

5. ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕНОМЕ ВАРИАНТОВ ВИРУСА КОРИ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ.

Подострый склерозирующий панэнцефалит (ПСПЭ) и коревой энцефалит с включениями (КЭВ) являются практически смертельными дегенеративными заболеваниями центральной нервной системы, вызываемыми вирусом кори. Однако, варианты, изолированные от пациентов, страдающих данными заболеваниями, в большинстве случаев не могут продуцировать типичных экстрацеллюлярных вирусных частиц.

Как оказалось, геном большинства вирусных агентов, выделенных из мозга лиц, страдающих ПСПЭ, имел значительные различия в сравнении с геномом штаммов вируса кори, вызывающих литическую инфекцию. Нуклеотидная последовательность генома ряда вариантов, выделенных от лиц, страдающих ПСПЭ, имела определенные сходные черты и отличалась от нуклеотидной последовательности канонических штаммов вируса кори.

Данные, полученные группой Hirano (Wong et al., 1991) выявили высокую степень консервативности гена, кодирующего М-белок у штаммов вируса кори, вызывающего литическую инфекцию. Так, например, М-гены штамма Nagahata и штамма Edmonston имели различия в 46 позициях, однако эти нуклеотидные различия сопровождались только 4-мя аминокислотными замещениями в М-белке (Pro 77- Leu77; Lys 89- Glu-89; Pro-202-His 202; Thr 209- Ala 209; нуклеотидные позиции 260, 290, 632, 657).

Ранее это явление было детально исследовано группой Cattaneo (Cattaneo et al., 1988; Cattaneo et al., 1989; Cattaneo and Billeter.,1992; Cattaneo and Rose., 1993), которая показала, что сходные мутационные замены можно было обнаружить также в значительном количестве в Н и F - генах вариантов, ассоциированных с хроническими заболеваниями ЦНС. Тем не менее оставалось неясным, являются ли эти мутации в геноме вируса кори необходимым условием для развития ПСПЭ.

Дефектная экспрессия М-гена у вариантов вируса кори, изолированных от больных, страдающих хроническими заболеваниями ЦНС, наблюдалась впервые несколькими группами исследователей (Wechsler and Fields 1978; Hall et al., 1979; Carter et al ., 1983).

В частности были сообщения как о полном отсутствии М-белка (Hall and Choprin 1981) или продукции нефункционального (нестабильного) М-белка (Sheppard et al ., 1986).

У вариантов вируса кори, выделенных от пациентов, страдающих ПСПЭ, наблюдается эффективная *in vitro* продукция М- белка нормального размера с транскриптов с DNA-клонов, несмотря на факт, что такой белок не был обнаружен в мозге пациента, страдающего ПСПЭ (Vaszko et al., 1986). Можно предположить, что данный белок мог не обнаруживаться из-за быстрой дегградации.

Тем не менее, нарушение функции М-гена может не быть ответственным за персистенцию, поскольку в некоторых случаях ПСПЭ наблюдался синтез М-белка нормального размера. Однако неизвестно, является ли этот М-белок функционально компетентным. С другой стороны в случае с вариантами, выделенными от пациентов, страдающих ПСПЭ, СООН-конец F-белка был структурно изменен. Суммируя полученные результаты можно сделать вывод, что наибольшие мутационные изменения наблюдаются в М-белке, менее значительные изменения - в F-белке.

Еще один серьезный аргумент в поддержку гипотезы о важности некоторых мутаций в геноме вируса кори для развития летальной инфекции в мозге заключается в своеобразии некоторых характеристик популяции вирусных геномов, присутствующих в мозге пациентов, страдающих ПСПЭ. В этом случае популяция вирусных геномов обнаруживает внутреннюю вариабельность в 10 раз меньшую, чем ожидаемое число изменений, требуемых во время персистенции.

Сравнительно небольшое количество наблюдаемых случаев ПСПЭ и КЭВ свидетельствует о том, что комбинация мутаций, которые способствуют персистенции вируса кори, наблюдается нечасто. Можно предполагать, что персистенция вируса наступает только тогда, когда повреждены механизмы защиты организма. Остаются неясными причины формирования протяженных кластеров мутационных замен в геноме вариантов вируса кори, ассоциированных с ПСПЭ и КЭВ.

