

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Кост В.Ю., Сухова О.А., Аكوпова И.И., Горбачёва Е.О., Лисовская К.В.,
Ртищев А.А., Маркушин С.Г.

ВКЛЮЧЕНИЕ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В PB1-ГЕН ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА A/WSN/33 (H1N1) ВИРУСА ГРИППА А МЕНЯЕТ ЕГО ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 115088, г. Москва, Россия

Цель – изучение изменений фенотипических характеристик вирулентного штамма A/WSN/33 вируса гриппа А под влиянием включения сайт-специфических мутаций в его PB1-гене.

Материалы и методы. С помощью двухступенчатой полимеразной цепной реакции в PB1-гене штамма A/WSN/33(H1N1) были включены ts-мутации, взятые из генома холодоадаптированных (ХА) штаммов – доноров аттенуации А/Энн Арбор/6/60 (H2N2), А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/Краснодар/101/35/59 (H2N2). Исследовали ts- и att-фенотип полученных сайт-специфических мутантов, иммуногенность, а также снижение массы тела у инфицированных мышей.

Результаты. Показано, что включение ts-мутаций из генома ХА штаммов – доноров аттенуации в PB1-ген вирулентного штамма A/WSN/33 (H1N1) приводит к различным изменениям его фенотипических характеристик.

Обсуждение. Анализ генома ХА штаммов – доноров аттенуации вируса гриппа указывает на исключительно важное значение функциональных дефектов в PB1-белке для формирования аттенуационного фенотипа вируса.

Заключение. Технологию сайт-специфического мутагенеза можно использовать для модификации PB1-гена вирулентного штамма вируса гриппа А с целью конструирования живых гриппозных вакцин нового поколения.

Ключевые слова: вирус гриппа А; аттенуация; холодоадаптированные штаммы – доноры аттенуации; сайт-специфический мутагенез; ts-фенотип; att-фенотип; иммуногенность.

Для цитирования: Кост В.Ю., Сухова О.А., Аكوпова И.И., Горбачёва Е.О., Лисовская К.В., Ртищев А.А., Маркушин С.Г. Включение сайт-специфических мутаций в PB1-ген вирулентного штамма A/WSN/33 (H1N1) вируса гриппа А меняет его фенотипические характеристики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6): 21-29. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-21-29>

Kost V.Yu., Sukhova O.A., Akopova I.I., Gorbacheva E.O., Lisovskaya K.V.,
Rtishchev A.A., Markushin S.G.

INCLUSION OF SITE-SPECIFIC MUTATIONS IN THE PB1-GENE OF A VIRULENT A/WSN/33 (H1N1) STRAIN OF INFLUENZA A VIRUS CHANGES ITS PHENOTYPIC CHARACTERISTICS

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 115088, Russia

Aim. Study of changes in the phenotypic characteristics of the virulent A/WSN/33 (H1N1) strain of influenza A virus under the influence of the inclusion of site-specific mutations in the PB1-gene of this strain.

Materials and methods. Using a two-step polymerase reaction in the PB1 gene of A/WSN/33 (H1N1) strain were included ts mutations taken from the genome of attenuated CA donors-strains: A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/Leningrad 134/17/57 (H2N2) and A/Krasnodar/101/35/59. Ts-phenotype, att-phenotype, immunogenicity, as well as weight loss in mice infected with these mutants were studied in the obtained site-specific mutants.

Results. It was shown that the inclusion of ts mutations from the genome of CA donors-strains of attenuation in the PB1 gene of the virulent A/WSN/33 (H1N1) strain leads to a change in the phenotypic characteristics of this strain to different degrees.

Для корреспонденции: Маркушин Станислав Георгиевич, д-р мед. наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 115088, г. Москва. E-mail: s.g.markushin@rambler.ru

Discussion. Analysis of the genome of CA strains- donors of attenuation of influenza virus indicates the crucial importance of the presence of functional defects in the PB1-protein for the formation of the attenuation phenotype of the virus.

Conclusion. The technology of site-specific mutagenesis can be successfully used to modify the PB1 gene of a virulent influenza A virus strain in order to construct a new generation of live influenza vaccines.

