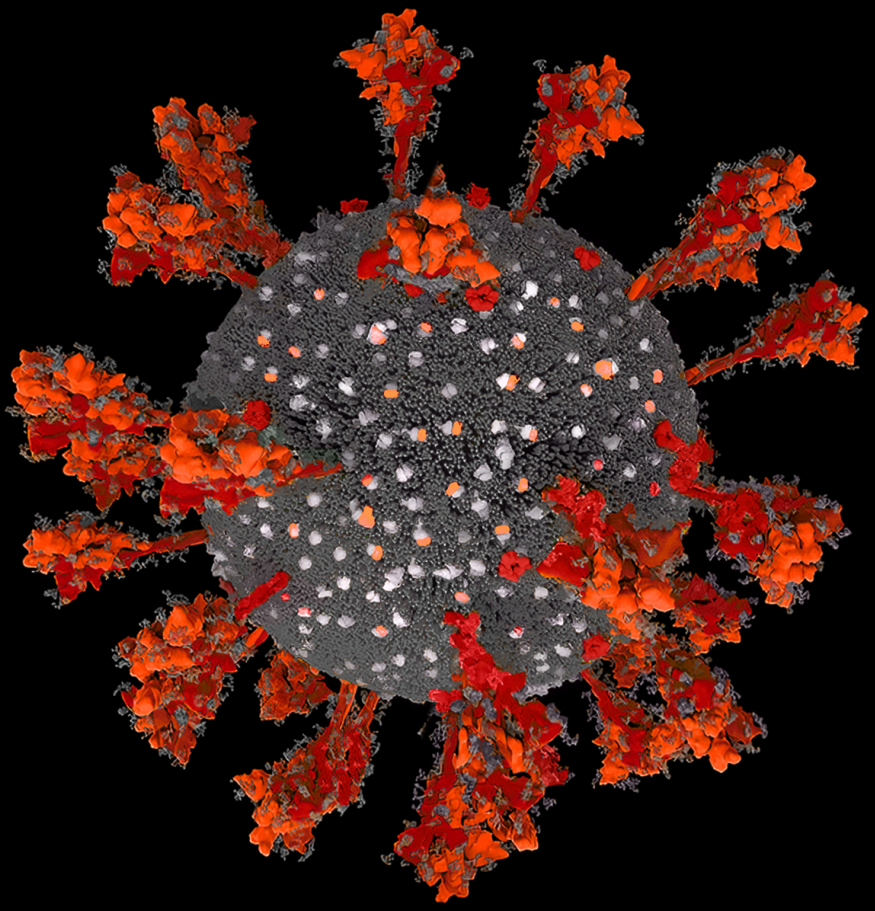
Міністерство освіти і науки України
Харківський національний педагогічний університет ім. Г.С. Сковороди

Шамрай С.М., Леонтьєв Д.В.

ВІРУСОЛОГІЯ

ПІДРУЧНИК



Харків 2024

Міністерство освіти і науки Україн и
Харківський національний педагогічний університет
імені Г.С. Сковороди

Шамрай С. М., Леонтьєв Д.В.

ВІРУСОЛОГІЯ

ПІДРУЧНИК

Видання друге, доповнене

Харків – 2024

Ш19
УДК 578
ББК 28.3

Рекомендовано до друку Вченою радою Харківського національного педагогічного університету імені Г.С. Сковороди (протокол №10 від 09.10.2024).

Р е ц е н з е н т и :

Будзанівська І.Г., завідувач кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, доктор біологічних наук, професор.

Білявська Л.О., завідуюча відділом загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник.

Страшнюк В.Ю., професор кафедри генетики та цитології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, доктор біологічних наук, професор.

Шамрай С. М.

Ш19 Вірусологія: підручник / С. М.Шамрай, Д.В. Леонтьєв. – Харків: Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди, 2024. – 2-е вид., доп. − 329 с.

У підручнику розглянуті основні аспекти загальної та спеціальної вірусології. Викладено історію дослідження вірусів, принципи їхньої організації, проблему належності вірусів до живого світу, основи систематики вірусів. Детально описується цикл репродукції вірусів, їхня взаємодія з клітиною та в цілому з організмом хазяїна. Окреслено проблеми походження та еволюції вірусів, методи їх дослідження та ідентифікації. Останній розділ підручника присвячений огляду основних представників групи, що вражають людину і тварин. Підручник призначено для студентів ОКР "Бакалавр" спеціальностей 091 Біологія та біохімія, 014.05 Середня освіта (Біологія та здоров’я людини) та 014.15 Середня освіта (Природничі науки).

© Шамрай С. М.

© Леонтьєв Д.В.

© Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди

На обкладинці − комп’ютерна модель віріона SARS-CoV-2. Credit: Зображення створене Janet Iwasa з Університету Юти, 2021 р.

ЗМІСТ

ВСТУП 7
Ми живемо в океані вірусів 7
Чому необхідно досліджувати віруси? 7
Предмет вірусології, її місце серед біологічних наук 8
РОЗДІЛ 1. ЩО ТАКЕ ВІРУСИ? 10
1.1. Коротка історія вірусології 10
1.2. Природа вірусів 17
РОЗДІЛ 2. ВІРУСНА ЧАСТКА 25
2.1. Структурна віріонів 25
2.2. Морфологія і розмір віріонів 26
2.4. Принципи структурної організації віріонів 29
2.5. Будова та симетрія капсидів 30
2.6. Ліпідні оболонки віріонів 37
2.7. Хімічний склад віріонів 38
РОЗДІЛ 3. КЛАСИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ 41
3.1. Основні підходи до класифікації вірусів 41
3.2. Ранні спроби класифікувати віруси 41
3.3. Класифікація Девіда Балтімора на основі механізмів синтезу мРНК 42
3.4. Сучасні принципи класифікації і номенклатури вірусів 44
3.6. Огляд філогенетичної системи вірусів 46
РОЗДІЛ 4. РЕПЛІКАЦІЯ ВІРУСІВ У КЛІТИНІ ХАЗЯЇНА 52
4.1. Прикріплення, вхід до клітини та внутрішньоклітинний транспорт 52
4.1.1. Віруси тварин: прикріплення 53
4.1.2. Віруси тварин: вхід до клітини 56
4.1.3. Віруси рослин: зараження. 60
4.1.4. Бактеріофаги: прикріплення і ввід геному до клітини бактерії 61
4.1.5. Внутрішньоклітинний транспорт 64
4.2. Експресія генів вірусів 66
4.2.1. Транскрипція геномної ДНК 67
4.2.2. Синтез РНК на матриці РНК: транскрипція і реплікація РНК-геномів 71
4.2.3. Синтез білка (трансляція) у еукаріотів 81
4.2.4. Особливості транскрипції і трансляція в клітинах бактерій. 91
4.3. Реплікація геномів ДНК-вірусів 93
4.3.1. Реплікація вірусів з кільцевим длДНК-геномом 98
4.3.2. Реплікація вірусів з лінійним длДНК-геномом 98
4.3.3. Реплікація вірусів з олДНК-геномом 103

4.3.4. Реплікація віроїдів і вірусу гепатиту дельта 104
4.3.5. Реплікація геномів вірусів через зворотну транскрипцію 107
4.4. Збирання (морфогенез) вірусних часток 112
4.5. Вірусні фабрики 116
4.5.1. Біогенез вірусних фабрик. 118
4.6. Вихід віріонів та їхнє перебування поза клітиною 119
4.7. Дефектні вірусні частинки 120
4.8. Субвірусні частки 121
4.8. Взаємодії між вірусами під час змішаної інфекції 124
4.8.1. Взаємодії між геномами вірусів 124
4.8.2. Взаємодії між генними продуктами вірусів 125
РОЗДІЛ 5. ВЗАЄМОДІЯ ВІРУСУ З ОРГАНІЗМОМ 126
5.1. Наслідки зараження вірусом хазяїна 126
5.2. Продуктивна інфекція 127
5.2.1. Зміни у сигнальних шляхах 128
5.2.2. Експресія генів 131
5.2.3. Метаболізм 133
5.3. Непродуктивна інфекція 134
5.3.1. Абортивна інфекція 134
5.3.2. Латентна інфекція 134
5.4. Персистентна інфекція 136
5.5. Програмована загибель клітин 138
5.6. Поширення вірусів усередині організму багатоклітинного хазяїна. 138
5.7. Захворювання. 138
РОЗДІЛ 6. ІМУННА ВІДПОВІДЬ ОРГАНІЗМІВ НА ВІРУСНУ ІНФЕКЦІЮ 141
6.1. Імунна відповідь хребетних тварин 141
6.1.1. Внутрішній імунітет 141
6.1.2. Вроджений імунітет 141
6.1.3. Адаптивний імунітет 145
6.1.4. Взаємодія між вродженою та адаптивною імунними системами 153
6.2. Противірусний імунітет безхребетних тварин 154
6.3. Противірусний імунітет рослин. 155
6.4. Механізми стійкості до вірусів у бактерій та архей 157
РОЗДІЛ 7. РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ВІРУСІВ 161
7.1. Цикл передавання вірусів 161
7.2. Бар'єри на шляху передавання вірусів 162
7.3. Горизонтальне і вертикальне передавання вірусів 163
7.3.1. Шляхи горизонтального передавання вірусів у хребетних тварин 163
7.3.2. Вертикальне передавання вірусів ссавців 166

7.3.3. Горизонтальне і вертикальне передавання вірусів рослин 166
7.4. Передавання вірусів переносниками 167
7.4.1. Віруси тварин, що передаються переносниками 167
7.4.2. Віруси рослин, що передаються переносниками 168
7.5. Переміщення вірусів на великі відстані 170
7.6. Епідеміологія вірусних інфекцій 170
7.7. Зберігання вірусної інфекції в популяціях 171
РОЗДІЛ 8. ВІРУСНИЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ 173
8.1. Загальні уявлення про канцерогенез 173
8.2. Онкогенні віруси і механізми вірусного канцерогенезу 174
8.2.1. Приклади пухлин людини, виникнення яких асоційовано з вірусами 175
8.3. Запобігання розвитку індукованих вірусами ракових пухлин 182
РОЗДІЛ 9. ЗАСОБИ БОРОТЬБИ З ВІРУСНИМИ ІНФЕКЦІЯМИ 184
9.1. Вакцини 184
9.1.1. Інфекційні («живі») вакцини 186
9.1.2. Інактивовані («вбиті») вакцини 189
9.1.3. Вакцини, які містять антигени 190
9.1.4. Вакцини, що містять ДНК або РНК 192
9.2. Противірусні препарати 195
9.2.1. Приклади антивірусних препаратів, які мають клінічне застосування. 197
РОЗДІЛ 10. ПАТОГЕНЕЗ ПРІОННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ 202
10.1. Природа пріонів 202
10.2. Пріонні хвороби тварин і людини 204
10.3. Штами пріонів і їх передавання. 206
РОЗДІЛ 11. ПОХОДЖЕННЯ ТА ЕВОЛЮЦІЯ ВІРУСІВ 208
11.1. Походження вірусів 208
11.2. Еволюція вірусів 211
11.2.1. Механізми еволюції вірусів 211
11.2.1. Коеволюція вірусів та їхніх хазяїв 216
РОЗДІЛ 12. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУСІВ 217
12.1. Культивування вірусів 217
12.1.1. Культивування вірусів в лабораторних тваринах. 217
12.1.2. Культивування вірусів в курячих ембріонах. 218
12.1.3. Культивування вірусів в культурі тканин і клітин. 218
12.1.4. Одиночний цикл репродукції вірусів в культурі 220
12.2. Кількісний облік вірусів 221
12.2.1. Вимірювання фізичних титрів вірусів 221
12.2.2. Вимірювання інфекційних титрів вірусів 222
12.3. Виділення і очищення вірусів 225

12.4. Дослідження структури віріонів і заражених клітин 227
12.5. Ідентифікація вірусів 227
12.5.1. Виявлення віріонів 228
12.5.2. Визначення інфективності вірусів 228
12.5.3. Виявлення вірусних білків 228
12.5.4. Виявлення нуклеїнових кислот вірусу 229
12.5.5. Виявлення специфічних для вірусу антитіл 231
12.6. Дослідження генетики вірусів 231
РОЗДІЛ 13. ВІРУСИ, ЯКІ МАЮТЬ ДНК-ГЕНОМИ (КРІМ ПАРАРЕТРОВІРУСІВ) 234
13.1. Віруси з дволанцюговою ДНК (клас 1 за Д. Балтімором) 234
13.1.1. Віруси людини і тварин 234
13.1.2. Віруси прокаріот 246
13.2. Віруси з одноланцюговою ДНК (клас 2 за Д. Балтімором) 249
13.2.1. Віруси людини і тварин 249
13.2.2. Віруси рослин 255
13.2.3. Віруси прокаріот 260
РОЗДІЛ 14. ВІРУСИ, ЯКІ МАЮТЬ РНК-ГЕНОМИ (КРІМ РЕТРОВІРУСІВ) 266
14.1. Віруси з дволанцюговою РНК (клас 3 за Д. Балтімором) 266
14.1.1. Віруси людини і тварин 266
14.1.2. Віруси рослин, грибів і найпростіших 270
14.1.3. Віруси прокаріот 272
14.2. Віруси, що містять плюс-ланцюг РНК (клас 4 за Д. Балтімором) 274
14.2.1. Віруси людини і тварин 275
14.2.2. Віруси рослин 290
14.2.3. Віруси прокаріот 294
14.3. Віруси, що містять мінус-ланцюг РНК (клас 5 за Д. Балтімором) 296
14.3.1. Віруси людини і тварин 296
14.3.1.2. Інші віруси людини і тварин з (-)РНК-геномами 301
14.3.2. Віруси рослин 309
15. ВІРУСИ, РЕПЛІКАЦІЯ ЯКИХ ВІДБУВАЄТЬСЯ ЧЕРЕЗ ЗВОРОТНУ ТРАНСКРИПЦІЮ (КЛАСИ 6 І 7 ЗА Д. БАЛТІМОРОМ) 311
15.1. Віруси людини і тварин 311
15.1.1. Родина *Retroviridae* 311
15.1.2. Родина *Hepadnaviridae* 316
15.2. Віруси рослин 320
15.2.1. Родина *Caulimoviridae* 320
ДЖЕРЕЛА ІЛЮСТРАЦІЙ 326
ЛІТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДАЛЬШОГО І ДОДАТКОВОГО ЧИТАННЯ 327

ВСТУП

Ми живемо в океані вірусів

Сказати, що віруси повсюдно поширені, – це не сказати нічого. Вони знайдені в усіх організмах, перевірених на їхню присутність, від бактерій і архей до троянди та людини. Більш того, існує чітка кореляція між ступенем вивченості певного виду і кількістю вірусів, знайдених у нього. Природно, найбільшу увагу привертають віруси, що інфікують наш власний вид, тож не дивно, що перелік відомих вірусів людини є значно ширшим за переліки, складені для інших видів. Втім, у цьому питанні у людини є своєрідний «конкурент»: кишкова паличка *Escherichia coli*. Ця бактерія є модельним об'єктом для найрізноманітніших біологічних досліджень, тож і в неї також виявлено дуже багато вірусів. Очевидно, що будь-який інший вид, одержавши таку ж пильну увагу, як людина чи кишкова паличка, теж міг би «похизуватися» тисячами видів вірусів, що паразитують на ньому. Відповідно, перелік вірусів, відомий на сьогодні, є лише краплею в океані вірусів, що оточує нас.

Віруси мають неймовірну ефективність реплікації. Зараження одного господаря призводить до появи нових вірусних частинок, які за кількістю перевищують кількість особин в популяції господаря. І, наприклад, одна хвора на грип людина може виділити кількість вірусних частинок, яка теоретично може заразити всю людську популяцію.

Кількість вірусів неможливо уявити. Сучасні оцінки кількості окремих вірусів на Землі дозволяють припустити, що воно значно перевищує загальну кількість зірок у відомому Всесвіті, тобто понад 10^{31} (10 нонільйонів). Але використання в останні роки нових методів дослідження, зокрема секвенування нуклеїнових кислот показало, що величезна кількість раніше невідомих вірусів ще чекає на вивчення.

Кожна дитина знає, що вірусні інфекції призводять до негативних, часто небезпечних наслідків. Однак чимало вірусів не завдають шкоди своїм хазяям. Навіть хвороботворні віруси не призвели до вимирання своїх господарів. Більш того, генетичний матеріал вірусів, що інтегрується у геном хазяїв, поступово стає життєво необхідною частиною їхнього власного генофонду. Так, принаймні 8% генетичного матеріалу людини складають геноми ретровірусів, що у різні часи вбудувалися в наші хромосоми. Існують серйозні докази того, що віруси відіграли важливу роль у виникненні еукаріотичної клітини, статевого процесу, плаценти. Без вірусів живий світ нашої планети був би цілком іншим.

Чому необхідно досліджувати віруси?

Найочевидніша мета дослідження вірусів – боротьба з хворобами, що ними спричиняються. Вірусні захворювання не тільки суттєво впливають на якість життя кожної людини, але і стають важливими чинниками розвитку суспільства: в минулому такий вплив мала віспа, нині – СНІД і ковід-19. Тож людині конче потрібне розуміння природи вірусів, процесів їх відтворення, інфікування господаря і спричинення захворювань. Саме такі знання дозволяють розробляти ефективні заходи із запобігання, діагностики та лікування вірусних інфекцій, починаючи від звичайнісінької застуди й закінчуючи летальними хворобами на кшталт сказу, СНІДу та деяких типів злоякісних пухлин.

Не менш важливою для людини є також ветеринарна вірусологія і вірусологія рослин, оскільки вірусні хвороби свійських тварин і культурних рослин значно знижують продук-

тивність сільського господарства. Віруси-бактеріофаги можуть заражати молочнокислі бактерії, за допомогою яких виготовляються сири, йогурти та інші кисломолочні продукти, що призводить до серйозних збитків харчової промисловості.

Втім, віруси не варто розглядати як суто шкідливі об'єкти: вчені змусили деяких із них приносити людині користь. Приклади практичного використання вірусів наведені нижче.

Ідентифікація бактерій за допомогою бактеріофагів. У окремих груп бактерій, наприклад у видів роду Salmonella, штами заведено розрізняти на основі спектра фагів, до яких вони чутливі. Ідентифікація бактерійних ізолятів надає важливу епідеміологічну інформацію під час спалахів захворювань, що викликані цими бактеріями.

Віруси як джерела ферментів. Низка ферментів, які використовують в молекулярній біології, одержана від вірусів. Прикладами є зворотна транскриптаза ретровірусів та РНК-полімераза фагів.

Віруси як пестициди. Віруси допомагають контролювати чисельність організмів, що завдають шкоди сільському господарству або довкіллю. Так, чисельність деяких комах-шкідників контролюють за допомогою бакуловірусів, а вірус міксоми використовується для контролю чисельності кроликів.

Віруси як антибактерійні агенти. В середині XX ст. бактеріофагів використовували для лікування деяких бактерійних захворювань людини. Інтерес до них впав після відкриття антибіотиків, проте знову відродився з появою стійких до антибіотиків штамів бактерій.

Віруси як протиракові агенти. Проводяться дослідження з обробки злоякісних пухлин генетично модифікованими вірусами, наприклад вірусом простого герпесу та вірусом коров'ячої віспи. Вони модифіковані таким чином, що специфічно заражають і руйнують лише клітини пухлини, але не нормальні клітини.

Віруси як вектори для генної інженерії. Деякі бакуловіруси та аденовіруси використовують як вектори для вбудовування генів в культивовані клітини тварин. Ця технологія дозволяє включати до тваринних клітин гени, які кодують корисні білки, наприклад компоненти вірусних вакцин.

Віруси як вектори в терапії генетичних захворювань. Діти з важким комбінованим імунодефіцитом успішно лікуються з використанням ретровірусу. Він використовується для вбудовування в стовбурові клітини не мутантних копій генів, втрата яких стала причиною захворювання.

Предмет вірусології, її місце серед біологічних наук

Вірусологія – наука про віруси. Виникнувши наприкінці XIX століття як гілка патології людини й тварин, з одного боку, і фітопатології – з іншого, вірусологія стала самостійною наукою, що займає чільне місце серед головних напрямів біології.

Як і будь-яка інша наука, вірусологія поділяється на розділи. Загальна вірусологія вивчає природу вірусів, їхню морфологію, біологію, біохімію, генетику, механізми реплікації.

Медична, ветеринарна і сільськогосподарська вірусологія досліджують патогенні для людей, свійських тварин і сільськогосподарських рослин віруси, їхні інфекційні властивості, розробляють заходи попередження, діагностики та лікування вірусних захворювань.

Вірусологія тісно пов'язана з іншими науками. Відкриття і дослідження вірусів, зокрема бактеріофагів, зробило величезний внесок у становлення і розвиток молекулярної біології. Розуміння спадкових властивостей вірусів тісно пов'язане з молекулярною генетикою. Віруси є поширеним інструментом досліджень у царині генетичної трансформації організмів,

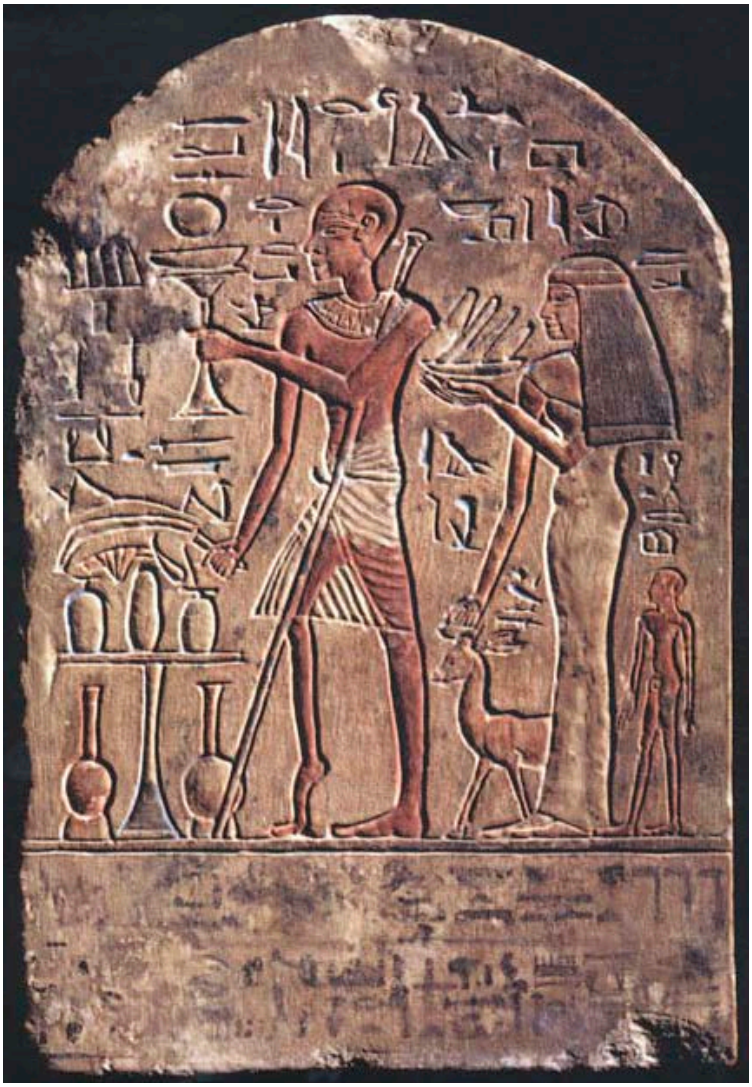
що зв’язує вірусологію з генетичною інженерією. Віруси є збудниками численних інфекційних захворювань людини, тварин, рослин, протистів і бактерій, що пов’язує вірусологію з медициною, ветеринарією, фітопатологією та іншими науками.

Об’єктом досліджень вірусології є не лише віруси. Інші інфекційні агенти неклітинної природи також досліджуються вірусологами. До «невірусних» об’єктів вірусології належать віроїди (інфекційні молекули РНК), субвірусні частки (віруси-сателіти та сателітні нуклеїнові кислоти, що відтворюються у присутності вірусу-помічника) та пріони (білкові інфекційні частки, здатні перетворювати нормальні білки організму на ідентичні собі інфекційні молекули). Про них у цій книзі теж буде йти мова.

РОЗДІЛ 1. ЩО ТАКЕ ВІРУСИ?

1.1. Коротка історія вірусології

Перші свідчення про вірусні хвороби людини та способи боротьби із ними. Вірусні хвороби людини, тварин і рослин були відомі задовго до відкриття вірусів і навіть до самого встановлення інфекційної природи хвороб. Ймовірно, найдавнішим зображенням ознак вірусної хвороби людини є давньоєгипетська стела 1500–1700 рр. до н. е. із фігурою жерця, хворого на поліомієліт (Мал. 1.1). На поліомієліт страждав також фараон Сиптах, який помер у молодому віці близько 1187 р. до н. е. Вивчення його мумії, знайденої в 1905 р., виявило, що ліва нога була всохлою і мала характерні ознаки цієї хвороби.



Мал. 1.1. *Давньоєгипетська стела, знайдена на розкопках Мемфісу і датована приблизно 1500–1700 рр. до н.е., на якій зображений жрець, хворий на поліомієліт, з властивими цій хворобі видимими симптомами, передусім атрофією кінцівки. Зміст цього рельєфу – звернення хворого до богів з проханням про зцілення. Про це говорять священна чаша в руках хворого і жертовна тварина, яку веде слідом за ним дружина (за https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polio_Egyptian_Stele.jpg).*

У староєгипетських папірусах є згадки і про віспу. На шкірі мумії фараона Рамзеса V, що помер імовірно від віспи в 1143 (1145?) р. до н. е., знайдені численні виразки, типові для цієї хвороби (Мал. 1.2).



Мал. 1.2. *Голова мумії фараона Рамзеса V, який помер від віспи в 1145 (1143?) р. до н. е. (за https://www.utahstandardnews.com/smallpox-unknown-in-land-of-promise-600-bc-science-in-the-book-of-mormon/).*

Ще одне вірусне захворювання, сказ, було згадане в працях давньогрецького філософа Аристотеля (384–322 рр. до н. е.), який вказував на зв'язок сказу з укусами собак. Давньоримський філософ і лікар Цельс (бл. 25 р. до н. е. – бл. 50 р. н. е.) уперше детально описавши сказ, назвав це захворювання гідрофобією (водобоязню).

Попри те, що люди не знали й не розуміли причин інфекційних хвороб і пов'язували їх з гнівом богів або підступами демонів, спостережливість людини дозволила зробити деякі вірні висновки.

Стародавні лікарі помітили, що люди, які перехворіли на віспу, повторно нею не заражаються. На цьому спостереженні вони побудували перший метод запобігання зараженню віспою, який дістав назву **варіоляції** (від латинської назви віспи – *variola*). Суть її полягала в тому, що вміст пустул (гноячків) від пацієнтів, що хворіли на легку форму віспи, вносили в маленьку ранку на шкірі людини. Це викликало зазвичай легке захворювання і запобігало виникненню важкої форми хвороби.

Варіоляція була відома на Сході принаймні з Раннього Середньовіччя: в Індії про неї збереглися записи VIII ст., а в Китаї – X ст. У Європу ця методика була вперше привезена з Туреччини дружиною британського посла в Константинополі Мері Вортлі Монтеґю в 1718 р. Дізнавшись про варіоляцію у турок, вона прищепила свого шестирічного сина. Після дослідів над злочинцями та дітьми з церковних притулків, віспа була прищеплена членам родини британського короля Георга I. У наступні вісім років в Англії щеплення було зроблене 845 людям, з яких 17 після цього померли. Таким чином, під час першого масового використання у Європі варіоляція дала 2% смертності. Але ж смертність від віспи була у 10–20 разів вищою, тож, не зважаючи на певні ризики, варіоляція здобула широку популярність.

Втім, цей метод все ж таки мав непереборну ваду: він сам міг викликати епідемію. Тож врешті варіоляція була заборонена: у Франції у 1762 р., а в Англії – у 1840 р.

Таким чином, якщо використовувати сучасну термінологію, перші спроби *вакцинації* були виконані ще у ранньому середньовіччі!

Переворот у боротьбі з віспою вчинив англійський лікар Едвард Дженнер. Ще у молодому віці він почув фермерське повір'я, що доярки, які перехворіли на коров'ячу віспу, ставали несприйнятливі до віспи натуральної. У 1765 р. лікарі Суттон і Фьюстер повідомили Лондонському медичному товариству, що віспа у дійних корів, якщо нею заражається людина, оберігає її від захворювання натуральною людською віспою. Однак товариство визнало їх спостереження випадковістю, яка не заслуговує на подальші дослідження.

У 1768 р., під час чергової епідемії віспи, спостереження Суттона і Фьюстера спробував перевірити Дженнер. У 1789 і 1790 рр. він зробив щеплення коров'ячої віспи своєму синові і його годувальниці. Обидва не захворіли на натуральну віспу, і лікар звернувся до колег по допомогу щодо перевірки свого спостереження. На жаль, він не отримав підтримки, тож змушений був і далі працювати сам.

Впродовж наступних років Дженнер продовжував експерименти з щепленнями коров'ячої віспи й 14 травня 1796 р., отримавши згоду батьків Джеймса Фіпса, хлопчика з Берклі, зробив йому щеплення проти віспи, скориставшись матеріалом з рани не корови, а жінки, зараженої коров'ячою віспою. Через два тижні дитина, що ніколи раніше не хворіла на натуральну віспу, одужала. 1 липня 1796 р. дослідник прищепив Джеймсу вже натуральну, «людську» віспу. Захворювання не трапилось.

Результати своїх експериментів Дженнер виклав в статті, представленій 10 липня 1798 р. Королівському науковому товариству. Однак робота була проігнорована «за недостатністю доказів». Але Дженнер не здавався. Він продовжив свої досліди й в 1798 р. опублікував 64-сторінкову монографію «Дослідження причин і дії коров'ячої віспи», а в наступні роки – ще три книги з тієї ж тематики.

Оскільки перша вакцина являла собою, власне кажучи, коров'ячу форму віспи, а корова на латині називається *vacca*, Луї Пастер назвав винайдену Дженнером процедуру **вакцинацією.**

У 1800 р. вакцинація була визнана обов'язковою в англійській армії та на флоті, після чого щеплення від віспи стало поширюватися у світі. У 1980 р. ООН оголосила про повну ліквідацію натуральної віспи на Землі.

Перші свідчення про вірусні хвороби рослин. Вірусні захворювання рослин поширені так само широко, як і захворювання людини та тварин, але з цілком зрозумілих причин вони привертали меншу увагу. Можливо, перша відома згадка про вірусну хворобу рослини зустрічається у вірші зі збірки японської лірики «Манйосю» («Збірка міріад листя»), написаної імператрицею Кокен влітку 752 р. У довільному викладі рядки японської імператриці є приблизно такими:

У цьому селі
Невже увесь час були приморозки?
У рослин, які я бачила
Влітку в полі
Було пожовкле листя.

Рослини, про які йде мова, в японському оригіналі названі точно, це *Eupatorium lindleyanum*, або сідач Ліндлея. Згадана рослина сприйнятлива до вірусу кучерявості листя тютюну, який і викликає пожовтіння ураженого листя.

Першими зображеннями рослин, вражених вірусними хворобами, імовірно є картини та малюнки голландських майстрів, створені у період «тюльпаноманії», у 1600–1637 рр. Квітки тюльпанів, уражених вірусом мозаїки, ставали рябими, строкатими (Мал. 1.3). Ця ознака помилково вважалася сортовою, тож цибулини, одержані від враженої рослини, цінувалися в Голландії дуже дорого: в 1635 р. одна така цибулина могла коштувати до 6000 голландських гульденів. Досвідчений ремісник у той час одержував до 300 гульденів на рік.



Мал. 1.3. Малюнок тюльпана, ураженого вірусом мозаїки. Бальтазар ван дер Аст, 1620-і рр.

Відкриття вірусів. До кінця XVIII – початку XIX ст. вже було добре відомо, що чимало захворювань є «заразними», тобто можуть передаватися від хворої людини здоровій. У другій половині 19 століття була сформульована мікробна теорія, і тоді лікарі та мікробіологи були впевнені, що для кожної інфекційної хвороби буде знайдено мікроорганізм-збудник.

Наприкінці XIX ст., завдяки відкриттям Луї Пастера і Роберта Коха, збудники багатьох хвороб тварин і людини були знайдені: ними виявилися бактерії. За результатами своїх досліджень Кох сформулював знамениті *постулати* – серію припущень, підтвердження яких необхідне для того, щоб стверджувати, що мікроорганізм є збудником певної хвороби. Нижче ці постулати наведені в дещо осучасненому вигляді.

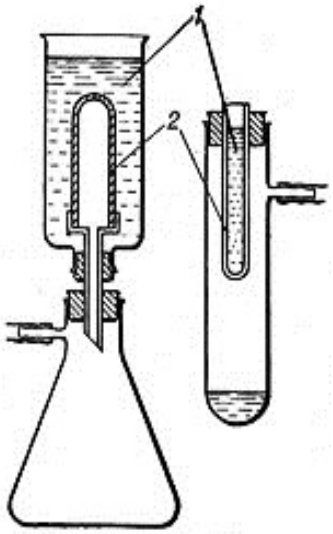
1. Мікроорганізм постійно трапляється в організмі хворих, але відсутній у здорових особин;
2. Мікроорганізм виділяється з хворого організму і росте в чистій культурі;
3. Під час зараження чистою культурою мікроорганізму здорова особина захворює;
4. Мікроорганізм повторно виділяється з експериментально зараженої особини.

Перші три постулати відомі також як **тріада Коха**.

Принципи, закладені Кохом, дозволили довести інфекційну природу багатьох хвороб. Але наприкінці XIX ст. з'ясувалося, що ціла низка захворювань людини, а саме сказ, віспа, грип, жовта лихоманка, хоча і є інфекційними, ніби не відповідають постулатам Коха. Збудники цих хвороб були цілковито невловними: вони не виявлялися під мікроскопом і не росли в чистій культурі. У 1890 р. на X конгресі гігієністів Р. Кох вимушений був заявити, що «у випадку перерахованих хвороб ми маємо справу не з бактеріями, а з організованими збудниками, які належать до зовсім іншої групи мікроорганізмів». Так була вперше висловлена думка про існування групи збудників інфекційних захворювань не бактерійної природи. Залишалося лише експериментально довести їхнє існування.

Успіх, як не дивно, був досягнутий не в царині медицини чи ветеринарії, а в галузі дослідження інфекційних хвороб рослин, тобто у фітопатології. Посадкам тютюну значної шкоди завдавало захворювання, що викликало мозаїчність листя. У 1886 р. німецький вчений Адольф Майєр, що працював в Голландії, показав, що сік рослин, хворих на мозаїчну хворобу, викликає у здорових рослин таке ж захворювання.

Водночас мозаїчною хворобою тютюну займалися вчені Російської імперії, серед яких був і Дмитро Йосипович Івановський. Працюючи у Нікітському ботанічному саду (АР Крим, Україна), Івановський показав, що сік хворих рослин, пропущений крізь **свічку Шамберлана** – пристрій, що затримував усі відомі у той час бактерії (Мал. 1.4) – залишається заразним. Натомість прогрівання соку до 60–70°С позбавляло його інфекційності, що свідчило про біологічну природу збудника. У тканинах уражених рослин дослідник спостерігав «кристали Івановського» – структури, які надалі виявилися кристалізованими вірусними частками.



Мал. 1.4. Свічка Шамберлана. 1 – фільтрована рідина, 2 – свічка. Шарль Едуард Шамберлан (Ch. E. Chamberland, 1851–1908) – французький бактеріолог, друг і учень Луї Пастера, виготовляв «свічки» з фарфору з дуже маленькими порами, що не пропускають бактерій.

Однак Д. Й. Івановський не усвідомив, що має справу з особливою формою паразитів. Він вирішив, що збудник тютюнової мозаїки є дуже маленькою бактерією, «бактерією, що фільтрується», або бактеріальним токсином. Результати своєї роботи Д.Й. Івановський опублікував у книзі «Про дві хвороби тютюну» в 1892 р. Цей рік і вважається роком відкриття вірусів.

У 1898 р. голландець Мартін Бейерінк повторив експерименти з фільтрації екстрактів рослин тютюну, уражених мозаїкою. Він не лише підтвердив спостереження Івановського,

але й з'ясував, що патоген здатний репродукуватися і поширюватися в клітинах хазяїна. Водночас, на відміну від відомих у ті часи бактерій, збудник тютюнової мозаїки не розвивався у живильному розчині. З цього випливало, що він не є бактерією. Зауважимо, що сьогодні ми знаємо сотні видів бактерій, які не культивуються на простих поживних середовищах. Але Бейерінку це не було відомо, тож він зробив правильний висновок про небактерійну природу захворювання з неправильної посилки.

Щоб підкреслити небактерійну природу цього агенту Бейерінк увів для нього поняття **вірус** (лат. *virus* – отрута). Втім, первинне значення цього слова суттєво відрізнялося від сучасного. Бейерінк вважав, що вірус є рідкою матерією. Розчин, що містив віруси, він називав *contagium vivum fluidum* (заразною живою рідиною). Слід зазначити, що Бейерінк визнавав пріоритет Івановського у факті відкриття вірусів.

Загальну відповідь на питання щодо природи вірусів зміг дати німецький бактеріолог Фрідріх Леффлер, який у 1898 р. відкрив вірус ящуру. Працюючи разом з Паулем Фрошем, Леффлер виявив, що збудник ящуру хоча й вільно проходить крізь фільтр Шамберлана, але затримується на *фільтрі Кітасато*, який має ще менші пори. На основі цього спостереження Леффлер зробив вірний висновок, що віруси мають корпускулярну природу, тобто є частинками, а не рідиною, як вважав Бейерінк.

Таким чином, честь бути основоположниками вірусології належить трьом дослідникам – росіянину Дмитру Івановському, що відкрив здатність збудника мозаїки тютюну проходити крізь бактерійні фільтри, голландцю Мартіну Бейерінку, що показав небактерійну природу збудника цієї хвороби і запропонував назву вірус, і німцю Фрідріху Леффлеру, який показав, що віруси мають корпускулярну природу (Мал. 1.5).



Мал. 1.5. *Основоположники вірусології (зліва направо): Івановський Дмитро Йосипович (1864 – 1920), Бейерінк Мартін Віллем (1851 - 1931), Леффлер Фрідріх Август Йоганн (1852 – 1915).*

Подальша історія досягнень вірусології безпосередньо пов'язана з розвитком методології досліджень. У кінці XIX – на початку XX ст. основним методом ідентифікації вірусів залишався метод фільтрації через бактерійні фільтри. В цей час були відкриті десятки небезпечних вірусів:

1892 р. – вірус тютюнової мозаїки
1898 р. – вірус ящуру
1898 р. – вірус чуми рогатої худоби
1899 р. – вірус жовтої лихоманки
1902 р. – вірус віспи птахів і овець
1903 р. – вірус сказу
1903 р. – вірус віспи людини
1904 р. – вірус чуми собак
1907 р. – вірус лихоманки Денге
1909 р. – вірус поліомієліту
1916 р. – вірус кору
1917 р. – вірус простого герпесу
1926 р. – вірус везикулярного стоматиту
1931 р. – вірус свинячого грипу.

У 1911 р. американський патолог Френсіс Раус довів вірусну природу злоякісної пухлини курей – саркоми Рауса.

У 1915 р. англійський бактеріолог Ф. Туорт, досліджуючи причини лізису бактерійних колоній, описав принцип передавання «лізису» новим культурам у ряді поколінь. У 1917 р. канадський бактеріолог Ф. д'Ерель довів, що лізис бактерій пов'язаний з агентом, що фільтрується, і назвав цей агент бактеріофагом. Дослідження М. Барнета, який працював в Мельбурні в 1924–34 рр., показали широку різноманітність бактерійних вірусів за фізичними і біологічними властивостями. Це відкриття викликало великий науковий інтерес, і наприкінці 1930-х рр. троє дослідників – фізик М. Дельбрюк, бактеріологи С. Лурія і А. Херші, які працювали в США, створили неформальну «фагову групу», роботи якої зрештою заклали підвалини нової науки – молекулярної біології.

Значну проблему під час роботи з вірусами становила неможливість культивування цих об'єктів поза живою клітиною, в чистих культурах. У 1930-ті роки цю проблему вирішували шляхом розведення вірусів у живих лабораторних тваринах (дорослих білих мишах – для вірусів грипу, новонароджених мишах – для вірусів Коксакі, шимпанзе – для вірусу гепатиту В, курях і голубах – для онкогенних вірусів, поросятах – для кишкових вірусів тощо). Першим, хто почав систематично використовувати лабораторних тварин під час дослідження вірусів, був Луї Пастер, який ще в 1881 р. проводив дослідження з інокуляції матеріалу від хворих сказом в мозок кролика.

У 1931 р. для культивування вірусів почали використовувати курячі ембріони, які мають високу чутливість до вірусів грипу, віспи, лейкозу, саркоми курей і деяких інших вірусів. Ще й досі курячі ембріони широко використовують для виділення вірусів грипу.

З'ясування природи вірусів. У 1932 р. англійський хімік В. Елфорд створив штучні дрібнопористі колоїдні мембрани й використав їх для *ультрафільтрації* біологічних рідин. Це дало можливість визначити розмір вірусних частинок і диференціювати їх за цією ознакою. З використанням цього методу Елфорд з'ясував, що розмір вірусних частинок знаходиться в межах 20–200 нм.

У 1935 р. американський біохімік У. Стенлі вперше отримав чистий препарат вірусу тютюнової мозаїки у вигляді кристалічного білка. Оскільки приготованим з кристалів розчином білка можна було заразити рослини, Стенлі зробив висновок, що віруси складаються з білка.

У 1937 р. англійські біохіміки Ф. Боуден і Н. Пірі уточнили спостереження У. Стенлі та встановили, що вірус тютюнової мозаїки складається з білка лише на 94%, а ще 6% припадає на нуклеїнову кислоту. Так було встановлено, що вірусна частинка є *нуклеопротеїном* – комбінацією білків та нуклеїнових кислот.

У 1939 р. для вивчення вірусів уперше був застосований електронний мікроскоп. Так почалось дослідження структури вірусних частинок.

У 1949 р. була відкрита можливість культивування тваринних клітин в штучних умовах, що надалі дозволило використати ці культури для вирощування вірусів. Введення у вірусологію методу культури клітин стало важливою подією, бо значно полегшило створення противірусних вакцин. З широко вживаних нині вакцин, створених завдяки цьому методу, зазначимо вакцини проти поліомієліту, паротиту, кору і краснухи.

У 1949 Р. Маркхем і К.М. Сміт виявили, що у препараті вірусу жовтої мозаїки турнепсу присутні два типи ідентичних сферичних частинок; частинки одного типу містили нуклеї-

нову кислоту, а іншого – ні. При цьому інфекційними виявилися лише частинки з нуклеїновою кислотою. Це відкриття сприяло усвідомленню ролі нуклеїнових кислот як носіїв спадкової інформації.

У 1948–1949 рр. А. Херші та Р. Ротман побудували першу генетичну карту бактеріофага Т2.

У 1952 р. А. Херші та М. Чейз виявили, що для зараження бактерійної клітини бактеріофагом достатньо, щоби в бактерію проникла ДНК бактеріофага.

У 1956 р. А. Гірер й Г. Шрамм, а також Х. Френкель-Конрат встановили, що генетичним матеріалом вірусу тютюнової мозаїки є РНК.

У 1971 р. було встановлено, що деякі хвороби рослин, збудниками яких вважали віруси, насправді викликаються *віроїдами* – об'єктами, що складаються лише з РНК та не містять білків. Ці агенти відкрив і дав їм назву американський фітопатолог Теодор Дінер.

У 1982 р. американський лікар С. Прузинер виділив інфекційний агент, що має білкову природу і не містить нуклеїнових кислот. Вчений назвав цей агент *пріоном*.

У 1983 р. був відкритий вірус імунодефіциту людини.

У 2002 р. в Нью-Йоркському університеті був створений перший синтетичний вірус (вірус поліомієліту).

Віруси та біологічні відкриття. Починаючи з 1960-х р. XX ст. розвиток вірусології тісно пов'язаний з молекулярною біологією. Жодне велике відкриття у галузі молекулярної біології не обходилося без вірусної моделі. Зокрема, дослідження експресії генів у вірусів еукаріотів дало фундаментальну інформацію про молекулярну біологію самих еукаріотів – існування кеп-структури мРНК та її роль у трансляції, наявність поліаденілової послідовності на 3′-кінці мРНК; сплайсинг і роль енхансерів в транскрипції уперше були виявлені саме під час дослідження вірусів тварин.

Дослідження вірусів відіграло надважливу роль у розвитку епідеміології, імунології, молекулярної генетики та інших розділів біології. У різні роки як мінімум шість Нобелівських премій з фізіології та медицині і три Нобелівські премії з хімії були вручені за дослідження, безпосередньо пов'язані з вивченням вірусів.

1.2. Природа вірусів

Чим є віруси? Уявлення про природу вірусів змінювалися з розвитком вірусології. Як ми пам'ятаємо з попереднього розділу, у різні часи щодо цього були висунуті такі гіпотези:

- віруси є дуже дрібними бактеріями або бактеріальними токсинами (Д. Івановський);
- віруси є токсичною речовиною (М. Бейерінк);
- віруси є частинками невідомої природи (Ф. Леффлер);
- віруси є білковими частинками (У. Стенлі);
- віруси є частинками, що складаються з білка та нуклеїнової кислоти (Ф. Боуден і Н. Пірі).

Остання гіпотеза зрештою одержала всебічне підтвердження і сьогодні вже не викликає сумнівів. Звісно, що зараз відомі численні інфекційні агенти, які не містять або білків, або нуклеїнових кислот (віроїди, вірусоїди, пріони), однак вони й не розглядаються як віруси. Тож, вірним є наступне «рівняння»:

Вірус = білок + нуклеїнова кислота.

Слід, однак, зауважити, що, всупереч законам математики, обернути це «рівняння» неможливо: не кожне поєднання білків з нуклеїновими кислотами є вірусом.

Окремо варто згадати й виняток зі вказаного правила: безкапсидні віруси родини *Narnaviridae*, які складаються лише з нуклеїнової кислоти (РНК) та не містять білків. Відмінності цих вірусів від віроїдів пояснюються далі.

Чи є віруси живими? Дискусія про те, чи можна вважати віруси живими, не вщухає і досі. І пов'язано це не з тим, що ми недостатньо повно розуміємо природу вірусів, а з тим, що саме поняття життя не має чіткого визначення.

Почнемо з поняття **живого** як властивості, притаманної певним матеріальним об'єктам. Традиційні спроби визначити цю властивість як комплекс конкретних біологічних функцій (розмноження, ріст, розвиток, обмін речовин, гомеостаз, адаптації тощо) варто визнати невдалими. Легко знайти приклади організмів, що не мають тієї чи іншої ознаки, хоча й розглядаються біологами як живі. Наприклад, спори у стані анабіозу фактично позбавлені обміну речовин, бактерії майже не демонструють індивідуального розвитку, а робочі особини еусоціальних комах, личинки, ювенільні та сенільні індивіди багатьох тварин не здатні до розмноження.

У 1950–1960-ті рр. стало зрозуміло, що існування життя забезпечується універсальними молекулярними механізмами, насамперед реплікацією, транскрипцією і трансляцією. Усі інші ознаки є лише опосередкованими наслідками вказаних процесів, наприклад, розмноження є результатом реплікації, а адаптація до змінних умов – наслідком контролю транскрипції. Таким чином, живе можна схарактеризувати як *систему, у якій відбувається реплікація, транскрипція і трансляція*. Однак визначення через терміни, що описують складні багатокомпонентні процеси, є недостатньо універсальним; воно, вочевидь, може виявитися непридатним до позаземного життя. Зважаючи на це, намагаються визначити живе через максимально прості й загальні терміни, сенс яких зрозумілий поза біологічним контекстом. Назвемо декілька найбільш популярних визначень **живої системи:**

- це самопідтримувана хімічна система, здатна до Дарвіновської еволюції (Дж. Джойс, 1995). Це визначення офіційно використовується НАСА для розробки принципів пошуку позаземного життя.
- це система автономних агентів, здатних до самовідтворення та здійснення термодинамічних циклів (С. Кауфманн, 2004).
- це відкрита система, здатна використовувати градієнти концентрації речовин з метою утворення неточних копій самої себе (Г. Ламмер та ін., 2009).
- це термодинамічна система з організованою молекулярною структурою, здатна самовідтворюватись і змінюватись з метою самозбереження (Д. Люттермозер, 2012).

У наведених визначеннях багато спільного. Усі вони наголошують на декількох фундаментальних властивостях живого.

1. *Самовідтворення, або самокопіювання.* Навіть у межах особини, не здатної до розмноження, постійно відбувається поділ та оновлення клітин. Немає жодного прикладу системи, принципово нездатної до створення власних копій, але водночас зарахованої науковцями до живих об'єктів.

2. *Наявність помилок у процесі самовідтворення та здатність успадковувати ці помилки.* Життя не є точним копіюванням певної структури. В усіх відомих випадках воно

еволюціонує за дарвінівським принципом, згадуваним у визначенні Джойса. Сутність цього принципу полягає у тому, що відтворення живих систем супроводжується їхньою *варіабельністю* (мінливістю), тобто створенням варіантів, які відрізняються один від одного індивідуальними «помилками» – *мутаціями*. Ця варіабельність далі виступає як субстрат для *природного добору*, тобто вибіркового виживання і подальшого відтворення найбільш прийнятного з варіантів.

3. *Засвоєння енергії у формі термодинамічного циклу,* тобто перетворення енергії у роботу. Важливим, хоча і не єдиним джерелом енергії у живих системах, є згадувані у визначенні Ламера градієнти, тобто різниці концентрацій певних речовин між двома ділянками всередині живої системи, або на межі між нею та навколишнім середовищем.

4. *Наявність та підтримання певної молекулярної структури.* Саме специфічні структури, утворені розташованими певним чином молекулами, здійснюють самокопіювання та перетворення енергії. Ці структури постійно змінюються у часі (наприклад, у процесі онтогенезу), але водночас постійно відтворюються у циклах розвитку.

Таким чином, об'єкт або систему можна вважати *живими* (або *біологічними* – у цьому випадку це синоніми), якщо вони здатні до неточного самокопіювання певної молекулярної структури та самопідтримання шляхом використання енергії. З цього випливає і визначення самого життя як *процесу* або *властивості*, наприклад таке**: життя** – *це активне, енерговитратне підтримання та відтворення специфічної структури* (Б.М. Мєдніков, 1982). «*Активне* підтримання та відтворення» у цьому визначенні відповідає «*само*підтриманню та *само*відтворенню» з вищенаведених визначень живого. Додавши здатність до дарвінівської еволюції, ми одержимо розширений варіант цього визначення: *життя – це енерговитратне самопідтримання та самокопіювання специфічної структури, що супроводжується виникненням та вибірковим відтворенням помилок.*

Кожна система, що відповідає вищеперерахованому переліку базових ознак життя, може впевнено вважатися живою. Але чи можна скоротити перелік обов'язкових ознак життя до ще меншої кількості ознак, або навіть до однієї єдиної ознаки? Якщо так, то такою ознакою може бути лише самовідтворення. Причина цього напрочуд проста: лише у процесі самовідтворення відбувається еволюція, яка є єдиним відомим нам природним джерелом виникнення специфічних структур, здатних до засвоєння енергії та самопідтримання. Без самовідтворення живі структури просто не мають шансів на виникнення, що принципово відрізняє їх, скажімо, від об'єктів техносфери чи мистецтва, які часто бувають унікальними. Спонтанне ж утворення одиничної живої системи, на кшталт розумної планети Соляріс з роману С. Лема, на поточному рівні знань здається неможливим, бо така система не має предків, від яких вона могла б успадкувати свої специфічні риси. Тож, гранично редуковане визначення життя буде таким: *життя – це самовідтворення.*

Втім, говорячи про самовідтворення, варто замислитись, чи кожний варіант цього процесу дійсно характеризує лише живі об'єкти. Наприклад, клітини самовідтворюються шляхом *матричного синтезу*, тобто збирання біополімерів з «неживих» мономерів, послідовність яких визначається відповідною послідовністю мономерів молекули-зразка. Але у природі можливі й значно простіші варіанти самовідтворення. Наприклад, *пріони*, інфекційні білки, самовідтворюються шляхом перебудови нормальних білків клітини на подібні до себе білки (які, власне, і називаються пріонами). Під час такого перетворення змінюється лише просторова організація білкової молекули, але не її первинна структура. Тож пріон не створює білок з інших речовин, а значить, фактично, не створює і себе самого. У цьому

випадку йдеться про звичайну ланцюгову реакцію, у якій продукт попередньої реакції стає складником наступної. Приблизно так «створюють собі подібних» навіть елементарні частинки, що здійснюють ланцюгову реакцію ядерного розпаду. Вважати їх живими ми, звичайно, не будемо. Тож мінімально необхідною властивістю життя ми будемо вважати лише таке самовідтворення, яке здійснюється шляхом побудови нових, раніше відсутніх молекулярних структур. Єдиним відомим нам прикладом такого самовідтворення є *реплікація нуклеїнових кислот*. Таким чином, у вкрай спрощеному вигляді, *життя – це реплікація*, тобто утворення молекул з простіших складових шляхом матричного синтезу, а *жива система – це система, здатна до реплікації.*

Життя зазвичай реалізується у складі **організму** – *дискретної структури, яка самостійно проявляє властивості живого.* Однак не кожна жива система може вважатися організмом. Наприклад, окремі органи людського тіла є живими системами. Але кістка не розмножується з утворенням інших кісток, а печінка – з утворенням інших печінок, тож організмами вони, звісно, вважатися не можуть. Звичайно, з печінки можна виділити клітини, з яких далі можна буде створити новий організм з новою печінкою. Але для такого самовідтворення завжди буде необхідна фаза цілого організму.

Іншою важливою ознакою організму є дискретність, тобто чітка відокремленість від інших подібних об’єктів. Скажімо, у рослин, що розмножуються кореневищами, кожен окремий пагін потенційно здатний до проявлення усіх властивостей живого. Однак доти, поки він анатомічно і фізіологічно пов’язаний з іншими подібними пагонами, вважати його окремим організмом недоцільно.

На межі між організмом і не-організмом стоять окремі клітини багатоклітинних істот. З одного боку, вони здатні до енерговитратого самопідтримання та самовідтворення самих себе. З іншого, ця здатність проявляється лише в умовах цілого організму або штучних поживних середовищах, які імітують ці умови.

Така «несамостійність» окремих клітин, їхній нерозривний зв’язок з собі подібними, порушує наведене вище визначення організму, хоча і не суперечить визначенню життя як такого.

Цікавим прикладом проміжного стану між організмом і не-організмом є симбіотичні органели: хлоропласти та мітохондрії. У минулому вони були повноцінними організмами й навіть сьогодні здатні не лише відтворювати себе шляхом поділу, але й забезпечувати енергією і себе, і усю клітину. Складність, однак, полягає у тому, що частина генів, необхідних для функціонування цих органел, перенесені до ядра, тож хлоропласт і мітохондрія принципово нездатні до самовідтворення поза межами клітини. Це відрізняє їх від внутрішньоклітинних паразитів (бактерійних та еукаріотичних), яких теоретично можна культивувати поза клітинами хазяїна за умови надання їм усіх необхідних поживних речовин. Крайнім випадком інтеграції симбіотичних органел до клітини є редуковані мітохондрії – **мітосоми**, які повністю позбавлені власної ДНК і відтворюються завдяки своїм генам, перенесеним у ядро. Мітосоми вже точно не можуть вважатись організмами: їхня дискретність є ілюзорною, бо не враховує гени, розташовані поза цими органелами.

Простіші внутрішньоклітинні системи (рибосоми, АТФ-соми, мікротрубочки) тим більше не є організмами. Але чи можна вважати їх живими? Деяким з них властиві окремі ознаки живого: наприклад, рибосоми здійснюють термодинамічні цикли, а мікротрубочки виникають шляхом самозбирання. Однак жодна з цих систем не здійснює самовідтворення

і тим більше не має перерахованих вище чотирьох властивостей життя. Таким чином, відповідність одному або деяким з вищенаведених ознак життя, окрім ознаки самовідтворення, не дозволяє однозначно зарахувати об'єкт до живих систем.

Повернемось до вірусів. Чи відповідають віруси вказаним ознакам живих організмів та живих систем взагалі? На перше питання можна впевнено відповісти «ні». Вірус не є організмом, оскільки властивості життя він ніколи не проявляє у формі дискретної системи з певними кордонами. Вірусна частинка є пасивною структурою, що сама по собі не проявляє біологічних властивостей, хоча й утворюється у живих системах (її можна було б навіть вважати «мертвою» структурою, та зазвичай ми називаємо мертвими колишні живі системи, що вже не здатні повернутися до життя). Біологічні процеси вірус здійснює лише у клітині, де він не має ані постійної локалізації (за винятком так званих «вірусних фабрик», див. розділ 4.5), ані чіткої межі, яка б відділяла його від інших компонентів клітини. Так, активна ДНК ретровірусу, вбудована у хромосому клітини, не має жодних фізичних кордонів, які б відділяли її від власної ДНК хазяїна. Тож віруси не можна вважати організмами.

Але чи можемо ми розглядати їх як живі (біологічні) системи? Значною мірою так, адже вони і розмножуються, і еволюціонують, і використовують енергію у формі «чужих» молекул АТФ, і мають певну, чітко визначену структуру хоча б на стадії вільної вірусної частинки. В той самий час очевидно, що віруси не є активними системами, тож для них значною мірою не прийнятні поняття само-відтворення і тим більш само-підтримання. Обидва ці процеси в усіх відомих нам живих системах забезпечуються білками, а вірусні білки створюються клітинними рибосомами. Тож незрозуміло, чи то віруси відтворюються у клітині, чи радше клітина відтворює віруси.

Таким чином, серед чотирьох ознак життя, перерахованих вище, віруси впевнено відповідають лише одній – здатності до реплікації. Усі системи, які демонструють подібну здатність, заведено називати **реплікаторами**. Як ми вже згадували, єдині відомі нам реплікатори – це *нуклеїнові кислоти*. В сучасних умовах вони функціонують лише у межах живих клітин. Однак у минулому це, вочевидь, було не так: згідно з сучасними уявленнями, виникнення нуклеїнових кислот передувало появі клітин. Навіть зараз, в умовах *in vitro,* деякі нуклеїнові кислоти проявляють здатність до самовідтворення. Так, одноланцюгова ДНК може перетворитися у дволанцюгову шляхом приєднання вільних нуклеотидів *in vitro*, без жодної ферментативної підтримки. А *рибозими* (каталітичні РНК) не лише здатні синтезувати неточні копії самих себе з вільних нуклеотидів, але і здійснюють напрочуд інтенсивну еволюцію шляхом природного добору прямо у «пробірці». Дискретність рибозимів не викликає жодних сумнівів, а це наближує їх до організмів.

Звичайно, можна звернути увагу на те, що жоден «вільний» молекулярний реплікатор не здатен забезпечити себе будівельним матеріалом та енергією для самовідтворення. Але чи є це принциповим? Навіть серед еукаріотів відомі численні паразити, не здатні виживати поза межами тіла хазяїна, а деякі – і поза його клітинами. У деяких бактерій (наприклад, хламідій) відсутня навіть здатність до енергетичного метаболізму, тож вони використовують лише ту енергію, яку накопичує хазяїн. Вочевидь, це не робить їх у наших очах неживими – хоча б тому, що визначення життя включає лише факт витрачання енергії, але не здатність цю енергію генерувати.

Проте, відмінність вільних реплікаторів від молекул, що працюють у живій клітині, існує, просто вона полягає в іншому. Нуклеїнові кислоти здатні нести інформацію. І сутність

цієї інформації є дуже різною. Французький вірусолог П. Фортьє запропонував поділити усі реплікатори на дві групи.

1. Рибосомо-кодуючі – реплікатори, що містять інформацію про рибосоми – молекулярні машини, здатні синтезувати білки. Серед відомих нам біологічних систем лише ця група реплікаторів здатна до повної автономності, що підводить її до поступової індивідуалізації і подальшого формування живого організму, особини, індивіду. Саме до рибосомо-кодуючих реплікаторів належать *клітини* – єдині відомі нам системи, що мають усі без винятку ознаки життя.

2. Капсид-кодуючі – реплікатори, що містять інформацію про білкову оболонку (капсид), яка захищає нуклеїнову кислоту. Вони не містять даних про пристрої для збирання цієї оболонки – рибосоми, тож принципово залежать від рибосом-кодуючих реплікаторів і не здатні в сучасних умовах функціонувати поза ними. Саме до таких систем належать віруси. Щоправда, у деяких вірусів (*Narnaviridae*) капсид повністю відсутній, і їхній РНК-геном кодує лише фермент, необхідний для власного самовідтворення. Близькими до цих безкапсидних вірусів є *ретротранспозони* (*ретропозони*) – мобільні генетичні елементи, здатні кодувати білки, необхідні для їхнього власного самовідтворення у клітині. Безкапсиді віруси й ретротранспозони можна було б назвати «фермент-кодуючими» або «білок-кодуючими» реплікаторами. Втім, такий термін не виглядає вдалим, оскільки рибосомо-кодуючі реплікатори теж кодують білки.

До переліку, створеного Фортьє, ми додамо ще одну категорію реплікаторів.

3. Некодуючі – реплікатори, що не кодують жодних білків. До таких систем належать вірої̈ди, самокопіюючі рибозими, автосплайсингові інтрони – тобто системи, що відтворюються або з білковою підтримкою, або без неї, але самі не містять жодної інформації про білок чи білок-синтезуючий апарат.

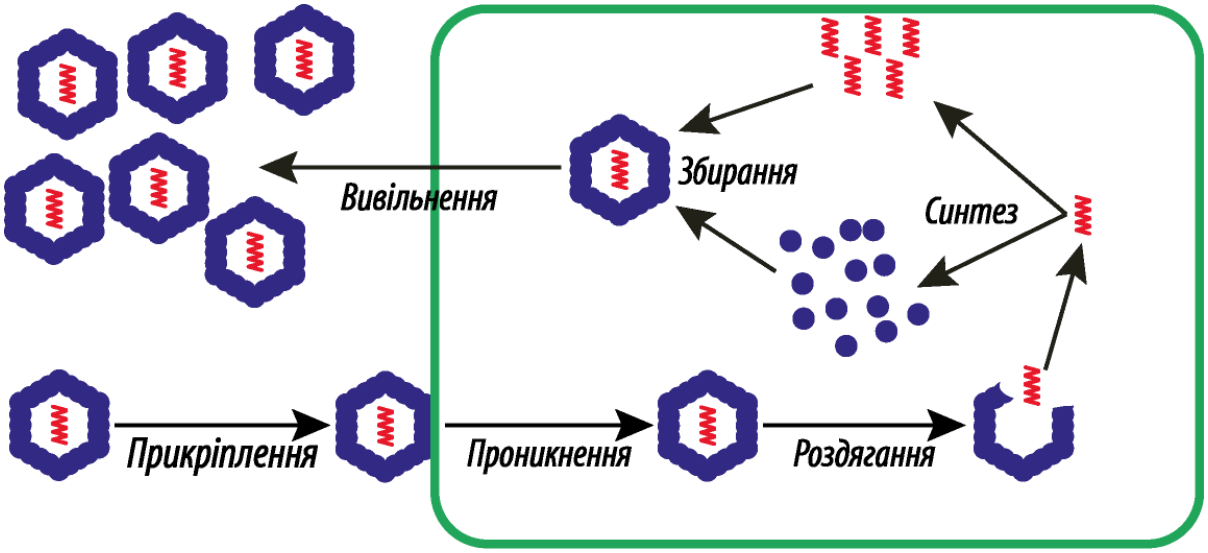
Таким чином, віруси можна визначити як **капсид-кодуючі реплікатори**, або, точніше, **реплікатори, які кодують білки, але не кодують рибосоми.** Це, певною мірою, дозволяє зняти питання про їхню належність до живого світу: віруси живі тією мірою, у якій здатність до самовідтворення тотожна поняттю життя. Як ми з'ясували вище, самовідтворення – найважливіша і найсвоєрідніша, але все ж таки не єдина ознака живого. Тож, вважати віруси живими або ні – врешті-решт питання смаку, правильної відповіді на це питання не існує. Іронізуючи над цією термінологічною проблемою, вірусологи створили ряд жартівливих визначень вірусів, наприклад: *вірус – це шматочок поганих новин, загорнутий у білок*, англ. *virus is simply a piece of bad news wrapped up in protein* (з Нобелівської лекції сера П. Медавара, 1960 р.), або навіть *вірус – це вірус* (Нобелівський лауреат А. Львов, 1965 р.).

Підсумовуючи вищесказане, підкреслимо, що принциповою відмінністю вірусів від клітинних систем є *спосіб* самовідтворення. Нові клітини, завдяки власним рибосомам, завжди виникають безпосередньо з передіснуючих клітин, але нові вірусні частинки ніколи не утворюються безпосередньо з передіснуючих частинок. Вони нездатні *само*-відтворюватися автономно. Натомість вони збираються з компонентів, які синтезуються окремо один від одного всередині клітини хазяїна, тобто їх *реплікує* клітина. У цьому сенсі віруси певною мірою нагадують вищезгаданий приклад з печінкою, яка не здатна відтворювати нові печінки, минаючи стадію цілого організму. Вірус так само невідійманий від клітини, як печінка від тіла тварини, однак суттєво відрізняється від останньої своєю *інфекційною здатністю,* тобто властивістю передаватися від однієї клітини до іншої, змушуючи кожну з клітин від-

творювати себе. Підкреслюючи цю особливість, нобелівський лауреат Дж. Вотсон визначив віруси як *мобільні генетичні елементи, одягнені в захисну оболонку і здатні переходити з однієї клітини до іншої*.

Віруси як сукупність фаз циклу репродукції (реплікації). Як і будь-яка біологічна система, віруси є змінними у часі й мають певний *цикл репродукції*, або *життєвий цикл* (останнє поняття для вірусів вживати небажано). Фактично, поняття «вірус» не може бути прив'язане до однієї окремої фази циклу репродукції, наприклад до вільної вірусної частинки. Звичайно, поняття «метелик» теж включає і яйце, і гусінь, і лялечку, однак у випадку тварин акцент на дорослу особину (імаго) є певною мірою виправданим: саме дорослі особини зазвичай мають найскладнішу будову і поведінку, здатні до розмноження тощо. У циклі реплікації вірусу такого «апогею» немає. Тож розуміння сутності вірусів невіддільне від розуміння їхнього циклу репродукції. У цьому розділі ми розглянемо його максимально коротко (Мал. 1.6).

Зазвичай опис циклу репродукції вірусів починають з **віріона**, або **вірусної частинки.** Це – молекулярний комплекс, що складається з нуклеїнової кислоти та білків та/або ліпопротеїдів (білково-ліпідних комплексів). Він виконує функцію, яку у клітинних організмів здійснюють спори та цисти, тобто забезпечує переживання стресових умов навколишнього середовища та перенесення до нових біотопів (у цьому випадку – клітин організму-хазяїна).



Мал. 1.6. Узагальнена схема циклу репродукції вірусів (ориг.).

Віріон є метаболічно пасивним і не виявляє жодних ознак живого. Однак, увійшовши у контакт з мембраною клітини-хазяїна, він здійснює **прикріплення** до неї. Зазвичай прикріплення є специфічним: білок або білки вірусної частки зв'язуються з цільовими рецепторами на поверхні клітини. Таким чином, сама наявність таких рецепторів визначає вразливість клітини до певного вірусу.

Оскільки реплікація вірусу може відбуватися лише всередині живої клітини, після прикріплення до поверхні вірус має здійснити **проникнення** або **вхід** усередину клітини. Одразу після цього геном вірусу повинен стати доступним для компонентів клітини, які будуть здійснювати ініційовані ним процеси: синтез вірусних білків і нуклеїнових кислот. Це досягається шляхом втрати багатьох або всіх білків, які утворюють вірусну частку, в процесі **роздягання**, або **депротеїнізації**.

Після того, як вірусний геном виявиться доступним для компонентів клітинної біохімічної машинерії, починається етап синтезу білків і нуклеїнових кислот вірусу, у т. ч. нових вірусних геномів і численних мРНК, на яких синтезуються вірусні білки.

Щойно кількість новоутворених білків і нуклеїнових кислот стає достатньою для створення нових вірусних часток, починається етап збирання віріонів. Внаслідок цього процесу цитоплазма клітини може бути цілковито заповнена вірусними частинками. Нарешті, готові віріони вивільняються з клітини та потрапляють у позаклітинний простір, де заражують нові клітини.

В деяких випадках, до або після вивільнення віріонів може відбуватися їхнє дозрівання. Під час кожного циклу репродукції вірусні геноми можуть зазнавати мутаційних змін, які стають субстратом для природного добору. Це призводить до стрімкої еволюції вірусів.

Головні ознаки вірусів. Підсумовуючи вищезазначене, наведемо перелік найважливіших ознак і властивостей вірусів:

1. Віруси є внутрішньоклітинними облігатними інфекційними агентами, що не мають клітинної будови.
2. Поза живою клітиною вірус представлений вірусною часткою, що складається з однієї або декількох молекул нуклеїнової кислоти, поміщених в одну або декілька захисних оболонок з білка та/або ліпопротеїну.
3. Репродукція вірусів відбувається лише усередині відповідних клітин хазяїв.
4. Репродукція вірусів зводиться до синтезу численних копій їхніх білків і нуклеїнових кислот, тобто реплікації. Цей синтез цілком залежить від активності біохімічних систем клітини-хазяїна і як правило локалізується в ділянках, просторово не відокремлених від вмісту клітини.
5. Виникнення нових вірусних часток відбувається за допомогою самозбирання (іноді за певної участі клітини хазяїна) заново синтезованих молекул нуклеїнової кислоти і білків вірусу.

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні вміти:

- обговорити причини вивчення вірусів;
- пояснити, чим віруси відрізняються від клітинних організмів;
- знати найважливіші ознаки вірусів.

РОЗДІЛ 2. ВІРУСНА ЧАСТКА

2.1. Структурна віріонів

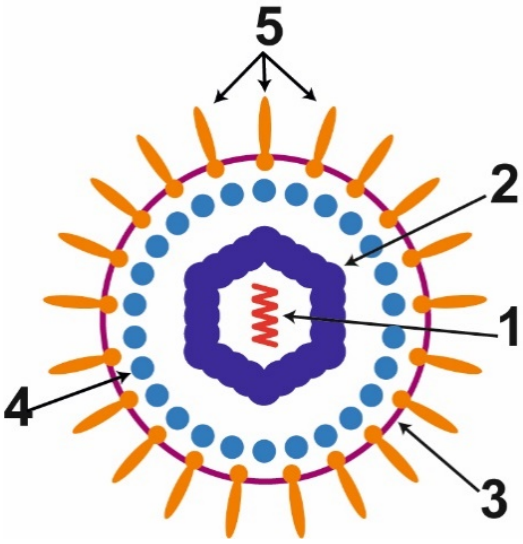
Позаклітинна форма вірусу, або **віріон** – це структура, яка відповідає за доставляння вірусних генів з однієї клітини до іншої. Його функція полягає в захисті вірусного геному під час перебування поза клітиною та забезпеченні його потрапляння в наступну клітину, де він далі зможе реплікуватися і формувати нові віріони.

Обидві ці функції забезпечує білкова оболонка віріона – **капсид,** або **нуклеокапсид** (Мал. 2.1). Білки, що складають цю оболонку, виконують важливі функції:

− захищають нуклеїнові кислоти від механічних пошкоджень та руйнування ферментами нуклеазами;

− розпізнають придатну для зараження клітину (ця функція відсутня у вірусів рослин, які потрапляють в клітину через механічні ушкодження);

− забезпечують вивільнення геному у цитоплазму клітини-хазяїна.



Мал. 2.1. *Схематичне зображення віріона (ориг.). 1 - нуклеїнова кислота (геном вірусу); 2 - капсид (нуклеокапсид); 3 - ліпопротеїнова оболонка (суперкапсид, пеплос); 4 - білкові молекули матриксу; 5 - білкові вирости на оболонці (спайки, пепломери, «шипи»).*

У складніше влаштованих вірусів білковий капсид може бути оточений ліпопротеїновою оболонкою, яка утворює **суперкапсид** або **пеплос** (дав.-грец. *πέπλος*, *πέπλον*, лат. *peplum*, покрив). Треба зазначити, що ці два терміни є застарілими й зараз майже не використовуються у вірусологічній літературі, оболонку так і називають оболонкою або мембраною. Ліпідний компонент цієї оболонки є фрагментом клітинної мембрани, захопленої вірусною часткою під час збирання.

Варто зазначити, що віруси не мають генів, які забезпечували б їм синтез «власних» ліпідів, тож, утворюючи мембрани, вони завжди вдаються до запозичення. Щодо білків оболонки, то вони мають вірусне походження і кодуються вірусними генами.

Білки, вбудовані у оболонку, можуть утворювати помітні в електронний мікроскоп білкові вирости. Спочатку їх називали шипами, проте згодом вони виявилися не гострими і не жорсткими, тож слово «шип» було відкинуте.

Простір між капсидом і ліпідною оболонкою може містити додаткові білкові молекули **– білки матриксу**.

2.2. Морфологія і розмір віріонів

Віріони мають дуже різноманітну форму, залежну від взаємного розташування білків капсиду, їхньої кількості та різноманіття, характеру зв'язків між білками та нуклеїновими кислотами, наявності ліпідної оболонки тощо. Виділяють наступні морфологічні типи віріонів (А – віруси архей; В – віруси бактерій; Е – віруси еукаріотів):

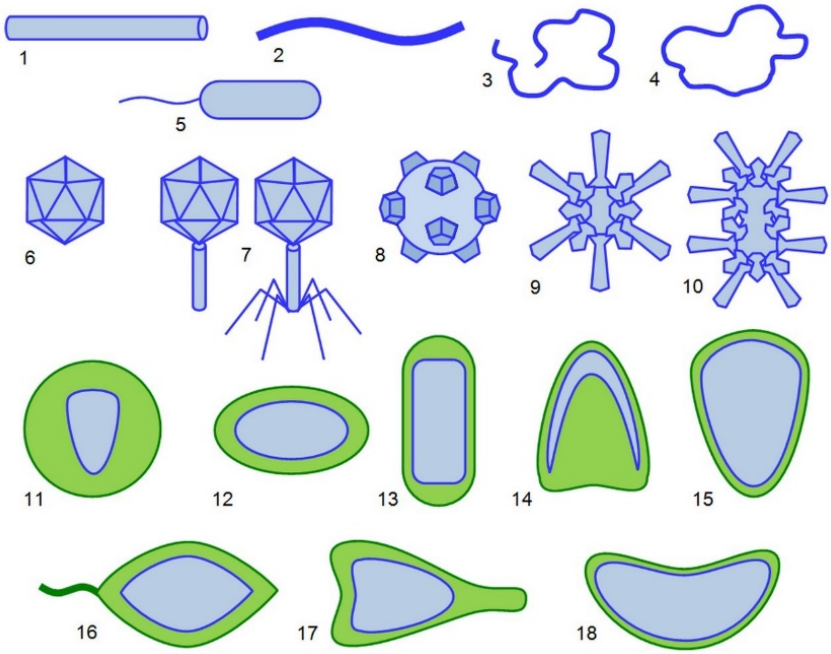
Безмембранні – віріон складається з нуклеїнової кислоти і капсиду.

1. Паличкоподібні (АЕ)
2. Ниткоподібні (АВЕ)
3. Звивисті (Е)
4. Кільчасті (Е)
5. Овоїдні хвостаті (Е)
6. Поліедричні (АВЕ)
7. Поліедричні з хвостами, або віруси типу «голівка-хвіст» (АВ)
8. Зірчасті, або поліедричні з трубчастими капсомерами (ВЕ)
9. Шипуваті (Е)
10. Подвійні шипуваті (Е)

Мембранні – віріон складається з нуклеїнової кислоти, капсиду і ліпопротеїнової оболонки.

11. Сферичні (ВЕ)
12. Еліпсоїдні (Е)
13. Бацилоподібні (Е)
14. Кулеподібні (Е)
15. Краплеподібні (А)
16. Веретеноподібні (А)
17. Пляшкоподібні (А)
18. Бобоподібні (Е)

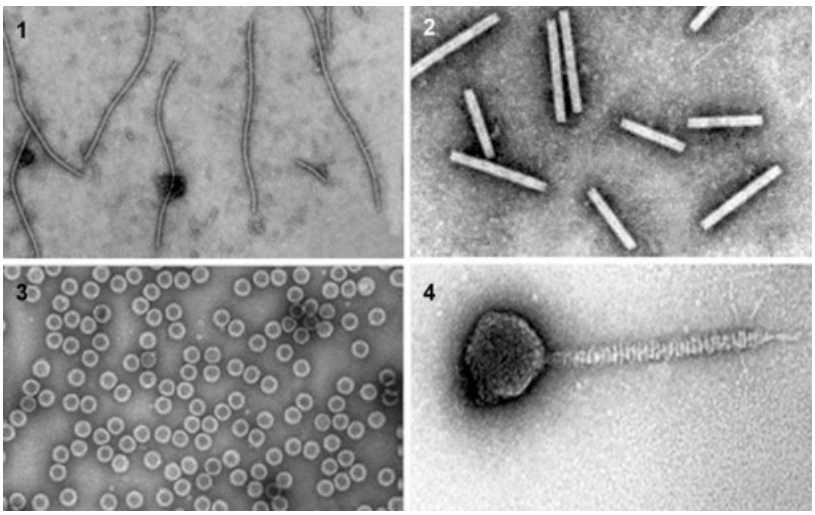
Морфологічні типи віріонів наведені на Мал. 2.2.



Мал. 2.2. *Форми віріонів у вірусів бактерій, архей та еукаріотів (ориг.). Номери відповідають типам, переліченим вище у тексті.*

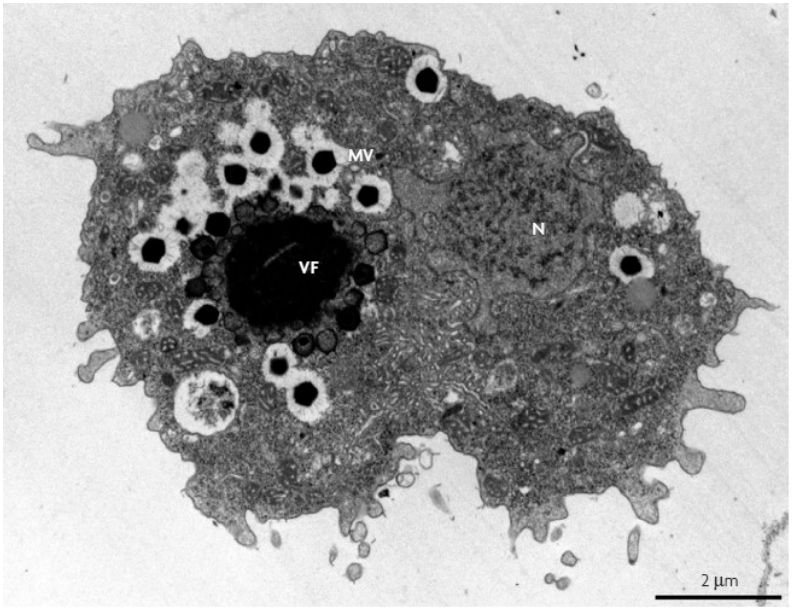
Віріони різних вірусів суттєво відрізняються за розмірами. *Найменші* серед ДНК-вірусів віріони мають цирковіруси свиней (17 нм), а серед РНК-вірусів – пікорнавіруси (менше ніж 30 нм). *Найдовшими* є віріони деяких ниткоподібних вірусів рослин, що мають довжину до 2000 нм (2 мкм). Слід зазначити, що не зважаючи на значну довжину, вони мають украй малий діаметр і залишаються невидимими у світловому мікроскопі.

Електронні мікрофотографії віріонів з різною морфологією наведені на Мал. 2.3.



Мал. 2.3. *Електронні мікрофотографії віріонів, що мають різну морфологію. 1 – ниткоподібні віріони вірусу «віспи» (шарки) слив; 2 – паличкоподібні віріони вірусу тютюнової мозаїки; 3 – сферичні віріони РНК-вірусу лейшманій;4 – віріон бактеріофагу λ, що має морфологію «голівка-хвіст» (за A.M.Q. King et al., 2012).*

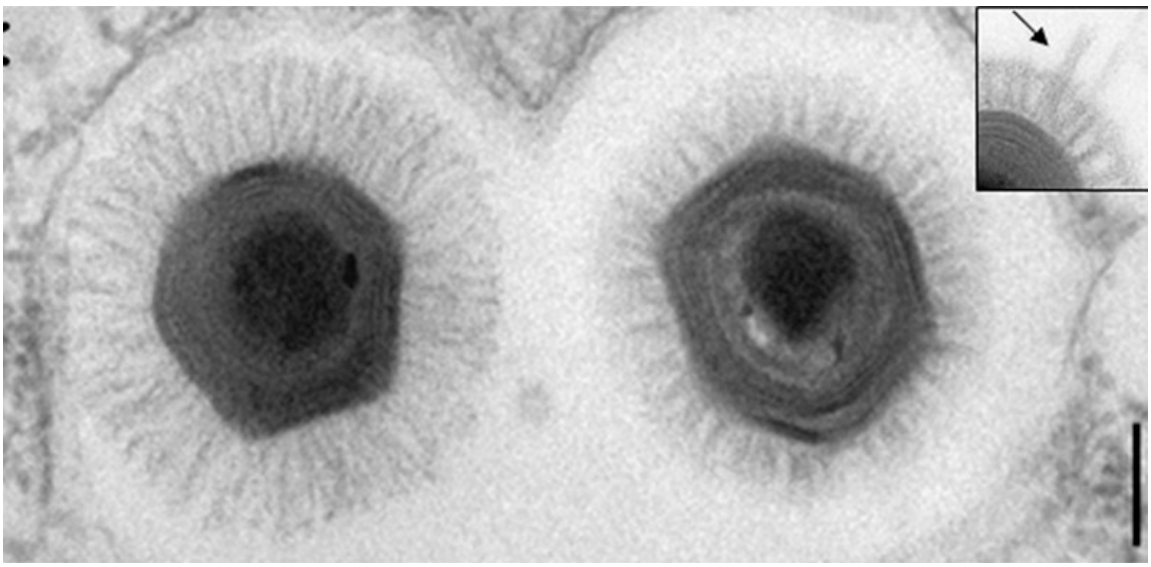
Найбільшими за об'ємом до недавнього часу вважалися еліпсоїдні віріони вірусу натуральної віспи, що мають довжину понад 350 нм. Однак у 2003 р. був відкритий мімівірус, який паразитує в амебі *Acanthamoeba polyphaga*. Його віріон має діаметр близько 400 нм (Мал. 2.4).



Мал. 2.4. *Амеба Acanthamoeba polyphaga, інфікована мімівірусом. N - ядро; VF – «вірусна фабрика» (місце синтезу макромолекул мімівірусу і збирання віріонів); MV - віріони мімівірусу. Трансмісивна електронна мікроскопія (за D. Raoult, P. Forterre, 2008).*

Вперше цей величезний вірус побачили ще в 1993 р., але тоді він був ідентифікований як паразитична бактерія, яка позитивно фарбується по Граму. Нарешті, у 2003 році група французьких дослідників під керівництвом Рауля Дідьє за допомогою електронної мікроскопії визначили, що то не бактерія, а просто дуже великий вірус з ікосаедричним капсидом. Назва «мімівірус» пішла від терміну «мімікрія», тобто вірус, що імітує бактерій.

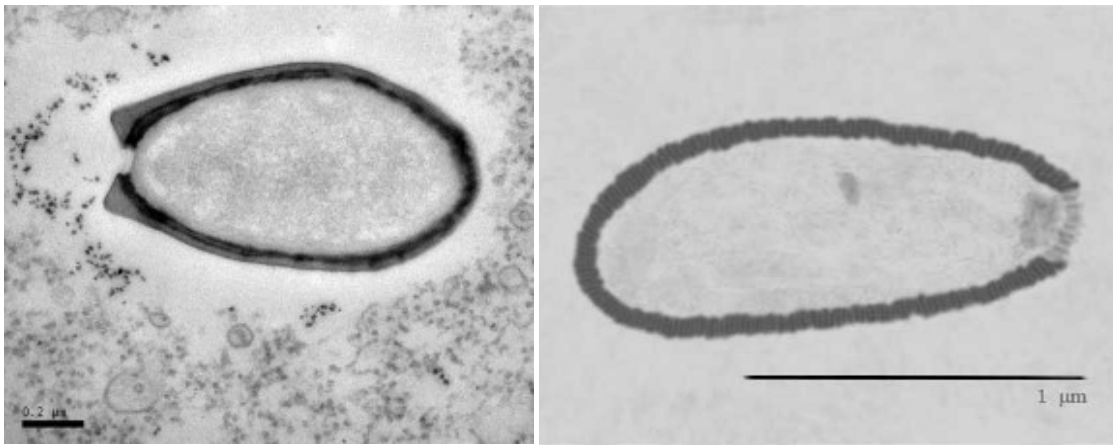
У 2010 р. був відкритий ще більший вірус, який теж паразитує на видах роду *Acanthamoeba – Megavirus chilensis*. Його було знайдено в зразку води, узятому неподалік від узбережжя Чилі. Діаметр віріона мегавірусу перевищує 440 нм (Мал. 2.5).



Мал. 2.5. *Віріони мімівірусу (ліворуч) і мегавірусу (праворуч) в одній вакуолі амеби (спільна інфекція). Стрілкою на врізанні показані пасма, які часто спостерігаються у зовнішньому волокнистому шарі віріона мегавірусів. На вершинах віріонів добре помітна п'ятигранна структура, яку назвали «зоряними воротами» (stargate). Смужка дорівнює 200 нм. Трансмісивна електронна мікроскопія (за D. Arslan et al., 2011).*

У 2013 р. були виявлені гігантські еліпсоїдні віруси з роду *Pandoravirus*: *P. salinus* і *P. dulcis,* що мають 1,2 мкм завдовжки та 0,5 мкм в діаметрі. Перший з цих двох видів має найбільший серед вірусів геном – 2,77 млн пар основ. Так само, як мімівіруси та мегавіруси, пандоравіруси паразитують на *Acanthamoeba*, але *P. salinus* мешкає в Тихому океані біля узбережжя Чилі, а *P. dulcis* – у прісноводому ставку в Австралії (Мал. 2.6, ліворуч).

Нарешті, у 2014 р. був відкритий ще більший вірус, *Pithovirus*, віріон якого має 1,5 мкм завдовжки й 0,5 мкм в діаметрі (Мал. 2.6, праворуч). Проте геном пітовірусу, хоча й досить великий, є на порядок меншим, ніж у пандоравірусів.



Мал. 2.6. *Віріони Pandoravirus (ліворуч) і Pithovirus (праворуч) (за відкритими джерелами Інтернету).*

Цікавою є історія відкриття пітовірусу. Він був отриманий зі зразка багаторічної мерзлоти з Сибіру віком приблизно 30 тис. років. Після розморожування вірус виявився життєздатним і зміг відтворюватися у клітинах амеб.

Таким чином, найбільші відомі віріони не лише помітні у світловий мікроскоп, а й перевищують за розмірами клітини деяких прокаріотів, що можуть сягати лише 0,25×0,1 мкм (*Mycoplasma mycoides*).

2.4. Принципи структурної організації віріонів

Структурна організація вірусних часток визначається їхніми функціями. По-перше, вони мають захистити вірусний геном в агресивному позаклітинному середовищі. По-друге, віріони повинні легко і безпомилково збиратися під час виходу з клітини й так само легко, але контрольовано, розбиратися під час проникнення у наступну клітину.

Усі віруси містять білок і нуклеїнову кислоту, при цьому у віріоні білок складає щонайменше 50%, а в деяких випадках до 90% і більше їх маси. На перший погляд здається, що існує багато способів, за допомогою яких білки можуть бути розташовані навколо нуклеїнової кислоти. Однак віруси використовують лише обмежену кількість конструкцій, що обумовлене міркуваннями ефективності та стабільності.

Ще в 1957 р. Ф. Крік і Дж. Вотсон дійшли висновку, що капсиди вірусів мають бути побудовані з великої кількості ідентичних субодиниць білка. Вони звернули увагу, що геном вірусу занадто малий для того, щоб кодувати гігантську білкову молекулу, розміру якої буде достатньо, щоб укрити усю нуклеїнову кислоту. Значно економнішим є використання великої кількості однакових білкових субодиниць, амінокислотний склад яких визначається достатньо коротким геном. Використання однакових субодиниць сприяє мінімізації помилок під час збирання вірусної частинки: наявність невірно укладених або невикористаних субодиниць при цьому не має критичного впливу на функціональність вірусної частинки.

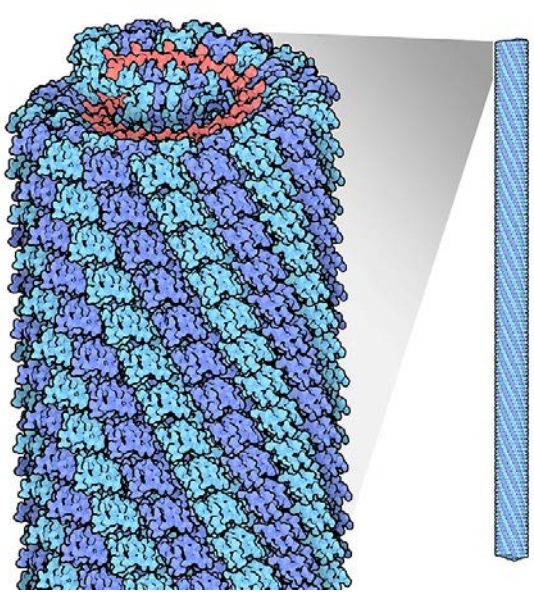
Необхідною фізичною умовою стабільності будь-якої структури є те, що вона знаходиться в стані мінімально вільної енергії. Через це припускається, що між субодиницями утворюється максимальна кількість взаємодій. Водночас будова субодиниць має дозволяти утворення лише обмеженої кількості подібних нековалентних зв’язків, інакше білки б утворювали різноманітні за формою комплекси, не придатні до утворення вірусної частки, та й сам віріон мав би нестабільну структуру.

Оскільки білкові субодиниці несиметричні, максимальна кількість взаємодій може відбуватися лише в тому випадку, якщо вони розташовані *симетрично*, і існує обмежена кількість способів це зробити. Незабаром після початкової роботи над структурою ДНК, Дж. Вотсон і Ф. Крик на теоретичних засадах передбачили, що єдині два способи, за допомогою яких асиметричні субодиниці можуть бути зібрані для формування часток вірусу, це створювати структури з кубічною (замкненою) або спіральною симетрією.

Оскільки є лише два типи організації, за якої ідентичні асиметричні молекули можуть з’єднуватися одна з одною з утворенням симетричного капсиду: **спіральна** та **замкнена**, тож існує лише два відповідних типи структури білкових капсидів. Однак віріони деяких вірусів, приміром, бактеріофагів з родини *Myoviridae*, являють собою комбінації спіральних та замкнених структур.

У вірусних частках зі спіральною організацією білкові субодиниці зв’язуються з нуклеїновою кислотою, розташовуючись уздовж неї періодичним чином, так що вона згортається в спіраль. Найвідоміший приклад такої структури – вірус тютюнової мозаїки, ВТМ (Мал. 2.7).