В настоящее время имеются многочисленные факты, свидетельствующие о наличии в клетках эукариотов РНК-модифицирующей активности (Bass and Weintraub, 1988; Bass et al., 1989; Wagner et al., 1989; Wong et al., 1989). Предполагается, что относительно невысокая частота случаев гипермутации в геноме ПСПЭ-вариантов и КЭВ-вариантов могут объясняться тем, что РНК-модифицирующая активность локализована, главным образом, в клеточном ядре, тогда как репликация вируса кори происходит в цитоплазме инфицированных клеток.

6. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С АТТЕНУАЦИЕЙ ВИРУСА КОРИ.

Элиминация кори путем вакцинации детей является одной из приоритетных задач Всемирной Организации Здравоохранения. Несмотря на достигнутые успехи, дальнейший прогресс в этой области во многом зависит от улучшения качества вакцин. Коревые вакцины должны индуцировать более высокий и более длительный иммунный ответ, они должны быть безопасными и более эффективными для детей самого младшего возраста.

Первые аттенуированные живые коревые вакцины были получены путем адаптации дикого штамма Edmonston к различным клеточным культурам. После 24 пассажей в первичной культуре клеток почек человека и 28 пассажей в первичной культуре амниотических клеток человека вирус приобрел способность размножаться в амниотических клетках человека и получил название вариант Edmonston В. Этот вариант при подкожном введении обезьянам не продуцировал виремии, не размножался в респираторном тракте и не вызывал клинических симптомов у животного. Он индуцировал коревые антитела и обеспечивал защиту от последующего заражения вирулентным штаммом Edmonston.

В СССР почти одновременно были начаты работы по получению коревого вакцинного штамма. При этом были использованы различные методические подходы для получения группы вакцинных штаммов под общим шифром : Ленинград.

В 1958 году были выделены первые 5 коревых изолятов: Л-1, Л-2, Л-3, Л-4, Л-5. Для изоляции были использованы культуры клеток человека и обезьяны. Еще 2 коревых изолята были выделены в в 1960 году: Л-14 и Л-16. При этом Л-16 был выделен в первичной культуре клеток почек морской свинки, а Л-14 - в культуре фибробластов куриных эмбрионов.

Наконец, вариант Л-4/25 был получен после 10 пассажей в культуре почек человека, 17 пассажей в культуре амниотических клеток человека, 15 пассажей в культуре фибробластов куриного эмбриона и 19 пассажей в культуре клеток почек морской свинки. Первые пассажи этого варианта в культуре клеток почек морской свинки были проведены при нормальной температуре, дальнейшие пассажи - при температуре 30 С и заключительные 15 пассажей - при 25 С.

Полученные варианты Л-4Ф, Л-4ПМС, Л-4/30 и Л-4/25 утратили способность размножаться в верхних отделах дыхательных путей у чувствительных детей.

Однако эти варианты индуцировали вирусную репликацию и размножились в верхних отделах дыхательных путей при подкожном введении. В процессе адаптации к различным культурам клеток варианты Л-4/30 и Л-4/25 значительно снизили способность к размножению при 40 С, а также снизили термостабильность при 50 С.

Вариант Л-4 /25 сохранил свою способность индуцировать иммунный ответ у детей и процент сероконверсий был равен 81, однако титр антител в РТГА был исключительно низким : 1 : 13. Принимая во внимание эти данные, можно считать, что вариант Л-4/30 имел оптимальный уровень аттенуации, а вариант Л-4/25- избыточный уровень аттенуации (Бойчук и др., 1968)

При изучении молекулярно-генетических основ аттенуации вакцинных штаммов вируса кори возникает два серьезных препятствия. Первое препятствие заключается в отсутствии реального дикого штамма - предшественника, исчезнувшего за давностью лет. Второе препятствие заключается в отсутствии продуктов промежуточных пассажей, которые необходимы для выявления корреляции между возникновением определенных мутаций и появлением авирулентного фенотипа. К сожалению, большинство продуктов промежуточных пассажей также недоступно для изучения.

При изучении первичной структуры генома дикого штамма Л-4, выделенного в 1958 г. в городе Ленинграде во время большой коревой вспышки, было обнаружено, что Н-ген этого штамма имеет три нуклеотидные замены по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого штамма Edmonston. Нуклеотидные замены были обнаружены в позиции 157(С-U), которая сопровождалась аминокислотной заменой S- F, в позиции 651 (А-G), вызывающей аминокислотную замену S-G, и в позиции 1656(G-A), сопровождающейся аминокислотным замещением G-S.