Keywords: *influenza virus; cold-adapted (CA) strains-donors of attenuation; site-specific mutagenesis; ts- phenotype; att-phenotype; immunogenicity.*

For citation: Kost V.Yu., Sukhova O.A., Akopova I.I., Gorbacheva E.O., Lisovskaya K.V., Rtishchev A.A., Markushin S.G. Inclusion of site-specific mutations in the PB1-gene of a virulent A/WSN/33 (H1N1) strain of influenza A virus changes its phenotypic characteristics. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6): 21-29. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-21-29>

For correspondence: Stanislav G. Markushin, Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, the Head of Laboratory of RNA-viruses genetics. I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 115088, Russia. E-mail: s.g.markushin@rambler.ru

Information about authors:

Kost V.Y., <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

Sukhova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5299-003X>

Akopova I.I., <https://orcid.org/0000-0003-1795-4356>

Gorbacheva E.O., <https://orcid.org/0000-0002-4347-1684>

Lisovskaya K.V., <https://orcid.org/0000-0002-5119-877X>

Rtishchev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Markushin S.G., <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

Acknowledgments. This study was financially supported by I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 11 July 2019

Accepted 24 September 2019

Введение

Использование генно-инженерных подходов при получении гриппозных живых вакцин значительно расширяет возможности их конструирования. В последнее время значительный интерес среди исследователей вызывает генно-инженерный подход, предполагающий прямое включение заранее изученных и охарактеризованных мутаций, взятых из геномов холодаадаптированных (ХА) штаммов – доноров аттенуации, в геном вирулентного штамма вируса гриппа с целью его трансформации в аттенуированный вакцинный вариант. Эта стратегия теоретически должна обеспечить лучшую иммунную защиту по сравнению с используемыми в настоящее время реассортантными живыми гриппозными вакцинами на базе стандартных ХА доноров аттенуации.

Цель данной работы – изучение изменений фенотипа вирулентного штамма А/WSN/33 вируса гриппа под влиянием включения в его геном отдельных ts-мутаций, локализованных в PB1-гене ХА штаммов – доноров аттенуации.

Данные литературы в последнее время свидетельствуют о том, что использование технологии сайт-специфических мутаций может значительно продвинуть разработку живых гриппозных вакцин как в медицине, так и в ветеринарии. Вместе с тем прогресс в этой области обозначил наличие серьёзных нерешённых проблем. Согласно данным литературы, основным источником сайт-специфических ts-мутаций является ХА штамм А/Энн Арбор/6/60, полученный д-ром Х. Маассабом более полувека назад [1]. Три мутации из PB1-гена данного штамма (K391E, E581G, A661T), одна мутация из PB2-гена (N265S) и одна из NP-гена (D34G) составляют стандартный набор для модификации генома подавляющего количества вирулентных штаммов вируса гриппа человека, животных и птиц [2–5]. Однако использование этого набора мутаций не позволяет полностью аттенуировать не только пандемический штамм, но и некоторые вирулентные сезонные варианты вируса гриппа человека [2, 3]. Для полной аттенуа-

ции пандемического штамма NY-1681 (H1N1) потребовалось включение 7 ts-мутаций в PB1- и PB2-гены, включая ts-мутации из генома штамма А/Энн Арбор/6/60 [6].

По данным литературы, включение сайт-специфических мутаций даже в геном серологически близкородственного вируса не всегда бывает удачным. В этой связи для получения новых вакцинных гриппозных штаммов целесообразно увеличить арсенал аттенуирующих мутаций и провести сравнительное исследование ts-мутаций, взятых из генома других ХА штаммов вируса гриппа человека. В России в течение многих лет в качестве донора аттенуации для живых гриппозных вакцин используется ХА штамм А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [7–9]. Генетические детерминанты, ответственные за аттенуацию этого штамма, главным образом сосредоточены в PB1-гене (K265N, V591I) и PB2-гене (V478L). В другом недавно полученном ХА штамме А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) ts-мутация, ответственная за ts-фенотип, локализована в PB1-гене (I147T) [10]. Потенциал данных ts-мутаций, а также ts-мутаций в PA- и NP-генах этих штаммов в плане влияния на модификацию фенотипических характеристик вирулентных штаммов вируса гриппа изучен достаточно поверхностно. Исследования в этом направлении дали бы возможность сравнить эффективность описанных выше мутаций, а также расширить арсенал сайт-специфических мутаций, что весьма полезно для дальнейшего конструирования живых гриппозных вакцин. Основной мишенью для включения сайт-специфических мутаций остаются гены, кодирующие белки полимеразного комплекса, состоящего из трёх субъединиц: PB1, PB2 и PA. В данной работе мы попытались провести сравнительное исследование аттенуационного потенциала отдельных ts-мутаций, локализованных в PB1-гене отечественных ХА штаммов-доноров А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и канонического штамма А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) при включении в их геном гетерологичного вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1).