В замкнених частках нуклеїнова кислота укладена таким чином, щоб не впливати на організацію оболонки. Зв’язки між капсидом і геномом при цьому є значно більш лабільними та різноманітними, аніж за спіральної організації. Прикладом вірусу із замкненою структурою оболонки є аденовірус (див Мал. 2.15)



Мал. 2.7. Будова віріонів спірального типу. Схематичне зображення фрагмента віріона вірусу тютюнової мозаїки. Капсид ВТМ розміром 18×300 нм є спіраллю, що складається з 130 витків з кроком спіралі 2,3 нм. На виток спіралі припадає 16⅓ субодиниць. Спіраль сформована з 2130 ідентичних молекул білка (капсомерів), що містять по 158 амінокислотних залишків. Геномна РНК показана рожевим кольором (за https://pdb101.rcsb.org/motm/109).

2.5. Будова та симетрія капсидів

Симетрія спіральних вірусних часток. Одним з простих способів побудувати симетричну фігуру з несиметричних компонентів є розміщення їх по колу з утворенням диска. Далі такі диски можуть накладатися один на одного, створюючи циліндричну стопку. Проте дослідження вірусних часток показали, що паличкоподібні віріони утворюють структури не у вигляді серії дисків, а у вигляді спіралі. Річ у тому, що лише за спіральної будови зв'язки між білками та нуклеїновою кислотою можуть бути однаковими (Мал. 2.7), окрім крайніх на обох кінцях. Симетрію спіральних структур зручно описувати за допомогою двох параметрів: кількості білкових субодиниць на виток, u, та відстані між одиницями уздовж осі спіралі, P. Крок спіралі P дорівнює добутку p на u; $P = pu$.

Віріони спіральної структури мають поворотну вісь симетрії, яка збігається з віссю спіралі.

Симетрія замкнених вірусних часток. Замкнені оболонки віріонів являють собою чохли більш-менш округлої форми, побудовані з окремих субодиниць, які специфічно взаємодіють між собою. У типовому випадку вони є правильними опуклими багатогранниками. Багатогранник називається опуклим, якщо усі його зовнішні кути є більшими за внутрішні, і правильним, якщо усі його грані являють собою рівні правильні багатокутники та у кожній його вершині сходиться однакова кількість ребер (Мал. 2.8).

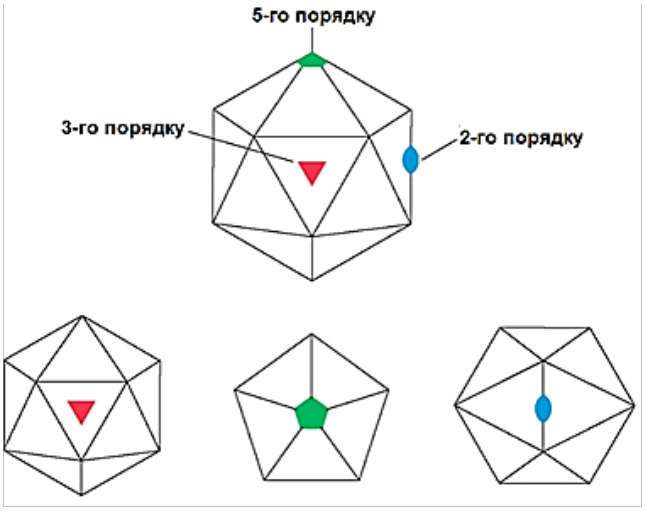


Мал. 2.8. Правильні опуклі багатогранники. Зліва направо: тетраедр, куб (гексаедр), октаедр, додекаедр, ікосаедр.

Дослідження електронних мікрофотографій виявляє, що багато вірусів насправді мають ікосаедричні віріони (точніше віріони з ікосаедричною симетрією). Така форма дозволяє створити капсид певного об'єму з субодиниць найменшого розміру, тобто з мінімальною витратою генетичного матеріалу. По-друге, вірогідно, існують фізичні обмеження, які перешкоджають щільному приляганню субодиниць при інших типах багатогранників. З цієї причини серед усіх опуклих багатогранників лише ікосаедр використовується у природі для побудови ізометричних замкнених віріонів. Цю закономірність у 1962 р. встановили американські дослідники Д. Каспар і А. Клуг.

Ікосаедр (Мал. 2.9) має 20 ідентичних граней, кожна з яких є рівнобоким трикутником, 12 вершин, і осі симетрії п'ятого, третього і другого порядків. Порядок осі обертальної симетрії є числом, на яке слід розділити 360°, щоб визначити кут, під час повороту на який тіло переходить саме в себе. Так, для осі симетрії п'ятого порядку цей кут дорівнює 72°, третього порядку – 120°, другого порядку – 180°.

Слід звернути увагу на те, що ікосаедричний тип симетрії не обов'язково означає, що віріон матиме саме форму ікосаедра. Навіть якщо об'єкт має сферичну (Мал. 2.10) або еліпсоїдну форму, розташування його складових може підпорядковуватись ікосаедричній симетрії. Тож відомо багато віріонів, які підпорядковуються ікосаедричній симетрії, але не мають форму ікосаедра.



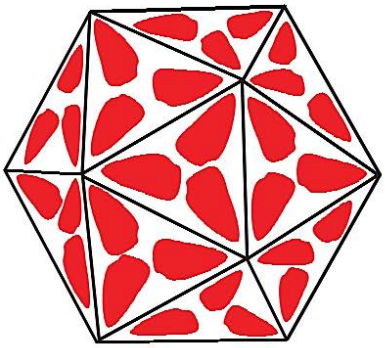
Мал. 2.9. *Ікосаедрична симетрія. Показано положення осей симетрії правильного ікосаедра і вид ікосаедра з боку осей симетрії (за Carter & Saunders, 2013).*

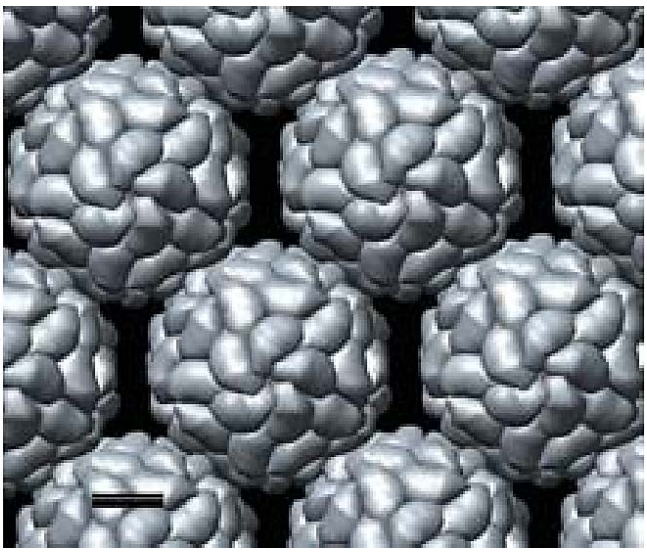


Мал. 2.10. *Приклад об'єкту, що має симетрію ікосаедра, але не є ікосаедром.*

Як вперше підрахували Дж. Вотсон і Ф. Крик, правильний ікосаедр можна побудувати з мінімум 60 ідентичних субодиниць, які однаковим чином взаємодіють одна з одною, тобто мають *еквівалентні* зв'язки. На кожну трикутну грань такого ікосаедра буде припадати по три білкові молекули. Капсиди багатьох дрібних вірусів дійсно мають подібну будову (Мал. 2.11).

Проте у більшості вірусів молекула нуклеїнової кислоти є занадто великою, щоб поміститися в капсид з 60 білкових субодиниць. Яким чином цю проблему можна розв'язати? Просте збільшення розміру білкової субодиниці не призведе до успіху, адже білок більшого розміру вимагатиме для свого кодування більшої довжини вірусного геному.





Мал. 2.11. *Ліворуч – схема розташування 60 молекул білка (показані червоним кольором), по три на кожну трикутну грань ікосаедра, з еквівалентними, тобто однаковими зв'язками для кожної молекули. Праворуч – реконструкція капсиду сателіта вірусу тютюнової мозаїки. Зверніть увагу, що в кожній вершині ікосаедра п'ять молекул білка сходяться разом і утворюють пентамерний кластер. Смужка дорівнює 5 нм (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Більш ефективним рішенням є збільшення кількості білкових субодиниць зі збереженням їх невеликого розміру. Проте кількість субодиниць не може збільшуватись довільно. Д. Каспар і А. Клуг показали, що кожну трикутну грань ікосаедра можна умовно розділити на декілька рівнобоких трикутників меншого розміру, кожен з яких може бути утворений окремими білковими молекулами.

Багатогранники, які утворяться у результаті, матимуть ікосаедричну симетрію, проте можуть і не бути істинними ікосаедрами. Іноді ці фігури називають ***ікосадельтаедрами*** (Мал. 2.12).



Мал. 2.12. *Приклади правильних багатогранників, що мають ікосаедричну симетрію (ікосадельтаедрів). Істинними ікосаедрами є лише перша і друга фігури зліва.*

Кількість трикутників на кожну грань ікосаедра називають тріангуляційним числом *T*. Чому воно може дорівнювати, тобто на скільки рівнобоких однакових трикутників можна розділити кожну трикутну поверхню ікосаедра? Відповідь дає наступна формула:

$$T = Pf^2$$

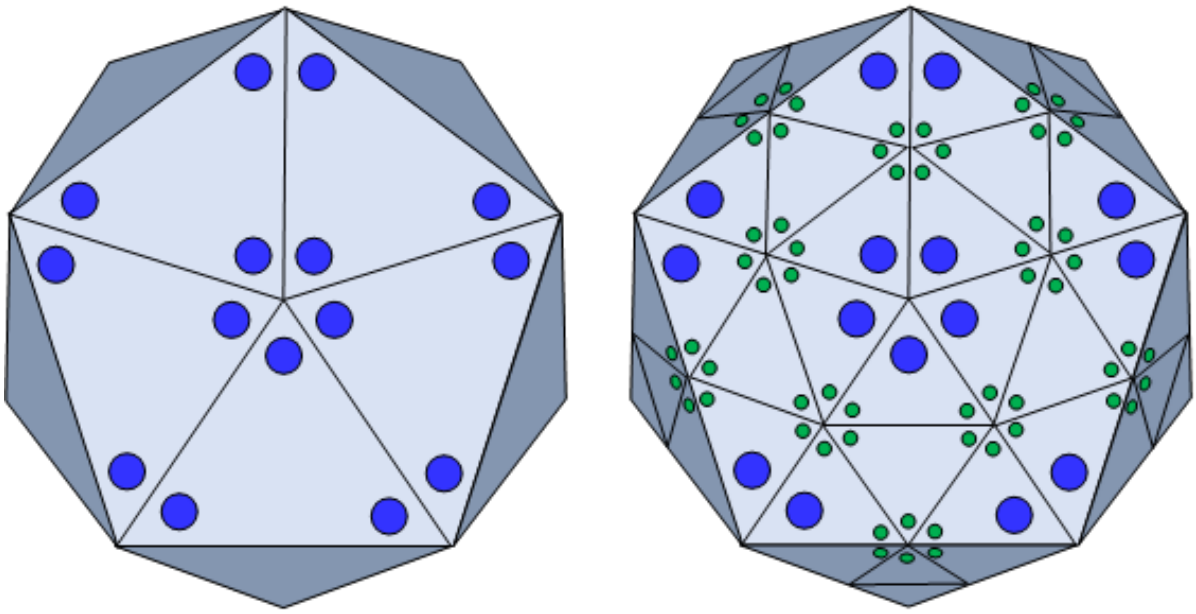
де *T* – тріангуляційне число, а *P* визначається виразом $h^2 + hk + k^2$ (*h* і *k* є натуральними числами, що не мають спільного множника); *f* – будь-яке ціле число.

В усіх досліджених на сьогодні вірусів, *P* дорівнює 1 (*h* = 1, *k* = 0), 3 (*h* = 1, *k* = 1) або 7 (*h* = 1, *k* = 2). Таким чином, *T* може набувати значень 1, 3, 4, 7, 9, 12, 13, 16, 19, 21, 25, 27, 28 і так далі. Якщо *P* = 1 або 3, утворюються правильні ікосаедри. Загальна кількість субодиниць білка в капсиді дорівнює 60*T* (Табл. 2.1).

Таблиця 2.1. *Приклади геометричних параметрів віріонів деяких вірусів.*

P	f	$T=Pf^2$	Кількість субодиниць ($60T$)	Приклад
1	1	1	60	Сателіт вірусу некрозу тютюну
3	1	3	180	Вірус кущистої карликовості томатів
1	2	4	240	Вірус Синдбіс
1	4	16	960	Герпесвіруси
1	5	25	1500	Аденовіруси

У міру збільшення кількості субодиниць, з яких побудований віріон, зв'язки між ними перестають бути еквівалентними. Наприклад, в простому випадку, якщо T=1, віріон буде побудований з 60 субодиниць. Вони розташовані по кутах кожної трикутної грані. Усі субодиниці у вершинах ікосаедра об'єднані в групи по п'ять – *пентамери*, і кожна субодиниця має абсолютно однотипні, еквівалентні зв'язки з сусідніми субодиницями (див. Мал. 2.10). Проте якщо T=4, віріон вже будуватиметься з 240 субодиниць, і деякі з них не торкатимуться вершин ікосаедра й об'єднуватимуться в групи по шість – *гексамери*. Таким чином, зв'язки між субодиницями, що знаходяться в різних частинах капсиду, не будуть еквівалентними (Мал. 2.13).



Мал. 2.13. Розташування 60T ідентичних субодиниць на поверхні ікосаедра. Ліворуч випадок з T=1, 60 субодиниць розташовані у вершинах кожної трикутної грані. Усі субодиниці зв'язані еквівалентними зв'язками. У вершинах ікосаедра вони утворюють пентамери. Праворуч випадок з T=4. Кожна трикутна грань розділена на 4 однакових рівнобоких трикутника. 240 субодиниць розташовані у вершинах цих трикутників. Сині крапки позначають ділянки, де з'єднуються субодиниці, що утворюють пентамери, зелені крапки – ділянки, де з'єднуються складові гексамерів.

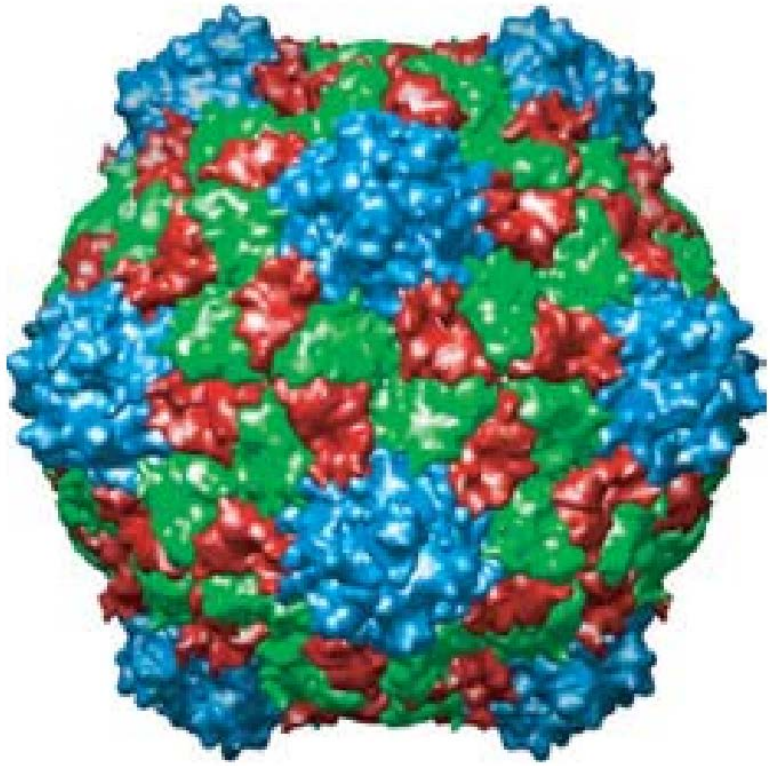
Чи можна забезпечити існування двох альтернативних типів зв'язування для однакових субодиниць? Так, якщо між субодиницями в складних віріонах формуються **квазіеквівалентні зв'язки,** існування яких було передбачене Д. Каспаром і А. Клугом. Нековалентні зв'язки, що формуються між білковими субодиницями, здатні до певної пластичності. Завдяки цьому субодиниці ніби «підлаштовуються» під конкретне положення в капсиді, і зрештою формують правильну ікосаедричну структуру з мінімумом вільної енергії. Здатність до квазіеквіваленості зумовлена тим, що у білках капсиду присутній невеликий сегмент

довжиною 10–30 амінокислотних залишків, який залежно від свого мікрооточення утворює різну конформацію.

На електронних мікрофотографіях віріонів часто спостерігаються стійкі комплекси з п’яти або шести субодиниць. З’єднання білків капсиду у такі групи назвали **пентамерно-гексамерною кластеризацією**, а самі групи – **пентонами** й **гексонами**. Ймовірно, утворення цих комплексів сприяє збільшенню до максимуму кількості контактів між субодиницями, що повинно виключати утворення між ними щілин. У ікосадельтаедрів, що не є істинними ікосаедрами, віріон має 12 пентонів і $10\cdot(T–1)$ гексонів.

У багатьох віріонах саме пентаметри й гексамери, а не окремі білкові молекули, стають структурними одиницями будови капсиду – **капсомерами**. Часто саме ці, складні за будовою капсомери є видимими в електронному мікроскопі. Взагалі, морфологічна одиниця може вважатися капсомером, якщо білки, з яких вона складається, утворюють більш-менш міцний агрегат і залишаються разом в умовах м’якої дезінтеграції. Втім, у найпростіших вірусів капсомером є окрема білкова молекула.

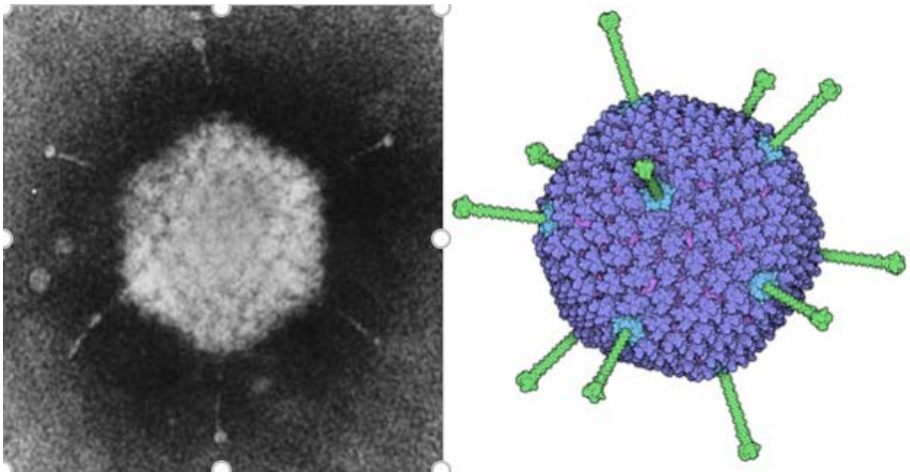
Квазіеквівалентність – лише один зі способів створити ікосаедричний капсид із різною симетрією вершин. Альтернативним шляхом є утворення капсиду з декількох типів білка. Наприклад, капсид вірусу мозаїки вігни (*Vigna villosa*, род. Бобові) складається з білків двох типів, перший з яких формує пентамери, а другий – своєрідні гексамери, специфіка яких полягає у тому, що кожні два сегменти цього гексамера є субодиницями *однієї* молекули білка. Таким чином, гексамер у цьому випадку утворюється не шістьма, а лише трьома молекулами (Мал. 2.14).



Мал. 2.14. *Модель капсиду вірусу мозаїки вігни, що складається з двох типів молекул білка. Білок першого типу (показаний синім кольором) формує 12 пентамерів на вершинах ікосаедра, тоді як молекули другого білка, що складаються з двох доменів (показані зеленим і оранжевим) формують 20 гексамерів на гранях. Кожен гексамер формується з шести субодиниць, або трьох молекул (за (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Поверхня капсидів має дуже різноманітну топографію. Білкові молекули можуть утворювати западини, гребні, виступи тощо. Деякі віруси з ікосаедричними капсидами мають

додаткові структури. Наприклад, віріони аденовірусів мають у кожній з 12 вершин ниткоподібні вирости (фібрили) (Мал. 2.15). Фібрили закріплені на пентаметрах, що складаються з п’яти поліпептидних ланцюгів. Грані ікосаедра утворені гексамерами. Разом капсид аденовірусів складається з 1500 субодиниць: 1440 з них розташовані в гексонах і 60 (тобто 12·5) – в пентонах.

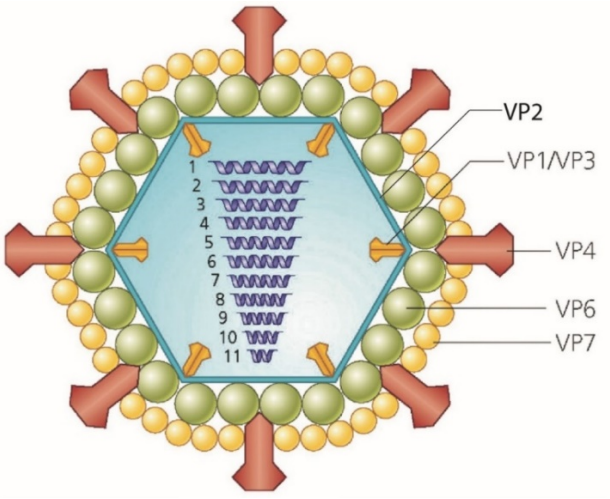


Мал. 2.15. *Структура капсиду аденовірусів (T=25, 1500 субодиниць). Ліворуч електронна мікрофотографія віріона, праворуч модель капсиду, на якій показані групування капсомерів (240 гексамерів і 12 пентамерів) і фібрили на вершинах капсиду (за відкритими джерелами Інтернету).*

Існують віруси з ікосаедричними віріонами, структура яких залишається достеменно невідомою. Так, віруси роду *Levivirus*, ікосаедричні бактеріофаги з РНК-геномами, мають капсиди з *T*=3, тобто складаються зі 180 білкових субодиниць. Але до складу капсиду входить одна молекула додаткового білка, який забезпечує прикріплення віріонів до бактерій (Мал. 14.21). У який спосіб ця додаткова молекула вбудована у капсид, залишається невідомим.

Інколи ікосаедричні віріони мають напрочуд складну структуру. Наприклад, частинки ротавірусів містять тришаровий капсид, що оточує структуру серцевини (кора). Ротавірус кодує 12 білків. З них шість розташовані у віріоні: три утворюють внутрішню оболонку, один утворює середню оболонку і два утворюють зовнішню оболонку. Зовнішня та середня оболонки мають ікосаедричну симетрію, причому зовнішня оболонка має симетрію T=13 (13 × 60 субодиниць), а проміжна — T=2 (2 × 60 субодиниць). Внутрішня оболонка складається зі 120 молекул білка VP2, який утворює стійку структуру для підтримки середньої оболонки, що складається з білка VP6. Кор містить геном, що включає 11 сегментів дволанцюгової РНК та окремі молекули білків VP1 та VP3, які разом утворюють РНК-полімеразу віріона, можливо розташовану у кожній з 12 вершин ікосаедра (Мал. 2.16).

Цікаві варіації морфології й будови віріонів мають згадані вище гігантські віруси. Наприклад, мімі- і мегавіруси (Мал. 2.5). мають ікосаедричні білкові капсиди та внутрішню мембрану, яка оточує внутрішнє ядро (кор). Але ікосаедрична симетрія порушена п’ятигранною структурою, яку назвали «*зоряними воротами*» (stargate). Вона присутня лише у вершині частинки. За винятком цієї структури, вся поверхня капсиду вкрита білковими фібрилами, що позитивно фарбуються по Граму. «Зоряні ворота» слугують для вивільнення внутрішнього нуклеоїду вірусу: коли вона відкривається, це дозволяє внутрішній ліпідній мембрані віріона зливатися з мембраною фагосоми *Acanthamoeba*, що призводить до доставлення нуклеоїду віріона в цитоплазму.

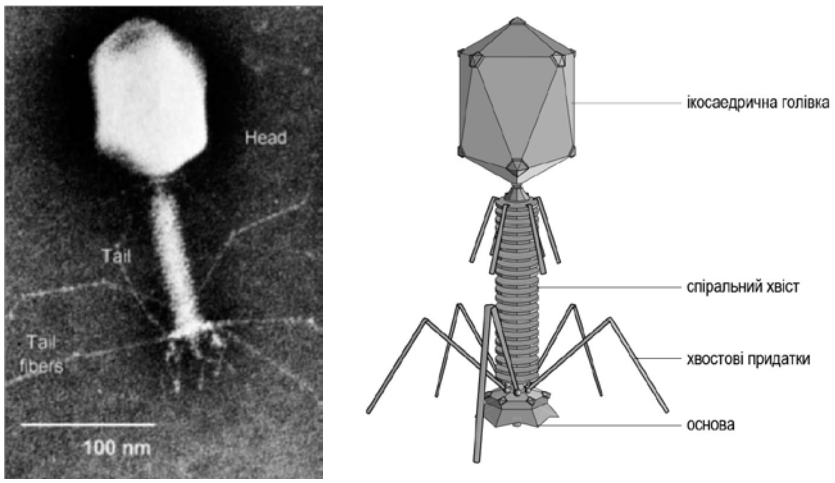


Мал. 2.16. Схематичне зображення структури потрійної оболонки ротавірусу, на якій показане розташування білків у віріоні. Цифрами від 1 до 11 зазначені 11 сегментів длРНК (за N.J. Dimmock et al., 2016).

У пандоравірусів (Мал. 2.6, ліворуч) овоїдні віріони оточені мембраною, під якою розташована оболонка (тегумент) товщиною 70 нм, на верхівці якого є пора, через яку вміст віріона потрапляє в цитоплазму амеби.

Віріон пітовірусів (Мал. 2.6, праворуч) зовні дуже нагадує віріон пандоравірусів. Він оточений оболонкою товщиною 60 нм, яка підіслана мембраною. Дозрілі частинки пітовірусу також мають апікальний отвір, який закорковується «пробкою», складеної з надзвичайно правильної гексагональної сотоподібної сітки. На початковій стадії зараження ця пробка викидається у вакуолі амеб, що дозволяє вмісту вірусної частки доставлятися до цитоплазми хазяїна після злиття внутрішньої мембрани віріона з мембраною фагосоми.

Віріони комбінованої будови. У межах трьох родин бактеріофагів відома комбінована морфологія «голівка-хвіст», яка об'єднує принципи спіральної та ікосаедричної симетрії (Мал. 2.17): голівки, що містять нуклеїнову кислоту, мають ікосаедричну симетрію, а хвости – спіральну.



Мал. 2.17. Віріони, що мають морфологію голівка-хвіст. Ліворуч - електронна мікрофотографія бактеріофага, праворуч – модель будови віріону бактеріофага.

В межах цієї морфології виділяють три варіації: короткий хвіст (родина *Podoviridae*), довгий хвіст, що не скорочується (родина *Siphoviridae*), і складний хвіст, що скорочується (родина *Myoviridae*). Інші структури у складі віріона, на кшталт комірців і базальних пластинок, мають переважно променеву симетрію.

Деякі віруси мають капсиди, які не відповідають розглянутим вище структурам, і правила, які направляють їхнє формування, залишаються незрозумілими. Наприклад, капсид ВІЛ має конусоподібну форму, а вірус віспи, окрім внутрішнього спірального капсиду, має розташовану поза ним білкову оболонку еліпсоїдної форми, укладену численними капсомерами. Закономірності морфогенезу віріонів цих вірусів наразі невідомі.

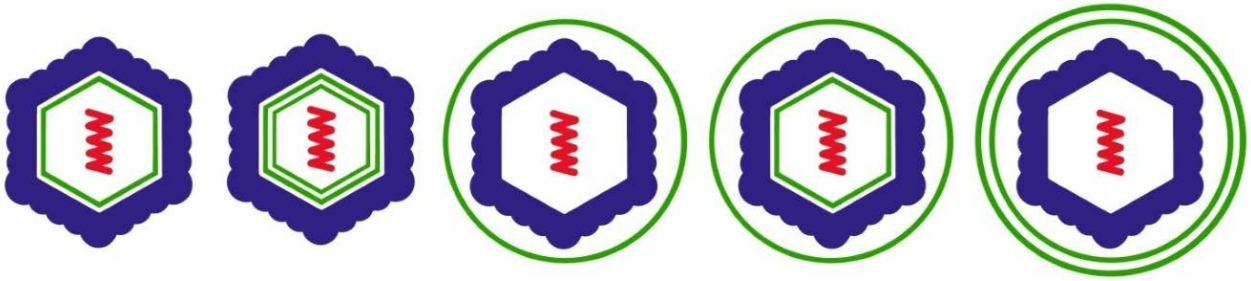
2.6. Ліпідні оболонки віріонів

Віруси з оболонкою, хоча виглядають складними, мають звичайну ізометричну або спіральну структуру капсида, оточеного мембраною — ліпідним бішаром товщиною 4 нм, що містить білки. Внутрішню структуру зазвичай називають нуклеокапсидом, щоб диференціювати його від капсида вірусів, у яких відсутні оболонки. Ліпідні мембрани у більшості випадків знаходяться на поверхні віріонів, значно рідше – усередині капсиду. У першому випадку форма вірусної частки визначається саме ліпідною оболонкою, а також вбудованими у неї білками. Ліпідні оболонки можуть оточувати як спіральні, так і ікосаедричні капсиди. Варто зазначити, що оточені оболонкою віруси вражають переважно еукаріотів, позбавлених клітинної стінки (тварин та деяких протистів).

Оболонка віріона утворюється у процесі відбруньковування від мембрани хазяїна: плазмолеми, мембрани ендоплазматичного ретикулума, апарату Ґольджі або навіть зовнішньої чи внутрішньої мембрани ядерної оболонки. Перед включенням до віріона мембрана хазяїна зазнає глибоких модифікацій. Наприклад, оболонка віріона вірусу імунодефіциту людини 1, яка походить від плазматичної мембрани клітини хазяїна, після включення у віріон містить більше холестерину і сфінгомієліну та менше фосфатидилхоліну і фосфатидилінозиту, ніж вихідна мембрана хазяїна.

Якщо вірус здатний реплікуватися у клітинах різних хазяїв, вибір хазяїна суттєво впливатиме на склад ліпідів оболонки віріона. Наприклад, віруси роду *Alphavirus* реплікуються як в клітинах ссавців, так і в клітинах комах. І коли вірус лісу Семлікі (збудник однойменної лихоманки) реплікується в клітинах нирки хом’яка, оболонка дочірніх віріонів містить приблизно в п’ять разів більше холестеролу, ніж у того самого вірусу, який реплікується в клітинах комарів.

Ліпідні мембрани, розташовані під поверхнею капсиду, певною мірою повторюють його форму (Мал. 2.18). Формування таких мембран пов’язане з накопиченням білків капсиду на їхніх поверхнях (наприклад, у вірусів родини *Corticoviridae*). Цей механізм, однак, не може пояснити існування вірусів, які мають як внутрішню, так і зовнішню мембрани (деякі *Iridoviridae*) або віріонів, вкритих двома зовнішніми (*Poxviridae*) або внутрішніми (*Mimiviridae*) мембранами.



Мал. 2.18. *Типи розташування ліпідних оболонок у складі віріонів (ориг.). Зеленим кольором показана ліпідна оболонка, темно-синім – білкова оболонка (капсид), червоним – нуклеїнова кислота.*

З мембраною оболонки вірусів завжди асоційовані один або декілька типів вірусних білків. Найчастіше вони є інтегральними, тобто вбудовані у мембрану, мають складну мультимерну будову, тобто складаються з декількох субодиниць. Усі ці білки кодуються вірусними геномами (виняток складають деякі білки *Retroviridae*). Тож під час формування оболонок відбувається не лише включення до їхнього складу вірусних білків, а й витіснення білків клітини хазяїна. Яким чином виключаються клітинні білки і чому деякі віруси не виключають клітинні білки зі своїх віріонів, не зрозуміло.

2.7. Хімічний склад віріонів

Нуклеїнові кислоти. Клітини усіх живих організмів містять два види нуклеїнової кислоти – ДНК (дволанцюгова ДНК клітинного геному) і РНК (переважно одноланцюгові мРНК, тРНК, рРНК, численні типи малих регуляторних РНК). На відміну від клітин, віріони містять лише один вид нуклеїнової кислоти – ДНК або РНК, причому, незалежно від складу, вона виконує одну функцію: зберігає і реалізує спадкову інформацію. Приблизно 20% усіх вірусів мають ДНК-геном, 80% – РНК-геном. В сучасному світі зберігання генетичної інформації у вигляді РНК є унікальною властивістю вірусів, але існують припущення, що предки клітинних організмів також могли мати РНК-геном.

Наявність одного виду нуклеїнової кислоти є характеристикою віріона, але не вірусу. У циклі реплікації ДНК-вірусу його геномна ДНК транскрибується з утворенням РНК. Своєю чергою, деякі РНК-віруси мають в циклі репродукції стадію зворотної транскрипції та синтезують ДНК на матриці РНК.

Кожна молекула нуклеїнової кислоти вірусного геному є або одноланцюговою (ол, ss), або дволанцюговою (дл, ds); таким чином, вірусні геноми можна розділити на чотири типи: **длДНК, олДНК, длРНК** і **олРНК**. І якщо длДНК вірусів являє собою такий же тип спадкового матеріалу, як і в усіх живих організмів, то інші три типи геному є унікальними для вірусів. Цікаво відмітити, що більшість вірусів грибів мають в геномі длРНК, у вірусів рослин геном зазвичай представлений олРНК, а більшість бактеріофагів мають длДНК-геноми. Причина такого розподілу, можливо, пов’язана з різною історією виникнення вірусів у цих хазяїв.

Подальшу класифікацію нуклеїнових кислот вірусів можна здійснити на підставі того, чи є їх молекули лінійними, з вільними 5′- і 3′-кінцями, або кільцевими. Своєю чергою, кільцеві молекули можуть одержувати свою форму або внаслідок ковалентного зв’язування, або внаслідок спаровування комплементарних основ на їхніх кінцях.

Розмір геномів вірусів варіює в надзвичайно широких межах. До найменших можна віднести олДНК-геноми цирковірусів свиней і вірусу гепатиту D, що мають довжину близько 1700 нуклеотидів.

Найбільші РНК-геноми виявлені у коронавірусів, вони складають близько 33 000 нуклеотидів олРНК. Найбільші ДНК-геноми відомі у пандоравірусів і досягають 2 500 000 пар нуклеотидів длДНК.

Більшість вірусних геномів складаються з єдиної молекули нуклеїнової кислоти. Але відомі й випадки, коли вірусні геноми утворені з двох або більше сегментів. Такі *сегментовані* геноми частіше трапляються у РНК-вірусів. Особливо це характерне для вірусів, що містять длРНК.

Основною функцією вірусних геномів, звичайно, є кодування вірусних білків. Однак деякі з них також містять регуляторні послідовності, які забезпечують контроль експресії генів. Регуляторні ділянки одноланцюгових нуклеїнових кислот можуть утворювати вторинні структури на кшталт шпильок або псевдовузлів, і навіть згортатися в третинні структури, важливі для реплікації вірусів.

Для деяких вірусів характерні модифікації кінців лінійних нуклеїнових кислот, наприклад їхнє зв'язування з молекулою білка або утворення кепа на 5′-кінці та поліаденілового хвоста на 3′-кінці РНК.

У складі капсиду нуклеїнові кислоти формують складні суперспіральні структури. Згортання геному для пакування в обмежений простір капсиду утруднюється взаємним відштовхуванням негативних електростатичних зарядів фосфатних груп. Віруси долають це утруднення шляхом пакування разом з геномом низки позитивно заряджених речовин (Na^+, Mg^{2+}, K^+, поліамінів), які нейтралізують негативні заряди. Крім того, нуклеїнові кислоти вірусів можуть бути нековалентно пов'язані з білками, збагаченими позитивно зарядженими амінокислотними залишками. Деякі віруси з дволанцюговою ДНК мають подібні до гістонів позитивно заряджені білки, тісно пов'язані з ДНК. Геном вірусу поліоми захоплює гістони клітини хазяїна (H2A, H2B, H3 і H4), набуваючи завдяки ним хроматиноподібну суперспіральну структуру.

Білки. Кількість білків, що входять до складу віріона, залежить від об'єму вірусного геному. Так, віріон вірусу тютюнової мозаїки, що має невеликий геном, містить лише один вид молекул білка, – той, що формує його спіральний капсид. Віріони парвовірусів містять 2–4 типів білка. У міру збільшення розмірів геному, кількість видів закодованих у ньому молекул білка зростає. Віріон вірусу простого герпесу 1 містить вже 39 видів молекул білка, а віріон вірусу *Paramecium bursaria Chlorella virus* 1 – близько 100100 типів білків.

Білки, що є компонентами віріонів, виконують декілька функцій. Найбільш очевидна функція – побудова капсиду для захисту вірусного геному. Крім того, у багатьох вірусів білки забезпечують прикріплення віріона до клітини хазяїна, злиття оболонки віріонів з плазматичною мембраною, реплікацію, транскрипцію тощо. До складу віріонів можуть входити ферменти (протеази, зворотні транскриптази, фактори транскрипції), білкові праймери для реплікації нуклеїнової кислоти, фактори пригнічення імунної відповіді хазяїна тощо.

Важливо усвідомити, що далеко не всі білки, які кодуються геномом вірусу, присутні у складі віріона: значна кількість білків синтезується лише під час перебування вірусу у складі клітини. Відповідно, вірусні білки поділяють на дві групи: **структурні** *(VP, virion proteins)*, які входять до складу зрілого віріона, і **неструктурні** *(NS, non-structural),* які кодуються геномом вірусу і синтезуються в зараженій клітині, але не пакуються в зрілу вірусну частку.

Вірусні РНК в ДНК-геномних вірусах. Не зважаючи на висловлене вище загальне правило щодо присутності у складі віріона лише одного типу нуклеїнових кислот, у низці віріонів ДНК-геномних вірусів трапляються короткі молекули РНК. Гепаднавіруси (*Hepadnaviridae*) і каулімовіруси (*Caulimoviridae*) містять короткі послідовності РНК, ковалентно зв'язані з їх ДНК. Ці РНК функціонують як праймери під час синтезу ДНК і залишаються прикріпленими до геномів в зрілих віріонах.

Є дані, що до складу віріонів герпесвірусів можуть входити вірусні мРНК, але молекулярні деталі цього процесі залишаються невідомими.

Молекули клітини-хазяїна. Раніше було згадано, що віріони деяких вірусів містять ліпідні мембрани, які мають клітинне походження. До інших молекул клітини, які включаються до складу віріонів, відносяться:

− **транспортні РНК** – наприклад, у ретровірусів;

− **білки** – наприклад, до складу віріону ВІЛ входять циклофілін А, асоційований з капсидом, і антигени лейкоцитів людини, що входять до складу оболонки;

− **поліаміни та катіони**, відповідальні за нейтралізацію негативного заряду вірусного геному під час пакування нуклеїнової кислоти в капсид;

− **вуглеводи**, які входять до складу мембранних глікопротеїнів: фруктоза, сахароза, маноза, галактоза, нейрамінова кислота, ацетилглюкозамін. Вуглеводи можуть складати 10-13% від маси віріона.

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- характеризувати структурні компоненти віріона
- знати принципи структурної організації віріонів і різноманіття їх морфології
- пояснювати, чому віріони мають симетричну будову
- знати різноманіття вірусних геномів
- характеризувати функції структурних і не структурних білків вірусів

РОЗДІЛ 3. КЛАСИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ

3.1. Основні підходи до класифікації вірусів

Кількість відомих сьогодні видів вірусів перевищує 11 000. Вочевидь, існує необхідність якось упорядкувати це різноманіття та об'єднати близькі види вірусів у групи на базі фундаментальних, сутнісних характеристик. Таке об'єднання дало б можливість передбачати особливості кожного окремого виду за його належністю до певної групи, що важливо як з пізнавальних, так і з суто практичних міркувань. Саме така логіка лежить у основі побудови біологічних класифікацій, створенням яких займається окрема наука – систематика.

3.2. Ранні спроби класифікувати віруси

Довгий час вірусологи намагалися створити класифікації вірусів на основі їхніх властивостей, але такі ранні класифікації через численні недоліки не стали загальноприйнятими. Як у той час іронічно зауважували, «скільки вірусологів − стільки й класифікацій вірусі». Розглянемо принципи цих ранніх класифікацій.

Класифікації вірусів за типом захворювання. Найпомітнішою спільною рисою вірусів є те, що вони є інфекційними агентами. Вже у першій половині XX ст. з'явилася ідея класивікувати віруси за типом захворювання, яке вони спричиняють. Такий підхід приваблює своєю простотою, проте він ігноруює той факт, що більшість вірусів або взагалі не викликають захворювань, або викликають патологічні стани, які складно охарактеризувати саме як хвороби (наприклад, віруси бактерій, архей та протистів можуть завдавати своїм хазяям помітну шкоду, але описати їхній вплив у термінах медицини дуже складно). Далі, певний вірус може викликати декілька різних захворювань. Гарним прикладом є вірус вітряної віспи, який під час першого зараження викликає вітрянку, проте, за умови реактивації, спричиняє вже оперізуючий лишай (оперізуючий герпес). Більше того, існують віруси, що у різних хазяїв викликають різні захворювання, або ж у одних хазяїв викликають патологічні стани, а в інших – ні. Нарешті, віруси, які мають приниципово різну молекулярну будову, можуть викликати дуже близькі захворювання. Скажімо, характеристика вірусу гепатиту А нічого не зможе нам повідомити про віруси гепатиту В, С і D.

Класифікація за систематичною приналежністю хазяїна. Альтернативним класифікаційним підходом є групування вірусів відповідно до систематичної приналежності хазяїв, яких вони інфікують. Такий підхід є більш обґрунтованим, оскільки принаймні деякі віруси є похідним від геному свого хазяїна. Проте практичне застосування такоъ класифыкацыъ викликає певні складності, бо коло хазяїв окремого вірусу може бути дуже різним. Одні віруси вражають тільки один вид живих організмів (наприклад, вірус гепатиту В заражає тільки людину), інші – декілька споріднених видів (наприклад, поліовіруси вражають декілька видів приматів). Нарешті, існують віруси, здатні вражати широке коло неспоріднених хазяїв (наприклад, багато вірусів рослин можуть реплікуватися і в комахах-переносниках, і в самих рослинах-хазяях). Таким чином, навіть таке поняття, як «віруси рослин», виявляється недостатньо точним: у тій самі мірі вони можуть виявитися і вірусами тварин. Очевидно також, що віруси, які вражають певний вид, можуть не мати між собою нічого спільного, тож детальне вивчення одного вірусу, який вражає, скажімо, епітеліоцити людини, нічого не скаже про фундаментальні властивості інших вірусів, які вражають ті ж самі клітини цього ж виду.

Однак класифікація вірусів на основі систематичної приналежності їхніх хазяїв виявилася ефективною на найвищому таксономічному рівні – рівні доменів. Репродукція вірусів потребує управління клітинними системами реплікації, транскрипції і трансляції, а ці системи суттєво різняться у трьох доменах клітинного світу – у бактерій, архей і еукаріотів. Тому переважна більшість груп вірусів, що мають певну будову та механізм відтворення, здатні заражати лише представників одного з трьох доменів. З 18 перерахованих нами вище морфологічних типів вірусних часток (див. Мал. 2.2) лише третина трапляється у межах більш ніж одного домена. Таким чином, інформація про систематичну приналежність хазяїна на рівні домена дозволяє певною мірою передбачити структурні та функціональні особливості вірусів.

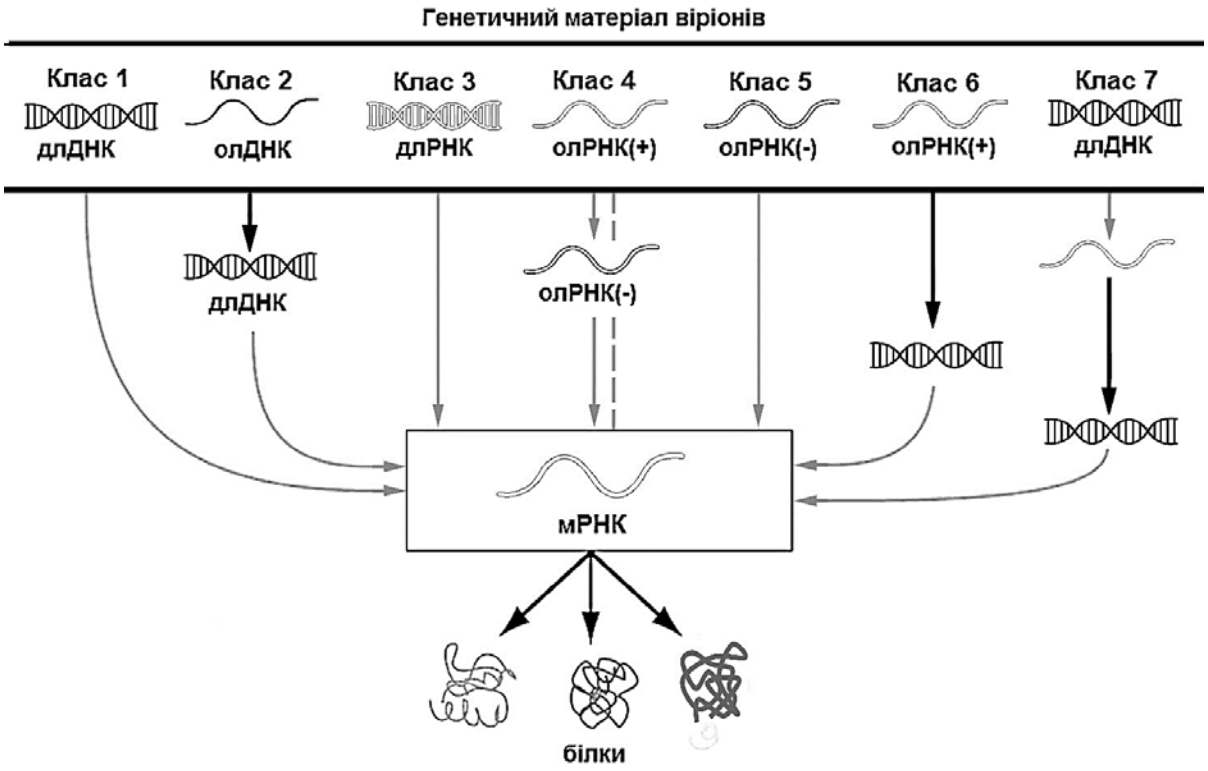
Класифікація за морфологією вірусних часток. Коли вірусні частки було розглянуто в електронному мікроскопі, стало очевидно, що вони мають дуже різну будову (див. Мал. 2.2). Ключовими критеріями запропонованих у 1960-1970-ті рр. морфологічних класифікацій стала наявність або відсутність ліпідної оболонки та типологія капсиду, що у ті роки поділявся на три типи: ізометричний, нитчастий або комплексний (тобто складений з ізометричної та спіральної ділянок). Ізометричні віруси далі підрозділялися на істинно ікосаедричні та ікосадельтаедричні. Класифікація вірусів з ліпідними оболонками також будувалася на структурі нуклеокапсиду, який може бути ізометричним або спіральним. Такі класифікації ґрунтувалися на важливих особливостях вірусів і мали гарну передбачувальну здатність. Однак вони мало що могли повідомити про особливості життя вірусу у клітині хазяїна, де він, власне, набуває властивостей біологічної системи.

3.3. Класифікація Девіда Балтімора на основі механізмів синтезу мРНК

У 1971 р. майбутній лауреат Нобелівської премії Девід Балтімор запропонував класифікацію вірусів, в основу якої була покладена хімічна природа їхнього генома та механізми синтезу матричної РНК. На відміну від попередніх класифікацій, система Балтімора ґрунтується на особливостях процесів відтворення та реалізації вірусом своєї спадкової інформації, тобто характеризує біологічну сутність цих об’єктів.

В усіх клітинних організмах реалізація спадкової інформації відбувається згідно «центральної догми молекулярної біології» у її класичному вигляді: інформація щодо складу білків та некодуючих РНК записана у геномі, який складається з дволанцюгової ДНК. На одному з ланцюгів цієї ДНК синтезується одноланцюгова молекула мРНК, а також численні некодуючі РНК. Далі мРНК слугує матрицею для створення молекули білка, що здійснюється рибосомами.

На відміну від клітин, віруси часто порушують вищенаведену схему, тож для опису їхньої репродукції потрібні додаткові терміни. Геноми вірусів можуть бути представлені длДНК, одДНК, длРНК та олРНК (див. розділ 2.7). Геноми, утворені олРНК, можуть належати до двох типів. Ті з них, що являють собою функціональні мРНК називають позитивно-смисловими РНК або (+)РНК. А ланцюги РНК, комплементарні (+)РНК, називають негативно-смисловими, або (–)РНК. З урахуванням цих та інших даних, класифікація Д. Балтімора розрізняє сім класів вірусів (Мал. 3.1).



Мал. 3.1. Класифікація вірусів за Д. Балтімором. Чорні стрілки символізують синтез ДНК, сірі – синтез РНК. Пунктирна лінія символізує тотожність молекул (за https://quizlet.com/84930709/40-41-introduction-to-virology-tempera-flash-cards/.

Клас 1 включає віруси, геном яких складається з длДНК. Її реплікація відбувається в ядрі з використанням ферментів клітини-хазяїна. Винятком є так звані *Varidnaviria* (див. нижче), в яких реплікація відбувається в цитоплазмі з використанням ферментів, що кодуються вірусом.

Клас 2 включає віруси з олДНК. Після потрапляння до клітини, ДНК стає дволанцюговою, після чого відбувається транскрипція. Реплікація ДНК відбувається в ядрі.

Клас 3 включає віруси, геном яких представлений длРНК. Усі відомі віруси цього класу мають сегментований геном. Транскрипція відбувається на одному з двох ланцюгів кожного сегменту геномної РНК. Оскільки клітини хазяїна зазвичай не мають ферментів для синтезу мРНК на геномній РНК-матриці вірусу (такі ферменти відомі лише в деяких рослин та протистів), вони кодуються геномом вірусу. Більше того, оскільки ці ферменти потрібні вірусу для запуску репродукції, вони повинні входити до складу віріона.

Клас 4 включає віруси, геном яких представлений ол(+)РНК, що фактично являє собою матричну РНК. Трансляція може відбуватися або безпосередньо на цій геномній РНК, або ж на ній синтезується (–)РНК, а вже на останній – власне мРНК. Ферменти, що каталізують ці процеси, не входять до складу віріона, а транслюються на клітинній РНК.

Клас 5 включає віруси, геном яких утворений ол(–)РНК. Ця молекула слугує матрицею для синтезу мРНК. Вказаний процес каталізується вірусним ферментом, що міститься у віріоні. Реплікація відбувається в цитоплазмі або ядрі.

Клас 6 включає так звані ретровіруси. Так само як і представники класу 4, вони містять в геномі ол(+)РНК. Проте, перед реплікацією за участю вірусного ферменту – *зворотної транскриптази* – на цій РНК синтезується дволанцюгова ДНК, що далі слугує матрицею для синтезу мРНК.

Клас 7 включає невелику групу вірусів, названих параретровірусами, або реверсівірусами. Спочатку вони були віднесені до класу 1, оскільки їхній геном представлений дволанцюговою ДНК. Проте ця ДНК використовується вкрай незвично: на ній формується олРНК, а вже на ній, за допомогою зворотної транскриптази вірусу, знову синтезується длДНК. І от ця новосинтезована ДНК слугує матрицею для синтезу мРНК.

Класифікація Балтімора набула широкого визнання. Віруси у ній розподіляються по класах на підставі фундаментальних, еволюційно консервативних характеристик, тож сам факт приналежності вірусу до певного класу дозволяє детально описати молекулярні процеси, які відбуваються в інфікованій клітині. Зокрема, ця класифікація дозволяє передбачити, чи буде інфекційною сама по собі вірусна нуклеїнова кислота, чи для інфекції потрібна ціла вірусна частка.

Недоліком класифікації Балтімора є та обставина, що в ній не враховується морфологія вірусних часток. Наприклад, до класу 1 входять разом бактеріофаг Т2 і вірус віспи, які радикально розрізняються за структурою і біологією. Не враховує ця класифікація і походження вірусів. Через ці обставини у 2016-2020 рр. на зміну системі Балтімора прийшла сучасна філогенетична класифікація вірусів.

3.4. Сучасні принципи класифікації і номенклатури вірусів

Принципи класифікації вірусів. Деякий час вірусологи уникали використання у класифікації вірусів ліннеєвських таксономічних категорій, як-от родина, рід або вид. Лише у 1966 р. на міжнародному мікробіологічному конгресі був заснований Міжнародний комітет з номенклатури вірусів, який у 1973 р. був перейменований в Міжнародний комітет з таксономії вірусів (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Цей комітет існує і досі. Він розробляє і затверджує принципи розподілу вірусів по групах і правила найменування цих груп. Згадані правила і принципи зведені у засадничий документ − Міжнародний кодекс класифікації і номенклатури вірусів (The International Code of Virus Classification and Nomenclature, ICVCN).

Через глибоку відмінність між основними групами вірусів, їхня класифікація довгий час обмежувалася створенням таксонів низького рангу, не вище порядку. У 1971 р. Д. Балтімор запропонував додати до цієї системи рівень класів (Мал. 3.1), однак ці класи не одержали формальних таксономічних назв. Лише протягом останніх кількох років Міжнародний комітет з таксономії вірусів визнав, що наявної інформації про еволюційні зв'язки між вірусами достатньо для створення таксонів найвищих рангів.

У 2016 р. робоча група ICTV дійшла висновку, що розширена формальна ієрархія вірусних таксонів повинна включати 15 рангів, зокрема вісім основних (первинних) рангів і сім похідних (вторинних) рангів. Під вторинними розуміються ранги з приставкою «під-»; ранги з приставкою «над-» для вірусів не використовуються. До категорії основних увійшли чотири ранги, які вже використовувалися у вірусології (порядок, родина, рід і вид), а також чотири нові (реалм, царство, тип і клас). Легко помітити, що назви таксономічних рангів, запропонованих ICTV, майже повністю співпадають з тими, що використовуються для клітинних організмів. Єдина відмінність стосується назви найвищого рангу: у систематиці вірусів він називається «реалмом», а не «доменом», як в інших таксономіях. Сама назва «реалм» (від англ. realm − підвладна область, королівство) є алюзією на поняття «домен» (що також означає володіння монарха). Але концепція реалму інша: він позначає *найбільше*

об'єднання вірусів, для якого існують докази походження від спільного предка, або принаймні від спільної макромолекулярної структури. Між вірусами з різних реалмів не існує жодної спорідненості; передбачається, що вони виникли цілком незалежно.

Сім вторинних рангів включають раніше використовуваний ранг підродини та шість нових над- і під-рангів. Єдиний основний ранг, для якого не було запропоновано похідний відповідник − це ранг виду. Справа в тому, що стосовно визначення «підвиду» у вірусів наразі не вдалося досягти консенсусу.

Нова ієрархія рангів та її нормативна основа у вигляді змін до Кодексу ICVCN були схвалені і згодом ратифіковані ICTV у 2018 та 2019 рр. Ці зміни надали вірусологічній спільноті право подавати пропозиції щодо опису конкретних таксонів високих рангів. Перший реалм (*Riboviria*) був створений у 2018 р., ще три − у 2019 р., та ще два − у 2020 р. У цей же період були формально оприлюднені назви нових царств, типів і класів вірусів. Наразі система вірусів включає 6 реалмів, 10 царств, 17 типів, 2 підтипи, 40 класів, 72 порядків, 8 підпорядків, 264 родин, 182 підродин, 2818 родів, 84 підроди та більше 11000 видів, число яких постійно зростає. Треба зазначити, що не усі родини і навіть роди вірусів наразі віднесені до вищих рангів. Такі групи перебувають у статусі *таксонів incertae sedis* (тобто таких, для яких систематичне положення не встановлене). Класифікація вірусів продовжує активно розвиватися.

Принцип номенклатури вірусів. Згідно з вимогами Міжнародного кодексу, номенклатура вірусів слідує таким принципам.

1. Таксони вірусів мають стандартні закінчення, що вказують на їхній ранг (Табл. 3.1). На відміну від клітинних організмів, назви родів вірусів також мають стандартні закінчення.

Таблиця 3.1. *Стандартні закінчення назв таксонів вірусів відповідно до їхнього рангу.*

Ранг таксона	Стандартне закінчення	Приклад назв
Реалм	*-viria*	*Duplodnaviria*
Підреалм	*-vira*	-
Царство	*-virae*	*Heunggongvirae*
Підцарство	*-virites*	-
Тип	*-viricota*	*Peploviricota*
Підтип	*-viricotina*	-
Клас	*-viricetes*	*Herviviricetes*
Підклас	*-viricetidae*	-
Порядок	*-virales*	*Herpesvirales*
Підпорядок	*-virineae*	-
Родина	*-viridae*	*Herpesviridae*
Підродина	*-virinae*	*Alphaherpesvirinae*
Рід	*-virus*	*Simplexvirus*
Підрід	*-virus*	-
Вид	Не регулюється	*Human alphaherpesvirus 1*

2. Види вірусів не є біологічними видами. Вони визначаються як політетичні класи[1], що утворюють низку поколінь і займають певну екологічну нішу (визначення, дане у Міжнародному кодексі класифікації і номенклатури вірусів у 1991 р.).

3. Назва виду вірусу не відповідає принципам бінарної номенклатури і не містить назву роду. Як правило, вона складається з двох слів, перше з яких містить назву хвороби, певну ознаку чи вид хазяїна, а друге обов'язково містить корінь «virus» (наприклад, *Measles virus* – вірус кору, *Psittacid herpesvirus* – попугаячий герпесвірус). Назва виду може також містити літерні (*Bovine adenovirus A*), цифрові (*Human alphaherpesvirus 1*) або комбіновані (*Escherichia virus T4*) позначення.

4. Кодекс не виділяє таксони вірусів нижче виду, проте в медичній практиці й наукових дослідженнях використовують внутрішньовидову диференціацію вірусів за антигенами, генотипами, електрофоретипами тощо, залежно від вживаних методів дослідження.

За домовленості, назви **всіх** таксономічних рангів вірусів пишуться курсивом, включаючи види. Але у вірусологічний науковій літературі часто використовують тривіальні назви, що не регулюються Кодексом. Наприклад, припустимо писати прямим шрифтом «вірус простого герпесу людини типу 1», але курсивом пишеться «*Human alphaherpesvirus 1*».

3.6. Огляд філогенетичної системи вірусів

Хоча найвищі таксони сучасної класифікації вірусів на перший погляд нагадують класи системи Балтимора, між ними є принципова відмінність. Класи Балтимора об'єднують віруси з певним типом геному те механізмом відтворення мРНК, незалежно від того, чи споріднені такі віруси один з одним. Сучасна філогенетична система − навпаки, об'єднує споріднені між собою віруси, незалежно від того, чи однакові в них типи відтворення. Звичайно, схожість у будові геномів і циклі відтворення може свідчити про єдність походження, але так буває не завжди. Зокрема, віруси з геномом у вигляді дволанцюгової ДНК виникали мінімум чотири рази (імовірно − набагато частіше). Тому зараз вони розміщені у чотирьох різних реалмах (*Adnaviria, Duplodnaviria, Monodnaviria* і *Varidnaviria*), хоча за класифікацією Балтімора всі ці віруси належать до класу 1. З іншого буку, у межах однієї еволюційної лінії вірусів типи відтворення могли змінюватися, як це сталося з РНК-вірусами (*Riboviria*): за класифікацією Балтимора різні представники цієї групи належать до 3, 4, 5, 6 та 7 класів (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2. *Основні характеристика реалмів.*

Реалм	Тип геному	Клас за Балтімором	Хазяї	Додаткові ознаки
Adnaviria	длДНК	1	Археї	− капсидний білок з SIRV2-мотивом
Duplodnaviria	длДНК	1	Усі домени	− капсидний білок HK97
Monodnaviria	олДНК	(1), 2	Усі домени	− ендонуклеаза супперродини HUH
Riboviria	длРНК, олРНК(+)	3, 4, 5, 6, 7	Еукаріоти, зрідка бактерії	− РНК-залежна РНК-полімераза − зворотна транскриптаза (у ретровірусів)
Ribozyviria	олРНК(−)	5	Тварини	− є вірусами-сателітами − не містять РНК-залежної РНК-полімерази
Varidnaviria	длDNA	1, (2)	Усі домени	− капсидний білок з мотивом jelly roll − власна ДНК-полімераза

[1] Політетичний клас – об'єднання, що має великий набір ознак, більшість з яких є у кожного представника даного класу, але немає жодної ознаки, яку обов'язково повинен мати кожний представник класу.

Варто підкреслити, що єдність походження для вірусів не тотожна виникненню від спільного предка у клітинних організмів і не завжди передбачає одноразову появу певної групи вірусів. Наприклад, віруси з реалму *Monodnaviria* неодноразово виникали від бактерійних плазмід, що містили ендонуклеазу HUH. Таким чином, представники одного реалму можуть бути споріднені не стільки між собою, скільки з комплексами генів клітинного походження, від яких вони могли виникати неодноразово.

В цьому парадокс філогенетичної системи вірусів: на відміну від системи клітинних організмів вона дозволяє існування поліфілетичних таксонів. Але дозволяє лише в тому випадку, коли представники цих таксонів містять гомологічні молекулярні структури. Тож, якщо продовжити генеалогію вірусів до клітинних генів, від яких вони походять, поліфілетичні таксони сучасної класифікації стають монофілетичними.

Реалм Adnaviria. До складу реалму входять віруси гіпертермофільних архей, що мають нитчасті віріони і геном, представлений длДНК, що перебуває в А-формі (у інших вірусів, а також у клітинних організмів, геномна ДНК перебуває в В-формі). А-форма ДНК може бути пристосуванням до екстремальних температурних умов, у яких розвиваються археї-хазяї *Adnaviria*.

Важливою фенотипічною ознакою представників реалму є присутність головного капсидного білка, що містить так зване SIRV2-укладання: структурний мотив, що представляє собою пучок із чотирьох α-спіралей. Віріони *Adnaviria* ниткоподібні або паличкоподібні, мають спіральну будову і оточені ліпідними мембранами.

До реалму *Adnaviria* наразі входить єдине царство *Zilligvirae*, з єдиним типом *Taleaviricota* і єдиним класом *Tokiviricetes*.

Віруси реалму *Adnaviria*, ймовірно, інфікували вже останнього спільного предка архей.

Реалм Duplodnaviria. Ця група об’єднує длДНК-віруси, в яких основний білок капсиду належить до типу HK97. Капсид, зібраний з білків HK97, має ікосаедричну форму. На одній з дванадцяти вершин капсиду присутня так звана портальна пора, призначена для входу ДНК. Характерна особливість *Duplodnaviria* − збирання каписидів на основі білкового ядра, так зв. скаффолда, навколо якого розташовуються субодиниці білка HK97. Перед завантаженням ДНК у капсид білки скаффолда розщеплюються спеціальною протеазою, звільняючи простір усередині капсиду. Присутність такої протеази − важлива ознака *Duplodnaviria*.

До реалму *Duplodnaviria* входить єдине царство *Heunggongvirae* з двома типами, *Uroviricota* та *Peploviricota*. До *Uroviricota* входить єдиний порядок *Caudovirales*, що включає класичні «хвостаті» бактеріофаги зі складним капсидом, що вражають бактерій і архей. До *Peploviricota* відносять порядок *Herpesvirales*, що включає збудників герпесу.

Хвостаті фаги, можливо, є найдавнішими з нині існуючих вірусів; імовірно, вони вражали вже останнього спільного предка клітинних організмів (LUCA). *Caudovirales* поширені повсюдно, вражають лише прокаріотів і відрізняються високою генетичною різноманітністю. Походження *Herpesvirales* точно не встановлено, проте вони безумовно походять від якихось *Caudovirales*. Цікаво, що укладання білку за типом HK97 трапляється у бактеріальних білків інкапсулінів, які пов'язані з окислювальним стресом. Імовірно, гені інкапсулінів були запозичені бактеріями у фагів з порядку *Caudovirales*.

Реалм Varidnaviria − велика група ДНК-вірусів, геном більшості з яких представлений длДНК (винятком є родина *Finnlakeviridae*, яка має олДНК-геном). Спільною рисою *Varidnaviria* є присутність структурного мотиву jelly roll у складі головного і мінорного

капсидних білків. Мотив jelly roll складається з восьми антипаралельних бета-шарів, складених таким чином, що загальна структура нагадує рулет. Молекули капсидного білка, що містить цю структуру, формують характерні для *Varidnaviria* шестикутні елементи капсиду − гексони. До характерних білків цих вірусів також належать АТФаза FtsK-HerA, що упаковує вірусний геном в капсид, і власна ДНК-полімераза. У більшості *Varidnaviria* капсид має ікосаедричну форму з 20 трикутними гранями і 12 вершинами. Лише у деяких представники реалму, зокрема поксвірусів (родина *Poxviridae*), капсиди втратили ікосаедричну структуру і набули овальної форми.

До реалму входять два царства, *Bamfordvirae* і *Helvetiavirae*. Перше царство включає віруси, в яких головний капсидний білок утворює тримери. До складу цієї групи належать гігантські нуклеоцитоплазматичні віруси (тип *Nucleocytoviricota*), поксвіруси (родина *Poxviridae*), до якої належить вірус натуральної віспи, аденовіруси, а також віофаги з класу *Maveriviricetes*. Царство *Helvetiavirae* об'єднує віруси, в яких головний капсидний білок утворює гексамери. До цієї групи належать віруси архей з родини *Sphaerolipoviridae*.

Varidnaviria − стародавня група, що, імовірно, інфікувала вже LUCA. За поширеною гіпотезою, царства *Bamfordvirae* та *Helvetiavirae* виникли незалежно від мобільних генетичних елементів, можливо плазмід, шляхом захоплення ними генів двох різних, хоча і споріднених клітинних білків. Припускають, що капсидний білок *Bamfordvirae* походить від бактеріального білка DUF 2961, тоді як відповідний білок *Helvetiavirae* походить від бактеріальних білків суперродини Cu.

Реалм Monodnaviria. Цей реалм об'єднує віруси з кільцевим олДНК-геномом, що реплікується за типом кільця, що котиться. Ініціація реплікації у цих вірусів забезпечується ендонуклеазою з суперродини HUH, присутність якої є діагностичною рисою *Monodnaviria*. До складу реалму також входять нечисленні похідні групи, що мають або лінійний олДНК-геном, або кільцевий длДНК-геном. Капсиди у *Monodnaviria* бувають паличкоподібними, нитчастими, поліедричними, подвійно-поліедричними. Багато представників *Monodnaviria* здатні вбудовуватися в геноми своїх господарів. Загалом, ця група звідрізняється високою швидкістю еволюції, значною частотою мутацій та рекомбінацій.

Реалм *Monodnaviria* включає чотири царства: *Loebvirae, Sangervirae, Trapavirae* та *Shotokuvirae*. Представники *Loebvirae* і *Sangervirae* вражають бактерій, *Trapavirae* − архей, а *Shotokuvirae* − еукаріотів. Серед представників *Shotokuvirae* варто назвати родини *Papillomaviridae* та *Polyomaviridae*, що викликають пухлини у людей.

У ході еволюції представники *Monodnaviria*, ймовірно, неодноразово виникали від лінійних плазмід бактерій та архей, які містили гени ендонуклеази HUH. Члени реалму, що вражають еукаріотів, також виникали кілька разів, у ході злиття HUH-плазмід з генами капсидів деяких РНК-вірусів (*Riboviria*).

Реалм Riboviria. Цей реалм охоплює переважну більшість РНК-вірусів. Його представники відтворюються з допомогою РНК-залежної РНК-полімерази або РНК-залежної ДНК-полімерази. Геном *Riboviria* може бути представлений длРНК, олРНК(−), олРНК(+), і навіть длДНК, якщо остання слугує попередником геномної РНК. З такою різноманітністю геномів не дивно, що представники реалму входили до кількох класів системи Балтімора, від 3 до 7. Не зважаючи на це, *Riboviria* є істинно монофілетичною групою, що походить від єдиного спільного предка. Капсиди *Riboviria* мають переважно поліедричну форму, але трапляються також нитчасті, сферичні і кулеподібні.

До реалму *Riboviria* входить два царства − *Orthornavirae* і *Pararnavirae*. До складу першого царства входять віруси, в життєвому циклі яких відсутня ДНК (класи 3−5 за Балтімором). Залежно від будови геному ці віруси діляться на відділи *Duplornaviricota* (длРНК), *Negarnaviricota* (ол(−)РНК), Pisuviricota (переважно ол(+)РНК) та деякі інші. До *Orthornavirae* належать численні збудники хвороб людини, зокрема віруси грипу, сказу, кору, паротиту, коронавірусної хвороби, лихоманки Ебола, гепатитів А і С.

Царство *Pararnavirae* включає віруси, що містять зворотну транскриптазу − ретровіруси (клас 6 за Балтімором) і реверсвіруси (клас 7). До цієї групи належать збудники СНІДу і гепатиту В.

Обидва царства у складі *Riboviria* споріднені з Non-LTR-ретротранспозонами та автосплайсинговими інтронами II групи. Передбачається, що *Riboviria* виникли від якихось егоїстичних ретроелементів, від яких походять також і вищезгадані егоїстичні елементи геному. Виникнення *Riboviria* пов'язане з бактеріальним субстратом, але більшість їхніх підгруп поширені лише в еукаріотів.

Реалм Ribozyviria. Це невелика група РНК-вірусів, що є сателітами, тобто здатні відтворюватися тільки за присутності в клітини іншого вірусу. *Ribozyviria* мають кільцевий ол(−)РНК геном, який, на відміну від геномів *Riboviria*, не містить РНК-залежної РНК-полімерази та реплікується клітинними РНК-полімеразами. Капсиди цих вірусів запозичуються у хелперного вірусу; зазвичай вони мають поліедричну форму.

До реалму входить єдина родина *Kolmioviridae*. Найбільш вивченим представником групи є вірус гепатиту Д (дельта), що є сателітом вірусу гепатиту В.

Походження *Ribozyviria* пов'язане з віроїдами або ретрозимами (групою каталітичних ретротранспозонів).

У Табл. 3.3. наведено спрощений огляд сучасної класифікації вірусів з прикладами систематичного положення значущих патогенів людини, а також деяких інших класичних видів.

Таблиця 3.3. *Систематичне положення деяких вірусів.*

Реалм	Царство	Родина	Представники	Клас за Балтімором
Adnaviria	*Zilligvirae*	*Lipothrixviridae*	Нитчастий вірус Acidianus 3	1
Duplodnaviria	*Heunggongvirae*	*Herpesviridae*	Віруси герпесу людини Вірус вітряної віспи Вірус Епштейна-Барр Цитомегаловірус людини Герпесвіруси, асоційовані з саркомою Капоші	1
		Myoviridae	Бактеріофаг T4	1
		Siphoviridae	Бактеріофаг λ	1
Varidnaviria	*Bamfordvirae*	*Adenoviridae*	Аденовірус людини HAdV-B	1
		Poxviridae	Вірус натуральної віспи Вірус віспи мавп	1
		Mimiviridae	Мімівірус	1
Monodnaviria	*Shotokuvirae*	*Papillomaviridae*	Папіломавірус людини I (HPV1)	1
		Polyomaviridae	Поліомавірус мавп 40 (SV40)	1
		Parvoviridae	Вірус інфекційної еритеми B19 Депендовірус	2
	Loebvirae	*Inoviridae*	Бактеріофаг M13	2
	Sangervirae	*Microviridae*	Бактеріофаг φX174	2

Реалм	Царство	Родина	Представники	Клас за Балтімором
Riboviria	*Orthornavirae*	*Reoviridae*	Ротавірус людини A Вірус «синього язика» (BTV)	3
		Cystoviridae	Бактеріофаг φ6	3
		Picornaviridae	Вірус гепатиту A Поліовірус Вірус Коксакі Риновірус людини 1A Вірус ящуру	4
		Flaviviridae	Вірус гепатиту C Віруси жовтої лихоманки, лихоманки західного Нілу, лихоманки денге Вірус діареї худоби Вірус чуми свиней	4
		Coronaviridae	Збудник SARS (SARS-CoV) Збудник MERS (MERS-CoV) Збудник COVID-19 (SARS-CoV2)	4
		Togaviridae	Вірус краснухи Віруси лихоманок Чикунгунья, Синдбіс, Карельська, О'Ньон-Ньонг, лісу Семлики	4
		Narnaviridae	Нарнавірус грибів роду *Ophiostoma*	4
		Virgaviridae	Вірус тютюнової мозаїки	4
		Rhabdoviridae	Вірус сказу	5
		Orthomyxoviridae	Віруси грипу A, B і C, у т.ч. збудники пташиного грипу H5N1 і H9N2, а також свинячого грипу H1N1.	5
		Paramyxoviridae	Вірус кору Вірус епідемічного паротиту (свинки) Вірус парагрипу Вірус чуми собак Вірус Хендра Вірус Ніппах	5
		Filoviridae	Вірус лихоманки Марбург Вірус Ебола	5
		Bunyaviridae	Вірус лихоманки Крим-Конго Вірус Сін Номбре	5
		Arenaviridae	Вірус лімфоцитарного хоріоменінгіту Віруси лихманок Хунін, Мачупо і Гуанаріто	5
		Tospoviridae	Вірус плямистого в'янення томатів	5
	Pararnavirae	*Retroviridae*	ВІЛ-1 та ВІЛ-2 Вірус саркоми Рауса Вірус раку молочних залоз мишей Вірус лейкемії мишей Пінистий вірус шимпанзе Т-лімфотропні віруси людини 1 і 2 Вірус лейкоми рогівки	6
		Hepadnaviridae	Вірус гепатиту B	7
		Caulimoviridae	Вірус мозаїки цвітної капусти	7
Ribozyviria	−	*Kolmioviridae*	Вірус гепатиту Д (дельта)	5

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- знати критерії, які використовують у класифікації вірусів
- правильно писати латинські назви таксонів вірусів
- знати підґрунтя, на якому базується класифікація вірусів за Д. Балтімором
- знати головні особливості сучасної філогенетичної класифікації вірусів
- давати визначення виду вірусів

РОЗДІЛ 4. РЕПЛІКАЦІЯ ВІРУСІВ У КЛІТИНІ ХАЗЯЇНА

З точки зору молекулярних подій, на рівні окремої клітини, цикл реплікації вірусів зручно розділити на декілька етапів:

1. Прикріплення вірусу до поверхні клітини;
2. Проникнення вірусу до клітини та декапсидація (роздягання) вірусного геному шляхом повного або часткового видалення білків капсиду;
3. Експресія генів вірусу (синтез вірусних мРНК та білків);
4. Реплікація нуклеїнової кислоти геному вірусу;
5. Збирання білків і геномних нуклеїнових кислот у віріони;
6. Вихід віріонів з клітини.

Наведена схема представляє зручний шаблон для розгляду циклу репродукції вірусів. Проте існують значні відхилення від неї, пов'язані як з особливостями клітин-хазяїв, так і з особливостями вірусів: наприклад, у вірусів рослин відсутні стадії прикріплення і проникнення; віруси дріжджів і інших грибів взагалі не мають позаклітинної фази циклу реплікації, тому процеси прикріплення і проникнення у вірусів грибів також не відбуваються.

Відомі також і віруси, цикл реплікації яких містить додаткові етапи.

Вірусні частки є стабільними структурами, цілісність яких підтримується мережею міжмолекулярних взаємодій. Але їхня стабільність повинна бути оборотною, адже під час зараження нової клітини віріони мають бути частково або повністю розібрані. Щоб це стало можливим, ціла вірусна частка або її специфічні білки мають бути здатні до швидких конформаційних змін без зовнішніх джерел енергії.

Віруси, які інфікують клітини тварин з одного боку і клітини рослин, архей і бактерій з іншого боку, використовують різні стратегії входу, оскільки останні мають клітинні стінки.

4.1. Прикріплення, вхід до клітини та внутрішньоклітинний транспорт

Прикріплення вірусної частинки до клітини та її потрапляння до цієї клітини являють собою події, які ініціюють цикл реплікації вірусу. Щоб ці події відбулися, вірус повинен спочатку наблизитися до клітини сприйнятливого організму.

Бактерійні клітини, які живуть вільно, стикаються з вірусом у навколишньому середовищі шляхом випадкової дифузії. У рослин віруси найчастіше доставляються новому господареві переносником. У тварин віруси потрапляють за допомогою переносника або при прямому контакті з частинками на поверхнях, або ж віруси можуть потрапляти в організм із навколишнього середовища через дихальні, шлунково-кишкові або статеві шляхи, де вони можуть зустрітися з потенційними клітинами-мішенями. Оскільки ці процеси зазвичай відбуваються випадково, будь-який організм постійно стикається з вірусами, які не здатні в клітинах цього організму викликати продуктивну інфекцію. Отже, прикріплення та потрапляння до клітини являють собою перші події, в яких визначається здатність вірусу заразити певного господаря.

Вхід вірусу до клітини відбуваються шляхом декількох контрольованих послідовних кроків. Вони ініціюються зв'язуванням віріона з рецепторами, дією на нього низького значення pH, ферментів та інших сигналів. Ці сигнали не лише індукують зміни у структурі віріона, але й координують переміщення вірусу з однієї ділянки клітини до іншої, гарантуючи тим самим, що кожний етап програми проникнення буде відбуватися у вірній послідовності, у вірний час і у вірному місці.

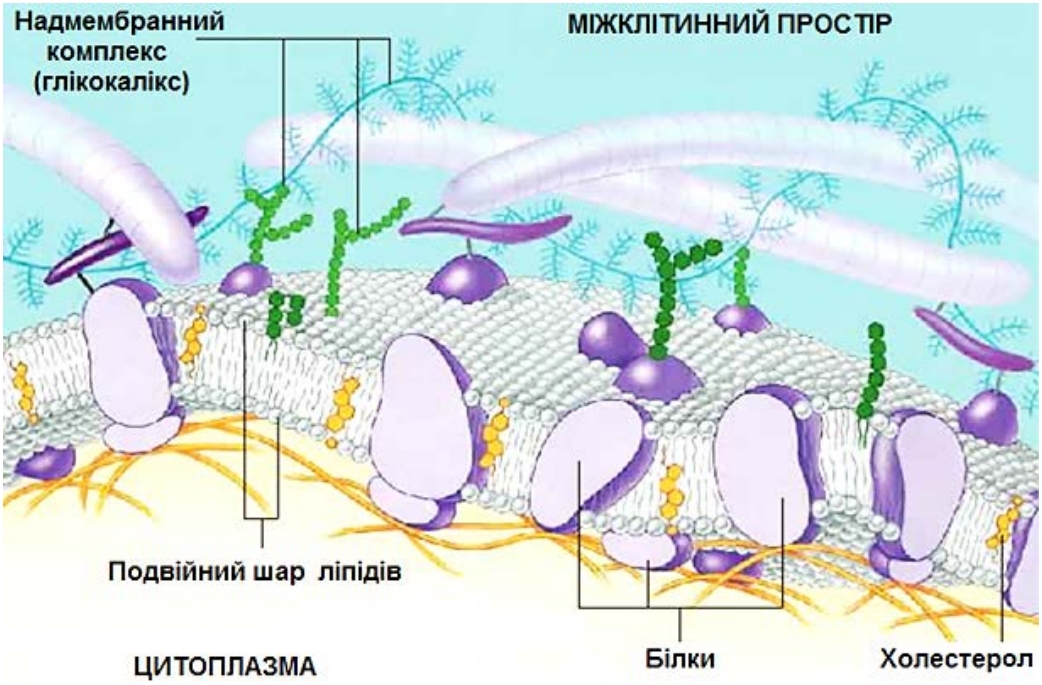
Своєю чергою, клітина, яку уражає вірус, реагує на сигнали, які він ініціює. Прикріплення вірусу до рецепторів активує у клітині каскади різноманітних реакцій, які вірус може обернути на свою користь.

У цьому розділі розглядаються події приєднання та проникнення вірусів, що відбуваються у тваринних, рослинних та бактеріальних системах.

4.1.1. Віруси тварин: прикріплення

Клітини багатоклітинних тварин (Metazoa) оточені плазматичною мембраною та позбавлені клітинної стінки. Відповідно, першим кроком віріона на шляху до проникнення у клітину буде його прикріплення до поверхні мембрани. Це прикріплення завжди обумовлене зв'язуванням вірусної частки зі специфічним рецептором.

У плазматичній мембрані «заякорені» молекули білків, глікопротеїнів і гліколіпідів (Мал. 4.1). Звичайно, всі ці молекули мають нормальні функції, не пов'язані з вірусами. Але кожна з них може стати «воротами» для проникнення вірусної інфекції.



Мал. 4.1. Будова клітинної мембрани (за https://ru.pinterest.com/pin/559501953687297853/).

Коли вірусна частинка опиняється в безпосередній близькості від клітини, прикріплення ініціює процес зараження. Прикріплення запобігає вільній дифузії віріонів, що збільшує шанси на потрапляння вірусу. Зв'язування білків, що приєднуються до рецепторів, часто також викликає конформаційні зміни в вірусній частинці, необхідні для проникнення або вивільнення геному.

Процес прикріплення вірусу розпочинається зі специфічної взаємодії вірусного білка, що зветься **антирецептором**, або **білком прикріплення**, з молекулою рецептора на поверхні клітини. Тут важливо не допустити термінологічної плутанини: **рецепторами вірусів** називають саме клітинні структури, з якими зв'язується вірус. Вірусні ж компоненти називають не рецепторами, а антирецепторами.

Ще до зв'язування зі специфічним рецептором, вірусна частка може взаємодіяти з **факторами адгезії** – речовинами, що мають низьку спорідненість до вірусних часток, але представлені на поверхні клітини у великій кількості. До них належать різноманітні вуглеводи,

наприклад сульфатовані полісахариди *гепарани*. Зв'язування з факторами адгезії часто є оборотним й може завершитися розривом зв'язку між вірусом та клітиною.

Вірусні білки прикріплення часто, хоч і не завжди, утворюють помітні виступи на поверхні віріона. Помітно виступають над поверхнею вірусної частки гемаглютинін вірусу грипу (родина *Orthomyxoviridae*), білок VP4 ротавірусів (родина *Reoviridae*), фімбрії аденовірусів (родина *Adenoviridae*). У короновірусів (родина *Coronoviriadeae*) білкові антирецептори утворюють навколо вірусної частки помітний в електронний мікроскоп «вінець», або «корону», що й дало назву цій групі. Втім, у деяких випадках функціональна частина молекули антирецептора може бути екранована від випадкових взаємодій і знаходиться в заглибленні молекулярного комплексу. Так, в ентеровірусів (родина *Picornaviridae*) активна частина антирецептора знаходиться на дні так званих **каньйонів** – заглибин на поверхні капсиду.

Клітина не має рецепторів лише для того, або полегшити вірусам зараження. Ці рецептори виконують важливі структурні або функціональні ролі в житті організму. Таким чином, навіть потужний селективний тиск, який накладається їхньою присутністю, роблячи хазяїна сприйнятливим до вірусу, не здатний усунути рецептор з клітинної поверхні. Молекули рецепторів, як правило, є білками, але також використовуються вуглеводи та іноді ліпіди. Поширеними білковими рецепторами є *інтегрини* та *імуноглобуліни*, присутні у складі клітинних мембран у великій кількості. До вуглеводних рецепторів належить *N–ацетилнейрамінова кислота*, яка часто утворює термінальні залишки вуглеводних груп глікопротеїнів і гліколіпідів. Прикладом ліпідних рецепторів є *фосфатидилсерин*, звичайний компонент клітинних мембран. Перелік вірусних рецепторів є надзвичайно великим і постійно поповнюється. Деякі приклади наведені у Табл. 4.1.

Антирецептор може зв'язуватися з рецептором клітини за допомогою водневих зав'язків, іонних взаємодій та сил Ван-дер-Ваальса. А от ковалентних зав'язків між віріоном і рецептором ніколи не утворюється.

Зв'язування антирецептора з рецептором, як правило, відбувається за принципом «ключ-замок». Така взаємодія є дуже специфічною: вірус може заражати лише ті клітини, на поверхні яких присутній відповідний рецептор.

Рецептор може визначати діапазон хазяїв вірусу, тобто його здатність заражати певну тварину або культуру клітин. Наприклад, поліовірус заражає приматів і культури клітин приматів, але не культури мишей або клітин миші. Клітини миші синтезують білок, гомологічний рецептору поліовірусу, але він є достатньо відмінним, так що поліовірус не може приєднатися до нього. У цьому прикладі рецептор поліовірусу є визначальним для діапазону господарів поліовірусу. Однак наявність рецептора в певному типі клітин не гарантує репродукції вірусу. Деякі культури клітин приматів виробляють рецептор поліовірусу, але не можуть бути заражені. Обмеження вірусного розмноження в цих клітинах, швидше за все, пов'язане з блокуванням вірусної репродукції після етапу прикріплення.

Відповідність клітинних рецепторів і вірусних білків прикріплення визначає **тропізм** вірусу (від τροπος – напрям), тобто його здатність вибірково вражати певні клітини. Однак варто мати на увазі, що на цю здатність можуть впливати і багато інших чинників. Наприклад, залишки сіалової кислоти на мембранних глікопротеїнах або гліколіпідах, які є рецепторами вірусу грипу, знаходяться в багатьох тканинах, проте вірус може реплікуватися тільки в обмеженому типі клітин. Тропізм вірусу у межах одного організму визначають як

його **органотропність** або **тканинну специфічність**. Наприклад, віруси, що вражають печінку, називають гепатотропними, а віруси, що репродукуються в клітинах нервової системи, – нейротропними. Проте варто зауважити, що хоча взаємодія вірусу з рецептором клітини часто є високо специфічною, різні, навіть неспоріднені віруси можуть використати однакові рецептори.

Таблиця 4.1. *Приклади молекул на поверхні тваринних клітин, які використовуються вірусами як рецептори.*

Молекула	Нормальна функція	Вірус	Тип рецептора
Ангіотензин перетворюючий фермента-2	Утворює активний ангіотензин з попередників; множинні фізіологічні ефекти	Коронавіруси SARS-Cov, SARS-Cov2	Первинний
ICAM-1	Зчеплення з іншими клітинами через CD54	Більшість риновірусів	Первинний
CAR (рецептор Коксакі-аденовірусів)	Унікальний білок з невідомою функцією	Багато аденовірусів, віруси Коксакі	Первинний
$\alpha_v\beta_x$ інтегрин	Зчеплення з іншими клітинами через вітронектин	Аденовіруси	Корецептор
$\alpha_v\beta_6$ інтегрин	Зчеплення з іншими клітинами через вітронектин	Вірус ящуру	Первинний
CD4	Ліганди для головного комплексу гістосумісності II Т-хелперів	ВІЛ-1, ВІЛ-2, вірус імунодефіциту мавп	Первинний
CCR5	Білок з 7 трансмембранними доменами, який зв'язує С–С хемокіни	ВІЛ-1, ВІЛ-2, SIV	Корецептор
CXCR4	Білок з 7 трансмембранними доменами, який зв'язує С–Х–С хемокіни	ВІЛ-1, ВІЛ-2, SIV	Корецептор
β-Адренергічний рецептор	Зв'язує гормон адреналін	Реовіруси	Первинний
HVEM	Рецептор фактора некрозу пухлини	Вірус простого герпесу	Первинний
Нектин 1, 2	Міжклітинна адгезія	Вірус простого герпесу	Первинний
Вірус-специфічний IgG	Зв'язується з вірусом	Вірус лихоманки Денге	Первинний
N-ацетилнейрамінова кислота (термінальний залишок)	Залишок у вуглеводному ланцюзі глікопротеїнів і гліколіпідів	Віруси грипу А, В, С і віруси деяких інших родин	Первинний
Фосфатидилсерин	Мембранний ліпід	Вірус везикулярного стоматиту	Первинний

У деяких вірусів для проникнення в клітину достатньо зв'язування віріона з молекулою рецептора лише одного типу. Віріони інших вірусів, після зв'язування з рецептором, потребують після цього контакту з молекулою ще одного білка. Цей додатковий білок називають **вторинним рецептором** або **корецептором**.

Спочатку вірусологи щодо взаємодії вірусних часток з клітиною-хазяїном виходили з того, що кожен вірус буде використовувати один, визначений тип молекули як свій рецеп-

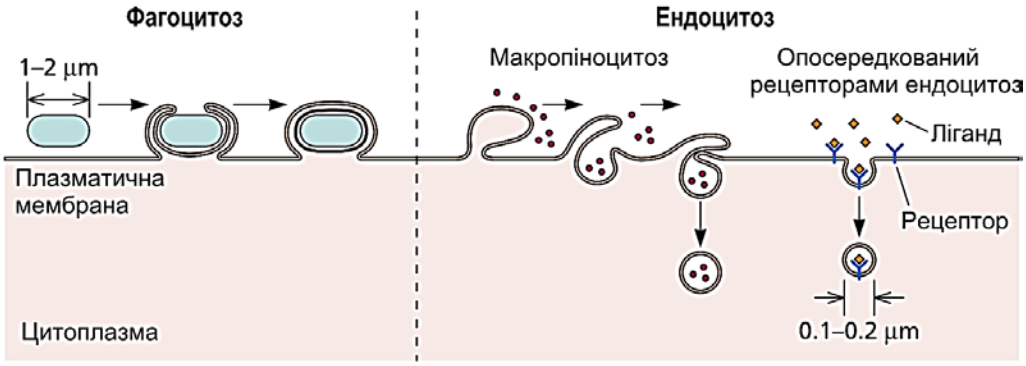
тор, і що відмінності між вірусами в їх рецепторах пояснюють унікальний спектр зараженості клітин, який проявляє кожен вірус. Однак зараз з'являється все більше прикладів використання множинних рецепторів. Наприклад, вірус простого герпесу може використовувати або HVEM, який є членом родини рецепторів фактора некрозу пухлини, нектини 1 і 2, які є молекулами клітинної адгезії із надродини імуноглобуліну, або ділянки гепарансульфату як рецептори входу. Можливість використання альтернативних рецепторів може дозволити вірусу розширити діапазон типів клітин, які він може заразити.

Рецептори розподілені в мембрані клітини дифузно. Напівридка природа мембрани призводить до випадкової концентрації рецепторів в невеликій ділянці, що сприяє утворенню численних зав'язків між рецепторами та антирецепторами і призводить до утворення мікродоменів. Таким чином, зв'язаний вірус може локалізуватися в спеціалізованих ділянках мембрани, таких як ліпідні рафти, кавеоли або вкриті ямки. Кількість молекул рецептора в ділянці адсорбції одного віріона може досягати декількох тисяч.

4.1.2. Віруси тварин: вхід до клітини

Прикріплення вірусу до рецепторів на поверхні тваринної клітини запускає зміну конформації білків оболонки та/або капсиду, що готує вірусну частку до введення геному в цитоплазму клітини. На відміну від прикріплення, проникнення вірусу в клітину є енергозалежним процесом, і може відбуватися лише з метаболічно-активними клітинами.

