Статистически значимых отличий для вирусов RGI155T и RG(K156E+V138A) от исходного вируса RGVN в уровне репликации при различных температурах не выявлено (табл. 1). С повышением температуры титр этих вариантов снижался. Наибольшее снижение инфекционного титра наблюдали для мутантов RGK156Q и RGN186K при температуре 40°C (0.7 lgЭИД₅₀) по сравнению с исходным вирусом RGVN. Таким образом, можно утверждать, что аминокислотные замены K156Q и N186K способствуют снижению репродуктивной активности вируса подтипа H5N1 при повышенной температуре (40°C).

Вирулентность вирусов гриппа для мышей

Вирулентность вариантов вируса гриппа H5N1 оценивали по изменению веса мышей и их выживаемости после интраназального инфицирования дозами от 1 до 10⁶ ЭИД₅₀/мышь. На основании динамики веса рассчитывали значение ID₅₀, а по выживаемости – LD₅₀ для каждого вируса. Наиболее вирулентным для мышей оказался исходный вирус RGVN; для него значения ID₅₀ и LD₅₀ были близкими и составляли примерно 10¹ ЭИД₅₀/мышь (табл. 2). У всех мутантных вариантов вирулентность была ниже (чем выше значение LD₅₀, тем ниже вирулентность). Так, у штамма RGN186K вирулентность снизилась на 4 порядка, замена K156Q также приводила к повышению LD₅₀ почти на 4 порядка. Такое сильное повышение LD₅₀ (то есть снижение летальности) этих двух штаммов, возможно, обусловлено наиболее выраженным снижением способности к росту при температуре 40°C и пониженной термостабильностью HA.

Скрининг вариантов H5 HA циркулирующих в природе вирусов гриппа

С целью установить, насколько часто исследованные нами аминокислотные замены встречаются в природных изолятах вирусов гриппа подтипа H5, мы провели скрининг HA вирусов гриппа подтипа H5 за последние 17 лет согласно сведениям из баз данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ge->

[nomes/FLU/Database/nph-select.cgi#mainform](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi#mainform)) и GISAID EpiFlu (<https://platform.gisaid.org>) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами исследовано влияние аминокислотных замен в молекуле HA вируса гриппа подтипа H5 на фенотипические свойства эскейп-мутантов (мутантов, резистентных к нейтрализующему действию того или иного моноклонального антитела) [12, 18]. Одно из проявлений эволюционной изменчивости высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 в процессе их адаптации к новому хозяину и/или условиям репродукции связано с изменениями HA в антигенных сайтах, рецептор-связывающем сайте (PСС), сайтах гликозилирования и нарезания¹ HA [19]. В преддверии возможной пандемии, вызванной вирусами гриппа подтипа H5, усилия ученых направлены на поиск мутаций, которые могут служить генетическими маркерами адаптации этих вирусов к млекопитающим и распространению среди людей.

В патологическом материале от людей, инфицированных вирусом гриппа H5N1, были обнаружены мутантные варианты HA (квазивиды), среди которых наиболее часто встречались мутации A138V, N186D, S227N, а также I155T, K156Q и N186K [13, 20]. Ранее мы детектировали мутации в этих позициях у эскейп-мутантов, полученных под воздействием моноклональных антител, и реадaptантов, полученных при пассировании низковирулентных эскейп-мутантов в легких мышей [9, 12, 21].

В этой работе методом сайтспецифического мутагенеза созданы варианты вируса с заменами I155T, K156Q, K156E+V138A и N186K в H5 HA при одинаковой структуре остальных генов и показано, что изменение фенотипических свойств этих вариантов обусловлено единичными мутациями в HA.

На трехмерной молекуле H5 HA аминокислоты в позициях 155 и 156 расположены в антигенном сайте 1, который соответствует антигенному сайту В молекулы HA подтипа H3 [22]. Рядом с ним находится PСС, который представляет собой углубление в глобулярной части HA, так называемый “рецепторный карман”. Аминокислоты в позициях 138, 155 и 186 находятся на поверхности молекулы HA и с разных сторон окаймляют рецепторный карман. Расположенная в пограничной зоне аминокислота 155 одновременно входит и в антигенный сайт, и в PСС [23]. Аминокислоты I38V и 186K, примыкающие к PСС, снижают связывание вирусов H5N1 с клеточными рецепторами птичьего типа (Neu5Acα2-3Gal) и повышают сродство к рецепторам человеческого типа

¹ Нарезание или расщепление HA на цепи HA1 и HA2 необходимо для активации инфекционного процесса в клетке.