Материалы и методы

Вирусы. В работе был использован генно-инженерный штамм А/WSN/33, полученный методом обратной генетики с помощью набора плазмид рНW2000 [11], содержащих отдельные гены данного вируса.

Куриные эмбрионы (КЭ). Все использованные в работе сайт-специфические мутанты поддерживали путём пассажей в 10–11-дневных КЭ. Активность репродукции вирусов гриппа оценивали по результатам титрования в КЭ, инкубированных при 34, 37, 38 и 39 °С, и выражали в RCT (reproductive capacity at different temperatures). $RCT_{39} = (\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 34 \text{ °С} - \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 39 \text{ °С})$. Вирусы считали температурочувствительными (ts-фенотип), если $RCT_{39} > 5,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$.

Культуры клеток. В опытах по трансфекции использовали клетки НЕК293Т и линию клеток MDCK, полученных из Института Пастера (Франция). Все клетки выращивали при 37 °С в CO₂-инкубаторе.

Мутагенез. Для генно-инженерных работ с вирусом гриппа штамма А/WSN/33 (H1N1) использовали 8-плазмидную трансфекционную систему на основе вектора рНW2000. Каждая из 8 плазмид содержала соответствующий ген вируса гриппа, фланкированный необходимыми регулируемыми элементами для сборки вируса на клеточной культуре при трансфекции [11].

Мутагенез PB1-гена проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) за 2 раунда. Для ПЦР использовали стандартный протокол по набору реактивов Tersus PCR Kit (кат. номер PK021). Для контроля длины ПЦР продукта проводили аналитический фореуз в 1,5% агарозном геле с добавлением буфера ТАЕ. Клонирование проводили с помощью так называемой Golden Gate реакции [12]: совмещение рестрикции-лигирования вставки с вектором в одной реакции. Для этого была получена линейная форма вектора рНW2000 с помощью ПЦР с праймеров, на 5'-концах которых находились сайты рестрикции BsmBI. Реакцию Golden Gate ставили в 10 мкл. Использовали рестриктазу Esp3I (BsmBI) (Fermentas/ThermoScientific), которую добавляли до 0,25 ед./мкл, 10× Fermentas Tango Buffer, T4 ДНК лигаза (Сибэнзим, Россия) до 5 ед./

мкл, дитиотреитол до 1 mM, АТФ до 1 mM и линейный вектор со вставкой по 50 нг (молярное соотношение вектор/вставка = 1/3). Реакцию проводили в амплификаторе с программой: 15 циклов каждый по 5 мин при 37 °C и 5 мин при 17 °C.

Трансформацию проводили на рубидиевых компетентных бактериальных клетках (комп. $10^{7.0}$) штамма DH5a. После разморозки во льду к клеткам добавляли ½ часть лигазной смеси. Далее суспензию клеток инкубировали 1 ч во льду, проводили «хит шок» (2 мин при 42 °C на водяной бане), инкубировали во льду 2 мин, добавляли среду LB без антибиотика и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Клетки высевали на чашки Петри с 1,5% агаром и средой LB с ампициллином (200 мкг/мл), инкубировали 16 ч при 37 °C. Скрининг удачных клонов, в которых плазида содержала вставку нужной длины, проводили при помощи ПЦР с последующим электрофоретическим анализом. Контроль нуклеотидной последовательности осуществляли с помощью секвенирования.

Для выделения плазмиды из бактериальных клеток использовали Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (кат. номер K0503). Концентрацию и чистоту (отношение 260/280 $\geq 1,8$) измеряли на «NanoDrop 2000».

Рекомбинантная ДНК и обратнo-генетические методы. В экспериментах использовали плазмиду pHW2000 [11], разработанную для получения вируса гриппа методом обратной генетики. Плазида pHW2000, а также плазмиды со вставками генов штамма вируса гриппа A/WSN/33 были любезно предоставлены д-ром Р. Вебстером (Мемфис, США). Для накопления плазмид использовали штамм *E. coli* DH5alpha.

Накопление и концентрирование вирусов. Вирусы накапливали в КЭ по стандартной методике. Для последующего выделения РНК вирусы концентрировали центрифугированием.

Выделение вирусной РНК. Для последующей постановки ПЦР выделяли вирусную РНК при помощи набора для выделения РНК из плазмы и сыворотки крови (ООО «Лаборатория Изоген», Москва).

Полимеразная цепная реакция в обратной транскрипции. Обратную транскрипцию ставили отдельно от ПЦР при помощи ревертазы М-MuLV (НПО «СибЭнзим», Новосибирск) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР ставили с высокоточной полимеразой Tersus (ЗАО «Евроген», Москва) в соответствии с рекомендациями производителя. Очистку полученных ПЦР-продуктов из легкоплавкой агарозы осуществляли при помощи набора (Thermo Fisher Scientific, США).