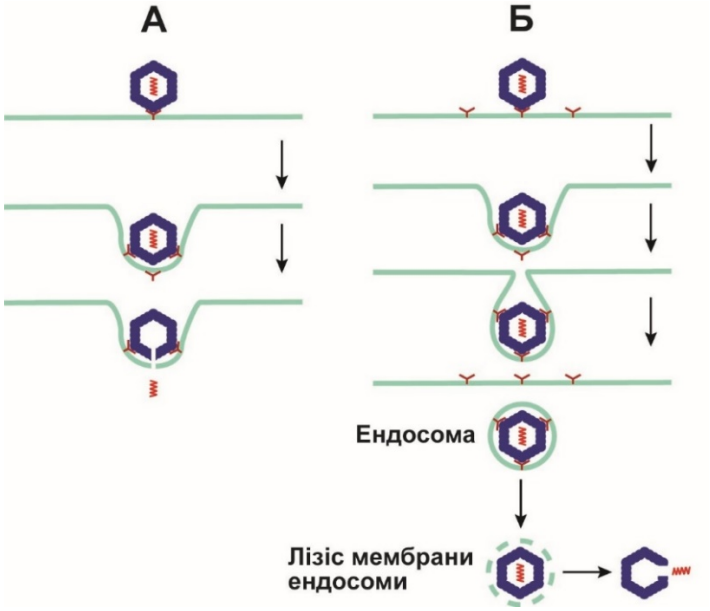
Задля того, щоб геноми вірусів та інші необхідні для реплікації компоненти вірусної частки потрапили усередину клітини, вони повинні перетнути одну або декілька мембран. Це не є тривіальним завданням, адже біологічні мембрани є дуже ефективними бар'єрами. Пробивати мембрани силоміць віруси тварин не здатні (загалом, це рідкісне вміння властиве лише деяким бактеріофагам). Однак клітини постійно поглинають молекули та більш складні структури зі свого оточення, вдаючись до *фагоцитозу* та *ендоцитозу* (Мал. 4.2). І віруси користуються цим, щоби потрапити до клітин.



Мал. 4.2. *Механізми, з допомогою яких клітини поглинають позаклітинні частки і макромолекули. Під час фагоцитозу великі частки, наприклад бактерії або фрагменти клітин, поглинаються завдяки витяганню плазматичної мембрани. Ендоцитоз являє собою інвагінацію і стягування невеликої ділянки плазматичної мембрани, внаслідок яких відбувається або неспецифічне поглинання часток (макропіноцитоз), або специфічне поглинання молекул, зв'язаних з поверхневими рецепторами (опосередкований рецепторами ендоцитоз) (за L.W. Enquist et al., 2015).*

Проникнення вірусів, що не мають ліпопротеїнової оболонки. Механізми, за допомогою яких віруси без оболонки приникають у клітину, вивчені гірше, ніж механізми проникнення вірусів, що мають оболонку. Відомо, що вони з цією метою використовують дві основних стратегії. Перша, властива окремим видам пікорнавірусів (родина *Picornaviridae*), полягає у перенесенні нуклеїнової кислоти через пору в плазматичній мембрані. У цьому

випадку капсид залишається ззовні клітини (Мал. 4.3А). Другий, більш звичайний механізм – це обумовлений рецепторами ендоцитоз (Мал. 4.3Б).

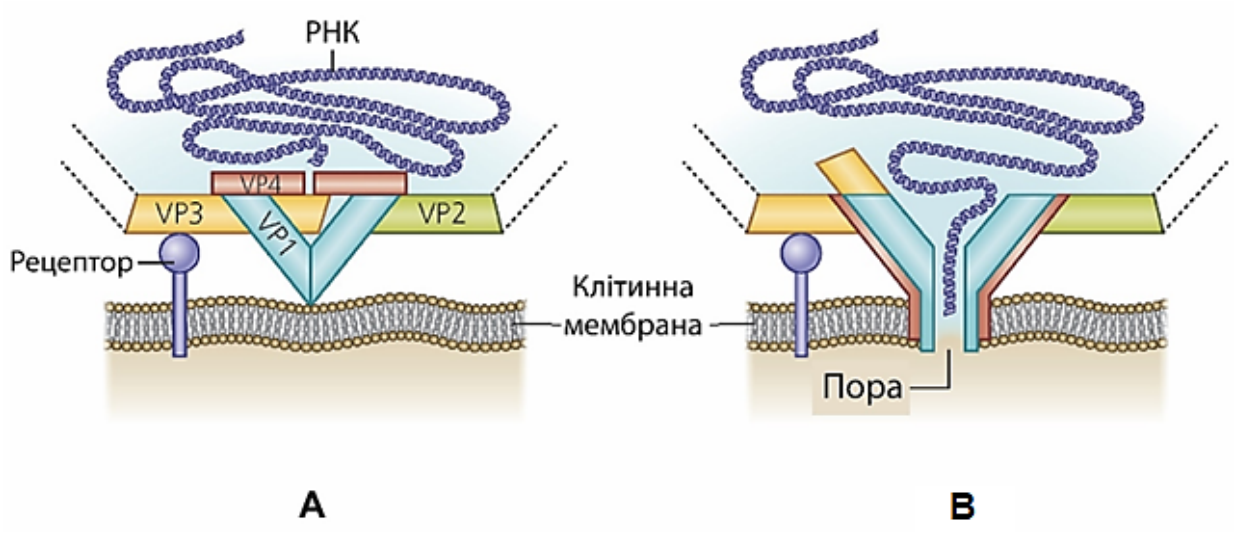


Мал. 4.3. Механізми проникнення в клітину вірусів, що не мають оболонки. А – після прикріплення віріона до рецептора або рецепторів на поверхні клітини, в капсиді утворюється канал, а в плазматичній мембрані – вгинання і надалі пора, через яку геном переходить в цитоплазму клітини. Б – опосередкований рецепторами ендоцитоз вірусу у внутрішньоклітинну вакуоль (ендосому).

Очевидно, що при обох механізмах у клітину доставляється вірусний геном. Але від обраної стратегії залежить кількість структурних білків віріону, які потраплять до клітини. Коли геном впроваджується через пору в мембрані, ймовірно, що більшість або навіть всі білки вірусної частки залишаться зовні клітини. На відміну від цього, при потраплянні в клітину через ендосому разом з геномом всередині опиняється значна кількість вірусних білків.

Прикладом проникнення вірусів через пору в плазматичній мембрані є деякі пікорнавіруси (родина *Picornaviridae*). Сучасні дані свідчать, що для формування пори після приєднання віріона до клітинного рецептора спочатку відбувається вгинання плазматичної мембрани у вигляді пухирця. Проте цей пухирець не замикається в ендосому, і порожній капсид залишається на поверхні клітини. Попадання геному в клітину є незалежним від низького pH. Деталі участі білків капсида у утворенні пори у мембрані показана на малюнку 4.4.

Друга стратегія вірусів без оболонки базується на використанні опосередкованого рецепторами ендоцитозу (Мал. 4.2). Існує декілька механізмів ендоцитозу, серед яких особливо поширені два: залежний від *клатрина* та залежний від *кавеоліна*. Клатрин і кавеолін – це білки, відповідальні за вгинання мембрани всередину і утворення ендоцитозних пухирців; навколо пухирців ці білки тимчасово утворюють правильні сітки, що формують і підтримують пухирець. Обидва механізми ендоцитозу можуть бути використані вірусами: так, аденовіруси (родина *Adenoviridae*) потрапляють до клітин, стимулюючи клатрин-залежний ендоцитоз, а поліомавірус мавп SV40 (родина *Polyomaviridae*) використовує кавеолін-залежний механізм. Відомі також і віруси, що стимулюють ендоцитоз, незалежний від клатрина та кавеоліна.

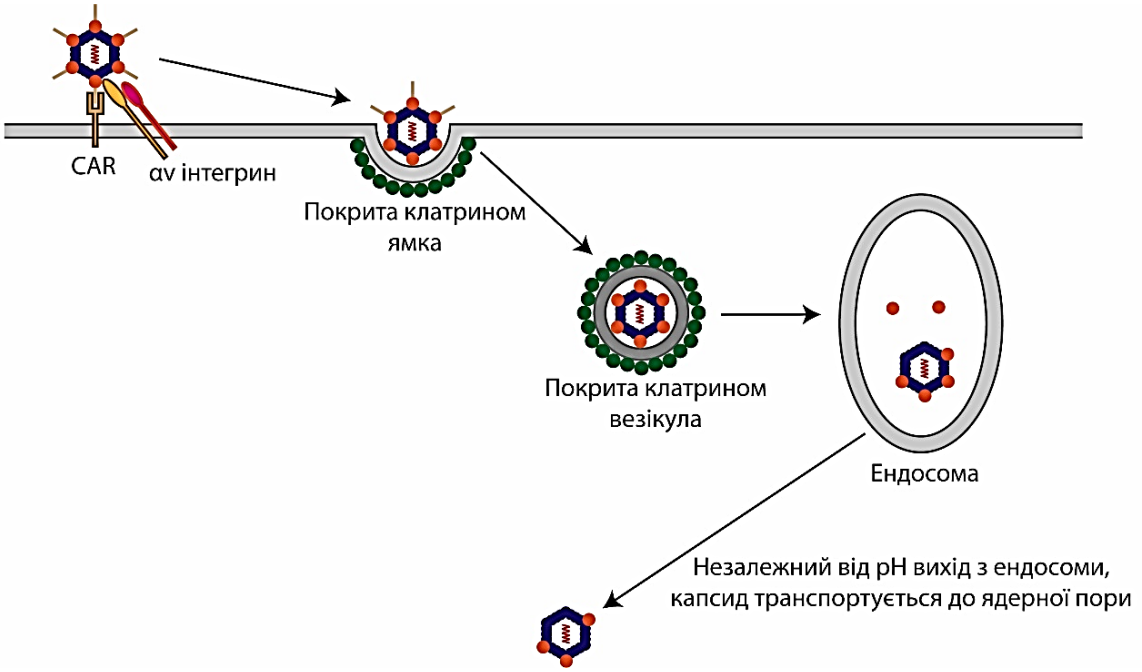


Мал. 4.4. *Модель перенесення РНК пікорнавірусу через клітинну мембрану. (А) Взаємодія з рецептором наближає вершину віріона, утворену з білка VP1, близько до мембрани клітини-мішені. Частина білка VP3 блокує обертання віріона, тоді як невеликий білок VP4, що має гідрофобний N-кінець, до якого приєднана міристильна група, утримується всередині. (В) Конформаційні зміни, викликані зв'язуванням з рецептором, переміщують пробку VP3 з вершини і дозволяють VP1 та міристильним групам на VP4 взаємодіяти з мембраною, утворюючи пору, через яку вірусна РНК потрапляє в клітину (за N.J. Dimmock et al., 2016).*

Варто зауважити, що віріон, який опинився всередині ендосоми, ще не досяг своєї мети, адже від цитоплазми його все ще відділяє мембрана, просто вже не цитоплазматична, а ендосомна. Тож наступним завданням вірусу є вивільнення з ендосоми. Цей процес забезпечується конформаційними змінами вірусних білків, які ініціюються зв’язуванням вірусу з рецепторами у складі ендосоми та/або змінами pH у ній. Остання подія відбувається, коли ендосома зливається з *лізосомою*, внутрішній вміст якої має pH 4,8–5,0. Конформаційні зміни у білках віріона призводять до вивільнення раніше прихованого гідрофобного регіону білкової молекули. Цей регіон вбудовується в мембрану везикули і утворює канал, через який геном і асоційовані з ним білки виходять в цитоплазму. Альтернативним механізмом вивільнення вірусу з ендосоми є лізис її мембрани, який може бути індукований зниженням pH, а може бути pH-незалежним. Останній шлях відомий принаймні у деяких аденовірусів (родина *Adenoviridae*).

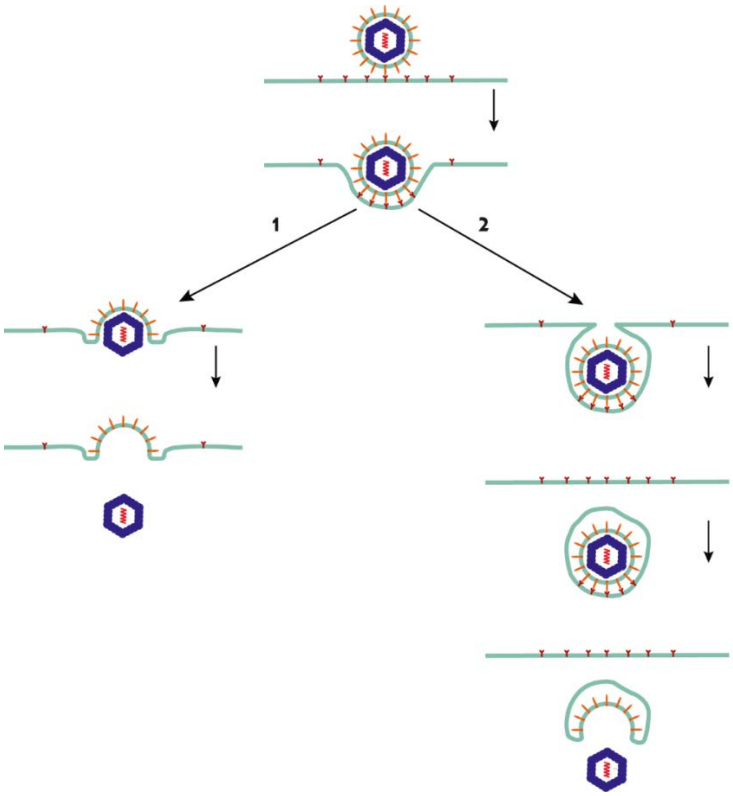
Найкраще вивченими з аденовірусів є аденовіруси людини С, які використовують у якості рецептора білок CAR (Табл. 4.1). Аденовіруси починають взаємодію зі своїм рецептором через білки, що виступають з вершин капсиду (Мал. 2.15). Прикріплення до CAR полегшує вторинну взаємодію між білком капсиду в основі виросту, відомим як основа пентона, та інтегринами на поверхні клітини (корецепторами) (Мал. 4.5).

Разом ці взаємодії ініціюють ендоцитоз через ямки, покриті клатрином, під час якого принаймні частина білків виростів і пентонових базових одиниць видаляється з віріона. Потім відбувається конформаційна зміна внутрішнього компонента капсида, білка VI, який лежить під зовнішньою оболонкою. Вважається, що ця зміна виставляє амфіпатичний (один бік гідрофобний, інший гідрофільний) спіральний домен, який може входити в мембрану везикул і дестабілізує її. Це дозволяє розрив мембрани та вихід залишкової, частково депротеїнізованої вірусної частинки в цитоплазму. Надалі геном з залишками капсида транспортується до ядерної пори.



Мал. 4.5. Процес проникнення аденовірусу в клітини. Докладніше див. у тексті.

Проникнення вірусів, які мають ліпопротеїнову оболонку. Віріони, оточені оболонкою, також мають два основних механізми проникнення до клітини. Перший полягає у злитті оболонки віріона з плазматичною мембраною, другий включає опосередкований рецепторами ендоцитоз вірусної частинки, після чого оболонка віріона зливається з мембраною ендосоми (Мал. 4.6). Таким чином, обидва сценарії включають процес злиття оболонки віріона з мембраною: з цитоплазматичною або з мембраною везикулі.



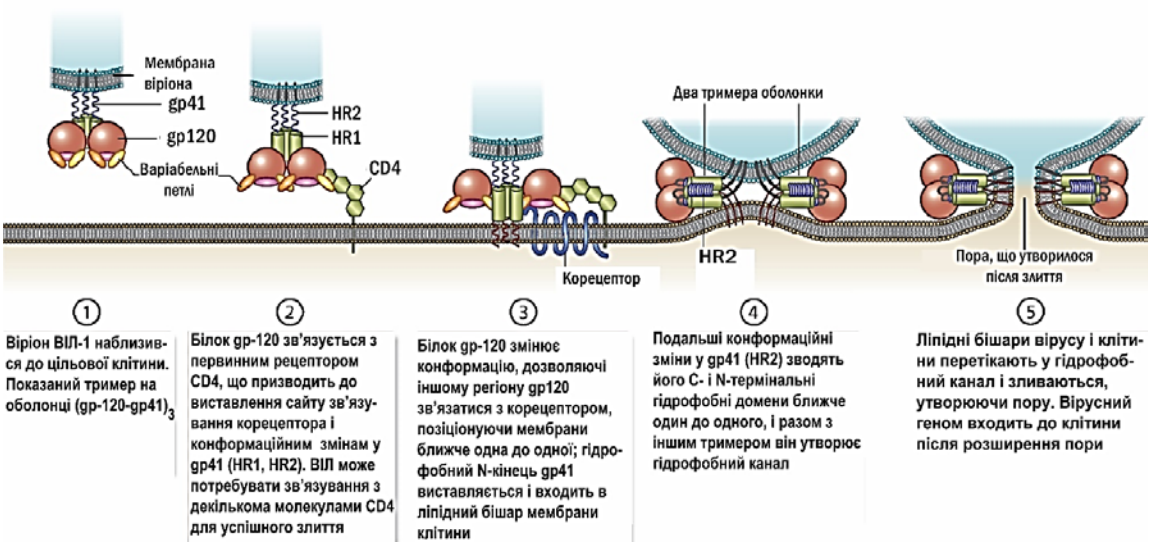
Мал. 4.6. Механізми входу в клітину вірусів, покритих оболонкою. Пояснення в тексті.

Злиття мембран є універсальним біологічним явищем, яке відбувається під час безлічі процесів – від запліднення до внутрішньоклітинного транспорту речовин. Але цей процес ніколи не відбувається спонтанно.

Білки прикріплення вірусів з оболонкою є трансмембранними білками, які пронизують ліпідний бішар. Їх зв'язування з рецепторами клітин-мішеней наближає ліпідні бішари оболонки вірусу та мембрани хазяїна. Однак заряджені головні групи фосфоліпідів у двох мембранах відштовхують одна одну, і тому злиття мембран не відбувається довільно. Кожен оточений оболонкою вірус має спеціалізовані глікопротеїни, які стимулюють злиття його мембрани з мембраною клітини.

Для того, щоб відбулося злиття, мембрани вірусу та клітини мають бути розірвані в певній спільній точці. Це призведе до того, що їхні гідрофобні ділянки опиняться в гідрофільному оточенні, і, притягуючись одна до одної, переформовуються у єдиний шар.

Прикладом злиття оболонки віріона з цитоплазматичною мембраною клітини є вхід в клітину нуклеокапсиду ВІЛ-1. Геном ВІЛ-1 кодує протеїн gp160, який при дозріванні розрізається протеазою на структурні білки оболонки gp120 та gp41. Білки gp120-gp41 утворюють тример на поверхні віріона. Подробиці злиття мембран показані на Мал. 4.7.



Мал. 4.7. Модель злиття мембран і проникнення геному віріона ВІЛ-1 у клітину-мішень (за N.J. Dimmock et al., 2016).

Злиття мембран оболонки віріона з мембраною ендосоми відбувається аналогічно, з тією відмінністю, що зазвичай воно є pH-залежним і здійснюється після ацидифікації вмісту ендосоми наприклад шляхом злиття з лізосомою.

4.1.3. Віруси рослин: зараження

Клітинна стінка, що оточує плазматичну мембрану рослинної клітини, запобігає прикріпленню і входу вірусів в клітину способами, властивими вірусам тварин. Товщина та склад клітинної стінки рослини не дозволяє вірусам утворювати в ній отвори, як це відбувається з клітинними стінками бактерій. Тому, віруси потрапляють у цитоплазму рослинної клітини лише у випадку пошкодження стінки. З цієї причини, рослини заражаються або за допомогою різноманітних переносників, або через ушкодження, викликані фізичними причинами. Переносниками вірусів рослин можуть бути попелиці, трипси, цикадки, кліщі, нематоди, фітопатогенні протисти та гриби. Коло рослин, що вражаються вірусом, зазвичай визначається видами рослин, якими може живитися переносник. Таким чинам, як вважають, віруси рослин не прикріплюються до рецепторів на поверхні клітин рослин і відповідно не мають на своїй поверхні білків прикріплення.

Потрапивши в клітину рослини, вірусна частка в цитоплазмі роздягається. Це забезпечується зв'язуванням білків капсиду з білками цитоплазми рослинної клітини. На процес роздягання також впливають двовалентні катіони, особливо іони кальцію.

Вивільнені геноми, так само як і нероздягнені віріони, можуть переміщатися з клітини рослини в суміжну клітину через плазмодесми. Цей механізм поширення інфекції, не доступний вірусам бактерій та тварин, є дуже важливим для рослинних вірусів. Тому характерною їхньою особливістю є кодування так званих **транспортних білків**, які є консервативними і сприяють переміщенню у прилеглі клітини через плазмодесми. Зазначимо, що молекулярні механізми переміщення вірусів через плазмодесми не є добре зрозумілими. На великі відстані віруси пересуваються по транспортним тканинам рослини, в першу чергу по флоемі. У багатьох випадках було показано, що транспортні білки і білки оболонки віріона є важливими для транспорту по флоемі. У той же час деякі віруси рослин здатні переміщатися без білка оболонки.

4.1.4. Бактеріофаги: прикріплення і ввід геному до клітини бактерії

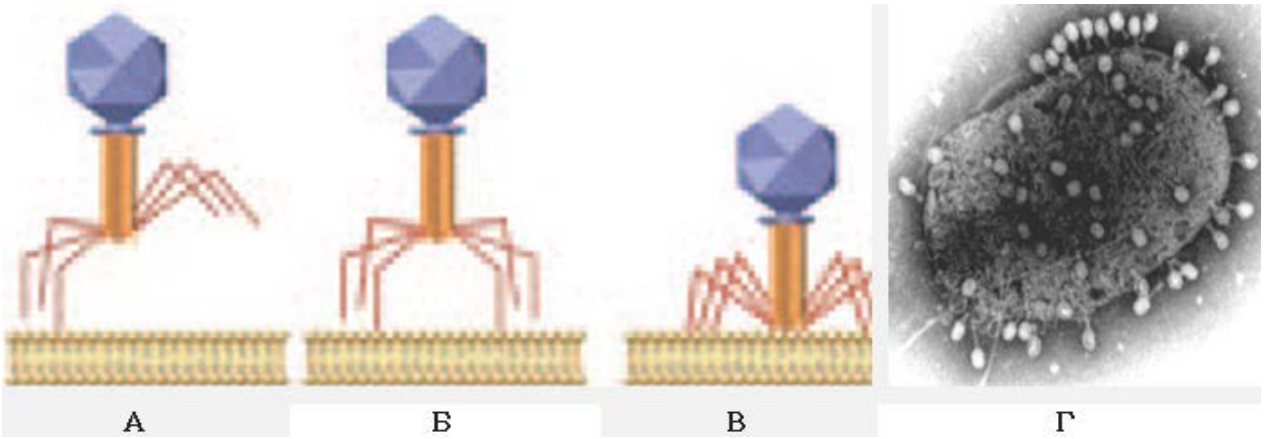
Бактерії, як і рослини, мають клітинну стінку. Деякі віруси бактерій мають засоби для здолання клітинної стінки і вводять через неї свій геном; інші використовувати спеціалізовані структури на поверхні бактерій як вхідні портали для вірусного геному. Після входу геному часто більшість або всі білки вірусних часток залишаються поза клітиною.

Аналогічно до вірусів тварин, бактеріофаги специфічно прикріпляються до складових бактерійної клітини, які відіграють роль рецепторів і корецепторів. Більшість бактеріофагів прикріплюються до клітинної стінки бактерій, але є деякі, які використовують клітинні рецептори на більш спеціалізованих структурах клітини-хазяїна, таких як ворсинки, джгутики або капсули. Наприклад, рецептором фага λ (лямбда), який вражає бактерію *Escherichia coli* і має морфологію голівка-хвіст, є білок мальтопорин, який є високо афінним білком зв'язування/транспорту мальтози. Цей білок кодується геном *lamB*, що знаходиться в межах індукованого мальтозою оперону. Таким чином, сприйнятливість клітин бактерій до цього фага залежить від поживного середовища і з'являється при появі мальтози.

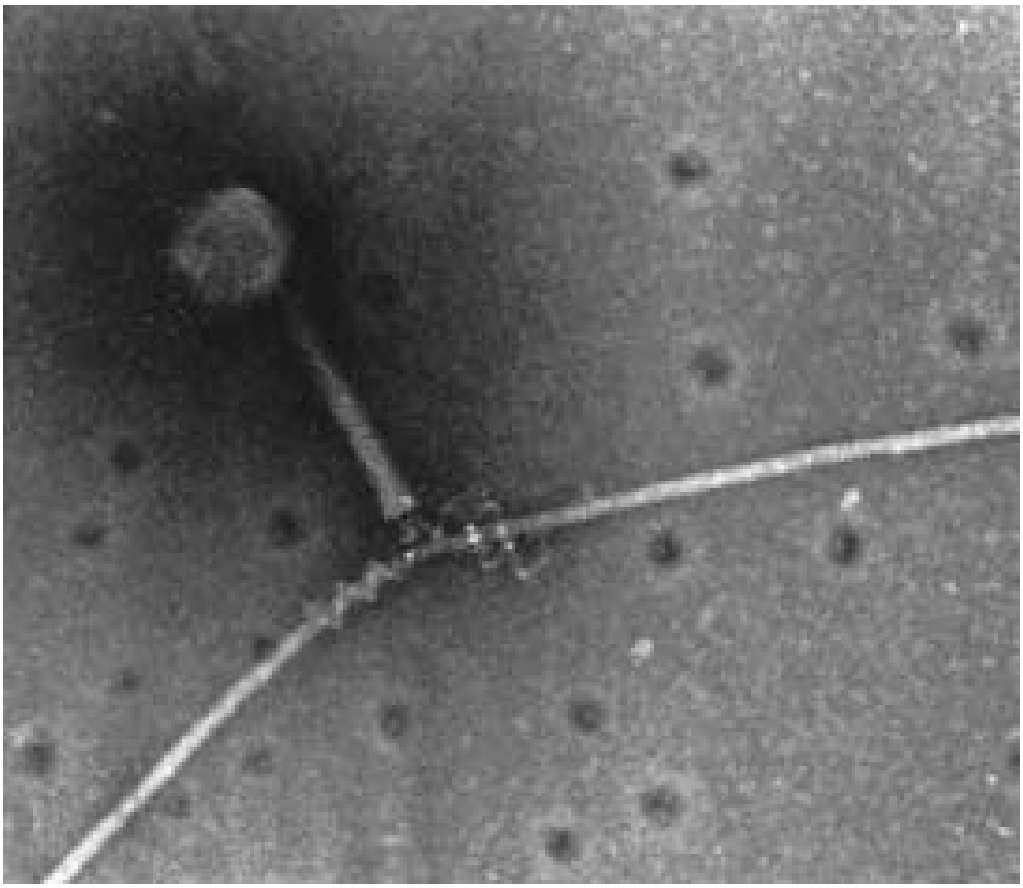
Бактеріофаги з родини *Myoviridae*, такі як фаги T2 і T4, мають складні віріони з цікавими допоміжними структурами: хвостом, базальною пластинкою, шпильками та фібрилами хвостового відростка (див. розділ 2.5). Початкове прикріплення фага до бактерій здійснюють дистальні кінці фібрил (Мал. 4.8). Далі фібрили згинаються в центрі, у результаті чого фаг наближається до клітинної стінки бактерії і закріплюється на ній шпильками базальної пластинки.

Фаги з родини *Siphoviridae*, наприклад фаг λ, не мають фібрил хвостового відростка, тож приєднуються до бактерії одразу за допомогою шпильок.

Не усі фаги прикріпляються саме до клітинної стінки бактерії. Деякі можуть прикріплятися до інших структур: *пілей, або ворсинок* (трубчастих стрижнів, розташованих на поверхні бактерії), джгутиків або слизових капсул. Наприклад, фаги χ (хі) та PBSI (родина *Siphoviridae*) прикріпляється до джгутика, обгортаючи навколо нього свої хвостові відростки (Мал. 4.9). Далі фаг «сповзає» по джгутику, досягаючи клітини.

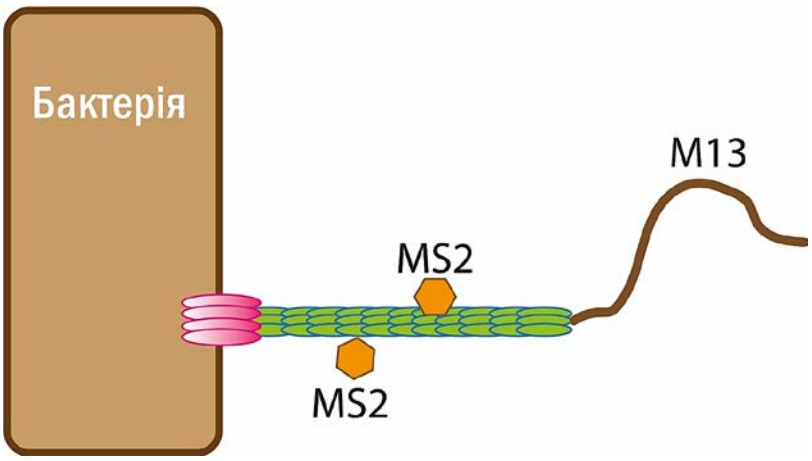


Мал. 4.8. *Етапи прикріплення бактеріофага Т4 до клітинної стінки бактерії (А-В) і електронна мікрофотографія Escherichia coli з фагами, що прикріпилися (Г) (А-В за відкритими джерелами інтернету, Г за https://schaechter.asmblog.org/.a/6a00d8341c5e1453ef014e8aca82ba970d-800wi).*



Мал. 4.9. *Електронна мікрофотографія фага χ, що прикріпився до джгутика бактерії (за https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jvi.2.3.256-264.1968).*

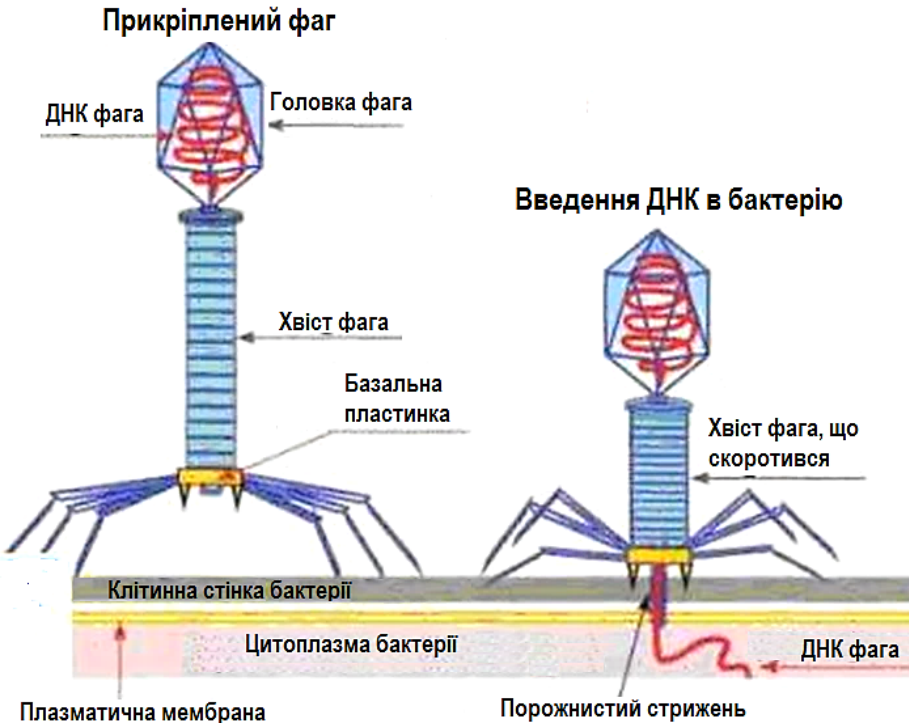
Важливою ділянкою бактерійних клітинних рецепторів для деяких фагів є статеві ворсинки. Бактерії, які містять статевий фактор (F) або певні коліцини або фактори стійкості до наркотиків, формують ворсинки, і два класи фагів прикріплюються до них. Ниткоподібні фаги з одноланцюговими ДНК-геномами, такі як M13 (родина *Inoviridae*), прикріплюється до кінчиків ворсинок, тоді як багато типів сферичних РНК-фагів (наприклад MS2, родина *Leviviridae*) прикріплюються вздовж ворсинок (Мал. 4.10).



Мал. 4.10. Приєднання фага M13 до кінчику ворсинки бактерії і фагів MS2 вздовж ворсинки.

Вхід геномів бактеріофагів, що мають голівку і хвіст. Хвостовий відросток бактеріофагів Т4 (родина *Myoviridae*) складається з 24 кілець, що утворюють чохол навколо центрального стрижня. Кожне кільце складається з декількох великих і малих субодиниць. Після прикріплення до поверхні бактерії, завдяки об'єднанню великих і малих субодиниць, хвіст скорочується, так що кілець у ньому стає лише 12. Енергію для скорочення чохла, можливо, забезпечують 144 молекули АТФ, пов'язані з хвостом фага.

Порожнистий стрижень усередині хвостового відростка скорочуватися не може. Тож він проходить крізь клітинну стінку та мембрану бактерії. Цей процес, ймовірно, полегшується ферментом *лізоцимом*, який асоційований з хвостом фага. Далі відбувається стискання голівки, яке призводить до уприскування ДНК фага в клітину бактерії. Спосіб введення ДНК в клітину у фагів Т4 часто порівнюють з введенням ліків за допомогою шприца (Мал. 4.11).



Мал. 4.11. Вхід геному бактеріофага Т4 в клітину бактерії (за https://tfa.org.ua/24582).

У бактеріофагів, які мають нескоротливий хвіст, наприклад, фаг Т1 з родини *Siphoviridae*, отвір для входу в клітину утворюють імовірно вірусні ферменти.

Вхід геномів інших бактеріофагів. Більшість бактеріофагів не мають хвоста, тож спосіб, яким їхня нуклеїнова кислота проникає в клітину, зрозумілий лише в загальних рисах.

Так, нитчасті ДНК-геномні та ікосаедричні РНК-геномні бактеріофаги адгезуються на поверхні статевих ворсинок, що характерні для багатьох бактерій. Але як саме вони далі проникають у клітину залишається загадкою. Можливо, вони використовують для цього канал ворсинки, а може – змушують її скорочуватись, входячи до цитоплазми під час цього процесу.

4.1.5. Внутрішньоклітинний транспорт

Для бактеріофага достатньо потрапляння геному в клітину, щоб розпочати цикл реплікації. У бактерійній клітині існує не так багато субклітинних компонентів, до яких вірусу потрібно дістатися, і на оголеному геномі негайно починається експресія генів.

Щодо вірусів тварин і рослин ситуація є більш складною. Якщо капсид потрапив у клітину цілим, то його слід принаймні частково розібрати, перш ніж можуть відбуватися процеси експресії генів та реплікації геному. Це необхідно для того, щоб субстрати для синтезу нових молекул, а в деяких випадках і клітинні ферменти, могли отримати доступ до вірусного геному. Крім того, вірусні геноми та будь-які необхідні асоційовані білки повинні транспортуватися, щоб дістатися до тієї частини клітини, де має відбутися реплікація. Для вірусів, які реплікуються в ядрі, геном повинен пройти через ядерну пору. Таким чином, після потрапляння до клітини, геноми, а іноді і цілі нуклеокапсиди вірусів мають бути доставлені в конкретне місце усередині клітини. Тому для вірусу важливо, щоб він зв'язувався з молекулою, яка може його перенести у потрібний компартмент.

Події, що відбуваються підчас раннього етапу реплікації, в більшості випадків унікальні для певного типу вірусу і не можуть бути узагальненими.

Реплікація більшості РНК-вірусів еукаріотів здійснюється в цитоплазмі, оскільки їхні геноми працюють і як матриці для реплікації, і як мРНК для синтезу ферментів, що обслуговують цей процес. Винятком є вірус грипу (родина *Orthomyxoviridae*). Йому для репродукції необхідні клітинні білки сплайсингу (див. нижче), тож геном цього вірусу має бути доставлений в ядро.

Реплікація геномів ретровірусів завжди відбувається в ядрі. У цитоплазмі клітини їхній РНК-геном копіюється у форму ДНК, після чого, як правило, зберігається до початку мітозу. Під час мітозу ядерна оболонка тимчасово зникає, що дозволяє вірусній ДНК, разом з асоційованими з нею білками, потрапити в ядерний компартмент. Втім, у низки ретровірусів ДНК може транспортуватися і в інтактні ядра, що дозволяє їм реплікуватися і в клітинах, які не діляться. Саме до цієї групи належить ВІЛ.

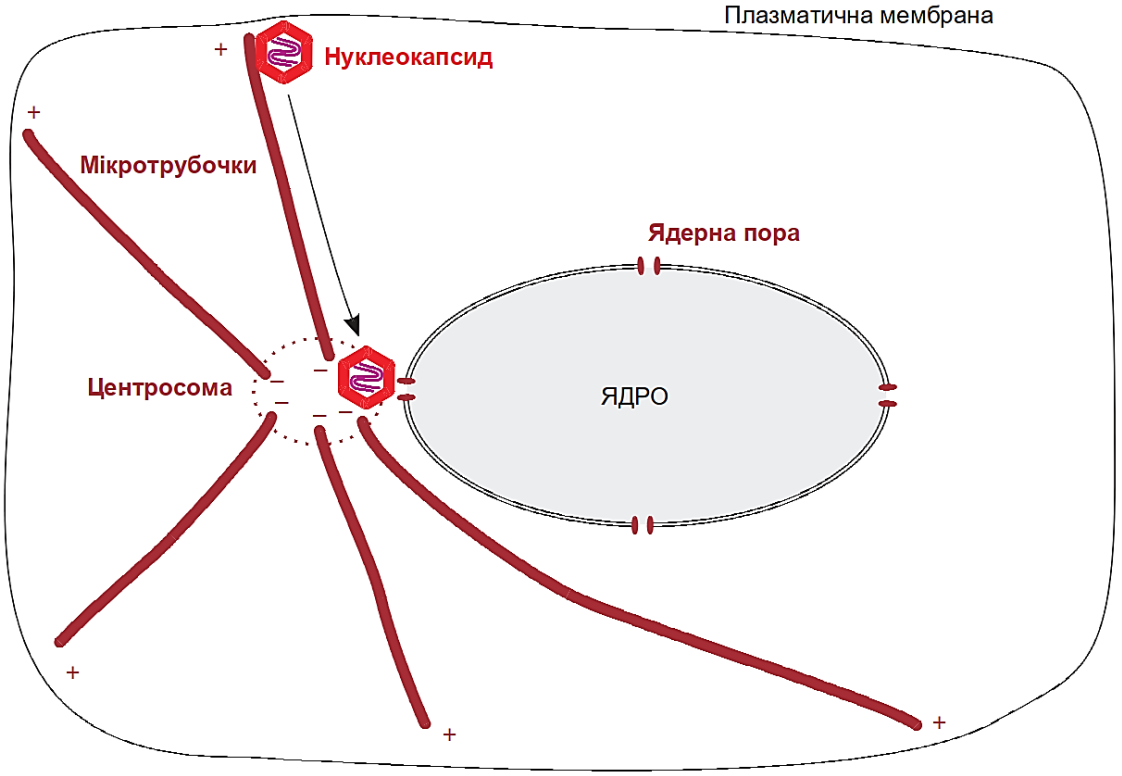
Щодо ДНК-вірусів еукаріотів, то більшість з них також реплікуються в ядрі. Винятком є лише іридовіруси (родина *Iridoviridae*) і поксвіруси (родина *Poxviridae*), які реплікуються в цитоплазмі.

Таким чином, більшість ДНК-вірусів та чимало РНК-вірусів повинні якось перенести свої геноми до ядерної оболонки і потім перетнути її. Оскільки власних засобів транспортування віруси не мають, вони експлуатують клітинні механізми, а саме – перенесення вантажів білками, пов'язаними з мікротрубочками.

Мікротрубочки є порожнистими циліндрами 25 нм діаметром, що складаються з білків α- і β-тубуліна. За своєю молекулярною структурою мікротрубочки асиметричні, їхні кінці позначають як плюс і мінус. У більшості тваринних клітин плюс-кінці розташовані біля плазматичної мембрани, а мінус-кінці прикріплені до розташованого поблизу ядра *клітинного центру (центросоми)* (Мал. 4.12). Під час переміщення різноманітних структур, серед

них молекул і органел, мікротрубочки використовуються як своєрідні рейки. Уздовж них, зі швидкістю 1–4 мкм в секунду, крокують так зв. **моторні білки** (*динеїни, кінезини, міозини* та ін.), тягнучі на собі різноманітні вантажі. Саме цю систему внутрішньоклітинного транспорту і експлуатують віруси, зокрема герпесвіруси, аденовіруси, парвовіруси і ретровіруси.

Оболонка ядра складається з двох мембран, зовнішньої і внутрішньої. Вона пронизана порами, в яких зовнішня і внутрішня мембрани переходять одна в одну. Ядро типової тваринної клітини має 3000–5000 пор.



Мал. 4.12. Транспорт нуклеокапсиду уздовж мікротрубочок. Нуклеокапсид транспортується від плюс кінця мікротрубочки, розташованого біля плазматичної мембрани, до центросоми, яка розташована поблизу від ядра (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Ядерні пори функціонують як своєрідна варта, контролюючи транспорт матеріалів до ядро та з нього. У центрі пори влаштовано канал, через який можуть вільно проходити частки до 25 нм діаметром. Невеликі нуклеокапсиди та віріони, на кшталт віріонів парвовірусів, відповідають цій вимогі і можуть проходити через пору повністю. Віруси з більшими віріонами повинні біля ядерної пори частково або повністю позбутися залишків свого капсиду, здійснивши так зване **вторинне роздягання**.

Перебування у цитоплазмі є дуже небезпечним для вірусу етапом, адже внутрішньоклітинні захисні системи, наприклад ферменти лізосом, можуть легко його зруйнувати. Показано, що під час зараження клітин поліовірусами (родина *Picornaviridae*) основна частина вірусної РНК руйнується клітинними рибонуклеазами. У результаті, з 1000 вірусних часток лише одна успішно заражає клітину. Цікаво, що ані електронна мікроскопія, ані біохімічні дослідження не виявили відмінностей між тими вірусними частками, що викликали зараження, і тими, що загинули у цитоплазмі. Тож вдале інфікування для багатьох вірусів є лише результатом рідкісного збігу обставин.

4.2. Експресія генів вірусів

Репродукція вірусів в усіх без винятку випадках потребує підтримки білків, що мають вірусне походження. Синтез цих білків є результатом *експресії* вірусних генів, тобто процесу, під час якого спадкова інформація, представлена в геномі у вигляді послідовності нуклеотидів, реалізується у формі функціонального продукту – білка або нематричної РНК.

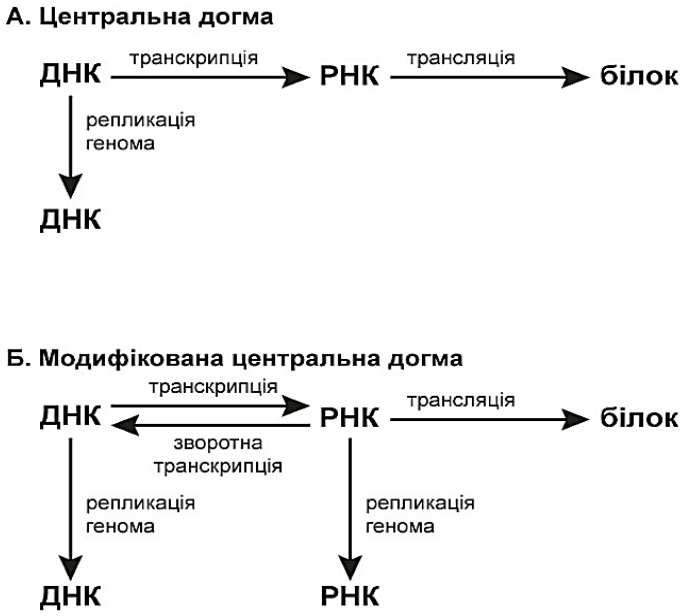
Експресія вірусних генів багато в чому схожа з процесами, які відбуваються в клітинах в нормальних умовах. Геномні ДНК вірусів повинні бути транскрибовані з утворенням матричної РНК (мРНК), на матриці якої потім синтезуються поліпептиди. Для вірусів еукаріотів мРНК повинна бути переміщена в цитоплазму, щоб забезпечити трансляцію. Контроль цього процесу можливий на усіх його стадіях – від транскрипції до посттрансляційної модифікації білків, і віруси використовують ці можливості різними способами, щоб досягти виконання організованої програми експресії генів.

Для більшості ДНК-вірусів експресія генів відбувається поетапно, причому так звані *ранні* гени експресуються до початку синтезу (реплікації) ДНК, а *пізні* гени активуються лише після цієї події. У деяких випадках є також подальші часові поділи експресії різних генів.

Центральна догма молекулярної біології та її модифікації для вірусів. У 1958 р. Френсіс Крік запропонував *центральну догму молекулярної біології*, відповідно до якої в усіх без винятку живих організмів генетична інформація реалізується шляхом передавання від ДНК до РНК (*транскрипція*) і далі від РНК до білка (*трансляція*), а між поколіннями передається шляхом копіювання (*реплікації*) ДНК (Мал. 4.13А). Дослідження вірусів змусили ввести до центральної догми суттєві доповнення. З'ясувалось, що окрім класичних процесів, у вірусів можливі (Мал. 4.13Б):

– *реплікація РНК*, тобто копіювання РНК-геному;

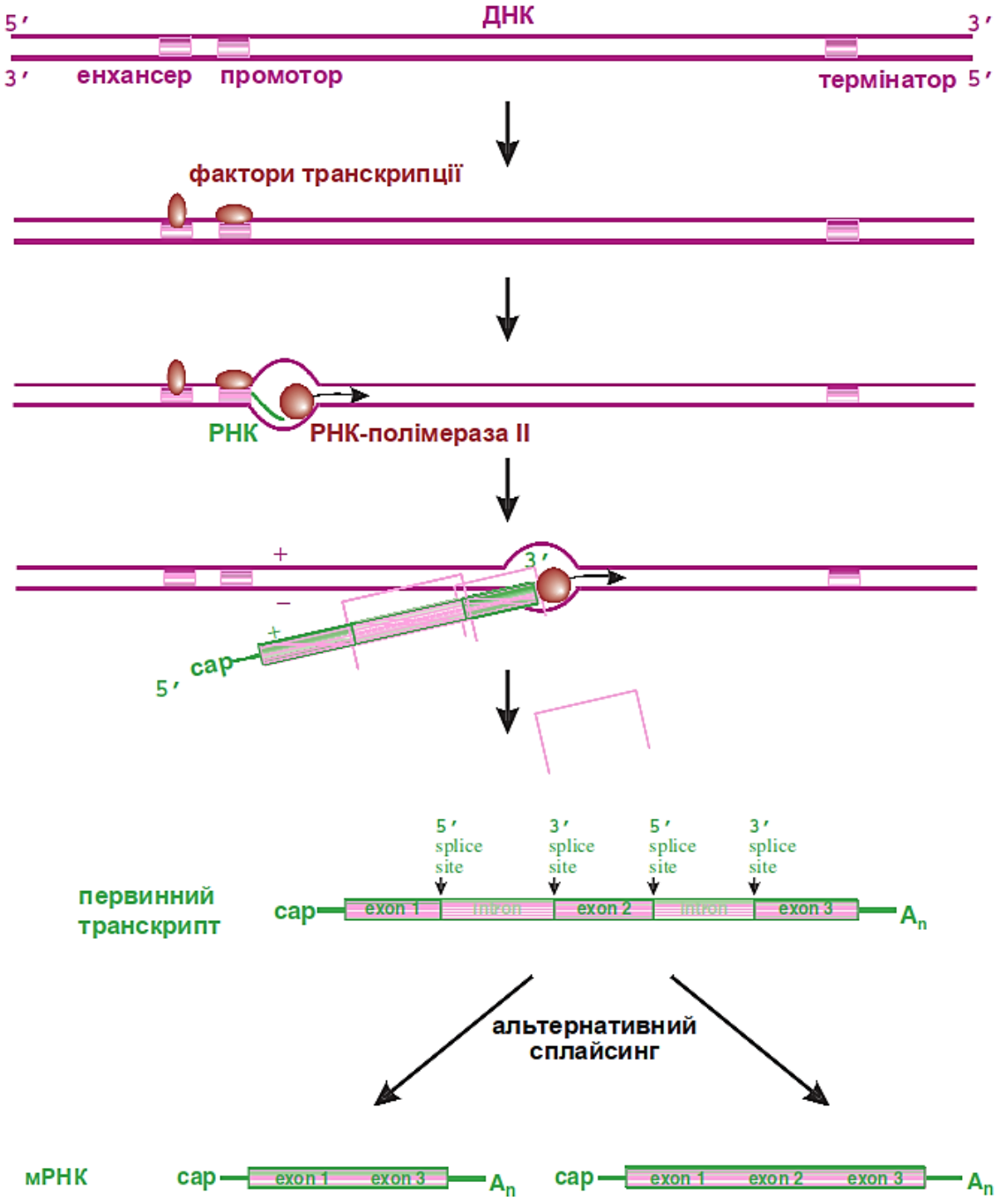
– *зворотна транскрипція*, тобто передавання інформації від РНК до ДНК.



Мал. 4.13. (А) Центральна догма молекулярної біології, запропонована Ф. Кріком, та (Б) модифікації центральної догми, які виявилися необхідними внаслідок відкриття механізмів репродукції вірусів.

4.2.1. Транскрипція геномної ДНК

Класична *транскрипція* є процесом синтезу РНК на матриці дволанцюгової ДНК (Мал. 4.14). І у вірусів, і у клітинних організмів довга молекула ДНК ніколи не копіюється у формі РНК цілком. Натомість, у кожному акті транскрипції утворюється РНК-копія лише короткого фрагменту ДНК, що описує будову одного або декількох цільових продуктів (білків та нематричних РНК). Ділянка ДНК, на якій підчас транскрипції утворюється РНК, називається *транскриптоном*. Це поняття близьке до поняття *гена*; різницю між ними ми тут не будемо обговорювати.



Мал. 4.14. Схематичне зображення процесу транскрипції та посттранскрипційної модифікації РНК (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013). Пояснення в тексті.

У процесі транскрипції бере участь чимало ферментів, але головними серед них є *ДНК-залежні РНК-полімерази*: саме вони здійснюють збирання молекули РНК з окремих нуклеотидів. Щоб почати свою роботу, РНК-полімерази повинні «знати», на яких ділянках ДНК слід починати і закінчувати синтез РНК. Тож на обох кінцях ділянок, призначених для транскрипції, виникли спеціальні, помітні для РНК-полімераз послідовності: промотори і термінатори.

Промотори – послідовності, що передують транскриптону. Вони призначені для приєднання РНК-полімерази, дозволяючи їй зайняти правильне положення перед початком транскрипції. Промотори містять дві-три регуляторні послідовності, що безпосередньо відповідальні за приєднання ферментів. Так, у прокаріотів та їхніх вірусів за 10 нуклеотидів від точки початку транскрипції знаходиться послідовність TATAAT, відома як *Прибнов-бокс,* а перед нею, на відстані 35 нуклеотидів від транскриптона, знаходиться *Хогнесс-бокс* з послідовністю TTGACA. У еукаріотів та їхніх вірусів Прибнов-боксу відповідає *TATA-бокс* з послідовністю TATA(A/T)A(A/G), розташований за 25–30 нуклеотидів від точки початку транскрипції, а замість Хогнесс-бокса у них присутній *CAAT-бокс*, розташований на відстані 75–80 нуклеотидів від транскриптона.

Термінатори – послідовності, які примушують РНК-полімеразу припинити транскрипцію та від'єднатись від мРНК. У прокаріотів вони містять так звані *паліндромні послідовності* або сайти зв'язування *білка ρ* (див. нижче). У еукаріотів термінатор зазвичай містить послідовність TTATTT, за якою слідує довга серія CA-повторів.

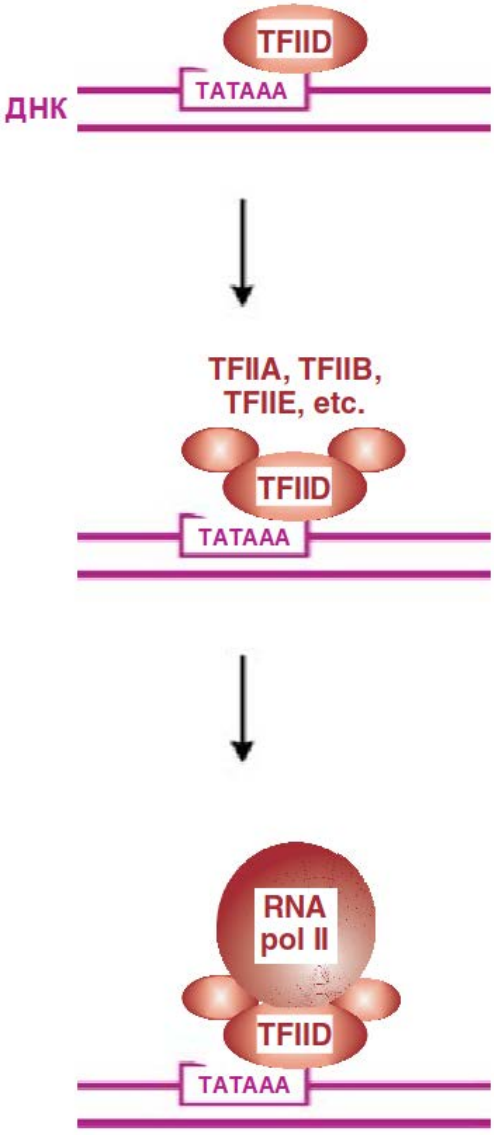
В еукаріотичних клітинах, окрім промоторів і термінаторів, також відомі так звані *транс-регуляторні послідовності*, що можуть знаходитися на відстані до 1 млн. пар нуклеотидів від транскриптона. Найважливішими серед них є **енхансери** (підсилювачі) – послідовності, які забезпечують «останній поштовх» для початку транскрипції. Для того, щоб енхансер спрацював як слід, до нього мають приєднатися спеціальні білки-активатори. Після цього молекула ДНК за допомогою спеціального ферменту вигинається дугою, дозволяючи активаторам торкнутися РНК-полімерази, що вже зв'язана з промотором. Прикладами активаторів є AP-1 і AP-2 (activator proteins 1, 2), Sp1 (stimulatory protein 1) та NF-κB (nuclear factor κB). Протилежними енхансерам за дією є **сайленсери** - ділянки ДНК, які, зв'язуючись з певними факторами транскрипції (репресорами), можуть виключати експресію генів.

Промотори, а також енхансери і сайленсери являють собою регіони контролю транскрипції.

До процесу транскрипції залучено кілька десятків регуляторних білків, що називають **факторами транскрипції**. Вони специфічно зв'язуються з послідовностями промоторів і енхансерів, контролюючи експресію гена. Власно кажучи, РНК-полімераза зв'язується не безпосередньо з промотором, а з факторами транскрипції, які зв'язалися з промотором. Прикладом фактору, що зв'язується з промотором, є TFIID (транскрипційний фактор два-Д). Його молекула складається з 13 поліпептидів, один з яких відповідальний за зв'язування з TATA-боксом. Після цього зв'язування відбувається приєднання до TFIID інших факторів транскрипції (TFIIA, IIB, IIE, IIF і IIH) та РНК-полімерази II (Мал. 4.15).

Для транскрипції власних ДНК-геномів віруси можуть використовувати клітинні фактори транскрипції, а можуть кодувати і власні регуляторні білки, включаючи ДНК-залежну РНК-полімеразу. У таблиці 4.2 наведені приклади участі кодованих вірусами білків у транскрипції.

В еукаріотичні клітині транскрипція відбувається у ядрі, і лише там можна знайти ферменти, здатні обслуговувати цей процес. Тож недивно, що віруси, здатні потрапляти в ядро, зазвичай використовують для здійснення транскрипції ферменти клітини-хазяїна, а ті, що реплікуються у цитоплазмі, змушені створювати свої власні ферменти.



Мал. 4.15. Зв'язування факторів транскрипції і РНК-полімерази II з ТАТА-боксом (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

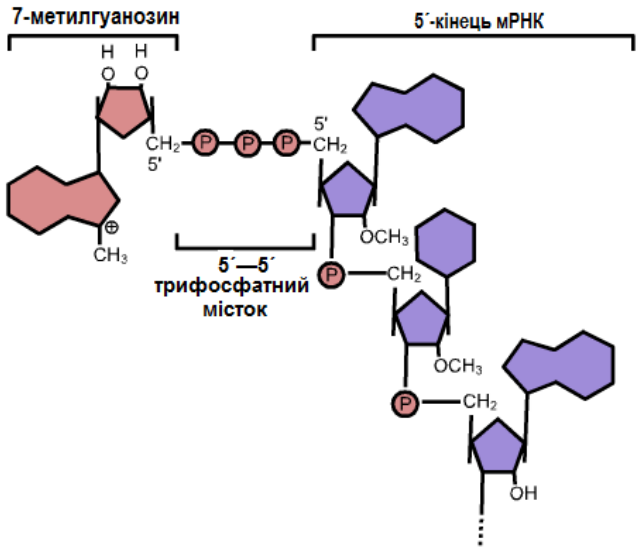
Таблиця 4.2. *Стратегії транскрипції вірусних ДНК-геномів.*

Походження компонентів для транскрипції	Приклади вірусів
Виключно кодовані клітиною-хазяїном білки	Ретровіруси з простими геномами, каулімовіруси
Білки клітини-хазяїна плюс один білок вірусу	
Білок вірусу транскрибує пізні гени	Бактеріофаги Т3 і Т7
Білок вірусу регулює транскрипцію	Парвовіруси, папіломавіруси, поліомавіруси, ретровіруси зі складними геномуми, гемініві-руси
Білки клітини-хазяїна плюс декілька білків вірусу	
Вірусні білки регулюють транскрипцію	Аденовіруси, бактеріофаг Т4, герпесвіруси
Виключно кодовані вірусом білки	Віруси віспи

Транскрипцію в клітинах еукаріот виконують три ДНК-залежні РНК-полімерази, які позначають як РНК-полімерази I, II і III відповідно. РНК-полімераза II синтезує попередники мРНК (пре-мРНК), а також попередники малих регуляторних РНК – мікроРНК і малих інтерферуючих (міРНК). Два інших ферменти виробляють стабільні РНК клітини: РНК-полімераза I синтезує попередників рибосомних РНК (пре-рРНК), а РНК-полімераза III – попередників транспортних РНК (пре-тРНК).

Використання вірусами РНК-полімерази III невідомо. Найчастіше серед клітинних РНК-полімераз для транскрипції власних генів віруси обирають РНК-полімеразу II, яка і в клітині відповідальна за синтез матричних РНК. Але геноми деяких вірусів містять гени, які транскрибуються РНК-полімеразою I. Зокрема, вона синтезує регуляторні міРНК аденовірусу людини С і деяких герпесвірусів людини і тварин.

При синтезі мРНК, ще до завершення транскрипції, молекула РНК, яка тільки почала синтезуватися, зазнає хімічної модифікації на своєму 5′-кінці. До неї приєднується так званий ***кеп*** (англ. *cap*, шапочка) – 7-метилгуанозинтрифосфат (Мал. 4.16). Цей модифікований нуклеотид з'єднується з першим нуклеотидом мРНК 5′–5′ зв'язком через три фосфатні групи (нагадаємо, що звичайні нуклеотиди пов'язані між собою 5′–3′ зв'язком через один фосфат).



Мал. 4.16. Кеп (7-метилгуанозин) на 5′-кінці мРНК (за https://basicrulesoflife.wordpress.com).

В певних випадках на 5′-кінці трапляються і інші модифікації, наприклад приєднання метильних груп до залишків рибози першого і другого нуклеотидів. Усі ці модифікації називають **кепуванням** (capping). Вони виконують такі функції:

– допомагають транспорту мРНК з ядра в цитоплазму;

– захищають мРНК від руйнування екзонуклеазами;

– слугують сигналами для початку трансляції.

Кепування здійснюють ферменти **гуанілтрансферази** (приєднують гуанозинтрифосфат) і **метилтрансферази** (приєднують метильну групу). У клітині ці ферменти локалізовані в ядрі.

Після завершення транскрипції, до 3′-кінця більшості первинних транскриптів еукаріотів і їх вірусів додається ряд залишків аденіну, так званий **поліаденіловий хвіст** (полі(А)-хвіст, polyA-tale). Його приєднання, що має назву **поліаденілювання**, або *тейлінг*, збільшує стабільність мРНК та відіграє роль в запуску трансляції. Приєднання полі(А)-хвоста

відбувається незвичним чином: кінець щойно синтезованої РНК замикається у петлю, після чого ця петля розрізається. До місця розрізу приєднується **поліаденілатполімераза**, яка починає крок за кроком приєднувати до нього аденінові нуклеотиди.

Сигнальна послідовність AATAAA, що ініціює цей процес, розташована за 10–30 нуклеотидів до сайту поліаденілювання. Цікаво, що в 1981 р. вона була відкрита у вірусу SV40 (родина *Polyomaviridae*), і лише згодом виявлена у еукаріотів. Втім, деякі віруси використовують для поліаденілювання інші сигнальні послідовності, наприклад, у гепаднавірусів ссавців (родина *Hepadnaviridae*) сигналом для цього процесу виступає TATAAA – послідовність, яка в інших умовах виконувала б функцію промотора.

Молекули РНК, що утворюються у результаті транскрипції, називають попередниками, або **первинними транскриптами**. У більшості випадків вони нефункціональні і потребують дозрівання, або **процесингу**. Для еукаріотів дуже важливо, що більшість їхніх генів є *розщепленими*, тобто складаються з почергово розташованих кодуючих і некодуючих ділянок, **екзонів** та **інтронів**. Під час транскрипції усі вони порекопійовуються у РНК. Тож для того, щоби РНК набула функціональності, інтрони з неї мають бути вилучені, а екзони – з'єднані один з одним (див. Мал. 4.14). Цей процес називають **сплайсингом**.

У деяких випадках первинний транскрипт може бути розрізаним і з'єднаним у більш ніж один спосіб, що призводить до утворення двох або більше варіантів мРНК після транскрипції того ж самого гена. Це явище називають **альтернативним сплайсингом** (див. Мал. 4.14). Завдяки ньому єдиний ген може кодувати більше за один вид білка. Це украй важливо для вірусів, оскільки збільшує інформаційну місткість їхнього геному без збільшення його фізичного розміру.

Первинні транскрипти вірусів, реплікація яких відбувається в ядрі, так само можуть піддаватись сплайсингу. Власне, цей процес був відкритий у 1977 р. саме під час дослідження вірусів.

Існування розщеплених генів показане, зокрема для аденовірусів, герпесвірусів, парвовірусів і ретровірусів. У простому випадку розщеплений ген складається з двох екзонів, розділених одним інтроном. Проте відомі і складніші варіанти. Наприклад, ген *K15* асоційованого з саркомою Капоші вірусу герпесу (родина *Herpesviridae*) має вісім екзонів і сім інтронів. А ВІЛ-1 (родина *Retroviridae*) здатний у результаті сплайсингу утворити з одного первинного транскрипту більше 30 варіантів мРНК.

4.2.2. Синтез РНК на матриці РНК: транскрипція і реплікація РНК-геномів

Як нам відомо з попередніх розділів, РНК-геноми вірусів можуть бути одноланцюговими і дволанцюговими, а одноланцюгові, у свою чергу, можна поділити на дві групи в залежності від того, чи можуть вони правити безпосередньо за матричні РНК (тобто чи може на них зразу ж відбуватися трансляція білка), чи ж вони комплементарні матричним РНК. Першу групу домовилися означати як плюс-сенсові РНК або (+)РНК, а іншу – як мінус-сенсові РНК або (–)РНК. Фактично (+)РНК являє собою мРНК. Цікавим випадком є існування амбісенсових (двосенсових) одноланцюгових РНК-геномів, у яких частина геному є (+)РНК, а інша частина являє собою (-)РНК. Всі вони, на відміну від ДНК–геномів, є лінійними; кільцеві РНК-геноми трапляються лише у віроїдів та своєрідного вірусу гепатиту D, про який ми розповімо окремо у подальшому.

Поширеною особливістю РНК-вірусів є **сегментація** геномів на фрагменти, подібні до хромосом еукаріотів (в ДНК-вірусів таке спостерігається дуже рідко). Відповідно, зріла вірусна частинка повинна містити принаймні одну копію кожного сегмента, а це створює проблему впорядкованого перенесення декількох молекул РНК в одну вірусну частку. Для більшості вірусів досі незрозуміло напевно, яким чином вирішується це завдання.

Синтез РНК на матриці РНК є унікальним процесом, і в клітинах прокаріот, архей і еукаріот відсутній фермент (РНК-залежна РНК-полімераза), який могли б використати віруси (кажучи точно, у деяких організмів такий фермент є, але віруси його ніколи не використовують). Тому усі РНК-геномні віруси (крім ретровірусів) вимушені кодувати цей фермент у власних геномах, для того щоби могли здійснюватися синтез мРНК і реплікація геному.

РНК-залежні РНК-полімерази і синтез РНК. Історично склалося так, що вірусні РНК-залежні РНК-полімерази отримують **дві різні** назви залежно від їх діяльності під час зараження. Термін **репліказа** використовують для назви ферменту, який копіює вірусну РНК для отримання додаткових геномів, у той час як фермент, який синтезує мРНК, називають **транскриптазою**. В деяких випадках ця термінологія вказує на справжні відмінності в активності ферменту, якій здійснює синтез **функціонально різних** РНК, але для інших РНК-вірусів реплікація геному та синтез мРНК є **тією самою** реакцією. З цієї причини ми не будемо розглядати окремо процеси транскрипції і реплікації для РНК-геномних вірусів, а обговоримо радше перебіг процесу синтезу РНК на РНК-матриці з утворенням геномних або мРНК. Реплікацію віроїдів і вірусу гепатиту D, а також РНК-геномних вірусів, у яких реплікація геному йде через зворотну транскрипцію, ми розглянемо окремо.

Кодовані вірусами РНК-залежні РНК-полімерази дуже різняться за властивостями і послідовністю амінокислот, але усі мають чотири консервативні амінокислотні мотиви, які позначають літерами від A до D. Цікаво, що мотиви A і C також мають РНК-залежні ДНК-полімерази, або зворотні транскриптази, ретровірусів і параретровірусів (див. розділ 4.3.5), у той час як усі ДНК-залежні полімерази мають мотиви A, B і C. Це дозволяє припустити, що усі чотири класи полімераз нуклеїнових кислот імовірно походять від загального попередника.

Додатковою проблемою РНК-вірусів є те, що ферменти, залучені до їхньої реплікації, нездатні здійснювати контроль та виправлення помилок копіювання (так званий **пруфридинг**, від англ. proofreading, пошук та виправлення помилок), наприклад приєднання до дочірнього ланцюга невірного нуклеотиду. Натомість, підчас реплікації ДНК-вірусів така перевірка зазвичай відбувається, адже в клітині присутні усі необхідні для неї *системи репарації*. Відсутність контролю призводить до того, що РНК-геноми мутують набагато частіше, аніж ДНК-геноми: у середньому, за одну реплікацію в них відбувається приблизно одна мутація на 1000–10000 нуклеотидів. Висока імовірність мутацій накладає обмеження на розмір геному РНК-вірусів, адже при збільшенні геномів збільшується також і ймовірність мутацій в них. Винятком з цієї закономірності є коронавіруси (родина *Coronaviridae*), які мають власний фермент для виправлення мутацій – 3′-5′-екзорибонуклеазу (ExoN)**.** Це дозволяє їм утворювати великі геноми, до 27–31 тис. пар нуклеотидів.

Залежний і незалежний від праймера синтез РНК. Синтез усіх нуклеїнових кислот є односпрямованим і відбувається у напрямку 5′→3′. Зверніть увагу, що *нова* молекула РНК синтезується в напрямку 5'→3, але для *матричного* ланцюга це буде напрямок 3′→5′, комплементарні ланцюги нуклеїнових кислот є антипаралельними. Як і ДНК-залежні РНК-полімерази клітини-хазяїна (транскриптази), про які йшла мова у попередньому розділі, деякі

РНК-залежні РНК-полімерази можуть ініціювати синтез РНК *de novo*, тобто «з нуля». В той же час інші неспроможні просто встановити перший комплементарний нуклеотид навпроти першого нуклеотиду матриці і додати наступний нуклеотид. Додавання **першого** нуклеотиду потребує праймера, до якого він буде **приєднаний**. Праймером може бути 3′-ОН група попереднього нуклеотиду, або -ОН група амінокислотного залишку молекули білка. Праймером для синтезу РНК деяких вірусів є білок: наприклад, у родин *Picornaviridae* та *Caliciviridae* 5'-кінець одноланцюгового (+)РНК-геному ковалентно з'єднаний з білком VPg. Цікавим є приклад бірнарівірусів (родина *Birnaviridae*), у яких білковим праймером є окрема молекула самої РНК-залежної РНК-полімерази VP1. Таким чином 5'-кінці мРНК та геномних дволанцюгових РНК цих вірусів ковалентно зв'язані з молекулою VP1.

У інших вірусів, наприклад вірусів грипу (родина *Orthomyxoviridae*) за праймер править олігонуклеотид з кепом, відрізаний від 5'-кінця щойно синтезованих клітинних мРНК. Такі транскрипти розщеплюються кодованою вірусом, кеп-залежною ендонуклеазою, яка входить до складу РНК-полімеразного комплексу. Отримані кеповані 10–13-нуклеотидні фрагменти служать праймерами для ініціації синтезу вірусної мРНК. Такий механізм отримання праймера і кепа звуть механізмом **«зривання шапки»** (cap snatching).

Вибір РНК-матриці для транскрипції/реплікації. Як вірусні РНК-залежні РНК-полімерази вибирають саме вірусні РНК серед величезної кількості клітинних мРНК для ініціювання синтезу? Зараз відомі декілька механізмів, які забезпечують вибір потрібної РНК-матриці. Специфічність може регулюватися спорідненістю РНК-полімерази до ініціюючого нуклеотиду. Наприклад, РНК-полімерази вірусу діареї великої рогатої худоби (родина *Togaviridae*) та бактеріофага φ6 (родина *Cystoviridae*) зв'язуються з 3'-термінальним цитозином. РНК-полімераза реовірусів надає перевагу гуанозину (G) у другій позиції матричної РНК. Оскільки синтез РНК починається на 3'-кінці матричного ланцюга РНК, а значна більшість клітинних мРНК на 3'-кінці закінчуються полі(А)-хвостом, то завдяки таким уподобанням вірусні РНК-полімерази не ініціюють синтез на матрицях клітинних мРНК.

Специфічність вірусної РНК може також бути опосередкована певними послідовностями нуклеотидів або певними структурами на 3'- або 5'-кінцях РНК. Наприклад, у вірусу гепатиту С (родина *Flaviviridae*) вірусна РНК вибирається завдяки багатій на залишки піримідину ділянці в 3'-регіоні, що не транслюється. РНК пікорнавірусів на 5'-кінці формує структуру, яка нагадує лист конюшини і збагачена С. Ця структура консервативна серед вірусів цієї родини і розпізнається полі(С)-зв'язуючим білком клітини-хазяїна, якій потрібен для ініціації синтезу РНК вірусу (див. нижче).

Загалом, оскільки синтез вірусних РНК починається на 3'-кінці РНК-матриці, то як у випадку (+)РНК, так і у випадку (-)РНК, 3'-кінець повинен так чи інакше містити певний *промотор* для приєднання полімерази. Зауважте, що РНК-промотори не є подібними до промоторів на послідовності ДНК, про які ми казали у попередньому розділі. Зокрема, з ними не зв'язуються фактори транскрипції.

Кепування і поліаденілювання. Більшість (але не усі!) мРНК вірусів мають кеп на 5'-кінці і поліаденіловий хвіст на 3'-кінці. Для отримання цих структур РНК-віруси використовують різні механізми.

У випадку вірусів грипу, як біло зазначено вище, кепований фрагмент клітинної мРНК використовується як праймер для ініціації транскрипції, що забезпечує наявність кепа у мРНК вірусу. У багатьох вірусів білки, які взаємодіють з РНК-полімеразним комплексом, мають метилтрансферазну активність і самостійно синтезують кеп. Треба зазначити, що

кепуються тільки (+)-ланцюги РНК, (−)-ланцюги завжди залишаються некепованими. Механізм такої вибірковості не є добре зрозумілим.

РНК-віруси також використовують кілька різних механізмів для поліаденілювання своїх мРНК. Деякі віруси кодують ферменти, які здійснюють поліаденілювання таким же чином, як і ферменти клітини-хазяїна. В інших випадках полі(А)-хвіст утворюється безпосередньо під час транскрипції. Наприклад, у найпростішому випадку, у пікорнавірусів (Мал. 4.17Б), (−)-ланцюги РНК, на яких синтезуються (+)РНК, мають на 5'-кінці поліурацилову (полі(U)) послідовність, яка буде транскрибуватися у полі(А)-хвіст. У (−)РНК-геномних вірусів, таких як вірус везикулярного стоматиту та вірус грипу, поліаденілювання мРНК здійснюється шляхом повторного копіювання коротких ділянок залишків U у матриці (−)РНК-ланцюга.

Стратегії транскрипції і реплікації геномів вірусів з РНК-геномами. Оскільки вірусні РНК-геноми дуже різняться (дволанцюгові, одноланцюгові (+) або (−) або амбісенсові), стратегії їх транскрипції і реплікації також є на диво різноманітними.

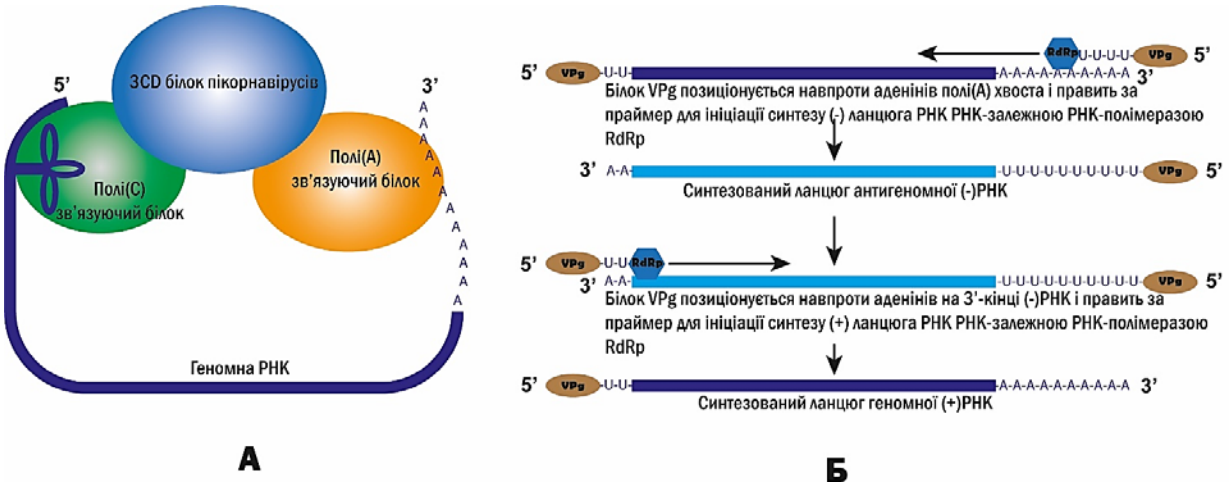
Для збирання нових інфекційних вірусних часток необхідно зробити точні копії геномної РНК. Однак мРНК більшості РНК-вірусів **не є** повними копіями вірусного геному. Отже, цикл реплікації цих вірусів повинен включати перехід від синтезу мРНК до синтезу геномів повної довжини. Більшість механізмів такого перемикання регулюють або ініціювання, або припинення (термінацію) синтезу РНК.

Одноланцюгові (+)РНК геноми. Для деяких (+)-ланцюгових РНК-вірусів геном і мРНК ідентичні. Наприклад, геномна РНК *Picornaviridae* транслюються при потраплянні в цитоплазму з утворенням вірусних білків, включаючи РНК-залежну РНК-полімеразу та допоміжні білки. Ця РНК має на 3′-кінці полі(А)-хвіст, а поблизу 5′-кінця – багатий залишками піримідинів **полі(С)-регіон**, який утворює складну вторинну структуру, подібну до листка конюшини (Мал. 4.17). З 5′-кінцем геномної РНК пікорнавірусів зв'язаний невеликий білок **VPg** (viral protein genome linked), що складається з 22 амінокислот. При утворенні цього білка до нього приєднуються залишки уридину (полі(U)). Треба зазначити, що в інфікованій клітині VPg швидко видаляється з мРНК перед трансляцією.

Реплікація РНК у пікорнавірусів потребує участі декількох специфічних білків і ініціюється при замиканні РНК в кільце. Клітини хазяїна містять **полі(А)-зв'язуючий білок (PABP)**, необхідний на ранніх етапах трансляції (див. наступний розділ). В зараженій вірусом клітині цей білок зв'язується з 3′-кінцем геномної РНК пікорнавірусу. Другий, **полі(С)зв'язуючий білок,** приєднується до вірусної РНК близько її 5′-кінця. Третім білком у комплексі стає кодований пікорнавірусом попередник реплікази – **3CD-білок**, щойно утворений внаслідок трансляції. Він розташовується біля 3′-кінця геному, де повинна початися реплікація. Після приєднання до комплексу, білок розрізається протеазою і набуває полімеразної активності (Мал. 4.17А). Праймером для ініціації реплікації є білок VPg – завдяки залишкам уридину, які є комплементарними до аденіну на матричному ланцюзі, він позиціонується на кінці полі(А)-хвоста РНК, а останній уридин дає 3′–ОН-групу для приєднання наступних нуклеотидів (Мал. 4.17Б).

Спочатку (+)РНК використовується як матриця для синтезу комплементарної **антигеномної (–)РНК**. Завдяки тому, що синтез починається на полі(А)-хвості, (–)РНК починається з полі(U) ділянки на 5′-кінці (Мал. 4.17Б). Під час реплікації два комплементарні ланцюги РНК не утворюють стабільного дволанцюгового комплексу; імовірно, вони залишаються

зв'язаними лише в регіоні, де безпосередньо йде синтез. Тому 3′-кінець (+)РНК звільняється для наступного раунду реплікації ще до того, як попередня полімераза досягне кінця матриці. Як наслідок, з РНК-матрицею пікорнавірусів одночасно можуть бути пов'язані до п'яти реплікаційних комплексів.



Мал. 4.17. Схематичне зображення реплікації (+)РНК пікорнавірусів. А - замикання РНК в кільце з участю білків клітини і вірусу. Б – ініціація синтезу РНК з участю білка VPg як праймера; для спрощення РНК зображена у лінійній формі. Позначення: RdRp – РНК-залежна РНК-полімераза. Синім кольором показані (+)РНК, блакитним – (–)РНК. Обговорення див. у тексті.

Наново синтезована (–)РНК, у свою чергу, буде використана як матриця для синтезу нових копій геномної РНК. Яким чином ініціюється цей синтез? Як було зазначено, білок VPg з залишками U (VPg-U) є приєднаним до 5′-кінця (+)РНК. При синтезі на її матриці (–)РНК, навпроти цих уридинів на 3′-кінці антигеномної (–)РНК будуть розташовані аденіни (A-A-…), свого роду коротенький поліаденіловий хвіст! Навпроти них за принципом комплементарності розташується білок VPg зі своїми уридинами, і знову останній уридин дасть 3′–OH-групу для приєднання наступних нуклеотидів у синтезі (+)РНК у процесі реплікації. Оскільки на 5′-кінці (–)РНК є послідовність полі(U), 3′-кінець (+)РНК буде мати поліаденіловий хвіст!

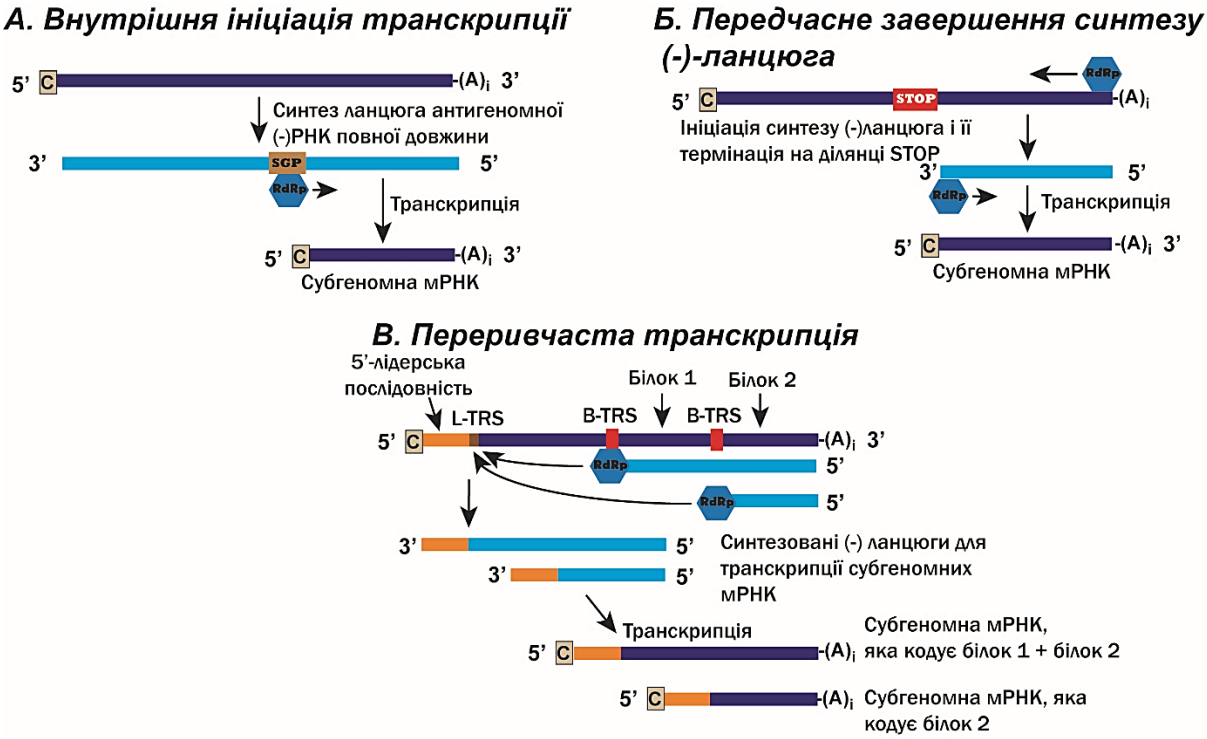
Повністю синтезовані (+)РНК, що вивільняються з реплікаційного комплексу, можуть: (1) упаковуватися у віріон, (2) використовуватися як матриці для подальшої реплікації, або (3) працювати як мРНК для трансляції. В останньому випадку від РНК від'єднується білок VPg. Цікаво, що молекул геномної (+)РНК синтезується у 100 разів більше, ніж (–)РНК, яка є лише проміжним продуктом і до складу віріонів не входить. Таку реплікацію називають **асиметричною** (див. нижче).

Таким чином, реплікація геномної (+)РНК і транскрипція у пікорнавірусів є тим самим процесом, який відбувається шляхом перебігу відносно простого набору реакцій синтезу РНК. Однак така простота має свою ціну, і синтез окремих вірусних білків у багатьох вірусів не може регулюватися, або регулюється тільки на етапі трансляції (див. наступний розділ).

Для вирішення цієї проблеми низка вірусів з (+)РНК-геномами синтезують так звані **субгеномні мРНК**. Синтез субгеномних мРНК дозволяє регулювати експресію специфічних вірусних генів. Ці мРНК коротші, ніж геноми, і як правило відповідають 3′-кінцю геномної РНК, хоча інколи є 5′-кінцевою частиною (+)РНК геному. Деякі віруси утворюють субге-

номні мРНК, які складаються з 5′-кінцевої лідерської послідовності, з'єднаною з 3′-кінцевою термінальною послідовністю. Таку стратегію використовують віруси тварин (наприклад родини *Coronaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae* тощо) і багато (+)РНК-геномних вірусів, які вражають рослини (родини *Luteoviridae*, *Bromoviridae*, *Tombusviridae* та ін.).

Яким чином синтезуються субгеномні мРНК? Відомі декілька механізмів їх утворення (Мал. 18).



Мал. 4.18. Схематичне зображення механізмів синтезу субгеномних мРНК. А – внутрішня ініціація транскрипції. Б – передчасне завершення синтезу (–)-ланцюга РНК. В – переривчаста транскрипція. Обговорення див. у тексті. Синім кольором показані (+)РНК, блакитним – (–)РНК. Окремо жовтим кольором показана лідерська послідовність. Літерою С у прямокутнику зазначений кеп. Позначення: SGP – сайт внутрішньої ініціації транскрипції (промотор субгеномних РНК); RdRp – РНК-залежна РНК-полімераза; STOP – ділянка передчасного переривання синтезу (–)РНК; L-TRS – послідовність регуляції транскрипції, яка розташована біля лідерської послідовності; B-TRS – послідовності регуляції транскрипції, які передують кожному гену вірусу.

Перший механізм – це **внутрішня ініціація транскрипції** (Мал. 4.18А). У цьому випадку після потрапляння вірусу в клітину, спочатку на (+)РНК-геномі як на матричній РНК синтезується РНК-залежна РНК-полімераза. Далі вона синтезує (–)-ланцюг вірусного геному повної довжини. На цьому (–)-ланцюзі присутні принаймні дві специфічні послідовності для приєднання РНК-залежної РНК-полімерази, які функціонально є РНК-промоторами. Один промотор розташований на 3′-кінці (–)-ланцюга і потрібен для синтезу (+)РНК повної довжини; на іншому після приєднання ферменту ініціюється синтез субгеномної мРНК. У різних вірусів особливості цих послідовностей різняться, і внутрішня ініціація транскрипції є багатокроковим процесом і потребує утворення особливої вторинної структури РНК та участі білків вірусу і клітини-хазяїна. Загалом, залишається не до кінця зрозумілим, як регулюється, чи буде РНК-залежна РНК-полімераза починати синтез чергового (+)-ланцюга повної довжини, чи вона буде синтезувати субгеномну мРНК. Не викликає сумніву, що у різних вірусів ця регуляція виконується доволі різними шляхами.

Другий механізм утворення субгеномних мРНК зумовлений **передчасним звершенням синтезу (–)-ланцюга** на матриці геномної (+)РНК (Мал. 4.18Б). Така передчасна термінація

контролюється складними внутрішньо- і міжмолекулярними взаємодіями певних ділянок геномної (+)РНК і субгеномних мРНК і білками вірусу. Ці взаємодії у потрібних випадках призводять до утворення особливої вторинної структури ділянок передчасної термінації і дозволяють контролювати перемикання між реплікацією (синтезом (–)-ланцюга повної довжини) та транскрипцією.

Третім механізмом синтезу субгеномних мРНК є **переривчаста транскрипція**. Таку стратегію використовують віруси родин *Coronaviridae* та *Arteriviridae* (Мал. 4.18В). Ця стратегія є своєрідним поєднанням внутрішньої ініціації транскрипції і передчасної термінації. Геноми вірусів, які використовують переривчасту транскрипцію, кодують так званий **вкладений набір** (nested set) субгеномних мРНК (СГ-мРНК). Усі ці СГ-мРНК мають лідерські 5′-послідовності, які співпадають з 5′-кінцем геномної РНК, і основні ділянки, які варіюють за довжиною, але усі співпадають з довшою або коротшою ділянкою на 3′-кінці геномної РНК.

Синтез РНК, який здійснює РНК-залежна РНК-полімераза коронавірусів і артерівірусів, включає два *різних* процеси: реплікацію геному для отримання нових копій геномної РНК, та транскрипцію з утворенням субгеномних РНК, які кодують структурні та допоміжні білки вірусу. У реплікації (продукуванні (–)-ланцюгів повної довжини, на яких синтезуються нові (+)РНК-геноми) приймають участь структури на 3′- і 5′-кінцях РНК.

Механізм утворення субгеномних мРНК підчас переривчастої транскрипції був предметом дискусій протягом декількох років. Зараз загальноприйнятою є модель, згідно з якою вони утворюються спочатку у вигляді (–)РНК, яка є матрицею для синтезу СГ-мРНК.

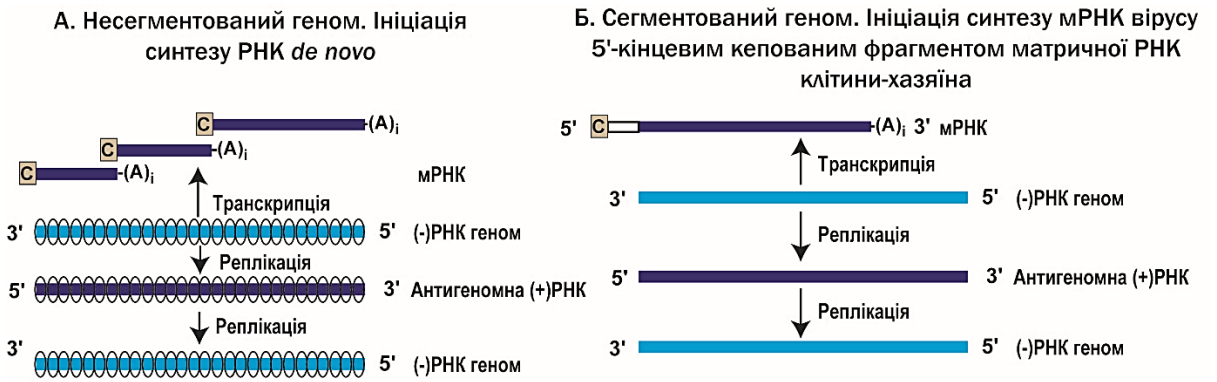
Ключовою особливістю геномної (+)РНК вірусів є те, що вона містить послідовності **регуляції транскрипції** (transcription-regulatory sequences, TRSs). Одна TRS розташована на 3'-кінці лідерської послідовності (L-TRS), інші передують кожному вірусному гену (body TRS, B-TRS) у вкладеному наборі СГ-мРНК. Усі TRS мають центральну консервативну послідовність довжиною 6-7 нуклеотидів, яка є ідентичною у L-TRS і у кожної B-TRS. Таким чином, при синтезі (–)-ланцюга, який починається на 3'-кінці (+)РНК, спочатку синтезується основна ділянка, яка включає один чи більше генів вірусу. Надалі, після утворення комплементарної копії однієї з B-TRS (цю послідовність умовно можна назвати (–)B-TRS), відбувається термінація транскрипції, і комплекс РНК-залежної РНК-полімерази разом з синтезованим фрагментом (–)РНК переміщується на ділянку L-TRS матриці (геному), яка містить комплементарні до (–)B-TRS нуклеотиди. Після цього до основної ділянки додається лідерська послідовність. Таким чином утворюються (–)-ланцюги СГ-мРНК, на яких шляхом транскрипції синтезуються субгеномні мРНК. Таке перемикання транскрипції, як вважають, контролюється взаємодією віддалених ділянок геномної (+)РНК вірусу за участю білків, хоча повне розуміння усіх подробиць цього процесу наразі відсутнє. Зокрема, не зовсім зрозуміло, яким чином вибирається потрібна ділянка B-TRS, на який відбудеться переривання синтезу (–)РНК, і як контролюється відносна кількість окремих СГ-мРНК.

Як повинно бути зрозуміло, кожна утворена таким чином субгеномна мРНК буде містити лідерську послідовність на своєму 5'-кінці і послідовність мінімум одного гена у основній ділянці. Але на 3'-кінці СГ-мРНК можуть бути послідовності декількох генів, чому ці мРНК і називають вкладеними. На малюнку 4.19В показаний умовний приклад, коли одна субгеномна мРНК кодує тільки білок 2, а друга – білок 1 + білок 2. Таким чином, перша СГ-мРНК вкладена в другу. Насправді у вірусів можуть бути великі вкладені набори субгеномних мРНК, і найкоротша СГ-мРНК буде кодувати тільки один білок (ген якого є

останнім на 3'-кінці геномної (+)РНК), а найдовша – усі білки вкладеного набора СГ-мРНК. Цікаво, що у процесі трансляції, тобто синтезу білка на цих мРНК, синтезується тільки *один* білок, який йде безпосередньо після лідерської послідовності, тобто найближчий до 5'-кінця мРНК (див. наступний розділ).