Таблица 1. Репродукция в куриных эмбрионах вариантов вируса гриппа А подтипа H5N1 при различных температурах^a

Вирус	Аминокислотные замены в HA	lgЭИД ₅₀		
		33°C	37°C	40°C
RGVN	—	8.20 ± 0.10	8.00 ± 0.20	7.50 ± 0.20
RG1155T	I155T	8.65 ± 0.15	8.20 ± 0.20	7.20 ± 0.20
RGK156Q	K156Q	7.75 ± 0.25	7.00 ± 0.25	6.80 ± 0.20
RG(K156E+V138A)	K156E+V138A	8.65 ± 0.15	8.20 ± 0.20	7.55 ± 0.15
RGN186K	N186K	8.10 ± 0.20	7.75 ± 0.15	6.80 ± 0.20

^a Данные представлены как инфекционный титр вируса через 48 ч после заражения куриных эмбрионов. Результаты представлены как среднее значение ± SD, вычисленное на основании трех независимых экспериментов.

Таблица 2. Влияние аминокислотных замен в HA вируса гриппа RGVN на патогенность для мышей^a

Вирус	Аминокислотные замены в HA	lgID ₅₀	lgLD ₅₀
RGVN	—	0.90 ± 0.20	1.10 ± 0.10
RG1155T	I155T	2.00 ± 0.30	2.50 ± 0.20
RGK156Q	K156Q	1.00 ± 0.30	4.00 ± 1.00
RG(K156E+V138A)	K156E+V138A	1.00 ± 0.20	2.50 ± 0.40
RGN186K	N186K	4.00 ± 0.30	4.30 ± 0.40

^a Результаты представлены как среднее значение ± SD, вычисленное на основании двух экспериментов.

Таблица 3. Частота встречаемости аминокислотных замен в H5 HA среди природных изолятов вирусов гриппа, выделенных за период с 2003 по 2019 гг.

Год выделения	Аминокислотные замены, % ^a				
	I155T	K156Q	K156E	A138V ^b	N186K
2003	0 (0/137)	0 (0/137)	0.7 (1/137)	0.7 (1/137)	0 (0/137)
2004	1.2 (6/489)	0.4 (2/489)	0.6 (3/489)	1.0 (5/489)	0.2 (1/489)
2005	0.5 (4/749)	0.1 (1/749)	0 (0/749)	1.5 (11/749)	0.5 (4/749)
2006	1.4 (18/1326)	0.1 (1/1326)	0 (0/1326)	0.7 (9/1326)	0.3 (4/1326)
2007	2.5 (24/948)	0.5 (5/948)	0 (0/948)	0.6 (6/948)	0 (0/948)
2008	4.8 (27/561)	1.2 (7/561)	0.7 (4/561)	0.9 (5/561)	0.2 (1/561)
2009	16.4 (89/542)	0.2 (1/542)	1.8 (10/542)	1.1 (6/542)	0 (0/542)
2010	17.9 (114/638)	0.2 (1/638)	1.1 (7/638)	0.6 (4/638)	0 (0/638)
2011	22.2 (140/631)	0 (0/631)	0 (0/631)	0.3 (2/631)	0.3 (2/631)
2012	8.5 (35/410)	1.0 (4/410)	0 (0/410)	0.0 (0/410)	0 (0/410)
2013	17.7 (76/430)	0 (0/430)	0.9 (4/430)	0.2 (1/430)	0 (0/430)
2014	26.8 (219/818)	0.1 (1/818)	0.1 (1/818)	0.1 (1/818)	0 (0/818)
2015	43.6 (682/1564)	0 (0/1564)	0 (0/1564)	0.2 (3/1564)	0 (0/1564)
2016	46.5 (348/748)	0 (0/748)	0 (0/748)	0.0 (0/748)	0.1 (1/748)
2017	19.6 (113/576)	0 (0/576)	0 (0/576)	0.0 (0/576)	0 (0/576)
2018	10.8 (24/222)	0.5 (1/222)	0 (0/222)	0.5 (1/222)	0 (0/222)
2019	17.6 (3/17)	0 (0/17)	0 (0/17)	0.0 (0/17)	0 (0/17)

^a В скобках указано число последовательностей с указанной заменой/общее число вирусов подтипа H5 за указанный период.