Клонирование в E. coli. Опыты по клонированию (работа с бактериями, рестрикция, лигирование и т.п.) проводили по стандартным методикам или в соответствии с рекомендациями производителя для соответствующих ферментов (T4 ДНК лигаза, рестриктазы Esp3I и Eco31I).

Секвенирование вставок в полученных плазидах проводило ЗАО «Евроген» на автоматическом секвенаторе «MegaBACE-500».

Трансфекцию проводили при помощи реагента Lipofectamine LTX (Invitrogen, США) либо в кокультуре клеток 293Т и MDCK, либо в однодневном монослое клеток 293Т (плотность клеточного монослоя около 70%) в соответствии с методическим протоколом, прилагаемым к реагенту Lipofectamine LTX.

Репродукция вирусов в лёгких мышей. Изучали att-фенотип по следующей методике: группы самок беспородных мышей (по 5 голов на группу) инфицировали интраназально под лёгким эфирным наркозом анализируемыми вирусами в инфекционном титре $10^{5.0}$ ЭИД₅₀ (в дозе 50 мкл на мышью). Через 72 ч мышью усыпляли и извлекали лёгочную ткань. Из лёгочной ткани готовили 10% суспензию в ступках с тёртым стеклом. Инфекционный титр вируса в 10% суспензии лёгких определяли в КЭ и выражали в Ig ЭИД₅₀/0,2 мл. Все реассортанты были исследованы в трёх независимых опытах.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программы Excel. Измерения проводили в трёх пробах, подсчитывали среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD). Данные представляли как $M \pm SD$. Достоверность различий оценивали с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты

Сравнительное изучение *ts*-фенотипа вариантов штамма А/WSN/33 вируса гриппа, имеющих сайт-специфические мутации в гене *PB1*. *Ts*-маркёр является важнейшим маркёром аттенуации для штаммов – кандидатов в живые гриппозные вакцины. Поэтому на первом этапе был исследован данный генетический признак у полученных сайт-специфических мутантов. Как видно из данных **табл. 1**, включение мутаций из *PB1*-гена ХА штаммов – доноров аттенуации в геном вирулентного штамма А/WSN/33 приводило к снижению или к резкому снижению размножения при повышенной температуре (38–39 °С). Следует отметить, что выраженность *ts*-фенотипа сайт-специфических мутантов варьировала в широком диапазоне в зависимости от включения *ts*-мутаций из *PB1*-гена того или иного ХА штамма – донора аттенуации и количества включённых мутаций. Так, включение единичных *ts*-мутаций К391Е, Е581G, Е457D или А661Т из *PB1*-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) в геном исходного вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) приводило к незначительному изменению *ts*-фенотипа вируса. С другой стороны, включение большего количества *ts*-мутаций из *PB1*-гена ХА штаммов А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) вызывало резкое снижение способности вируса реплицироваться при температуре 39 °С. Включение единичных *ts*-мутаций из генома ХА штамма А/Ленинград/134/17/57 в геном штамма А/WSN/33 также вызывало недостаточно глубокое изменение *ts*-фенотипа вирулентного штамма. Однако совместное включение двух мутаций из *PB1*-гена А/Ленинград/134/17/57 в геном штамма А/WSN/33 приводило к резкому падению размножения вирулентного штамма в КЭ при 38–39 °С. Интересно отметить, что единичная *ts*-мутация из *PB1*-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) при включении в геном штамма А/WSN/33 (H1N1) способствовала резкой утрате способности к размножению вируса-реципиента в КЭ при непермиссивных условиях. Следует отметить, что субъединица *PB1* содержит каталитический центр полимеразного комплекса, что делает структуру данного белка более ригидной. Это обстоятельство затрудняет включение *ts*-мутаций из генома разных ХА штаммов – доноров аттенуации. Многократные попытки включить в *PB1*-ген штамма А/WSN/33 (H1N1) *ts*-мутации из разных ХА штаммов – доноров аттенуации были безуспешными.