Одноланцюгові (–)РНК-геноми і амбісенсові одноланцюгові РНК-геноми. Геноми вірусів, які містять ланцюг (–)РНК, не є матричними РНК і не можуть одразу після потрапляння у клітину транслюватися у білок. Таким чином, РНК-залежна РНК-полімераза у цих вірусів є структурним білком, входить до складу віріонів і потрапляє у клітину разом з геномом. Експресія **несегментованого** геному (–)РНК-вірусів, наприклад вірусу везикулярного стоматиту (родина *Rhabdoviridae*), починається з синтезу в інфікованих клітинах мРНК (Мал. 4.19А). Геномна (–)РНК цього вірусу, разом з утворюваній на ній антигеномній (+)РНК (але не мРНК!), завжди тісно зв'язана з трьома типами вірусних білків, молекули яких, разом з РНК, утворюють спіральний нуклеокапсидний комплекс. Найчисленнішими серед білків комплексу є **нуклеопротеїн (N)**, в менших кількостях трапляється **фосфопротеїн (P)**, а **великий білок (L)** представлений у нуклеокапсиді лише двома субодиницями.

Імовірно, ці білки не заважають приєднанню РНК-залежної РНК-полімерази до РНК і синтезу нових молекул РНК. Окремі мРНК утворюються послідовно, шляхом серії реакцій ініціації і термінації. Спочатку копіюються гени, найближчі до 3'-кінця геномної РНК, і після утворення попередньої мРНК синтезується наступна мРНК. Тобто, РНК-залежна РНК-полімераза не може довільно ініціювати синтез окремих мРНК.



Мал. 4.19. Схематичне зображення транскрипції і реплікації геномів вірусів з (–)РНК-геномами. Синім кольором показані (+)РНК, блакитним – (–)РНК. Літерою С у прямокутнику зазначений кеп. На панелі А показані молекули нуклеопротеїну, який утворює нуклеокапсид з (–)- і (+)-ланцюгами РНК повної довжини. Обговорення див. у тексті.

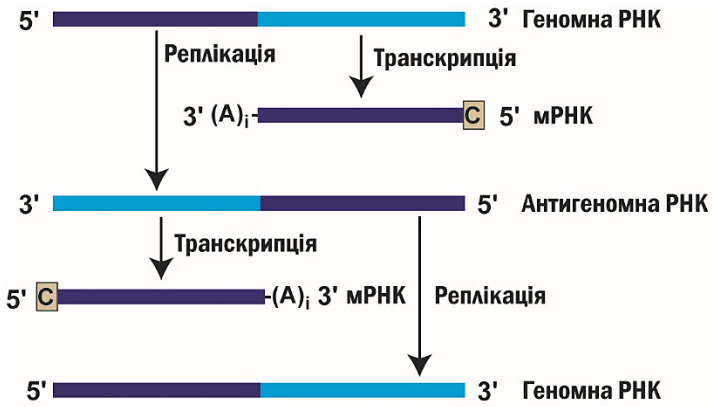
Перемикання від транскрипції до реплікації геному контролюється кількістю білка нуклеокапсиду N. На початку циклу репродукції вірусу, зразу після зараження клітини, відбувається транскрипція з утворенням мРНК, на яких починають синтезуватися вірусні білки, в тому числі N і P. Білок P підтримує N у розчинній формі, щоби останній міг взаємодіяти з наново синтезованою РНК. Коли білок N напрацьовуються у клітині у певній кількості, він починає взаємодіяти з наново синтезованою (+)РНК, формуючи капсид. Білки N-P взаємодіють також з матрицею, геномною (–)РНК, таким чином, що реакції термінації і ініціації блокуються. Внаслідок цього синтезується антигеномна (+)РНК повної довжини, інкапсідована білком N. Копіювання повнорозмірних (+)-ланцюгових РНК до геномних (–)РНК

також вимагає зв'язування білкових комплексів N-P з молекулами (–)РНК, що синтезуються. Таким чином, наново синтезовані (–)РНК утворюються у вигляді нуклеокапсидів, які можна легко упакувати у нові віріони.

Експресія **сегментованого** геному (–)РНК-вірусів, наприклад вірусу грипу (родина *Orthomyxoviridae*), також починається з синтезу в інфікованих клітинах мРНК (Мал. 4.19Б). Ініціація *транскрипції* сегментованих геномів (–)РНК-вірусів є залежною від праймера і відбувається шляхом відрізання від 5'-кінця щойно синтезованих клітинних мРНК кепованих фрагментів, які і правлять за праймер. Цей механізм «зривання шапки» ми обговорювали вище.

Ініціація реплікації, тобто сегментів антигеномної (+)РНК, є незалежною від праймера і відбувається *de novo*. Оскільки реплікація геному у ортоміксовірусів потребує безперервного синтезу білка, спочатку було висловлене припущення, що перемикання від транскрипції до реплікації також контролюється наявністю молекул нуклеопротеїну, який утворює спіральний капсид з РНК, що синтезується, як і у (–)РНК-геномних вірусів з несегментованим геномом. Але це припущення не отримало експериментального підтвердження. Зараз запропоновано декілька можливих моделей контролю переходу від транскрипції до реплікації, але серед них наразі немає загальноприйнятої.

Аренавіруси (родина *Arenaviridae*) формально належать до (–)РНК-геномних вірусів, але фактично їх геномна РНК є *амбісенсовою*, тобто складається з ділянок (–) і (+) РНК. Геном аренавірусу містить два сегменти РНК, S (малий) і L (великий). РНК-залежна РНК-полімераза цих вірусів є структурним білком і пакується у віріон. Після зараження РНК-полімераза синтезує мРНК з 3'-кінця кожного сегмента. Термінація синтезу мРНК обумовлена особливою вторинною структурою геномної РНК. Згодом синтезуються антигеномні S і L РНК і відбувається транскрипція. Перемикання між реплікацією і транскрипцією найбільш імовірно обумовлено тим, що геном аренавірусів кодує **дві** РНК-залежні РНК-полімерази, так що одна здійснює транскрипцію, а інша – реплікацію!



Мал. 4.20. Схематичне зображення транскрипції і реплікації геномів вірусів з амбісенсовими РНК-геномами. Синім кольором показані (+)РНК, блакитним – (–)РНК. Літерою С у прямокутнику зазначений кеп.

Чим зумовлений асиметричний синтез ланцюгів РНК? В інфікованих клітинах виробляються різні кількості ланцюгів (+) і (–) РНК. Наприклад, у клітинах, інфікованих поліовірусом, геномна РНК виробляється у 100 разів вищій концентрації, ніж комплементарна їй антигеномна. Існують різні пояснення цих фактів. Геномні ланцюги РНК та комплементарні їм ланцюги можуть мати різну стійкість, або ці ланцюги можуть бути синтезовані за допомогою механізмів з різною ефективністю.

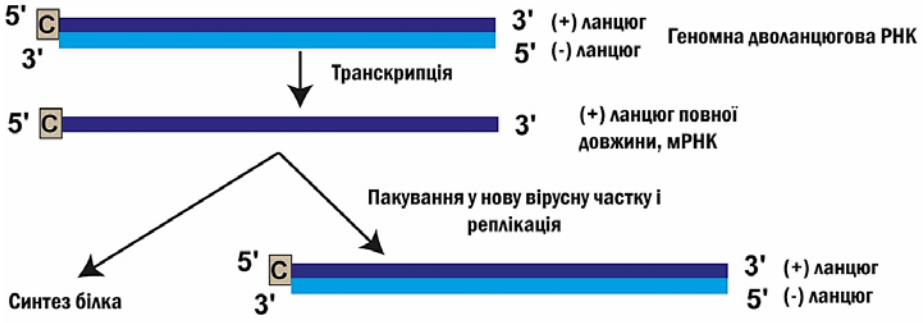
В клітинах, інфікованих вірусом везикулярного стоматиту (родина *Rhabdoviridae*), ланцюгів геномної вірусної (–)РНК приблизно в 20-50 разів більше, ніж ланцюгів (+)РНК. Було висловлено припущення, що така асиметрія є наслідком більш ефективної ініціації синтезу РНК на 3-кінцях (–)-ланцюгів РНК, ніж (+)-ланцюгів РНК. Згодом це припущення отримало експериментальну підтримку.

В інфікованих альфавірусами (родина *Togaviridae*) клітинах більша кількість геномної (+)РНК пояснюється тим, що антигеномні (–)-ланцюги синтезуються протягом короткого часу на початку інфекції. І конфігурація РНК-полімеразного комплексу, якій синтезує (–)-ланцюги РНК, присутня лише в цей період. Синтез (+)-ланцюгів, якій здійснює інша конфігурація РНК-полімеразного комплексу, триває набагато довше, що призводить до накопичення мРНК та (+)-ланцюгової геномної РНК.

Дволанцюгові РНК-геноми. Усі віруси з длРНК-геномами мають сегментовані геноми, кожен сегмент яких реплікується незалежно від іншого. Рекорд тут належить реовірусам (родина *Rheoviridae*), геном яких складається з 10–12 фрагментів; в решти представників фрагментів 2, рідше 3 або 4. Особливістю циклу реплікації вірусів з длРНК-геномами є те, що транскрипція і трансляція відбуваються з різних матриць у різних вірусних частинках.

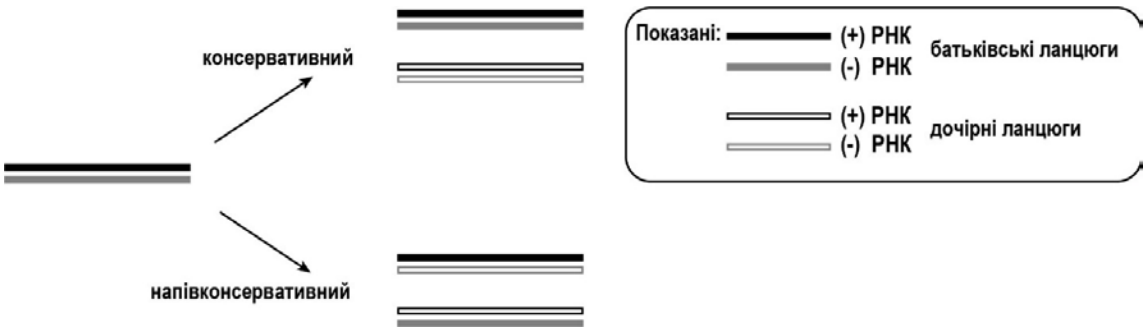
Дволанцюгові РНК майже не трапляються у здорових клітинах, тож присутність таких молекул сигналізує клітині про зараження. Це запускає механізми *сайленсингу (глушіння) РНК*, утворення *інтерферону* і запрограмовану загибель клітин (див. розділ 6.1.2). Зважаючи на це, більшість длРНК-вірусів не «роздягають» свою РНК повністю, залишаючи її у складі недорозібраних віріонів – так званих **субвірусних частинок**.

Оскільки на длРНК не може відбуватися синтез білка, першим кроком є синтез мРНК на кожному сегменті геному, які синтезуються пов'язаною з субвірусними частинками РНК-залежною РНК-полімеразою. У реовірусів мРНК мають кеп, але позбавлені поліаденілової послідовності. Ці мРНК виходять з субвірусних часток у цитоплазму, де на них відбувається синтез вірусних білків. Коли починається збирання нових вірусних часток, ці (+)РНК першими пакуються в них, і надалі відбувається реплікація – синтез (–)-ланцюга (Мал. 4.21).



Мал. 4.21. Схематичне зображення транскрипції і трансляції вірусів з дволанцюговими РНК-геномами. Синім кольором показані (+)РНК, блакитним – (–)РНК. Літерою С у прямокутнику зазначений кеп.

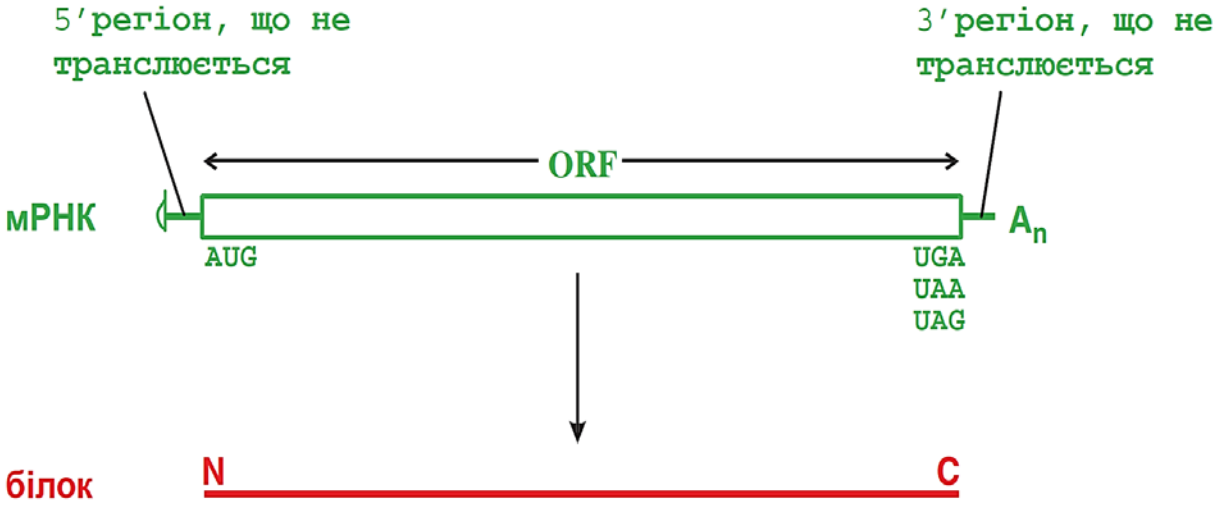
Таким чином, на відміну від ДНК, що завжди реплікується за *напівконсервативним механізмом*, длРНК у вірусів реплікується *консервативно* (Мал. 4.22). Втім, напівконсервативний синтез длРНК також відомий: він описаний у бактеріофага ϕ6 (родина *Cystoviridae*) і вірусів родини *Birnaviridae*.



Мал. 4.22. Консервативний і напівконсервативний механізм реплікація дволанцюгової РНК.

4.2.3. Синтез білка (трансляція) у еукаріотів

У типовому випадку мРНК еукаріот починається з кепа на 5′-кінці, далі йде 5′-регіон, що не транслюється (лідерна нетрансльована послідовність), тобто який не кодує амінокислотних залишків для синтезу білка (Мал. 4.23). Цей регіон варіює за довжиною від 3 до ≥1000 нуклеотидів, але в типовому випадку складає 50-100 нуклеотидів.



Мал. 4.23. Трансляція моноцистронної мРНК. Існує одна відкрита рамка зчитування (ORF). Трансляція відбувається у напрямі 5′→3′, тож N-кінець білка синтезується першим. Кеп зображений на 5′-кінці молекули у вигляді кепки (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Синтез білка як правило розпочинається зі *стартового кодону* AUG. Цей кодон відповідає метіоніну, і зазвичай стартовим є тоді, коли він найближчий до 5′-кінця мРНК і знаходиться у межах так званої **консенсусної послідовності Козак** (Kozak consensus sequence). Цю специфічну послідовність відкрила Мерілин Козак у 1986 році. Закінчується трансляція на одному зі стоп-кодонів (UGA, UAA або UAG). У бік 3′-кінця мРНК після стоп-кодону розташований 3′-регіон, що не транслюється (трейлерна нетрансльована послідовність) і поліаденіловий хвіст.

Значна більшість мРНК еукаріотів є **моноцистронною**, тобто кодує єдину білкову молекулу. Ще кажуть, що вона містить єдину **відкриту рамку зчитування**, ORF (open reading frame). Оскільки основу генетичного коду складають триплети нуклеотидів, які не перекриваються, то мРНК можна зчитувати трьома різними способами, із зсувом на один нуклеотид. Тобто на певній ділянці РНК можуть існувати три рамки зчитування. Але зазвичай тільки одна з трьох містить достатньо довгу ділянку до того, як зустрінеться стоп-кодон. Це й буде відкрита рамка зчитування. Дві інші рамки зчитування зазвичай не можуть бути

використані для трансляції, оскільки в їх послідовності занадто часто зустрічаються стоп-кодони. Такі рамки зчитування називають блокованими або закритими (Мал. 4.24).

Поняття відкритої рамки зчитування використовують не тільки для матричної РНК, а й для ДНК, на якій ця РНК закодована. Коли на певній послідовності ДНК шукають можливі гени, аналізують усі три рамки зчитування. Існування довгої ORF є хорошим індикатором наявності гену, але для ефективної транскрипції і трансляції потрібна, крім того, ціла низка регуляторних елементів, в першу чергу – промоторів.

Перша рамка зчитування:

…	AUG	AAG	GCU	UGC	UAU	AGU	AGG	CUG	AAG	…
	Мет	**Ліз**	**Ала**	**Цис**	**Тир**	**Сер**	**Арг**	**Лей**	**Ліз**	

Друга рамка зчитування:

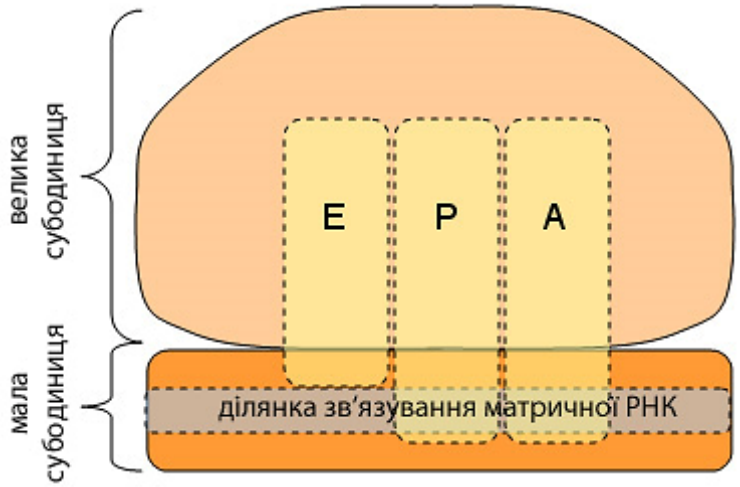
… A	UGA	AGG	CUU	GCU	AUA	GUA	GGC	UGA	AG…
	СТОП	**Арг**	**Лей**	**Ала**	**Іле**	**Лей**	**Глі**	**СТОП**	

Третя рамка зчитування:

… AU	GAA	GGC	UUG	CUA	UAG	UAG	GCU	GAA	G…
	Глу	**Глі**	**Лей**	**Лей**	**СТОП**	**СТОП**	**Ала**	**Глу**	

Мал. 4.24. Умовний приклад трьох можливих рамок зчитування з тієї самої послідовності нуклеотидів мРНК. Під триплетами (кодонами) нуклеотидів зазначені амінокислоти, які вони кодують. Відкритою є перша рамка зчитування, друга і третя містять стоп-кодони, тобто заблоковані. Зверніть увагу, що при зсуві рамки зчитування та сама послідовність нуклеотидів кодує різні амінокислоти.

Синтез білка (трансляція мРНК у білок) здійснюється клітинними машинами синтезу білка, рибосомами. Рибосоми еукаріот складаються з двох субодиниць, позначених у залежності до їх коефіцієнтів седиментації як 40S та 60S, які називають відповідно малою та великою. Матрична РНК рухається повз три сайти рибосоми, які позначають як A (аміноацил або акцептор), P (пептидил) та E (вихід, від англ. exit) (Мал. 4.25). Ініціаторна тРНК (див. нижче) потрапляє в сайт P, але всі наступні поєднані з амінокислотами (аміноацильовані) тРНК потрапляють в сайт A. Пептидний зв’язок утворюється в сайті P, тоді як вихід вже вільної від амінокислоти тРНК відбувається в сайті E.

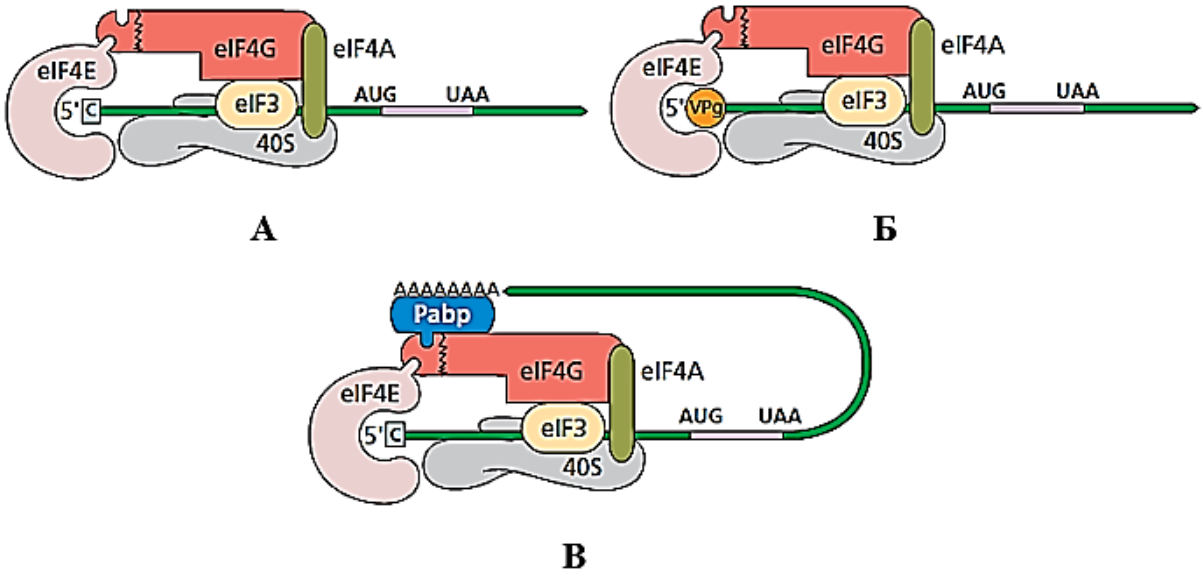


Мал. 4.25. Схематичне зображення сайтів рибосоми, які зв’язують РНК. A — аміноацил-тРНК-зв'язуючий сайт, P — пептидил-тРНК-зв'язуючий сайт, E — сайт виходу тРНК (за https://wikipedia.org).

Залежна від 5'-кінця ініціація трансляції. Кеп, що обмежує мРНК з боку 5′-кінця (Мал. 4.23), є сайтом зв'язування для білків **факторів ініціації еукаріотів**, **eIFs** (eukaryotic initiation factors); зокрема, безпосередньо з кепом зв'язується білок eIF4E. Згодом збирається пре-ініціаторний комплекс, який складається з 40S субодиниці рибосоми, тРНК метіоніну, з'єднаної зі своєю амінокислотою (Met-тРНК) та інших ініціювальних білків. У деяких вірусів, у яких мРНК замість кепа на 5′-кінці містить білок VPg (розділ 4.2.2), саме з цим білком взаємодіє фактор ініціації eIF4E, який у підсумку рекрутує eIF4G, eIF3 і 40S субодиницю рибосоми (Мал. 4.26А, Б).

Треба зазначити, що не у всіх вірусів, у яких 5′-кінець мРНК з'єднаний з білком VPg, відбуваються саме такі події. Наприклад, у пікорнавірусів при трансляції білок VPg від'єднується, і ініціація трансляції відбувається інакше (див. нижче).

З полі(А)-хвостом на 3′-кінці мРНК зв'язуються специфічні для цієї послідовності білки **PABTs** (poly-adenilate binding proteins). Білки, пов'язані з двома кінцями мРНК, здатні взаємодіяти один з одним. Це приводить до стикання кінців мРНК і замикання її в кільце, внаслідок чого ініціюється трансляція (мал. 4.26В).

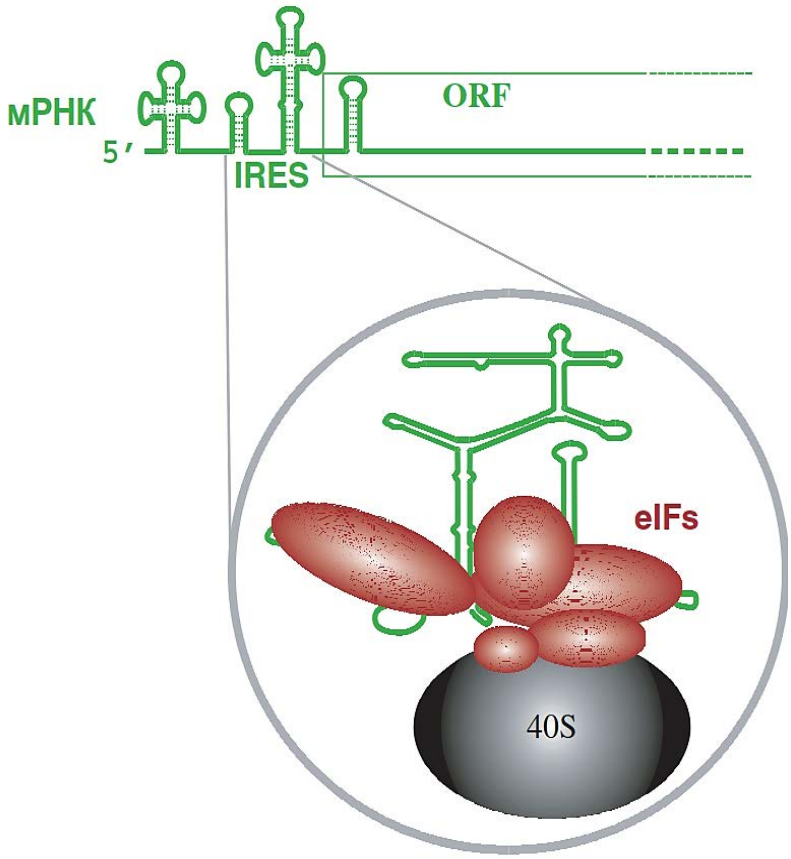


Мал. 4.26. Схематична модель кеп-залежної ініціації трансляції. Білок eIF4F зв'язується з 5'-кінцем мРНК через взаємодію зі структурою кепа (А) або зі зв'язаним з геномом білком VPg (Б). N-кінець eIF4G зв'язує eIF4E, а С-кінець - eIF4A. Субодиниця рибосоми 40S зв'язується з eIF4G опосередковано через eIF3. Ініціація трансляції стимулюється через зближення кінців мРНК завдяки взаємодії полі(А)-зв'язуючого білка Pabp1 з eIF4G (В). Літерою С у прямокутнику означено кеп, відкрита рамка зчитування показана між стартовим (AUG) і стоп-кодоном (UAA) (за L.W. Enquist et al., 2015).

Незалежна від 5'-кінця ініціація трансляції. Як було зазначено вище, деякі мРНК не мають кепа, тож ініціація трансляції відбувається в них інакше. У таких мРНК 5′-регіон, що не транслюється, формує складну вторинну структуру, до якої може приєднатися 40S субодиниця рибосоми. Ця структура зветься **внутрішнім сайтом входження рибосоми, IRES** (internal ribosome entry site). Таки сайти були виявлені наприклад у всіх пікорнавірусів і вірусу гепатиту С (родина *Flaviviridae*). IRES вірусів поділяють на п'ять типів, в залежності від первинної і вторинної структури.

При ініціації трансляції, з IRES зв'язується певний набір факторів ініціації еукаріотів і 40S субодиниця рибосоми (Мал. 4.27). Але за кількістю необхідних факторів ініціації віруси дуже різняться. З одного боку, у вірусу гепатиту А (родина *Picornaviridae*) задіяні усі

eIFs, які використовуються і при залежній від кепа ініціації. З іншого боку, для вірусу паралічу цвіркунів (родина *Dicistroviridae*) взагалі немає потреби у жодному з eIFs, а 40S субодиниця рибосоми приєднується безпосередньо до IRES.



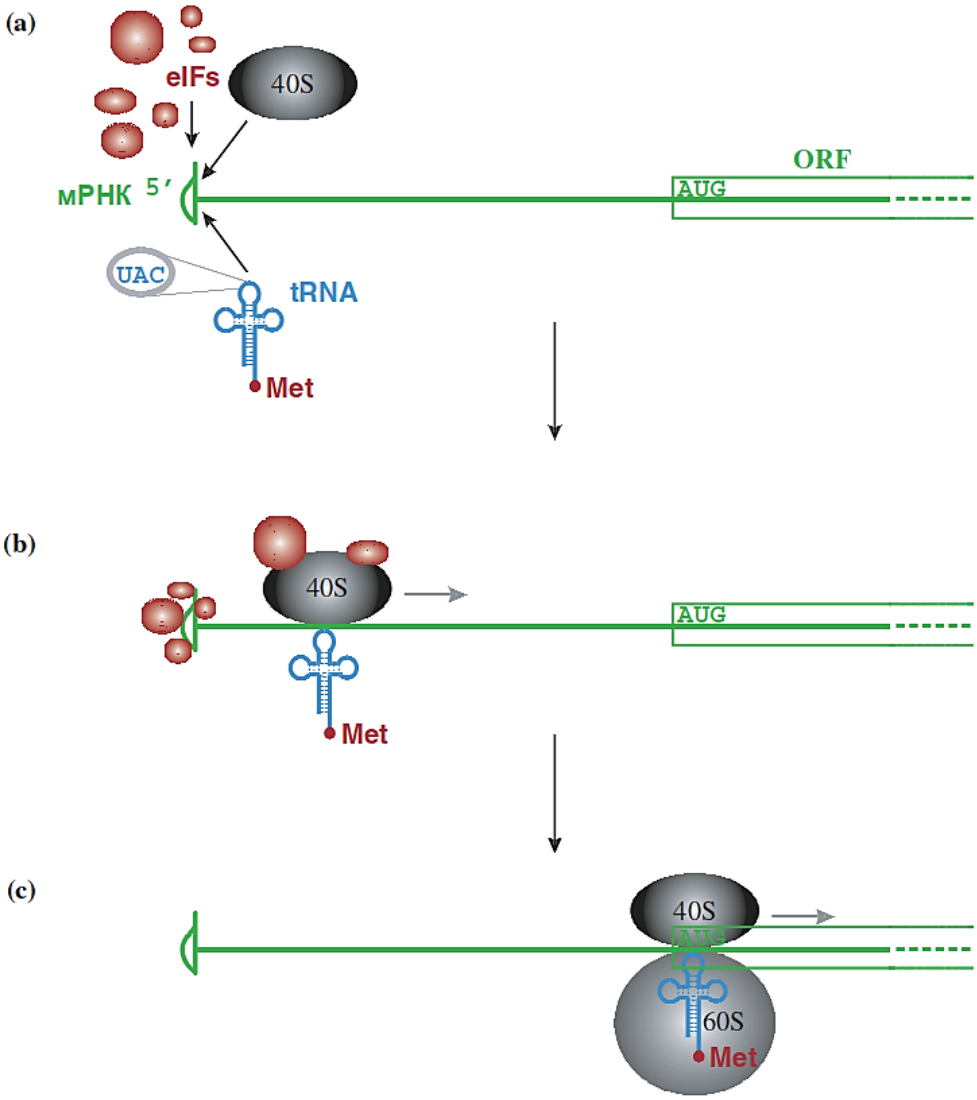
Мал. 4.27. Ініціація трансляції мРНК, яка не має кепа. eIFs і 40S субодиниця рибосоми зв'язуються з внутрішнім сайтом входження рибосоми (IRES), розташованому у 5′-регіоні, що не транслюється, вище ORF (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Як обговорювалося вище, залежна від 5′-кінця трансляції мРНК ініціюється стиканням кінців мРНК з утворенням кільця (Мал. 4.26В). Незалежна від 5′-кінця трансляція ініціюється аналогічним чином, але, наприклад, у вірусу ящуру (родина *Picornaviridae*) 5′- і 3′-кінці мРНК зближуються за рахунок взаємодії РНК-РНК, без участі білків. При цьому може бути відсутня потреба як у кепі на 5′-кінці, так і у полі(А)-хвості на 3′-кінці мРНК, як наприклад у вірусу реверсії чорної смородини (родина *Picornaviridae*).

Сканування мРНК і пошук стартового кодону. Так чи інакше на ділянці 5′-регіона, що не транслюється, збирається пре-ініціаторний комплекс, який починає рухатися у напрямку 3′-кінця мРНК у процесі, який називається скануванням. Сканування - це поєднання низки рухів вперед і назад із загальним «чистим» рухом у напрямку 5′→3′.

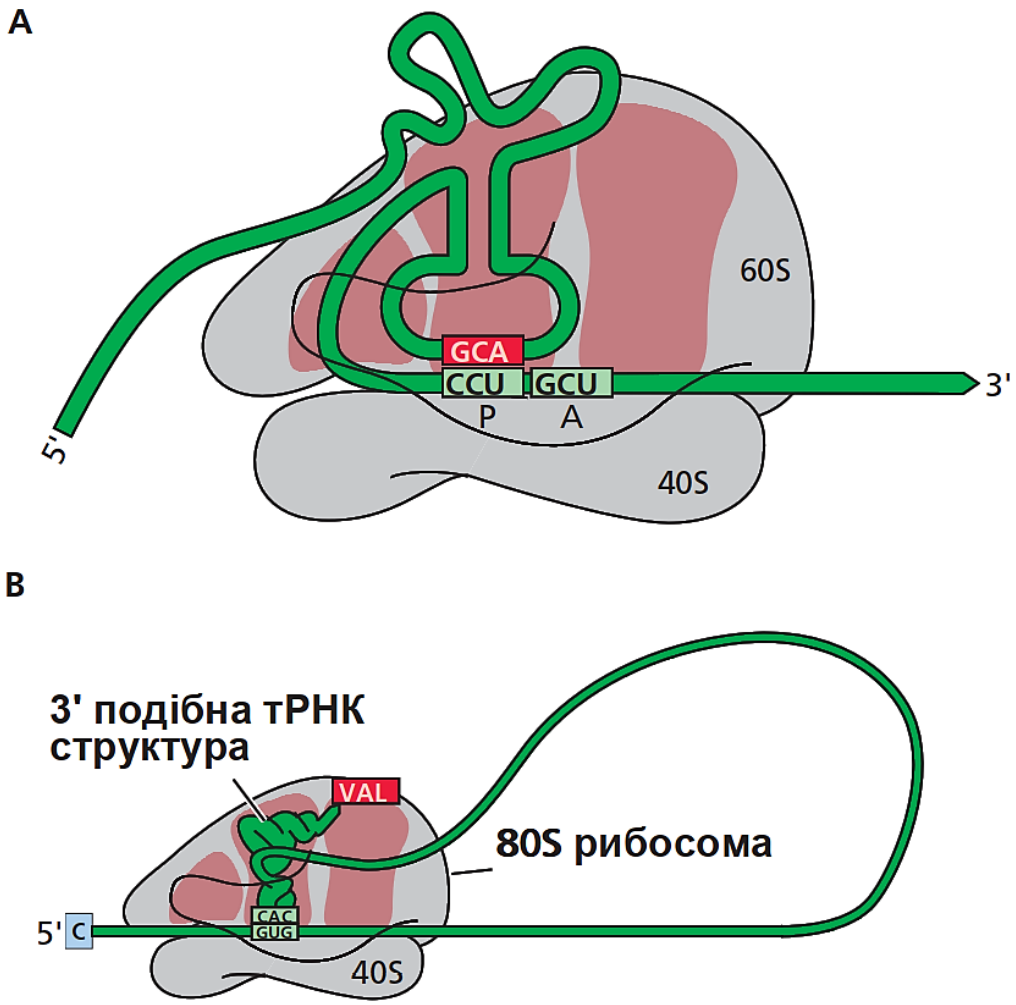
Коли пре-ініціаторний комплекс досягає першого кодону AUG, ініціювальні білки від'єднуються, що дозволяє субодиниці 60S рибосоми асоціюватися з 40S субодиницею з формуванням комплексу 80S (Мал. 4.28). Таким чином збирається повна еукаріотична 80S-рибосома, і починається синтез поліпептидного ланцюга. Аміноацильована Met-тРНК займає Р-ділянку рибосоми, що дозволяє відбуватися ініціації в межах А-ділянки.

Зрозуміло, що першою амінокислотою, з якої починається майже будь-яка молекула білка, буде метіонін (щоправда, у подальшому ця амінокислота може бути видалена).



Мал. 4.28. Сканування мРНК. (a). Фактори ініціації еукаріотів (eIF), 40S-субодиниця рибосоми і метіонін, приєднаний до тРНК, зв'язуються на 5'-кінці мРНК, формуючи пре-ініціаторний комплекс.(b) Цей комплекс сканує мРНК у напрямку 3'-кінця. (c). Коли досягається перший кодон AUG, він розпізнається антикодоном UAC метионінової тРНК, після чого до комплексу приєднується 60S-субодиниця рибосоми, а фактори ініціації вивільняються (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

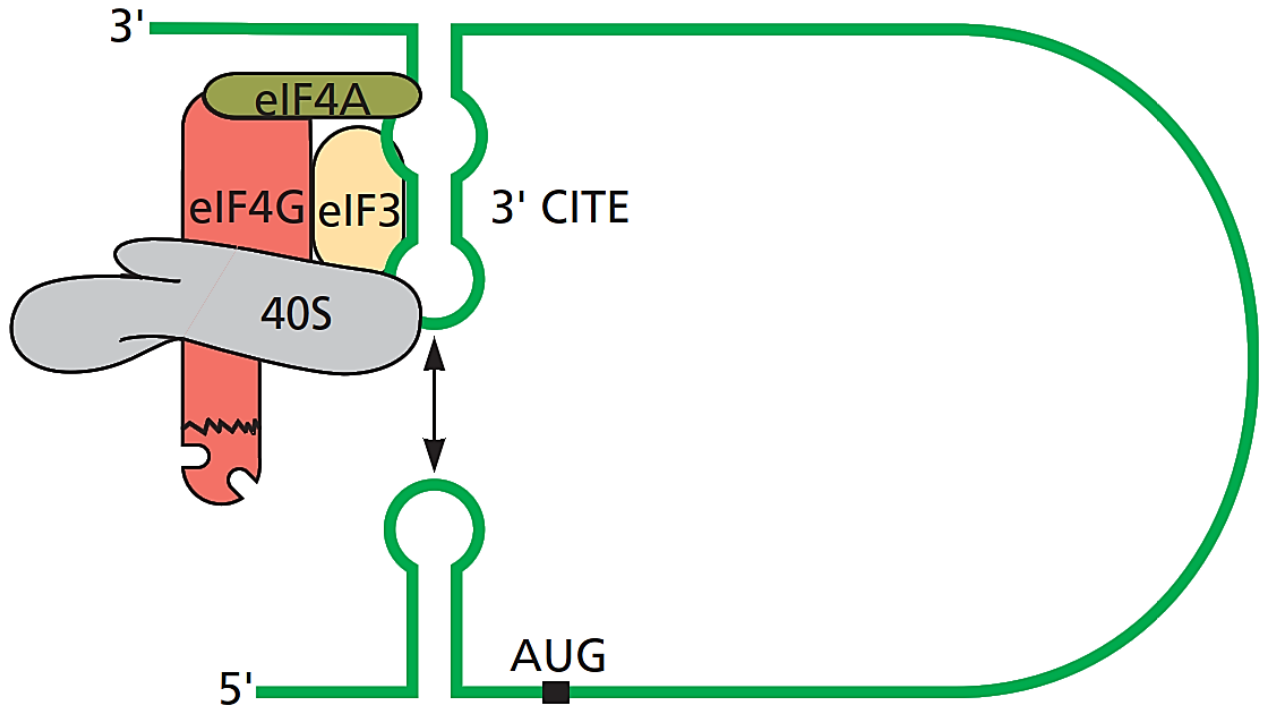
Незалежна від метіоніну ініціація трансляції. Структурні білки деяких вірусів починаються не з метіоніну, а з декотрих інших амінокислот. Ініціація синтезу цих вірусних білків не вимагає Met-тРНК, оскільки вірусна мРНК сама імітує структуру тРНК. Ця тРНК-подібна структура займає Р-ділянку рибосоми, що дозволяє відбуватися ініціації в межах А-ділянки. Ці мРНК не потребують білків ініціації трансляції і можуть безпосередньо зв'язувати рибосоми та спонукати їх увійти в фазу елонгації трансляції (Мал.4.29А). Незалежне від метіоніну ініціювання трансляції мРНК вірусу жовтої мозаїки ріпи (родина *Tymoviridae*) здійснюється подібним чином, за винятком того, що тРНК-подібна структура розташована в 3′-регіоні, що не транслюється (рис. 4.29Б). Ця подібна тРНК структура амініоацилюється валіном, який і стає першою амінокислотою вірусного білка.



Мал. 4.29. Два механізми ініціювання трансляції, незалежної від метіоніну. (А) Вірусна мРНК піконавірусів комах імітує структуру тРНК, яка займає Р-сайт рибосоми, що дозволяє ініціювати трансляцію в межах А-сайту. (В) Подібна тРНК структура в 3'-регіоні, що не транслюється, мРНК вірусу жовтої мозаїки ріпи, аміноацильована валіном, займає Р-ділянку рибосоми (за L.W. Enquist et al., 2015).

Незалежні від кепа і 3′ полі(А)-хвоста енхансери трансляції. Геноми (+)-ланцюгів РНК низки вірусів рослин, у яких немає як 5′-кепів**,** так і 3′ полі(А)-хвостів, мають потребу у **енхансерах трансляції 3′ CITE** (3′-cap-independent translational enhancer) для синтезу білка. Ці структури розподілені на декілька різних класів і всі розташовані в 3′-регіоні, що не транслюється. Усі 3′ CITE енхансери рекрутують рибосоми шляхом безпосереднього зв'язування через білки eIF4G або eIF4E. Оскільки вони знаходяться в 3′-регіоні вірусної РНК, що не транслюється, необхідна внутрішньо молекулярна взаємодія РНК-РНК, щоби розташувати рибосоми або трансляційні білки на 5′-кінці, де починається трансляція.

Прикладом може служити геном вірусу жовтої карликовості ячменю (родина *Luteoviridae*), у якому комплементарні послідовності, розташовані в 5′-регіоні, що не транслюється, та в 3′ CITE, утворюють місток РНК-РНК (Мал. 4.30). Одночасне зв'язування 3′ CITE з eIF4F і 5′-регіоном, що не транслюється, наближає 40S субодиницю рибосоми до 5′-кінця РНК і ініціює трансляцію.



Мал. 4.30. Незалежні від кепа і 3' полі(А)-хвоста енхансери трансляції (3' CITE) у деяких вірусів рослин зв'язують фактор ініціації еукаріот eIF4F, що дозволяє рекрутувати 40S субодиницю рибосоми. Взаємодія енхансера трансляції з 5'-кінцем вірусної мРНК дозволяє позиціонувати 40S субодиницю рибосоми біля стартового кодону (AUG) (за L.W. Enquist et al., 2015).

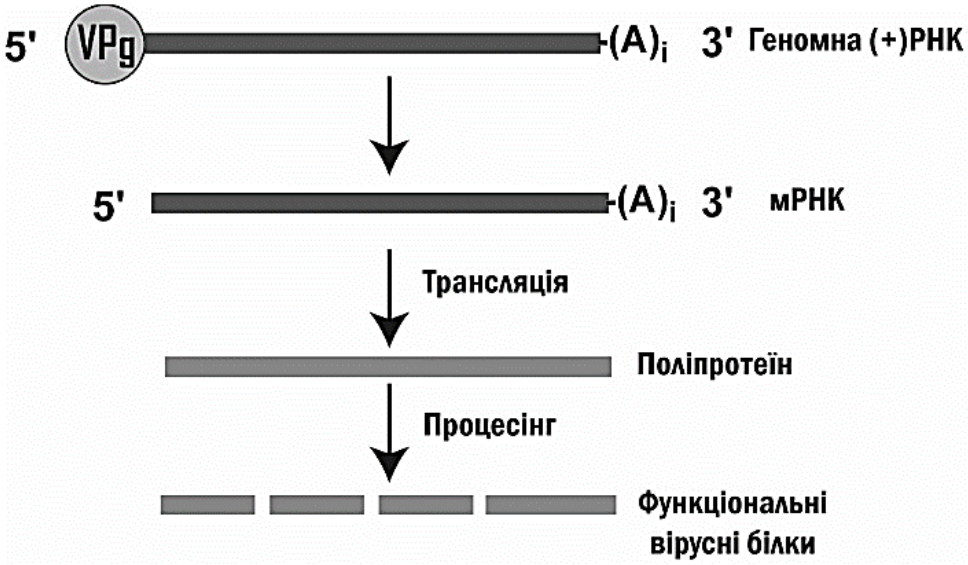
Стратегії трансляції у вірусів. Для вірусів є життєво важливим максимально збільшити інформаційну ємність своїх геномів, так щоби відносно невеликий за фізичними розмірами геном кодував якомога більше вірусних білків. Одним з рішень цієї проблеми є згаданий вище альтернативний сплайсинг (Мал. 4.14). Інші стратегії реалізуються на рівні трансляції, коли завдяки незвичайним механізмам трансляції з однієї мРНК синтезується кілька білків.

Більшість мРНК еукаріот є моноцистронними, тобто кодують єдиний білок (Мал. 4.23). В той же час більшість мРНК бактерій і архей є поліцистронними: вони кодують декілька білків, і кожна окрема відкрита рамка зчитування (ORF) відділена від наступної **спейсерним** регіоном, що не транслюється. Але достатньо багато вірусних мРНК є функціонально бі- або поліцистронними і можуть кодувати декілька білків. Фундаментальною проблемою, з якою стикаються віруси при використанні механізмів трансляції еукаріот, є та, що в загальному випадку транслюється тільки найближча до 5'-кінця ORF, і трансляція буде припинена при зустрічі першого ж стоп-кодону, так що розташовані після стоп-кодону ORF залишаться не трансльованими.

Вирішення цієї проблеми досягається різними шляхами, головні з яких ми обговоримо нижче.

Два внутрішніх сайти входження рибосоми. Біцистронні мРНК деяких вірусів мають два IRES, внутрішніх сайти входження рибосоми, або один IRES і ділянку, яка імітує тРНК. Один такий сайт передує ORF 1, інший - ORF 2. Ініціація транскрипції починається на цих сайтах незалежно. Таку стратегію трансляції використовує зокрема вірус паралічу цвіркунів (родина *Dicistroviridae*).

Синтез поліпротеїна. Однією зі стратегій, що дозволяють продукувати численні білки з геномної РНК, є синтез з мРНК поліпротеїнового попередника, який потім шляхом протеолізу обробляється з утворенням функціональних вірусних білків. Така стратегія типова для пікорнавірусів – їх геномна (+)РНК кодує єдину відкриту рамку зчитування, яка транслюється у великий поліпротеїн. Надалі цей попередник розщеплюється на функціональні білки двома вірусними протеазами, які **активні у складі поліпротеїна** у вивільняються шляхом саморозрізання (Мал. 4.31). Отже, поліпротеїн не спостерігається в інфікованих клітинах, оскільки відбувається його **процесінг**, як тільки послідовності, що кодують протеази, транслюються.



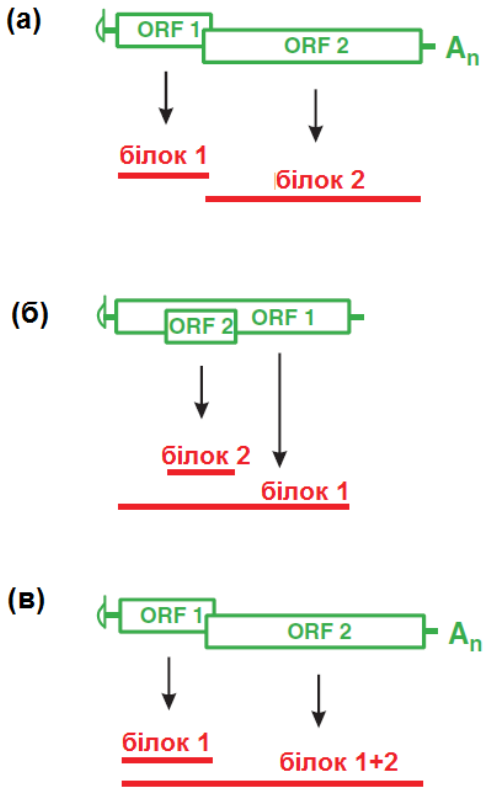
Мал. 4.31. Синтез і процесінг поліпротеїна у пікорнавірусів. VPg – зв'язаний з 5′-кінцем геномної РНК білок, який від'єднується у випадку використання РНК для трансляції.

Послаблене сканування. Як ми обговорювали вище у цьому розділі, на 5′-кінці мРНК збирається пре-ініціаторний комплекс трансляції, який починає сканувати мРНК у напрямку 3′-кінця. Коли він досягає стартового кодону AUG, збирається повна еукаріотична 80S-рибосома, і починається синтез білка. Але при так званому «**послабленому скануванні**» (leaky scanning) пре-ініціаторний комплекс пропускає перший стартовий кодон AUG і продовжує сканування до альтернативного низхідного стартового AUG. При цьому ORFs різних білків можуть бути відокремленими (Мал. 4.32а), а можуть перекриватися. А іноді трапляється ще цікавіша ситуація, коли одна ORF знаходиться усередині іншої (Мал. 4.32б). Послаблене сканування є найчастішим механізмом трансляції поліцистронних мРНК вірусів.

Послаблене сканування може бути зумовленим неоптимальною послідовністю Козак, мова про яку йшла вище. Ця послідовність має консервативні і варіюючи нуклеотиди, і деякі її варіанти знижують ефективність ініціації трансляції. Також якщо перший стартовий кодон AUG є близьким до 5′-кінця мРНК (<30 нуклеотидів) або розташований близько до низхідного стартового AUG (у межах 10 нуклеотидів), ефективність ініціації трансляції на ньому буде знижена. Все це призводить до того, що з певною вірогідністю пре-ініціаторний комплекс трансляції «не побачить» перший стартовий кодон і продовжить сканування мРНК до наступного стартового кодону.

Зсув рамки зчитування (фреймшіфт). На мРНК можуть бути послідовності нуклеотидів, так звані «слизькі ділянки» з особливою вторинною структурою. На них рибосоми з

певною частотою зміщуються на іншу рамку зчитування і продовжують трансляцію. При цьому, замість звичайного переміщення на один кодон (три нуклеотиди) у бік 3′-кінця мРНК, рибосома переміщується або на 1 нуклеотид у бік 5′-кінця (-1 фреймшіфт), або на один нуклеотид у бік 3′-кінця (+1 фреймшіфт). Це призводить до зміни кодонів (див. Мал. 4.24), завдяки чому зникає стоп-кодон ORF 1 і рибосома продовжує рух уздовж мРНК, прочитуючи ORF 2 (Мал. 4.32В).



Мал. 4.32. Трансляція біцистронних мРНК. а–б. Рибосома може почати трансляцію із стартового кодону ORF 1, або сканування мРНК рибосомою може бути «послабленим», і трансляція може розпочатися зі стартового кодону ORF 2. Два стартові кодони знаходяться в різних рамках зчитування, і два білки не пов'язані. в. ORF 2 транслюється завдяки зсуву рамки зчитування, що призводить до синтезу збільшеної версії білка 1 (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Посттрансляційні модифікації білків. Впродовж трансляції та після неї білки можуть піддаватися одній або декільком модифікаціям, спрямованим на корегування їхніх функції. До таких модифікацій належать глікозилювання, ацилування і фосфорилювання.

Глікозилювання – це приєднання до поліпептидного ланцюга олігоцукрових груп. Вони можуть зв'язуватись з білком через -ОН групу залишків серину або треоніну (тоді процес називають *О-глікозилюванням*) або через -NH_2 групу залишку аспарагіну (тоді це називають *N-глікозилюванням*). N-глікозилювання починається на шорсткому ендоплазматичному ретикулумі. Далі білок транспортується до комплексу Гольджі, де цей процес завершується. О-глікозилювання повністю відбувається в комплексі Гольджі. Деякі білки піддаються глікозилюванню лише одного типу, наприклад N-гликозильованим є білок gp120 ВІЛ-1. Чимало вірусних білків зазнають і обидва типи глікозилювання, наприклад, білки gC і gD вірусу простого герпесу. У складі вірусної частки глікозильовані білки стають або інтегральними мембранними білками (як вищезгадані білки ВІЛ та вірусу герпесу), або поверхневими білками капсиду (як VP7 ротавірусів).

Ацилування – це додавання до білка ацильної групи (R–CO–), найпоширенішим варіантом якої є *міристильна група*, де R = CH_3–$(CH_2)_{12}$. Міристильна група приєднується до залишку гліцину на N-кінці молекули білка. Більшість вірусів не кодує білок N-міристилтрансферазу, який здійснює приєднання цієї групи, тож ацилування вірусних білків виконується ферментами хазяїна. Чимало вірусних білків з міристильними групами пов'язані з мембранами (наприклад, білки Gag ретровірусів). Якщо ці білки не будуть міристильовані, вони не зможуть зв'язатися з плазматичною мембраною, і збирання віріонів не відбудеться.

Фосфорилювання означає перенесення фосфатної групи з нуклеотиду (зазвичай – молекули АТФ), на кисень –ОН групи залишків серину, треоніну або тирозину. Перенесення виконується ***протеїнкиназами***, які можуть належати хазяїну або вірусу. Фосфорилювання змінює конформацію, активність, локалізацію та стабільність білка. Чимало процесів в клітині, у тому числі і під час реплікації вірусів, включають фосфорилювання білків. Багато структурних і неструктурних білків вірусів є фосфорильованими (наприклад, фосфопротеїни рабдовірусів).

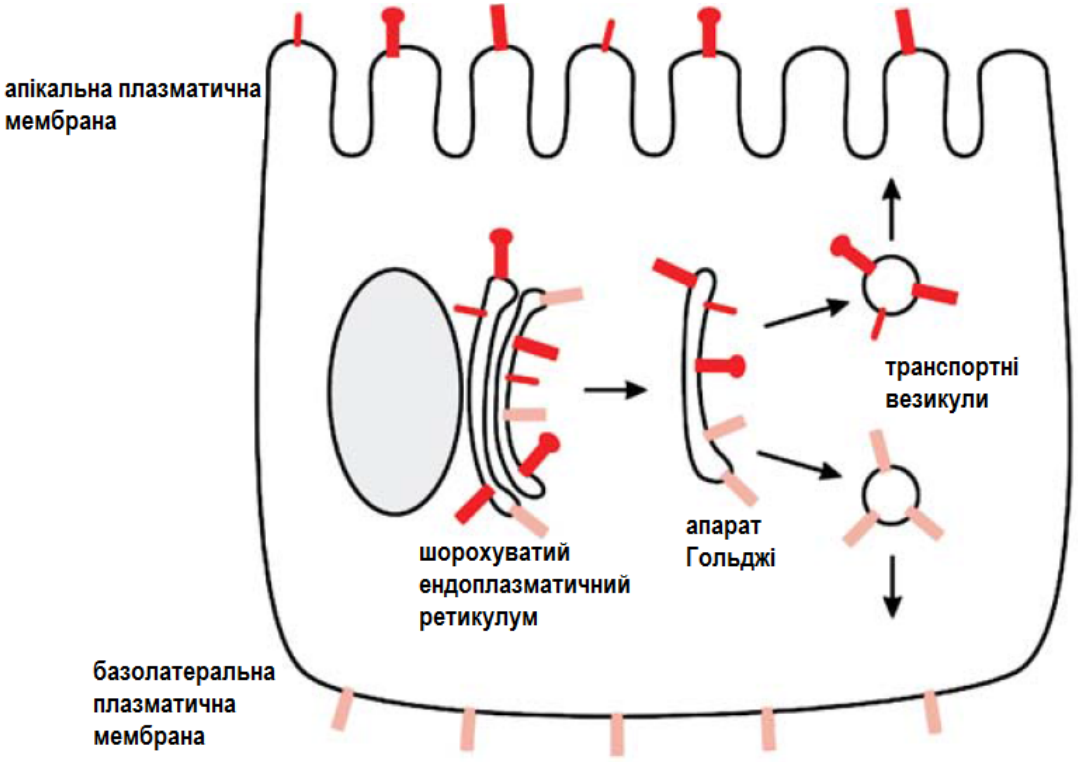
Транспорт новосинтезованих вірусних молекул. Вище, в розділі 4.2, обговорювалося, як вірусні структури транспортуються вдовж мікротрубочок до ядерних пор після входу вірусу в клітину. Проте переміщатися всередині клітини повинні не лише вірусні структури, які щойно в неї проникли, але й молекули, синтезовані вже в інфікованій клітині. Так, вірусні мРНК транспортуються з ядра в цитоплазму, а вірусні білки – у найрізноманітніші ділянки клітини, включаючи ядро.

Молекули білків часто містять **сигнальні послідовності амінокислот**, які визначають їхню локалізацію. Так, білки, що мають бути включені до мембран, мають серією гідрофобних амінокислотних залишків на N-кінці або усередині ланцюга. Саме новостворені сигнальні послідовності направляють комплекси поліпептид-рибосома до *шорсткого ендоплазматичного ретикулума* (ШЕР), де синтез білка завершується. Далі білки, синтезовані на ШЕР, транспортуються за участю везикул апарату Гольджі до плазматичної мембрани або ядерної оболонки. Через ці мембрани можуть в подальшому брунькуватися дочірні віріони.

Цікаві особливості має транспорт вірусних білків у асиметричних за будовою клітинах. Так, епітеліальні клітини тварин мають апікальну (зовнішню) і базолатеральну (внутрішню) поверхні, які складаються з різних ліпідів і білків. Брунькування віріонів в таких клітинах може відбуватися лише на одній з цих двох поверхонь.

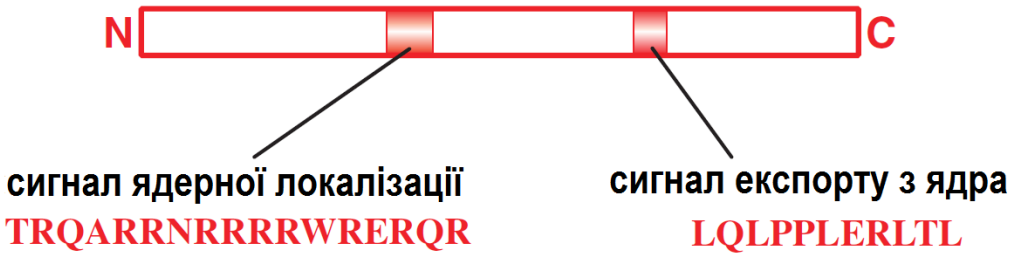
Вірус везикулярного стоматиту (родина *Rhabdoviridae*) брунькується крізь базолатеральну поверхню, а вірус грипу (родина *Orthomyxoviridae*) – крізь апікальну поверхню. Глікопротеїни кожного вірусу спрямовуються до відповідної поверхні клітини (Мал. 4.33). Кожен білок має сигнальну послідовність, яка визначає, до якої саме мембрани клітини він переміщається у складі транспортних везикул.

Якщо віруси реплікуються в ядрі, то більшість, якщо не усі їхні білки мають бути спрямовані в ядро. Для цього вони повинні мати так званий **сигнал ядерної локалізації** – послідовність, збагачену лізином та аргініном. Цей сигнал дозволяє білку зв'язуватися з білками *імпортинами*, і далі, з філаментами ядерної пори, через яку білок транспортується в ядро. Сигнал ядерної локалізації уперше був виявлений у білка вірусу SV40 (родина *Polyomaviridae*).



Мал. 4.33. Направлення вірусних білків до апікальної і базолатеральної поверхонь епітеліальних клітин. Білки вірусу грипу А (червоного кольору) і вірусу везикулярного стоматиту (рожевого кольору) транспортуються до апікальної і базолатеральної поверхонь відповідно (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Молекули РНК також переміщуються по клітині. Наприклад, мРНК після синтезу в ядрі повинні експортуватися через ядерну пору в цитоплазму. Цьому допомагають специфічні білки. Наприклад, білок Rev ВІЛ-1 (родина *Retroviridae*) має як сигнал ядерної локалізації, так і **сигнал експорту з ядра** (Мал. 4.34). Завдяки сигналу ядерної локалізації, він транспортується в ядро, де специфічно зв'язується з вірусною РНК. Далі, завдяки сигналу експорту, Rev і зв'язана з ним РНК транспортуються через ядерну пору в цитоплазму.

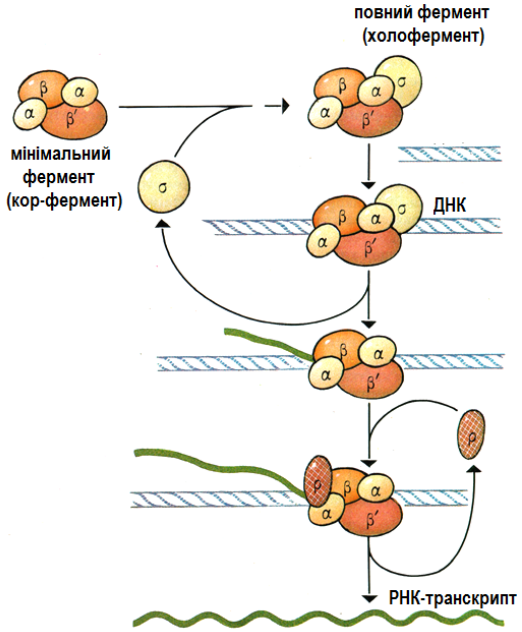


Мал. 4.34. Білок Rev ВІЛ-1. На малюнку застосовані однолітерні позначення амінокислот. Сигнал ядерної локалізації збагачений залишками аргініну (R). Сигнал експорту з ядра збагачений залишками лейцину (L) (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

4.2.4. Особливості транскрипції і трансляція в клітинах бактерій

У прокаріотів відомий єдиний тип ДНК-залежної РНК-полімерази. Його молекула складається з каталітичного *кор-ферменту* (який містить субодиницю β, субодиницю β′ і дві субодиниці α), та регуляторного *сигма-фактора* (σ) (Мал. 4.35). Сигма-фактор дозволяє полімеразі розпізнавати і зв'язуватися зі специфічними промоторами у вірній орієнтації. Бакте-

рійні промотори (Прибнов-бокс та Хогнесс-Бокс, див. вище) розпізнаються сигма-фактором, який зв'язується з ними. Далі він від'єднується від кор-ферменту і може бути використаний повторно.



Мал. 4.35. *Транскрипція за участі РНК-полімерази прокаріотів. Пояснення у тексті (за відкритими джерелами Інтернету).*

Завершення транскрипції в клітинах прокаріотів може бути ρ-незалежним (читається «ро-незалежним»), або внутрішнім, і ρ-залежним, або зовнішнім. ρ-Незалежна термінація опосередкована послідовністю матриці, яка включає *паліндром, або інвертований повтор* – ділянку, одна половина якої комплементарна іншій половині. За паліндромом йде декілька залишків аденіну. Після завершення синтезу РНК, новосинтезована молекула у паліндромній ділянці «замикається сама на себе», утворюючи шпильку. Оскільки у складі ДНК за паліндромом йшла полі-А-ділянка, на молекулі РНК їй відповідає новостворена U-ділянка. Зв'язки між аденінами і урацилами є відносно слабкими; різке утворення шпильки призводить до поштовху, під час якого ці зв'язки розриваються, і РНК від'єднується від матриці.

ρ-Залежна термінація відбувається за допомогою спеціального білка, ρ-фактора (ро-фактор, rho factor), який має геліказну і АТФ-азну активності. Він розриває зв'язки між РНК-ДНК, що призводить до вивільнення транскрипту.

Процеси транскрипції та трансляції у прокаріотів відрізняються від відповідних процесів у еукаріотів низкою особливостей:

– мРНК прокаріотів зазвичай є *поліцистронними*, тобто кожна мРНК має декілька відкритих рамок зчитування (Мал. 4.36);

– мРНК прокаріотів та їхніх вірусів ніколи не бувають кепованими на 5′-кінці і лише деколи мають полі(А)-хвіст на 3′-кінці.

– у геномах бактерій і бактеріофагів майже не трапляються інтрони.

− трансляція у прокаріотів може починатися до того, як завершиться транскрипція: відсутність ядра дозволяє одночасний перебіг транскрипції і трансляції.

− мала субодиниця прокаріотичної рибосоми зв'язується безпосередньо з регіоном ініціації трансляції на мРНК. Ініціація зазвичай включає взаємодію між послідовністю Шайна-Дальгарно (Shine-Dalgarno sequence, S-D) на мРНК і комплементарною їй анти-S-D

послідовністю на 3′-кінці молекули 16S рРНК малої субодиниці. Послідовність S-D знаходиться безпосередньо перед стартовим кодоном AUG і містить мінімум шість нуклеотидів, AGGAGG;

− метіонін в ініціаторній метионіл-тРНК зазвичай є *формілованим* (містить групу –CHO);

− у ініціації трансляції бере участь значно менше факторів ініціації;

− під час одного акту трансляції у прокаріотів та їхніх вірусів транслюються усі ORF одразу. Лише декілька фагів містять гени, що перекриваються, тож їхня трансляція відбувається за допомогою читання через стоп-кодон або фреймшіфту (див. вище).



Мал. 4.36. У типовому випадку мРНК бактерій, як і мРНК бактеріофагів, має декілька відкритих рамок зчитування, які можуть транслюватися послідовно, за один акт трансляції. 5'-кінець РНК прокаріотів не має кепа, але 3'-кінець іноді містить хвіст (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

4.3. Реплікація геномів ДНК-вірусів

Реплікація ДНК-геному вірусу є не просто актом репродукції. Вона створює нові копії нуклеїнової кислоти, що слугують матрицями для трансляції і синтезу ферментів та структурних білків. Важливо підкреслити, що кожна з цих копій працює не на себе, а на вірус загалом. Коли прийде час збирання вірусних часток, кожна копія геному може бути обгорнута білками, у синтезі яких вона безпосередньо не брала жодної участі.

Найчастіше, ДНК-геномні віруси копіюють свої геноми безпосередньо у форму ДНК, а РНК-геномні віруси – в РНК. Проте деякі ДНК-геномні віруси синтезують геноми через проміжну РНК-форму, і навпаки.

Типові ДНК-віруси (класи 1–2 за Балтімором) потребують для реплікації **ДНК-залежної ДНК-полімерази** – ферменту наявного в усіх клітинних організмів і доступного для вірусної експлуатації. Тож серед вірусів, реплікація яких відбувається у ядрі, форми з невеликими геномами, наприклад, папіломавіруси, використовують фермент хазяїна. Але віруси з великими геномами, наприклад, герпесвіруси, зазвичай кодують свої власні ферменти. Щодо ДНК-геномних вірусів, які реплікуються в цитоплазмі, то вони завжди використовують свої власні ферменти, адже ДНК-залежних ДНК-полімераз у цитоплазмі еукаріотів немає.

Ретровіруси (клас 6) використовують для реплікації **РНК-залежну ДНК-полімеразу**, або **зворотну транскриптазу**, яка здійснює синтез ДНК на матриці РНК.

А для реплікації своїх РНК-геномів на матриці ДНК вони використовують *РНК-полімеразу II* клітини-хазяїна.

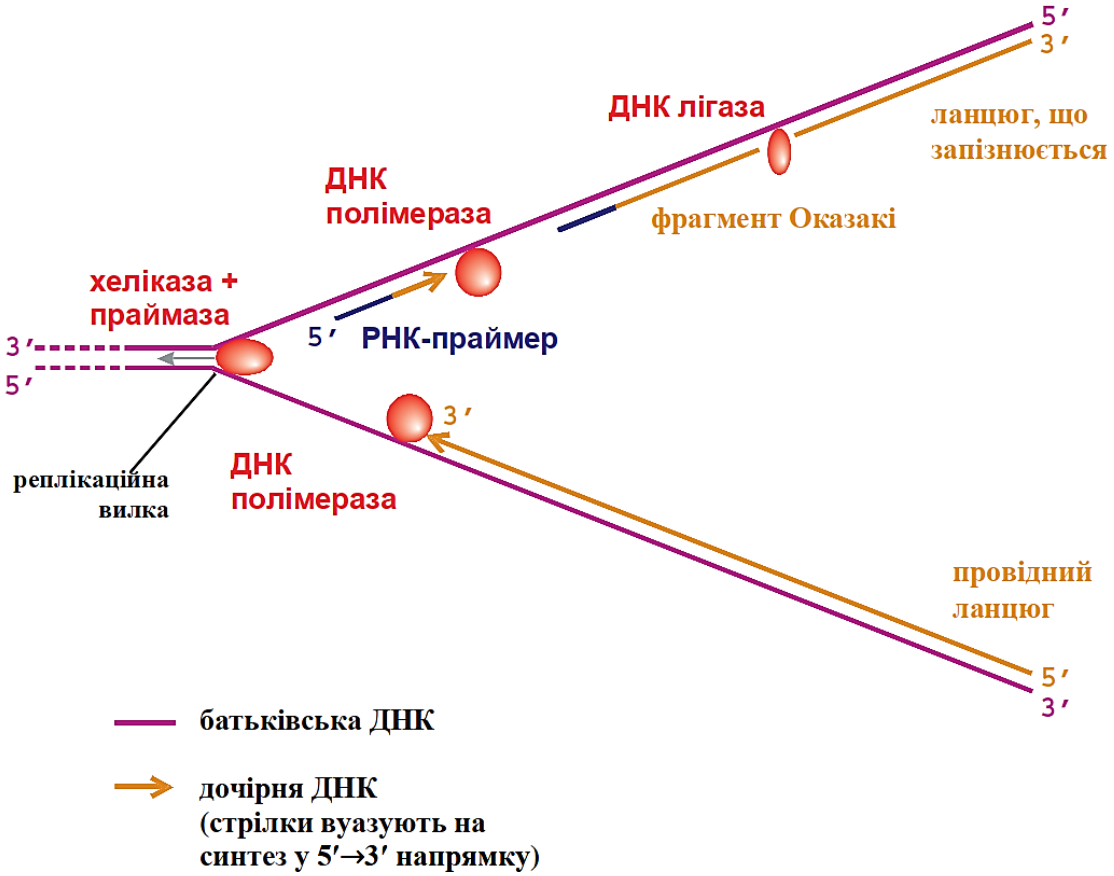
Загальні особливості реплікації ДНК. Основний механізм, за допомогою якого реплікуються геноми ДНК-вірусів, подібний до принципу реплікації клітинних ДНК. Процес починається на спеціальній ділянці молекули ДНК – *точці початку реплікації*, або *локусі ori* (від англ. origin of replication). Ця ділянка містить специфічну послідовність нуклеотидів, яка є симетричною в кожному ланцюзі і збагачена АТ-парами.

Першими з локусом *ori* зв'язуються ферменти *хеліказа* та *топоізомераза* (у прокаріотів один з її варіантів відомий як *гіраза)*. Перший фермент розділяє ланцюги материнської ДНК, а другий позбавляє молекулу зайвого скручування, що виникає під час розділення.

Далі у процес вступає ДНК-залежна ДНК-полімераза. До кожного з розділених материнських ланцюгів вона приєднує вільні нуклеотиди, потрохи створюючи дволанцюгові молекули (Мал. 4.37).

Оскільки батьківські ланцюги антипаралельні (лежать уздовж один одного «валетом»), новоутворювані дочірні ланцюги також стають антипаралельними. Відповідно, якщо ДНК-полімераза просто рухатиметься уздовж дволанцюгової батьківської молекули ДНК у певному напрямку, то один дочірній ланцюг доведеться синтезувати у напрямі 5′→3′, а інший – у напрямі 3′→5′. Проте усі ДНК-полімерази здатні проводити синтез ДНК лише у напрямі 5′→3′. Зверніть увагу, що, як і у випадку синтезу РНК, на батьківському ланцюзі синтез йде у напрямку 3′→5′.

Усі клітинні організми, а також чимало вірусів, вирішують цю проблему таким чином. На одному з двох батьківських ланцюгів, що називається *провідним (лідируючим) ланцюгом*, синтез дочірнього ланцюга відбувається безперервно. А на другому, який називається *ланцюгом, що запізнюється*, синтез відбувається переривчасто, у формі окремих фрагментів. Такі фрагменти були названі *фрагментами Оказакі* на честь японського ученого Р. Оказакі, який відкрив їх під час вивчення реплікації ДНК бактеріофагів в 1968 р.



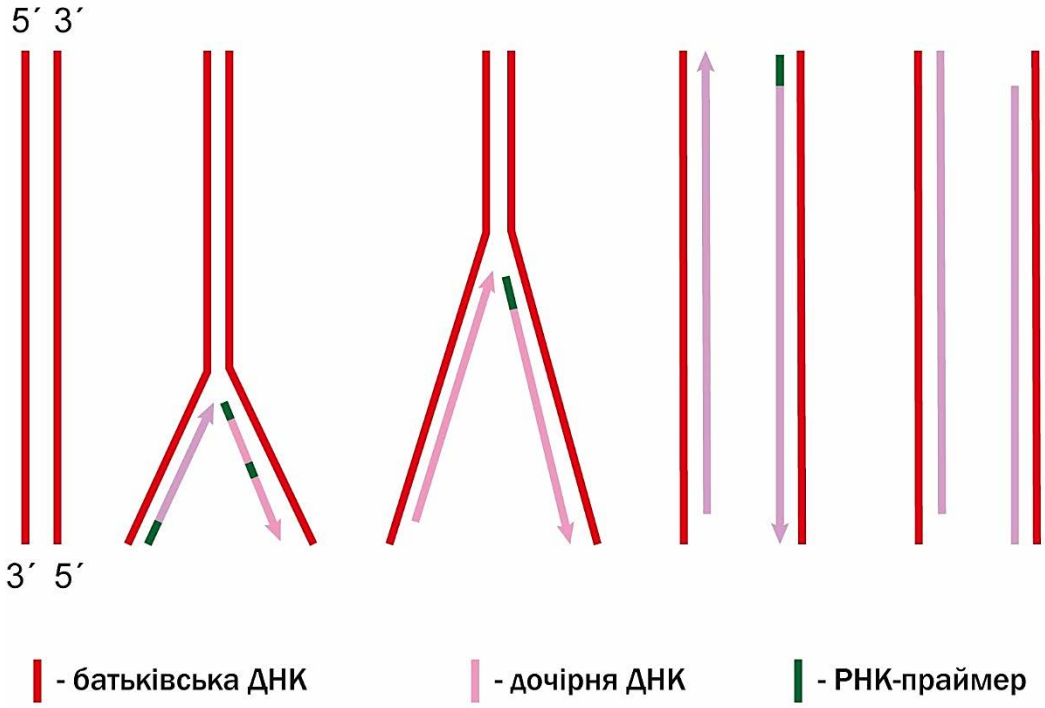
Мал. 4.37. Схематичне зображення реплікаційної вилки – ділянки реплікації ДНК. Хеліказа розділяє дволанцюгову батьківську ДНК, а праймаза синтезує РНК-праймери, які далі використовуються ДНК-полімеразою для ініціації синтезу ДНК. Провідний ланцюг синтезується безперервно. Ланцюг, що запізнюється, синтезується у вигляді фрагментів Оказакі, які з'єднуються разом ДНК-лігазою (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Альтернативним рішенням проблеми односпрямованого синтезу є розділення синтезу дочірніх ланцюгів в часі. У такому випадку кожен з ланцюгів синтезується окремо: спочатку один ланцюг синтезується у напрямі 5′→3′, потім інший. Саме так реплікуються аденовіруси. Однак цей механізм є у природі дуже рідкісним, адже він призводить до того, що

другий ланцюг довгий час залишається неспареним. Оскільки одноланцюгова ДНК схильна до утворення вторинних структур та хімічних модифікацій, платою за аденовірусний механізм реплікації є генетична нестабільність.

Друга фундаментальна проблема реплікації полягає в тому, що ДНК-полімерази нездатні починати синтез ДНК «з нуля» (на відміну від деяких РНК-полімераз, розділ 4.2.2). Натомість, вони вимагають наявності *праймера* - цукрової ОН-групи попереднього нуклеотиду, до якого здатні додавати наступні нуклеотиди. Однак звідки взяти попередній нуклеотид на самому початку процесу? Загальним рішенням цієї проблеми є використання особливої ДНК-залежної РНК-полімерази, ***праймази***, яка синтезує на ДНК-матриці коротку ділянку РНК (як ми пам'ятаємо, ДНК-залежні РНК-полімерази не потребують праймера). Ця ділянка, праймер, далі використовується ДНК-полімеразою як основа для продовження синтезу. В подальшому праймер видаляється специфічним ферментом, який розпізнає і руйнує РНК, спарену з ДНК. Ділянка, звільнена від праймера, заповнюється новосинтезованою ДНК, після чого *ДНК-лігаза* з'єднує новий фрагмент ДНК з синтезованим раніше ланцюгом (див. Мал. 4.37).

Потреба у праймері створює фундаментальну проблему реплікації лінійних ДНК: неможливість синтезу кінців молекул. Коли синтез у напрямку 5′→3′ ініціюється РНК-праймером, який далі видаляється, то заповнення проміжку на 5′-кінці провідного ланцюга стає неможливим, адже там відсутня основа для початку синтезу ДНК (це, зі зрозумілих причин, не стосується праймерів, що розділяють фрагменти Оказакі). У кінці циклу реплікації така ж проблема виникає у ланцюга, що запізнюється, в результаті чого на 3′-кінцях батьківських ланцюгів утворюються дочірні ланцюги неповної довжини (Мал. 4.38). В результаті, після кожного циклу реплікації лінійна ДНК коротшає.



Мал. 4.38. Укорочення дочірніх ланцюгів ДНК на 5′-кінцях під час реплікації лінійних молекул ДНК.

Проблема реплікації кінців є загальнобіологічною. В еукаріотів вона вирішується за допомогою використання спеціальних кінцевих ділянок молекули ДНК – *теломер*. Вони складаються з численних повторів, пов'язаних зі спеціальними білками. Особливий фер-

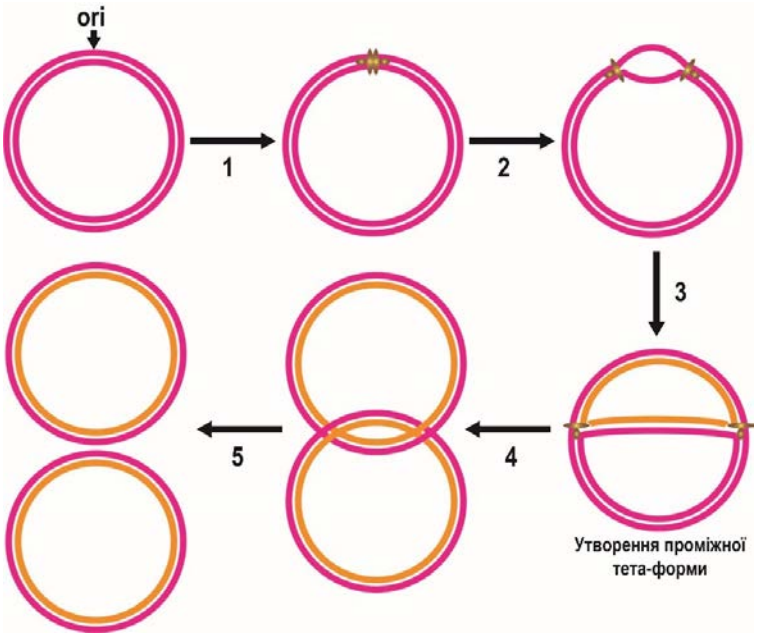
мент, *теломераза*, за допомогою власної РНК-матриці добудовує теломерні повтори і подовжує теломери в кожному циклі поділу клітини. Таким чином, довжина хромосом залишається незмінною, і кодуючі ділянки не страждають від вкорочення. У більшості диференційованих клітин тварин теломераза не експресується, проте у статевих та стовбурових клітинах (і клітинах злоякісних пухлин) вона активна.

Прокаріоти ж вирішують цю проблему значно простіше: їхні геноми замкнені в кільце, а у кільця немає кінця!

Віруси, що мають кільцеві геноми, також позбавлені проблеми реплікації кінців. Але власники лінійних геномів змушені вдаватися до різноманітних хитрощів (див. далі), адже телomераз вони не мають.

Реплікація замкнених в кільце ДНК у загальному випадку відбувається за участі трьох різних механізмів, які називають *тета-, D-* і *сигма-формами* реплікації. Такі назви обумовлені тим, що на проміжних етапах реплікаційні комплекси нагадують літери тета (θ), D і сигма (σ) відповідно.

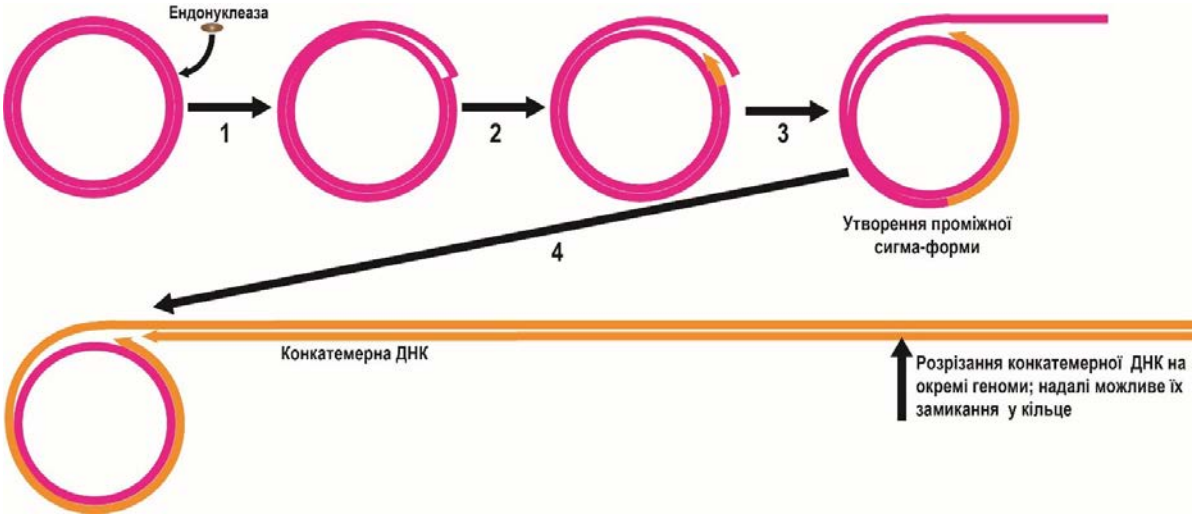
Підчас реалізації тета-механізму (Мал. 4.39), синтез обох ланцюгів починається одночасно. Утворюються дві реплікаційні вилки (див. Мал. 4.37), які рухаються в протилежних напрямах, кожна по власній матриці. Під час просування реплікаційних вилок уздовж материнських ланцюгів формується структура, яка нагадує грецьку букву «тета», у якій коло відповідає первинній формі кільцевої молекули ДНК, а перетинка є виникаючою другою кільцевою молекулою. Зрештою, реплікаційні вилки зустрічаються на протилежній відносно локусу *ori* стороні материнської ДНК, завершивши повне копіювання обох ланцюгів. Наприкінці процесу відбувається розчеплення двох дочірніх молекул за участі топоізомерази.



Мал. 4.39. *Схема реплікації кільцевої ДНК через тета-форму. ori – точка початку реплікації. Червоним кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, жовтим – щойно синтезована ДНК. 1 - Розпізнавання реплікаційним комплексом точки початку реплікації; 2 - ініціація реплікації; 3, 4 – елонгація; 5 – розчеплення кілець.*

Механізм D схожий на попередній, але у ньому дочірній ланцюг одразу синтезується лише на одному з двох материнських ланцюгів. Другий ланцюг материнської молекули просто витісняється з неї, і добудовується вже після закінчення реплікації першого.

Сигма-реплікація, яку ще називають *реплікацією за механізмом кільця, що котиться* (Мал. 4.40) починається з того, що спеціальна ендонуклеаза розрізає один з двох ланцюгів материнської ДНК. Далі 3′-кінець ДНК, що утворився в результаті розрізання, виступає праймером для початку синтезу дочірнього ланцюга на матриці нерозрізаного материнського ланцюга. А 5′-кінець розрізаного ланцюга потрохи витісняється з молекули і на певному етапі нагадує хвостик грецької букви σ.



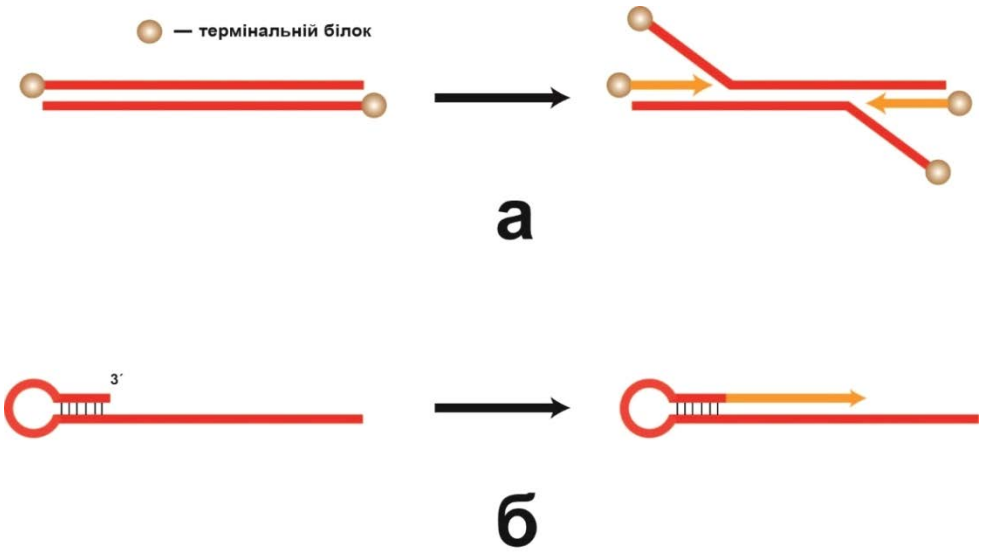
Мал. 4.40. *Схема реплікації кільцевої ДНК через сігма-форму. Червоним кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, жовтим – щойно синтезована ДНК. 1 – Роз-різання одного з ланцюгів ендонуклеазою 2 - ініціація реплікації; 3, 4 – елонгація з утворенням конкатемерної ДНК; 5 – розрізання конкатемерної ДНК на окремі геноми і замикання їх у кільце. Задля спрощення, білки реплікаційного комплексу не відображені.*

У певний момент на вільному хвості теж починається синтез другого ланцюга ДНК; для ініціації цього процесу використовуються звичайні РНК-праймери. А далі починається найцікавіше. Коли нерозрізаний кільцевий ланцюг добігає кінця, приєднання нуклеотидів не закінчується. Натомість, вони починають додаватися до основи хвоста! Утворюється конструкція, подібна на котушку ниток, яку безперервно розкручують за вільний кінець. Кільцева молекула ніби «котиться», обертаючись навколо своєї осі, продовжуючи і без того довгий лінійний фрагмент.

В підсумку, замість однієї копії материнської ДНК, утворюється довгий ланцюг ідентичних, з’єднаних між собою фрагментів, що називаються *конкатемерами*. Згодом, ці лінійні копії розрізаються і замикаються в кільця.

У вірусів, геноми яких являють собою кільцеву ДНК, відомі тета- і сигма-форми реплікації. Однак вищезазначені механізми непридатні для вірусів, що мають лінійні геноми.

Як ми вже зазначали, для забезпечення реплікації вони використовують особливі стратегії. Перша з них полягає в тому, що перед початком реплікації ДНК замикається у кільце. Друга стратегія змушує використовувати як праймер бічну –ОН групу так званого **попередника термінального білка** (попередником цю білкову молекулу називають через її недозрілість у момент використання). Білковий праймер не перекриває кінців батьківського ланцюга і дозволяє здійснити реплікацію, починаючи з першого нуклеотиду. В підсумку кожен з ланцюгів геномної ДНК залишається ковалентно зв’язаним з термінальним білком (Мал. 4.41а).



Мал. 4.41. *Схема реплікації лінійної ДНК вірусів. Червоним кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, жовтим – щойно синтезована ДНК. а – В якості праймера використовується попередник термінального білка, який у підсумку залишається ковалентно зв'язаним з кожним ланцюгом ДНК. б – за праймер править сама ДНК (самопраймування), що стає можливим завдяки утворенню шпильки на кінцях ДНК. Зображена шпилька, утворена на 3´-кінці геномної ДНК.*

Третя стратегія реплікації лінійних геномів полягає в **самопраймуванні**, тобто використанні кінця самої геномної ДНК у ролі праймера. Щоб це було можливим, 3′-кінець молекули ДНК загинається петлею та приєднується до комплементарних нуклеотидів тієї ж молекули. У результаті на кінці ДНК або утворюється шпилька (Мал. 4.41б), або загнутий кінець відрізається від ДНК та формує на ній окремий комплементарний ланцюг.

Нижче ми розглянемо приклади реплікації вірусних ДНК-геномів різних типів.

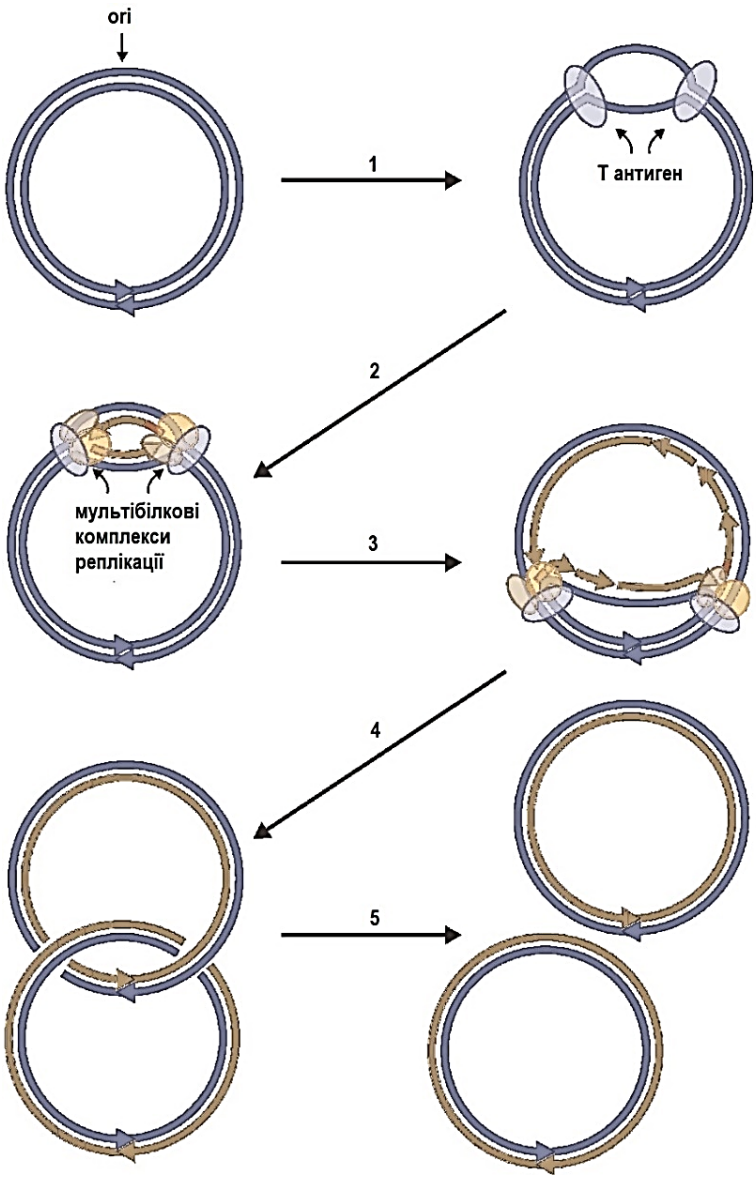
4.3.1. Реплікація вірусів з кільцевим длДНК-геномом

Вірус SV40 (родина *Polyomaviridae*) має кільцевий дволанцюговий ДНК-геном завдовжки 5243 пар нуклеотидів. Цей геном реплікується за тета-механізмом (Мал. 4.42).