^b Эта аминокислотная замена присутствует в исходном вирусе RGVN.

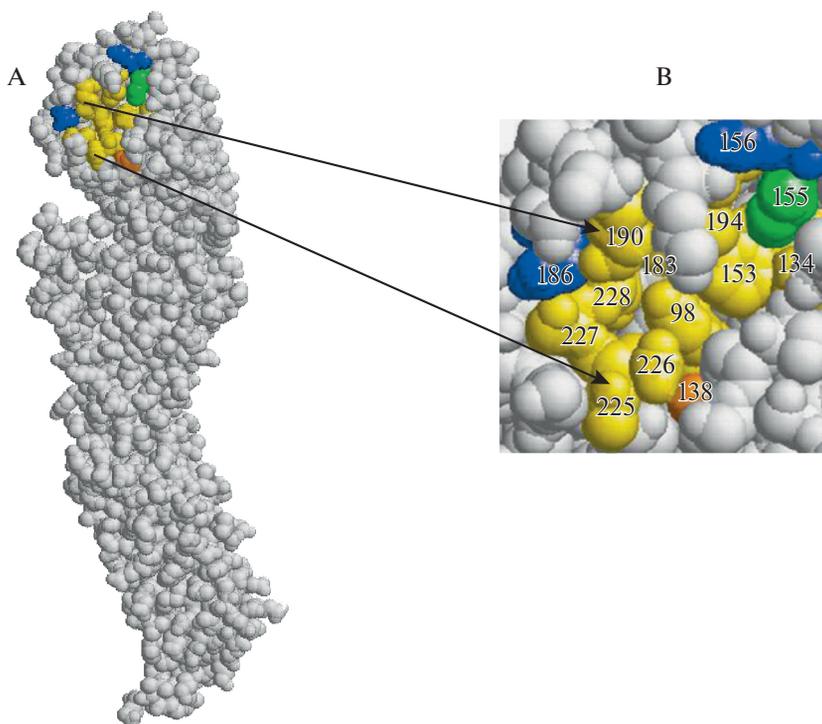


Рис. 3. Расположение исследованных аминокислотных замен на трехмерной структуре вируса гриппа A/Vietnam/1203/2004 (по материалам работы [28]). Позиции аминокислотных замен, относящихся к антигенному сайту В (в нумерации Н3), выделены синим цветом, РСС – желтым, одновременно сайт В и РСС – зеленым. Оранжевым цветом выделена позиция 138. Изображение получено с помощью программы RasMol (www.rasmol.org), структура молекулы Н5 взята из RCSB Proteine Data Bank (PDB ID 2FKO) ([DOI] (<https://doi.org/https://doi.org/10.2210/pdb2FKO/pdb>)).

(Neu5Ac α 2-6Gal) и могут считаться адаптационными [13, 20, 24–27] (рис. 3).

Необходимо отметить, что у подавляющего большинства вирусов гриппа подтипа Н5 (8514 последовательностей НА) в позиции 138 находится остаток аланина и только 12 природных изолятов Н5N1 высокопатогенной линии содержат замену А138V. Из них 11 вирусов выделено от людей в период с 2004 по 2010 гг., что подтверждает адаптационный характер мутации А138V [20]. Такую же мутацию А138V имеют все исследованные нами RG-мутанты, за исключением одного – RG(K156E+V138A), в котором сопутствующая мутация V138A возникла как возврат к дикому типу. По всей видимости, это произошло неслучайно и объясняет наши неудачные попытки получить RG-мутант с единичной заменой K156E. Ранее единичную мутацию K156E мы выявили только в эскейп-мутантах вируса VNH5N1-PR8/CDC-RG, НА которого в позиции 138 содержал остаток аланина (А138) [9]. К этому следует добавить, что попытка Аневаракул и др. [26] методом обратной генетики реконструировать вирус гриппа с единичной мутацией А138V в НА от A/Thailand/676/2005 (H5N1) и остальными генами от PR8 (H1N1) не увенчалась успехом – по мнению авторов, из-за несовместимости этой мутации с

остальными генами. В полученных мутантах замена А138V всегда сопровождалась дополнительной мутацией в НА.