Изучение вирулентности полученных сайт-специфических мутантов для мышей. Анализ вирулентности исследованных трансфектантов для мышей свидетельствует о

Таблица 1

Изучение *ts*-фенотипа трансфектантов на базе штамма А/WSN/33, содержащих сайт-специфические мутации в *PB1*-гене

Исходный вирус и трансфектант	Титр вируса в куриных эмбрионах при разной температуре инкубации (lg ЭИД ₅₀ /0,2 мл)			
	34 °С	37 °С	38 °С	39 °С
А/WSN/33	6,5 ± 0,5	6,5 ± 0,5	6,25 ± 0,4	6,25 ± 0,4
№ 1 А/Энн Арбор/6/60* (К391Е, Е581G, Е457D**)	6,5 ± 0,32	4,5 ± 0,74	2,5 ± 0,5	2,0 ± 0,2
№ 2 А/Ленинград/134/17/57 (К265N, V591I)	6,5 ± 0,4	5,0 ± 0,25	2,5 ± 0,2	< 1,0
№ 3 А/Краснодар/101/35/59 (I147T)	6,5 ± 0,5	4,0 ± 0,7	2,0 ± 0,5	< 1,0
№ 4 А/Энн Арбор/6/60 (Е581G)	6,75 ± 0,25	6,5 ± 0,25	5,5 ± 0,75	4,5 ± 0,5
№ 5 А/Энн Арбор/6/60 (К391Е)	6,5 ± 1,0	6,5 ± 0,5	5,0 ± 0,56	4,0 ± 0,4
№ 6 А/Энн Арбор/6/60 (Е457D)	7,0 ± 0,2	7,0 ± 1,0	5,5 ± 0,32	4,5 ± 1,0
№ 7 А/Ленинград/134/17/57 (К265N)	7,0 ± 0,5	7,0 ± 0,25	5,0 ± 0,4	3,5 ± 0,4
№ 8 А/Ленинград/134/17/57 (V591I)	7,0 ± 1,0	6,5 ± 0,25	6,0 ± 0,5	5,5 ± 0,75
№ 9 А/Энн Арбор/6/60 (А661Т)	7,0 ± 1,0	7,0 ± 0,75	6,5 ± 0,56	5,5 ± 1,0

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: * – название ХА штамма, из генома которого были использованы мутации; ** – в скобках указано количество мутаций и их локализация в *PB1*-белке трансфектанта.

том, что включение ts-мутаций из PB1-гена ХА штаммов в геном вирулентного штамма А/WSN/33 приводит к снижению вирулентности данного штамма. В частности, как видно из данных **табл. 2**, включение двух ts-мутаций из PB1-гена ХА штаммов А/Ленинград/134/17/57 (K265N, V591I) или одной ts-мутации из PB1-гена (I147T) штамма А/Краснодар/101/35/59 в геном штамма А/WSN/33 значительно подавляло размножение этого штамма в лёгких мышей. С другой стороны, в лёгких мышей, инфицированных трансфектантами № 4 или 5, унаследовавшими единичные мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, наблюдалось сниженное, но заметное размножение вируса. Как видно из наших данных, включение единичных ts-мутаций из PB1-гена ХА штаммов в геном вирулентного штамма А/WSN/33, как правило, незначительно снижает его вирулентность. Исключением является ts-мутация I147T из PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59. Включение этой мутации в геном вирулентного штамма А/WSN/33 значительно подавляло размножение вируса в лёгких мышей. Интересно отметить, что при заражении мышей реассортантом между ХА штаммом А/Краснодар/101/36/59 и штаммом А/WSN/33, который содержал мутантный PB1-ген от штамма А/Краснодар/101/35/59, наблюдалось более заметное подавление размножения вирулентного вируса в лёгких, при одинаковой дозе интраназального заражения (**см. табл. 2**). Данное явление можно рассматривать как влияние фенотипического окружения на проявление эффекта мутации.

Изучение иммуногенности сайт-специфических мутантов. Проведён сравнительный анализ способности отдельных сайт-специфических мутантов индуцировать гуморальный иммунитет у мышей в ответ на интраназальное заражение. В качестве объектов изучения были выбраны трансфектант № 1, имеющий в геноме 3 мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, трансфектант № 2, унаследовавший 2 мутации из PB1-гена ХА штамма А/Ленинград/134/17/57, и трансфектант № 3 с единичной мутацией в геноме из PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59. Исследование гуморального ответа было проведено с целью оценить иммуногенность вирусов, реплицирующихся в пределах верхнего респираторного тракта мышей. Как видно из **табл. 3**, наивысший титр гуморальных антител (1 : 1280) был обнаружен у мышей, иммунизированных трансфектантом № 1, содержащим в геноме мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60. Этот факт можно было объяснить размножением остаточного вируса в лёгких мышей. Трансфектанты № 2 и 3, содержащие в геноме ts-мутации из PB1-гена ХА штаммов А/Ленинград/134/17/57 и А/Краснодар/101/35/59, при интраназальной иммунизации мышей индуцировали умеренный уровень гуморального иммунного ответа (1 : 320, 1 :