Для здійснення реплікації вірусу SV40 потрібні 10 білків. Лише один з них кодується вірусом, решта дев'ять належать клітині хазяїна, причому в здоровій клітині вони виконують ту ж функцію, як і під час реплікації вірусу. Єдиний білок вірусного походження – **великий Т-антиген**, потрібний для ініціації реплікації. Окрім цього, йому притаманна хеліказна активність, тобто здатність до розплітання ланцюгів ДНК перед працюючою ДНК-полімеразою. Він також сприяє взаємодії ДНК з праймазним комплексом.

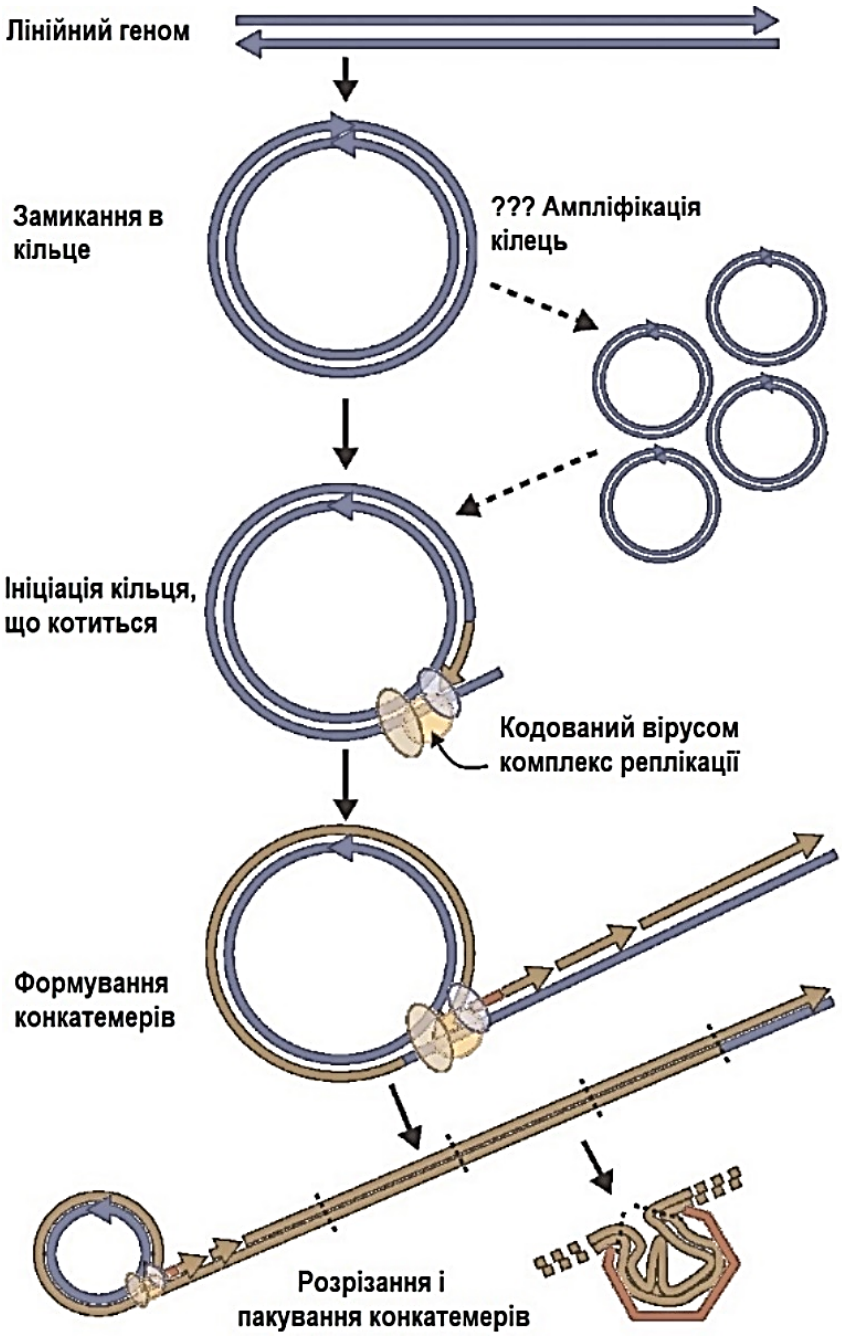
4.3.2. Реплікація вірусів з лінійним длДНК-геномом

Як ми зазначали вище, існує декілька стратегій реплікації лінійних геномів. Спочатку ми розглянемо відтворення тих вірусів, що вирішують проблему реплікації кінців шляхом замикання ДНК в кільце. До цієї категорії належать, зокрема, віруси простого герпесу типу 1 і 2, вірус Епштейна-Барр (родина *Herpesviridae*), а також бактеріофаг λ (родина *Siphoviridae*).



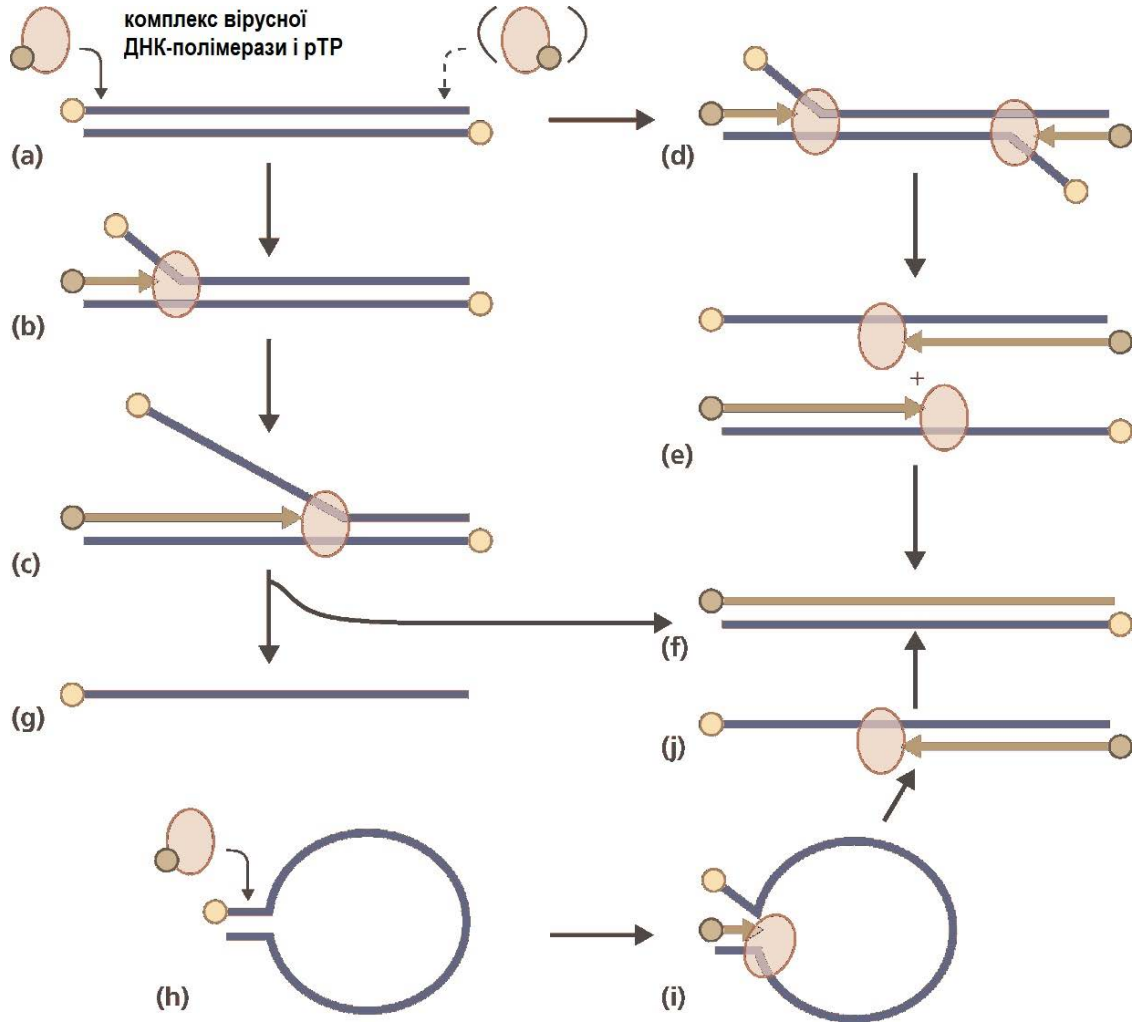
Мал. 4.42. *Загальна схема реплікації ДНК вірусу SV40: ori – точка початку реплікації; 1 – розпізнавання Т-антигеном точки початку реплікації; 2 – ініціація реплікації; 3, 4 – елонгація; 5 – розчеплення. схема реплікації SV40 (подробиці дивіться в тексті). Синій колір – батьківська ДНК; коричневий – дочірня ДНК; червоний – РНК-праймер. Стрілки на новосинтезованих фрагментах ДНК представляють 3′-кінці; полярність 5′→3′ інших ланцюгів ДНК позначається символами ▶ (за N.J. Dimmock et al., 2016).*

Особливістю геному вірусу герпесу типу 1 є наявність вільного (неспареного) нуклеотиду на 3′-кінці кожного з двох ланцюгів ДНК. Ці нуклеотиди комплементарні один одному і, власне, саме вони обумовлюють замикання ДНК в кільце перед початком реплікації. Далі відбувається ампліфікація кільцевої ДНК за сигма-механізмом. Процес іде за підтримки білків, що кодуються вірусом. Вони забезпечують розділення ланцюгів, зв’язування одноланцюгової ДНК та синтез праймерів. Вірусне походження має також і ДНК-полімераза. Участь білків клітини-хазяїна в процесі реплікації відносно невелика, але такий важливий фермент, як топоізомераза, має тут клітинне походження. Конкатемерна ДНК певний час залишається цільною молекулою і розрізається на геноми однакової довжини лише під час їхнього пакування у капсиди (Мал. 4.43).



Мал. 4.43. *Схема реплікації ДНК вірусу герпесу типу 1. Синій колір – батьківська ДНК; коричневий – дочірня ДНК; червоний – збірний капсид (за N. J. Dimmock et al., 2016).*

Друга стратегія реплікації лінійних длДНК-геномів (Мал. 4.44), що полягає у використанні білкових ОН-груп, типова для аденовірусів (*Adenoviridae*). Геном цих вірусів представлений лінійною дволанцюговою ДНК завдовжки близько 36 тис. пар нуклеотидів. На двох її кінцях присутні інвертовані термінальні повтори завдовжки 100–150 пар нуклеотидів, які містять точки *ori*. До 5′-кінця кожного ланцюга ковалентно прикріплений кодований вірусом *термінальний білок*, що використовується для запобігання скорочення геному (див. Мал. 4.41, а). Точка початку реплікації розпізнається комплексом з ДНК-полімерази і *попередника термінального білка* (pTP). Зв’язуванню цього комплексу з ДНК сприяють два білка клітини-хазяїна, які специфічно розпізнають послідовності, суміжні з точкою початку реплікації. Ці білки в нормі є факторами транскрипції, але вірус запозичує їх для інших потреб.



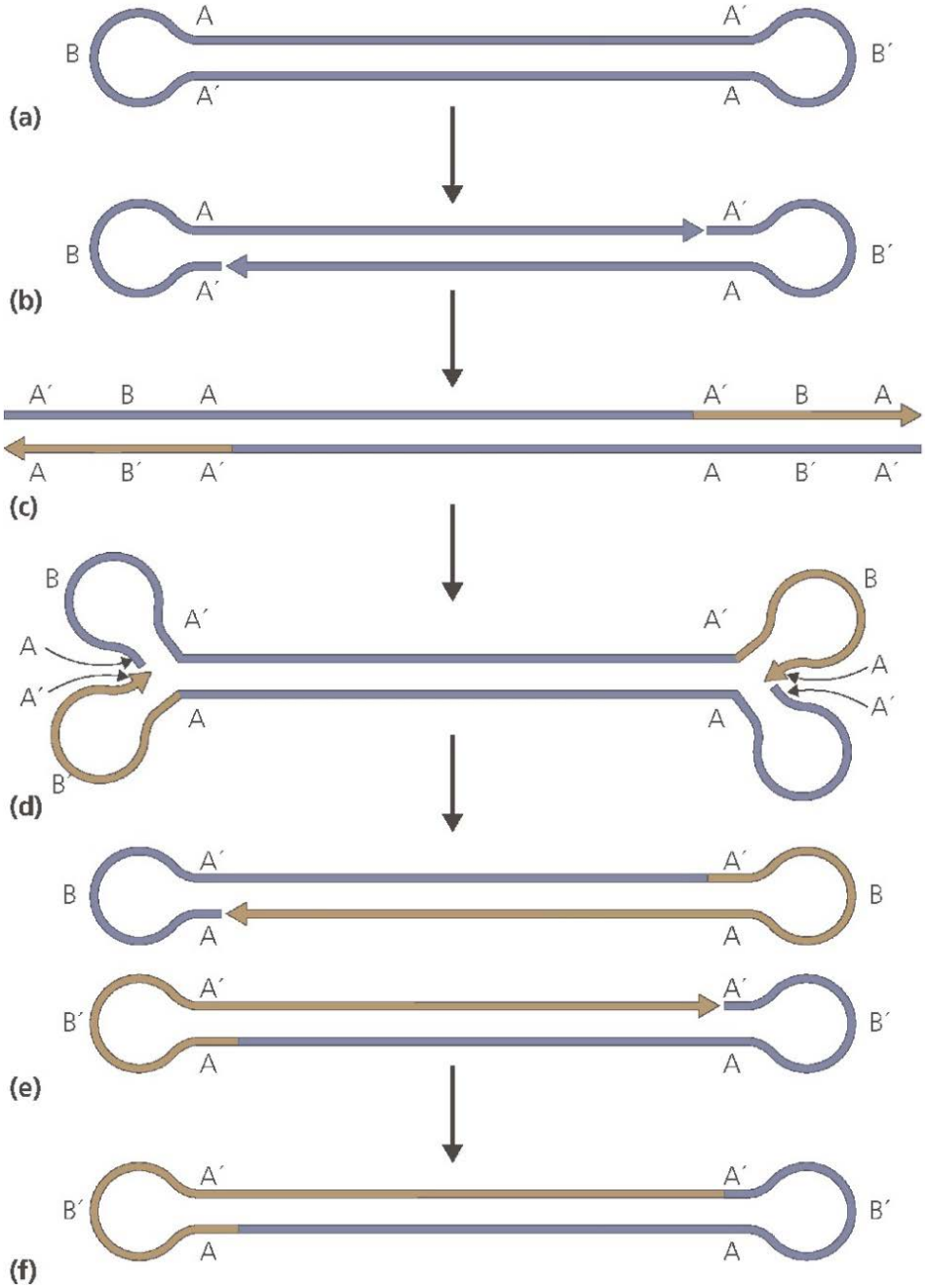
Мал. 4.44. *Схема реплікації ДНК аденовірусів. Синій колір – батьківська ДНК; коричневий – дочірня ДНК. Стрілки на дочірніх ланцюгах ДНК представляють 3′-кінці. Жовті кружечки позначають термінальний білок (TP), приєднаний до 5′-кінців батьківської ДНК, а коричневі кола позначають білкові молекули-попередники термінального білка (pTP), які запускають новий синтез ДНК. Вірусна ДНК-полімераза представлена рожевим кольором. Латинські літери позначають етапи процесу (за N. J. Dimmock et al., 2016).*

Після зв'язування комплексу ДНК-полімерази і pTP з точкою *ori*, полімераза починає синтез дочірнього ланцюга ДНК. Синтез відбувається у напрямі 5′ → 3′ уздовж одного з ланцюгів. Другий ланцюг, поки що вільний, потроху витісняється з молекули. Він стабілізується спеціальним білком, що кодується вірусом (Мал. 4.44, a–c). Цей процес, однак, може здійснюватися одночасно з двох кінців батьківської ДНК (Мал. 4.44, d), і тоді батьківські ланцюги розходяться під час зустрічі реплікаційних комплексів (Мал. 4.44, e), що призводить до одночасного утворення двох дволанцюгових ДНК. Якщо ж використовується лише одна точка початку реплікації, другий ланцюг повністю витісняється з молекули, залишаючись нespареним (Мал. 4.44, g). В цьому разі він замикається у кільце, утворюючи конфігурацію «сковороди з ручкою» (Мал. 4.44, h). Далі до кінця, що не зв'язаний з термінальним білком, приєднується ініціаторний комплекс (Мал. 4.44, i), і відбувається реплікація (Мал. 4.44, j).

До вірусів, що вирішують проблему реплікації кінців третім шляхом, через самопраймування (див. Мал. 4.41, б), належить вірус віспавакцини (родина *Poxviridae*). Геном цього вірусу має довжину близько 190 тис. пар нуклеотидів. Його надзвичайна особливість – замкненість кінців ДНК. Пари нуклеотидів на кожному кінці лінійної молекули ДНК

пов’язані звичайним 5′→3′-зв’язком, тобто являють собою не два окремих ланцюги, а дві половини єдиного ланцюга. За умови повної денатурації такої ДНК утворюється кільцева одноланцюгова ДНК, одна половина якої комплементарна іншій.

Процес реплікації вірусної ДНК у поксвірусів здійснюється виключно вірусними білками. На двох замкнених кінцях геному присутні інвертовані повтори, які містять декілька генів (Мал. 4.45, a).



Мал. 4.45. *Імовірна схема реплікації ДНК поксвірусів. Синій колір – батьківська ДНК; коричневий – дочірня ДНК. Стрілки на дочірніх ланцюгах ДНК представляють 3′ кінці. Комплементарні послідовності позначаються A, A′ і B, B′. Зверніть увагу, що дві альтернативні форми послідовностей термінальних петель, B і B′, міняються з кожною реплікацією; окремі молекули можуть мати петлі або з ідентичними, або з комплементарними послідовностями. Пояснення в тексті (за N. J. Dimmock et al., 2016).*

Реплікація ініціюється за допомогою розпізнавання і розрізання одного з ланцюгів ДНК у локусі *ori*, що знаходиться в межах повтору (Мал. 4.45, b). Розрізання може відбутися на одному або двох кінцях молекули.

ДНК-полімераза починає рух від 3′-кінця, що утворився внаслідок розрізання ланцюгів, аж поки не досягне кінця матриці, утворивши звичайні для ДНК розімкнені кінці (Мал. 4.45, c). Далі, завдяки наявності термінальних повторів, кінці кожного з ланцюгів формують кільця. Оскільки при основі цих кілець як раз знаходиться ДНК-полімераза, вона продовжує синтез, на цей раз рухаючись у бік середини молекули, розділяючи материнські ланцюги і добудовуючи дочірній ланцюг на кожному з них (Мал. 4.45, d). Коли дві реплікаційні вилки зустрічаються, дві дволанцюгові молекули остаточно розходяться (Мал. 4.45, e), а кінці ланцюгів з'єднуються між собою (Мал. 4.45, f).

4.3.3. Реплікація вірусів з олДНК-геномом

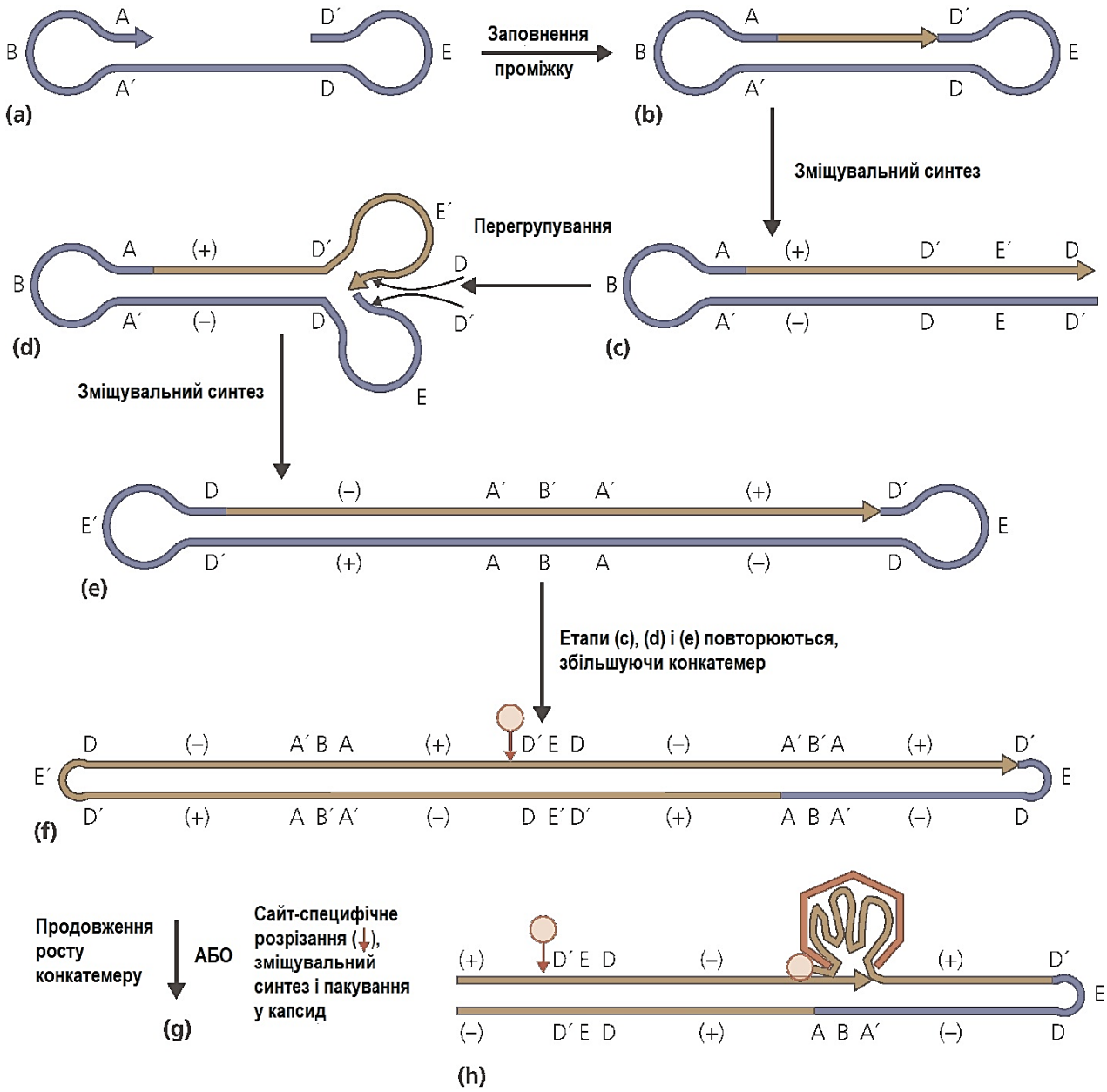
Віруси класу 2 за Балтімором, зокрема, бактеріофаги φX174 (родина *Microviridae*) і M13 (родина *Inoviridae*), а також віруси ТТ людини (родина *Anelloviridae*) мають геном у вигляді замкненої в кільце олДНК. Першим етапом реплікації стає синтез другого, комплементарного ланцюга ДНК.

Після цього механізм реплікації стає подібним до реплікації дволанцюгових кільцевих геномів (Мал. 4.39, Мал. 4.40). У бактеріофага φX174 одноланцюгова ДНК, що потрапила в клітину, перетворюється на дволанцюгову за допомогою залежного від РНК-праймерів синтезу. Далі дволанцюгова ДНК реплікується за механізмом кільця, що котиться, щоправда вільний кінець в цьому разі не доповнюється другим ланцюгом. У результаті формуються одноланцюгові конкатемери, які потім розрізаються і замикаються в кільця.

Реплікація геномів вірусів, які мають *лінійну* одноланцюгову ДНК, відбувається за схемою самопраймування (див. Мал. 4.41, б). Це характерно для парвовірусів (родина *Parvoviridae*), наприклад, автономного парвовірусу B19 та депендопарвовірусів. Ці віруси на кінцях геномів мають термінальні інвертовані повтори, завдяки яким на кінцях ДНК утворюються шпильки. На малюнку 4.46 наведена загальна схема реплікації геномів автономних парвовірусів.

Важливим першим кроком реплікації парвовірусу є перетворення генома на дволанцюгову форму за допомогою заповнення проміжку (Мал. 4.31, a, b). Термінальна шпилька забезпечує 3′-кінець спареної основи з ОН–групою, з якого синтез ДНК може ініціюватися без РНК-праймерів (самопраймування). Зміщення спарених основ на 5′-кінці дозволяє тривати синтезу до досягнення 5′-кінця (Мал. 4.31, c). Саме на дволанцюговій ДНК відбувається транскрипція вірусних білків. Далі структура зазнає перегрупування (Мал. 4.31, d), в результаті якого наново утворюється шпилька, що спочатку існувала на 5′-кінці батьківської ДНК, а також утворюється копія цієї шпильки на 3′-кінці комплементарного ланцюга, який служить праймером для продовження синтезу (Мал. 4.31, e). Надалі цикли перегрупування і зміщувального синтезу призводять до утворення тетрамерного спареного ланцюга (Мал. 4.31, f), і цей процес може тривати (Мал. 4.31, g). Сформовані конкатемери можуть служити інтермедіатами, з яких формується одноланцюгова вірусна ДНК. Розрізи здійснюються на 5′-кінці сайт-специфічним ферментом, який залишається прикріпленим до 5′-кінця. 3′-кінець з ОН–групою діє як праймер для зміщувального синтезу, який супроводить упаковка одноланцюгової ДНК у віріони.

Як тільки зміщується і упаковується увесь геном, надмірний дочірній геном розщеплюється ендонуклеазами, що призводить до вивільнення вірусних часток.



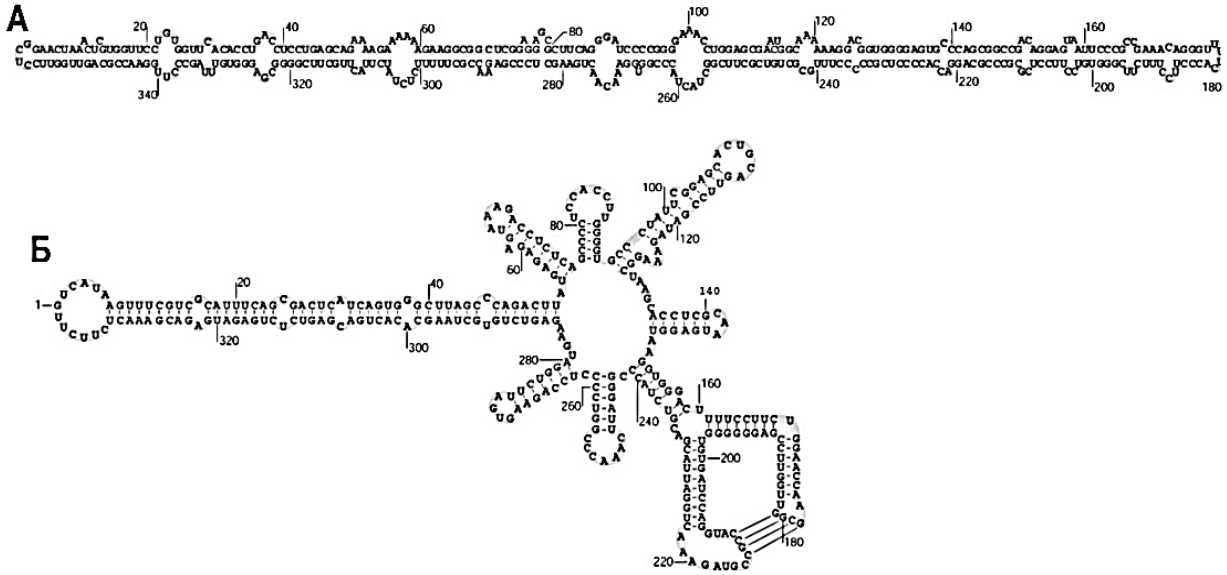
Мал. 4.46. Схема реплікації ДНК парвовірусів. Синім кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, коричневим – щойно синтезована ДНК, червоним – капсид. Стрілками позначені 3'-кінці. Червоне коло позначає сайт-специфічний вірусний фермент, що розрізає ДНК. Комплементарні послідовності позначаються A, A´ тощо. Пояснення див. в тексті (за N.J. Dimmock et al., 2016).

4.3.4. Реплікація віроїдів і вірусу гепатиту дельта

Віроїди являють собою патогенні для рослин кільцеві молекули РНК довжиною 246–399 нуклеотидів, що мають складну вторинну структуру (Мал. 4.47). Вони не належать до РНК-вірусів (і взагалі вірусів), і хоча їх реплікація є синтезом РНК на матриці РНК, вона відбувається зовсім іншими механізмами, ніж розглянута у розділі 4.2.2 реплікація РНК-геномних вірусів.

Віроїди ніколи не утворюють капсидів, але їхня відмінність від вірусів полягає не в цьому (адже віруси родини *Narnaviridae* теж позбавлені капсидів). Відмінність віроїдів – в тому, що їхня РНК не кодує ніяких білків. Цей дивний факт ускладнює розуміння патогенності віроїдів: що може змінити у організмі хазяїна «гола» нуклеїнова кислота? Вважається, що віроїди втручаються у контроль експресії генів, зокрема пов'язаних з обігом фітогормонів. Імовірно, вони роблять це, запускаючи синтез рослиною *малих інтерферуючих РНК*

(міРНК). Ці міРНК спричиняють сайленсинг мРНК генів, відповідальних за обмін фітогормонів. Можливо, паралельно порушуються й інші метаболічні процеси.



Мал. 4.47. *Вторинна структура віроїдів: А – веретеноподібності бульб картоплі (родина Pospiviroidae), Б – латентної мозаїки персика (родина Avsunviroidae) (за T.O. Diener,, 2003).*

Віроїди розділяються на дві родини, *Pospiviroidae* і *Avsunviroidae*, які різняться за деякими молекулярними особливостями і місцем реплікації. Характеристика цих родин наведена у таблиці 4.2.

Реплікація віроїдів відбувається відповідно до моделі кільця, що котиться (див. Мал. 4.40), з утворенням проміжних форм РНК. Зрозуміло, що ферментативна підтримка цього процесу покладена на білки хазяїна, адже власних ферментів віроїд не кодує. Однак віроїди родини *Avsunviroidae* мають каталітичну активність, яка забезпечує їм здатність до саморозрізання – процесу, важливого під час реплікації. Цю здатність надає їм присутність у складі віроїдної РНК так званого **молотоголового рибозима** (hammerhead ribozyme).

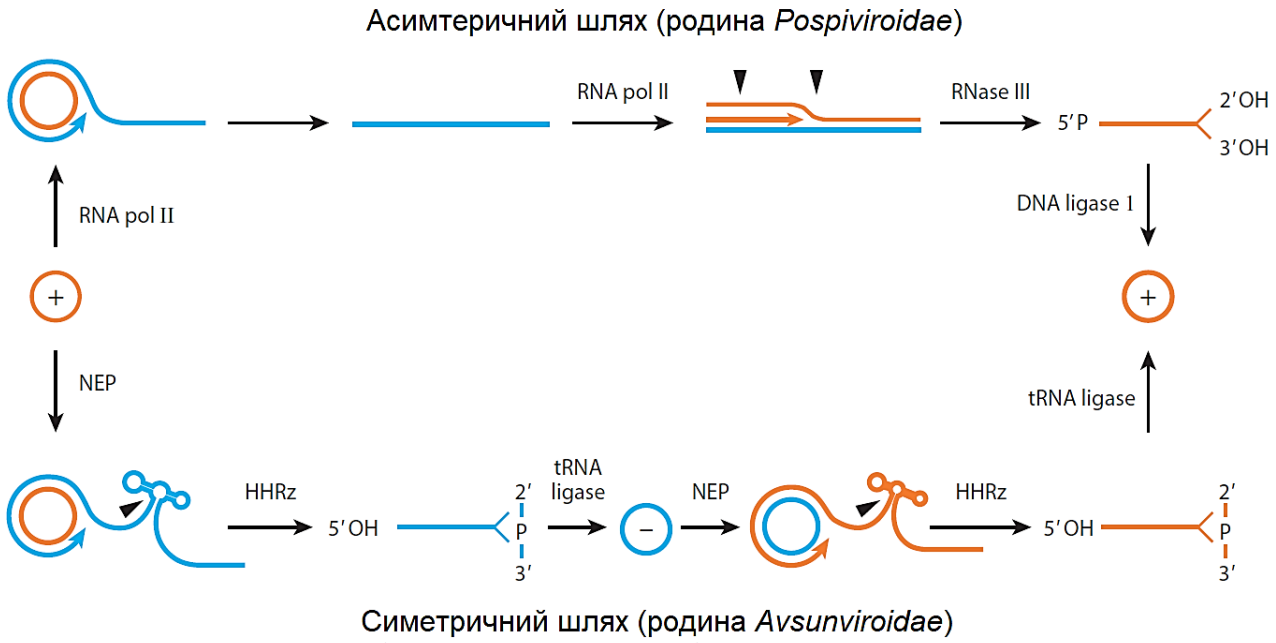
Віроїди не кодують білків, тому використання позначень (+)- і (–)-ланцюги щодо їх РНК у звичайному сенсі алогічно. У інфікованих рослинах виявлені РНК віроїдів обох полярностей, і за умовою, (+) полярність призначається ланцюгу РНК, що накопичується на більш високому рівні *in vivo*.

Таблиця 4.2. *Характеристика родин віроїдів.*

Характеристики	Родина *Pospiviroidae*	Родина *Avsunviroidae*
Представники	Віроїд веретеноподібності бульб, або готики, картоплі	Віроїд сонячного опіку авокадо
Центральний консервативний регіон	Присутній	Відсутній
Каталітична активність	Відсутня	Володіють активністю рибозима, який каталізує саморозрізання РНК віроїда
Місце реплікації у клітині рослини	Ядро	Пластиди, головним чином хлоропласти

Реплікація віроїдів веретеноподібності бульб картоплі і сонячного опіку авокадо (Мал. 4.48) починається на специфічній ділянці РНК. Таким чином, вважають, що ініціація реп-

лікації у віроїдів вірогідно контролюється промотором. У випадку *Pospiviroidae*, процес каталізує **ядерна ДНК-залежна РНК-полімераза II**, яка незрозумілим чином набуває здатності використовувати РНК як матрицю. Процес реплікації спочатку призводить до синтезу лінійної конкатемерної (–) РНК. Далі на ній синтезується лінійний (+)-ланцюг, який потім за участі ферменту **РНКаза III** хазяїна розрізається на лінійні одноланцюгові РНК. Ці лінійні фрагменти замикаються у коло ядерною **ДНК-лігазою I**, яка у цьому випадку працює з РНК-субстратом (тобто діє як РНК-лігаза). Такий шлях реплікації називається **асиметричним**.



Мал. 4.48. Реплікація віроїдів асиметричним і симетричним шляхами. Оранжевий і блакитний кольори позначають відповідно позитивну і негативну РНК. Сайти розщеплення показані стрілками. HHR – молотковий рибозим; NEP – кодована ядерним геномом ДНК-полімераза пластид; RNA pol II – ДНК-залежна РНК-полімераза II; RNase III – РНКаза III (за R. Flores et.al., 2014).

Реплікація віроїдів родини *Avsunviroidae* відбувається за участю кодованої у ядрі **ДНК-залежної РНК-полімерази пластид (NEP)**, яка в цьому разі використовує РНК як матрицю. Так само як і у попередньому випадку, на першій стадії процесу синтезується лінійна конкатемерна (–)РНК. Але далі ця РНК розрізається на фрагменти, що за довжиною відповідають окремим віроїдам. Це розрізання здійснює згаданий вище молотоголовий рибозим. Одержані фрагменти замикаються в кільця під дією **пластидної ізоформи тРНК-лігази**. У подальшому ця замкнена (–)РНК виступає матрицею для синтезу лінійної конкатемерної (+)РНК, знов-таки за механізмом кільця, що котиться. Потім за рахунок дії молотоголового рибозима ця (+)РНК розрізається на фрагменти, які одразу замикаються в коло РНК-лігазою. Наявність двократного повторення процесів реплікації, розрізання та замкнення конкатемерів, спочатку з (–), а потім з (+)РНК, дозволило назвати цей шлях реплікації **симетричним**.

Реплікація вірусу гепатиту D (δ). На відміну від віроїдів, які паразитують на рослинах, вірус гепатиту D паразитує на ссавцях. Цей вірус формально має (–)РНК-геном, найменший серед вірусів тварин, близько 1680 нуклеотидів. Але, на відміну від інших РНК-вірусів, він не кодує РНК-залежної РНК-полімерази, що зближує його з віроїдами. Іще однією «віроїдною» рисою вірусу гепатиту D є те, що його геномна РНК замкнена в коло і

складена у паличкоподібну дволанцюгову структуру. Сучасні автори зазвичай розглядають цей вірус як *субвірусну частку* (див. розділ 4.8).

Геном вірусу місить єдину ORF, в якій закодовані два білка, **великий і малий дельта-антигени**. Спочатку геномна РНК експресує малий дельта-антиген. Потім, клітинний фермент ADAR1 додає до вірусної РНК новий фрагмент, внаслідок чого вона починає експресувати вже великий дельта-антиген, довший за малий на 19 амінокислот. Цікаво, що модифікована вірусна РНК не може ані реплікуватися, ані потрапити у нові віріони, тож власне функцію розмноження реалізують лише ті копії вірусної РНК, які не були піддані модифікації.

Реплікація РНК вірусу відбувається в ядрі клітини-господаря за механізмом кільця, що котиться, аналогічно до асиметричної реплікації віроїдів родини *Pospiviroidae*. Процес іде за участі клітинної ДНК-залежної РНК-полімерази клітини. Однак конкатемерна лінійна РНК розрізається на мономери без участі ферментів, адже вона має рибозимну активність (ця риса зближує дельта-вірус з віроїдами родини *Avsunviroidae*). Замикання мономерів у кільце здійснюється ДНК-лігазою.

Хоча геном вірусу гепатиту D реплікується без допомоги інших вірусів, він не здатен до самостійного переміщення до незаражених клітин. Це пов'язане з тим, що його геном не кодує білки його власного капсиду, ними його забезпечує вірус гепатиту B. Більш того, мембрана, що оточує капсид дельта-вірусу, також містить лише білки вірусу гепатиту B. Таким чином, зріла вірусна частка дельта-вірусу за зовнішнім виглядом не відрізняється від віріонів вірусу гепатиту B, хоча й має зовсім інший геном.

4.3.5. Реплікація геномів вірусів через зворотну транскрипцію

Загальні особливості. Процес синтезу ДНК на матриці РНК називається **зворотною транскрипцією** і забезпечується ферментом **зворотною транскриптазою** (вона ж **ревертаза**, або **РНК-залежна ДНК-полімераза**). Відкриття цього ферменту у 1970 р. стало біологічною сенсацією десятиліття. Однак сьогодні ми знаємо, що ревертазну активність можна знайти в клітинах більшості організмів, а значна частина геному еукаріотів сформувалася саме внаслідок зворотної транскрипції.

Серед вірусів зворотну транскрипцію використовують представники класів 6 і 7 за Балтімором. Віруси класу 6 (ретровіруси) мають (+)РНК-геном, на якому у клітині створюється ДНК-копія. Віруси класу 7 (параретровіруси, або реверсівіруси) мають длДНК-геном, на якому в клітині спочатку синтезується проміжна прегеномна РНК, а вже на ній – ДНК. Важливо усвідомити, що «справжнім» геномом, тобто молекулою, на якій відбувається транскрипція (синтез мРНК), у вірусів обох класів є ДНК. Просто у ретровірусів ця молекула не потрапляє у віріон, а синтезується лише в клітині. У віріонах цих вірусів замість неї знаходиться проміжний продукт – **прегеномна РНК** (Мал. 4.49).

Реплікація ретровірусів. Віріони усіх ретровірусів містять дві ідентичні молекули одноланцюгової геномної РНК. Через це їх інколи називають диплоїдними, однак цей «диплоїд» ніколи не буває гетерозиготним. Геномні РНК мають послідовність з (+) сенсом і наділені характерними особливостями мРНК еукаріотів, наприклад, кепом і полі(А)-хвостом. Незважаючи на це, геномні РНК ніколи не транслюються після попадання вірусу в клітину. Натомість, вони використовуються як матриці для синтезу дволанцюгових молекул ДНК.

Цей процес відбувається усередині вірусних нуклеокапсидів, що перебувають в цитоплазмі. Власне, саме тому прегеномна РНК і не транслюється: рибосоми хазяїна просто не мають до неї доступу.



Мал. 4.49. Загальна схема циклу реплікації геномів вірусів за участі зворотної транскрипції.

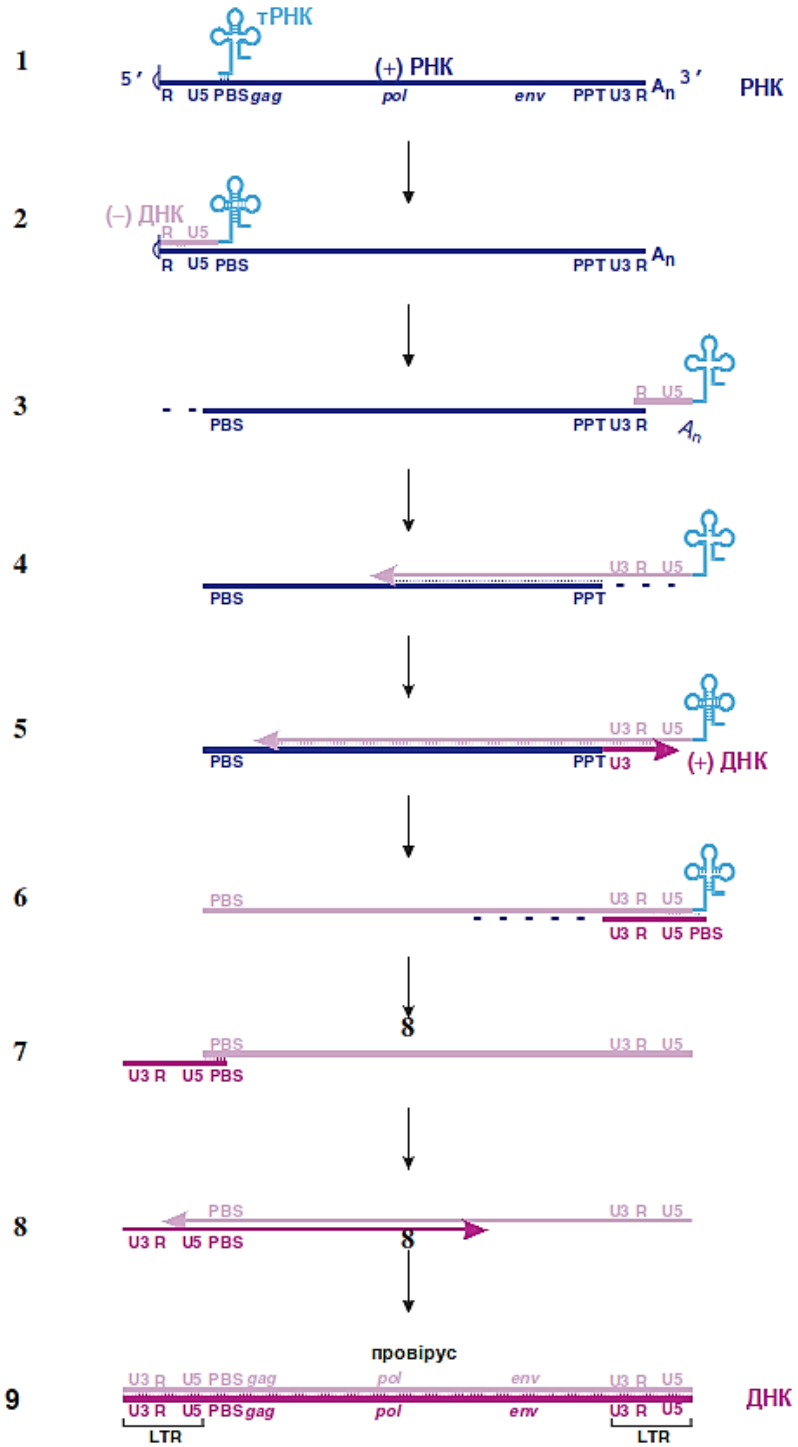
Зворотна транскриптаза ретровірусів має три типи ферментативної активності. По-перше, вона, зрозуміло, здійснює зворотну транскрипцію, тобто синтез ДНК на матриці РНК. По-друге, вона може поводитися як ДНК-залежна ДНК-полімераза, тобто синтезувати ДНК на ДНК-матриці. По-третє, вона є **РНКазою Н**, тобто вміє розщеплювати РНК-ланцюг у складі РНК-ДНК-гібриду. Дивовижно, що усі ці активності необхідні у процесі зворотної транскрипції.

Як і будь-яка ДНК-полімераза, зворотна транскриптаза вимагає наявності РНК-праймера, у ролі якого ретровіруси використовують вкрай незвичну молекулу – **транспортні РНК** хазяїна, захоплені у попередній клітині. На початку процесу, молекула тРНК своєю певною ділянкою (але не антикодоном) повинна комплементарно зв'язатися з певною ділянкою геномної РНК вірусу (з сайтом приєднання праймера). Оскільки це зв'язування є специфічним, і різні ретровіруси різняться по послідовності нуклеотидів на ділянці приєднання тРНК, вони використовують різні типи тРНК. Наприклад вірус саркоми Рауса застосовує триптофанову тРНК, вірус лейкемії мишей Молоні – пролінову, а ВІЛ – лізинову.

Процес зворотної транскрипції є доволі складним; причину цієї складності ми пояснимо пізніше. Все починається з того, що тРНК хазяїна зв'язується з геномною (+)РНК вірусу з допомогою **сайту приєднання праймера**, **PBS** (primer-binding site) (Мал. 4.50, 1). Приєднання відбувається поблизу 5′-кінця (+)РНК, який місить особливий **регіон U5** та **послідовність повтору R**. Таке місце приєднання не дозволяє одразу почати синтез ДНК по всій довжині матриці. Натомість, ревертаза, використовуючи тРНК як праймер, здійснює синтез ДНК-копії лише на невеликому відрізку (+)РНК (Мал. 4.50, 2). Далі ревертаза, що діє тут як РНКаза Н, видаляє РНК-ланцюг в дуплексі РНК-ДНК. Це звільняє фрагмент ДНК, пов'язаний з тРНК, і дозволяє йому здійснити **стрибок**: ДНК переноситься на інший кінець (+)РНК, де містяться **регіон U3** та вже знайома нам послідовність R (Мал. 4.50, 3).

Від комплексу тРНК-ДНК починається нарощування ланцюга ДНК на матриці (+)РНК. Слідом за цим РНКаза Н частково видаляє ланцюг РНК на щойно утвореному РНК-ДНК-дуплексі (Мал. 4.50, 4). Його місце займає ланцюг ДНК, що починає синтезуватися на ДНК-матриці, приєднаній до (+)РНК (Мал. 4.50, 5). Зрештою, ланцюг РНК повністю руйнується

(Мал. 4.50, 6), що дозволяє здійснити **другий стрибок**: перенесення короткого ланцюга ДНК на 5′-кінець довгого та їхнє зв'язування в сайті PBS (Мал. 4.50, 7). На обох ланцюгах починається добудовування парного ланцюга. Цей процес каталізує та ж сама ревертаза, що тут проявляє активність ДНК-залежної ДНК-полімерази (Мал. 4.50, 8). В результаті утворюється молекула дволанцюгової ДНК, на обох кінцях якої знаходяться **довгі кінцеві повтори, LTRs** (long terminal repeats), що мають структуру U3–R– U5.



Мал. 4.50. Механізм зворотної транскрипції у ретровірусів. ДНК позначена рожевим і червоним кольором, РНК – синім, мРНК - блакитним. LTR – великі кінцеві повтори (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Після завершення зворотної транскрипції нуклеокапсид переміщається до ядра і через ядерну пору вприскує у нього свою ДНК. У ядрі вірусна ДНК набуває кільцевої форми.

Ділянка стику LTR-кінців розпізнається ферментом **інтегразою**, який вносить ступінчасті розриви як в LTR, так і в клітинну ДНК, утворюючи на них так звані *липкі кінці*. Цей же фермент здійснює і з'єднання ланцюгів вірусної та клітинної ДНК, тобто вбудовує вірусну ДНК у клітинну хромосому. У цьому вбудованому стані вірусна ДНК називається **провірусом**.

ДНК ретровірусів може вбудуватися у будь-яку ділянку клітинного геному. Але все-таки вона має певні уподобання: зі зрозумілих причин вірус надає перевагу ділянкам, що активно експресуються.

Інтеграція вірусного геному до клітинної ДНК є незворотною. У більшості випадків, однак, ретровіруси інтегруються до соматичних клітин, тож у багатоклітинних організмів вони здебільшого не передаються наступному поколінню. Проте іноді ретровіруси все ж інтегруються до геномів статевих клітин, і коли це відбувається, провірус стає невід'ємною частиною генофонду популяцій, видів і навіть таксонів вищого рангу. Звичайно, у певний момент провірус зазнає мутацій і втрачає здатність до репродукції, але його пошкоджені гени залишаються з господарем назавжди.

Нові РНК-геноми ретровірусів утворюються на інтегрованій в ядрі провірусній ДНК. Цей процес не відрізняється від синтезу клітинних та вірусних мРНК та здійснюється клітинною ДНК-залежною РНК-полімеразою II. Первинний транскрипт кепується і поліаденілюється ферментами хазяїна. Власне, саме тому, що геномні вірусні РНК утворюються клітиною як звичайні мРНК, вони і одержують кеп та хвіст, що ніколи їм не знадобляться.

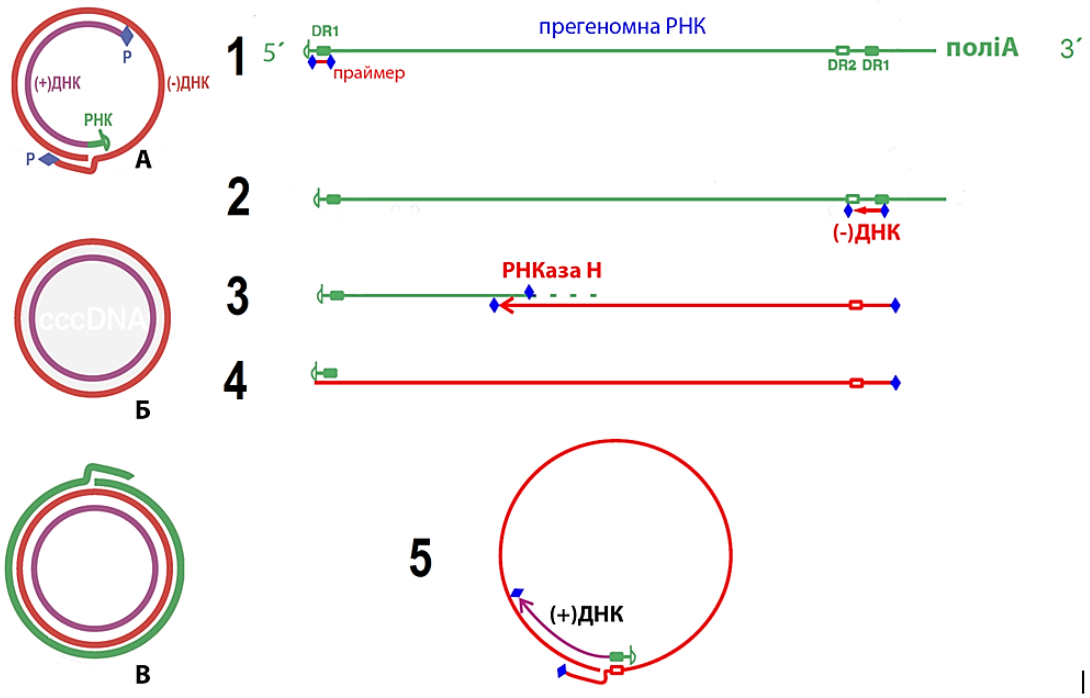
Цікавою проблемою, з якою стикаються ретровіруси, є потреба у промоторі для початку синтезу нових геномів. Звичайно, у ділянці хромосоми, в яку вбудувався провірус, промотора скоріше за все не знайдеться, тож він має бути частиною провіруса. Але ж промотори не транскрибуються! Тож промоторна ділянка провірусу не зможе увійти до складу прегеномної РНК і потрапити до вірусної частки. Звідки ж наступне покоління вірусів її візьме? Саме через цю проблему провірус не може бути просто копією РНК-геному. Натомість, як ми пам'ятаємо, під час зворотної транскрипції на обох кінцях вірусної ДНК утворюються додаткові послідовності, LTRs. Послідовність U3, розташована зліва від точки початку транскрипції, і слугує промотором під час транскрипції, яка починається точно на 5′-кінці елементу R. А сайтом поліаденілювання вірусної РНК є елемент U5 на 3′-кінці елементу R правого LTR. Таким чином, усі складності зворотної транскрипції необхідні для вирішення проблеми промотора.

Реплікація параретровірусів (клас 7 за Балтімором). Відтворення цих вірусів ми розглянемо на прикладі вірусу гепатиту В людини, який належить до родини гепаднавірусів (родина *Hepandaviridae*). Геном цього вірусу складається з **частково дволанцюгової ДНК**. Вона замкнена в кільце, однак, парадоксально, кожен з її ланцюгів є лінійним (Мал. 4.51, А). Довшим з ланцюгів є (–)-ланцюг, який утворює повне кільце. Його кінці частково перекриваються, утримуючись разом за допомогою водневих зв'язків між азотними основами. Другий, (+)-ланцюг, перекриває ділянку з'єднання кінців (–)ДНК, але не досягає повної довжини, тож не перекрита ним частина (–)ДНК залишається одноланцюговою.

Коли частинка вірусу гепатиту В входить в клітину, її геном транспортується в ядро і, за допомогою клітинної ДНК-полімерази, ковалентно замикається і добудовується з утворенням повноцінного дволанцюгового кільця (Мал. 4.51, Б). На відміну від ретровірусів, це кільце далі не вбудовується в геном хазяїна.

Щойно отримане кільце ДНК транскрибується клітинною РНК-полімеразою II з утворенням декількох мРНК, які далі виходять в цитоплазму. Більшість із них там транслюються з утворенням білків капсиду, але одна молекула, **прегеномна РНК** (Мал. 4.51, В), використовується для реплікації вірусу. Однак, що незвично, перед цим вона теж має пройти через процес трансляції (з використанням механізму внутрішньої ініціації трансляції).

У результаті трансляції прегеномної РНК синтезується **білок Р,** який має активність зворотної транскриптази, ДНК-полімерази та РНКази Н (нагадаємо, що в ретровірусів ревертаза також володіє усіма цими активностями). Але окрім цього, він використовується як праймер, одна молекула якого залишається ковалентно зв'язаною з геномною ДНК навіть після завершення репродукції. Через це він потрапляє до вірусної частки.



Мал. 4.51. Механізм реплікації геному вірусу гепатиту В. Ліворуч: А – геном вірусу; Б – формування дволанцюгового ДНК-геному в ядрі клітини; В – синтез прегеномної РНК. Праворуч: 1–5 – етапи зворотної транскрипції. ДНК позначена червоним кольором, РНК – синім (за J. Carter, Vol. Saunders, 20013).

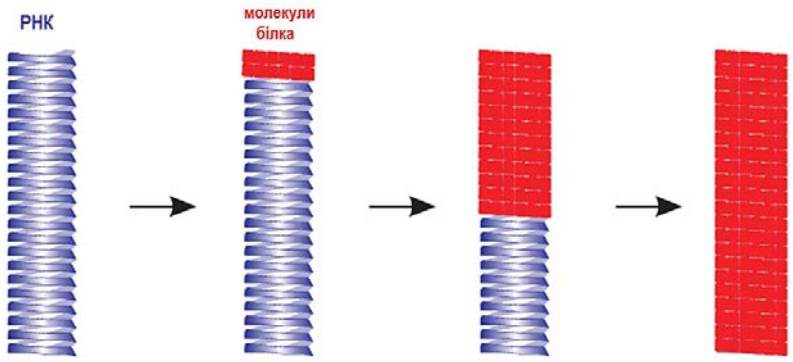
Реплікація вірусу починається з того, що новостворені молекули білка Р зв'язується із специфічною послідовністю на 5′-кінці прегеномної РНК. Здійснюється синтез короткого фрагмента (–)ДНК, в якому білок Р використовується як праймер (Мал. 4.51,1). Далі цей фрагмент, разом з білком Р, здійснює стрибок на 3′-кінець РНК (Мал. 4.51, 2). Там синтез ДНК продовжується, причому, завдяки Н-РНКазній активності зворотної полімерази матриця РНК руйнується одразу після використання (Мал. 4.51, 3). Однак специфічний олігонуклеотид РНК на 5′-кінці РНК-матриці, який містить **повтор DR1**, уникає руйнування (Мал. 4.51, 4). Цей фрагмент переноситься на ділянку **DR2** біля 5′-кінця синтезованої (–)ДНК і там слугує праймером для синтезу другого, короткого ланцюга ДНК. Під час синтезу цього ланцюга (–)ДНК замикається у кільце (Мал. 4.51, 5).

Зауважимо, що через перекриття кінців у молекулі (–)ДНК синтез другого ланцюга ДНК спочатку іде на тій частині кільця, що завершується вільним хвостом (він відмічений стрілкою на Мал. 4.51, 5). Але далі синтезований фрагмент (+) ДНК перестрибує на інший ланцюг (–) ДНК, що дозволяє продовжити синтез (+) ДНК. Однак вірусна частка покидає клітину раніше, ніж синтез (+)-ланцюга завершується. Саме тому цей фрагмент геному має в гепаднавірусів неповну довжину: його просто не встигають добудувати.

Параретровіруси родини Caulimoviridae (колімовіруси), у т. ч. вірус мозаїки цвітної капусти, так само як і гепаднавіруси, мають геном у вигляді кільцевої дволанцюгової ДНК, однак (+)-ланцюг цієї молекули є повним, а (–)-ланцюг містить цілих два розриви. Подібно до ретровірусів, праймером для синтезу (–) ДНК у колімовірусів слугує транспортна РНК клітини хазяїна.

4.4. Збирання (морфогенез) вірусних часток

Формування капсида. Після накопичення в інфікованій клітині порогових кількостей вірусних геномів і структурних білків, починається збирання**,** або **морфогенез віріонів**. Якщо віріон має спіральну симетрію (Мал. 4.52), процес розпочинається з прикріплення молекули капсидного білка до кінця молекули нуклеїнової кислоти. Далі приєднання продовжується, аж поки геном не вкривається білковою оболонкою повністю.

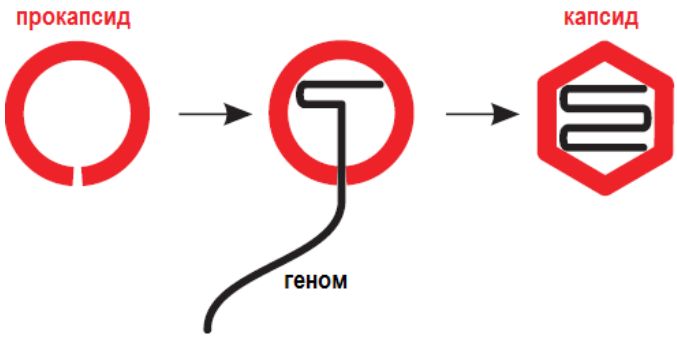


Мал. 4.52. Збирання нуклеокапсиду, що має спіральну структуру (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Збирання ікосаедричних капсидів відбувається у зворотному порядку. Спочатку утворюється порожня білкова оболонка, і лише після цього до неї потрапляє нуклеїнова кислота. Впродовж цього процесу, або після нього, капсид може зазнати додаткових модифікацій, наприклад зміни форми зі сферичної на ікосаедричну. Іноді модифікація капсиду включає ферментативне розрізання одного або декількох структурних білків.

Геном входить в недозрілий капсид (**прокапсид**) через канал, розташований в ділянці, яка в подальшому стане однією з вершин ікосаедра. У цій ділянці розташовані ферменти, які забезпечують пакування геному (Мал. 4.53). У фагів складної будови саме до ділянки, через яку входить ДНК, потім приєднується хвіст.

Пакування геному. Як вірусу вдається «знайти» свій геном серед усіх нуклеїнових кислот, присутніх у клітині? Виявляється, в цьому йому допомагають вірусні білки, що специфічно зв'язуються зі спеціальними нуклеотидними послідовностями – **сигналами упаковки.** У геномів, представлених одним ланцюгом, сигнал упаковки є ділянкою з певною вторинною структурою, причому вона має формуватися або лише на (+)-, або лише на (–)-ланцюзі, залежно від того, який з них упаковується до віріона.



Мал. 4.53. Морфогенез ікосаедричного капсиду (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Важливо, що не всі копії вірусного геному мають потрапити у віріон: проміжні та матричні РНК вірусу повинні залишитися у клітині. У таких копій геному сигнал упаковки маскується спеціальними білками.

З іншого боку, іноді віруси включають до віріонів клітинні РНК, наприклад, тРНК, як це роблять ретровіруси (див. вище). Такі молекули потрапляють до вірусних часток, будучи вже зв'язаними зі складовими вірусного геному.

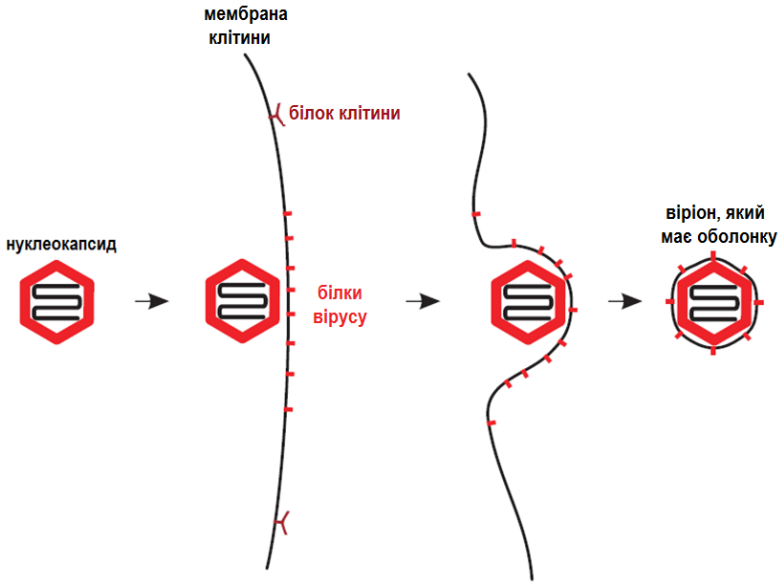
Геноми вірусів мають бути щільно упаковані у віріони невеликого об'єму. Цьому заважає відштовхування між негативно зарядженими фосфатними групами нуклеїнових кислот: воно просто не дозволяє наблизити петлі закрученої молекули одну до одної. Щоб зменшити цей спротив, деякі віруси розміщують удовж нуклеїнової кислоти оснóвні білки, що мають позитивний заряд. У більшості випадків такі білки кодуються самими вірусами, але папіломавіруси і поліомавіруси нейтралізують заряд своєї ДНК звичайними гістонами клітини-хазяїна. В інших випадках негативний заряд нейтралізується позитивно зарядженими катіонами або іншими молекулами, які пакуються в капсид разом з геномом.

Механізм збирання білкових капсидів. В умовах лабораторії деякі віруси демонструють здатність самостійно збирати інфекційні віріони з очищених компонентів (білків і нуклеїнових кислот) за відповідних умов pH у присутності певних іонів. Вважається, що саме так вони чинять і в клітині. Однак здатність до повного самозбирання притаманна аж ніяк не усім вірусам, її демонструють лише власники відносно простих капсидів з невеликою кількістю білків: вірус тютюнової мозаїки, ікосаедричні бактеріофаги з олРНК-геномом (наприклад, *Escherichia virus* MS2) тощо.

Віріони вірусів, що мають складнішу структуру, на кшталт герпесвірусів або бактеріофагів типу «голівка-хвіст», не здатні до самозбирання з очищених компонентів *in vitro*. Для їхнього морфогенезу потрібні умови інфікованої клітини, де віріони будуються в процесі **спрямованого збирання**. У цьому процесі задіяні так звані **каркасні білки** (scaffolding proteins) – молекули, що присутні у віріоні лише під час його будування. Коли потреба у них закінчується, каркасні білки видаляються з прокапсиду. Деякі з них руйнуються за допомогою протеолізу, інші залишаються інтактними і можуть бути використані повторно. Саме каркасні білки визначають розмір і форму голівки фагів, що мають хвіст.

Пікорнавіруси і ретровіруси під час трансляції кодують не окремі функціональні білки, а довгі молекули, поліпротеїни, з яких окремі вірусні білки далі вивільняються протеазами. Внутрішня структура віріонів цих вірусів формується з продуктів розщеплення поліпротеїна вже після того, як віріон відділився від клітини.

Формування мембрани віріонів. Віріони, що мають мембранну оболонку, формують її за допомогою одного з двох механізмів: або модифікують мембрану клітини хазяїна і відбруньковуються разом з нею, або безпосередньо ініціюють синтез нової мембрани навколо нуклеокапсиду. Перша стратегія (Мал. 4.54) властива більшості мембранних вірусів, у т. ч. багатьом еукаріотичним вірусам і тим нечисленним фагам, які мають мембрану (наприклад, L2 з родини *Plasmaviridae*). В більшості випадків вірус утворює оболонку на цитоплазматичній мембрані хазяїна. Спочатку у регіон мембрани, через який буде відбруньковуватися вірус, вбудовуються молекули вірусних білків, переважно – глікопротеїнів. Білки клітини-хазяїна з цієї ділянки витісняються: вірусні білки або відштовхують їх, або ж, маючи високу спорідненість один до одного, просто формують щільні групи, до яких клітинні білки не можуть потрапити. Втім, іноді це таки відбувається, і тоді клітинні білки включаються в оболонку вірусу. Наприклад оболонка ВІЛ завжди містить білки класу II головного комплексу гістосумісності (MHC II), який допомагає вірусу залишатись непоміченим в організмі людини.



Мал. 4.54. Одержання оболонки віріоном через брунькування (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

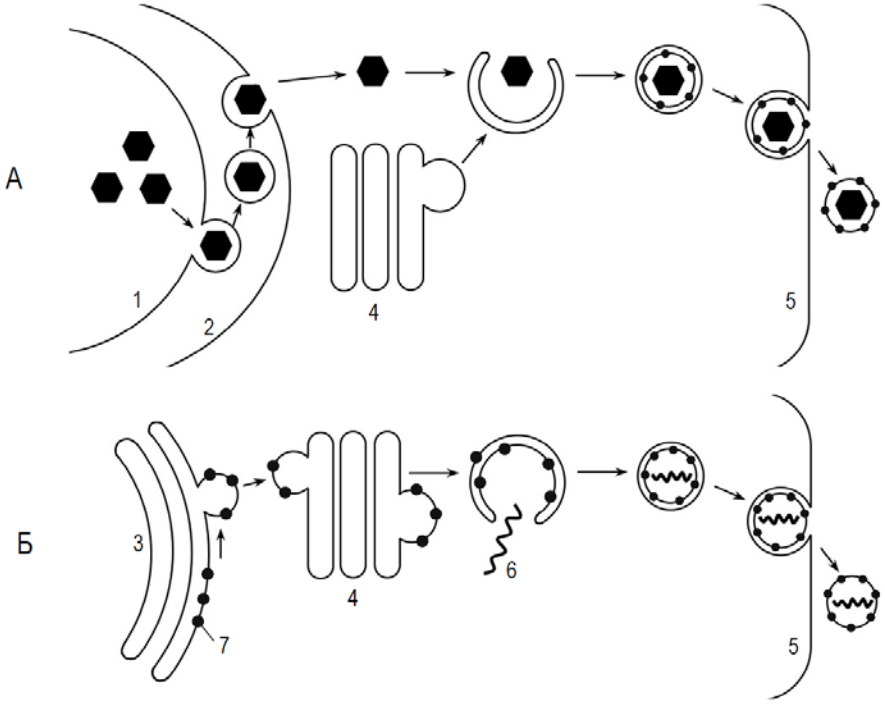
Якщо клітина поляризована, тобто має апікальну і базолатеральну поверхні, брунькування вірусів відбувається лише на одній з цих поверхонь (див. Мал. 4.33). Доведено, що кожний вірусний білок містить певну сигнальну послідовність, яка і направляє його до поверхні, через яку вірус далі брунькуватиметься.

Нуклеокапсиди, що очікують брунькування, накопичуються у безпосередній близькості від ділянок мембрани, що містять вірусні білки. Коли у мембрані накопичується достатньо вірусних глікопротеїнів, білки нуклеокапсидів починають з ними зв'язуватись, ініціюючи процес відбруньковування. У флавівірусів, до яких належить, наприклад, вірус жовтої лихоманки, поверхня нуклеокапсиду безпосередньо взаємодіє з цитоплазматичними ділянками глікопротеїнів мембрани. У деяких інших вірусів на поверхні нуклеокапсиду утворюється шар **білка М**, який має спорідненість до мембрани і зв'язує нуклеокапсид з нею. Роль, подібну білку М, відіграє також білок М1 вірусу грипу А і МА-домен білка Gag ретровірусів.

Через взаємодію меж капсидними та мембранними білками, «вірусна» ділянка мембрани оточує нуклеокапсид і формує навколо нього випин, спрямований у позаклітинний простір.

Нарешті, відбувається відшнуровування «вірусної» ділянки мембрани від цитоплазматичної мембрани. Можливо, певну роль в цьому процесі відіграють клітинні білки.

Деякі оболонкові віруси відбруньковуються не від цитоплазматичної мембрани, а від інших мембран клітини. Так, нуклеокапсид вірусу герпесу формується в ядрі, і починає свій шлях назовні, відбруньковуючись від внутрішньої мембрани ядерної оболонки (Мал. 4.55, А). Оточена мембраною частка певний час перебуває у просторі між ядерними мембранами, але потім її оболонка зливається із зовнішньою мембраною ядра, і нуклеокапсид потрапляє до цитоплазми, втративши мембрану. Далі вірус транспортується до комплексу Гольджі, де пухирці, утворювані цією органелою, оточують його нуклеокапсид, формуючи навколо нього подвійний мембранний чохол. Внутрішній шар цього чохла насичується вірусними білками, зовнішній залишається типово «клітинним» за складом. Це дозволяє цій зовнішній мембрані злитися з цитоплазматичною мембраною клітини, вивільнивши вірусну частку, оточену внутрішньою мембраною пухирця.



Мал. 4.55. *Вивільнення вірусних часток у герпесвірусів (А) і коронавірусів (Б). 1 – внутрішня мембрана ядра; 2 – зовнішня мембрана ядра; 3 – ЕПС; 4 – комплекс Гольджі; 5 – цитоплазматична мембрана; 6 – нуклеокапсид; 7 – вірусні білки.*

Мембранні білки коронавірусів (Мал. 4.55, Б) вбудовуються у мембрану ЕПС, і разом з пухирцями, утворюваними цією органелою, переносяться до комплексу Гольджі. Далі вони відбруньковуються вже від цієї органели, опиняючись на поверхні пухирців. Ці модифіковані вірусом пухирці захоплюють з цитоплазми вірусні капсиди, оточуючи їх таким чином, що навколо капсиду утворюється подвійна мембранна оболонка. Далі, так само як і у герпесвірусів, зовнішня мембрана пухирця зливається з цитоплазматичною мембраною клітини, а внутрішня стає мембраною вільної вірусної частки.

Альтернативна стратегія набуття вірусом мембрани – це її синтез *de novo* (див. наступний розділ).

Лише таким чином формують мембрану віруси, в яких вона залягає під капсидом (*Iridoviridae*) та між зовнішнім та внутрішнім білковими шарами капсиду (фаг PM2 з родини *Corticoviridae*). Але й ті віруси, в яких мембрана знаходиться зовні від капсиду, теж іноді вдаються до цієї стратегії (вірус віспи з родини *Poxviridae*).

Бувають випадки, коли один і той самий вірус використовує обидва підходи до утворення мембран. Так, бакуловіруси (*Baculoviridae*) бесхребетних утворюють два типи віріонів. Перший тип, призначений для інфікування клітин того ж організму, утворює оболонку шляхом брунькування через цитоплазматичну мембрану. Другий тип, призначений для зараження нової особини хазяїна, має оболонку, що закладається навколо нуклеокапсиду усередині ядра клітини.

4.5. Вірусні фабрики

Внутрішньоклітинна стадія розвитку вірусів у багатьох випадках є невидимою для мікроскопістів, адже вона представлена окремими молекулами. В такому разі неможливо зареєструвати присутність вірусу в клітині аж до початку збирання нових вірусних часток. Однак часто інтенсивна реплікація вірусу та використання ним мембран клітинних органел для побудови віріонів призводить до утворення у зараженій клітині добре помітних специфічних структур, як називають вірусними фабриками (ВФ).

Вірусні фабрики – це внутрішньоклітинні структури (включення), які утворюються в клітині під час реплікації вірусу. Утворення вірусних фабрик пов’язане зі значною перебудовою внутрішньоклітинних мембран та цитоскелета, а також накопиченням електронно-щільних скупчень вірусних білків та нуклеїнових кислот. Деякі фабрики є рухливими і зливаються; інші, які є в клітинах рослин, здатні долати великі відстані, щоб досягти незаражених клітин.

У багатьох випадках ВФ є багатокомпонентними і містять функціональні ділянки, які виконують певні ролі у реплікації, збиранні та виході вірусу. Одним з центральних елементів ВФ є вірусні комплекси реплікації (ВКР), де створюються копії геномів вірусів.

Інші елементи клітини-хазяїна, такі як мітохондрії та цитоскелет, часто залучаються до складу вірусних фабрик і встановлюють контакти з ВРК. У більшості випадків конкретна роль цих контактів невідома. Припускається, що мітохондрії забезпечують енергію, необхідну для реплікації вірусу, але прямих доказів цього бракує. Інша можливість полягає в тому, що віруси залучають мітохондрії навколо ВФ, щоб блокувати вроджену противірусну імунну відповідь, опосередковану цими органелами.

Вірусні фабрики можуть бути досить великими, діаметром в кілька мікрон і займати великі внутрішньоклітинні області. ВФ – це динамічні структури, які підтримують зв’язок із внутрішньоклітинними транспортними шляхами для включення основних компонентів та полегшення виходу новоутворених вірусних частинок. Крім того, ВФ змінюються з часом зі збиранням та розбиранням конкретних конструкцій, необхідних для певних етапів репродукції вірусу.

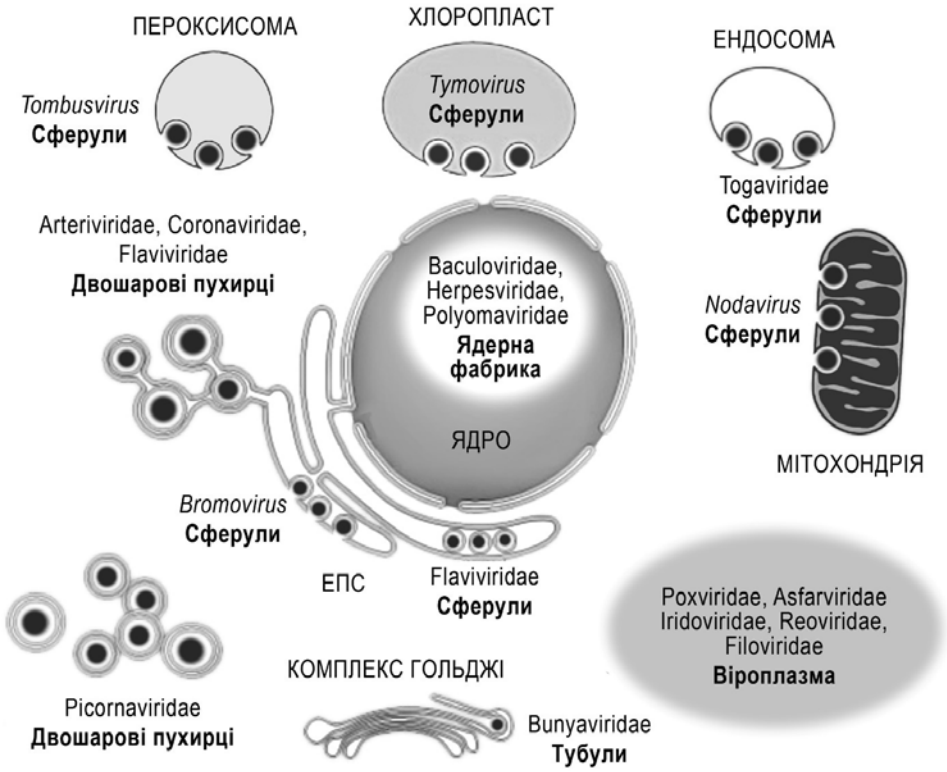
Мембрани вірусних фабрик захищають сайт реплікації і морфогенезу вірусів від нуклеаз і інших клітинних чинників.

Розрізняють декілька типів вірусних фабрик (Мал. 4.56).

Віроплазма – це аморфне скупчення вірусних продуктів у цитоплазмі, де відбувається реплікація та збирання вірусів. Такий тип вірусної фабрики типовий для великих ядерно-

цитоплазматичних ДНК-вірусів (*Poxviridae, Asfarviridae, Iridoviridae, Megavirus, Pandoravirus*), а також деяких длРНК-вірусів (*Reoviridae*) та (–)РНК-вірусів (*Filoviridae*).

Сферула – це сферична інвагінація мембрани діаметром 50–400 нм, в якій відбувається реплікація вірусу. Залежно від виду вірусу, сферули з'являються на мембранах різних органел. *Timoviridae* утворюють їх на хлоропластах, *Tombusvirus* – на пероксисомах, *Nodaviridae* – на мітохондріях, *Togaviridae* – на ендосомах та лізосомах, *Flaviviridae* – на ендоплазматичній сітці.



Мал. 4.66. Вірусні фабрики в еукаріотичній клітині. Джерело: viralzone.expasy.org.

Всі віруси, що утворюють сферули, відрізняються наявністю у циклі репродукції дволанцюгової РНК. Цей продукт активізує клітинний імунітет, тож завданням сферул є приховування длРНК від клітинних рецепторів.

Двошаровий пухирець – це сферична структура діаметром 200–300 нм, оточена двома фосфоліпідними мембранами. Пухирці утворюються з мембран ендоплазматичного ретикулума або комплексу Гольджі шляхом поглинання вірусних молекул звичайним одношаровим пухирцем (див. Мал. 4.55).

Двошарові пухирці характерні для *Picornaviridae, Arteriviridae* та *Coronaviridae*, причому у двох останніх родин ці структури не відділяються від ЕПС, залишаючись пов'язаними з нею мережею проміжних цистерн.

Усі віруси, що утворюють двошарові пухирці, продукують під час реплікації молекули длРНК, тож ці структури, так само як і сферули, є інструментом захисту вірусних РНК від захисних систем клітини.

Тубула – це трубчаста структура, оточена однією мембраною. Вона є похідним комплексу Гольджі і характерна для вірусів з родини *Bunyaviridae*. Тубули розташовані близько до місць збирання та брунькування віріонів, і їх функцією може бути структурне поєднання процесів реплікації та морфогенезу вірусу.

Ядерна вірусна фабрика – це відокремлена ділянка у складі ядра, в якій відбувається реплікація вірусу. Вони характерні для длДНК-вірусів з родин *Baculoviridae, Herpesviridae* та *Polyomaviridae.*

4.5.1. Біогенез вірусних фабрик

Ключовими гравцями в біогенезі ядерних фабрик є вірусні та клітинні білки. З їх допомогою віруси маніпулюють синтезом і внутрішньоклітинними потоками ліпідів, щоб створити мембрани з особливим складом ліпідів і біофізичними властивостями, які ідеально підходять для активації та ефективної роботи макромолекулярних комплексів, які працюють у реплікації генома та збиранні вірусних частинок.

Віруси керують синтезом і потоком ліпідів. Віруси можуть контролювати плинність і пластичність мембрани шляхом десатурації ліпідних хвостів або через накопичення холестеролу. Відповідна плинність мембран має важливе значення для реплікації вірусної РНК, зокрема реплікація вірусу мозаїки брому (родина *Bromoviridae*) потребує ненасичених жирних кислот. Важливо, що більшість неструктурних вірусних білків є гідрофобними і інтегруються в клітинні мембрани, де вони викликають зміни складу та плинності мембрани.

Віруси можуть стимулювати синтез ліпідів de novo. Деякі ДНК та РНК-віруси родин *Hepadnaviridae, Herpesviridae, Retroviridae, Coronaviridae, Flaviviridae* та *Togaviridae* індукують синтез високо впорядкованої тривимірної наноперіодичної структури, яку називають кубічними мембранами (cubic membranes). Вважається, що індуковані вірусом кубічні мембрани пов'язані з метаболізмом холестеролу в клітинах шляхом активації ГМГ-КоА-редуктази, ферменту, що обмежує швидкість синтезу холестеролу. Це модифікує рівні холестеролу у плазматичній мембрані, що, крім іншого, перешкоджає передаванню внутрішньоклітинних противірусних сигналів.

На додаток до синтезу ліпідів, деякі (+)РНК-віруси модифікують клітинні сигнали синтезу ліпідів для створення нових сайтів реплікації. Локальне збільшення фосфатидилінозитол-4-фосфату (PI4P) важливе для реплікації вірусу через утворення мембранних структур, які допускають складання реплікаційних комплексів, одночасно захищаючи вірусний геном від деградації. З цією метою вірус гепатиту С (родина *Flaviviridae*), а також деякі ентеровіруси та пікорнавіруси стимулюють PI4-кінази для утворення PI4P в місцях реплікації. Синтез PI4P необхідний для реплікації цих вірусів, хоча його специфічна функція в реплікаційних комплексах залишається невідомою.

Віруси використовують ліпідні краплі. Ліпідні краплі (ЛК), або ліпідні включення, є багатофункціональними динамічними органелами, які регулюють зберігання та гідроліз нейтральних ліпідів, беруть участь у енергетичному балансі та передаванні сигналів, імунітеті клітин, зберіганні та транспортуванні білків. Вони особливо актуальні для РНК-вірусів. Наприклад, фабрики ротавірусів з родини *Reoviridae* (віроплазми) з'єднуються з ліпідами та білками, пов'язаними з ЛК. Такий тісний зв'язок є необхідним для складання функціональних віроплазм. ЛК відіграють центральну роль у реплікації вірусу гепатиту С. Індукована вірусом мембранна мережа, яка отримана з ендоплазматичної мережі і містить сайти реплікації вірусу, знаходиться в безпосередній близькості від ЛК. Кілька клітинних факторів сприяють націлюванню білків вірусу на ЛК. Вірус використовує ліпопротеїни дуже низької щільності для створення ліповірусних частинок, які дозволяють йому циркулювати в крові. Синтез ліпопротеїнів залежить від постачання ліпідів з ЛК, що робить ці органели необхідними для репродукції вірусу гепатиту С.

Фабрики вірусів рослин є рухливими мембранами. Ліпідні оболонки віріонів має небагато вірусів рослин, але, як і віруси, які вражають тварин, вони використовують ендомембрани клітин для створення фабрик реплікації. Віруси рослин можуть використовувати майже будь-яку мембранну органелу, включаючи хлоропласти, пероксисоми, апарат Гольджі, мітохондрії та ендоплазматичну мережу. Деякі віруси рослин демонструють надзвичайну гнучкість у перенацілюванні своїх сайтів реплікації на альтернативні мембрани. Наприклад, томбусвіруси (родина *Tombusviridae*) можуть перемикати свій сайт реплікації і організацію вірусної фабрики з пероксисом на мітохондрії або на мембрани ендоплазматичної мережи.

Добре відомою характеристикою фабрик вірусів рослин є рухливість. Вони використовують мотори актоміозину для транспортування реплікованої вірусної РНК і везикул з ВРК до плазмодесм. У плазмодесмах транспортні білки вірусів сприяють перенесенню везикул з сайтами реплікації до суміжних клітин. Це забезпечує швидку і ефективну доставку вірусної РНК в неінфіковані клітини.

4.6. Вихід віріонів та їхнє перебування поза клітиною

Існує дві основні стратегії виходу вірусу з клітини хазяїна. Перший полягає у вивільнені через її мембрану (див. Мал. 4.54, 4.55). Другий вимагає лізису, тобто руйнування клітини.

Лізис клітини-хазяїна потребує від вірусу спеціальних зусиль. Чимало бактеріофагів продукують ферменти, які розривають зв'язки у молекулах пептидоглікану, що утворюють клітинну стінку бактерії, інші – інгібують ферменти, необхідні для синтезу пептидоглікану. Позбавлена цілісної клітинної стінки, бактерія буквально «лопається» і гине.

Унікальний механізм виходу з клітин мають нитчасті фаги з родини *Inoviridae*. Одноланцюгова ДНК такого фага усередині клітини укрита білком g5p, який не є білком капсиду. Капсидний білок g8p тим часом синтезується у цитоплазмі і вбудовується в мембрану. Третій вірусний білок, g4p, утворює канал у клітинній мембрані. Саме через цей канал і виходить назовні вірусна ДНК. Під час виходу, ДНК залишає в цитоплазмі білки g5p і, вже опинившись поза клітиною, одягається капсидними білками g8p, що чекають на неї на зовнішній поверхні мембрани.

Переважна більшість вірусів тварин, які не мають оболонки, вивільняються після лізису клітини, але як саме гинуть клітини тварин зараз залишається достеменно невідомим. Встановлено, що це не пов'язано з активністю будь-якого літичного ферменту, як у бактеріофагів і бактерій. В інших випадках вивільнення вірусу досягається без лізису клітин; натомість віруси проникають у цитоплазматичну везикулу, яка потім зливається з плазматичною мембраною і вивільняє свій вміст назовні.

Віруси рослин, як правило, не виходять з цитоплазми взагалі, адже поза цитоплазматичною мембраною на них ще чекає клітинна стінка, яку вони нездатні перетнути. Тому рослинні віруси або поширюються через плазмодесми, або очікують, поки вміст клітини з новими вірусними частками не буде проковтнутий рослиноїдною твариною, наприклад, попелицею або нематодою.

Після виходу з клітини, більшість віріонів залишаються інертними доти, поки не проникнуть в нову клітину. Проте відомо декілька випадків, коли дозрівання віріонів продовжується після виходу з клітини. Наприклад, як ми згадували вище, у ретровірусів розрізання поліпротеїну починається в процесі брунькування і завершується, коли віріон вже покинув клітину. Іншим прикладом є фаг з родини *Ampullaviridae*, що інфікує архею *Acidianus*

convivator. Його віріон має лимоноподібну форму з двома хвостами, і ці хвости розвиваються вже після виходу віріона з клітини-хазяїна.

Загальна кількість віріонів, що можуть сформуватися у одній зараженій клітині, значно варіює. Так, загальна продуктивність фага Т4 (родина *Myoviridae*) складає 200 віріонів на клітину, тоді як у пікорнавірусів вона може досягати 100000.

4.7. Дефектні вірусні частинки

Під час взаємодії вірусу з клітиною можуть утворюватися так звані **дефектні віруси**. Складові, необхідні для автономної реплікації, у їхньому геномі або первинно відсутні, або втрачені через мутацію. Для реплікації таких вірусів необхідна присутність іншого вірусного геному.

Виділяють 4 класи дефектних вірусів:

- дефектні інтерферуючі частки;
- дефектні геноми, інтегровані в хромосому клітини хазяїна;
- псевдовіріони;
- умовно-дефектні вірусі.

Дефектні інтерферуючі частинки (ДІ-частинки) є делеційними мутантами, що втратили частину геному батьківського вірусу. Делеція може досягати 90% їхнього геному (!), але навіть за таких жахливих пошкоджень вірус іноді здатен зберегти біологічну активність. Для цього лише потрібно, щоб ту ж саму клітину одночасно заразив споріднений з ДІ-частинкою **вірус-помічник**, або **хелперний вірус**. Під час такої взаємодії, ДІ-частинки використовують продукти генів помічника, здійснюючи з ним щось на кшталт спільного циклу репродукції. ДІ-частинки можуть утворитися під час реплікації будь-якого вірусу. Фактично, вони є просто пошкодженим варіантом нормального вірусу.

Дефектні геноми, інтегровані в хромосому клітини хазяїна. У вірусів, що інтегрують свої геноми до геномів хазяїна, також трапляються мутації, що призводять до вбудовування до клітинної хромосоми дефектного вірусного геному. Як правило, такі дефектні геноми просто «мовчать». Але за певних умов вони можуть бути активовані, і тоді їхня експресія вплине на функціонування клітини хазяїна. Активовані дефектні геноми можуть вимикати гени клітини-хазяїна або сприяти їхній експресії, надавати клітині нові генетичні властивості, усувати або переміщати уздовж геному регуляторні елементи і навіть сприяти рекомбінаційним змінам у ДНК клітини-хазяїна.

В лабораторних умовах вченим вдалося примусити сплячі дефектні геноми до експресі, використовуючи як стимул мітоміцин та ультрафіолет. У результаті, у культурах бактерій, ніби не заражених фагами, вдалося спостерігати утворення фрагментів вірусу: порожніх голівок, хвостових відростків тощо.

Псевдовіріони – це вірусні частки, що замість геному вірусу містять нуклеїнову кислоту клітини хазяїна. Зазвичай вони виникають у прокаріотів, цитоплазма яких містить *плазміди* – короткі кільцеві ДНК з одним або декількома бактерійними генами. Утворення псевдовіріонів має для прокаріотів величезне значення, адже дозволяє їм обмінюватися між собою плазмідами, набуваючи нових властивостей, наприклад стійкості до антибіотиків. Цей феномен відомий як **вірусна трансформація**. Існує припущення, що, принаймні, для деяких вірусів псевдовіріони є первинним станом: бактерії могли утворити їх, щоб обмінюватися

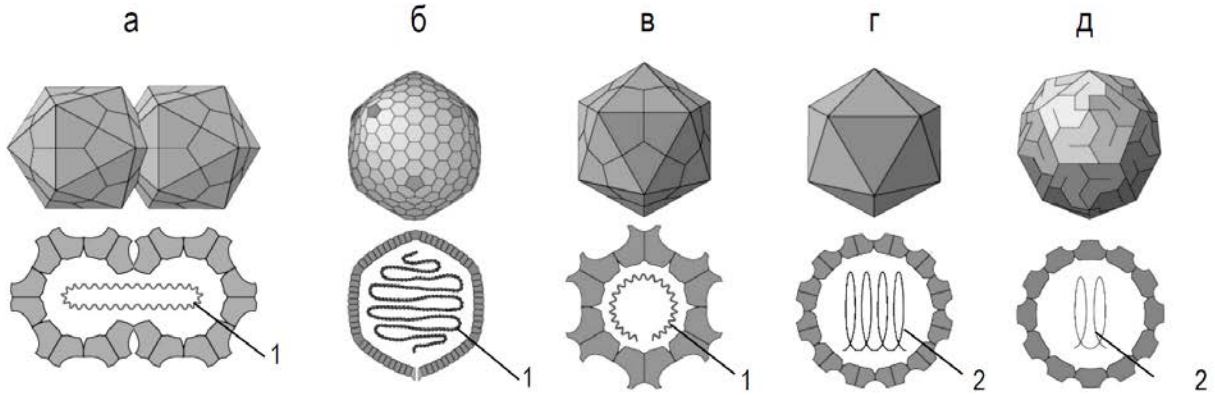
генами, і лише згодом з плазмід виникли власне вірусні геноми, що почали експлуатувати систему трансформації, не надаючи бактеріям жодних переваг.