По данным Naughtin с соавт. [27], вирусы гриппа с мутацией А138V в НА хорошо размножаются в куриных эмбрионах и в культуре клеток млекопитающих MDCK. По всей видимости, использованный нами исходный вирус RGVN, несущий в своем составе адаптационную мутацию А138V, имеет хорошо сбалансированную структуру, которая позволяет ему успешно размножаться в куриных эмбрионах. Внесенные мутации K156Q, K156E+V138A и N186K нарушают этот баланс, о чем свидетельствует снижение титра накопления вируса в первые 24 ч после заражения куриных эмбрионов (рис. 1). Показательно в этой связи существенное отставание в росте мутанта RGN186K, который помимо 138V несет замену N186K, переключающую рецепторную специфичность НА с “птичьего” типа на “человеческий”.

Выявленное нами снижение репродукции вируса при повышенной (40°C) температуре и термостабильности НА мутанта RGN186K совпадает с данными других авторов, которые в дополнение к этим свойствам показали, что единичная мутация N186K приводит к повышению сродства к рецепторам “человеческого” типа, повышенной ре-

пликации в культуре эпителиальных клеток дыхательного тракта человека и возрастанию значения рН (с 5.6 до 5.9) активации конформационного изменения HA – параметра, важного для проникновения вируса в клетку [13, 25]. Все эти признаки позволяют предположить, что замена N186K может способствовать переходу вирусов гриппа H5N1 к новому хозяину (млекопитающим). Но скорее всего, для этого события требуются дополнительные условия, что подтверждает авирулентность для мышей варианта RGN186K по сравнению с исходным вирусом RGVN (табл. 2) и крайне низкий процент встречаемости этой мутации (табл. 3).

Аминокислотная замена K156Q, как и мутация N186K, приводила к снижению термостабильности HA и репродукции при повышенной температуре (40°C) (рис. 2, табл. 1), ослаблению вирулентности для мышей (табл. 2). Позиция 156, расположенная в антигенном сайте, отличается полиморфизмом (известно 10 вариантов аминокислотных остатков) и отвечает за антигенную изменчивость HA. Репликативная активность и вирулентность вируса гриппа зависят от конкретной аминокислоты в этой позиции и природы вируса [29–31]. Мутация K156Q обнаружена в 24 природных вирусах гриппа H5N1, преимущественно выделенных от птиц. Самый ранний штамм с такой заменой – A/duck/Shantou/195/2001(H5N1) – был выделен от домашней утки в Китае и считается одним из первых предшественников высокопатогенных штаммов вируса гриппа H5N1, вызвавших эпизоотии в Юго-Восточной Азии в 2003 году [32]. Позднее (2004–2012 гг.) мутацию K156Q наблюдали в изолятах от кур в Таиланде, Индонезии и Индии, ворон (Индия, 2012 г.), в двух изолятах от людей в Египте (2008 и 2009 гг.) и от свиньи в Китае (2014 г.). Вирусы, выделенные в разных странах, принадлежат разным клатам гуангдонгской линии, то есть на протяжении последних 20 лет эволюции вирусов гриппа H5 зафиксированы только 3 случая присутствия этой мутации в вирусах гриппа млекопитающих. Маловероятно, что эта мутация способствует переходу вируса к млекопитающим.

Замена K156E приводит к изменению заряда аминокислоты с положительного на отрицательный, что ослабляет электростатическое взаимодействие между вирусом и клеточной поверхностью и способствует более успешному распространению вирусного потомства [29–31]. Мутант RG(K156E+V138A) успешно размножался в куриных эмбрионах во всем диапазоне исследованных температур, хотя его термостабильность была ниже, чем у исходного вируса RGVN (табл. 1); при этом вирулентность была снижена по сравнению с RGVN, но оставалась для мышей на достаточно высоком уровне. В природных изолятах не обнаружено сочетания замен 156E+138V, что в некото-

рой степени объясняет нашу неудачу в создании жизнеспособного рекомбинантного мутанта с такой комбинацией. Сочетание 156E+138A, как в мутанте RG(K156E+V138A), обнаружено в 18 природных изолятах от птиц, среди которых 12 вирусов относятся к гуангдонгской линии, а остальные – непатогенные вирусы гриппа с Американского континента и Южной Африки.