Методы аттенуации вариантов Л-4/30 и Л-4/25 значительно отличались от методов аттенуации, применяемых при получении других вакцинных штаммов вируса кори. В частности, были использованы длительные пассажи в культуре почек морской свинки при пониженной температуре. Тем не менее большинство мутаций в генах, кодирующих поверхностные белки вирионов вариантов Л-4/30 и Л-4/25, были локализованы в ограниченном количестве позиций, которые характерны для всех эдмонстоноподобных штаммов вируса кори (позиции: 157, 651, 1461, 1656, 1867 - в Н-гене варианта Л-4/25 и позиции: 157, 651, 1461, 1471, 1656- в Н-гене варианта Л-4/30; позиции 297 и 827 в М-гене варианта Л-4/25 и 827- в М-гене варианта Л-4/30; позиция 640 - в F- гене вариантов Л-4/30 и Л-4/25).

Секвенирование кодирующих частей Н, N, F и М- генов вакцинных штаммов вируса кори не позволило выявить мутации, характерные только для вакцинных штаммов вируса кори. Однако можно предположить, что выявленные мутации имеют значение для реализации авирулентного фенотипа.

Другая часть мутаций , возможно, ответственна за реализацию процесса матурации в новом фенотипическом окружении, включая кливидж, гликозилирование, фолдинг и внутриклеточный транспорт. Нуклеотидные замены в генах , кодирующих Н, F, N,М -белки могут являться необходимой предпосылкой для появления мутаций в других участках генома, ответственных за снижение вирулентности вируса кори. Сравнительное изучение Н, F, N и М -генов вариантов Л-16/17, Л-16/21 , Л-16/21/3 и конечного варианта Л-16 показало, что что все промежуточные варианты приобрели почти полный набор мутаций в изученных генах, характерный для конечного варианта Л-16 (отсутствовала только молчащая мутация U-C в позиции 1178 Н-гена).

Также были обнаружены нуклеотидные различия *cis*-регуляторных элементов генома вакцинных и диких штаммов вируса кори (Lerch et al., 1997). Как известно, геном вируса кори содержит *cis*-регуляторные элементы, контролирующие транскрипцию и репликацию вирусного генома. Эти домены распознаются полимеразным комплексом вируса кори, включающим Р и L - белки. Мутации в этих элементах могут изменить транскрипцию и / или репликацию и привести к аттенуации вирусов.

На Западе наиболее детальные исследования генетических основ аттенуации вируса кори были проведены группой Рота (Rota et al., 1994 b), которая провела сравнительные исследования первичной структуры генов, кодирующих Н, F, N и М -белки у дикого штамма Edmonston и группы вакцинных вариантов, полученных как из данного штамма так и из других диких штаммов-предшественников. Было также обнаружено, что несмотря на различное географическое происхождение вакцинных штаммов и различные методы аттенуации, у исследованных штаммов наблюдались сходные мутационные замены в различных областях генома. Наибольшие изменения были обнаружены в Н-гене вакцинных коревых штаммов.

Наиболее дивергировала нуклеотидная последовательность Н-гена вакцинного японского штамма САМ - 70, где наблюдалось 12 нуклеотидных замен. В нуклеотидной последовательности Н-гена вакцинных штаммов С-47 и АІКс было обнаружено 8 нуклеотидных замен. В позиции 1032 штаммы САМ-70 и АІК-с имели различные нуклеотидные замещения.

В настоящее время трудно оценить полностью функциональное значение этих мутаций и их связь с аттенуацией вируса. Поскольку аттенуация вируса кори сопряжена с его адаптацией к новым клеточным культурам, в том числе и с адаптацией к первичной культуре фибробластов куриных эмбрионов, авторы предполагают, что часть этих мутаций вовлечена в изменение тропизма вируса, в изменение его рецепторной функции, позволяющей осуществлять адсорбцию на клетках этой культуры с последующей успешной репродукцией вируса.

Сравнительное изучение нуклеотидной последовательности F-гена дикого штамма Edmonston и ряда вакцинных штаммов вируса кори показало почти полную идентичность данного гена у штаммов Edmonston-Enders, Zagreb, Л-16 и дикого штамма Edmonston . Штаммы Moraten, Schwarz и Edmonston В имели 3 уникальных общих нуклеотидных замены , две из которых сопровождалась аминокислотными замещениями (позиции 1243 (C-U), 1370 (A-G), 1668 (C-A)).