У еукаріотів пседовіріони також відомі (їх утворюють, наприклад, поліомавіруси), але їхнє еволюційне значення не досліджене.

Умовно-дефектні віруси – це мутантні віруси, дефектні лише в певних умовах. Прикладами є *ts-мутанти* (температурно-чутливі мутанти) та *hr-мутанти* (мутанти за спектром хазяїв), які у сприятливих для них умовах функціонують як звичайні віруси.

4.8. Субвірусні частки

Субвірусні частки, або **субвірусні агенти** (Мал. 4.57) – інфекційні агенти, відтворення яких певною мірою залежить від інших, «повноцінних» вірусів. Фактично, вони є паразитами вірусів, тобто паразитами другого (а іноді й вищого) порядку; деякі з них помітно зменшують продуктивність помічника, за що були названі **вірофагами**. Однак відомі і випадки, коли субвірусні частки, навпаки, сприяють репродукції вірусу-помічника і посилюють прояви спричиненої ним інфекції.



Мал. 4.57. Приклади субвірусних часток: а – альфасателіт; б – вірофаг Спутник; в -- аденоасоційований депендопарвовірус; г – сателіт вірусу некрозу тютюну; д – сателітна РНК, асоційована з неповірусом. 1– ДНК, 2 – РНК. Джерело: viralzone.expasy.org.

На відміну від дефектних вірусів, субвірусні частки мають стабільну, відтворювану у кожному поколінні структуру, що дозволяє розглядати їх як таксономічні одиниці, присвоювати їм латинські назви і, принаймні в деяких випадках, вказувати їхнє систематичне положення (яке, однак, визначається не характером взаємодії з вірусом-помічником, а складом геному, як і у звичайних вірусів). Серед субвірусних часток відомі представники 1–5 класів за класифікацією Балтімора.

За рідкісними винятками, субвірусні частки не споріднені з вірусами-помічниками і являють собою самостійні біологічні сутності. Однак у тих випадках, коли субвірусна частка користується капсидними білками супутнього вірусу, відрізнити її віріон від віріону помічника за зовнішньою будовою абсолютно неможливо.

Класифікація субвірусних часток знаходиться у процесі становлення і дещо різниться у різних джерелах. В цілому, серед них виділяють, як мінімум, три самостійні групи:

– сателітоподібні агенти;

– сателітні віруси;

– сателітні нуклеїнові кислоти, зокрема вірусоїди.

Відмінності мі цими групами наведені у табл. 4.2.

Таблиця 4.2. Основні групи субвірусних часток.

	Здатність до реплікації за відсутності вірусу-помічника	**Здатність до утворення капсиду за відсутності вірусу-помічника**	**Здатність до кодування білків**
Сателітоподібні агенти	+	–	+
Сателітні віруси	–	+	+
Сателітні нуклеїнові кислоти	–	–	+/–

Сателітоподібні агенти **–** це субвірусні частки, що здатні до автономної реплікації в клітині, але потребують присутності вірусу-помічника для побудови капсиду. Їхні геноми мають довжину 1100–3000 нуклеотидів та можуть складатися як з ДНК, так і з РНК. У деяких керівництвах сателітоподібні агенти розглядаються як підгрупа сателітних нуклеїнових кислот, з якими їх зближує нездатність синтезувати капсидні білки.

До сателітоподібних агентів належать:

− **альфасателіти** (родина *Alphasatellitidae*). Асоційовані з вірусами рослин з родин *Geminiviridae* і *Nanoviridae*. Геном утворений одноланцюговою кільцевою ДНК. Він має довжину 1100–1380 нуклеотидів і схожий на фрагмент геному нановірусів. Цей геном кодує лише один білок, **Rep**, що відіграє допоміжну роль під час реплікації сателітної ДНК, але не має полімеразної активності.

− **вірус гепатиту D** (рід *Deltavirus*, родина не визначена). Асоційований з вірусом гепатиту В. Геном утворений одноланцюговою кільцевою (–)РНК, має довжину 1700 нуклеотидів. Особливості реплікації цього інфекційного агента розглянуті у розд. 4.3.4.

− **РНК, асоційовані з полеровірусами** (таксономія не визначена). Асоційовані з вірусами рослин з роду *Polerovirus* (родина *Luteoviridae*). Геном представлений одноланцюговою (+)РНК довжиною 2800–3000 нуклеотидів. Він кодує два білки, необхідні для реплікації.

Сателітні віруси, або віруси-сателіти – це субвірусні частки, що здатні синтезувати капсидні білки (один або декілька), але потребують присутності вірусу помічника для здійснення реплікації. Сателіти мають дрібні капсиди ікосаедричної, шипуватої, подвійно-шипуватої форми, або типу голівка-хвіст. Прикладами вірусів-сателітів є:

− **вірофаг Спутник** (рід *Sputnikvirus* родини *Lavidaviridae*). Асоційований з гігантськими вірусами роду *Mimivirus*, що паразитують на протистах. Геном утворений кільцевою длДНК довжиною 17.2–18.3 тис. пар основ, містить 20–21 ORF що кодують як структурні, так і регуляторні білки;

− **аденоасоційований депендопарвовірус А** (рід *Dependoarvovirus* родини *Parvoviridae*). Асоційований з аденовірусами (родина *Adenoviridae*). Геном утворений лінійною олДНК довжиною 3700 нуклеотидів, містить 9 ORF, що кодують як структурні, так і регуляторні білки;

− **сателіт вірусу некрозу тютюну, STNV** (рід *Albetovirus*, родина не визначена). Асоційований з вірусом некрозу тютюну (родина *Tombusviridae*). Геном утворений лінійною ол(+)РНК довжиною 1200 нуклеотидів, містить єдину ORF, що кодує єдиний білок капсиду.

Сателітні нуклеїнові кислоти**.** На відміну від вірусів-сателітів, сателітні нуклеїнові кислоти (СНК) кодують лише деякі регуляторні білки, або не кодують білків взагалі. Це

наближує їх до віроїдів, але на відміну від останніх, вони (1) не здатні до самостійної реплікації і (2) утворюють справжні віріони, капсидні білки яких кодуються вірусом-помічником. За структурою СНК поділяються на п’ять груп:

– сателітні ДНК;

– дволанцюгові сателітні РНК;

– великі лінійні одноланцюгові РНК;

– малі лінійні одноланцюгові РНК;

– малі кільцеві одноланцюгові РНК (вірусоїди).

Сателітні ДНК мають кільцеві одноланцюгові ДНК-геноми довжиною 750– 1350 нуклеотидів. До цієї групи належать:

− **бетасателіти** (рід *Betasatellite* родини *Tolecusatellitidae*) асоційовані з гемінівірусами (родина *Geminiviridae*), паразитами рослин. Геном кодує **білок βCl**, що є супресором імунної відповіді рослини-хазяїна та не пов’язаний з реплікацією сателіта;

− **дельтасателіти** (рід *Deltasatellite* родини *Tolecusatellitidae*) також асоційовані з гемінівірусами. Геном не кодує білків і можливо являє собою дефектний геном бетасателітів, який, однак, успішно реплікується за допомогою вірусу-помічника.

Дволанцюгові сателітні РНК мають геноми довжиною 500–1800 нуклеотидів. До цієї групи належать:

− **стателітні РНК, асоційовані з тотавірусами** (родина *Totiviridae*), наприклад сателіт M1 вірусу L-A *Saccharomyces cerevisiae*. Віруси-помічники вражають гриби та протистів. Сателіт кодує білок **препротоксин**, який є летальним для виду гриба-хазяїна, якщо його клітина не містить самого сателіту. Це дає конкурентні переваги інфікованим клітинам і сприяє поширенню СНК;

− **стателітні РНК, асоційовані з партітівірусами** (родина *Partitiviridae*), наприклад сателіт вірусу F *Penicillium stoloniferum*. Віруси-помічники вражають рослини та гриби. Вони не кодують функціональних білків, тож їхній вплив на помічника та хазяїна залишається невідомим.

Великі лінійні одноланцюгові сателітні РНК мають (+)РНК-геном розміром 800–1500 нуклеотидів. Вони кодують неструктурний білок, який, принаймні у декількох випадках, потрібен для реплікації сателітної РНК, але не є полімеразою. Віруси-помічники цих СНК вражають рослини. До цієї групи належать:

− **сателітні РНК, асоційовані з неповірусами** (рід *Nepovirus* родини *Secoviridae*), наприклад великий сателіт вірусу мозаїки резухи;

− **сателітні РНК, асоційовані з потексвірусами** (рід *Potexvirus* родини *Alphaflexiviridae*), наприклад сателіт вірусу мозаїки бамбука.

Малі лінійні одноланцюгові сателітні РНК. Ці сателіти мають геном 200– 700 нуклеотидів і не кодують жодних білків. Геномна РНК має складну вторинну структуру, до 70% її нуклеотидів комплементарно зв’язані одні з одними. Віруси-помічники цих СНК вражають рослини. До групи належать:

− **сателітні РНК, асоційовані з томбусвірусами** (родина *Tombusviridae*), наприклад сателіт вірусу крапчастої зморшкуватості артишоку.

− **сателітні РНК, асоційовані з бромовірусами** (родина *Bromoviridae*), наприклад сателіт вірусу мозаїки огірка.

Малі кільцеві одноланцюгові сателітні РНК, або вірусоїди. Ці інфекційні агенти мають геноми довжиною 220–450 нуклеотидів, які за структурою дуже нагадують РНК віроїдів (власне, звідси походить друга назва цих СНК, вірусоїди, яку, однак, останнім часом використовують все менше).

Геномна РНК вірусоїдів завжди є кільцевою у цитоплазмі. Але під час перебування у капсиді вона може набувати і лінійної форми.

Так само, як і віроїди, вірусоїди мають каталітичну активність і здатні формувати не лише молотоголовий, а й **шпильчастий рибозим** (hairpin ribozyme). Однак їхня реплікація залежить від кодованого вірусом-помічником РНК-репліказного комплексу. Віруси-помічники цих СНК вражають рослини. До цієї групи належать:

– **вірусоїди, асоційовані з неповірусами** (рід *Nepovirus* родини *Secoviridae*), наприклад сателіт вірусу кільчастої плямистості тютюну;

– **вірусоїди, асоційовані з собемовірусами** (рід *Sobemovirus* родини *Solemoviridae*), наприклад сателіт перехідно смугастості люцерни.

4.8. Взаємодії між вірусами під час змішаної інфекції

Як у природних, так і в експериментальних умовах одна клітина може бути заражена декількома різними вірусами, що належать до різних штамів, видів, родин або навіть класів. Під час такої **змішаної інфекції** вірусні геноми та їхні продукти можуть різним чином взаємодіями між собою.

У випадку взаємодії геномів у них виникають зміни, які можуть успадковуватися; такі взаємодії у вітчизняній літературі часто звуть **генетичними**. До них належать множинна реактивація, рекомбінація, пересортування генів, крос-реактивація та гетерозиготність.

Під час взаємодії білкових продуктів вірусних генів можуть виникати фенотипічні зміни, які в подальшому не успадковуються. Такі взаємодії звуть **негенетичними.** До них належать комплементація, інтерференція та фенотипічне змішування.

4.8.1. Взаємодії між геномами вірусів

Множинна реактивація. Якщо вірус з пошкодженим геномом проникає до клітини, він, як правило, реплікуватися не буде. Однак цілком можлива ситуація, коли декілька пошкоджених вірусів (наприклад, ДІ-часток, див. вище) можуть допомогти один одному, адже продукт пошкодженого гена, відсутній у одного вірусу, може бути замінений на аналогічний продукт другого. Під час реплікації геномів цих вірусів між пошкодженими геномами може відбуватися рекомбінація, і разом можуть зібратися непошкоджені частини геномів. Завдяки цьому у клітині може з’явитися повноцінний неушкоджений геном і повноцінні віріони!

Рекомбінація – це обмін генетичним матеріалом між декількома вірусами. Вона реалізується у формі обміну цілими генами (**міжгенна рекомбінація**) або ділянками одного і того ж гена (**внутрішньогенна рекомбінація**).

Пересортовування генів (реасортація) – це обмін цілими сегментами геному. Він відбувається між спорідненими вірусами, геном яких представлений декількома молекулами нуклеїнової кислоти (наприклад, віруси грипу). Форми вірусів, що утворюються шляхом пересортовування генів, називають **реасортантами**. Штучно одержані реасортанти вірусу грипу широко використовуються для одержання вакцин.

Перехресна реактивація (крос-реактивація) – це рекомбінантний обмін фрагментами геному між двома дефектними вірусами. Його метою є заміна власної дефектної ділянки на цілісну ділянку, скопійовану в іншого вірусу. В результаті дочірні віруси набувають властивостей обох батьків.

Гетерозиготність. Під час спільного культивування декількох типів вірусів іноді утворюються віріони, що містять одночасно два різних геноми (щоправда, один з них може бути представлений там лише частково). Цікавим різновидом гетерозиготності є ситуація, коли в одну ліпідну оболонку потрапляє декілька різних нуклеокапсидів. В цьому разі вірус можна назвати поліплоїдним, а якщо геноми нуклеокапсидів походять від різних батьків, то навіть гетероплоїдним або аллополіплоїдним. Гетерозиготність значно утрудняє генетичний аналіз вірусів, оскільки її результат практично складно відрізнити від результату рекомбінації.

4.8.2. Взаємодії між генними продуктами вірусів

Комплементація є формою взаємодії між вірусами, під час якої, за умови спільного зараження клітини, стимулюється репродукція одного або обох партнерів. Генотипи вірусів в цьому випадку не змінюються. Просто один вірус забезпечує партнера своїми структурними або неструктурними білками, як це відбувається під час взаємодії вірусу-сателіта та його помічника. Комплементація може бути двосторонньою і односторонньою. Під час **двосторонньої комплементації** кожен з партнерів не здатний до самостійної реплікації, тож вони можуть реплікуватися лише разом. В разі **односторонньої комплементації** один з партнерів забезпечує іншого продуктом, якого йому недостає. Комплементація спостерігається як між спорідненими, так і між неспорідненими вірусами.

Фенотипічне змішування – це виникнення віріонів, у яких змішані ознаки двох та більше вірусів. Подібне відбувається, коли геном одного вірусу випадково потрапляє до чужого капсиду, або коли нуклеокапсид потрапляє до чужої ліпідної мембрани.

Інтерференція вірусів – це взаємодія між вірусами, під час якої відбувається пригнічення репродукції одного вірусу іншим. Інтерференція може бути обумовлена конкуренцією вірусів за клітинні рецептори, ферменти і рибосоми, виснаженням запасу потрібних обом вірусам метаболітів, індукцією одним вірусом захисних систем, до яких чутливий інший вірус. Прикладом інтерференції є також вплив на віруси їхніх сателітів-вірофагів.

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

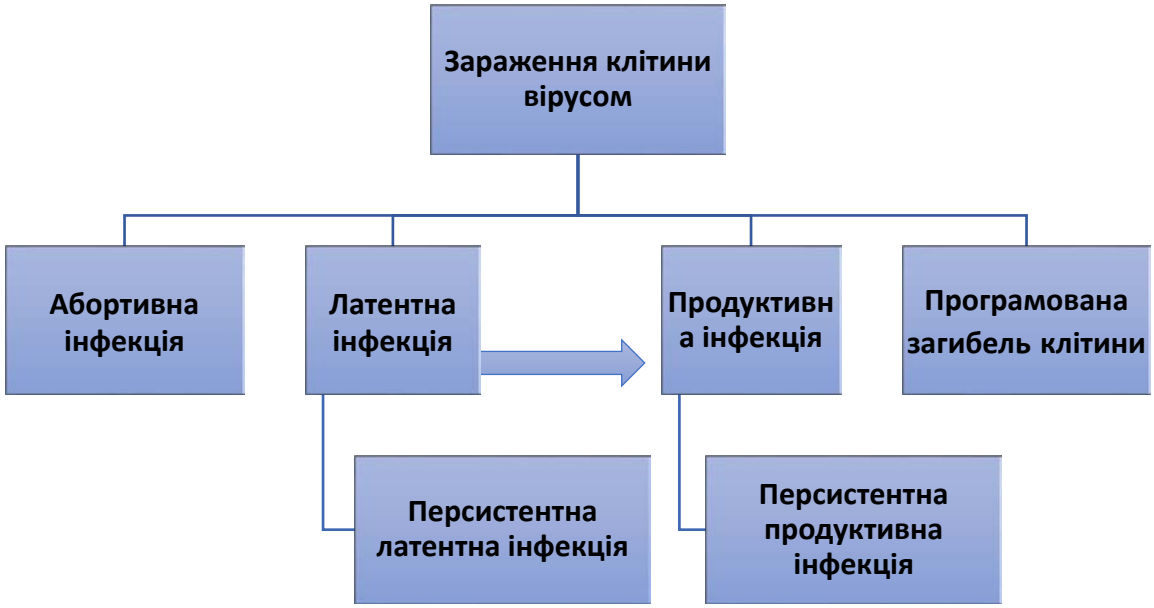
- розуміти особливості взаємодії віріонів з клітинними рецепторами
- знати механізми входу вірусів до клітин вірусів тварин і бактерій
- знати загальні механізми перебігу транскрипції і трансляції у клітинах еукаріотів і прокаріотів та особливості використання цих процесів вірусами
- знати головні особливості транскрипції і реплікації РНК-геномних вірусів і віроїдів
- знати загальні механізми реплікації ДНК в живих організмах і способи вирішення вірусами загальнобіологічних проблем, що виникають під час цього процесу
- знати особливості морфогенезу вірусів
- мати уявлення про значення вірусних фабрик у репродукції вірусів і загальні особливості утворення цих структур
- розрізняти форми дефектних вірусів та субвірусних часток
- знати головні механізми взаємодії між геномами і генними продуктами вірусів під час змішаної інфекції

РОЗДІЛ 5. ВЗАЄМОДІЯ ВІРУСУ З ОРГАНІЗМОМ

У цьому розділі ми обговоримо взаємодію вірусів з організмом. Це може бути одноклітинний організм, такий як бактерія, або багатоклітинний організм людини. Якщо вірус спроможний заразити окрему клітину або певну кількість клітин організму, починається *інфекційний процес*. В залежності від багатьох внутрішніх і зовнішніх чинників, зараження вірусом клітини або клітин організму може мати різні наслідки.

5.1. Наслідки зараження вірусом хазяїна

У розділі 4 були обговорені деталі циклу реплікації вірусів, який починається зараженням клітини і завершується виходом з неї вірусного потомства. Коли вірусна інфекція призводить до такого результату, вона називається **продуктивною** (Мал. 5.1). Під час вивільнення віріонів клітина хазяїна може зазнати лізису або залишитися живою. В останньому випадку віріони будуть вивільнятися з неї впродовж певного періоду, який може бути коротким, як у випадку ВІЛ, або тривалим, як у випадку гепатиту В.



Мал. 5.1. *Можливі наслідки взаємодії вірусу з клітиною.*

В деяких випадках результат вірусної інфекції не є продуктивним. Цьому може бути декілька причин:

– інфекція може стати **латентною** (від лат. *latentis* – прихований, невидимий), з геномом вірусу, що зберігається певний час або впродовж усього життя клітини-хазяїна і, можливо, навіть передається дочірнім клітинам під час поділу;

– інфекція може бути **абортивною** (від лат. *abortivus* – передчасний, недоношений), протягом якої не встановлюється ані продуктивна, ані латентна інфекція. Клітина залишається живою, а геном вірусу в ній зникає. Абортивна інфекція може спостерігатися, наприклад, коли вірус заражає клітини, які нездатні підтримувати його реплікацію. Одним з випадків абортивної інфекції є зараження клітини дефектним вірусом з геномом, що мутував. Такий вірус не здатний пройти в клітині повний цикл реплікації;

– внаслідок активації антивірусного захисту, в зараженій клітині може бути індукована **програмована загибель клітини**[1], що, вочевидь, не дозволить вірусу завершити цикл реплікації.

Деякі віруси зберігаються в своїх хазяях впродовж тривалого часу, іноді усе життя. Таку вірусну інфекцію називають **персистентною** (лат. *persisto* – постійно перебувати, уперто триматися). В окремих випадках персистентна інфекція є продуктивною, наприклад, під час зараження ВІЛ. У інших випадках персистенція вірусу може набувати форми латентності, що лише згодом може знову перейти у форму продуктивності, як відбувається у випадку зараження вірусами герпесу. Тривале зараження деякими вірусами може призвести до розвитку ракової пухлини у хазяїна.

Деякі бактеріофаги, включаючи нитчасті фаги, ініціюють персистентну продуктивну інфекцію клітин їх бактерій-хазяїв. За сприятливих умов, клітини бактерій залишаються живими впродовж тривалого часу, виділяючи віріони.

Наслідок зараження вірусом з точки зору хазяїна може варіювати від нешкідливості на одному кінці шкали, через хвороботворну дію різного ступеня до загибелі хазяїна на іншому кінці шкали. Наслідок вірусної інфекції залежить від взаємодії різноманіття особливостей хазяїна, самого вірусу і чинників середовища.

В ході еволюції у організму, який є хазяїном для вірусу, розвивається антивірусний захист. Проте вірус також міняє свою тактику нападу. Взаємодія між вірусом і його хазяїном часто є тим, що називають гонкою озброєнь, і вірус у ході еволюції виробляє свої контрзаходи проти захисту хазяїна.

5.2. Продуктивна інфекція

Для своєї реплікації, віруси повинні отримати доступ до пермісивних (від англ. permissive – який дозволяє, терпимий, поблажливий) клітин, тобто сприйнятливих до вірусу клітин хазяїна, здатних забезпечити реплікацію вірусів. Для вірусів, які зв'язуються з поверхневими рецепторами клітини, першим кроком в зараженні є пошук відповідного рецептора, з яким вірус може зв'язатися. Окрім того, клітина повинна або містити усі необхідні вірусу компоненти, або вірус має бути здатний їх індукувати. До таких компонентів належать зокрема клітинні білки, наприклад, фактори транскрипції і ферменти.

Деякі віруси обмежені вузьким колом пермісивних клітин, наприклад, віруси гепатиту В вражають майже виключно гепатоцити. Інші віруси менш обмежені типом клітин і можуть розмножуватися навіть в цілковито неспоріднених хазяях, наприклад, в рослині і комасі.

Деякі віруси еукаріотів потребують, щоб клітина хазяїна була в певній фазі клітинного циклу. Наприклад, ретровірусам необхідно потрапити в ядро клітини, і більшість з них можуть це зробити лише тоді, коли оболонка ядра руйнується під час мітозу. Парвовіруси містять ДНК, і для реплікації свого геному використовують ферменти хазяїна. Відповідно, їм потрібні клітини, в яких ці ферменти є присутніми, тобто клітини у фазі S клітинного циклу.

[1] У науковій літературі програмовану (запрограмовану) загибель клітин часто синонімізують з апоптозом. Але це невірно, адже апоптоз є лише однією з форм запрограмованої загибелі клітин; окрім нього існують некроптоз, піроптоз, автофагія тощо, і ці процеси можуть відігравати роль у противірусному захисті. І, наприклад, у рослин запрограмована загибель клітин відома, а апоптоз – ні.

Наступною важливою вимогою до пермісивних клітин є відсутність у них захисту від вірусу, або вірус має бути здатним здолати захист клітини.

Таким чином, для успішного зараження клітини вірус повинен доставити в неї свій геном, геном повинен залишитися інтактним і вірус повинен покласти край усім спробам хазяїна припинити його реплікацію.

Успішна експресія вірусних генів, реплікація вірусних геномів і виробництво вірусних частинок залежать від метаболізму клітини-хазяїна, роботи шляхів передавання сигналів і систем внутрішньоклітинного транспорту. Отже, продуктивна вірусна інфекція неминуче перенаправляє і перепрограмує нормальні молекулярні, біохімічні і фізіологічні процеси клітини-хазяїна, і може призвести до загибелі інфікованої клітини протягом кількох годин або днів. Тут ми представимо комплексний опис клітинних реакцій при продуктивній інфекції, щоби проілюструвати помітний і загалом незворотний вплив вірусної інфекції на клітину-хазяїна. Хоча віруси мають на диво різноманітні механізми перехоплення контролю над молекулярними і фізіолого-біохімічними процесами у клітині, які неможливо узагальнити, але є й загальні для вірусів особливості таких подій.

5.2.1. Зміни у сигнальних шляхах

Кожна клітина, чи то окремий одноклітинний організм (наприклад, бактерії, археї та найпростіші), чи то клітина багатоклітинного організму, повинна відчувати своє середовище та відповідним чином реагувати на його зміни. Клітини також мають механізми для сприйняття внутрішніх сигналів, які надають інформацію про потребу в конкретних метаболітах, цілісності геному або наявності мікробів. У багатоклітинних організмів координація властивостей і поведінки окремих клітин з властивостями сусідів або більш віддалених клітин є критичною для успішної диференціації та розвитку, а також для підтримки гомеостазу між функціонально спеціалізованими органами і тканинами. Таким чином, клітини мають складні механізми сприйняття, які відстежують інформацію про зовнішнє та внутрішнє середовище та, за необхідності, ініціюють відповідь на неї. Ці *шляхи передавання сигналу* керують та інтегрують кожен аспект поведінки клітини, від швидкості метаболічних реакцій до рішень рухатися в певному напрямку, поділу чи диференціації.

У шляхах передавання сигналу рецептор виявляє інформаційну молекулу, таку як метаболіт, гормон тощо, і передає інформацію про це далі шляхом активації наступних елементів шляху передавання сигналу. У необхідних випадках сигнал посилюється (ампліфікація сигналу). Ампліфікація досягається дією протеїнкіназ, які каталізують послідовне фосфорилювання та активацію додаткових кіназ або інших субстратів, а також синтезом невеликих молекул, які діють як вторинні месенджери, наприклад, циклічного АМФ і фосфоінозитол-3-фосфату (PI3). У підсумку сигнал передається на мішень, зазвичай білок, наприклад фактор транскрипції, який активується і обумовлює необхідну відповідь.

Багато з численних шляхів передавання сигналу клітин ссавців реагують на більш ніж один вхід, регулюють численні молекулярні процеси та взаємодіють один з одним. Шлях фосфоінозитол-3-кінази і протеїнкінази B (Pi3k-Akt шлях) є гарним прикладом цього: він отримує сигнали від багатьох мембранних рецепторів і регулює багато аспектів клітинного метаболізму, проліферації та виживання як безпосередньо, так і через зв’язки з іншими шляхами. Кінази Pi3k і Akt є фокусними точками або концентраторами в мережі сигналізації з кількома входами і виходами.

Модуляція вірусами загальних шляхів передавання сигналу. Практично для усіх вірусів є загальними процеси, які ми обговорювали у розділі 4 (проникнення в клітину-хазяїна, трансляція вірусних мРНК, реплікація вірусного геному тощо). Отже, не є несподіваним, що той самий шлях передавання сигналу може модулюватися в клітинах, інфікованих вірусами, що належать до різних родин. Одним із прикладів цього є активація регулятора транскрипції NF-κB у клітинах, інфікованих кількома вірусами з ДНК-геномами та деякими ретровірусами для полегшення транскрипції матриць вірусної ДНК. Проте продукти генів інших вірусів також часто блокують цей шлях, оскільки NF-κB є критичним для активації вродженого імунного захисту.

Передавання сигналів через згадані вище кінази Pi3k і Akt регулює багато клітинних процесів і модулюється після інфікування великою кількістю вірусів. Тому на прикладі цього шляху ми проілюструємо різноманітний вплив вірусної інфекції на один каскад передавання сигналу.

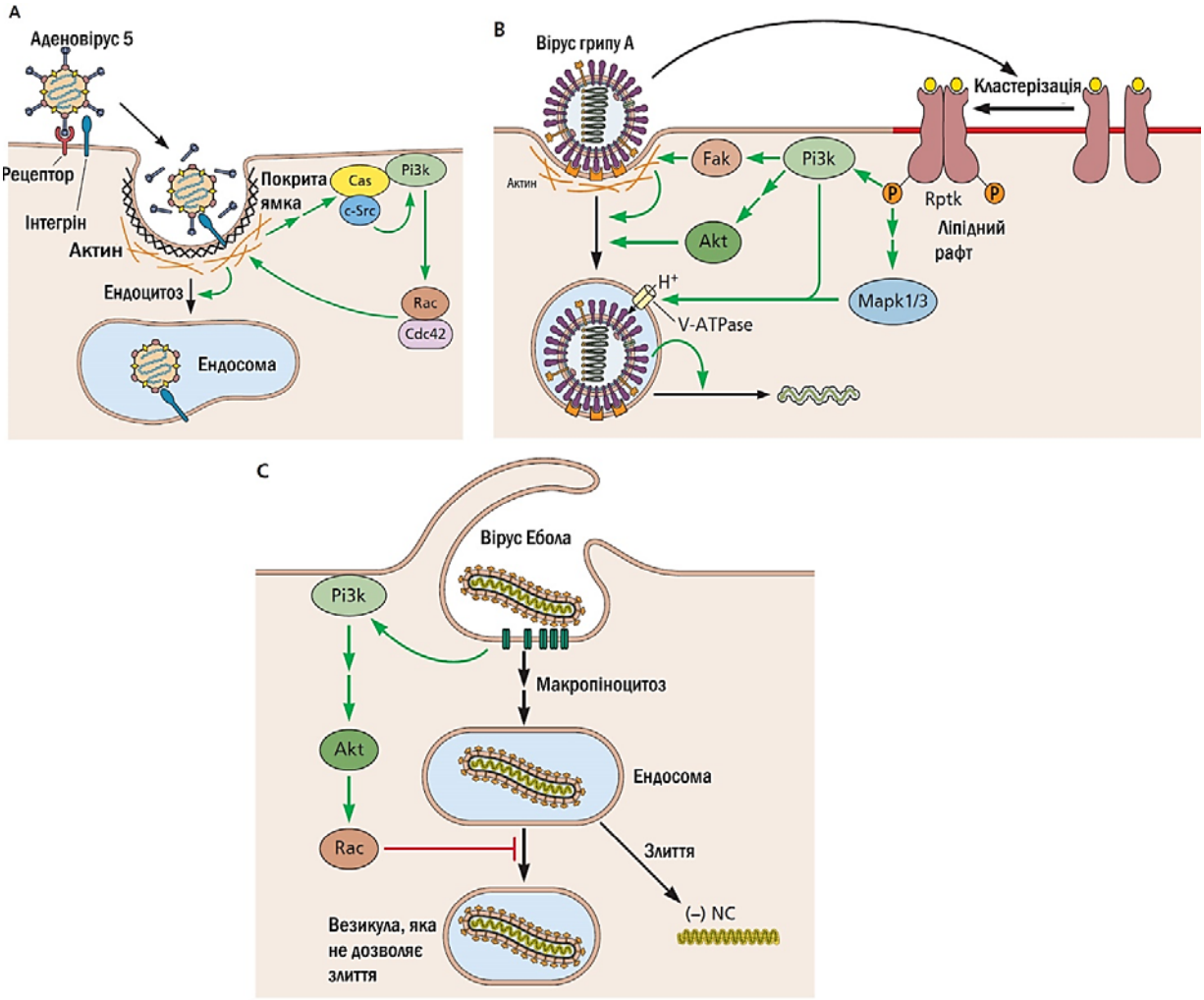
Цей сигнальний шлях регулює зокрема реорганізацію цитоскелета шляхом полімеризації та деполімеризації волокон актину. Така перебудова цих структурних компонентів клітини є суттєвою зокрема для проникнення вірусу. Приєднання вірусів, що належать до численних сімейств, до споріднених рецепторів клітинної поверхні викликає швидку активацію (фосфорилювання) Pi3k. Ця реакція необхідна для ефективного проникнення вірусу (Мал. 5.2)

Хоча Pi3k активується у всіх випадках, подальші шляхи є специфічними для окремих вірусів, оскільки механізми проникнення відрізняються від вірусу до вірусу. Приєднання аденовірусу людини до його рецептора інтегрину призводить до передавання сигналів від Pi3k через невеликі G-білки, щоби індукувати реорганізацію актину та полегшити ендоцитоз вірусних частинок (мал. 5.2A). В інших випадках саме передавання сигналів від Pi3k до Akt було причетним до стимулювання проникнення вірусних частинок шляхом ендоцитозу. Приєднання частинок вірусу грипу А, що призводить до кластеризації ліпідних рафтів і пов'язаних з ними рецепторних тирозинкіназ і подальшої активації Pi3k, стимулює не лише реорганізацію актину, а й підкислення ендосом, необхідне для розбирання вірусних частинок (мал. 5.2B). Навпаки, активація шляху Pi3k-Akt шляхом зв'язування вірусу Ебола з його рецептором не сприяє безпосередньому проникненню вірусу, а навпаки, запобігає перенаправленню ендосом з частинками вірусу в цитоплазматичні везикули, в яких не може відбутися злиття вірусної та клітинної мембран (мал. 5.2C).

Імовірно, ці різні вихідні сигнали Pi3k і Akt визначаються специфічними для вірусу механізмами активації кіназ. Потрапляння всіх вірусів, які репродукуються в клітинах ссавців, залежить від певного ступеня зміни плазматичної мембрани та пов'язаного з нею цитоскелета. Тому видається ймовірним, що порушення нормальної функції Pi3k, Akt або обох у регулюванні переміщення через мембрану буде більш загальною реакцією на зустріч клітин-господарів з вірусними частинками.

Сигналізація, ініційована активацією Pi3k, також сприяє подальшим крокам у репродукції вірусу. Ця кіназа передає сигнал не тільки до Akt, але й до іншої кінази, mTor, присутньої в mTor комплексі 1 (mTorC1). Вихідні сигнали з цих комплексів збільшують інтенсивність трансляції (і, отже, підтримують ріст і проліферацію клітин), модулюють метаболічні шляхи та сприяють виживанню клітин. Передбачається, що всі ці реакції будуть корис-

ними для завершення циклів реплікації вірусної інфекції. Фактично, у кожному дослідженому випадку було помічено, що вірусна інфекція активує передачу сигналів через Pi3k до Akt, а в багатьох випадках і до mTorC1.



Мал. 5.2. *Передавання сигналів через Pi3k полегшує проникнення вірусів в клітину. Pi3k активується після приєднання до рецепторів клітин аденовірусів, філовірусів, флавівірусів, вірусів грипу, герпесвірусів, поксвірусів та інших. (A) Зв'язування частинки аденовірусу типу 5 з рецептором інтегрину αv призводить до активації Pi3k при асоціації його регуляторної субодиниці p85 з фосфорильованою субодиницею, зв'язаною з Crk (Cas), яка є субстратом тирозинкінази c-Src . Передавання сигналів, ініційована Pi3k, призводить до реорганізації актину через активацію малих G-білків Rac і Cdc42. Інгібування фосфорилювання Cas пригнічує проникнення аденовірусу, підкреслюючи важливість цього клітинного сигнального шляху для ефективної інтерналізації. (B) Приєднання частинки вірусу грипу A до рецептора сіалової кислоти індукує активацію Pi3k для стимулювання реорганізації актину та ендоцитозу. У цьому випадку ці процеси залежать від передавання сигналів через Akt і кіназу фокальної адгезії (Fak), а Pi3k активується після кластеризації ліпідних рафтів та пов'язаних з ними рецепторних протеїн-тирозинкіназ (Rptks) у плазматичній мембрані. Така концентрація рецепторів сприяє їх активації шляхом перехресного фосфорилювання, а також активує Mapk1/3. Ці кінази разом із сигналами, що передаються від Pi3k, підвищують активність вакуолярної АТФази (V-ATPase), присутньої в мембрані ендосом, яка закачує протони у везикули. Підвищений потік протонів знижує pH в просвіті ендосоми і полегшує розбирання частинок вірусу для вивільнення сегментів РНК геному в цитоплазму. (C) Зв'язування філовірусу Zaire ebolavirus з його рецептором викликає проникнення шляхом макропіноцитозу, а також активує передачу сигналів через Pi3k, Akt і Rac за механізмом, який ще не відомий. Таке передавання сигналу опосередковано сприяє вивільненню вірусних геномів у цитоплазму, блокуючи переведення ендосом, що містять вірусні частинки, на непродуктивний шлях (за L.W. Enquist et al., 2015).*

Зараження певним вірусом модулює декілька шляхів передавання сигналу. Репродукція вірусу незмінно супроводжується змінами в більш ніж одному сигнальному шляху, як

правило, з блокуванням одного або кількох шляхів і стимуляції інших. Серед тих, які інгібуються в інфікованих клітинах, чільне місце займають шляхи, які виявляють патогенів та опосередковують клітинний захист. Одночасно сигнальні каскади, які керують іншими процесами, модулюються для підтримки реакцій, необхідних для експресії та реплікації вірусних геномів і збирання частинок потомства вірусу.

Загалом здається вірогідним, що чим більш складною є стратегія репродукції вірусу, тим більшим є вплив на сигнальні шляхи. Проте про безпосереднє пряме порівняння змін каскадів трансдукції сигналів в певному типі клітин на інфекцію різними вірусами на час написання цього підручника не повідомлялося. Крім того, те, наскільки радикально змінюються клітинні сигнальні системи, також буде визначатися походженням і станом проліферації клітини-хазяїна. Багато клітинних ліній тваринного і людського походження, які зазвичай використовуються в лабораторії, є похідними від пухлин, і, отже, є аномальними в багатьох аспектах, включаючи постійну проліферацію та постійну активацію сигнальних ланцюгів, які сприяють росту клітин через клітинний цикл. Навпаки, при природних інфекціях багато клітин-господарів діляться лише повільно або перебувають у стані спокою (вилучені з клітинного циклу). Таким чином, неможна просто екстраполювати результати досліджень вірусної інфекції у клітинних лініях на усі випадки репродукції вірусів в природних умовах.

5.2.2. Експресія генів

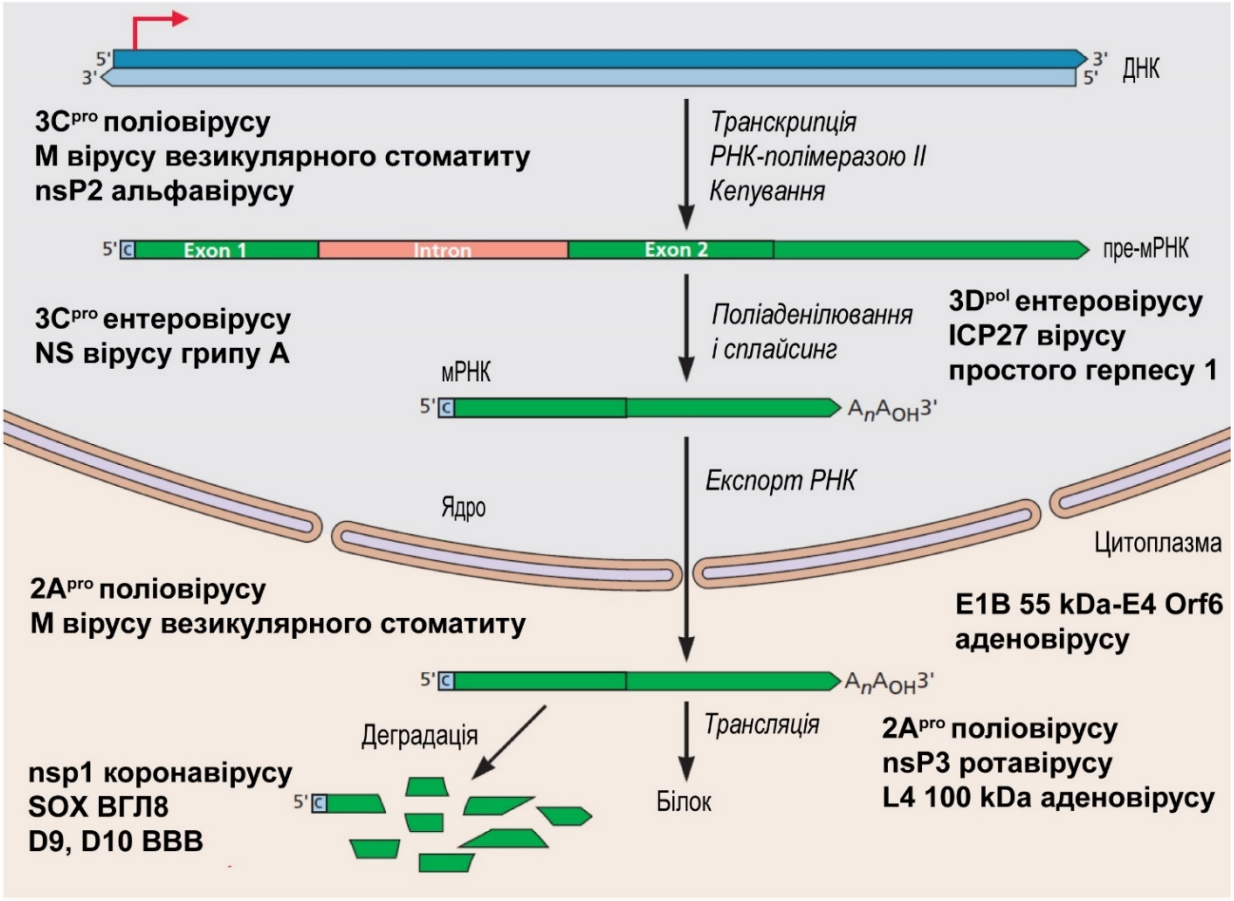
Зміни у експресії генів клітини-хазяїна є універсальним наслідком вірусної інфекції. Характер змін варіює від інгібування синтезу або трансляції більшості, якщо не всіх, клітинних мРНК, до диференційного збільшення або зниження експресії окремих наборів клітинних генів протягом розвитку інфекції.

Пригнічення експресії генів хазяїна. Вірусні геноми зазвичай кодують один або кілька білків (або малі регуляторні РНК), які інгібують експресію клітинних генів опосередковано, або через модуляцію шляхів передавання сигналу клітини-хазяїна (див. попередній розділ). Білки вірусів діють зі значним розмаїттям механізмів.

Продукування мРНК клітини-господаря може бути ефективно пригнічено після інфікування клітин вірусами з геномами (−) або (+)РНК, оскільки вірусні геноми експресуються та реплікуються з мінімальною залежністю від клітинних систем. Це сприяє ефективному синтезу вірусних білків, зменшуючи конкуренцію клітинних мРНК з вірусними мРНК за компоненти механізму трансляції.

Хоча специфічні реакції, які порушуються вірусними білками, різні, мішенями є клітинні білки, необхідні для виробництва клітинних мРНК в ядрі або їх експорту в цитоплазму. Приклади активності деяких білків вірусів щодо пригнічення експресії генів хазяїна наведені на Мал. 5.3.

Так, головний компонент ініціації транскрипції, наприклад TATA-зв'язуючий білок (Tbp), розщеплюється протеазою поліовірусу $3C^{pro}$; каталітичну субодиницю РНК-полімерази II спрямовує на деградацію білок альфавірусу nsP2. Білки, необхідні для сплайсингу або експорту вірусних мРНК до цитоплазми, також можуть бути зруйновані або інгібовані вірусними білками. Загалом, пригнічення експресії генів хазяїна вірусом може бути значним. Наприклад, лише близько 7% з 5000 клітинних полі(А)-мРНК було виявлено через 18 годин після інфікування клітини альфавірусом Сіндбіс.



Мал. 5.3. *Інгібування експресії генів клітини вірусними білками. Етапи експресії генів показані курсивом, білки вірусів, які пригнічують відповідні етапи, показані жирним шрифтом. ВГЛ8 – вірус герпесу людини 8, ВВВ - вірус вісповакцини. (Транскрипція). Білки 3Cpro вірусу поліомієліту, nsP2 альфавірусу Старого Світу та білок М вірусу везикулярного стоматиту націлені на компоненти базового транскрипційного механізму ТАТА-зв'язуючий білок, РНК-полімеразу II та білок ініціації транскрипції IID (TfIId) відповідно. Перші два руйнуються в інфікованих клітинах, але механізм, за допомогою якого білок М інактивує TfIId, не встановлений. Розщеплення Tbp 3Cpr поліовірусу також інгібує транскрипцію РНК-полімеразами I і III. (Поліаденілювання) Як білок 3Cpro ентеровірусу, так і білок NS1 вірусу грипу А блокують поліаденілювання клітинних пре-мРНК, інактивуючі задіяні в поліаденілюванні клітинні білки. В обох випадках 3′-полі(А) послідовності вірусних мРНК синтезуються вірусною РНК-полімеразою. (Сплайсинг). Сплайсинг, необхідний для виробництва більшості клітинних мРНК, порушує білок ICP27 вірусу простого герпесу 1 (HSV-1), який пригнічує ранні реакції сплайсингу та порушує ядерні локуси, в яких зосереджені білки сплайсингу. Цей процес також блокується в клітинах, інфікованих ентеровірусом, в результаті взаємодії вірусного білка 3Dpol з основним компонентом клітинного механізму сплайсингу, Prp8.. (Експорт). Експорт РНК з ядра порушується 2Apro, другою протеазою вірусу поліомієліту, і білком М вірусу везикулярного стоматиту, тоді як експорт клітинних мРНК вибірково блокується специфічною для аденовірусу убіквітин-лігазою E3, яку містить E1B 55 kDa та E4 Orf6. (Трансляція). Трансляція клітинних мРНК також вибірково пригнічується в клітинах, інфікованих різними вірусами. Показані вірусні білки блокують функцію білків, критичну для ініціації трансляції клітинних мРНК, оскільки вірусні мРНК мають відмінні риси, які зменшують або усувають залежність їх трансляції від цих білків. (Деградація). Геноми великих ДНК і РНК-вірусів кодують білки, які ініціюють деградацію мРНК шляхом видалення 5-кепа (білки вірусу вісповакцини D9 і D10) або ендонуклеазного розщеплення (білок nsp1 коронавірусу і білок SOX вірусу герпесу людини 8) (за L.W. Enquist et al., 2015).*

Але зрозуміло, що пригнічення експресії генів хазяїна не може бути і не є занадто потужним. Репродукція вірусу залежить від багатьох стабільних клітинних білків, включаючи білки рибосом та структурні білки цитоскелета. Також може бути необхідним підтримувати виробництво інших білків клітини-хазяїна для оптимального відтворення конкретних віру-

сів, навіть в умовах широкого пригнічення експресії клітинних генів. Механізми, які дозволяють таку селективну експресію специфічних наборів клітинних генів в клітинах, інфікованих вірусом, недостатньо зрозумілі, але синтез окремих білків можна підтримувати різними способами. Наприклад, багато клітинних мРНК є досить стабільними, з періодом напіврозпаду довше, ніж час, необхідний для виробництва частинок потомства деяких вірусів, таких як пікорнавіруси або поксвіруси (6-8 год). І коли концентрації клітинних білків оцінювали на початку та пізніше після інфікування клітин людини вірусом вісповакцини, спостерігалося значна зміна концентрації менш ніж 10% білків (порівняйте з катастрофічним зниженням клітинних полі(А)-мРНК, про яке мова йшла вище).

Диференційна регуляція експресії генів хазяїна. Хоча пригнічення експресії клітинних генів є поширеним результатом інфекції, також відбуваються більш тонкі зміни, особливо коли експресія генів вірусу залежить від машинерії транскрипції клітини-хазяїна та механізмів для процесінгу РНК. Зміни концентрації мікро-РНК, довгих міжгенних некодуючих РНК, малих ядерних РНК, антисмислових РНК і транскриптів псевдогенів спостерігалися в клітинах, інфікованих кількома вірусами, але значення такого впливу на популяцію РНК клітини-господаря ще не є зрозумілим.

Вплив інфекції на характер експресії клітинних генів залежить від вірусу. Експресія приблизно 800 генів хазяїна змінюється в активованих CD4 Т-клітинах, інфікованих вірусом імунодефіциту людини типу 1. На відміну від цього, концентрація 10 000 клітинних мРНК збільшується або зменшується щонайменше в 2 рази в первинних фібробластах миші, інфікованих цитомегаловірусом мишей, який має великий геномом, що кодує кілька транскрипційних або посттранскрипційних регуляторів.

Загалом, механізми диференційної регуляції експресії генів хазяїна потребують подальшого вивчення, як і розуміння значення такої регуляції для реплікації вірусу.

5.2.3. Метаболізм

Клітина-хазяїн забезпечує не тільки молекулярну машинерію, необхідну для синтезу вірусних нуклеїнових кислот і білків, але також забезпечує будівельні блоки, такі як нуклеотиди та амінокислоти, для молекулярних процесів. Збирання вірусів з оболонкою також вимагає мембран клітини і ліпідів, з яких побудовані мембрани. Виробництво великої кількості вірусних макромолекул і вірусних частинок, часто протягом короткого періоду (доба або менше), накладає значні вимоги на біосинтетичні системи клітини-хазяїна, які продукують нуклеотиди, амінокислоти та, у багатьох випадках, жирні кислоти. Синтез цих молекул споживає енергію, яка зазвичай надходить при гідролізі АТФ, так само як і синтез вірусних макромолекул; енергія також витрачається під час згортання вірусних білків та внутрішньоклітинного транспорт вірусних нуклеїнових кислот і білків під час циклу реплікації.

Таким чином, вірусна інфекція призводить до змін у шляхах, за допомогою яких клітини виробляють енергію (катаболізм), а також у шляхах, в яких утворюються попередники нуклеїнових кислот, білків і мембран (анаболізм). Вплив вірусної інфекції на метаболізм хазяїна є специфічним для вірусу, починаючи від відносно простих змін у швидкості конкретних реакцій до широкого перенаправлення багатьох шляхів до специфічних для вірусу. Інфікування деякими вірусами пов’язано з розвитком метаболічних захворювань. Детальний розгляд біохімічних змін у певних клітинах, заражених певними вірусами, виходить за рамки цього підручника.

5.3. Непродуктивна інфекція

При деяких обставинах вірус заражає клітину, але цикл реплікації вірусу не завершується, незважаючи на те, що клітина залишається живою. Якщо геном вірусу зберігається в клітині, таку інфекцію називають латентною. Інакше інфекцію називають абортивною.

5.3.1. Абортивна інфекція

Будь-яка клітина, яка має відповідні рецептори, може буде інфікована вірусом, але різні клітини не реплікують цей вірус з однаковою ефективністю. Може спостерігатися зниження загального виходу вірусних частинок (іноді до нуля), або якість утворених віріонів може бути недостатньою, зі створенням частинок з низькою інфекційністю або неінфекційних.

Як зниження виходу, так і зниження якості частинок є наслідком дефекту у продукуванні або дозріванні деяких компонентів віріонів, необхідних для репродукції, будь то ДНК, РНК або білок. Одним із прикладів є вірус пташиного грипу, що росте в лінії клітин миші L, в якому зменшуються як кількість потомства, так і його специфічна інфекційність, ймовірно, через синтез недостатньої кількості РНК віріону. Іншим прикладом є інфікування непермісивних клітин вірусами грипу людини, що призводить до нормального виходу віріонів, які проте є неінфекційними. Це пояснюється тим, що в цих клітинах відсутній тип протеази, необхідної для розщеплення білка-попередника гемаглютиніну на HA1 і HA2. Цікаво, що це можна змінити, додавши невелику кількість трипсину до культури або до вивільнених віріонів.

Абортивні інфекції викликають труднощі під час спроб розмножити віруси. При природних інфекціях абортивність впливає на наслідок інфекції, ефективно обмежуючи вірус лише тими клітинами, в яких відбувається продуктивна інфекція.

5.3.2. Латентна інфекція

Термін «латентний» визначається як існуючий, але не виставлений. Таким чином, у контексті клітини, інфікованої вірусом, це означає, що вірусний геном присутній, але не виробляється інфекційне потомство. Однак латентність не означає абсолютно неактивного стану вірусного геному, і деякі продукти, кодовані вірусами, завжди експресуються. Приклади наведені в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1. *Приклади латентності вірусів.*

Вірус	Стан геному вірусу	Синтез		
		Принаймні одна транскрибована РНК*	Білок (-ки) вірусу	Інфекційне потомство
Вірус простого герпесу 1 і 2	Епісомний	+	-	-
Вірус Епштейна-Барр	Епісомний	+	+	-
Аденоасоційований вірус	Інтегрований у геном хазяїна	+	+	-

**Кількість і природа експресованих генів обмежена, варіює в залежності від вірусу і суворо контролюється.*

Латентною інфекцією є зараження прокаріотів помірними бактеріофагами (лізогенія), а в клітинах тварин латентність, наприклад, виявляють віруси герпесу та аденоасоційований вірус. Наше розуміння процесів молекулярного контролю, пов'язаних із латентністю, є не-

повним. Віруси бактерій, які досягають стану латентності, а також аденоасоційований вірус людини інтегрують копії ДНК свого геному в геном хазяїна. Це гарантує, що вірусний геном буде реплікуватися разом з ДНК хазяїна і передаватися дочірнім клітинам, а також буде захищений від деградації нуклеазами. З іншого боку, ДНК герпесвірусів не інтегрована, а залишається у вигляді епісоми, хоча зазвичай лінійна молекула геному вірусу замикається у кільце.

Треба зазначити, що «латентних вірусів» не буває. Є віруси, які можуть перейти в латентний стан, але латентні інфекції завжди починаються як продуктивні цитопатогенні інфекції, тобто такі, які призводять до дегенерації і руйнування заражених клітин. Ця початкова інфекція може перетворитися на латентну, а потім певні молекулярні засоби контролю діють для підтримки латентного стану. Згодом латентність порушується певними зовнішніми подразниками, і відбувається повна експресія геному вірусу з утворенням інфекційних частинок, що дає вірусу можливість інфікувати нових хазяїв. Як правило, латентний стан порушується лише в підгрупі клітин у латентно інфікованій культурі, а решта клітин зберігає вірус у латентному стані. Таким чином, латентність можна розглядати як еволюційну стратегію залишатися в хазяїні протягом тривалого періоду часу.

Мабуть, найкращим прикладом вірусів, які викликають латентну інфекцію, є родина герпесвірусів (*Herpesviridae*). Вірусом простого герпесу заражена дуже багато людей. Цей вірус переходить у стан латентності в клітинах сенсорних нейронів, які іннервують ділянку епітелію, де відбулося первинне зараження. Періодично латентний стан перемежається з перетвореннями в продуктивну цитопатогенну інфекцію (реактивація вірусу).

Латентність підтримується завдяки комбінованій дії вірусних мікроРНК, які знижують експресію генів, які потрібні для продуктивної інфекції. Якщо ж ці гени починають експресуватися при реактивації, ініціюється імунна відповідь хазяїна.

Вірус Епштейна-Барр, який також належить до герпесвірусів, стає латентним, коли він інфікує В-лімфоцити *in vitro*. Його дуже велика лінійна дволанцюгова ДНК, 172 т.п.н., замкнена в кільце і не інтегрується в геном хазяїна. В результаті інфекції В-клітин стимулюється безперервний клітинний поділ. Вірусна ДНК реплікується напівконсервативно, один раз у клітинному циклі, і кожна молекула потрапляє в дочірню клітину, як хромосоми хазяїна. Під час латентності експресується до дев'яти із орієнтовно 100 вірусних генів. Однак приблизно 1 з 10^3-10^6 клітин спонтанно переходять у продуктивну фазу інфекції, де експресується повний набір генів, і синтезуються та вивільняється інфекційні віріони. Вірус Епштейна-Барр також асоційований з деякими злоякісними новоутвореннями (див. розділ 8.2.1).

Аденоасоційований вірус (родина *Parvoviridae*) має невеликий одноланцюговий лінійний ДНК-геном із 4680 нуклеотидів. Він є вірусом-сателітом, і його реплікація зазвичай залежить від зараження тих клітин, куди він потрапив, аденовірусом або вірусом герпесу. За відсутності хелперного вірусу аденоасоційований вірус стає латентним за допомогою кодованого вірусом білка Rep, інтегруючись у 19-ту хромосому геному хазяїна, і реплікується як частина геному хазяїна. Під час латентності спостерігається мінімальна експресія генів. При зараженні клітин хелперним вірусом і за наявності білка Rep латентність порушується. Вірусна ДНК вирізається з геному хазяїна, і починається продуктивна інфекція аденоасоційованого вірусу.

5.4. Персистентна інфекція

Персистентна інфекція у випадку переходу вірусів у латентний стан є очікуваною, оскільки вірус не продукує нових віріонів, не спричиняє загибелі клітин і поводить себе так би мовити дуже непомітно. В такому випадку в організмі не активуються імунні відповіді, і вірусні геноми не виявляються і не знищуються. Інфіковані клітини виживають, і, наприклад, віруси герпесу у латентному стані в організмі інфікованої людини зберігаються протягом всього життя.

Але персистентна інфекція може бути і продуктивною. Під час персистентної продуктивної інфекції йде безперервне виробництво інфекційного вірусу, і це досягається або виживанням інфікованої клітини, або ситуацією, в якій спочатку інфікована меншість клітин, які гинуть, а поширення вірусу в організмі обмежене. Тому загибель клітин врівноважується новими клітинами, що утворюються шляхом поділу, тобто без чистих втрат у кількості клітин.

Персистентна інфекція у ссавців є результатом балансу між вірусом і його хазяїном в результаті: (i) окремо взаємодії вірусу і клітин; (ii) взаємодії вірусу та клітин з антитілами або інтерфероном, що обмежує продукцію вірусу; (iii) взаємодії вірусу та клітини з утворенням дефектних інтерферуючих вірусних часток; або (iv) поєднання цих подій.

Пропоноване пояснення здатності певних комбінацій вірус-клітина створювати персистентну інфекцію полягає в тому, що віруси еволюціонують до стану спільного існування зі своїм хазяїном. Іншими словами, вірус не отримує переваг у вбивстві свого хазяїна, навіть навпаки, оскільки виживання вірусу повністю залежить від хазяїна.

Персистентна інфекція, що виникає внаслідок взаємодії вірусу та клітини. Член родини *Paramyxoviridae,* Вірус приматів 5 (Simian virus 5, SV5), також званий вірусом парагрипу типу 5, викликає гостру цитопатогенну інфекцію із загибеллю клітин у лінії клітин нирки хом'яка, але при зараженні клітин нирки мавпи (МК), встановлюється персистентна інфекція. Вірус розмножується з однаковою швидкістю в обох типах клітин, але клітини нирки мавп не виявляють цитопатогенного ефекту, залишаються здоровими і безперервно виробляють вірусне потомство. Інфекція SV5 не пошкоджує МК-клітини в тому сенсі, що вона не порушує синтез клітинного білка, РНК або ДНК, і поділ клітини відбувається в звичайному режимі. Розрахунки показують, що SV5-інфекція МК-клітин не вимагає великої кількості ресурсів хазяїна. Наприклад, загальний синтез вірусної РНК становить <1% синтезу клітинної РНК (незважаючи на те, що кожна клітина виробляє близько 150 000 частинок вірусу на добу). Таким чином, походження клітин є важливим у визначенні наслідку зараження вірусом хазяїна.

Персистентна інфекція також може виникнути, коли віруси здатні пригнічувати програмовану загибель клітин, яка зазвичай викликає гострі цитопатогенні події. Багато вірусів експресують генні продукти, які можуть інгібувати таку форму програмованої загибелі, як апоптоз. Наприклад, цитомегаловірус людини (герпесвірус) кодує білок під назвою UL37x1, який пригнічує апоптоз інфікованих клітин, дозволяючи вірусу встановити довготривалу інфекцію. Оскільки персистентна інфекція дозволяє вірусу репродукуватися протягом тривалого періоду часу, продукування засобів пригнічення апоптозу забезпечує перевагу для вірусу.

Персистентна інфекція, що виникає у результаті взаємодії між вірусами, клітинами та інтерфероном, або вірусами, клітинами та антитілами. Персистентна інфекція може бути встановлена в результаті рівноваги між утворенням нових інфекційних частинок та противірусною дією інтерферону (див. розділ 6.1.2). Інтерферон пригнічує реплікацію вірусу, і коли інфіковано лише кілька клітин у культурі чи організмі, інтерферон, вироблений природним шляхом, спричинить противірусний стан у неінфікованих клітинах. В результаті суттєво зменшується продукція вірусу, що супроводжується зниженням індукції інтерферону. Зниження рівня інтерферону дозволяє вірусу репродукуватися, інфікуючи частину клітин, доки рівень інтерферону не підвищиться до точки, коли він знову пригнічує продукцію вірусу. Таким чином може бути досягнутий стабільний стан.

Персистентно інфікована вірусом культура також може бути створена в лабораторії, коли спочатку інфікованими є лише кілька клітин, а до середовища додається невелика кількість специфічних нейтралізуючих антитіл (див. розділ 6.1.3). Антитіла зменшують кількість вірусного потомства, доступного для повторного інфікування клітин. Як і в ситуації з інтерфероном, результатом є те, що швидкість зараження, а отже, і загибель клітин збігається або перевищується поділом неінфікованих клітин, так що в цілому популяція клітин виживає. Антитіло необхідно постійно додавати, щоб забезпечити його достатню кількість протягом вироблення нового вірусу. Звичайно, загальна чиста продукція клітин буде менша, ніж у неінфікованій культурі, але у організмі тварини поділ клітин буде підвищуватися нормальними гомеостатичними механізмами, які контролюють кількість клітин. Вважається, що ця ситуація імітує певні види персистентної вірусної інфекції у тварин.

Персистентна інфекція, що виникає у результаті взаємодії між вірусами, клітинами та дефектними інтерферуючими вірусними частинками. Дефектні інтерферуючі частинки (ДІ-частинки, розділ 4.7) продукуються усіма вірусами в результаті помилок реплікації і мають делеції значної частини геному. Це робить їх дефектними у сенсі реплікації. Геном ДІ-частинок зберігає послідовності, необхідні для розпізнавання вірусними полімеразами та для упаковки геному у частинку вірусу, але майже нічого іншого. Таким чином, геном ДІ-частинки реплікується тільки в клітині, інфікованій інфекційним вірусом того типу, з якого був створений геном ДІ-частинки (хелперним вірусом), оскільки це необхідно для забезпечення ферментів для реплікації і структурних білків. У цьому сенсі геном ДІ-частинок паразитує на інфекційному вірусі. ДІ-частинки, які є результатом такої співпраці, зазвичай не відрізняються за зовнішнім виглядом від інфекційних віріонів. Інтерференція між ДІ-частинками та інфекційним вірусом виникає частково тому, що більше копій коротшого геному ДІ-частинок можна зробити за той самий час, який потрібен для синтезу геному повного розміру. Оскільки вірусні полімерази синтезуються в помірних кількостях, велика кількість вироблених геномів ДІ-частинок в кінцевому підсумку захопить всі молекули полімерази, і синтез інфекційних геномів повного розміру припиниться.

Геноми ДІ-частинок також будуть конкурувати з хелперним вірусом за білки, необхідні для упаковки геному в віріони, і, знову ж таки, їх більша кількість забезпечить перевагу для геномів ДІ-частинок. Таким чином, у міру розвитку інфекції вихід повністю інфекційного хелперного вірусу знижується. Однак, оскільки геноми ДІ-частинок вимагають присутності вірусу-помічника, виробництво геномів ДІ-частинок також зменшиться через зниження доступності основних білків. На практиці ситуація складніша, оскільки генерація геномів ДІ-частинок дуже залежить від типу інфікованої клітини, тому і клітина, і вірус сприяють збалансованій ситуації.

5.5. Програмована загибель клітин

Вірусна інфекція в клітинах може ініціювати процес, який призводить до загибелі клітини ще до того, як утворюється потомство вірусу і починає працювати імунна система цілого організму. Таким чином, забезпечується запобігання поширення вірусу в інші клітини. Серед типів процесів клітинного «суїциду» у клітинах тварин найчастіше відбувається *апоптоз*. У рослин подібну захисну реакцію називають *надчутливою відповіддю*. Процес програмованої загибелі клітин відіграє важливу роль не лише в імунній реакції, але також і в процесах нормального росту і розвитку (наприклад, у зародка людини таким шляхом зникає хвіст).

Подібний механізм захисту від зараження фагами трапляється і у бактерій. Загибель зараженої клітини до того, як потомство фага буде сформовано, захищає інші сприйнятливі клітини від зараження. Цей механізм був виявлений у *Escherichia coli* і багатьох інших видів бактерій.

Загалом, якщо заражена вірусом клітина успішно здійснить процес програмованої загибелі, це виявиться корисним для усього багатоклітинного хазяїна або для популяції одноклітинних хазяїв.

5.6. Поширення вірусів усередині організму багатоклітинного хазяїна

Після зараження першої клітини організму дочірні віріони можуть заразити сусідні клітини; наприклад, віруси, що викликають застуду, можуть заразити інші клітини епітелію дихальних шляхів, а ротавіруси інші клітини епітелію шлунково-кишкового тракту. Більшість розташованих поруч клітин тварин відокремлена одна від одної плазматичною мембраною, що дозволяє вірусам безпосередньо переходити з клітини в клітину.

Віруси рослин повинні переміщатися з клітини в клітину через плазмодесми, і кожен фітопатогенний вірус кодує від одного до чотирьох спеціалізованих білків, які дозволяють вірусу це робити. Ці білки звуться транспортними білками (ТБ) і функціонують з використанням різних механізмів. ТБ формують комплекси або з вірусною нуклеїновою кислотою, або з вірусною нуклеїновою кислотою і білком оболонки (нуклеокапсидом), допомагаючи їм переміщуватися через плазмодесми. Треба зазначити, що подробиці їх функціонування залишаються не зовсім зрозумілими. Транспортні білки є поліфункціональними і відіграють роль не лише транспортного білка, але задіяні і в інших етапах циклу реплікації вірусу.

У деяких обставинах віріони можуть транспортуватися у віддалені частини хазяїна, де сприйнятливі клітини стають зараженими. В тілі тварин в ролі транспортних магістралей для вірусів можуть використовуватись кров і нерви, тоді як у рослин транспорт на далекі відстані здійснюється через флоему.

5.7. Захворювання

Чимало вірусних інфекцій не викликають захворювання у своїх хазяїв, в інших же випадках вірус може викликати захворювання з фатальним наслідком, таке як сказ або СНІД. Між двома цими крайнощами розташовані вірусні захворювання з різним ступенем тяжкості перебігу.

Захворювання можна визначити по симптомах або певних ознаках. У медичній термінології симптоми є суб'єктивними особливостями, такими як біль в животі або відчуття втоми. Кажучи іншими словами, симптоми – це *відчуття*, які зазнає людина. Ознаки ж є

об'єктивними особливостями, такими як, наприклад, кров у екскрементах, підвищена температура або висипання на шкірі. Симптоми і ознаки хвороби – це не синоніми, не слід їх плутати. Симптоми може виявити лише заражений індивідуум, тоді як ознаки видно кожному.

Цікаво, що фітопатологи і вірусологи, які працюють з рослинами, використовують термін симптоми хвороби відносно об'єктивних особливостей, таких як, наприклад, розмір поразок на листі або мозаїка. Тобто симптомами називають візуальну реакцію рослини на атаку збудника хвороби. Так само симптомами називають ознаки вірусних хвороб у комах.

Ознаками хвороби у фітопатології називають візуальну присутність на рослині-господарі певної структури, утвореної патогеном. Приклади включають міцелій, спори, плодові тіла грибів або бактерійний ексудат.

При зараженні декотрими вірусами, наприклад депендовірусами, деякими герпесвірусами і деякими реовірусами, захворювання не виникає. Зараження іншими вірусами, такими як поліовірус (родина *Picornaviridae*) або вірус гепатиту В (родина *Hepadnaviridae*), може спричинити захворювання, а може і не призвести до захворювання. Інфекції, які не призводять до захворювань, називають субклінічними або безсимптомними.

Не треба плутати латентні вірусні інфекції з безсимптомними вірусними захворюваннями. Латентна вірусна інфекція не є продуктивною; у той же час безсимптомні вірусні захворювання спостерігаються на тлі продуктивної вірусної інфекції.

Складна взаємодія різних чинників визначає, чи буде викликати зараження вірусом захворювання, чи ні, і якщо захворювання буде викликано, в якому ступені тяжкості воно проявиться. До числа цих чинників належать особливості, пов'язані з вірусом, фактори, пов'язані з хазяїном, і втручання людини.

Для вірусів чинники, які впливають на результат зараження, включають вірулентність та дозу вірусу.

Вірулентність певного штаму вірусу. Вірулентність вірусу, як і патогенного мікроорганізму, визначається мірою його хвороботворної здатності, тобто тяжкістю перебігу викликаного ним захворювання. Наприклад, вірус грипу А (родина *Orthomyxoviridae*) має два антигени: гемаглютинін (H) і нейрамінідазу (N). Існує 13 варіантів H (H1–H13) і 9 варіантів N (N1–N9). Антигенні варіанти вірусу грипу А можуть поєднуватися в різних комбінаціях. Для людини тип H5N1 є більше вірулентним, ніж типи H1N1 і H3N2, оскільки під час зараження типом H5N1 захворювання минає важче.

***Доза вірусу*.** Більш висока доза вірусу може призводити до коротшого інкубаційного періоду, тобто часом між зараженням і проявом перших симптомів і/або ознак.

Чинники хазяїна, що впливають на результат зараження, включають ефективність роботи імунної системи, а також чи є імунна пам'ять до конкретного вірусу (див. наступний розділ). Слід зазначити, що сильніша імунна відповідь у хазяїна не гарантує видалення вірусу. ВІЛ (родина *Retroviridae*) продовжує реплікуватися у присутності високих рівнів специфічних для ВІЛ антитіл і Т-лімфоцитів. В деяких випадках симптоми і/або ознаки хвороби можуть бути наслідком імунної відповіді проти вірусу. Висипання під час кору (родина *Paramyxoviridae*) і поразки протягом простого герпесу є клінічним проявом спроби тіла людини зруйнувати інфіковані вірусом клітини.

Втручання людини, яке впливає на результат вірусної інфекції у людини або тварин, полягає в призначенні противірусних ліків.

Одужання хазяїна під час вірусної хвороби може бути пов’язане з видаленням вірусу, що відбувається, наприклад, протягом звичайної вірусної застуди в дихальних шляхах або ротавірусній інфекції шлунково-кишкового тракту. Одужання може також супроводжуватися формуванням довготривалої інфекції, можливо і на все життя. Така персистентна інфекція, незалежно від того, чи є вона продуктивною або латентною, може не мати подальших наслідків для хазяїна, або викликати періодичне захворювання. Зараження в дитинстві вірусом вітряної віспи може призводити до довічної латентної інфекції, яка може реактивуватися і викликати оперізуючий лишай. Тривале персистентне зараження людей і тварин деякими вірусами може призводити до формування злоякісних пухлин.

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- пояснити терміни:
  - продуктивна інфекція
  - абортивна інфекція;
  - латентна інфекція
- персистентна інфекція
- розуміти головні особливості продуктивної і непродуктивної інфекцій
- знати особливості і механізми перебігу продуктивної, непродуктивної і персистентної інфекції,
- знати шляхи поширення вірусних інфекцій в організмах тварин і рослин
- знати фактори, які визначають, чи призводить вірусна інфекція до захворювання.

РОЗДІЛ 6. ІМУННА ВІДПОВІДЬ ОРГАНІЗМІВ НА ВІРУСНУ ІНФЕКЦІЮ

Коли вірус вперше потрапляє у сприйнятливого хазяїна, цей організм стає вразливим до потенційно дуже великої шкоди від неконтрольованої реплікації вірусу і, як наслідок, пошкодження тканин хазяїна. Тому не дивно, що природний добір призвів до появи різноманітних захисних механізмів у хазяїна, які уповільнюють реплікацію вірусу і в кінцевому підсумку усувають вірус чи інших патогенів.

У цьому розділі ми коротко розглянемо механізми противірусної імунної відповіді хребетних і безхребетних тварин, рослин і прокаріотів. Імунна відповідь грибів наразі є значною мірою *terra incognita*, ми про неї на диво мало знаємо і тут згадувати про неї не будемо.

6.1. Імунна відповідь хребетних тварин

У хребетних тварин традиційно захисні механізми поділяють на **вроджений імунітет** і **адаптивний імунітет** – перший є неспецифічним за своєю природою, тоді як останній розвивається спеціально для протидії конкретному патогену. Важливо пам'ятати, що між цими двома типами імунних відповідей існують зв'язки і їх реакції не є абсолютно відокремленими.

Зовсім недавно у тварин була визнана третя категорія імунітету – **внутрішній імунітет** (intrinsic immunity). Внутрішнім імунітетом називають набір нещодавно відкритих механізмів противірусного захисту на рівні клітин, зокрема генетично закодованих білків, які специфічно спрямовані на еукаріотичні ретровіруси. На відміну від факторів адаптивного та вродженого імунітету, білки внутрішнього імунітету зазвичай конститутивно експресуються на постійному рівні, що дозволяє швидко зупинити вірусну інфекцію.

6.1.1. Внутрішній імунітет

Внутрішній імунітет базується на дії декількох типів білків, з яких ми згадаємо два.

Білки TRIM5α (tripartite interaction motif five, splice variant α) є одними з найбільш вивчених внутрішніх імунних білків завдяки їх зв'язку з вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) та вірусом імунодефіциту приматів (SIV). Ці білки конститутивно експресуються і розпізнають білки капсиду ретровірусів. TRIM5α запобігають роздяганню капсиду вірусу та зворотній транскрипції за допомогою ще невідомого механізму. Варіант TRIM5α у мавпи-резус здатний розпізнавати та запобігати ВІЛ-інфекції, тоді як білок TRIM5α людини може запобігти зараженню SIV.

Білки APOBEC3 (apolipoprotein B mRNAediting enzyme, catalytic polypeptide-like 3 proteins) є внутрішніми імунними білками, які перешкоджають ВІЛ-інфекції. Вони можуть індукувати летальні мутації за допомогою дезамінування дезоксицитидину, перетворюючи його на дезоксиуридин, в процесі зворотної транскрипції. Декілька з цих білків в клітинах людини можуть втручатися в реплікацію ВІЛ. Два з них, APOBEC3F і APOBEC3G, можуть включатися у віріони ВІЛ і поглинатися разом з вірусною частинкою іншими клітинами, в яких реплікація вірусу блокується.

6.1.2. Вроджений імунітет

Розпізнавання збудника. Реакції вродженого імунітету починаються на рівні окремої інфікованої клітини. Щоби ініціювати вроджену імунну реакцію, клітина повинна «зрозуміти»,

що в ній присутній патоген, який може ось-ось почати або починає ініціювати інфекційний процес.

Система вродженого імунітету у Metazoa (до речі, як і у рослин) виявляє присутність потенційно патогенних організмів по появі певних молекул, так званих **молекулярних патернів**, які є *сигналами небезпеки*. Джерелом таких молекул можуть бути патогени (екзогенні патерни) або клітини самого організму (ендогенні патерни). До екзогенних патернів належать особливості молекулярної сигнатури, які унікальні для певного класу інфекційних агентів і не зустрічаються у хазяїна. Прикладами є флагелін або ліпополіцукри бактерій, хітин грибів або певні білки вірусів.

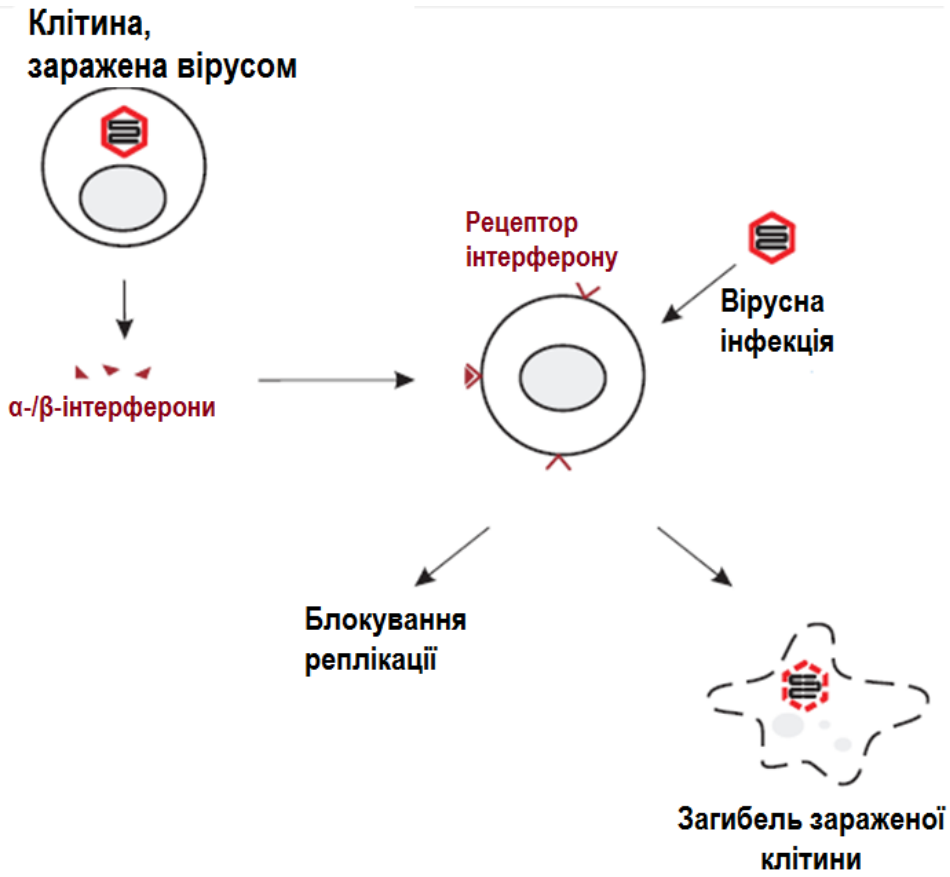
Ендогенні патерни є унікальними для інфікованих клітин (тобто не зустрічаються в неінфікованому хазяїні) або, принаймні, зазвичай не зустрічаються в тому компартменті клітини, де патерн з'явився, наприклад вільна ДНК в цитоплазмі. У перебігу нормального метаболізму клітина не виробляє дволанцюгову РНК, хоча, навпаки, вона є частиною циклу реплікації багатьох вірусів; таким чином, він є ключовою ознакою інфікованого стану та важливим патерном. Деякі віруси, наприклад ротавіруси, мають геноми длРНК. Багато інших вірусів мають геноми одноланцюгової РНК, де реплікація/транскрипція вимагає синтезу молекул протилежної полярності. Отже, принаймні на певний час утворюються довші або коротші фрагменти длРНК. Інші вірусні патерни включають ДНК, в якій динуклеотиди CpG неметильовані, що відрізняє її від ДНК хазяїна, а також не кеповані 5´-кінці цитоплазматичної РНК.

Розпізнавання екзогенних і ендогенних патернів здійснюють рецептори - імунні сенсори, які так і називають **рецепторами, що розпізнають патерни** (pattern recognition receptors, PRRs). При активації патерном PRRs запускають реакції вродженого імунітету. На сьогоднішній день ідентифіковано кілька класів PRRs, включаючи: Toll-подібні рецептори (TLR), які є трансмембранними білками, присутніми в плазматичній мембрані або в мембранах цитоплазми; RIG-I-подібні рецептори (RLR), які є цитоплазматичними РНК-геліказами; рецептори DDX/DHX, які є РНК/ДНК-геліказами; NOD-подібні рецептори (NLR), також цитоплазматичні, і деякі інші, структура яких ще не охарактеризована. Як правило, RLR є важливими у відповіді на РНК-віруси, тоді як сенсори цитоплазматичної ДНК і TLR9 реагують на ДНК-віруси. Існує також механізм, що використовує РНК-полімеразу III, за допомогою якої цитоплазматична ДНК транскрибується з утворенням молекул РНК, які потім можуть залучати RLR, такі як RIG-I.

Після виявлення присутності вірусу PRRs активуються і ініціюють шляхи передавання імунних сигналів, які у цьому підручнику ми розглядати не будемо. У кінцевому підсумку, в організмі тварин активуються захисні реакції вродженого імунітету, коротко розглянуті нижче.

Синтез інтерферонів. Інтерферони є білками, що синтезуються і виділяються з клітин у відповідь на зараження вірусами. Потужним стимулом для синтезу інтерферону є дволанцюгова РНК, яка утворюється протягом реплікації РНК-геномних вірусів. Роль інтерферонів полягає в захисті прилеглих клітин від зараження і активації обумовленого Т-клітинами імунітету. Відомо декілька типів інтерферонів, серед яких альфа- і бета- (α- і β-) інтерферони під час зараження вірусами синтезуються більшістю типів клітин (Мал. 6.4).

Після виділення у міжклітинний простір, молекули інтерферонів дифундують до сусідніх клітин, де запускають різні антивірусні реакції за допомогою зв'язування зі спеціальними рецепторами.



Мал. 6.4. Активності α- і β-інтерферонів (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

До антивірусних реакцій, що запускаються α- і β-інтерферонами, належать такі:

– активація генів, які кодують антивірусні білки, наприклад, залежної від дволанцюгової РНК протеїнкінази R і РНКази L.

– стимуляція утворення молекул головного комплексу гістосумісності класу I і білків протеосом; ці молекули посилюють презентацію вірусних пептидів на поверхні заражених клітин Т-клітинам (див. наступний розділ).

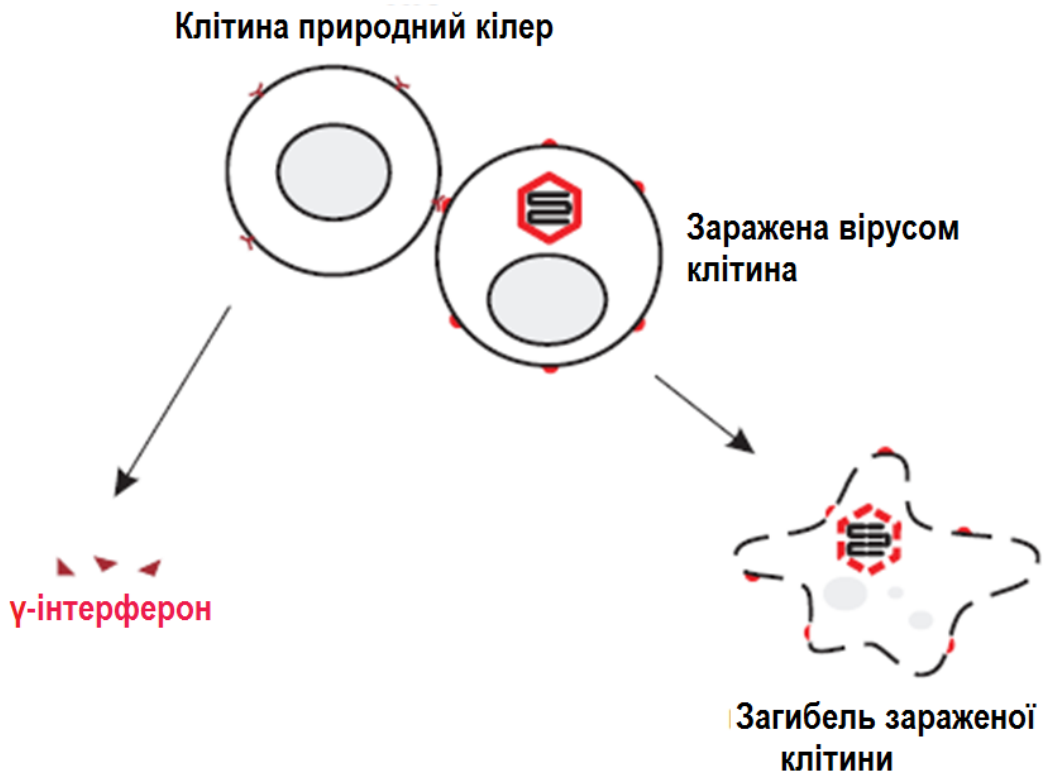
– активація *природних кілерів* – лімфоцитів, що змушують клітину-мішень гинути шляхом апоптозу;

– індукція програмованої загибелі клітини.

Ще один тип інтерферону, гамма- (γ-) інтерферон, продукується в основному Т-клітинами і природними кілерами у відповідь на приєднання різних молекул, що виділяються під час імунної відповіді. Гамма-інтерферон також викликає ряд противірусних ефектів, включаючи стимуляцію презентації антигена і активацію фагоцитів і природних кілерів.

Протидія вірусів дії інтерферонів. Чимало вірусів продукують білки, які інгібують або синтез інтерферонів, або їхню активність. Наприклад, білок NS1 вірусу грипу А і білок NS3-4A вірусу гепатиту В блокують метаболічні шляхи, що беруть участь в синтезі інтерферону. Інші віруси, наприклад поліовіруси, запобігають синтезу інтерферону загальним блокуванням експресії генів клітини.

Природні кілери. Клітини природні кілери присутні по усьому організму, але головним чином трапляються в крові. Вони є окремим класом лімфоцитів, мають цитотоксичну дію проти пухлинних клітин і клітин, заражених вірусами. Природні кілери є одним з найважливіших компонентів клітинного вродженого імунітету (Мал. 6.5).



Мал. 6.5. Активність клітин природних кілерів (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Природні кілери розпізнають зміни поверхневих молекул заражених вірусом клітин, які відбуваються в результаті зараження. На відміну від В- і Т-клітин, вони не розпізнають специфічні антигени. Після розпізнавання зараженої вірусом клітини як своєї мішені, природні кілери приєднуються до клітини і вбивають її.

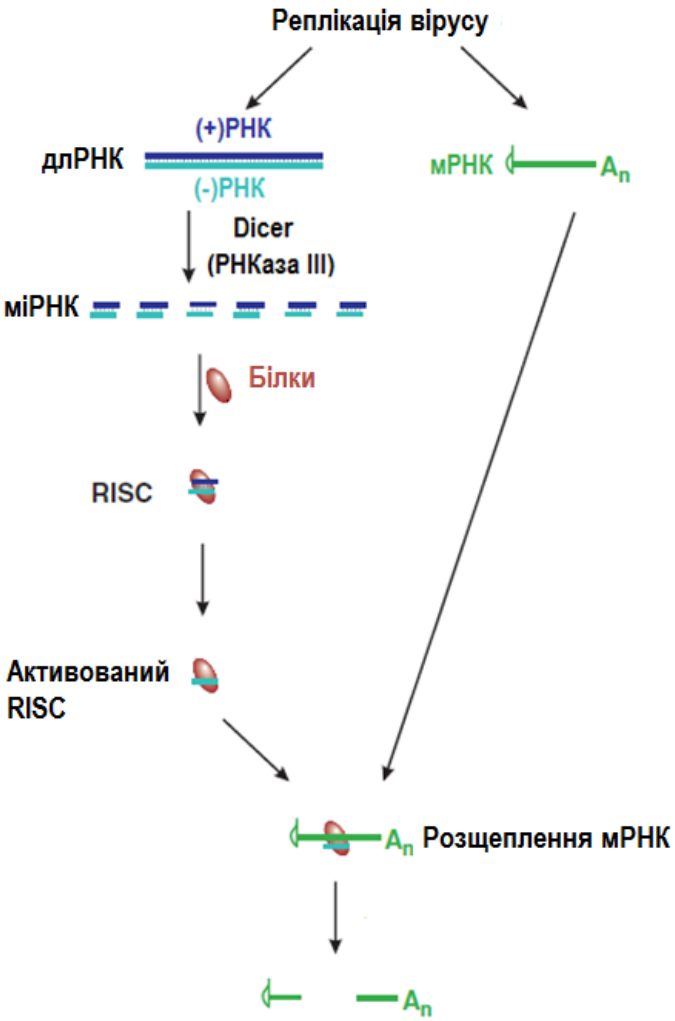
Природні кілери вбивають клітину або виділяючи перфоріни, білки, які вбудовуються в мембрану зараженої вірусом клітини, утворюючи в ній отвори, що приводить до загибелі, або індукують програмовану загибель. Також, після прикріплення до зараженої клітини, природні кілери виділяють γ-інтерферон.

Протидія вірусів природним кілерам. Прикладом є ВІЛ, присутність частинок якого в крові змінює експресію низки молекул на поверхні клітин природних кілерів. Це знижує активність природних кілерів, включаючи їх здатність вбивати інфіковані вірусами клітини і виділяти γ-інтерферон.

Сайленсинг РНК. Сайленсинг, тобто «глушення» РНК (RNA silencing), також відоме як пост-транскрипційне глушення генів або інтерференція РНК, є внутрішньоклітинним процесом, який індукується дволанцюговою РНК. В результаті цього процесу руйнується матрична РНК, яка має таку ж послідовність нуклеотидів, як і ініціаторна длРНК. В результаті цього процесу руйнуються як мРНК вірусу, так і мРНК клітини (Мал. 6.6).

У цьому процесі дволанцюгова РНК розпізнається комплексом білків, до складу якого входить фермент, який дістав назву Dicer (від англ. dicer – машина для нарізання у формі кубиків). Цей фермент належить до родини РНКаз III і проявляє специфічність до дволанцюгової РНК, розрізаючи її на фрагменти довжиною 20–25 пар нуклеотидів. Ці фрагменти називають малі інтерферуючі РНК (міРНК). Фрагмент міРНК з'єднується з певними білками цитоплазми, формуючи комплекс RISC (RNA-induced silencing complex). У цьому комплексі дволанцюгова міРНК розплітається, і (–) ланцюг залишається в комплексі, що

активує цей комплекс. Мінус-ланцюг РНК в комплексі націлюється на мРНК на ділянку, що має комплементарні нуклеотиди, і далі в цьому регіону мРНК руйнується.



Мал. 6.6. Сайленсинг РНК. Дволанцюгова РНК розрізається РНКазою Dicer на миРНК, які зв'язуються з білками RISC. Активований комплекс RISC містить фрагменти мінус-ланцюга РНК, які направляють комплекс на специфічну мРНК. мРНК розщеплюється білками RISC (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Сайленсинг РНК виявлено у рослин, грибів, хребетних і безхребетних тварин. У рослин він є важливим антивірусним механізмом; у грибів і тварин, ймовірно, також. Слід зазначити, що окрім захисту від вірусів, сайленсинг РНК також бере участь у регуляції експресії власних генів організму, зокрема у процесі ембріогенезу.

Протидія вірусів сайленсингу РНК. Деякі віруси рослин кодують білки, які у той або іншим способом пригнічують цей процес.

6.1.3. Адаптивний імунітет

Хоча цей підручник не є підручником з медичної або ветеринарної вірусології чи імунології людини і тварин, але організацію і функціонування системи адаптивного імунітету тварин ми розглянемо більш-менш детально. Пандемія коронавірусу SARS-Cov-2, яка почалася в 2019 році, виявила, що відповідні знання вкрай потрібні для раціонального ставлення до вірусних інфекцій, щоби не вводили в оману різні сенсаційні псевдонаукові абсолютно помилкові твердження з цих питань.

У вітчизняній навчальній і науковій літературі адаптивний імунітет часто називають «набутим» або «придбаним». Але набутий чи придбаний імунітет – це **імунна пам'ять**, яка сформувалася **після** реакцій адаптивного імунітету (див. нижче). Тому називати адаптивний імунітет набутим є зовсім невірним.

Загальні особливості адаптивної імунної системи. Адаптивна імунна система складається з двох ланок: опосередкованого клітинами імунітету (клітинного імунітету) і гуморального імунітету. Вони розрізняються за природою клітин, які обумовлюють клітинний і гуморальний імунітет, і механізмом дії після ініціації імунних відповідей.

Клітини, які беруть участь в адаптивній імунній системі, дуже мобільні, і більшість із них присутні в системі кровообігу та лімфатичній системи, які розповсюджуються по всьому тілу, а менша кількість знаходиться в певних тканинах організму. В адаптивній імунній відповіді задіяні два основних типи клітин, *Т- і В-лімфоцити*. Вони працюють як дозорні, які постійно оглядають організм на предмет наявності інфекції. Т-лімфоцити беруть участь у клітинному адаптивному імунітеті, а В-лімфоцити є ефекторами гуморальної імунної відповіді. Інші типи клітин відіграють додаткову роль. Хоча обидві ланки адаптивної реакції можуть функціонувати незалежно, вони взаємодіють одна з одною на кількох рівнях, а також взаємодіють із вродженою імунною системою.