Мутация I155T приводит к снижению термостабильности HA, ослаблению вирулентности для мышей и существенно не влияет на репродукцию вируса в исследуемом диапазоне температур при сравнении с исходным вирусом (рис. 2, табл. 1). Замена I155T распространена в природе среди вирусов домашних и диких птиц, а также людей. Возникновение и закрепление этой мутации, скорее всего, обусловлено селекцией в условиях иммунного давления. Один из первых случаев упоминания (без комментариев) этой мутации в “человеческих” вирусах гриппа H5 встречается в работе Kongchanagul и др. [20]. При исследовании квазивидового разнообразия HA в разных органах пациентов, ставших жертвами птичьего гриппа H5N1 в Таиланде в 2004–2005 гг., мутацию I155T наблюдали только один раз в вирусном материале из легких больного на 17 сутки болезни. Из этого можно предположить, что мутация возникла под давлением иммунного ответа, сформировавшегося на поздних стадиях болезни (комментарий наш). За последние 10 лет (2010–2020 гг.) частота встречаемости замены I155T в HA вирусов гриппа, изолированных от людей, составляет 48.5%. Кстати, эта мутация присутствует в изоляте, выделенном от человека в Китае в 2018 году (GenBank, MK300699).

Обобщая результаты исследований единичных мутаций в HA, можно заключить, что мутации, меняющие антигенные свойства вируса гриппа A подтипа H5, могут обладать плейотропным эффектом. Мутация A138V обеспечивает высокую вирулентность, термостабильность и высокий уровень репродукции вируса в диапазоне температур от 33 до 40°C. Мутации I155T и K156E+V138A способствуют репродукции вируса при пониженной температуре 33°C с сохранением высокой вирулентности. Мутации K156Q и N186K приводят к ослаблению вирулентности и снижению репродуктивной способности вируса гриппа при 40°C.

Анализ частоты встречаемости этих мутаций в природных изолятах указывает на то, что мутации K156E/Q и N186K имеют мало шансов сохраниться в процессе эволюции, в отличие от мутации I155T, которая в наибольшей степени ответственна за антигенный дрейф HA. Мутации A138V и N186K носят адаптационный характер в вирусах гриппа млекопитающих.

По всей видимости, для формирования жизнеспособных, продолжительно циркулирующих но-

вых вариантов вирусов гриппа А подтипа Н5 необходимы не единичные мутации в НА, а, скорее всего, определенное сочетание нескольких мутаций в НА и/или других вирусных белках.

Написание данной работы не требовало специального финансирования.