Известно, что наиболее выраженные штаммовые вариации среди диких штаммов вируса кори наблюдаются в СООН-концевой части N – гена. Однако большинство вакцинных штаммов вируса кори имеют сравнительно небольшое количество мутаций в этом гене. На этом фоне выделяется вакцинный штамм Shanghai-191, имеющий 12 нуклеотидных замен в N – гене в сравнении с нуклеотидной последовательностью N-гена дикого штамма Edmonston.

При сравнительном изучении М-гена вакцинных и диких штаммов вируса кори также были отмечены определенные отличия. Так, в позиции 297 все известные вакцинные штаммы, включая Edmonston-Enders, Shanghai-191, Moraten, AIKc, Л-16 имели мутацию G-A в позиции 297, которая сопровождалась аминокислотным замещением E-K.

Все эти мутационные изменения в геноме вакцинных штаммов в ряде случаев трудно интерпретировать из-за отсутствия информации о первичной последовательности генома отдельных диких штаммов – предшественников. Интересно отметить, что большое число мутаций U-C в N-гене штамма Shanghai-191 дает основания для предположения о том, что феномен гипермутации может наблюдаться не только у вариантов вируса кори, выделенных от больных, страдающих ПСПЭ и КЭВ.

Известно, что ряд исследователей существенным фактором аттенуации рассматривают снижение экспрессии мутантного F- гена (Sinitsyna et al ., 1990), благодаря мутациям в 5- некодирующей области этого гена. Однако группа Мори (Mori et al., 1993) не смогла найти каких–либо мутаций в 5- некодирующей области F- гена вакцинного штамма АІКс.

При сравнительном изучении молекулярных механизмов проявления авирулентного и вирулентного фенотипов вируса кори было обнаружено, что вакцинные штаммы вируса кори вызывали down-регуляцию рецептора CD46 в инфицированных клетках. Вакцинные штаммы в отличие от диких штаммов вызывали гемадсорбцию обезьяньих эритроцитов и индуцировали процесс слияния клеток. Чтобы идентифицировать аминокислотные остатки N- белка вируса кори, ответственные за данные фенотипические различия, было проведено сравнительное изучение первичной структуры N- гена двух штаммов: вакцинного штамма Halle и недавно выделенного дикого штамма вируса кори Ma 93F. (Le Couturier et al., 1996).

Аминокислотные остатки 451 и 481 находятся внутри полипептидной цепи N-белка в пределах аминокислотных остатков 451 и 505, которые формируют часть гемадсорбирующего и гемагглютинирующего домена этого белка . В поддержку этого вывода свидетельствуют данные, полученные группой японских исследователей (Shibahara et al., 1994).

Имеются данные о различной степени агрессивности диких и вакцинных штаммов вируса кори в отношении различных элементов иммунной системы. Иммунодефицитные мыши с имплантированными тимусом и клетками печени человека были использованы, чтобы определить эффект вирулентного дикого штамма Chicago-1 и авирулентного вакцинного штамма Moraten на человеческий тимус *in vivo*. Было продемонстрировано, что Chicago-1 реплицировался быстро с 100-кратным снижением количества тимоцитов, в то время как Moraten реплицировался слабо без значительной гибели тимоцитов.

При изучении структуры генома вакцинного штамма Edmonston-Zagreb было обнаружено большое количество дефектных частиц в его популяции. В этой связи возникло предположение, что вакцинные свойства этого штамма во многом определяются повышенным содержанием дефектных интерферирующих частиц в популяции этого штамма (Calain and Roux., 1988).

Следует отметить, что детальное изучение дефектных интерферирующих частиц вируса кори на модели штамма Toyoshima группой японских исследователей (Enami et al., 1989) показало, что геном этих частиц представляет собой структуру, сформированную по принципу “обратного копирования”, содержащую 5-конец нормального генома вируса кори а также короткую консенсус-последовательность (15 нуклеотидов), которая присутствует в начале каждого гена вируса кори и служит сигналом для инициации транскрипции.

Сравнительный анализ продемонстрировал высокую степень гомологии нуклеотидных последовательностей данных генов. Вакцинные варианты, включая АІКс, Moraten, Schwarz, Rubeovax и Zagreb отличались не более чем на 0,3 % от дикого штамма Edmonston. Предсказуемые аминокислотные замены наблюдались во всех вирусспецифических полипептидах. Восемь аминокислотных замен было общим для всех белков вакцинных штаммов. Дополнительные две аминокислотные замены были общими для белков всех вакцинных штаммов за исключением штамма Zagreb.