Як тільки Т- або В-клітини виявляють сигнал, що вказує на наявність інфекції, вони не реагують негайно. Спочатку вони збільшують свою кількість шляхом поділу, щоби утворити багато генетично ідентичних дочірніх клітин, у процесі, який називається **клональною експансією**. Клітини також повинні диференціюватися з неактивного стану, коли вони не діляться, в активні клітини, які спрямовані на чужорідний матеріал, внесений вірусом. Адаптивний імунітет специфічний для чужорідних молекул, як правило, білків, які синтезуються під час інфекції або є частиною віріона. Молекули, які розпізнаються Т- і В-клітинами, називаються **антигенами**[1], і вони можуть містити повні білки, кодовані вірусом, або фрагменти цих білків. Окремі Т- і В-клітини розпізнають лише невеликі ділянки цих антигенів, які називаються *епітопами*, і один білок може містити кілька епітопів, кожен з яких розпізнається *окремими* Т- і В-клітинами.

Адаптивний імунітет можна також дещо умовно поділити на *системний* (якій піклується про організм в цілому) та локалізовану імунну систему слизових оболонок (яка доглядає за поверхнями слизових оболонок). Слизові оболонки охоплюють поверхні дихальних шляхів, кишкового тракту, сечостатевих шляхів та кон'юнктиви ока. Слизова оболонки важливі, оскільки більшість мікроорганізмів, включаючи віруси, проникають саме через ці ділянки. Поверхні слизової оболонки є особливо вразливими, оскільки вони мають велику площу, а їхня фізіологічна діяльність вимагає, щоби вони складалися з голого епітелію (на відміну від шкіри, яка непроникна для вірусів, якщо її не порушити). Системний імунітет та імунна система слизової оболонки відрізняються тим, що клітини та антитіла, що забезпечують системний імунітет, не циркулюють у слизовій оболонці. Проте слизові оболонки мають власний резервуар лімфоцитів, які стимулюються антигенами, щоб забезпечити локалізовану імунну відповідь.

Клітинний адаптивний імунітет. У клітинній формі адаптивного імунітету бере участь велика кількість різних Т-клітин, які можна розділити на два великих типи: *хелперні*

[1] Назва «антиген» походить від англійських слів «генератор антитіл» (antigen - **anti**body **gen**erator).

Т-клітини (T_H) і *цитотоксичні Т-клітини* (T_C; також їх називають цитотоксичними Т-лімфоцитами, застарілою назвою є Т-кілери). Клітини T_H ідентифікуються за наявністю клітинного білка під назвою CD4, вбудованого в плазматичну мембрану, і називаються $CD4^+$ Т-лімфоцитами. Клітини T_C ідентифікуються за наявністю білка під назвою CD8 на поверхні клітини і називаються $CD8^+$ Т-лімфоцитами. Обидва типи Т-клітин мають багато різних форм на основі їх розташування в організмі, сигнальних молекул, які вони використовують і/або на які реагують, і функції, які вони виконують. Однак повний розгляд усіх цих різних типів клітин виходить далеко за рамки цього підручника, і ми розглянемо лише головні особливості адаптивного імунітету.

Запускає клітинний імунітет подія виявлення чужорідного антигену Т-клітиною. Коли це відбувається, Т-клітина посилає сигнали у вигляді цитокінів[1] і хемокінів[2], які залучають додаткові імунні клітини до місця інфекції та посилюють відповідь. Це надалі запускає каскад подій з активацією цілої низки різних процесів, які атакують інфіковані вірусом клітини, обмежуючи масштаби інфекції і в кінцевому підсумку усуваючи її. Це називається запальною реакцією, яка виникає після інфекції. Запальна реакція часто спричиняє деякі симптоми захворювання, які відчуває інфікована людина.

Усі Т-клітини мають на поверхні рецептори, здатні розпізнавати антиген і зв'язуватися з епітопом у молекулі антигена. Кожна клітина має *особливий* рецептор, який *відрізняється* від рецепторів інших Т-клітин за специфікою розпізнавання антигена. Ця різноманітність створюється неточною рекомбінацією в окремих клітинах, яка об'єднує альтернативні кодуючі сегменти генів рецепторів і створює змінні послідовності. Ця соматична різноманітність рецепторів і є основою для різної антигенної специфічності окремих Т-клітин.

Важливо зауважити, що Т-клітини (як Т-кілери, так і Т-хелпери) не розпізнають повні окремі молекули антигенів безпосередньо. Вони здатні розпізнавати чужорідні антигени тільки тоді, коли їх пептидні фрагменти представлені, або як ще кажуть презентовані, на поверхні клітин у комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності (major histocompatibility complex, MHC) клітини. Історично компоненти MHC були ідентифіковані за здатністю індукувати відторгнення трансплантата. Але згодом виявилось, що вони виконують в організмі також інші важливі імунобіологічні функції. Фактично MHC є головною генетичною системою, що визначає функціонування клітинного імунітету.

За деякими особливостями компоненти головного комплексу гістосумісності підрозділяють на два класи – MHC класу I та MHC класу II. Білки, які утворюють ці два класи, хоча і схожі за структурою, відрізняються в деяких подробицях. Але головна відмінність полягає в тому, що компоненти MHC класу I презентують *внутрішньоклітинні* цитоплазматичні білки. Це можуть бути змінені білки самої клітини, або вірусні білки, які синтезуються в цитоплазмі клітини. Білки MHC класу I у людини мають всі клітини, крім еритроцитів.

---

[1] Цитокіни — клас невеликих пептидів та білків (8–30 кДа), що регулюють міжклітинні і міжсистемні взаємодії в організмі, включаючи виживання клітин, стимуляцію або пригнічення їх росту, диференціацію, функціональну активність і запрограмовану загтбель, а також забезпечують узгодженість дії імунної, ендокринної і нервової систем в нормальних умовах і у відповідь на патологічні дії, включаючи появу інфекційних агентів. До цитокінів належать зокрема інтерферони.

[2] Хемокіни - родина невеликих цитокінів, що секретується клітинами хребетних. Хемокіни об'єднує їх невеликий розмір (від 8 до 10 кДа) і наявність 4-х консервативних залишків цистеїну. Хемокіни здатні викликати хемотаксис чутливих до них клітин (звідси їх назва хемотаксичні цитокіни, скорочено хемокіни).

Компоненти МНС класу II презентують *позаклітинні* антигени, які потрапляють у клітини шляхом фагоцитозу або різних форм ендоцитозу. Білки МНС класу II експресують більш спеціалізовані клітини, головним чином дендритні клітини (особливий тип лейкоцитів), макрофаги і В-лімфоцити. Позаклітинний антиген потрапляє до такої клітини, там з ним відбувається частковий протеоліз, і пептидні фрагменти антигенів презентуються на поверхні клітини.

Таким чином, у клітинному імунітеті проти вірусів білки МНС класу I можуть презентувати вірусні антигени, які синтезуються у заражених клітинах, а білки МНС класу II презентують антигени, які містять у віріони.

Т-лімфоцити, які ще не зустрічали антиген, якій вони розпізнають (а кожен лімфоцит своїми рецепторами може розпізнати тільки один специфічний антиген, див. вище), називають *наївними* лімфоцитами. Після першої зустрічі зі своїм спорідненим антигеном Т-клітини мігрують до одного з лімфоїдних центрів, з яких найвідомішими є лімфатичні вузли, розташовані в стратегічних місцях тіла. Тут вони зазнають клональної експансії і диференціюються в *ефекторні* клітини, які також часто називають *активованими* клітинами, які всі націлені на один і той же антиген. Активовані Т-клітини патрулюють тіло і взаємодіють зі своїм антигеном, коли він зустрічається. Таким чином, відповідь не обмежується фізичним розташуванням, де вона була ініційована. Активовані Т-клітини недовговічні і не діляться далі, що обмежує час їх дії, якщо не продовжується стимуляція антигеном. Однак частина цих клітин стає клітинами *імунної пам'яті* (див. нижче), які формують основу для майбутніх реакцій проти того ж антигену. Після перемоги над вірусом популяція Т-ефекторних клітин падає, але не до початкового рівня, оскільки залишається популяція клітин імунної пам'яті.

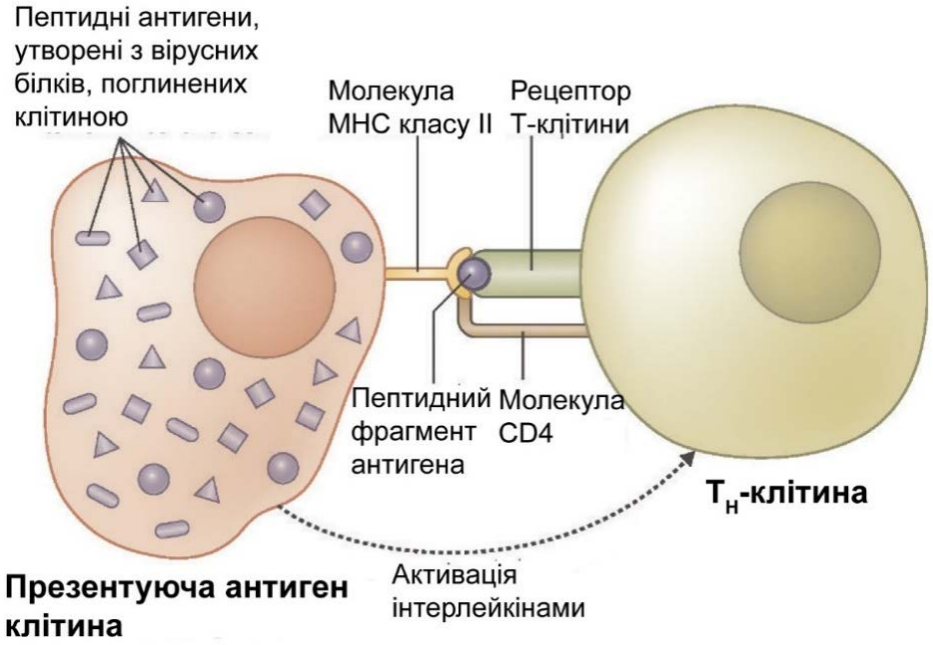
Вище ми згадували про хелперні і цитотоксичні Т-клітини. Яким чином вони функціонують у клітинному імунітеті?

CD4$^+$ Т-хелперні клітини. Основною функцією активованих CD4$^+$ Т-клітин є *допомога*, і лише ці T_H-клітини можуть її надати. Допомога є позитивною регуляторною функцією, яка необхідна для активації всіх Т- і В-лімфоцитів, коли вони зв'язують свій специфічний епітоп чужорідного антигена. Таким чином, вся імунна відповідь залежить від T_H-клітин. Це також основний тип клітин, який інфікує вірус імунодефіциту людини, і стає зрозумілим, чому їхнє знищення є таким руйнівним для імунної системи.

Перший крок у цьому процесі полягає в тому, що дендритна клітина захоплює вірус, що вторгається, або вірусні білки, виділені з інфікованих клітин, шляхом фагоцитозу. Важливо відзначити, що білки потрапляють ззовні дендритної клітини, а не синтезуються всередині клітини вірусом. Після фагоцитозу білки частково руйнуються в лізосомах, а утворені короткі пептиди завантажуються на молекули МНС класу II в цитоплазмі, і цей комплекс транспортується до плазматичної мембрани, де пептид стає доступним (презентованим) для зв'язування з рецептором певної Т-клітини (мал. 6.7).

Кожна Т-клітина має багато копій одного рецептора, який розпізнає специфічний пептидний антиген. Коли клітина, що презентує антиген, і наївна T_H-клітина взаємодіють таким чином, клітина, що презентує антиген, виділяє цитокіни, зокрема інтерлейкін-1 (IL-1), які активують раніше наївну T_H-клітину. Далі активована T_H-клітина мігрує до лімфатичного вузла, де відбувається клональна експансія і утворюються клітини пам'яті. Активована T_H-клітина виділяє низку цитокінів, які стимулюють інші клітини імунної системи. У цей момент клітина T_H може перетворитися на будь-який з кількох підкласів хелперних Т-клітин,

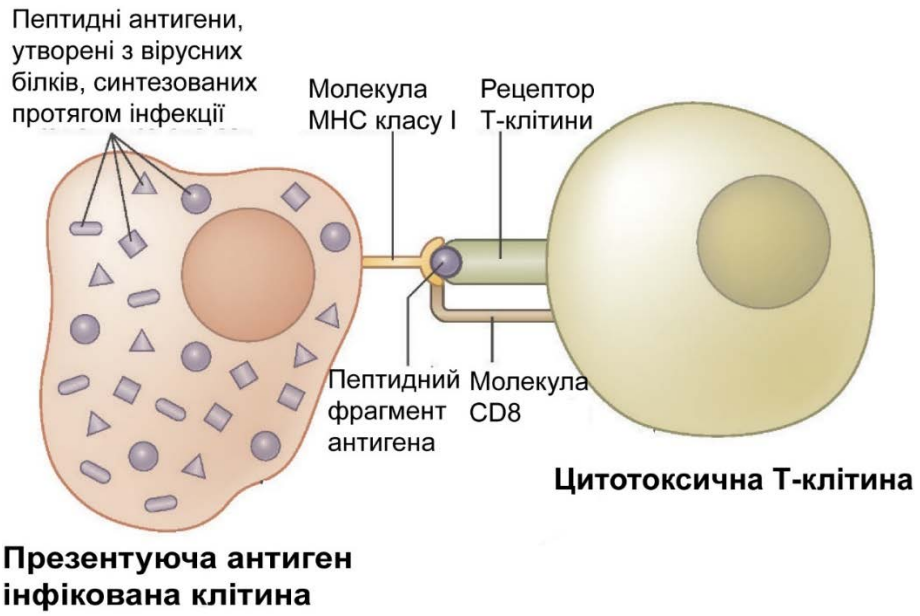
з яких особливо важливі підкласи T_H1 і T_H2. Клітини T_H1 стимулюють активність цитотоксичних Т-клітин і макрофагів, які є частиною запальної відповіді на інфекцію в поєднанні з будь-якими запальними елементами, стимульованими вродженою імунною системою. Клітини T_H2 стимулюють дію В-клітин як частини гуморального імунітету, опосередкованого антитілами.



Мал. 6.7. Схема активації наївної $CD4^+$ T_H-клітини. Клітина, що презентує антиген, зазвичай дендритна клітина, презентує короткий вірусний пептидний антиген на своїй поверхні в комплексі з молекулою MHC класу II. Цей комплекс розпізнається специфічним рецептором на поверхні T_H-клітини разом з молекулою CD4. Ця взаємодія змушує клітину, що презентує антиген вивільняти інтерлейкіни[1], які активують T_H-клітину (за N.J. Dimmock et al., 2016).

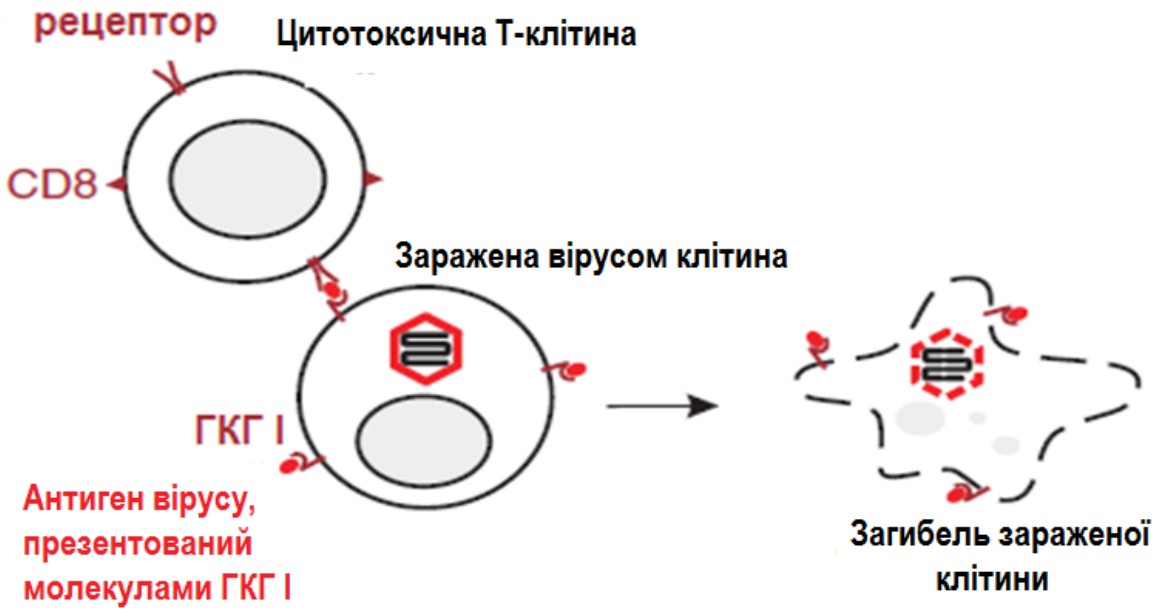
CD8+ цитотоксичні Т-клітини. Так само, як і $CD4^+$ хелперні Т-клітини, $CD8^+$ цитотоксичні Т-клітини також містять кілька копій одного рецептора на своїй поверхні, і ці рецептори є специфічними для конкретних коротких пептидних послідовностей. У цьому випадку, однак, короткі 8-10 амінокислотні пептидні антигени презентуються рецепторам молекулами MHC класу I, а не MHC класу II, і, на відміну від ситуації з презентацією MHC класу II клітинам T_H, пептидні антигени, пов'язані з білками MHC класу I, синтезуються *всередині* клітини в результаті вірусної інфекції. Вірусні білки розщеплюються клітинними протеосомними комплексами, і будь-які пептидні фрагменти завантажуються на білки MHC класу I, які потім переміщуються до плазматичної мембрани, щоб презентувати пептидний антиген Т-клітинам. Т-клітина зв'язується з антигеном, який утримується молекулою MHC класу I, разом з молекулою CD8 (Мал. 6.8). Зв'язування активує Т-клітину і стимулює клональну експансію, і нові клітини подорожують по кровоносній системі для пошуку інфікованих клітин, які презентують цей антиген на своїй поверхні. Клональна експансія посилюється дією кількох цитокінів, включаючи IL-2, що продукується клітинами T_H1. Деякі з нових клітин T_C стануть клітинами імунної пам'яті, щоби забезпечити швидку та надійну відповідь, якщо той самий антиген знову зустрінеться в будь-який момент у майбутньому.

[1] Інтерлейкіни - підродина цитокінів, яка специфічно діє на лімфоцити.



Мал. 6.8. Схема активації наївної CD8⁺ T_C-клітини. Інфікована клітина представляє на своїй поверхні короткий вірусний пептидний антиген у комплексі з молекулою MHC класу I. Цей комплекс розпізнається специфічним Т-клітинним рецептором на поверхні цитотоксичних Т-клітин разом з молекулою CD8. Розпізнавання призводить до активації T_C-лімфоцита і вбивства інфікованої клітини (за N.J. Dimmock et al., 2016).

Після зв'язування рецептора з антигеном, T_C-клітина міцно утримується на інфікованій клітині, яка буде знищена. Клітини T_C атакують інфіковані клітини, вивільняючи секреторні гранули, що містять цитотоксичні білки перфорин, гранзим, гранулізин. Перфорин і гранулізин створюють пори і отвори в плазматичній мембрані інфікованої клітини, які дозволяють проникати гранзимам. Гранзими — серинові протеази, активність яких у клітині активує програмовану загибель клітини шляхом апоптоза (Мал. 6.9).

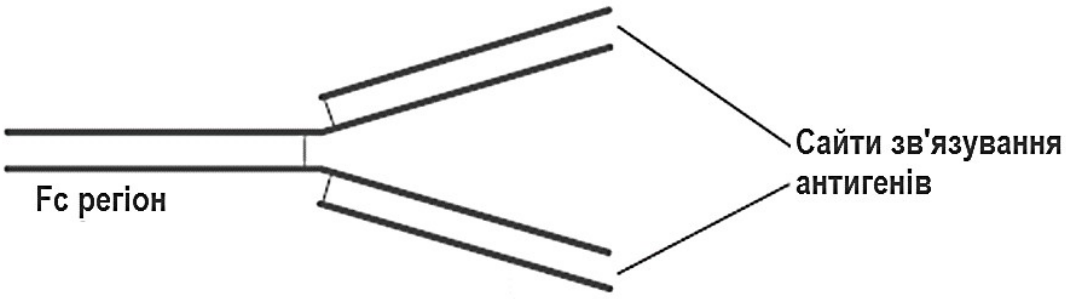


Мал. 6.9. Загибель зараженої вірусом клітини, що індукується цитотоксичною Т-клітиною. Цитотоксична Т-клітина вбиває заражену вірусом клітину після того, як рецептори Т-клітини розпізнають фрагмент вірусного антигена, виставлений на поверхні клітини в асоціації з молекулами головного комплексу гістосумісності класу I (ГКГ I) (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013)..

Гуморальний імунітет, опосередкований антитілами. Наївні циркулюючі В-клітини, що не діляться, експресують В-клітинні рецептори на своїй поверхні. Це специфічні для

певного епітопу рецептори, і кожна В-клітина містить лише один тип рецептора зі специфічністю лише для одного епітопу. На відміну від Т-клітинного рецептора, який може зв'язуватися лише з пептидами, В-клітинний рецептор може бути специфічним майже для будь-якого типу молекул, включаючи пептиди, нуклеїнові кислоти, ліпіди, вуглеводи та синтетичні хімічні речовини. Тому В-клітини, в принципі, здатні реагувати з будь-яким типом чужорідної молекули, з якою може зустрітися організм. Однак під час вірусних інфекцій це, зрозуміло, будуть швидше за все пептиди. Як і у випадку з Т-клітин, кожна В-клітина має свою особливу специфічність рецептора, яку вона отримує шляхом соматичної рекомбінації.

Коли рецептор на поверхні В-клітини розпізнає та зв'язує свій епітоп, В-лімфоцит мігрує до найближчого лімфатичного вузла, де відбувається клональна експансія та диференціація В-клітини, яка перетворюється на клітину плазми крові. Такій активації сприяє дія цитокінів, що секретуються клітинами T_H2 (див. вище). Специфічні для певного антигена антитіла синтезуються клітинами плазми крові, які беруть походження від В-лімфоцитів. Антитіла є глікопротеїнами, що належать до типу білків, які звуться імуноглобулінами (Ig). Молекули антитіл складаються з двох «важких» і двох «легких» поліпептидних ланцюгів (Мал. 6.9), містять два сайти зв'язування антигенів і регіон, відомий як Fc. Сайт антитіла, який розпізнає епітоп антигена, має назву **паратоп** (мал. 6.10). Описано декілька класів імуноглобулінів, щодо противірусного імунітету найбільш важливими є IgG і IgM в крові і IgA на слизових оболонках. У нормі молекули IgG є мономерами, IgA димерами, а IgM пентамерами.



Мал. 6.10. *Структура молекули антитіла. Молекула складається з чотирьох поліпептидів – двох «важких» і двох «легких» ланцюгів, сполучених разом дисульфідними зв'язками. Організація цих поліпептидів створює структуру, що має дві ділянки, які можуть зв'язуватися із специфічними антигенами (паратопи). Fc – фрагмент, що кристалізується (Fragment crystallizable) (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

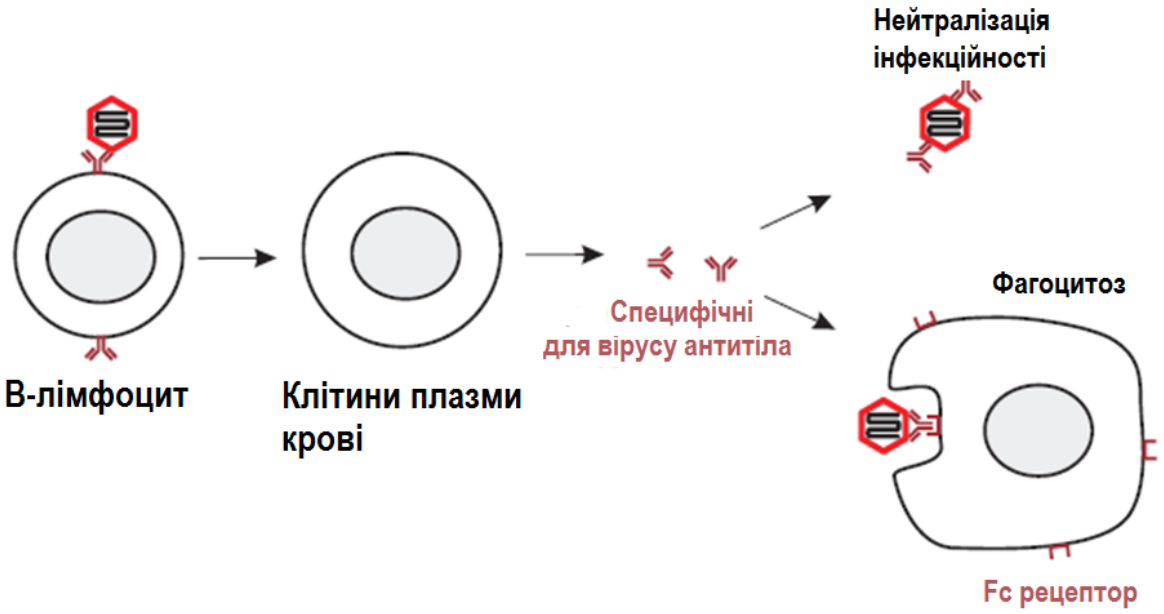
При активації наївних В-лімфоцитів відбувається багато молекулярних подій, зокрема реорганізація послідовностей ДНК і мутації в ділянках, що кодують паратопи. Ці мутації відбуваються з приголомшливо високою частотою і згадуються як приклад гіпермутабельності. У результаті цих подій паратопи антитіл, які продукуються В-лімфоцитами, трохи змінюються і «тонко підстроюються» для ще кращого розпізнавання епітопів антигенів. Детальний розгляд цих подій виходить за межи нашого підручника.

Деякі з цих активованих В-клітин не перетворюються у клітини плазми крові, а стають клітинами імунної пам'яті. Вони при повторному зараженні *тим же вірусом* можуть швидко забезпечити утворення нових клітин плазми крові, які можуть пригнітити інфекцію, перш ніж вона спричинить захворювання. Клітини імунної пам'яті вимагають стимуляції

спорідненим епітопом так само, як і лімфоцити, але активуються легше, ніж наївні В-лімфоцити, оскільки вони реагують на антиген при нижчому співвідношенні рецептор:антиген.

Яким чином антитіла виявляють антивірусну дію? Антитіла, що виробляються активованими В-клітинами, зазвичай секретуються з клітини і вільно циркулюють у сироватці, хоча деякі синтезуються у вигляді мембрано-зв'язаних антитіл, які вставляють у плазматичну мембрану В-клітини. Обидва типи можуть зв'язувати свій специфічний антиген і викликати реакції, які призведуть до елімінації вірусу, або шляхом безпосереднього зв'язування з вірусом, або шляхом зв'язування з інфікованими клітинами, які експресують білки вірусу на своїй поверхні.

Імуноглобуліни можуть боротися з вірусною інфекцією більш ніж одним способом. Деякі імуноглобуліни безпосередньо нейтралізують вірус, тобто вони можуть зв'язуватися з віріонами і призводити до втрати ними інфекційності (мал. 6.11). Такі антитіла називають *нейтралізуючими*. Інші імуноглобуліни є *не-нейтралізуючими* і приєднуються до не-нейтралізуючих епітопів. Вони діють опосередковано, або індукуючи фагоцитоз зв'язаного вірусу через свої Fc-домени, або залучаючи *комплемент*.



Мал. 6.11. *Деякі аспекти противірусної активності антитіл. Антитіла можуть зв'язатися з віріоном і нейтралізувати його інфекційність. Покритий антитілами віріон може бути поглинений фагоцитом після прикріплення Fc-регіонів антитіл до рецепторів на фагоциті (за J. Carter, Vol. Saunders, 20013).*

Декілька типів клітин імунної системи має рецептори для Fc-регіону IgG, що дозволяє цим клітинам прикріплятися до покритих антитілами віріонів або заражених клітин. До типів клітин, що мають рецептори для Fc-регіону, належать нейтрофіли і макрофаги, а також клітини природні кілери (взаємодія вродженого і адаптивного імунітету!). Нейтрофіли і макрофаги є фагоцитами і можуть поглинати покритий антитілами матеріал; проте вони можуть вбивати покриті антитілами клітини без їх поглинання. Природні кілери можуть вбивати інфіковані вірусами клітини або інтегруючи перфоріни в мембрани таких клітин, або індукуючи в них програмовану загибель.

Ще одним наслідком зв'язування антитіл з вірусними антигенами є активація *комплементу*. Система комплементу – комплекс білків, постійно присутніх в крові. Це каскадна си-

стема протеолітичних ферментів, призначена для захисту організму від дії сторонніх агентів, вона бере участь в реалізації імунної відповіді організму і є важливим компонентом як вродженого, так і адаптивного імунітету.

Білки комплементу у присутності певних вірусів зазнають модифікацій, які допомагають захистити хазяїна від інфекції. Одним з антивірусних ефектів є включення комплексів білків комплементу в мембрани віріонів, що мають оболонки, і мембрани клітин, заражених вірусом. Це призводить до деструкції як віріонів, так і заражених клітин. Ще одним антивірусним ефектом білків комплементу є їх здатність покривати віріони. Рецептори білків комплементу є у деяких типів нейтрофілів і макрофагів, які поглинають віріони.

Зв'язування антитіл з віріонами може призводити також до нейтралізації інфекційності. Це може відбуватися різними механізмами. Так, антитіла можуть вивільняти нуклеїнову кислоту з віріона. У дослідженнях з деякими вірусами було показано, що антитіла можуть приєднуватися до віріона, а потім від'єднуватися від нього, залишаючи порожній капсид, позбавлений геному. Крім того, антитіла можуть запобігати прикріпленню віріона до рецепторів на поверхні клітини, маскуючи сайти прикріплення у віріона (антирецептори). Антитіла можуть також призводити до від'єднання від клітини віріонів, що вже прикріпилися. Нарешті, антитіла можуть інгібувати роздягання геному.

Імунна пам'ять. Якість і інтенсивність адаптивного імунітету залежить від того, чи зустрічається хазяїн з цим вірусом перший раз. Як було зазначено вище, деякі В- і Т-лімфоцити можуть виживати впродовж тривалого часу як клітини імунної пам'яті після того, як організм був зараженим вірусом. Клітини пам'яті переходять в стан, що покоїться, з якого вони можуть бути швидко реактивовані, якщо в організмі знову з'являється відповідний антиген. Ці клітини є основою імунної пам'яті, яка може формуватися або в результаті природної інфекції, або за допомогою антигенів вакцини. Таким чином, результат зараження хребетної тварини вірусом багато в чому залежить від того, має або ні хазяїн імунну пам'ять до антигенів цього вірусу. У разі наявності імунної пам'яті, захворювання зазвичай протікає легко або відсутнє взагалі.

6.1.4. Взаємодія між вродженою та адаптивною імунними системами

Усі вроджені та адаптивні імунні реакції взаємозв'язані та організовані. Основною метою вродженої імунної системи є запобігання розвитку інфекції. Це досягається кількома способами, але частина вродженої імунної відповіді включає використання сигналів цитокінів. Ці цитокіни запускають запальну відповідь, залучаючи клітини адаптивної імунної системи, які ініціюють різні елементи, описані вище. Крім того, кілька цитокінів впливають на характер адаптивної імунної відповіді, визначаючи, чи встановлена відповідь T_H1 або T_H2, і сприяючи перемиканню типу в В-клітинах. Багато з цих факторів, які взаємодіють, мають залежний від концентрації ефект, що призводить до дуже тонкого рівня контролю деталей кінцевої реакції, яка досягається.

Недавні дослідження показали, що вроджена імунна система може зберігати певну пам'ять про стимуляцію в клітинах природних кілерах; однак важко сказати, чи були якісь віруси успішно переможені за допомогою лише вродженої імунної відповіді. Навпаки, адаптивна імунна система створює часто довічну пам'ять про патогени, з якими вона зіткнулася. Вона також дозволяє нам дослідити нашу імунну історію минулого.

Узгоджені дії вродженої та адаптивної імунної системи забезпечують низку механізмів, за допомогою яких можна протистояти інфекції. Незважаючи на те, що всі ці механізми

важливі, цілком імовірно, що один аспект реакції буде ключовим для людини в подоланні конкретної інфекції, незважаючи на те, що багато інших реакцій також можуть бути стимульовані. Ефективною є лише ключова реакція, інші реакції менш ефективні або зовсім неефективні. Однак надзвичайно важко визначити, який елемент імунної системи є ключовою відповіддю, необхідною для подолання конкретної вірусної інфекції, і для різних індивідуальних обставин це можуть бути різні відповіді.

6.2. Противірусний імунітет безхребетних тварин

Безхребетні тварини, від комах-переносників вірусів людини і рослин і до медуз і губок, заражаються вірусами. Деякі з цих вірусів мають практичне значення, оскільки вони безпосередньо загрожують життєдіяльності таких підприємств, як вирощування креветок або комерційний збір їстівних двостулкових молюсків. Інші, такі як бакуловіруси, використовуються для біоконтролю лускокрилих шкідників або як вектори для експресії еукаріотичних білків. Понад 500 відомих вірусів, які передаються членистоногими, є надзвичайно універсальними, оскільки вони можуть інфікувати як клітини свого безхребетного, так і хребетного хазяїна.

Хоча багато вірусів безхребетних є помітними в тому чи іншому контексті, загальний обсяг наших знань про різноманітність і біологію вірусів безхребетних досить мізерний. Ми також на диво мало знаємо, як безхребетні контролюють або усувають віруси.

Безхребетні тварини не мають адаптивного імунітету і відповідно специфічної імунної системи, яка базується на використанні лімфоцитів, здатних до клональної експансії, організації імунної пам’яті і точно налаштованої відповіді. При цьому деякі безхребетні, наприклад двостулкові молюски, живуть десятиріччями, постійно фільтруючі воду і захоплюючи з неї потенційних патогенів, включаючи вірусів. У боротьбі з вірусами вони покладаються на вроджений імунітет. Але у безхребетних відсутні клітини – природні кілери, жодна безхребетна тварина не має очевидних гомологів інтерферону. Отже, як безхребетні реагують на віруси?

Передбачається, що зокрема важливу роль відіграє сайленсинг РНК (Мал. 6.6). Дволанцюгова РНК у безхребетних є потужним індуктором противірусного захисту, який активує появу міРНК і руйнування вірусних мРНК в цитоплазмі. Таким чином, можна очікувати, що сайленсинг РНК буде важливим механізмом захисту безхребетних від потенційно всіх РНК-вірусів. Але як щодо ДНК-вірусів? Було показано, що деякі ДНК-віруси у рослин приглушуються системою сайленсингу РНК, можливо, тому що під час їх транскрипції випадково вироблялася длРНК. Інші внутрішньоклітинні противірусні механізми, такі як виробництво ферментів, що редагують РНК і спричиняють мутації вірусних геномів, також можуть діяти у безхребетних.

Отже, хоча дуже ймовірно, що сайленсинг РНК є важливим захистом від вірусів, чи є у безхребетних інші механізми, окрім внутрішньоклітинних, для захисту від вірусної атаки? Стан наших дуже обмежених знань, мабуть, найкраще ілюструє противірусний імунітет у морських ракоподібних. Існує близько 20 різних вірусів, які разом становлять найбільшу загрозу світовій індустрії креветок, але ми дуже мало знаємо про антивірусні механізми в креветках. Вірус синдрому білої плями (родина *Nimaviridae*), який має найбільший вплив на культуру креветок, викликає різке зниження кількості гемоцитів у креветки *Penaeus monodon*, але основні причини цієї реакції неясні. Тканинні екстракти, отримані з блакитних крабів (*Callinectes sapidus*), креветок (*Penaeus setiferus*) і раків (*Procambarus clarkii*),

мають противірусну дію, яка пригнічує реплікацію вірусів Синдбіс, вісповакцини, везикулярного стоматиту, поліомієліту і деяких інших . Інгібітор блакитного краба запобігає прикріпленню вірусів до клітин і має ліпідний компонент, але крім цього він залишається неохарактеризованим. Хоча ми не знаємо про механізми, противірусний захист явно присутній у креветок і може бути посилений шляхом селекції; так, у креветок наявний штам, специфічно стійкий до вірусу синдрому Таури (родина *Picornaviridae*). Крім того, було показано, що креветок можна захистити від вірулентного вірусу синдрому білої плями шляхом попереднього контакту із загалом авірулентним вірусом гіподермального та гемопоетичного некрозу (родина *Parvoviridae*), але механізм такого захисту наразі невідомий.

Таким чином, незважаючи на вочевидь ефективний захист безхребетних тварин від вірусів, на момент написання цього підручника не було охарактеризовано ані клітинних рецепторів, які розпізнають атаку вірусів, наприклад рецепторів, які виявляють присутність длРНК, ані механізмів противірусного захисту, крім сайленсингу РНК. Але вони таки мають бути!

6.3. Противірусний імунітет рослин

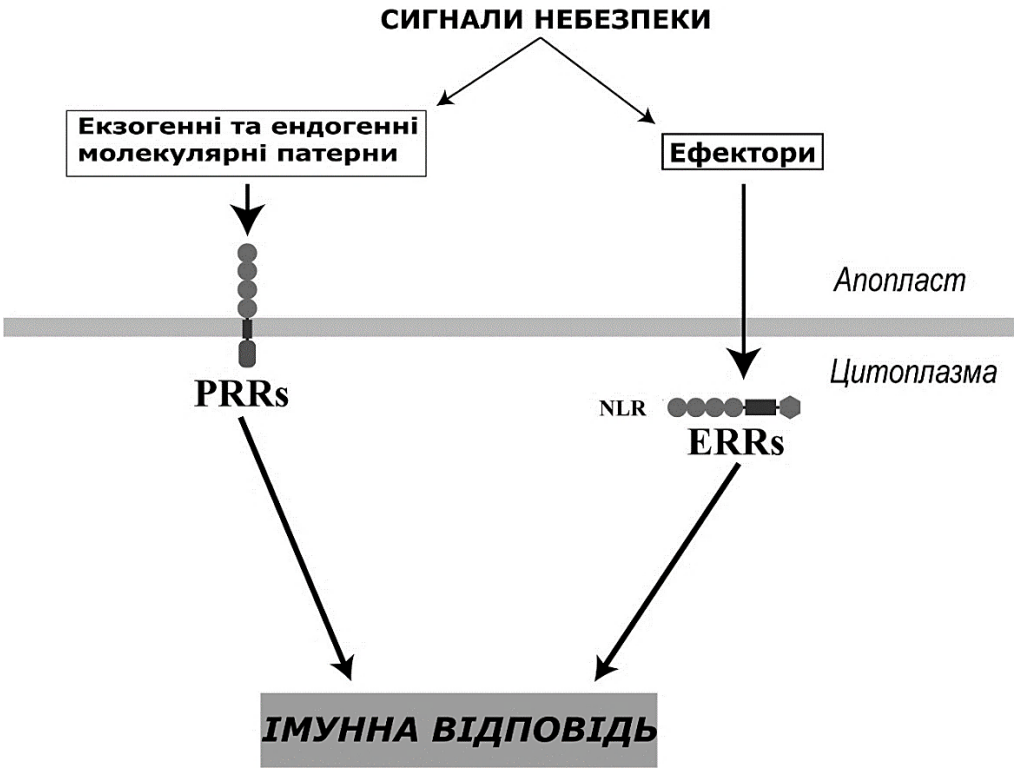
Порівняно зі ссавцями, імунна система рослин організована менш складно. В них відсутня циркуляторна система і, відповідно, немає циркулюючих імунних клітин; більше того, у рослин взагалі немає спеціалізованих імунних тканин і органів. Клітини рослин мають клітинну стінку і не здатні до фагоцитозу. Таким чином, у рослин відсутній адаптивний імунітет і імунна пам’ять. Однак рослини здатні на ефективну імунну відповідь. Яким же чином працює імунітет рослин?

Рослини використовують іншу в порівнянні з вищими тваринами стратегію захисту від патогенів: кожна рослинна клітина володіє сформованим заздалегідь та/або індукованим захистом.

«Оборонні укріплення» рослин організовані у вигляді двох форм активного імунітету (Мал. 6.12). Ці форми розрізняються за типом індукторів захисної реакції і рецепторам, які використовуються рослинами для активації захисної відповіді.

Перша форма запускається консервативними молекулярними патернами, асоційованими з патогенами, або молекулами, що з’являються в результаті впливу патогенів на клітини рослини або, навпаки, впливу рослинних ферментів на мікроорганізми («сигнали небезпеки»). Ці молекулярні сигнатури виявляють рецептори з позаклітинними сенсорними доменами (PRRs), які ініціюють імунну відповідь. Сенсорні домени можуть мати різну молекулярну будову, багато з них має так званий регіон збагачених лейцином повторів. Це загалом подібно ініціації патогенами вродженого імунітету тварин (розділ 6.1.2). У рослин таку форму імунітету називають *імунітетом, що запускається патернами* (pattern triggered immunity, PTI), або *базальним* імунітетом. Прикладами асоційованих з патогенами молекулярних патернів є флагелін бактерій, хітин грибів тощо. Патерном, асоційованим з фітопатогенними вірусами, є зокрема дволанцюгова РНК.

Однак адаптовані до конкретних видів рослин фітопатогени вводять в рослину білкові ефектори, які здатні тим чи іншим чином пригнічувати PTI. Ефектори роблять рослину сприйнятливою до патогену. У відповідь на це рослини в процесі еволюції виробили другу лінію активного захисту - здатність розпізнавати присутність ефекторів патогенів як сигналів небезпеки та ініціювати *імунітет, що запускається ефекторами* (effector triggered immunity, ETI).



Мал. 6.12. *Імунні сенсори рослин запускають захисні реакції після появи сигналів небезпеки. Молекулярні патерни запускають базальний імунітет. Ефектори, які розпізнаються білками стійкості рослин, ініціюють імунітет, який запускається ефекторами. Позначення: PRRs - рецептори, що розпізнають патерни; ERRs - рецептори, що розпізнають ефектори; NLR – білки стійкості рослин, які мають домен зв'язування нуклеотиду і домен збагачених лейцином повторів. Обговорення див. у тексті.*

Присутність ефекторів розпізнають рецептори (effector recognition receptors, ERRs), історично звані білками стійкості рослин. Переважна більшість цих рецепторів є внутрішньоклітинними і мають домен зв'язування нуклеотиду і сенсорний домен збагачених лейцином повторів. Гомологічні білки є і у тварин, у яких вони також переважно задіяні у ініціації імунної відповіді, і вони мають узагальнене позначення NLRs (nucleotide-binding, leucine-rich repeat). У патогенів можуть з'являтися нові ефектори, здатні уникати розпізнавання або придушувати ETI; в свою чергу у рослин можуть розвиватися нові білки NLRs, здатні розпізнати нові ефектори.

Під час активації імунітету імунної відповіді у рослин запускаються складні каскади передавання внутрішньоклітинних сигналів і активується багато захисних систем. Часто (хоча і не завжди) активація імунітету, що запускається ефекторами, призводить до локалізованої програмованої загибелі заражених клітин рослин, так званої *надчутливої відповіді*.

Хоча рослини не мають імунної пам'яті, після зараження патогенами і надчутливої відповіді у рослин може сформуватися так звана системна придбана стійкість. При цьому рослина стає на більш-менш тривалий час (до декількох тижнів) системно більш стійкою до нового зараження патогенами. На відміну від імунної пам'яті ссавців, ця стійкість є неспецифічною і функціонує проти широкого кола патогенів, включаючи гриби, бактерії і віруси, незважаючи на те, яка була природа патогену, первинне зараження яким викликало системну стійкість.

Головною противірусною відповіддю PTI (базального імунітету) рослин є сайленсинг РНК. Протягом транскрипції і реплікації РНК-геномних вірусів утворюються довгі длРНК, можуть також утворюватися структурні олРНК, які мають довгі дволанцюгові ділянки за

рахунок спаровування комплементарних нуклеотидів. Крім того, у рослин показано, що навіть при зараженні рослин ДНК-геномними вірусами дволанцюгові РНК можуть утворюватися при транскрипції за рахунок перекриття і комплементарної взаємодії нуклеотидів мРНК.

Загалом, перебіг сайленсингу у рослин відбувається таким же чином, як і у тварин (мал. 6.6). Але важливою особливістю рослин і принаймні деяких безхребетних тварин є ампліфікація міРНК. Після того, як РНКаза Dicer напрацює первинні молекули міРНК, вони можуть копіюватися РНК-залежною РНК-полімеразою рослин (а рослини мають такий фермент, хоча в реплікації РНК-геномних вірусів він не задіяний!), утворюючи великий пул міРНК, які можуть включатися в комплекс сайленсингу RISC. Також ці вторинні міРНК можуть поширюватися по рослині системно, переміщуючись в незаражені клітини, у яких в свою чергу знов може відбуватися їх ампліфікація. Таким чином, при потраплянні вірусу в незаражені клітини він зустрічає вже розгорнутий антивірусний захист!

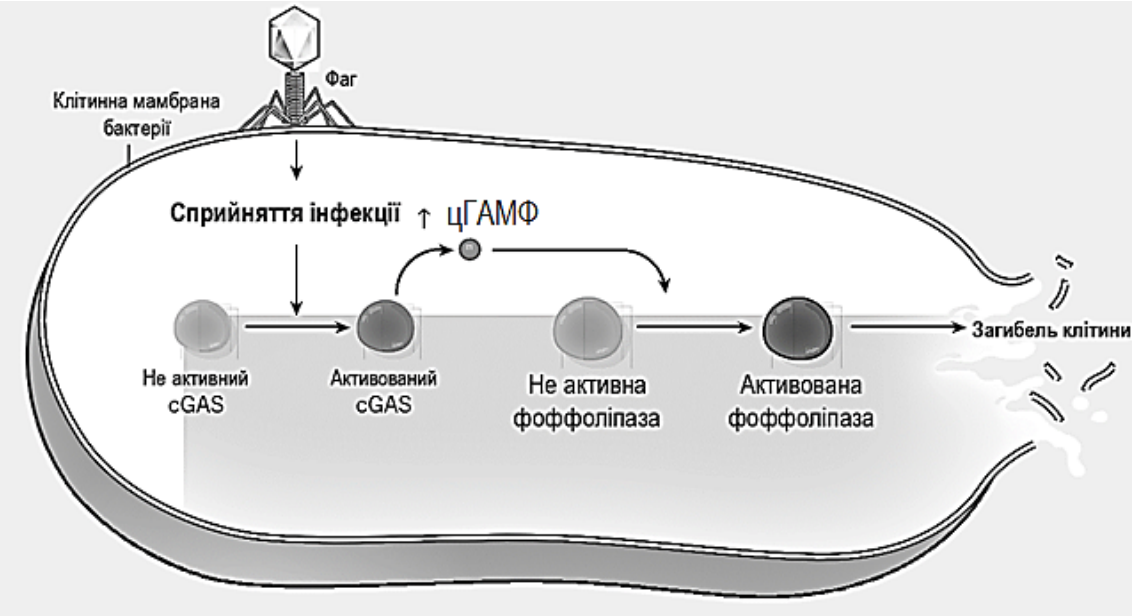
6.4. Механізми стійкості до вірусів у бактерій та архей

Донедавна вважалося, що прокаріоти не мають будь-якої форми механізму активного захисту від фагів. Переважала думка, що бактерії виживали, наприклад, завдяки швидким змінам рецепторів на поверхні клітини, які віруси використовують для входу, або шляхом адаптації до співіснування з помірними фагами, коли бактерія має геном фага, вбудований у свій власний, в той час як діють потужні системи рестрикції/модифікації ДНК, які мінімізують ймовірність успішного вторгнення будь-якої чужорідної ДНК. Проте тепер стало ясно, що це не так – бактерії мають напрочуд багато молекулярних противірусних механізмів, які протидіють вірусній інфекції і навіть передають пам'ять про цю інфекцію дочірнім клітинам! У цьому розділі ми як приклади розглянемо два таких механізми.

Система CBASS. Функціонування цієї системи призводить до активації генетично програмованої загибелі інфікованої бактеріальної клітини. Така самопожертва є корисною для популяції одноклітинних організмів, оскільки запобігає реплікації та утворенню нових частинок фага та його поширенню у популяції.

Першим компонентом цієї системи є білок cGAS (cyclic GMP-AMP synthase, синтаза циклічного ГМФ-АМФ), фермент, який синтезує своєрідний динуклеотид - циклічний гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат (цГАМФ). При потраплянні дволанцюгової ДНК фага у бактерію, ця ДНК сприймається невідомим чином і активується cGAS (Мал. 6.13).

Активована синтаза cGAS синтезує цГАМФ, який є сигнальною молекулою. Підвищення рівня цього динуклеотиду активує фосфоліпазу, яка починає руйнувати фосфоліпіди у мембрані бактерії, що призводить до її загибелі. Ця противірусна система отримала назву CBASS (cyclic oligonucleotide-based anti-phage signalling system, антифагова сигнальна система на основі циклічних олігонуклеотидів).

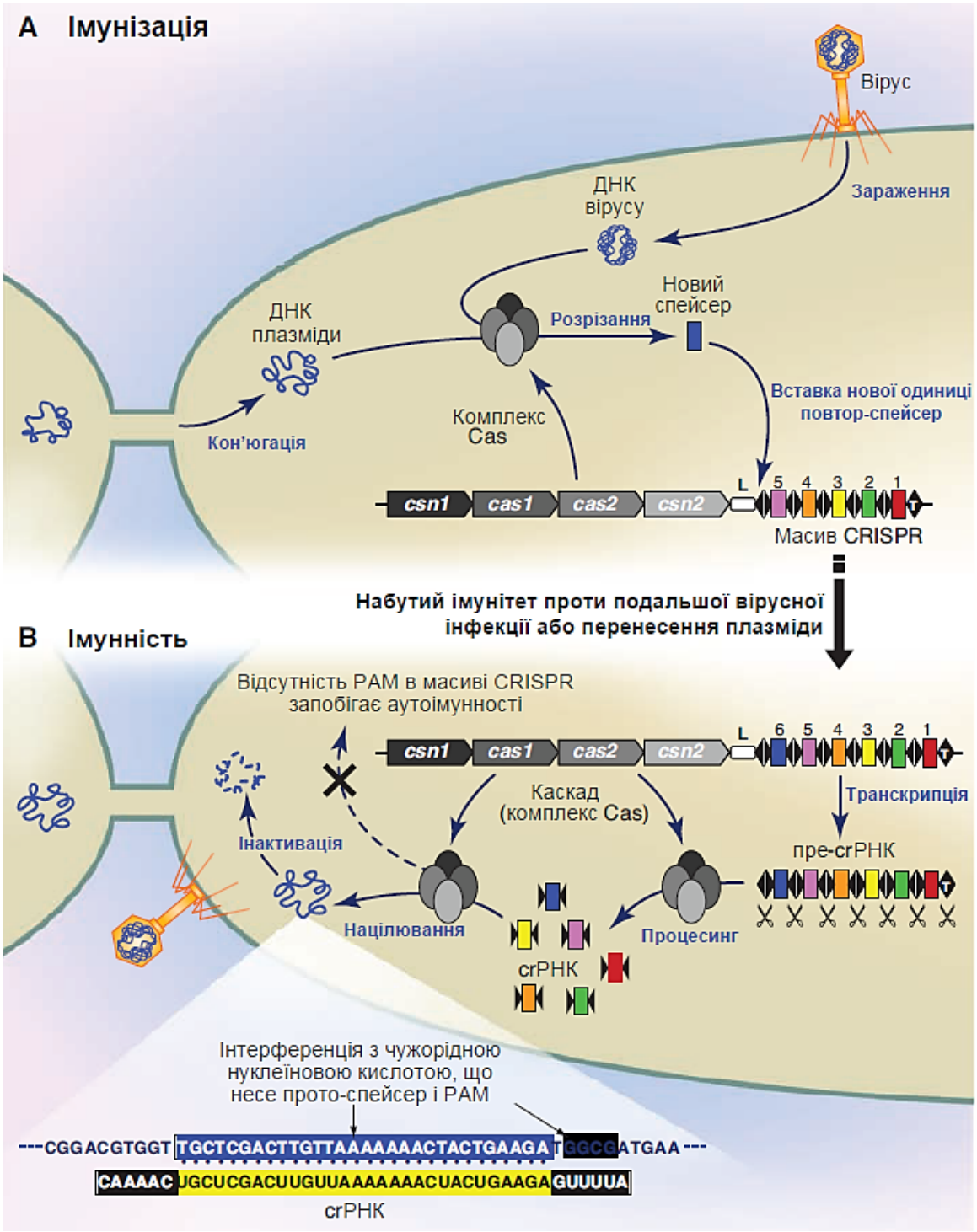


Мал. 6.13. *Після виявлення фагової інфекції активується (через невідомий механізм) фермент cGAS, що синтезує молекули цГАМФ. Підвищення рівня цГАМФ призводить до активації фосфоліпази, яка руйнує молекули фосфоліпідів у мембрані бактерії. Це призводить до загибелі бактеріальної клітини і може зупинити поширення вірусної інфекції на сусідні клітини (за Maxwell K.L., 2019).*

Система CRISPR/Cas. Після того, як почали секвенувати геноми прокаріотів, у бактерій і архей дослідники знайшли дивні генетичні локуси, які складалися з консервативних коротких паліндромних повторів ДНК (зазвичай довжиною 21–48 п.н.), проміжок між якими заповнювали варіабельні послідовності, які називають спейсерами (як правило, від 26 до 72 п.н.). Ці локуси були позначені як CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, згрупований короткий паліндромний повтор із регулярними проміжками). Деякий час залишалось незрозумілим, що являє собою такий локус геному, навіщо він потрібен прокаріотам, але згодом виявилось, що це елемент адаптивного імунітету, який містить набуту противірусну «базу даних»!

Поблизу масиву повторів і спейсерів зазвичай розташовується набір генів *cas* (CRISPR-associated, CRISPR-асоційованих). Білки Cas мають ендонуклеазну активність. Фактично CRISPR/ Cas є прокаріотним аналогом системи інтерференції (сайленсингу РНК) у еукаріот. Як вона працює?

Коли у бактерію потрапляє чужорідна ДНК (бактеріофага або плазміди), її розпізнають білки Cas, вирізають короткі фрагменти і вставляють їх у локус CRISPR як нові спейсери. Цей етап називають *імунізацією* (Мал. 6.14). Цікаво, що конкретний фрагмент ДНК, який стане спейсером, вірогідно обирається не випадково. Послідовність нуклеотидів нуклеїнової кислоти фага або плазміди, яка у подальшому утворить спейсер CRISPR, зветься *прото-спейсером*. Аналіз ДНК фагів виявив консервативні послідовності, суміжні з прото-спейсерами, які називають мотивами CRISPR або мотивами, прилеглими до прото-спейсера, PAMs (proto-spacer adjacent motifs). Саме ці мотиви вказують Cas, де вирізати спейсер, але самі PAMs *не потрапляють* у спейсер.



Мал. 6.14. Схема механізму дії CRISPR/Cas. (А) Процес імунізації: після потрапляння екзогенної ДНК вірусів або плазмід комплекс Cas розпізнає чужорідну ДНК і інтегрує нову одиницю спейсер-повтор на лідерному (L) кінці локусу CRISPR. (В) Імунність: масив повтор-спейсер CRISPR транскрибується в пре-crРНК, яка процесує у зрілі crРНК, які згодом використовуються як напрямні комплексом Cas для інактивації відповідної чужорідної нуклеїнової кислоти (за Horvath P., Barrangou R., 2010).

На наступному етапі *імунності* масив спейсерів-повторів CRISPR транскрибується у довгий первинний транскрипт РНК (так звану пре-crРНК), який далі шляхом процесінгу перетворюється в набір невеликих CRISPR РНК (crРНК). Це зумовлено тим, що більшість повторів в CRISPR є паліндромами, тому відповідні їм ділянки пре-crРНК формують шпильки. Ці шпильки розпізнаються білками-нуклеазами Cas, які і перетворюють пре-crРНК на набір crРНК.

Після цього crРНК об’єднуються з білками Cas в ефекторний комплекс, який розпізнає цільову послідовність (прото-спейсер) в нуклеїновій кислоті фага або плазміди шляхом з’єднання основ з комплементарним ланцюгом дволанцюгової ДНК або одноланцюгової РНК, і індукує специфічне для послідовності розрізання, тим самим запобігаючи реплікації чужорідних генетичних елементів. Важливе значення при цьому мають послідовності PAMs, оскільки заміна нуклеотидів в них інгібує цей противірусний механізм. У свою чергу, відсутність PAM у масиві CRISPR захищає прокаріотну клітину від автоімунної реакції.

Таким чином, на відміну від інших механізмів стійкості до бактеріофагів, CRISPR/Cas функціонує як специфічна адаптивна і спадкова імунна система прокаріот, яка забезпечує набуту стійкість до вірусів і плазмід.

CRISPR/Cas локуси поділяють на декілька типів, але у цьому підручнику ми їх обговорювати не будемо. Важливо, що на базі деяких типів були розроблені методи цілеспрямованого редагування геномів, що обіцяє у подальшому революцію у лікуванні генетичних хвороб людини і тварин.

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- знати головні механізми внутрішнього, вродженого і адаптивного противірусного імунітету хребетних тварин
- знати головні особливості і механізми противірусного імунітету безхребетних тварин, рослин і прокаріотів

РОЗДІЛ 7. РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ВІРУСІВ

Серед віріонів, що були сформовані у тілі зараженого хазяїна, певна мінімальна частина має бути перенесена на нових хазяїв, в яких згодом утворяться нові віріони. Якщо цього перенесення не відбуватиметься, вірус зникне. Єдиною альтернативною можливістю для виживання генів вірусу є його збереження в клітинах у вигляді нуклеїнової кислоти, яка реплікується і передається дочірнім клітинам під час ділення. Але навіть якщо вірус досягає довічної персистентної інфекції у своєму хазяїні, він все одно помре разом із цим хазяїном.

Віруси бактерій та інших мікроорганізмів вивільняються із заражених клітин в середовище, що оточує хазяїна, очікуючи, що навколо будуть присутні інші сприйнятливі клітини. Ці віруси залежать від шансу зустрітися із сприйнятливою клітиною, до якої вони можуть приєднатися через поверхневі рецептори і проникнути всередину.

Віруси багатоклітинних організмів також повинні знайти нову клітину для зараження. Інфекція може поширюватися до клітин, що примикають, або до клітин, що знаходяться на деякому видаленні від зараженої, за допомогою перенесення вірусних частинок кров'ю у тварин або по флоемі рослин. Проте зрештою для свого виживання вірус повинен знайти нового хазяїна.

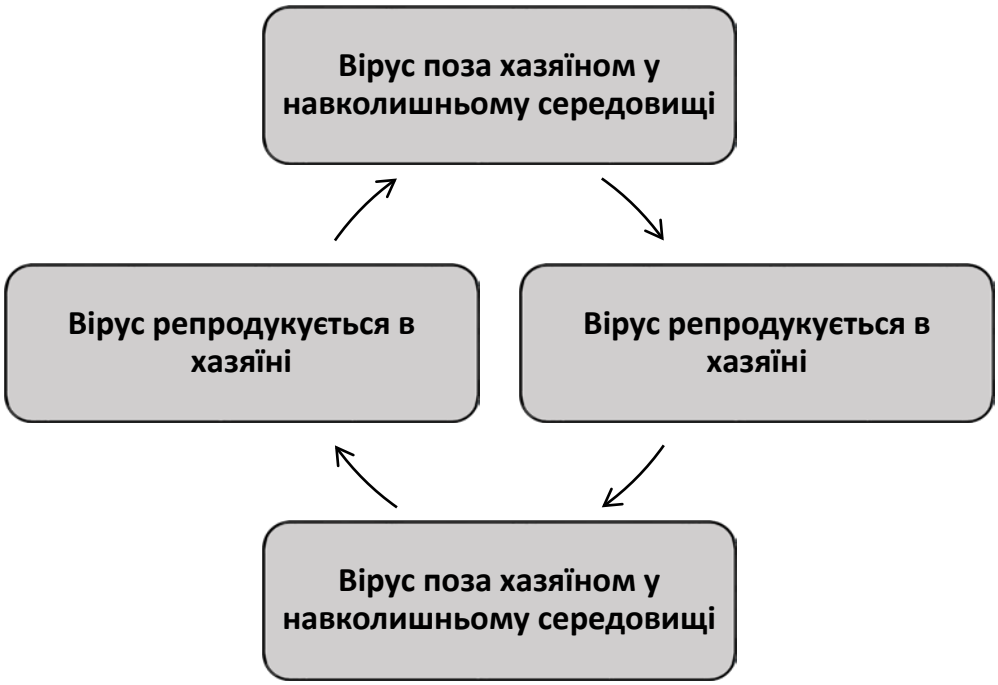
Передавання вірусів між окремими тваринами відбувається через обмежену кількість шляхів. Але фактори, важливі для природного передавання, часто важко дослідити, а деталі погано зрозумілі. У популяціях передавання вірусу є елементом епідеміології, науки про визначення та кількісну оцінку факторів, які визначають рівень захворюваності. Розуміння шляхів передавання вірусів та їх відносного значення є важливою частиною розробки стратегій контролю поширення інфекції.

7.1. Цикл передавання вірусів

Передавання вірусу призводить до послідовного зараження ряду особин-господарів. З точки зору вірусу, цей процес можна розглядати як прохід через тимчасову клітинну фазу реплікації для досягнення збільшення кількості вільного вірусу. Однак за межами хазяїна інфекційність багатьох вірусів за своєю природою нестабільна. Отже, після видалення з організму-хазяїна вкрай важливо, аби такі віруси швидко та ефективно зіткнулися з новим сприйнятливим хазяїном, щоби ініціювати нову інфекцію. Для всіх вірусів ці події становлять цикл (мал. 7.1), в якому деякі віруси проводять більшу частину свого часу за межами своїх господарів, наприклад фаги, які інфікують морські ціанобактерії, тоді як інші проводять більшу частину свого часу всередині господарів, наприклад герпесвіруси, які досягають довічної персистенції у тварин.

Характеристики циклу передавання вірусу можуть змінюватися в залежності від сезону. Багато відомих вірусних інфекцій людей мають виражену сезонність, наприклад вірусів грипу чи сезонних застуд. Як правило, в помірних широтах спостерігається *зимовий пік* захворюваності із більш постійним рівнем захворювань у тропіках, але точні періоди цих піків відрізняються для кожного вірусу. Наприклад, серед вірусів парагрипу (родина *Paramyxoviridae*) 1 і 4 типи мають осінній пік, а тип 3 — пізньої весни. Фактори, що впливають на сезонність, дуже погано зрозумілі, але вважають, що вони включають вплив клімату на виживання вірусу за межами хазяїна та пов'язані з кліматом варіації поведінки хазяїна (підвищений вплив вірусу під час находження в приміщенні), що впливає на ймовір-

ність передавання. Крім того, можливі варіації в перебігу захисних імунних реакцій, можливо, пов'язаних з рівнем освітлення. Жоден із цих факторів не пояснює, чому існують такі виразні відмінності у часі щорічного піку захворюваності різними вірусами.



Мал. 7.1. Цикли передавання вірусу. Вірус проводить час як всередині, так і за межами свого господаря. Деякі віруси проводять більшу частину свого існування в навколишньому середовищі, тоді як інші переважно пов'язані з хазяїном.

Також немає пояснень, де знаходяться такі віруси в сезони, коли вони не викликають захворювання. При цьому або продовжується низький рівень передавання (і відповідно низький рівень захворюваності), достатній для підтримки вірусу, або передавання триває з вищою швидкістю, але зі значно меншими симптомами і ознаками хвороби, так що більшість випадків залишаються нерозпізнаними.

Деякі віруси після зараження міняють поведінку своїх хазяїв, збільшуючи імовірність свого поширення. Ссавці, заражені вірусом сказу, часто стають агресивними; така зміна поведінки збільшує імовірність укусу хазяїном вірусу іншого індивідуума і передавання вірусу через слину. Деякі личинки комах, що живляться на рослинах, після зараження бакуловірусами стають більш рухливими, допомагаючи вірусу поширюватися.

7.2. Бар'єри на шляху передавання вірусів

Щоби вірус заразив окремий організм, він повинен не просто потрапити на його поверхню; він також повинен увійти в клітину і почати процес реплікації. По суті, всі типи клітин у всіх організмах сприйнятливі до інфікування одним або кількома специфічними вірусами. Однак не всі вони однаково доступні для вірусів, які вторгаються ззовні, і не всі вони вразливі до всіх вірусів, які з ними стикаються. У людей та інших ссавців велика частина їх зовнішньої поверхні тіла покрита захисним шаром мертвих клітин шкіри. Цей шар утворює фізичний бар'єр для інфекції; щоби отримати доступ до живих клітин, які можуть підтримувати інфекцію, вірус повинен використовувати проходи в цьому бар'єрі – або природні, такі як ніс і рот, або травми, які пошкоджують шкіру. Для рослин поверхня листків і стебла так само захищена від зараження вірусом стінками рослинних клітин; переважна більшість

зараження вірусами рослин відбувається через пошкодження комахами або механічне порушення цілісності стінок, що оголює чутливі клітини під ним. Нарешті, бактеріальні клітини, як правило, також оточені клітинною стінкою, і віруси, які заражають ці організми, або мають механізми ін'єкції їх генетичного матеріалу в клітину через клітинну стінку, або націлюються на більш вразливі структури, які з'являються з поверхні клітини. такі як ворсинки.

Після того, як вірус подолає фізичні бар'єри для проникнення, з'являються додаткові біологічні бар'єри, які необхідно подолати. По-перше, він повинен зустрітися і взаємодіяти з клітиною, сприйнятливою до інфекції. Якщо вірус не вводиться безпосередньо в клітину з навколишнього середовища (що стосується рослин), то така клітина повинна мати необхідні поверхневі рецептори для проникнення. Клітина також повинна забезпечувати необхідні фактори хазяїна, зокрема білки, від яких залежить цей вірус. Лише деякі типи клітин будуть мати як рецептори, так і внутрішньоклітинні фактори, необхідні для зараження, тому, щоб вірус міг успішно реплікуватися, ці клітини повинні бути доступні через шлях проникнення. Вірусу також доведеться подолати імунітет хазяїна. Таким чином, лише частина вірусів, які долають фізичні бар'єри, спричиняють зараження хазяїна.

7.3. Горизонтальне і вертикальне передавання вірусів

Передавання вірусів потомству протягом різних способів розмноження зветься *вертикальним*. Усі інші випадки передавання вірусів називають *горизонтальним*.

7.3.1. Шляхи горизонтального передавання вірусів у хребетних тварин

Оскільки більша частина поверхні тіла тварин зазвичай несприйнятлива до вірусної інфекції, можна визначити відносно обмежену кількість специфічних шляхів, за допомогою яких вірус може отримати доступ до тіла та ініціювати зараження. У кожному випадку вірус отримує доступ до певних тканин, які обумовлені шляхом проникнення. Встановивши інфекцію там, вірус може поширитися на інші тканини організму, які потім можуть стати основним джерелом вірусу для подальшого передавання, або він може залишатися обмеженим поблизу місця інфекції та репродукуватися там.

Зараження через дихальні шляхи. Респіраторне (або повітряно-крапельне) передавання найчастіше відбувається, коли вірус, який видихає інфікована людина, вдихається іншою людиною, сприйнятливою до цього вірусу. Класичними прикладами цього є поширення вірусів застуди та грипу. Потрапляння цим шляхом може також відбутися для певних вірусів через вдихання частинок пилу, забруднених сечею, яка містить вірусні частинки. Хоча багато вірусів, що поширюються дихальним шляхом, викликають респіраторні інфекції, інші викликають генералізовані інфекції, такі як кір або вітряна віспа.

Після реплікації вірусу в дихальних шляхах вірусні частинки покидають хазяїна у складі маленьких крапель рідини, які є результатом нашої звичайної діяльності, наприклад, розмови, кашлю та чхання. Завдяки вдиханню цих аерозолів іншими особинами викликається повітряно-крапельна інфекція сприйнятливої особи. Важливим є розмір крапель, оскільки краплі великого (>10 мкм) діаметра швидко падають на землю, тоді як дуже маленькі краплі (<0,3 мкм) швидко висихають. Висихання часто викликає інактивацію вірусу, хоча деякі типи вірусів його витримують, тому їх інфекційність може зберігатися на поверхнях, куди падають краплі. Таким чином, краплі середнього розміру є тими, які найбільш ефективно передають інфекцію. Такі краплі можна вдихнути, і їх точний розмір визначить, де вони

потрапляють у дихальні шляхи реципієнта; носові порожнини вистилають перегородки, які видаляють більші частинки повітря, краплі середнього розміру потрапляють до трахеї (горла), а краплі меншого розміру можуть проникати глибоко в легені. Однак навіть потрапляння в цільову тканину не гарантує зараження, оскільки частинки можуть захоплюватися на слизовій оболонці і підійматися війками, що вистилають трубки дихальних шляхів, у процесі, відомому як мукоциліарний потік.

Зараження через шлунково-кишковий тракт. Коли вірус заражає через шлунково-кишковий тракт, це часто називають «аліментарним», «ентеральним» або «фекально-оральним» шляхом передавання інфекції. Остання назва пояснюється тим, що передавання має бути циклічним: отримавши доступ до чутливих клітин та ініціювавши продуктивну інфекцію, вірусні частинки потомства повинні вийти з хазяїна таким чином, щоб дозволити їх подальше поглинання новими господарями, щоб досягти відповідних чутливих тканин. Оскільки відбувається постійне переміщення матеріалу через кишківник, шлях, яким утворений там вірус може виходити з організму найлегше — це фекалії. Вони надалі можуть забруднити джерела водопостачання і опосередковано також забруднюють їжу, яку миють у цій воді, так що новий господар може проковтнути її для завершення циклу. Щоб вірус міг передаватися фекально-оральним шляхом, його частинки повинні зберігати інфекційність під час проходження через кисле середовище шлунку. Ентеровіруси, такі як поліовірус, а також вірус гепатиту А та ротавіруси, всі передаються цим шляхом.

Оскільки віруси, що передаються фекально-оральним шляхом, виділяються з фекаліями, їх поширенню сприяють погані санітарні умови та погана особиста гігієна. Багато з цих вірусів накопичуються у великій кількості, і навіть мікроскопічні частинки/краплі фекального матеріалу містять значну кількість інфекційних віріонів. Деякі вірусні інфекції кишківника (ротавіруси, родина *Reoviridae*) безпосередньо пов’язані з діареєю, яка, хоча це й не доведено, може бути адаптацією до покращення передавання вірусу. Багато інфекцій, які передаються фекально-оральним шляхом, виникають у ранньому дитинстві, оскільки у маленьких дітей особиста гігієна недостатньо розвинена.

Обґрунтовано можна стверджувати, що з покращенням санітарії зменшиться кількість захворювань, спричинених кишковими вірусами. Найчастіше це так і є, проте були й неприємні сюрпризи. В умовах поганої санітарії поліовірус (родина *Picornaviridae*) вражає дуже маленьких дітей, але зазвичай це призводить до безсимптомної кишкової інфекції, після якої дитина отримує довічний імунітет. При покращенні санітарних умов зараження поліовірусом затримується, і вперше заражаються діти старшого віку та молоді дорослі. Але інфекції пізнішого віку призводять до збільшення захворюваності на паралітичний поліомієліт. Подібна вікова відмінність також спостерігається в патогенезі вірусу гепатиту А (родина *Picornaviridae*). На щастя, проти цих вірусів є ефективні вакцини.

Зараження через очі. Око, особливо кон’юнктива (шар клітин, що покриває око), уразливе до інфікування декількома вірусами, включаючи вірус простого герпесу типу 1 та декілька аденовірусів людини. Оскільки інфекційний матеріал в очі зазвичай не вводиться (на відміну від дихальних шляхів або шлунково-кишкового тракту), передавання залежить від випадкового введення вірусу, швидше за все, коли труть очі руками, на поверхні яких є вірус. У свою чергу, руки можуть захопити вірус з поверхонь, на які впав вірус після крапельного видиху або інших форм виділення. Крім того, зараз вважається, що деякі респіраторні віруси поширюються безпосередньо при контакті інфекційних крапель з кон’юнктивою. Природний дренаж до горла потім перенесе вірус до дихальних шляхів.

Передавання вірусів через слину або сечу. Слина є транспортним засобом для передавання декількох вірусів. З одного боку, саме зі слини утворюються багато крапель інфекційного аерозолю, про який йшла мова при обговоренні повітряно-крапельного шляху передавання вірусів. Але деякі віруси також передаються при тісному контакті зі слиною, наприклад під час гри або поцілунку. Для таких вірусів, як цитомегаловірус (ЦМВ) і вірус Епштейна-Барр (обидва родина *Herpesviridae*), передавання слини вважається основним шляхом передавання віріонів.

Сеча традиційно вважається стерильною. Однак є кілька прикладів вірусів, які поширюються у людей через сечу після реплікації в нирках. ЦМВ та поліомавіруси (родина *Polyomaviridae*), такі як вірус BK та JC, виділяються із сечею маленьких дітей і можуть передаватися цим шляхом, хоча для ЦМВ слина, ймовірно, є найважливішою рідиною для передавання. Сеча також важлива при деяких випадках передавання людині вірусів від інших тварин. Віруси лихоманка Ласса (родина *Arenaviridae*) і Sin Nombre (родина *Bunyaviridae*) виділяються із сечею і, можливо, фекаліями їхніх хазяїв-гризунів і заражають людей при вдиханні забруднених пилових частинок або через фоміти (див. нижче).

Передавання вірусів через фоміти. Фоміти — це тверді предмети, поверхні яких можуть бути забруднені вірусом і які таким чином є джерелом інфекції. Виділення інфікованої особи можуть потрапити на поверхню таких предметів, і вірус, який вони містять, залишатиметься на поверхні, коли матеріал висихає. У той час як висихання вбиває багато вірусів, інші виживають протягом тривалого періоду. Щоб фоміти були джерелом подальшого передавання такого стійкого у зовнішньому середовищі вірусу, потрібно, щоби майбутній хазяїн переніс вірус з поверхні до ділянки тіла, через яку вірус потрапить до чутливих клітин. При фекально-оральному передаванні це може бути дитина, яка кладе предмет у рот, або через людину, яка торкається об'єкта перед їжею тощо. Для вірусу гепатиту А (родина *Picornaviridae*) особливо відоме передавання через фоміт (забруднену постільну білизну).

Парентеральне передавання вірусів. Віруси, що циркулюють в крові або інших рідинах організму, можуть передаватися в процесі переливання крові, під час використання забруднених шприців та інших медичних інструментів (штучний шлях), а також безпосередньо в процесі сексуальних контактів (статевий шлях) тощо. Такими шляхами передаються віруси імунодефіциту людини (родина *Retroviridae*) і вірус гепатиту В (родина *Hepadnaviridae*).

Контактний шлях передавання вірусів. При такому шляху передавання зараження відбувається через шкірні покриви, включаючи епітелій зовнішніх статевих органів. Зовнішні покриви вражають віруси папіломи (родина *Papillomaviridae*). У той час як одна група папіломавірусів вражає слизові оболонки в статевих шляхах, інша група вражає шкіру. Але віруси не можуть здолати ороговілий зовнішній захисний шар. Щоби досягти шару базальних епітеліальних клітин, що діляться, віруси використовують існуючі мікропошкодження. Для папіломавірусів інфекційний процес обмежується шкірою, де вони викликають утворення папілом, шкірних бородавок. Але більш серйозні пошкодження шкіри, що глибоко проникають, відкривають шлях до системних інфекцій низки інших вірусів. І віруси імунодефіциту людини, а також гепатитів В і С, можуть дуже легко заразити цим шляхом Потрапляючи в кров, ці віруси можуть переміщатися по тілу, поки не зустрінуть сприйнятливі клітини

Окремим випадком є вірус сказу (родина *Rhabdoviridae*), який може проникати в організм тварини і людини під час обслинювання шкірних покривів. Навить якщо шкіра не має

пошкоджень (наприклад, хворий собака не встиг вкусити), слина собак містить гіалуронідазу, яка полегшує проникнення вірусу в кров через шкіру.

7.3.2. Вертикальне передавання вірусів ссавців

У тварин вертикальне передавання відбувається між матір'ю та плодом/дитиною. У такому випадку з'являються деякі нові шляхи передавання вірусу, які і згадуються як вертикальне передавання. По-перше, може відбутися внутрішньоутробне передавання, найчастіше трансплацентарна інфекція. По-друге, існує ризик зараження дитини вірусом при контакті з вірусними ураженнями або інфекційними рідинами організму матері під час природних пологів. Нарешті, передавання вірусу може відбутися з грудним молоком під час годування. Передавання вірусу від матері до дитини всіма іншими шляхами, які можуть відбуватися і між будь-якими двома особами, є горизонтальним передаванням.

Вірусна інфекція плода або немовляти може мати тяжкі наслідки через відсутність повноцінної імунної відповіді. Зараження вірусом краснухи (родина *Togaviridae*) проявляється у дітей та дорослих у гіршому випадку у вигляді легкого висипу на шкірі; часто інфекція є безсимптомною. Однак у вагітних жінок вірус може проникати через плаценту і розмножуватися у тканинах плода. В результаті плід може загинути або народитися з серйозними вродженими вадами розвитку, які зачіпають серцево-судинну і центральну нервову системи, очі і слух.

Вертикальне передавання ВІЛ новонародженим було головною ознакою перших років пандемії, але ризик цього можна значно знизити за допомогою антиретровірусної терапії матері перед пологами та уникнення грудного вигодовування.

7.3.3. Горизонтальне і вертикальне передавання вірусів рослин

Горизонтальне передавання вірусів рослин відбуваються контактним шляхом при зіткненні листя або коріння заражених рослин зі здоровими. На листках, що труться один об один, виникають дрібні ранки (наприклад, поломка волосків), через які сік, що містить вірусні частки, може перейти з однієї рослини до іншої. При цьому джерелом вірусної інфекції може бути не тільки хвора рослина, а й сільськогосподарській інвентар, який може переносити вірусні частинки від хворих рослин на здорові. Таким чином, загрозу становить поширення вірусів контактним способом в період догляду за рослинами, пов'язаного з їх ушкодженнями (культивація, пасинкування томату, ломка листя тютюну тощо). Тому при виконанні робіт по догляду за рослинами обов'язково треба контролювати стан рослин у посівах і, якщо треба, стерилізувати використовуване знаряддя.

Контактне передавання можливе тільки для вірусів, що накопичуються в епідермальних клітинах (віруси зі флоеми контактно не передаються) і здатних зберігатися в соку поза клітинами рослини. І наприклад для вірусу тютюнової мозаїки, вірусу Х картоплі і вірусу жовтої мозаїки турнепсу контактний шлях передавання є домінуючим.

Вертикальне поширення вірусів рослин можливо при розмноженні вегетативними частинами і насінням. У вегетативних частинах заражених рослин - бульбах, цибулинах, черешках - зберігаються всі віруси, і найбільшої шкоди віруси завдають рослинам, які розмножуються вегетативними органами - картоплі, квітковим і плодово-ягідним культурам. Більшість вірусів, які передаються насінням, розташовуються у зародку, який придбаває віруси або із зараженої яйцеклітини, або із заражених пилкових зерен. Насінням передається лише близько 20% відомих вірусів рослин, зокрема віруси штрихуватої мозаїки ячменю,

мозаїки люцерни, мозаїки квасолі і сої, крапчастості нуту, кільцевої плямистості малини і деякі інші.

7.4. Передавання вірусів переносниками

Багато вірусів тварин і переважна більшість вірусів рослин переносяться між хазяями за допомогою організмів, які живляться на цих хазяях. Це так званий *векторний*[1] шлях передавання вірусів.

7.4.1. Віруси тварин, що передаються переносниками

Чимало векторів вірусів хребетних тварин є членистоногими, або артроподами (комахи, кліщі, Мал. 7.2). Тому віруси хребетних, які переносяться членистоногими, часто називають *арбовірусами* (від **ar**thropod-**bo**rne viruses). Зверніть увагу, арбовіруси – це не систематична категорія!



Мал. 7.1. *Приклади векторів, які спроможні передавати віруси хребетних тварин (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Ці віруси вводяться в нового господаря при укусі комахи, яка раніше живилася інфікованою особиною і таким чином підхопила вірус. У більшості випадків комаха є більш ніж пасивним носієм; вірус реплікується всередині неї, і це необхідно для подальшого передавання. Приклади арбовірусів, які вражають людей, включають віруси жовтої гарячки, кліщового енцефаліту і гарячки Денге (усі - родина *Flaviviridae*) тощо. Існують також віруси домашніх тварин, які поширюються цим шляхом, наприклад вірус «блакитного язика» (родина *Reoviridae*).

Передавання комахами створює можливість *зоонозної* інфекції. Зоонози (дав.-гр. ζῷον - тварина, νόσος - хвороба) - узагальнена назва таких інфекційних хвороб, що звичайно поширені у тварин, але здатні іноді передаватися від тварин до людини. Якщо інфекційні хвороби зустрічаються тільки у людини, їх називають антропонозами (дав.-гр. ἄνθρωπος - людина, νόσος - хвороба). Зоонозна інфекція можлива, якщо комаха може харчуватися особинами більш ніж одного виду хазяїв і, отже, передавати вірус між ними. У деяких випадках вірус може реплікуватися та передаватись у більш ніж одному виді тварин і переміщатися між ними за допомогою відповідних векторів. Наприклад, вірус жовтої гарячки може інфікувати як мавп, так і людей через відповідні види комарів-переносників.

Віруси можуть передаватися від свого природного хазяїна до незвичайного хазяїна без досягнення стійкого подальшого передавання між особинами незвичайного виду хазяїна. Коли вірус передається людині таким чином, це називається «зоонозною передачею». Хоча внаслідок цього інфекція людини не передається або погано передається іншим людям, ча-

[1]Вектор - від лат. vector - той, що несе.

сто захворювання, що виникає в результаті таких інфекцій, є тяжким. Незалежно від тяжкості спостережуваного патогенезу, ця ситуація називається *тупиковою інфекцією*, що означає, що вірусу не вдалося розмножитися в цьому хазяїні в достатній мірі для подальшого передавання. У таких випадках хазяїн-реципієнт відомий як *тупиковий хазяїн*, тоді як природний хазяїн називається *резервуарним хазяїном*.

Прикладами зоонозних інфекцій є вірус сказу (родина *Rhabdoviridae*), який передається через слину при укусі інфікованої тварини (кажан, собака, єнот, лисиця тощо), а також різні віруси, які передаються через сечу гризунів. Ще одним прикладом є вірус Західного Нілу (родина *Flaviviridae*), арбовірус, який передається людям і коням від свого резервуарного хазяїна, диких птахів. Визначення зараження як тупикова інфекція не є абсолютним для будь-якого вірусу. Особи, інфіковані вірусом Західного Ніла або сказом, можуть бути джерелом подальшого передавання за незвичайних обставин, особливо якщо вони стають донорами крові або органів.

Усі віруси мають визначений діапазон господарів, і для більшості вірусів цей діапазон досить обмежений. Імовірність того, що вірус зможе поширюватися від одного виду до іншого, найбільша для видів-господарів, які близько споріднені. Якщо зоонозний вірус все ж утвердився в популяції людини з постійним передаванням між людьми у процесі еволюції вірусу шляхом мутацій та добору, то це більше не буде зоонозною інфекцією, а стане новою інфекцією людини. Відомо, що кілька вірусів людини виникли як зоонози, які потім утвердилися у популяції людей. Вірус імунодефіциту людини (ВІЛ, родина *Retroviridae*) і вірус кору (родина *Paramyxoviridae*) є прикладами такого явища. ВІЛ передався людям від шимпанзе та інших видів мавп, а кір походить від вірусу чуми великої рогатої худоби.

7.4.2. Віруси рослин, що передаються переносниками

З допомогою векторів передається переважна більшість вірусів рослин. Клітина рослини оточена товстою клітинною стінкою, яка є істотним бар'єром для вірусу, і ця перешкода може бути подолана за допомогою переносників. Рослину як джерело їжі використовує широке коло організмів, і деякі з них, особливо безхребетні, можуть бути переносниками вірусів (Мал. 7.3). Фактично коло рослин-хазяїв певного вірусу обумовлено видами рослин, на яких харчується переносник цього вірусу.



Мал. 7.3. Приклади векторів, які здатні передавати віруси рослин (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Перенесення фітопатогенних вірусів переносниками традиційно підрозділяється відповідно до природи асоціації вірусу з вектором. Віруси, передавання яких пов'язана тільки зі стилетом і які зберігаються деякий час на ротовому апараті комахи, називають *неперсистентними*, оскільки вони можуть бути втрачені комахою після харчування. Віруси, які знаходяться в передній частині кишківника вектору, називають *напівперсистентними*, і ті віруси, які проходять через кишківник в гемолімфу і потім в слинні залози, називають *персистентними*, оскільки часто вони можуть передаватися комахою протягом всього її життя.

Персистентні віруси в свою чергу підрозділяють на *пропагативні*, які здатні реплікуватися як в рослині, так і в комасі, і *циркулятивні*, які можуть реплікуватися тільки в рослині.

Аналіз фітопатогенних вірусів показав, що їх геноми кодують поліпептиди з доменами, необхідними для передавання комахами. У більшості не циркулятивних вірусів ці домени маються на білку оболонки або іншому білку, відомому як хелперний компонент (HC). Наприклад, у вірусів роду *Potyvirus* (родина *Potyviridae*) хелперний компонент, що позначається HC-Pro, є неструктурним білком з масою 53-58 kDa і функціонує, як вважають, у вигляді димеру. Цей білок є свого роду містком між вірусом і вектором. Один домен цього білка зв'язується з білком оболонки вірусу, а інший домен з поки не охарактеризованим рецептором ротового апарату або слини вектору.

Подібна гіпотеза містка використовується для пояснення механізму прикріплення напівперсистентних вірусів, наприклад роду *Caulimovirus* (родина *Caulimoviridae*). У вірусу мозаїки цвітної капусти показано, що білок, який кодується геном II, має два функціональних домени, один з яких взаємодіє з вірусною частинкою, а другий зі специфічним сайтом на стилеті попелиці. Більш того, цей же білок організовує вірусні частинки у великі включення всередині цитоплазми клітини господаря для збільшення шансу отримання комахою вірусу.

У персистентних вірусів родини *Geminiviridae*, білок оболонки є ключовим компонентом прикріплення до вектора і специфічності для вектора. Показано, що обмін білками оболонки між вірусом мозаїки маніоку, що передається білокрилкою, і вірусом кучерявості верхівок буряка, що передається цикадкою, привів до обміну і векторами.

Персистентні пропагативні віруси, такі як вірус плямистого в'янення томатів (родина *Tospoviridae*), часто мають ліпідну оболонку, в яку включено два кодованих вірусом глікопротеїни, G1 і G2. Присутність цих білків важливо для отримання вірусу личинками трипсів. Однак після того, як личинка його отримала, надалі вірус може передаватися і личинками, і дорослими особинами. У білка G2 для прикріплення важливий мотив RGD (аргінін- гліцин-аспарагінова кислота), і цей білок прикріплюється до білка масою 50 kDa в середній частині кишківника личинки. Передбачається, що після прикріплення в клітини комахи вірус потрапляє за допомогою рецептор-залежного ендоцитозу, подібно до багатьох вірусів тварин.

Низка вірусів передається *фітопатогенними нематодами*, які населяють ґрунт, при харчуванні на коренях інфікованих рослин. Показано, що віруси прикріплюються до поверхні харчових каналів, але відсутні докази реплікації вірусів у нематодах. У прикріпленні грає роль білок оболонки, передбачається також, що певну роль можуть відігравати хелперні білки, але для нематод це не є доведеним.

Низка вірусів передається *фітопатогенними грибоподібними протистами*, які населяють ґрунт, зокрема видами родів *Polymyxa* і *Spongospora*, а також видами грибів роду *Olpidium*. Ці грибоподібні організми і гриби переносять віруси або неперсистентно, коли

віруси абсорбуються на поверхні рухомих зооспор, або персистентно, коли віруси опиняються всередині зооспор або спор у стадії спокою. Ці організми самі по собі зазвичай не є високо шкідливими патогенами рослин, але коли вони утворюють асоціації з корінням рослини, віруси переносяться в рослину. Непрямі дані вказують, що в процесі передавання вірусів важливою є вторинна структура білка оболонки вірусу, але деталі передавання в даному випадку погано зрозумілі.

7.5. Переміщення вірусів на великі відстані

Різними способами віруси можуть переміщатися на значні відстані. У нові регіони віруси можуть переноситися вітром або водою. Наприклад, спалах ящуру на острові Вайт в протоці Ла-Манш в 1981 р. був ініційований вірусом, перенесеним повітрям з Бретані, яка знаходиться на відстані більше 250 км від острова.

Віруси птахів, риб, людей та інших хазяїв переміщаються усередині своїх хазяїв в інші частини планети в результаті міграції, подорожей або експорту тварин. Наприклад, завдяки міграції птахів переноситься вірус пташиного грипу (родина *Orthomyxoviridae*), завдяки подорожам людей переноситься вірус SARS-Cov2, збудник ковід19 (родина *Coronaviridae*), завдяки експорту тварин переноситься вірус віспи мавп (родина *Poxviridae*).

Більше того, віруси можуть транспортуватися і на неживих матеріалах, наприклад, вірус ящуру (родина *Picornaviridae*) на соломі і сільськогосподарських машинах і навіть на взутті людей. Через це у випадку спалаху ящуру карантинні заходи включають суворий контроль доступу людей, транспортних засобів та різного обладнання до стада і забезпечення регулярної дезінфекції місць утримання тварин, обладнання, одягу та взуття, транспорту.

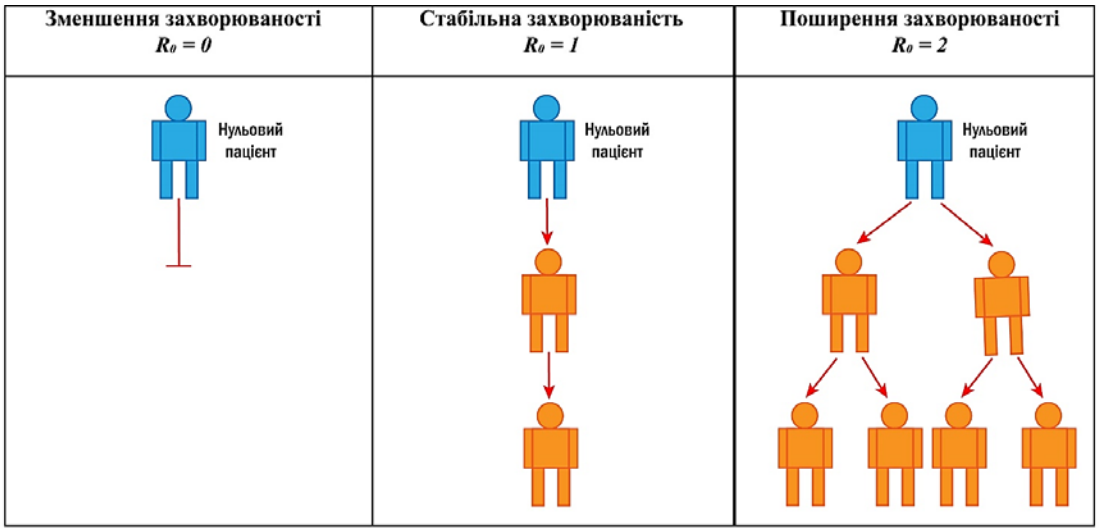
7.6. Епідеміологія вірусних інфекцій

Епідеміологія (грец. ἐπιδημία - має всенародне поширення, λόγος - вчення) - це дослідження параметрів, від яких залежить і які пояснюють частоту захворювань у популяції. Це не є винятковим для інфекційних хвороб, але має велике застосування в розумінні популяційної динаміки інфекційних захворювань та успіху стратегій контролю хвороби, таких як вакцинація. Таким чином, епідеміологія тісно пов’язана з дослідженнями передавання вірусу, оскільки саме передавання вірусу визначає швидкість його поширення в популяції.