Все процедуры, проведенные с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждений или принятой практике таких исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IRD Highly Pathogenic H5 Clade Classification Tool January 14, 2015. https://www.fludb.org/brcDocs/documents/IRD_H5_CLADE_SOP.pdf
2. Nuñez I.A., Ross T.M. (2019) A review of H5Nx avian influenza viruses. *Ther. Adv. Vaccines Immunother.* **7**, 1–15. <https://doi.org/10.1177/2515135518821625>
3. Wu H., Peng X., Xu L., Jin C., Cheng L., Lu X., Xie T., Yao H., Wu N. (2014) Novel reassortant influenza A (H5N8) viruses in domestic ducks, eastern China. *Emerg. Infect. Dis.* **20**(8), 1315–1318.
4. Bulter J., Stewart C.R., Layton D.S., Phommachanh P., Harper J., Payne J., Evans R.M., Valdeter S., Walker S., Harvey G., Shan S., Bruce M.P., Rootes C.L., Gough T.J., Rohringer A., Peck G.R., Fardy S.J., Karpala A.J., Johnson D., Wang J., Douangneun B., Morrissy G., Wong F.Y.K., Bean A.G.D., Bingham J., Williams D.T. (2016) A novel reassortant H5N6 influenza A virus from Lao People's Democratic Republic is highly pathogenic in chickens. *PLoS One.* **11**(9), e0162375.
5. Lee D.-H., Bertran K., Kwon J.-H., Swayne D.E. (2017) Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4. *J. Vet. Sci.* **18**(51), 269–280.
6. Bouvier N.M., Palese P. (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine.* **26**(Suppl. 4), D49–D53.
7. Александрова Г.И., Климов А.И. (1994) Живая вакцина против гриппа. Санкт-Петербург: Наука, 151 с.
8. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Varich N.L., Lipatov A.S., Smirnov Y.A., Govorkova E.A., Gitelman A.S., Lvov D.K., Webster R.G. (2002) Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *J. Gen. Virol.* **83**, 2497–2505.
9. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Govorkova E.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Krylov P.S., Webster R.G. (2007) Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* **81**, 12911–12917.
10. Rudneva I.A., Kushch A.A., Masalova O.V., Timofeeva T.A., Klimova R.R., Shilov A.A., Ignatieva A.V., Krylov P.S., Kaverin N.V. (2010) Antigenic epitopes in the hemagglutinin of Qinghai-type influenza H5N1 virus. *Viral. Immunol.* **23**(2), 181–187.
11. Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K. (1991) Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinin of influenza A viruses. *Virology.* **182**(2), 475–485.
12. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Bovin N.V., Ilyushina N.A. (2015) Pleiotropic effects of amino acid substitutions in H5 hemagglutinin of influenza A escape mutants. *Virus Res.* **210**, 81–89.
13. Watanabe Y., Arai Y., Daidoji T., Kawashita N., Ibrahim M.S., El-gendy E.E.-D., Hiramatsu H., Kubota-Koketsu R., Tokagi T., Okuo Y., Nakaya T., Suzuki Y., Ikuta K. (2015) Characterization of H5N1 influenza virus variants with hemagglutinin mutations isolated from patients. *mBio.* **6**(2), e00081-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00081-15>
14. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 6108–6113.
15. Шубладзе А.К., Гайдамович С.Я. (1964) Краткий курс практической вирусологии. М.: Медгиз, 379 с.
16. Ломакина Н.Ф., Садыкова Г.К., Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Боравлева Е.Ю., Иванов П.А., Прилипов А.Г., Гамбарян А.С. (2018) Три мутации в стеблевом участке гемагглютинаина влияют на рН слияния и патогенность вируса гриппа H5N1. *Молекуляр. биология.* **52**(6), 1029–1037.
17. Reed L.J., Muench H. (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hygiene.* **27**, 493–497.
18. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Krylov P.S., Ilyushina N.A., Kaverin N.V. (2013) Pleiotropic effects of hemagglutinin amino acid substitutions of H5 influenza escape mutants. *Virology.* **447**, 233–239.
19. Тимофеева Т.А., Асатрян М.Н., Альтштейн А.Д., Народицкий Б. С., Гинцбург А.Л., Каверин Н.В. (2017) Прогнозирование эволюционной изменчивости вируса гриппа А. *Acta Naturae.* **9**(3), 51–58.
20. Kongchanagul A., Suptawiwat O., Kanrai P., Uiprasertkul M., Puthavathana P., Auewarakul P. (2008) Positive selection at the receptor-binding site of haemagglutinin H5 in viral sequences derived from human tissues. *J. Gen. Virol.* **89**(Pt 8), 1805–1810. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/002469-0>
21. Крылов П.С., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Шилов А.А., Игнатьева А.В., Говоркова Е.А., Каверин Н.В. (2009) Аминокислотные замены в гемагглютинине вируса гриппа подтипа H5, влияющие на антигенную специфичность и вирулентность вируса. *Вопросы вирусологии.* **54**(5), 14–19.
22. Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В. (2012) Антигенная структура гемагглютинаина вируса гриппа. *Вопросы вирусологии (Приложение 1).* 148–158.
23. Гамбарян А.С., Матросович М.Н. (2015) Какие адаптационные изменения в гемагглютинине и нейраминидазе нужны для возникновения пандемического вируса гриппа из птичьего предшественника? *Биохимия.* **80**(7), 1039–1047.
24. Тимофеева Т.А., Садыкова Г.К., Руднева И.А., Боравлева Е.Ю., Гамбарян А.С., Ломакина Н.Ф., Мо-