Таблица 2

Изучение att-фенотипа трансфектантов на базе штамма А/WSN/33, содержащих сайт-специфические мутации в PB1-гене

Исходный вирус и трансфектанты	Титр вируса в лёгких мышей (lg ЭИД ₅₀ /1,0 г лёгочной ткани)
А/WSN/33	5,3 ± 0,4
№ 1 А/Энн Арбор/6/60* (K391E, E581G, E457D**)	2,5 ± 0,4
№ 2 А/Ленинград/134/17/57 (K265N, V591I)	2,5
№ 3 А/Краснодар/101/35/59 (I147T)	< 1,0
№ 4 А/Энн Арбор/6/60 (E581G)	3,5 ± 0,4
№ 5 А/Энн Арбор/6/60 (K391)	4,5 ± 0,4
№ 7 А/Ленинград/134/17/57 (K265N)	2,5 ± 0,5
№ 8 А/Ленинград/134/17/57 (V591I)	4,0 ± 1,0
Реассортант А/Краснодар/101/35/59 х А/WSN/33, имеющий мутантный PB1-ген от штамма А/Краснодар/101/35/59	1,3 ± 0,3

160). Важно отметить, что в сыворотке крови иммунизированных мышей наблюдались антитела, способные реагировать с дрейфовыми вариантами.

Изучение весовых характеристик мышей, инфицированных интраназально вариантами штамма А/WSN/33 вируса гриппа, содержащими сайт-специфические мутации в гене PB1. Как показано на **рисунке**, у мышей, инфицированных интраназально вариантами штамма А/WSN/33, содержащими в гене PB1 сайт-специфические мутации, унаследованные от различных ХА штаммов – доноров аттенуации, наблюдались различные темпы снижения массы тела. У мышей, инфицированных исходным вирулентным штаммом А/WSN/33, отмечено быстрое и значительное снижение массы тела (20–25%) к 6-му или 7-му дню с момента заражения. Масса тела мышей, инфицированных трансфектантом, имевшем в PB1-гене 3 мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 (K391E, E581G, E457D), не снижалась столь значительно. Наблюдалось снижение массы тела в пределах 10–12%. Этот факт свидетельствует о том, что наличие трёх мутаций из пяти, формирующих ts-фенотип ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 в геноме вирулентного штамма А/WSN/33, значительно снижает его вирулентный потенциал. Трансфектанты, имеющие в PB1-гене единичные мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, по динамике снижения массы тела занимали среднее положение между трансфектантом с тремя мутациями из ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 и исходным вирулентным штаммом А/WSN/33. Интересно отметить, что у мышей, инфицированных трансфектантом, имеющим в PB1-гене только одну мутацию Pе147Thг из PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), отмечено наименьшее снижение массы тела на протяжении всего срока наблюдения: не более 3–5% на 7–8-е сутки. Минимальное снижение массы тела наблюдалось и у мышей, инфицированных трансфектантом, содержащем в геноме две ts-мутации из PB1-гена ХА штамма А/Ленинград/134/17/59 (K265N, V591I). Как видно из наших данных, интенсивность уменьшения массы тела у животных не коррелировала с количеством мутаций, включённых в геном вирулентного штамма.

Обсуждение

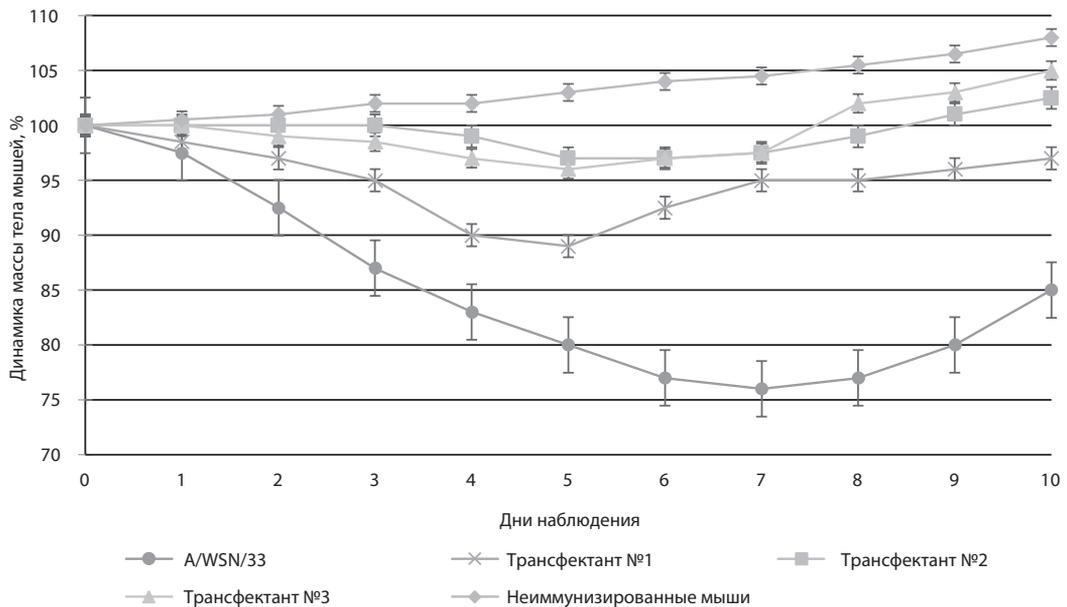
Согласно данным литературы, PB1-белок функционирует в качестве полимеразной каталитической субъединицы, вовлечённой в элонгацию вирусспецифической РНК [13]. Он включает консервативные мотивы и субдомены («пальцы» и «ладонь»), характерные для РНК-зависимых РНК-полимераз, ассоциированных с промоторными последовательностями вирионной и комплементарной РНК. Первые 15 аминокислотных остатков PB1-белка связаны с С-концевым доменом PA-белка. Внешняя поверхность субдоменов («пальцы» и «ладонь») PB1-белка тесно примыкает к линкерной последовательности PA-белка (аминокислотные последовательности 197–257), формируя многочисленные гидрофобные и полярные взаимодействия [14]. Специфическая область PB1-белка взаимодействует с N-концевым доменом PB2-белка. Каталитический центр PB1-белка содержит три консервативных аминокислотных остатка (Asp 305, Asp 444,

Таблица 3

Изучение иммуногенности трансфектантов на базе штамма А/WSN/33, содержащих сайт-специфические мутации в PB1-гене

Трансфектанты	Титр сывороточных антител в РЗГА*** при взаимодействии вирусов с антисыворотками		
	антигены		
	А/WSN/33	А/Брисбен/07	А/Калифорния/09
№ 1 А/Энн Арбор/6/60* (K381E, E581G, E457D**)	1 : 1280	1 : 40	< 1 : 10
№ 2 А/Ленинград/134/ 17/57 (K265N, V591I)	1 : 320	1 : 40	< 1 : 10
№ 3 А/Краснодар/101/35/59(I147T)	1 : 160	1 : 40	< 1 : 10

Примечание. *** РЗГА – реакция задержки геммагглютинирующей активности.



Динамика снижения массы тела мышей, инфицированных штаммом A/WSN/33 и трансфектантами № 1, 2, 3 на базе этого штамма, содержащими мутации в PB1-гене.

Группы самок беспородных мышей (по 5 голов в каждой) инфицировали интраназально под лёгким эфирным наркозом анализируемыми вирусами в инфекционном титре $10^{5.0}$ ЭИД₅₀ (в объёме 50 мкл на мышь). Массу тела мышей измеряли ежедневно и рассчитывали в процентах от массы тела каждого животного в день заражения (0-й день). По оси абсцисс – дни наблюдения; по оси ординат – снижение массы тела мышей в процентах от массы тела каждого животного в день заражения (0-й день).

Asp 445), связанных с двумя ионами двухвалентных металлов, важных для синтеза вирусспецифической РНК [15].

Анализ генома ХА штаммов – доноров аттенуации вируса гриппа свидетельствует о постоянном наличии ts-мутаций в различных доменах PB1-гена в этих штаммах, что указывает на исключительно важное значение функциональных дефектов в PB1-белке для формирования аттенуационного фенотипа вируса [4, 7, 10, 16]. В этой связи изучение возможности включения ts-мутаций из генома различных ХА штаммов в PB1-ген вирулентного штамма с целью его аттенуации представляет теоретический и практический интерес. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что включение ts-мутаций, локализованных в PB1-гене ХА штаммов-доноров А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), в геном вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) приводит к изменению его ts- и att-фенотипа, при этом практически не влияя на снижение массы тела иммунизированных мышей, превращает его в аттенуированный вариант. При проведении сайт-специфического мутагенеза мы не наблюдали влияния нового фенотипического окружения на эффективность фенотипического проявления включенных мутаций. Мы объясняем это принадлежностью как ХА штаммов-доноров, так и штамма-реципиента к вирусам гриппа человека, обладающим сходным температурным оптимумом активности вирусной РНК-полимеразы. В связи с этим PB1-субъединица, как часть полимеразного комплекса, выполняющая в инфицированных клетках каталитическую функцию, характеризуется повышенной ригидностью, что создаёт определённые трудности для одновременного включения ts-мутаций из генома различных ХА штаммов-доноров. Наши многократные попытки включить одновременно в PB1-ген ts-мутации из генома различных ХА штаммов-доноров не приводили к успеху. С другой стороны, в PB2-ген штамма А/WSN/33, облада-

дающий большей пластичностью, были одновременно успешно включены ts-мутации трёх ХА штаммов – доноров аттенуации.