- чалова Л.В., Бовин Н.В., Усачев Е.В., Прилипов А.Г. (2016) Изменения фенотипических свойств высокопатогенного вируса гриппа А подтипа H5N1, индуцированные точечными мутациями N186I и N186T в молекуле гемагглютинина. *Молекуляр. биология*. **50**(5), 855–862.
25. Chutinimitkul S., van Riel D., Munster V.J., van den Brand J.M., Rimmelzwaan G.F., Kuiken T., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., de Wit E. (2010) *In vitro* assessment of attachment pattern and replication efficiency of H5N1 influenza A viruses with altered receptor specificity. *J. Virol.* **84**(13), 6825–6833.
 26. Auewarakul P., Suptawiwat O., Kongchanagul A., Sangma C., Suzuki Y., Ungchusak K., Louisirirrotchanakul S., Lerdsamran H., Pooruk P., Thitithanyanont A., Pittayawonganon C., Guo C.-T., Hiramatsu H., Jampangern W., Chunsutthiwat S., Puthavathana P. (2007) An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J. Virol.* **81**(18), 9950–9955.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00468-07>
 27. Naughtin M., Dyason J.C., Mardy S., Sorn S., von Itzstein M., Buchy P. (2011) Neuraminidase inhibitor sensitivity and receptor-binding specificity of Cambodian clade 1 highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Anti-microb. Agents Chemother.* **55**(5), 2004–2010.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01773-10>
 28. Stevens J., Blixt O., Tumpey T.M., Taubenberger J.K., Paulson J.C., Wilson I.A. (2006) Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. **312**, 404–410.
 29. Katz J.M., Naeve C.W., Webster R.G. (1987) Host cell-mediated variation in H3N2 influenza viruses. *Virology*. **156**(2), 386–395.
 30. Kilbourne E.D., Taylor A.H., Whitaker C.W., Sahai R., Caton A. (1988) Hemagglutinin polymorphism as the basis for low- and high-yield phenotypes of swine influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 7782–7785.
 31. Gambaryan A.S., Matrosovich M.N., Bender C.A., Kilbourne E.D. (1998) Differences in the biological phenotype of low-yielding (L) and high-yielding (H) variants of swine influenza virus A/NJ/11/76 are associated with their different receptor-binding activity. *Virology*. **247**, 223–231.
 32. Wang J., Vijaykrishna D., Duan L., Bahl J., Zhang J.X., Webster R.G., Peiris J.S., Chen H., Smith G.J., Guan Y. (2008) Identification of the progenitors of Indonesian and Vietnamese avian influenza A (H5N1) viruses from southern China. *J. Virol.* **82**(7), 3405–3414.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02468-07>

THE EFFECT OF I155T, K156Q, K156E AND N186K MUTATIONS IN HEMAGGLUTININ ON THE VIRULENCE AND REPRODUCTION OF INFLUENZA A/H5N1 VIRUSES

T. A. Timofeeva^{1, *}, G. K. Sadykova¹, N. F. Lomakina¹, A. S. Gambaryan², I. A. Rudneva¹,
E. B. Timofeeva¹, A. A. Shilov¹, E. Y. Boravleva², M. M. Zhuravleva¹,
P. A. Ivanov¹, E. L. Ryazanova^{1, 3}, and A. G. Prilipov¹

¹*Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

²*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819 Russia*

³*Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru

The continued circulation of influenza A viruses subtype H5 can cause the emergence of new pandemic dangerous virus variants which can be transmitted from person to person. The occurrence of such variants is mainly related to mutations in hemagglutinin (HA). Previously we discovered mutations in H5N1 influenza virus hemagglutinin, which help the virus to escape from immune response. The purpose of this work was to study the role of these mutations in changing other characteristics of the virus, excluding antigenic, and their ability to be maintained in the viral population. Mutations were introduced into the gene *HA* of recombinant H5N1 influenza A virus (VNH5N1-PR8/CDC-RG) with using site-specific mutagenesis. Virus variants obtained were investigated and compared by replication kinetics in chicken embryos, thermostability, reproductive activity at various temperatures (33, 37 и 40°C) and virulence for mice. The amino acid substitutions I155T, K156Q, K156E+V138A, N186K led to decrease in thermal stability, replication activity of the mutant viruses in chicken embryos and virulence for mice, although these effects differed between the variants. K156Q and N186K mutations reduced the virus reproductive activity at elevated temperature (40°C). The analysis of a frequency of these mutations in natural isolates of H5N1 influenza viruses indicated that the K156E/Q and N186K mutations have a little chance to gain a foothold during evolution, in contrast to I155T mutation, which is most responsible for antigenic drift. Mutations A138V and N186K seem to be adaptive in mammalian viruses.

Keywords: influenza A virus, H5 hemagglutinin, amino acid substitutions, site-specific mutagenesis, phenotypic properties, reverse genetics