Заключение

Технология сайт-специфического мутагенеза может быть успешно использована для модификации PB1-гена вирулентных штаммов вируса гриппа А с целью получения живых гриппозных вакцин нового поколения.

Финансирование. Исследования были проведены при финансовой поддержке ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-6, 9, 11-16 см. REFERENCES)

- Александрова Г.И., Климов А.И. *Живая вакцина против гриппа*. СПб.: Наука; 1994.
- Рекстин А.Р., Дешева Ю.А., Лу Х., Александрова Г.И., Климов А.И., Кац Д.М. и др. Гетеросубтипический иммунный ответ и защита от высокопатогенного вируса гриппа А (H5N1) у мышей, иммунизированных холодоадаптированным вирусом гриппа А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). *Медицинская иммунология*. 2005; 7(5-6): 503-10.
- Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Акопова И.И., Ахматова Н.К., Коптяева И.Б. Новые холодоадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(1): 11-7.

REFERENCES

- Maassab H. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees. *C. Nature*. 1967; 213(5076): 612-4. Doi: <https://doi.org/10.1038/213612a0>
- Jin H., Zhou H., Lu B., Kemble G. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/PuertoRico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol*. 2004; 78(2): 995-8. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.995-998.2004>
- Solórzano A., Ye J., Pérez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol*. 2010; 84(9): 4587-96. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00101-10>
- Cox A., Dewhurst S. A single mutation at PB1 residue 319 dramatically increases the safety of PR8 live attenuated influenza vaccine in a murine model without compromising vaccine efficacy. *J. Virol*. 2015; 90(5): 2702-5. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02723-15>
- Song H., Nieto G., Perez D. A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol*. 2007; 81(17): 9238-48. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00893-07>
- Zhou B., Li Yo., Speer S., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine*. 2012; 30(24): 3691-702. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.025>
- Aleksandrova G.I., Klimov A.I. *Live Influenza Vaccine [Zhivaya vaksina protiv grippa]*. St. Petersburg: Nauka; 1994. (in Russian)
- Rekstin A.R., Desheva Yu.A., Lu Kh., Aleksandrova G.I., Klimov A.I., Kats D.M., et al. Heterosubtypic immune response and cross-protection against a highly pathogenic a (H5N1) influenza virus in mice immunized with cold-adapted a/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus. *Meditsinskaya immunologiya*. 2005; 7(5-6): 503-10. (in Russian)
- Rudenko L.G., Arden N.H., Grigorieva E., Naychin A., Rekstin A., Klimov A.I., et al. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and US inactivated influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents. *Vaccine*. 2000; 19(2-3): 308-18. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00153-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00153-5)
- Gendon Yu.Z., Markushin S.G., Tsfasman T.M., Akopova I.I., Akhmatova N.K., Koptyaeva I.B. New Cold-Adapted Donor Strains for Live Influenza Vaccine. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(1): 11-7. (in Russian)
- Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(11): 6108-13. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.100133697>
- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*. 2008;3(11):e3647.
- Pflug A., Guilligay D., Reich S., Cusack S. Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter. *Nature*. 2014; 516(7531): 355-60. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature14008>
- Da Costa B., Sausset A., Munier S., Ghounaris A., Naffakh N., Le Goffic R., et al. Temperature sensitive mutants in the influenza A virus RNA polymerase: alterations in the PA linker reduce nuclear targeting of the PB1-PA dimer and result in viral attenuation. *J. Virol*. 2015; 89(12): 3802-5. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00589-15>
- Biswas S.K., Nayak D.P. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J. Virol*. 1994; 68(3): 1819-26.
- Cox N.J., Kitame F., Kendal A.P., Maassab H.F., Naeve C. Identification changes in the cold-adapted live attenuated influenza vaccine strain A/Ann Arbor/6/60 1988 (H2N2). *Virology*. 1988; 167(2): 554-67.

Поступила 11.07.19

Принята в печать 24.09.19