Дуже важливим параметром для визначення розповсюдження вірусу є його заразливість, або контагіозність. Іншими словами, наскільки легко його придбати? Частково це визначається шляхом його передавання, а також особливостями біології вірусу, які визначають, наскільки ймовірно, що окрема інфекційна частинка вірусу, отримавши доступ до хазяїна, справді зможе ініціювати інфекцію. Контагіозність можна кількісно оцінити експериментально, якщо відома відповідна система господаря з точки зору *мінімальної інфекційної дози* 50 (МІД$_{50}$), тобто мінімальної кількості віріонів, яка заразить 50% індивідуумів-господарів, які отримують таку дозу.

З точки зору епідеміології, на популяційному рівні, контагіозність відображається так би мовити в середній інфекційності інфікованої особини. Кількісно це визначається як *базове репродуктивне число*, R_0, тобто середня кількість осіб, що безпосередньо інфікуються хворим упродовж усього заразного періоду хвороби за умови потрапляння хворого до повністю незараженої популяції. Якщо $R_0 < 1$, то інфекція згасне в довгостроковому періоді. Але якщо $R_0 > 1$, то інфекція буде поширюватися (мал. 7.4).

Загалом, що більшим є значення R_0, то складнішим стає контроль епідемії. Для простих моделей і вакцини зі 100% ефективністю, пропорція популяції, яку необхідно вакцинувати для запобігання сталому поширенню інфекції, розраховується як $1 - 1/R_0$. На базове репродукційне число впливає низка чинників. По-перше, це ступінь і тривалість виділення вірусу хворим хазяїном. Чим більше вірусу виділяється від типового хазяїна і чим довший період часу цього виділення, тим більша ймовірність, що інфекція буде передана іншим особам. Другим фактором є шлях передавання. Очевидно, від інфікованої людини набагато більше людей щодня буде заражатися при респіраторній передавання, ніж наприклад статевим шляхом. Третій фактор – це частка сприйнятливих людей у популяції – деякі вже можуть мати імунітет до вірусу.



Мал. 7.4. Перебіг інфекції у популяції в залежності від значення базового репродуктивного числа R_0.

Метою контролю під час спалаху інфекції є маніпулювання цими характеристиками, щоб зменшити значення R_0 до рівня нижче 1 (мал. 7.4). Шляхи досягнення цього включають вакцинацію для зменшення частки сприйнятливих осіб, карантин інфікованих осіб та обмеження на переміщення та збори населення, що зменшує частоту потенційно інфекційних контактів. Для інфекцій тварин і рослин дуже важливою стратегією боротьби є вибракування – знищення інфікованих хазяїв, щоб зменшити резервуар інфекційності. Для арбовірусів контроль популяцій комах-переносників є важливим для захисту людей.

Слід розуміти, що для багатьох вірусів лише частина інфікованих осіб має симптоми і ознаки хвороби. Іноді частка тих, хто має безсимптомну інфекцію, становить більшість інфікованих осіб. З точки зору передавання вірусу, такі особи є дуже важливим джерелом інфекції, тому заходи контролю повинні враховувати таку ситуацію.

7.7. Зберігання вірусної інфекції в популяціях

Як правило, після того, як тварина-господар завдяки імунній відповіді здолає вірусну інфекцію, в її організмі більше не буде вірусу і цей господар буде несприйнятливий при майбутніх зустрічах з цим вірусом. Саме цей фундаментальний принцип використовується для досягнення довготривалого захисту від інфекцій шляхом вакцинації. Таким чином, вірус зі стабільними антигенами поступово вичерпує свій запас нових хазяїв у існуючій популяції і може покладатися тільки на новонароджених, які забезпечують сприйнятливих особин, до яких він може передаватися і таким чином підтримувати себе. Тому для таких вірусів існує

мінімальний розмір запасу нових сприйнятливих особин в популяції хазяїна. Якщо такий запас виявиться нижчим мінімального, вірус зникне, якщо не буде повторно занесений ззовні. Прикладом такої ситуації є вірус кору.

Одним з еволюційних рішень цієї проблеми є встановлення стабільної стійкої асоціації вірусу зі своїми хазяїнами, тобто персистентної інфекції. Ця стратегія значно знижує мінімальний рівень оновлення популяції-господаря, який необхідний для збереження вірусу в цій популяції. Багато вірусів зі стабільними антигенами, які вражають тварин і людей, розробили таку стратегію; наприклад, всі герпесвіруси викликають постійні інфекції з можливістю передавання вірусу протягом усього життя хазяїна.

Альтернативна стратегія полягає в мінливості антигенів вірусу. Таким чином, імунна пам'ять, яка виникла у людини під час усунення попередньої інфекції, не захистить її при подальших зустрічах з цим вірусом. Після відповідного періоду часу, протягом якого вірус заражає інших людей і набуває змінені антигенні сайти шляхом випадкових мутацій, вірус буде виглядати «новим» для імунної системи, і тому матиме ще один шанс заразити того самого хазяїна. Ця стратегія зазвичай зустрічається у вірусів з РНК-геномами, оскільки їх цикли реплікації включають дію РНК-залежних РНК-полімераз, які не в змозі виправляти помилки невірно спарованих комплементарних нуклеотидів і тому мають набагато більший рівень помилок, ніж ДНК-полімерази. Вірус грипу А є класичним прикладом вірусу, який підтримується за допомогою цього механізму. Однак важливо зазначити, що не всі РНК-віруси демонструють варіацію антигенів, незважаючи на те, що вони мають схильність до помилок реплікації; як вірус поліомієліту, так і вірус кору мають стабільні антигени.

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- знати загальні механізми і особливості передавання вірусів тварин і рослин
- розуміти роль векторів у передаванні вірусів і загальні принципи векторного передавання вірусів
- знати головні засади епідеміології вірусних інфекцій

РОЗДІЛ 8. ВІРУСНИЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ

8.1. Загальні уявлення про канцерогенез

Нормальні клітини у тілі людини, як і у культурі, яку створюють зі здорової тканини, старіють і гинуть після фіксованої кількості поділів, близько 50. Як би ретельно за ними не доглядали, термін їх життя обмежений. Але ракові пухлини людини і тварин є безсмертними і з'являються у результаті *безперервної* проліферації клону клітин, що походить від нормальних клітин тіла. Перетворення здорових клітин на пухлинні, так звана *трансформація*, може відбутися в результаті різноманітних подій, як-от мутації, активація онкогенів та інактивація супресорів пухлин.

Ключовою подією в перетворенні клітин на безсмертні, в їх іммортализації[1], є реактивація *теломерази*, ферменту, який добудовує спеціалізовані послідовності ДНК на кінцях хромосом, теломер; відсутність цього ферменту в соматичних клітинах призводить до прогресуючого скорочення довжини теломер при кожному поділі клітини, що є важливим чинником старіння (згадайте Мал. 4.38, проблему скорочення лінійних молекул ДНК при реплікації). Але трансформовані клітини мають і інші зміни порівняно з іммортализованими клітинами, зокрема в них знижене контактне інгібування, тобто вони не припиняють поділ при утворенні контактів між ними і ростуть одна над одною. Крім того, відбувається безперервний поділ цих клітин, тобто в них порушений контроль клітинного циклу.

Механізми, що лежать в основі іммортализації, трансформації та онкогенезу, включають зміни в ДНК клітини, тобто мутації. Мутація може призвести до втрати нормальної функції генів-супресорів[2] пухлин. Крім того, поділ клітин залежить від низки генів, експресія яких або активність кодованих цими генами білків суворо контролюється, щоби клітини ділилися тільки тоді, коли треба, там, де треба і протягом часу, який є необхідним. Так, як буває наприклад при загоєнні ран. Але при онкогенезі або змінюються певним чином білкові продукти цих генів, або підвищується рівень їх експресії. Ці гени, які можуть сприяти утворенню пухлин, називають *онкогенами*. Онкогени беруть участь у контролі поділу клітин. Нормальні варіанти цих генів називають *протоонкогенами*, щоби відрізнити їх від мутованих, онкогенних форм.

Участь вірусів в онкогенезі може здійснюватися через зміну експресії протоонкогенів або генів-супресорів пухлин та/або через забезпечення нових функцій, кодованих вірусом, які є безпосередньо онкогенними. Однак трансформація та онкогенез – це багатоетапні процеси, в яких введення вірусних генів є лише однією з можливих подій. Власне, якраз накопичення сукупності змін призводить до перетворення нормальної клітини на злоякісну. Ці зміни можуть відбуватися у визначеному порядку або накопичуватися випадковим чином. Отже, може бути кілька шляхів, за допомогою яких клітина може досягти злоякісного стану.

---

[1] Від лат. immortalitas, безсмертя.

[2] Це гени, інактивація яких різко збільшує ймовірність виникнення та прогресії новоутворень. Більшість із них бере участь у регуляції клітинного циклу (гальмуючи його), репарації ДНК, апоптозі, запобігаючи, таким чином, накопиченню генетичних та/або інших аномалій.

Крім набуття клітинами низки генетичних змін, утворення пухлини включає складні взаємодії з імунною системою тварини-господаря. Імунна система має важливе значення, оскільки вона може вбивати клітини, що несуть вірусні антигени або антигени пухлини (навіть клітини пухлин, що виникають без участі вірусу, зазвичай демонструють нові антигени на своїй поверхні) і таким чином обмежувати розвиток пухлини.

Для більшості типів пухлин повна послідовність подій, які призводять до трансформації, залишається не до кінця відомою; вважається, що для цього потрібні від чотирьох до шести кроків. Деякі з них можуть бути запущені чинниками середовища, у т. ч. деякими хімічними речовинами, деякими формами опромінення і деякими вірусами.

8.2. Онкогенні віруси і механізми вірусного канцерогенезу

Віруси, здатні викликати пухлини, називають **онкогенними вірусами**. Доказом того або принаймні підозрою на те, що вірус є онкогенним, слугує, зокрема, постійна присутність вірусної ДНК в клітинах пухлини. Повне дотримання постулатів Коха для підтвердження причинно-наслідкового зв'язку між вірусом і пухлиною неможливе, тому, щоби признати вірус онкогенним, використовують й інші критерії, а також епідеміологічні дані. Найбільш переконливі докази є для зв'язку вірусів гепатитів B і C з первинною гепатоцелюлярною карциномою, вірусу Епштейна-Барр з карциномою носоглотки та лімфомою Беркітта, а також деяких вірусів папіломи людини з раком шийки матки.

Які спільні риси, якщо такі є, мають онкогенні віруси? Майже всі у циклі реплікації потрапляють в ядро і мають свій генетичний матеріал у формі ДНК. Фактично, представники більшості основних родин ДНК-вірусів асоціюються з раком, за винятком вірусів натуральної віспи (родина *Poxviridae*). Оскільки поксвіруси реплікуються в цитоплазмі, вони не мають можливості впливати на функції ядра, як інші ДНК-віруси.

Важливо також усвідомлювати, що вірус може ініціювати або сприяти утворенню пухлин, лише якщо вірусна інфекція не вбиває клітину. Майже для всіх вірусів, ідентифікованих як онкогенні, існує природний механізм, завдяки якому клітини можуть вижити після інфекції, що згодом відкриває можливість трансформації. Герпес- і ретровіруси зазвичай викликають латентні та нецитопатичні інфекції відповідно у своїх природних хазяїв. Віруси папіломи зберігають свій геном у клітинах, які не підтримують репродукцію вірусів, тоді як поліомавіруси можуть викликати персистентні продуктивні інфекції у своїх природних хазяїв. Нарешті, важливо враховувати генетичний статус вірусу. У популяції вірусних частинок будь-якого типу, як правило, буде багато дефектних інтерферуючих частинок (розділ 4.7), які через випадкові мутації позбавлені деяких функцій, необхідних для продуктивного зараження. Якщо гени, важливі для онкогенезу, залишаються неушкодженими, а здатність до продуктивної інфекції та вбивати клітину втрачена, то така частинка може бути спроможна трансформувати заражену клітину.

Крім виживання інфікованої клітини, вірусні гени, які мають брати участь у трансформації клітини, повинні бути успадковані всіма дочірніми клітинами початково інфікованої клітини. Найлегше цього досягти шляхом інтеграції вірусної ДНК у геном хазяїна. З онкогенних вірусів лише ретровіруси мають функцію інтеграції у геном хазяїна як частину свого нормального циклу реплікації. Якщо немає іншого механізму персистенції ДНК, відповідні вірусні гени повинні бути вставлені в геном хазяїна шляхом випадкової негомологічної рекомбінації, що є досить рідкісною подією. Саме таким чином ДНК аденовірусів, поліомавірусів і папіломавірусів зрештою інтегрується у геном клітини під час розвитку пухлини.

Хоча постійне зберігання ключових вірусних генів у клітині для сприяння трансформації є найбільш очевидним механізмом, за допомогою якого віруси можуть викликати онкогенез, існує альтернатива. Можна припустити, що віруси діють тимчасово, сприяючи онкогенезу за механізмом «вдар і біжи», наприклад шляхом сприяння нестабільності геному в клітині-хазяїні і, отже, набуття мутацій у критичних генах хазяїна. Після того, як такі мутації виникли, вірусні гени не повинні були присутніми в таких клітинах. Такий механізм може бути використаний вірусом гепатиту С.

Для кожного з вірусів, пов'язаних зі злоякісними новоутвореннями людини, зараження *не призводить* неминуче до раку. Канцерогенез - це багатофакторна і, отже, рідкісна подія. Багато онкогенних вірусів є дуже поширеними, але пов'язані з ними пухлини зустрічаються вкрай нечасто. На асоційований з вірусами канцерогенез впливає ще багато факторів, таких як генотип господаря, вік на момент зараження, дієта, вплив абіотичних канцерогенів навколишнього середовища тощо, і деякі з цих факторів інколи можуть мати більшу вагу при утворенні злоякісної пухлини, ніж віруси! Імунодефіцит різко посилює ризик розвитку багатьох пов'язаних з вірусами пухлин, і природа імунодефіциту впливає на тип пухлин, які можуть розвиватися. У хворих на СНІД сильніше зростає ризик розвитку саркоми Капоші, ніж у хворих після трансплантації органів, яким дають імунодепресанти. Але імунодефіцит не збільшує ризику усіх видів раку, пов'язаних з вірусами. Наприклад, хворі на СНІД не мають збільшеного ризику розвитку раку печінки.

Таким чином, називати вірус «онкогенним» насправді не зовсім вірно, оскільки така назва стосується одного відносно нечастого аспекту його циклу репродукції. Більш точною буде назва «асоційований з пухлиною вірус».

Канцерогенез, по суті, не дає вірусу ніяких переваг. Навпаки, у ході такої взаємодії зазвичай вірус втрачає здатність виробляти потомство та передаватись іншим хазяїнам, і при цьому загрожує життю свого існуючого господаря.

8.2.1. Приклади пухлин людини, виникнення яких асоційовано з вірусами

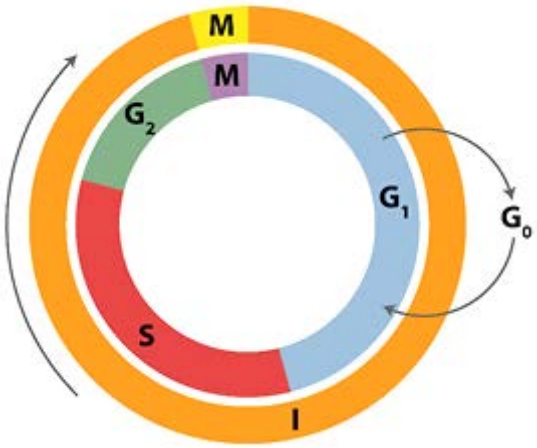
Пухлини, пов'язані з папіломавірусами (родина Papillomaviridae). Цервікальна карцинома, або рак шийки матки, є третьою з найбільш поширених форм раку у жінок; щорічно у світі трапляються приблизно півмільйона нових випадків виникнення пухлини і близько 280 000 обумовлених нею смертей. Більшість, якщо не усі, випадки раку шийки матки пов'язані із зараженням папіломавірусами.

У родині папіломавірусів представлені невеликі ДНК-геномні віруси, що вражають ссавців і птахів. Відомо більше 200 типів папіломавірусів людини, що розрізняються за послідовністю ДНК. Ці віруси можуть викликати утворення папілом (бородавок), які є доброякісними пухлинами і можуть бути підрозділені на ті, що вражають шкіру, і ті, що вражають внутрішні шари епітеліальних клітин. Останні пов'язані переважно з кондиломами (також доброякісні пухлини), а ще з папіломами голосових зв'язок та дихальних шляхів.

У більшості випадків зараження папіломавірусами не призводить до персистентної інфекції, проте в певній кількості випадків організм хазяїна не очищається імунною системою від вірусів.

Люди, у яких залишається персистентна інфекція, мають певний ризик розвитку злоякісної пухлини. Ризик пов'язаний приблизно з 15 типами вірусів папіломи людини; зараження іншими типами папіломавірусів не асоційоване з ризиком канцерогенної трансформації.

Клітинами-хазяями вірусів папіломи є кератиноцити. Ці клітини після диференціювання в нормі припиняють ділення: вони затримуються на фазі G1 клітинного циклу, або як ще говорять, знаходяться в стані G0 (мал. 8.1).



Мал. 8.1. *Клітинний цикл. I – інтерфаза – період, коли клітина не ділиться. Інтерфаза поділяється на три періоди: G1 (англ. first gap) – пресинтетичний, коли клітина росте, накопичує поживні речовини, виконує свої основні функції, S – синтетичний, коли відбувається реплікація ДНК, та G2 (англ. second gap) – постсинтетичний, коли клітина готується до поділу. M – мітоз, поділ ядра, після якого відбувається цитокінез (розходження дочірніх клітин).*

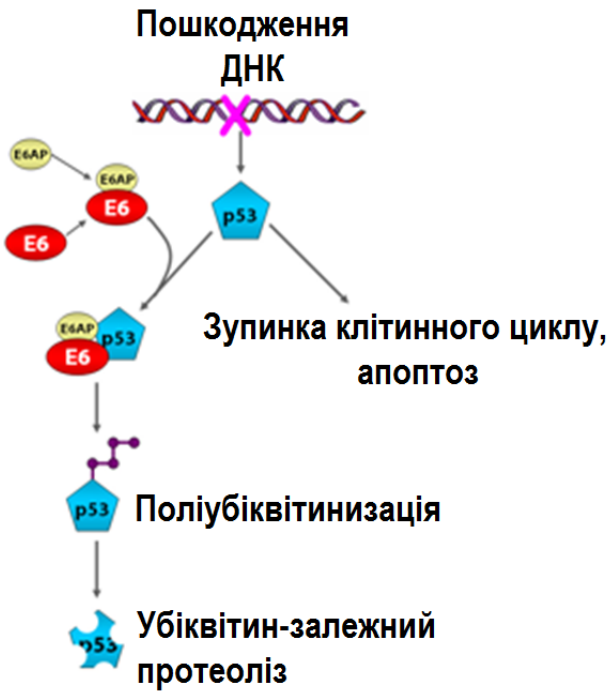
Але вірусу для активної реплікації ДНК в клітинах хазяїна потрібна ДНК-залежна ДНК-полімераза хазяїна, власної він не кодує. А цей фермент з'являється в клітинах тільки у фазі S клітинного циклу. Тому вірус втручається в контроль клітинного циклу і індукує перехід кератиноцитів у фазу S.

Контроль клітинного циклу обумовлений багатьма білками; у людини два білка відіграють ключову роль у цьому контролі – *білок p53* і *білок ретинобластоми (pRb)*. Останній білок так названий тому, що його відсутність у деяких індивідуумів, яка обумовлена мутацією в обох копіях гена, призводить до розвитку ретинобластоми (злоякісної пухлини сітківки). Ці білки кодуються генами, які належать до згаданих вище генів-супресорів пухлин.

Білок p53 – фактор транскрипції, який регулює клітинний цикл. Його часто образно називають «охоронець геному». За відсутності ушкоджень генетичного апарату білок p53 знаходиться в неактивному стані, а при появі ушкоджень ДНК активується. Результатом активації p53 є зупинка клітинного циклу і реплікації ДНК; якщо стресовий сигнал сильний – запускається апоптоз. Білок ретинобластоми pRb контролює експресію генів через взаємодію з факторами транскрипції.

Зрозуміло, що папіломавірусам треба якось знешкодити ці білки. Переходу клітин в фазу S сприяють ранні білки вірусів E6 і E7. E6 зв'язується з p53, сприяючи деградації цього білка (Мал. 8.2).

Білок E7 зв'язується з комплексом білків pRb-E2F, що призводить до дисоціації цього комплексу. E2F є фактором транскрипції клітини, який активує синтез ДНК. Підсумком усіх цих взаємодій є перехід клітини у фазу S (Мал. 8.3).



Мал. 8.2. Ранній білок вірусу папіломи Е6 «знешкоджує» протипухлинний білок клітини p53. E6AP – асоційований з Е6 білок, що кодується вірусом.



Мал. 8.3. Ранній білок вірусу папіломи Е7 індукує перехід клітини у фазу S клітинного циклу через «знешкодження» білка Rb.

Важливою особливістю типів вірусів папіломи людини, зараження якими призводить до високого ризику розвитку пухлин, є інтеграція усіх частин вірусного геному в хромосому клітини. У пухлинах геном вірусу часто виявляється неповним, але гени Е6 і Е7 є присутніми постійно. Безперервна експресія цих генів підтримує стан трансформації клітин і їх безперервне ділення. Клітини зазнають декілька циклів клітинних поділів, які зазвичай обмежені певною кількістю. Проте у разі зараження типом вірусу, який відноситься до здатних викликати злоякісну пухлину, ділення можуть тривати постійно, внаслідок чого і виникає карцинома.

Є також докази, що вірус папіломи людини, що відноситься до типу, здатного викликати рак, є причиною не лише раку матки, але і карцином на інших ділянках тіла, включаючи статеві органи, анус, голову і шию. У цих випадках в клітинах пухлини також міститься ДНК вірусу.

Вірус папіломи людини також бере участь у формуванні досить рідкісної форми раку шкіри, так званої бородавчастої епідермодисплазії, яка має генетичну основу. Під час цього захворювання люди украй сприйнятливі до зараження вірусом, особливо тих типів, які рідко трапляються в популяції людини, типів 5 і 8. Зараження відбувається в дитинстві, бородавки поширюються по усьому тілу, і в регіонах з високою сонячною радіацією у 25-

33% хворих розвиваються так звана плоскоклітинна карцинома або плоскоклітинний рак. У випадку карциноми такого типу, проте, ДНК вірусу нечасто інтегрується в хромосому хазяїна.

Пухлини, пов'язані з поліомавірусами (родина Polyomaviridae). Віріони поліомавірусів виявляються у ссавців і птахів, проте у більшості випадків зараження не викликає симптомів. Введення вірусів в певні види тварин, проте, може індукувати розвиток багатьох видів пухлини. Цей факт і послужив причиною назви вірусів (poly – багато і oma – пухлина, скупчення). Існує низка доказів, що поліомавіруси можуть викликати декілька злоякісних пухлин у людини.

Клітини Меркеля - це механосенсорні клітини шкіри. Вважається, що вони епітеліального походження, але тісно пов'язані з чутливими нервовими закінченнями. Карцинома клітин Меркеля зустрічається нечасто, зазвичай на ділянках шкіри, які піддаються впливу сонця, і, як правило, у літніх людей. У 2008 році у клітинах карциноми Меркеля було ідентифіковано новий поліомавірус, який назвали поліомавірусом клітин Меркеля (MCPyV). MCPyV продукує великі T- і малі t-антигени. Пухлини з клітин карциноми Меркеля містять інтегровану ДНК MCPyV і зберігають експресію цих ранніх білків. Якщо цю експресію порушити експериментально в клітинах пухлини Меркеля в культурі, вони піддаються апоптозу, що демонструє важливу роль, яку відіграють антигени T у підтримці життєздатності пухлинних клітин. Детальні механізми, за допомогою яких ці T-антигени викликають трансформацію клітин, все ще не зовсім відомі.

Існує ще два поліомавіруси людини, JC і BK. Ці назви є ініціалами осіб, з яких вони уперше були виділені. Обидва віруси дуже поширені і виявляються більш ніж у 80% дорослих людей. Ці віруси можуть індукувати пухлини у новонароджених хом'яків і трансформувати клітини в культурі. Доведено, що вони в деяких випадках пов'язані з певними типами пухлин у людей, особливо з пухлинами мозку. Доказами є присутність ДНК і білків вірусів JC і BK в клітинах пухлини.

Поліомавірус мавп SV40 був уперше виділений в 1960 р. з культури клітин нирки макаки резус. Цю культуру клітин використали для продукування вірусів поліомієліту для отримання вакцини. Процедура контролю якості вакцини передбачала її ведення хом'якам, і у деяких з цих тварин розвинулися пухлини. Надалі було встановлено, що введення SV40 новонародженим хом'якам може викликати карциноми, саркоми, лімфоми і лейкемію, залежно від місця введення вірусу.

Вірус SV40 набув сумної популярності, оскільки цим вірусам була забруднена вакцина від поліомієліту. Незабаром після виявлення, SV40 був виділений з ін'єкційної форми вакцини від поліомієліту, виробленої в період від 1955 до 1961 року. Мабуть, вірус потрапив у вакцину з клітин нирок інфікованих мавп, які використали для вироблення вакцини. Невідомо, як широко був поширений вірус SV40 у людській популяції до 1950-х років, але показано, що 12% зразків крові німецьких студентів в 1952 р. містили антитіла проти SV40. Вакцини, вживані в країнах колишнього Совєтського блоку, в Китаї, Японії і Африці, могли бути заражені SV40 до 1980 року. Таким чином, цим вірусом виявилися зараженими мільйони людей.

З часу відкриття вірусу не вщухають спори, чи може він викликати захворювання у людей. Ряд досліджень вказували на те, що цей вірус може бути причиною виникнення злоякісних пухлин. Проте інші дослідники не згодні з тим, що вірус викликає рак. У США

National Cancer Institute в 2004 р. заявив про те, що хоча SV40 і викликає рак в деяких модельних тваринах, накопичений істотний об'єм епідеміологічних даних, які свідчать про те, що вірус SV40, ймовірно, не викликає рак у людей.

Пухлини, пов'язані з герпесвірусами (родина Herpesviridae). *Вірус Епштейна-Барр (ВЕБ), або герпесвірус людини типу 4,* поширений повсюдно. Дитяча інфекція не спричиняє симптомів, але інфекція молодих людей може викликати тривалу слабкість (залозиста лихоманка або інфекційний мононуклеоз). Незалежно від того, є первинна інфекція симптоматичною чи ні, ВЕБ встановлює персистентну латентну інфекцію циркулюючих В-клітин протягом усього життя з періодичними реактиваціями в окремих клітинах. Цей цикл також включає інфекцію епітеліальних клітин під час первинного зараження та/або реактивації, а в популяціях клітин епітелію та В-клітин ВЕБ-інфекція асоціюється зі специфічними пухлинами, зокрема лімфомою Беркітта і носоглотковою карциномою. У кожному з цих типів пухлини присутні один або кілька продуктів генів ВЕБ, які функціонують під час латентної інфекції.

Лімфома Беркітта є ендемічною хворобою, яка зустрічається з високою захворюваністю у дітей, особливо хлопчиків, віком 6–9 років у тропічній Африці та Новій Гвінеї. Це географічне поширення збігається з поширенням малярійного паразита *Plasmodium falciparum.* Було продемонстровано, що малярія значно знижує контроль ВЕБ-інфікованих клітин Т-лімфоцитами, за рахунок зменшення частки Т-клітин-хелперів по відношенню до Т-клітин-супресорів. Вважається, що повторні атаки паразита знижують імунну відповідь до рівня, необхідного для утворення пухлини. Як саме малярія спричиняє імуносупресію, невідомо.

Окрім ендемічної лімфоми Беркітта, вона також зустрічається спорадично з низькою частотою у всіх популяціях, і тут частка, пов'язана з інфекцією ВЕБ, набагато менша. Це добре ілюструє складність розвитку раку; хоча ВЕБ є важливою причиною лімфоми Беркітта у деяких популяціях, хвороба може виникнути без будь-якого впливу вірусу.

Особливістю клітин лімфоми Беркітта, крім інфекції ВЕБ, є те, що вони містять хромосомні транслокацію, в результаті якої клітинний протоонкоген *c-myc* розташовується біля енхансеру генів імуноглобуліну. Ці гени дуже активні в В-клітинах, тому ефект транслокації призводить до експресії *c-myc* на ненормально високому рівні. Ген *c-myc* кодує білок, що зв'язується з ДНК і є фактором транскрипції. Постійна експресія гена призводить до порушення регуляції багатьох генів, які у тому числі відповідають за проліферацію клітин.

Вірус Епштейна-Барр також асоційований з іншими пухлинами. Близько 50% випадків лімфоми Ходжкіна, іншої пухлини В-клітин, є ВЕБ-позитивними. Існує також давно встановлений зв'язок вірусу з карциномою носоглотки, пухлиною епітеліальних клітин. Ця хвороба демонструє значну поширеність у обмеженій географічній зоні, у даному випадку в Південно-Східній Азії. Вважається, що споживання солоної риби з раннього віку, яка, як вважають, піддає інфіковані клітини впливу різних канцерогенів, є супутнім фактором розвитку хвороби.

Онкогенний потенціал ВЕБ добре проявляється в культурі В-лімфоцитів. Якщо клітини заразити вірусом, вони синтезують цілу низку білків вірусу, які безперервно вводять клітини в клітинний цикл, що призводить до появи лімфобластних клітинних ліній. В організмі людини проліферація таких В-лімфоцитів контролюється Т-клітинами, проте, у випадку послаблення Т-клітинного імунітету контроль може виявитися недостатнім, внаслідок чого і розвиваються пухлини.

Вірус герпесу людини 8 (герпесвірус, асоційований з саркомою Капоші). Цей вірус виявили у 1994 р. в клітинах саркоми Капоші. Ця хвороба уперше було описана в 19-му сторіччі як рідкісна пухлина шкіри, яка розвивалася у літніх людей в середземноморському регіоні. Однак після появи СНІДу вона стала однією з найбільш звичайних пухлин молодих хворих, і в цьому випадку пухлина поширюється по усьому тілу і стає агресивнішою. Вважають, що клітини пухлини мають походження від ендотеліальних клітин.

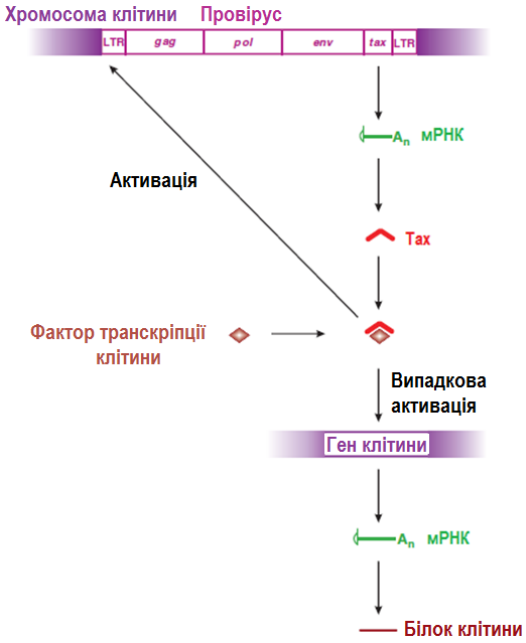
Молекулярні особливості вірусу, які відповідають за його онкогенну активність, ще не встановлені. Вірус виявляється у більшості частин світу, проте особливо поширений лише в деяких регіонах, насамперед – у центральній Африці. Ризик розвитку саркоми Капоші корелює з поширеністю вірусу в популяції.

Пухлини, пов'язані з ретровірусами (родина Retroviridae). *Т-лімфотропний вірус людини типу 1* (ТЛВЛ-1) асоційований з виникненням Т-клітинного лейкозу у дорослих людей. Цю пухлину утворюють $CD4^+$ Т-лімфоцити. Географічний розподіл Т-клітинного лейкозу дорослих нерівномірний, найчастіше він зустрічається в Японії та на Карибських островах. Такий розподіл близько відповідає поширенню інфекції ТЛВЛ-1, що свідчить про причетність вірусу до цього захворювання. Клітини пухлини завжди містять інтегровану провірусну ДНК у власному геномі. Однак також задіяні інші фактори, оскільки, як і в усіх інших прикладах вірусів людини, пов'язаних з раком, лише у меншості (близько 1%) інфікованих виявлено захворювання, і існує 20–40-річний інтервал між інфікуванням і виникненням Т-клітинного лейкозу. Одним із цих факторів є природа імунної відповіді, яка ініціюється до ТЛВЛ-1, і зокрема до білка Tax, який він кодує, під час початкової інфекції. Якщо до Tax виникає імунна толерантність через інфекцію, що виникла в дуже молодому віці, або через те, що конкретні білки головного комплексу гістосумісності не можуть адекватно презентувати пептиди Tax цитотоксичним Т-клітинам, то ймовірність подальшого розвитку лейкозу збільшується.

Яким чином проявляється онкогенний потенціал Tax? Деякі віруси здатні зв'язуватися з білками клітини, які фактично не є мішенями для білків вірусу. Таке зв'язування може запустити події, які не дають вірусу жодної користі, але можуть бути небезпечними для хазяїна. Білки вірусу можуть, так би мовити, ненавмисно перевести клітину в злоякісний стан за допомогою активації раніше вимкнених генів клітини, або за допомогою посилення експресії генів, які в нормі експресуються на низькому рівні.

Прикладом такого білка є білок Tax Т-лімфотропного вірусу людини 1. Ген *tax* експресується на інтегрованій в хромосому провірусній ДНК, і білок Tax, зв'язуючись з факторами транскрипції клітини, функціонує як фактор транскрипції для вірусу (Мал. 8.4). Проте білок Tax може випадково впливати на експресію багатьох генів клітини, які включають регулятори клітинного циклу.

Деякі ретровіруси індукують формування пухлин внаслідок інтеграції їх провірусу в хромосому клітини в такій ділянці, в якій протоонкогени клітини-хазяїна потрапляють під контроль вірусних промоторів. Це може привести до активації генів, які були вимкнені, або призвести до посилення експресії генів, які вже були активні. Слід мати на увазі, що активація ретровірусами протоонкогенів може привести до розвитку лейкемії у деяких пацієнтів, у яких ретровірусні вектори використали для генної терапії.



Мал. 7.4. Онкогенез за участю білка Tax Т-лімфотропного вірусу людини 1. Білок активує транскрипцію провірусу, але може також випадково активувати експресію генів клітини (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Ретровірусні онкогени. Деякі ретровіруси можуть викликати утворення ракових пухлин, оскільки в їх геномі присутні онкогени; наприклад, вірус саркоми Раусу, що викликає злоякісні пухлини у курей, містить ген *v-src*. Онкогени ретровірусів мають походження від клітинних протоонкогенів і мають з ними близьку спорідненість. У випадку саркоми Раусу онкоген вірусу *v-src* є близьким родичом протоонкогена *c-src*.

Коли протоонкоген мутує або його нормальна експресія порушується, він стає онкогеном. Ген *src*, який бере участь в розвитку багатьох пухлин, кодує протеїнкіназу. Надфосфорилювання ферментів-субстратів цієї протеїнкінази є ключовим процесом в розвитку пухлин, пов'язаних з цим геном.

Майже усі ретровіруси, що несуть онкогени, є дефектними в результаті делецій геному. Ці віруси можуть реплікуватися лише за допомогою ендогенних ретровірусів, або в клітинах, одночасно заражених вірусом-помічником. Наприклад, віруси саркоми мишей є дефектними, і вірусом-помічником може виступати вірус лейкемії мишей. Вірус саркоми Раусу є одним з небагатьох не дефектних ретровірусів, що містять онкоген. У вірусних онкогенів відсутні послідовності, які контролюють експресію клітинних протоонкогенов, тому якщо онкоген ретровірусу експресується в зараженій клітині, його продукт накопичується у більш високих концентраціях, ніж продукт клітинного протоонкогена.

Ретровіруси, що містять онкогени, здатні швидко індукувати розвиток пухлини, зазвичай впродовж 1–6 тижнів після зараження, що контрастує з розвитком пухлин, які індукуються іншими онкогенними вірусами. У останньому випадку пухлина може розвинутися через роки або навіть десятиліття після встановлення персистентної вірусної інфекції.

Пухлини, пов'язані з гепаднавірусами (родина Hepadnaviridae). Хронічна інфекція *вірусу гепатиту В* має дуже сильний зв'язок з виникненням раку печінки в більш пізньому віці. Найбільш висока поширеність пухлини і вірусу спостерігається в Азії і центральній і південній Африці. Вірогідно, вірус гепатиту В є найсильнішим канцерогеном для людини після паління тютюну.

Інфекція вірусом гепатиту В може бути подолана імунною відповіддю або стати персистентною, причому останнє найчастіше зустрічається у людей, інфікованих у дитинстві. Ті, хто захворів на хронічну інфекцію, мають у 200 разів підвищений ризик розвитку первинної *гепатоцелюлярної карциноми* порівняно з рештою населення. У багатьох випадках клітини пухлини містять інтегровані послідовності вірусу. Місце інтеграції є однаковим у всіх клітинах пухлини, що вказує на те, що інтеграція відбулася в одній клітині, яка згодом ділилася і утворила пухлину. Однак не існує єдиного місця інтеграції між пухлинами різних пацієнтів. Вважають, що вірус відіграє пряму роль у розвитку захворювання. Механізм онкогенезу не є достатньо зрозумілим. Будь-який запропонований механізм повинен враховувати тривалий часовий проміжок (можливо, 40 років) між первинною інфекцією та появою раку. Є припущення, що вірус чинить непрямий вплив через довгострокове пошкодження печінки, яке він спричиняє. При хронічній інфекції клітини печінки постійно втрачаються через опосередковане імунною відповіддю руйнування інфікованих клітин. Печінка реагує регенерацією, і ця постійно висока швидкість поділу гепатоцитів може обумовити накопичення мутацій, що в кінцевому підсумку випадково призведе до появи клітини з набором мутацій, які надають їм онкогенні властивості.

Пухлини, пов'язані з флавівірусами (родина Flaviviridae). *Вірус гепатиту С* є єдиним РНК-геномним вірусом, який зв'язаний з канцерогенезом. Захворювання цим вірусом може бути гострим, і через деякий час організм людини може позбавитися вірусної інфекції завдяки імунній відповіді. Але досить часто гепатит С приймає хронічний характер. Оскільки у циклі реплікації вірусу ДНК не приймає участі, він не може використати механізми персистенції, як ДНК-геномні віруси, наприклад інтегрувати свій геном у геном клітини-хазяїна. Наразі, власно кажучи, немає задовільного пояснення, яким чином цей вірус примудряється досягати персистентної інфекції печінки людини.

Механізм онкогенезу також є не зовсім зрозумілим. Вважають, що тут задіяні або механізми за принципом «вдарити і втекти», або непрямі механізми, подібні до тих, що пропонуються для вірусу гепатиту В. Враховуючи тривалу затримку між начальним зараженням та захворюванням, останнє є більш вірогідною моделлю. Цей висновок також підтверджується тим фактом, що інші, невірусні агенти, які викликають хронічне ураження печінки, такі як алкоголь або вживання мікотоксинів з їжею, також підвищують ризик гепатоцелюлярної карциноми.

8.3. Запобігання розвитку індукованих вірусами ракових пухлин

Логічні підходи до запобігання індукованому вірусами раку включають спроби запобігти передавання вірусів від інфікованих людей неінфікованим, тому знання шляхів передавання вірусів є важливим. Таке знання дозволяє розробити стратегії, спрямовані на зниження ризику передавання вірусу. Наприклад, більшість онкогенних вірусів людини передаються через кров або статевим шляхом, тому застосування методів, розроблених для запобігання поширенню ВІЛ, також знижує ризик зараження онкогенними вірусами.

Іншим підходом до зниження частоти передавання вірусів є вакцинація. Передавання вірусу гепатиту В у більшості випадків відбувається від матері до дитини під час пологів, тому в деяких країнах з високою поширеністю вірусу гепатиту В розпочаті програми по вакцинації дітей вакциною проти цього вірусу впродовж перших двох днів після народження. Реалізація такої програми на Тайвані вже понизила частоту раку печінки у дітей, і

з часом очікується зниження поширеності цього захворювання і у дорослих. Існують й інші програми вакцинації як людей, так і домашніх тварин.

Альтернативним підходом в запобіганні розвитку індукованих вірусом пухлин є спроби видалення з тіла персистентної інфекції онкогенних вірусів. Проте за рідкісним винятком часткового контролю вірусу, ці спроби доки не привели до успіху.

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- знати головних представників вірусів, які пов’язані з утворенням злоякісних пухлин
- розуміти можливі механізми індукції онкогенезу вірусами
- вміти обґрунтувати можливі заходи, які зменшують імовірність виникнення пов’язаних з вірусами злоякісних пухлин
- вміти обґрунтувати можливі заходи, які зменшують імовірність виникнення пов’язаних з вірусами злоякісних пухлин

РОЗДІЛ 9. ЗАСОБИ БОРОТЬБИ З ВІРУСНИМИ ІНФЕКЦІЯМИ

Руйнівні наслідки інфекційних захворювань людей, свійських тварин і рослин були очевидні з доісторичних часів. Смерть, захворювання та економічні збитки, спричинені вірусними інфекціями, спонукали до дослідження способів захисту від них. Задовго до того, як стала зрозуміла природа інфекційних агентів, було відомо, що попереднє зараження може за деяких обставин запобігти повторному зараженню. На базі цього знання були спроби захиститися від вірусів, прикладом чого є згадана у розділі 1.1 практика варіоляції для захисту від натуральної віспи, розроблена в стародавніх Китаї і Індії.

Вакцинація є набагато ефективнішою, ніж противірусна терапія, хоча застосування противірусних препаратів є надзвичайно цінною додатковою зброєю в лікуванні інфекцій, коли вакцинація не спрацювала або є неможливою. Нажаль, не всі вакцини працюють так добре, як повинні, а для деяких вірусів вакцин все ще немає взагалі, незважаючи на роки роботи.

У деяких системах вакцинація неможлива, тому необхідно використовувати альтернативні підходи. Наприклад, оскільки рослини не мають адаптивного імунітету, профілактика вірусних захворювань рослин заснована на інших заходах, таких як селекція генетично стійких до вірусу або його переносника рослин і боротьба з переносниками фітопатогенних вірусів. Власно кажучи, інших засобів для боротьби з вірусними хворобами рослин немає, тому подальший матеріал цього розділу буде присвячений тільки вірусним інфекціям людей і тварин.

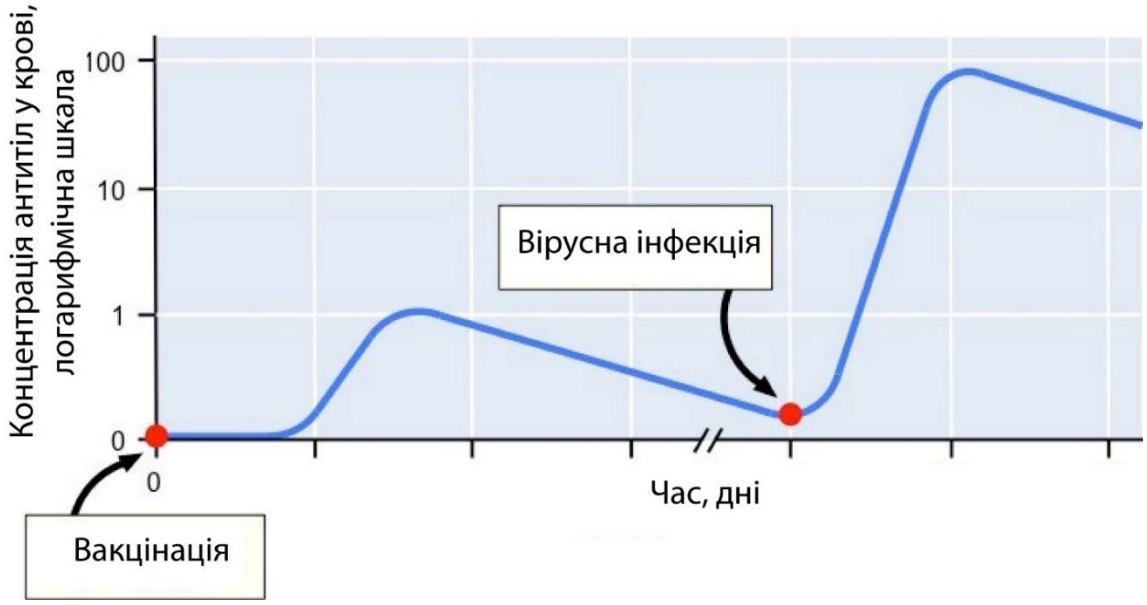
9.1. Вакцини

Термін «вакцина», який, нагадаємо, походить від латинського слова *vacca* (корова), означає препарат, що складається з ослаблених або вбитих збудників хвороб або навіть їхніх фрагментів. Метою вакцинації є ініціація специфічного до вірусу адаптивного імунітету і формування імунної пам’яті (розділ 6.1.3) без того, щоби людина захворіла на відповідну хворобу.

В ідеалі цей імунітет повинен забезпечувати якомога широкий спектр захисту і бути достатньо довготривалим, щоби забезпечити захист протягом багатьох років. Після успішної вакцинації імунна пам’ять здатна швидко і потужно реагувати, щоб запобігти поширенню інфекції при попаданні вірусу (Мал. 9.1).

Треба пам’ятати, що достатній рівень імунної пам’яті встановлюється лише тоді, коли у відповідь на вакцину буде достатньо потужна імунна відповідь.

Індивідуальний імунітет і колективний імунітет. Може здаватися, що кожна людина повинна бути імунізована для захисту від інфекції, але 100% осіб з імунітетом зазвичай не потрібно для ліквідації вірусної інфекції серед населення. Є необхідним достатній відсоток імунних осіб, щоб розірвати ланцюг передавання вірусу. Це називається *колективним імунітетом* і є ключем до успішної реалізації програми вакцинації. Природною ситуацією, яка ілюструє це, є поширеність вірусу кору серед населення островів. Природна інфекція кору призводить до формування у перехворілих людей імунної пам’яті і робить їх несприйнятливими до повторного зараження. Для народження достатньої кількості сприйнятливих дітей, щоби запобігти зникненню вірусу, необхідно принаймні 500 000 населення (див. розділ 7.7). При наявності менш ніж мінімально необхідної кількості чутливих осіб вірус не може вижити в популяції.



Мал. 9.1. *Рівні антитіл після вакцинації та зараження. Після вакцинації спостерігається підвищення специфічних антитіл, спрямованих проти антигену. Проходить 7 днів або більше, перш ніж рівень антитіл досягає піку, а потім поступово знижується до базового рівня. Після інфікування раніше вакцинованої людини рівень специфічних антитіл проти того самого антигену дуже швидко зростає і досягає набагато більших рівнів.*

Точний відсоток імунних осіб, необхідних для ефективного колективного імунітету, може бути розрахований і є різним для кожного інфекційного агенту. Знання цього важливого параметра може бути використано для встановлення цілей та інформування населення щодо впровадження програм імунізації. Принцип колективного імунітету є ключовим для успішної програми вакцинації.

Але при реалізації програм вакцинації існують певні перешкоди, пов'язані зокрема з громадською думкою. Коли програма вакцинації починає досягати успіху, рівень загрози захворювання серед населення знижується, і це зменшує сприйняття громадськістю серйозності захворювання і відповідно необхідності вакцинації. Якщо рівень вакцинації падає нижче критичного рівня, колективний імунітет стає недостатнім для ефективного обмеження передавання вірусу, і захворюваність знову росте. Крім того, майже для кожної вакцини існує ризик виникнення побічних реакцій у певної кількості вакцинованих. На початку програми вакцинації серйозність захворювання, викликаного вірусом, гарантує, що низькі рівні побічних реакцій не призводять до значного занепокоєння суспільства. Однак, оскільки захворюваність знижується, рівень побічних реакцій стає важливим фактором сприйняття вакцини громадськістю. Отже, оскільки суспільством сприйняття хвороби як загрози зменшується, сприйняття вакцини як небезпеки часто може безпідставно посилюватися. Це може призвести до зниження рівня вакцинації, збільшення частки сприйнятливих людей і, як наслідок, зростання захворюваності. Така ситуація виникла у Великобританії після публікації в 1998 році статті, в якій припускалося, що вакцина проти кору була пов'язана з аутизмом у деяких дітей. Незважаючи на антинауковість статті і відсутності у ній надійних статистичних доказів такого твердження, громадське сприйняття проблеми призвело до різкого зниження рівня вакцинації в деяких районах Великобританії, що, у свою чергу, призвело до різкого зростання захворюваності на кір у цих регіонах через кілька років.

Іншим прикладом такої ситуації є вакцинація проти коронавірусу SARS-Cov-2 під час пандемії ковід19 у 2019-2022. Не зважаючи на те, що вакцинація значно зменшувала захворюваність, тяжкість перебігу хвороби і смертність від неї, у багатьох країнах дуже поширювалася інформація про небезпеку вакцинації і, навпаки, про безпечність самого збудника, який начебто не спричиняє тяжкої хвороби. Така інформація поширюється в першу чергу через соціальні мережі, є антинауковою і не базується на перевірених статистичних даних, але суспільна думка часто їй довіряє. Тому хотілося б порекомендувати читачам цього підручника керуватися здоровим глуздом, довіряти тільки тій інформації, яку можна перевірити і яка публікується в наукових журналах, котрі піклуються про своє реноме і викликають довіру.

Сьогодні існують ефективні вакцини проти багатьох вірусів, у т. ч. вірусів віспи, поліомієліту, краснухи, кору, ящуру. Проте щодо багатьох інших вірусів, таких як ВІЛ, збудник лихоманки Ебола або простого герпесу, спроби розробити вакцини доки не призвели до успіху. Цьому є різні причини, серед яких однією з найважливіших є мінливість антигенних варіантів вірусів.

Що є метою використання вакцини? Як повинно бути зрозумілим з попереднього матеріалу, вакцина повинна доставити в організм людини або тварини антигени вірусу. Ці антигени можуть бути природними білками або навіть фрагментами цих білків, які містять такий же епітоп або епітопи, як і природні штами вірусу. Останнє є важливим, оскільки клітини імунної пам'яті специфічно «націлені» на конкретний антиген чи антигени певного вірусу. Для встановлення досить потужної імунної пам'яті необхідно, щоб вакцина спричиняла енергійні, яскраво виражені реакції імунітету; іншими словами, для вакцин потрібний вірусний матеріал з високими імуногенними властивостями.

Нижче ми розглянемо основні типи вакцин, їх переваги і недоліки.

9.1.1. Інфекційні («живі») вакцини

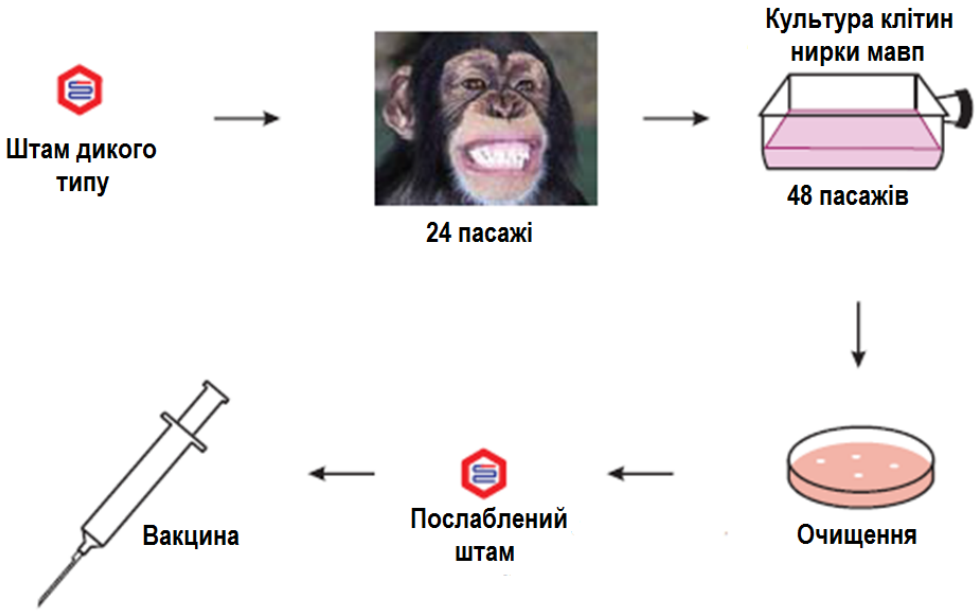
Вакцина повинна виробляти ефективний довготривалий імунітет. Різні віруси чутливі до різних частин імунної системи, тому вакцина повинна стимулювати імунітет правильного типу, у правильному місці та достатньої величини, щоб вона була ефективною. Це найлегше досягається за допомогою інфекційної «живої» вірусної вакцини, оскільки її взаємодія з імунною системою буде найбільш точно імітувати взаємодію з організмом диких вірулентних штамів вірусу. Важливо також, що інфекційний вірус вакцини буде реплікуватися в організмі і продукувати достатню кількість антигенів. Ключова вимога до живої вакцини полягає в тому, що вірус вакцини повинен викликати не більше ніж легке захворювання або в ідеалі взагалі не повинен викликати хвороби, але цього дуже важко досягти.

Вперше цей принцип застосував Едвард Дженнер, який використав вірус коров'ячої віспи для вакцинації проти натуральної віспи. Вірус коров'ячої віспи, природний штам вірусу тварин, викликав лише легке захворювання у людей, але його антигени споріднені з антигенами вірусу натуральної віспи, який викликав небезпечну для життя віспу. Антитіла, вироблені проти коров'ячої віспи, були здатні нейтралізувати інфекційність вірусу натуральної віспи, тим самим захищаючи людей від хвороби. Вірус коров'ячої віспи згодом був перетворений на вірус вісповакцини і використаний в програмі вакцинації, яка призвела до викорінення вірусу віспи у світі.

Однак використання близькоспоріднених вірусів можливе лише в декількох випадках, а в більшості ситуацій єдиною альтернативою для розробки інфекційної вірусної вакцини є

використання штаму вірусу, який взагалі не буде викликати хвороби або максимум може спричинити дуже легке захворювання. Процес виробництва такого авірулентного штаму вірусу називається послабленням або атенуацією, а вірус вакцини звуть послабленим, або атенуйованим.

Послаблення досягається емпірично, і досвід показав, що йому може допомогти реплікація в клітинах, не пов'язаних з клітинами нормального господаря, реплікація при субфізіологічній температурі тощо. Гарним прикладом є вакцина штамів трьох серотипів вірусу поліомієліту (родина *Picornaviridae*), який був послаблений внаслідок втрати здатності вражати нервові клітини. Вона була отримана шляхом пасажів штамів дикого типу в мавпах і культурі клітин нирки мавпи. Цю піонерську роботу виконав Альберт Себін (Albert Sabin) у 1953–1957 рр. (Мал. 8.1).



Мал. 9.1. Отримання послабленого штаму вірусу поліомієліту для живої вакцини (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Мутації, відповідальні за послаблення вірусу поліомієліту дикого типу, добре відомі: в геномній РНК вірусу вакцини в ділянці, що зветься домен 5, стається заміни одного нуклеотиду на інший.

З використанням підходу, аналогічного використаному А. Себіним, отримують низку інших послаблених вакцин, зокрема вірусів свинки, кору, краснухи, жовтої лихоманки, чуми собак.

При виготовленні інфекційних послаблених вірусних вакцин, використовують не лише повторні пасажі вірусу дикого типу в не споріднених хазяїну клітинах. До інших підходів, які вживають з цією метою, належать такі:

«адаптовані до холоду» штами вірусів. Такі вакцини отримують шляхом інкубації заражених вірусом клітинних культур в умовах температур, нижчих оптимальних для реплікації вірусу. «Адаптовані до холоду» штами вірусів зі зниженою вірулентність використовують для приготування вакцин вірусу грипу і респіраторно-синцитіального вірусу (викликає інфекції дихальних шляхів).

використання реасортантів. Такі вакцини містять реасортанти ротавірусів, у яких деякі гени належать вірусу людини, а інші – вірусу тварин.

використання зворотної генетики дозволяє конструювати геноми вірусів для приготування вакцини, що мають понижену вірулентність, наприклад, завдяки цілеспрямованому мутагенезу.

Здатність виробляти генетично модифіковані віруси відкрила можливість використання цієї технології для створення послаблених вірусів. Це нетривіально, оскільки механізми послаблення часто недостатньо зрозумілі. Проте багато досліджень кількох різних вірусів вирішували цю проблему, і наразі з'явилися два підходи. Перший полягає у створенні атенуйованих вірусів шляхом створення специфічних мутацій у геномі вірусу. Хоча це дуже привабливо, це залишається проблематичним через складність вірулентності вірусів, яка часто пов'язана з дією кількох генів, що працюють узгоджено складним чином. Більш простим і на сьогоднішній день успішнішим підходом є створення гібридних вірусів, у яких генетичний «хребет» є похідним від вірусу, для якого вже доступна послаблена вакцина, і введення в цей скелет гена, що кодує основний антиген з цільового вірусу. Успішним прикладом цього є рекомбінантний вірус коров'ячої віспи, який експресує основний глікопротеїн вірусу сказу, що використовується як вакцина проти сказу. Коли тварини їдять харчові добавки, «засіяні» рекомбінантним вірусом вісповакцини, вони заражаються і виробляють антитіла, які захищають їх від подальшого зараження вірусом сказу.

Переваги й недоліки інфекційних вірусних вакцин. Основна перевага використання «живої» вірусної вакцини полягає в тому, що імунна відповідь, яка стимулюється, буде достатньо повно імітувати реакцію, викликану природною інфекцією. Це означає, що вакцина стимулюватиме всі аспекти імунітету, які забезпечать захист від подальшої інфекції. Цей імунітет часто виявляється довготривалим. Ще одна перевага полягає в тому, що, оскільки вірус вакцини здатний реплікуватися, потрібна мала доза, яка зазвичай повинна бути введена лише один раз, що робить її більш прийнятною для пацієнтів. З цим пов'язано те, що вакцина може не потребувати ін'єкції і може бути доставлена більш «природним» шляхом, таким як інгаляція для вакцини проти вірусу грипу або пероральний прийом вакцини проти поліомієліту. Нарешті, вони, як правило, дешевші за дозу, ніж убита вірусна вакцина, хоча це компенсується більшими витратами на підтримання належних умов під час транспортування та зберігання. Ці фактори роблять живі вірусні вакцини надзвичайно привабливими.

Однак у них є недоліки. При використання послаблених живих вірусних вакцин є ризик того, що вірус може мутувати у бік вірулентності, коли він реплікується в імунізованій людині, особливо якщо у людини послаблений імунітет. Цей ризик є специфічним для кожного штаму вакцини та пов'язаний з кількістю та характером наявних мутацій, які дають його послабленим фенотип; навіть чудова жива вакцина від поліомієліту Себіна не є ідеальною в цьому стосунку. Крім того, навіть атенуйовані віруси все ще можуть викликати легкі захворювання, і це може вважатися неприйнятним.

Також є ризик взаємодії послабленого вірусу вакцини з наявною іншою вірусною інфекцією у реципієнта. Цей ризик має два аспекти. Важливо, щоби вакцини, які утворюються шляхом послаблення вірулентних штамів вірусів, не могли бути відновлені до високої вірулентності шляхом генетичних взаємодій з вірусами, що можливо наявні у реципієнта. Крім того, наявність триваючих інфекцій у реципієнта створює потенційний ризик втручання в природну імунну відповідь, що може поставити під загрозу надійність захисту, який був би створений в іншому випадку. З цієї причини пацієнтам із триваючою інфекцією зазвичай не дають живі вакцини.

Ще однією важливою проблемою є ризик контамінації іншими мікроорганізмами препаратів атенуйованих вірусних вакцин – послаблений вірус не можна отримувати способами, які гарантовано вбивають усі мікроорганізми, оскільки це також буде вбивати і вірус вакцини.

Нарешті, останньою проблемою є збереження життєздатності вірусу. Для тривалого зберігання зазвичай потрібні наднизькі температури, наприклад мінус 70° С і нижче. Життєздатність можна підтримувати при більш доступних температурах, наприклад 4° С, але навіть таку температуру може бути важко підтримувати. Необхідність «холодового ланцюга» для забезпечення доставки ефективних живих вакцин у віддалені райони світу є серйозною проблемою.

9.1.2. Інактивовані («вбиті») вакцини

Для деяких вірусів відсутні послаблені мутанти і не існує альтернативного не вірулентного вірусу, який має спільні антигенні характеристики з цільовим вірусом. За цих обставин успішно застосована стратегія полягає в обробці цільового вірусу таким чином, щоби знищити його інфекційність. Складність методу полягає в підборі комбінації хімічних препаратів і часу реакції, які повністю інактивують вірус, але залишають його антигени досить незміненими, так що вони залишаються здатними викликати захисний імунний відгук. Найбільш поширеними методами обробки є нагрівання вірусу або його обробка хімічними речовинами, такими як формальдегід або β-пропіолактон, щоб ліквідувати його інфекційність. Такий метод був використаний Джонасом Солком (Jonas Salk) для обробки вірусу поліомієліту, що привело до розробки вакцини, що носить ім’я Солка, яка була офіційно впроваджена в 1955 році. Обробка вірусу поліомієліту включає суспендування вірусу в розчині формаліну за температури 37° С впродовж 10 діб. Іншими прикладами убитих вакцин є інактивовані віріони вірусу грипу, гепатиту А і ящуру.

Використання інактивованих вакцин є привабливим, оскільки, незважаючи на те, що вони отримані від вірулентного вірусу, убиті вакцини не повинні викликати жодних захворювань.

Переваги й недоліки інактивованих вакцин. Істотною перевагою препаратів убитої вакцини є те, що будь-які інші невідомі віруси чи бактерії, ймовірно, також будуть вбиті при виготовлені вакцини. Крім того, оскільки інактивовані вакцини не здатні до реплікації, можна застосувати кілька інактивованих вакцин одночасно без побоювань генетичної взаємодії, яка може призвести до захворювання. Практична перевага інактивованих вакцин полягає в тому, що вони не викликають таких проблем стабільності, як у живих вакцин. Інактивовані вакцини, як правило, стабільні протягом тривалого періоду і не вимагають складних умов зберігання; у багатьох випадках матеріал готують у ліофілізованому вигляді, який можна транспортувати при звичайних температурах.

Однак цей тип вакцин також має недоліки. Процес інактивації для кожного вірусу є унікальним і його необхідно визначити емпірично. Щоб бути ефективною, вбита вакцина не повинна бути інфекційною, але має бути достатньо імуногенною, щоби стимулювати потужну імунну відповідь. З цієї причини інактувиючі агенти повинні бути спрямовані в першу чергу на вірусну нуклеїнову кислоту, а не тільки на білки віріонів, оскільки сама нуклеїнова кислота може бути інфекційною і може вивільнятися під дією клітини на білки оболонки віріону. Під час інактивації на ранніх термінах після початку спостерігається швидка втрата

інфекційності, але швидкість інактивації сповільнюється, і може залишатися частка інфекційного вірусу, яку часто дуже важко усунути. Це означає, що весь препарат вірусу повинен утримуватися в контакті з інактивуючим агентом дуже довго, і є великий ризик того, що імуногенність буде зменшена або навіть знищена обробкою. Неможливість виявити залишкову інфекцію може мати руйнівні наслідки. В США в 1955 р. чотири мільйони доз недостатньо інактивованої вакцини Солка були використані для вакцинації дітей. Серед вакцинованих виявилися 204 випадки паралітичної форми поліомієліту і 11 смертей.

З іншого боку, надмірна інактивація може спричинити такі проблеми, як зміна імуногенних характеристик вірусу, що ставить під загрозу ефективність вакцини. За цих обставин імунітет, отриманий від введення вбитої вакцини, може навіть посилити захворювання, яке виникає при зараженні диким вірусом.

Практичним недоліком убитих вірусів є те, що вони не реплікуються, тому імунізуюча доза вакцини має містити набагато більше вірусу, ніж доза живої вакцини, і можуть знадобитися повторні дози для індукування адекватного рівня імунітету. Це збільшує як вартість, так і кількість введеного невірусного матеріалу; крім того, у тих районах світу, де доступ до медичних працівників утруднений, може бути складно отримати необхідне багаторазове лікування. Інактивовані вакцини необхідно вводити шляхом ін'єкції, яка не є привабливою для реципієнтів, а місце введення має важливе значення і може відігравати певну роль у ефективності наступного імунітету, який індукується. У зв'язку з цим інша проблема полягає в тому, що вбиті вакцини не досягають і не стимулюють імунітет слизової оболонки в кишкових і дихальних шляхах, де вірус зазвичай потрапляє в організм, і, таким чином, може не стимулювати повний спектр імунітету, необхідного для найвищого рівня захисту.

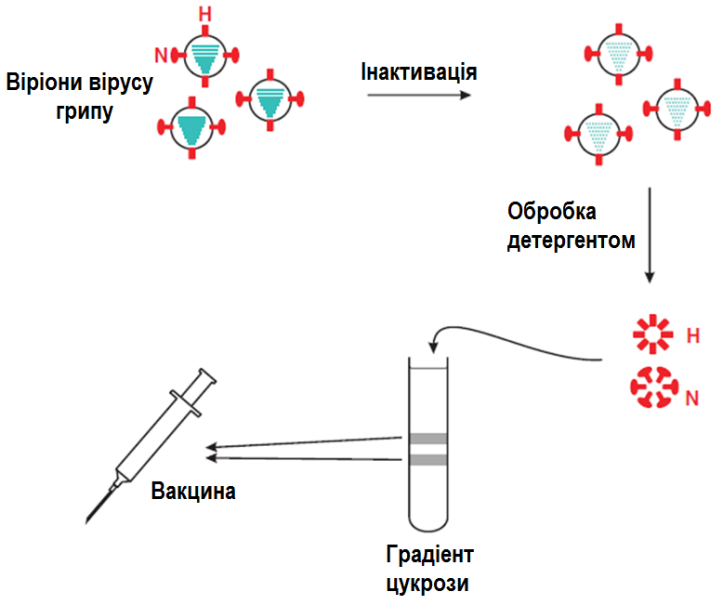
9.1.3. Вакцини, які містять антигени

Для доставки вірусних антигенів в організм людини чи тварини можна використовувати не тільки повні вірусні частинки, як у випадку двох попередніх типів обговорених вакцин. Можна доставити антигени як такі, тобто приготувати вакцини з очищених компонентів віріонів. Це може бути одним або кількома білками, які містять епітопи, що стимулюють імунну відповідь. Зазвичай вони включають білок(-и), що є частиною вірусної частинки, але можуть також включати вірусні білки, які зазвичай знаходяться лише в інфікованих клітинах. Ці компоненти мають бути високо очищеними, щоб уникнути ризику забруднення матеріалу, яке може викликати негативні реакції. Цей підхід також вимагає значних знань про природу вірусних антигенів і епітопів, щоб забезпечити імунізацією відповідну захисну імунну відповідь.

Метод отримання такої вакцини з віріону вірусу грипу наведений на Мал. 9.2. Інфекційність віріонів інактивується формальдегідом або β-пропіолактоном, далі оболонка віріонів видаляється обробкою детергентами, таким як Тритон X-100. Це вивільняє глікопротеїни, які очищають центрифугуванням в градієнті щільності цукрози і потім об'єднують для отримання вакцини.

В якості альтернативи, така вакцина може складатися з пептиду або колекції пептидів, що мають деякі епітопи, які містяться в білках вірусу. Більше того, можна використовувати навіть синтетичні пептиди, які містять епітоп і синтезують штучно. В порівнянні з традиційними вакцинами, в них легше забезпечити відсутність забруднень. Крім того, усуваються проблеми з попереднім культивуванням вірусів. Була виконана низка робіт в спробі розробити пептидні вакцини проти вірусу ящуру (родина *Picornaviridae*). У цього вірусу

важливим є епітоп в межах білка VP1. Синтетичні пептиди, що мають послідовність цього епітопа, забезпечували прийнятний рівень захисних антитіл у лабораторних тварин.



Мал. 9.2. Схема отримання вакцини з субодиниць віріонів вірусу грипу (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Також використовують вакцини з *вірусоподібних частинок.* Вірусоподібні частинки є структурами, зібраними з вірусних білків. Ці частинки нагадують віріон, проте в них немає ніякої нуклеїнової кислоти, і вони є безпечнішими, ніж вакцини з послабленими або інактивованими вірусами.

Саме так виготовляється вакцина проти вірусу гепатиту В (родина *Hepadnaviridae*). Для її виробництва використовують дріжджі, в геном яких вставлений ген вірусного білка. Після наростання культури трансгенних дріжджів, їх руйнують для вивільнення вірусного білка. Після очищення, молекули піддають хімічній обробці, що викликає їх агрегацію в сферичні структури, подібні до неінфекційних частинок, що утворюються протягом зараження вірусом гепатиту В людей.

Аналогічно отримують вакцину проти вірусу папіломи людини. Основний білок капсиду вірусу здатний до самозбирання у вірусоподібні структури, які містять епітоп, необхідний для вироблення противірусних антитіл. Білок вірусу папіломи отримують з використанням клітин або комах, або дріжджів.

Переваги й недоліки вакцин з білків-антигенів. Удосконалення технологій виробництва білка з використанням генетично модифікованих бактерій, дріжджів і клітин тварин значно спростило приготування вакцин з субодиниць. Основна перевага таких вакцин полягає в тому, що в них використовується високо очищений матеріал, що значно знижує ризик зараження інфекційними агентами або іншими матеріалами, які можуть призвести до несприятливих наслідків. Оскільки компоненти вакцин інертні, їм часто не потрібен «холодний ланцюг» для доставки, який є необхідним для живих вакцин, і це робить постачання значно простішим і зручнішим, особливо в ізольованих частинах світу. Виробництво компонентів субодиниць можна ретельно контролювати.

Основний недолік вакцин з субодиниць полягає в тому, що вони ініціюють адаптивну імунну відповідь, яка обмежується виробленням антитіл В-клітинами, зі слабким залученням Т-клітин або навіть без нього. Це означає, що імунна відповідь, коли вакцинована особа заражається природним вірусом, обмежується переважно лише виробленням антитіл. Дві інші потенційні проблеми такого типу вакцин полягають у тому, що, як і у випадку з інактивованими вірусними вакцинами, вакцини з субодиниць необхідно вводити шляхом ін'єкції, місце ін'єкції може бути важливим для якості подальшої імунної відповіді, і може знадобитися багаторазове введення і, отже, повторні ін'єкції.

9.1.4. Вакцини, що містять ДНК або РНК

При застосуванні обговорених вище типів вакцин у організм доставляються антигени, або у складі послабленої чи інактивованої вірусної частки, або у вигляді окремих антигенів чи пептидів, які містять епітопи. Але, як вважається, найбільш революційними є високотехнологічні вакцини, які містять фрагмент вірусної ДНК, яка кодує антиген, або навіть матричну РНК білка-антигена. Треба зазначити, що до 2021 року ДНК-вакцини не були зареєстровані для використання в якості вакцин для людей, а можливості РНК-вакцин взагалі вважалися сумнівними. Але під час пандемії ковід19 декілька фірм досягли прориву, особливо у виготовленні РНК-вакцин, і декілька типів таких вакцин получили схвалення ВООЗ для використання за пришвидшеною процедурою.

Поки що ці вакцини випростовують відносно недовго і тільки проти одного вірусу – коронавірусу SARS-Cov-2. Ще накопичено замало даних щодо можливого віддаленого впливу цих вакцин на здоров'я людини. Але, оскільки проти SARS-Cov-2 були також розроблені і традиційні вакцини, які містять інактивовані віруси або вірусні антигени, є можливість порівняти їх ефективність з ДНК- і РНК-вакцинами. За непрямими порівняннями, найбільшу ефективність виявили РНК-вакцини, а найменшу – традиційні. Треба однак зазначити, що ці дані є дуже попередніми. Через це важко обговорювати також переваги і недоліки високотехнологічних вакцин. Тому наразі ми просто розглянемо особливості ДНК- і РНК-вакцин.

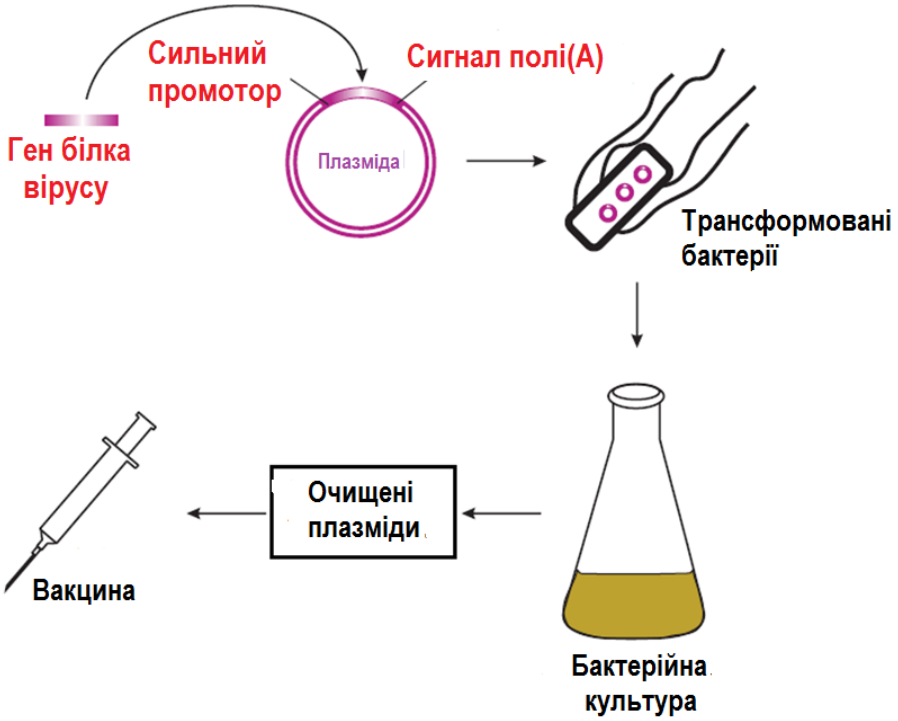
Використання *ДНК-вакцини* передбачає введення в клітину хазяїна вірусної ДНК, яка кодує антиген, з метою викликати у вакцинованого об'єкту синтез антигена. Однією з переваг такого підходу є те, що він забезпечує стабільне виділення нового антигена для стимуляції імунної системи, як і жива вірусна вакцина. Оскільки антиген, тобто в даному випадку білок вірусу, продукується усередині клітин вакцинованого об'єкту, є вірогідним стимулювати достатню обумовлену Т-лімфоцитами імунну відповідь.

Фрагмент вірусної ДНК, який буде відігравати роль вакцини, використовують або в складі бактерійної плазміди, або включають в геном вірусного вектора.

Процедура отримання ДНК-вакцини у вигляді плазміди показана на Мал. 9.3. Послідовність, що кодує антиген, отримують безпосередньо з вірусної ДНК або за допомогою зворотної транскрипції з РНК-вірусів. Надалі її вставляють в плазміду між сильним промотором і сигналом полі(А). Плазміда реплікується в клітинах бактерій і надалі очищається для використання у якості вакцини.

Проблемою є яким те, яким чином доставити цю ДНК в ядро клітини, де на ній буде синтезуватися матрична РНК. Цю проблему вирішують різними способами, які були раніше розроблені задля доставки ДНК в ядро клітини тварин: або ін'єкцією в м'яз, або з використанням методу «генної гармати», коли покриті ДНК мікроскопічні частинки золота

доставляються безпосередньо у клітини шкіри, у складі ліпосом, електропорацією тощо. Проте у всіх цих методів є декілька питань, пов'язаних з безпекою. Зокрема, потрібна гарантія, що введення ДНК не ініціює автоімунного захворювання, а також що ДНК, що вводиться, під час вбудовування в геном хазяїна не спричинить мутацій, що призведуть до злоякісної трансформації.



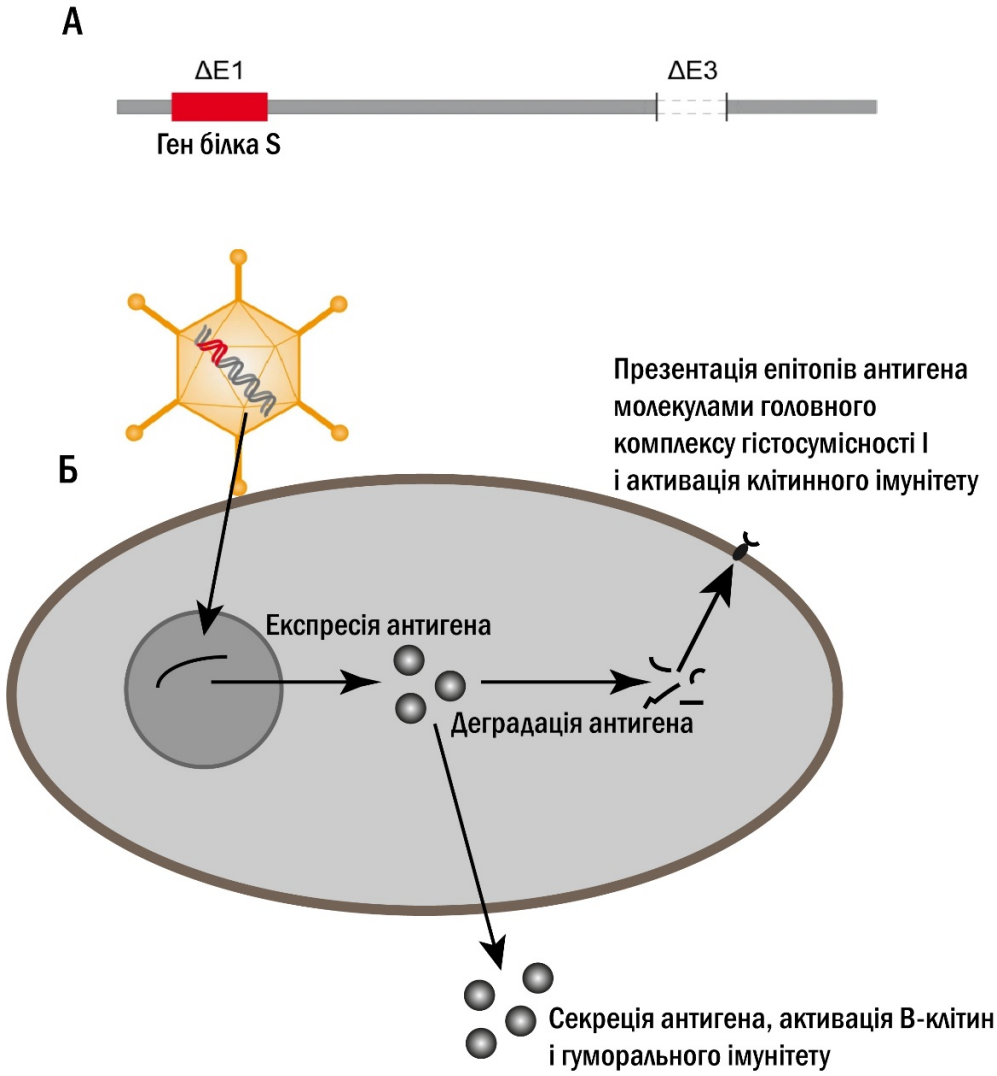
Мал. 9.3. Схема отримання ДНК-вакцини (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Іншим підходом для доставки ДНК-вакцини в ядро клітини є використання вірусних векторів. При такому методі фрагмент ДНК цільового вірусу, який кодує антиген, вставляється в геном іншого вірусу, який спроможний проникати в клітини хазяїна і використовувати молекулярну машинерію хазяїна для експресії власних генів. При цьому почнеться і експресія антигена цільового вірусу. Але існує загроза, що при випадковій інтеграції ДНК вірусного вектора в геном хазяїна може трапитися злоякісна трансформація клітини. Крім того, вірусний вектор не повинен викликати хвороби.

У ДНК-вакцинах проти SARS-Cov-2 головним антигеном є білок S виросту оболонки коронавірусу (спайк-білок). У якості вектора використовують аденовіруси, збудники звичайних застуд. Геном аденовірусів потрапляє в ядро клітин-хазяїв, але не інтегрується у хромосоми. Для того, щоби вектор не викликав захворювання, його генетично модифікують і видаляють певний ген, якій кодує абсолютно необхідний для репродукції вірусу в клітині-хазяїні білок. При напрацюванні вірусу вакцини цей білок додають до культури клітин, і таким чином він успішно реплікується. Але при вакцинації хазяїна він починає реплікацію, синтезуються вірусні білки разом з антигеном цільового вірусу, але реплікація не може завершитися через відсутність потрібного білка, нові віріони не утворюються і захворювання не виникає. Під час приготування такої вакцини потрібен суворий контроль, щоби у вакцину не потрапив повноцінний, не дефектний вірус, який зможе викликати хворобу.

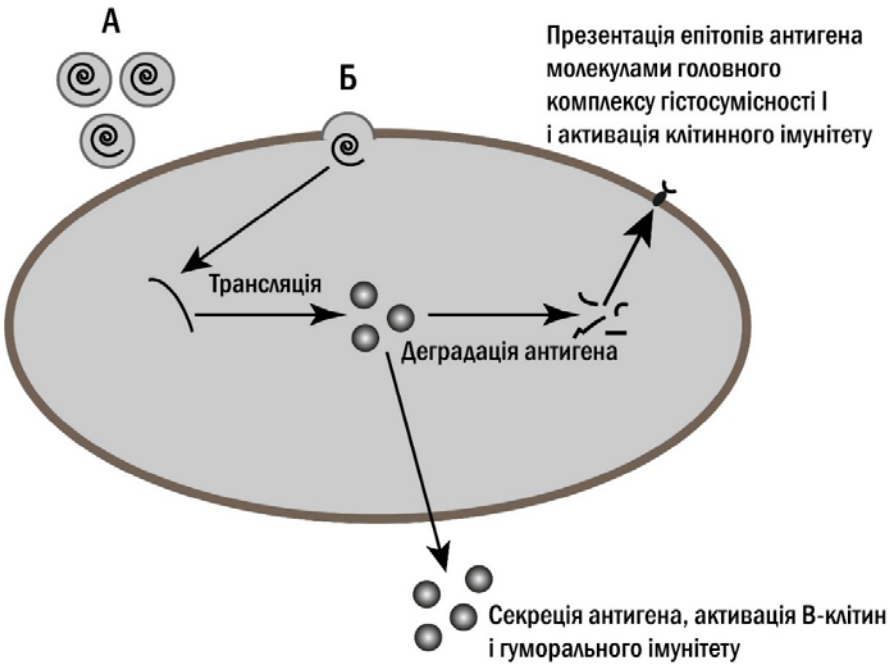
З аденовірусами людини є проблема: особина-реципієнт можливо раніше вже хворів на саме такий тип вірусу, і має до нього імунну пам'ять. В такому випадку ДНК-вакцина не

буде ефективною, оскільки вірусний вектор буде нейтралізований ще до того, як потрапить у клітини організму. Тому треба уважно підбирати вірус, який буде вектором. І наприклад у деяких ДНК-вакцинах проти SARS-Cov-2 в якості вектора використовують аденовірус шимпанзе, до якого людина навряд чи буде мати імунітет. Загальна схема роботи ДНК-вакцини проти SARS-Cov-2 показана на Мал. 9.4.



Мал. 9.4. ДНК-вакцина проти збудника ковід-19. (А) Схема геному аденовірусу, не здатного до реплікації. Ранні гени аденовірусу E1 і E3 видалені, замість гена E1 вставлений ген білка S коронавірусу. (Б) Модифікований аденовірус заражає клітину, починається експресія гена S і можливо деяких генів аденовірусу. Частина молекул синтезованого антигена коронавірусу S деградує і епітопи презентуються молекулами головного комплексу гістосумісності I, що ініціює клітинний імунітет. Інша частина молекул білка S секретується і ініціює гуморальний імунітет.

Вакцини, що *містять мРНК*, з'явилися також під час пандемії ковід-19. Раніше вважали, що по-перше мРНК надто нестабільна, а по-друге, немає надійного способу доставити цю мРНК у цитоплазму клітин реципієнта. Але декілька фірм вирішили ці проблеми, і завдяки їх ноу-хау високотехнологічна РНК-вакцина почала використовуватися. У РНК-вакцинах проти SARS-Cov-2 матричну РНК, яка кодує послідовність амінокислот білка S, заключають у наночастинки, оточені оболонкою з ліпідів. Після введення вакцини, оболонка зливається з плазматичною мембраною клітин реципієнта, мРНК вивільняється в цитоплазму і на ній відбувається трансляція. Надалі, як і у випадку з ДНК-вакциною, антиген S стимулює клітинний і гуморальний рівні адаптивного імунітету (Мал. 9.5).



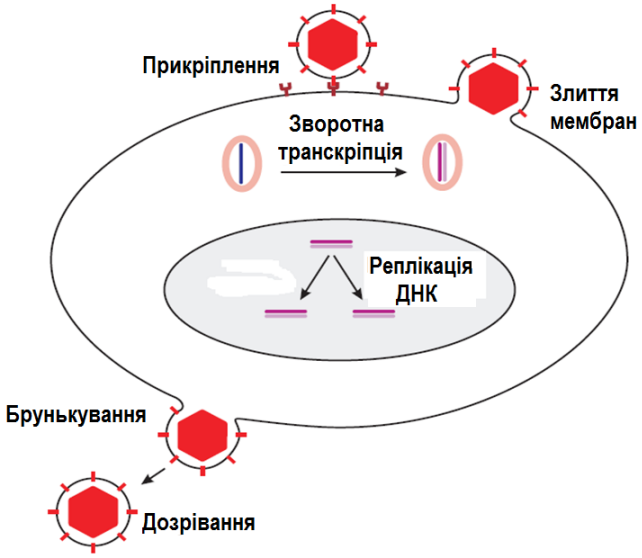
Мал. 9.5. РНК-вакцина проти збудника ковід-19. (А) Вакцину вводять у вигляді молекул мРНК білка S, які оточені ліпідною оболонкою. (Б) Після злиття оболонки з плазматичною мембраною клітини, мРНК потрапляє у цитоплазму, де відбувається трансляція. Частина молекул синтезованого антигена коронавірусу S деградує і епітопи презентуються молекулами головного комплексу гістосумісності I, що ініціює клітинний імунітет. Інша частина молекул білка S секретується і ініціює гуморальний імунітет.

Зазначимо ще раз, що стосовно віддалених наслідків застосування ДНК- і РНК-вакцин інформація поки що відсутня, але немає причин очікувати якихось проблем. Ці два високотехнологічних типу вакцин використовують поки що проти єдиного вірусу, антиген якого виявився досить мінливим. У науковій літературі не вщухає дискусія щодо тривалості імунної пам'яті, яка утворюється, співвідношення ініційованих вакцинами гуморальної і клітинної форм імунітету тощо. У цьому підручнику ми ці питання обговорювати не будемо. Проте накопичені дані дозволяють стверджувати, що розробка ДНК- і РНК-вакцини є багатообіцяючим і перспективним напрямком розвитку методів вакцинації людей і тварин від вірусних хвороб.

9.2. Противірусні препарати

Проти багатьох вірусних інфекцій з тих чи інших причин не існує вакцин. Однак впровадження антибіотиків у 1940-х роках для боротьби з бактеріальними інфекціями викликало сподівання, що можуть бути знайдені аналогічні засоби широкого спектру лікування вірусних інфекцій (противірусні препарати). Проте навіть сьогодні, маючи близько 50 противірусних препаратів, схвалених для використання у людей, ця надія не реалізувалася. Більшість противірусних засобів специфічні лише для одного або кількох вірусів, і половина наявних препаратів призначені виключно для лікування ВІЛ-1.

Причина цього полягає в тому, що важко знайти сполуки, які б специфічно втручалися в активність, пов'язану з вірусом, і не робили значного шкідливого впливу на активність клітини-хазяїна. Останнім часом, проте, стало відомо чимало специфічних для вірусів реакцій, які можуть бути об'єктами дії противірусних засобів (Мал. 9.6).



Мал. 9.6. *Деякі стадії циклу репродукції вірусів, що є потенційними мішенями противірусних препаратів (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Крім того, суттєво змінилася стратегія розробки нових противірусних засобів. Раніше протягом пошуку антивірусних препаратів проводили скринінг серед дуже великої кількості сполук, які могли б потенційно мати противірусну активність. Процедура скринінгу включає перевірку розчинів речовин проти низки вірусів, що ростуть в клітинних культурах.

Нині створення антивірусних препаратів, так званий раціональний дизайн, головним чином засновано на їх дії на певну активність вірусу (Мал. 9.6). Після вибору виду діяльності вірусу, що має бути заблокований, необхідно обрати вірусний білок, який стане мішенню дії препарату. Далі визначають детальну тривимірну структуру білка, використовуючи такі методи, як рентгеноструктурна кристалографія, і в молекулі білка вибирається цільовий сайт дії. Надалі з використанням комп'ютерних програм визначаються речовини, які зв'язуватимуться з цільовим сайтом і інгібуватимуть активність вірусного білка. Таким чином, можна очікувати прискорення розробки нових препаратів проти різних вірусів.

Слід враховувати, що препарати, які мають клінічне застосування, повинні інгібувати *тільки* реплікацію вірусу, але не чинити шкідливої дії на хазяїна, або така дія має бути слабкою. Тому під час розробки противірусних препаратів проводяться інтенсивні дослідження впливу потенційних ліків на незаражені клітини і увесь організм. У будь-якому випадку, за концентрації, яка забезпечує достатній рівень пригнічення реплікації вірусів, потенційний противірусний препарат не повинен блокувати синтез ДНК в незаражених клітинах організму або блокувати ділення незаражених клітин.

Усі противірусні засоби прийнято поділяти на 2 групи:

1. Противірусні засоби прямої дії;
2. Противірусні засоби опосередкованої дії.

Засоби прямої дії безпосередньо впливають на віруси, не залучаючи ніяких допоміжних механізмів організму.

До противірусних засобів другої групи належать інтерферони (людські і рекомбінантні) та індуктори інтерферону. Особливістю засобів цієї групи є те, що вплив на вірус здійснюється через активацію численних механізмів імунної системи та, відповідно, ефект можливий лише при повноцінній роботі і наявності всіх її факторів у достатній кількості.

Пряма противірусна дія препаратів полягає у блокуванні вірусу на різних етапах його реплікації та проникнення у клітину, а саме – у перешкоджанні проникненню вірусу у клітини, вивільненню генетичного матеріалу, блокуванні копіювання генетичного матеріалу вірусу та ускладненні вивільнення віріонів, що утворилися.

В залежності від впливу на етап реплікації вірусу, противірусні засоби класифікуються наступним чином.

I. Препарати, що діють на позаклітинні форми вірусу.

II. Інгібітори проникнення вірусів в клітину.

III. Інгібітори нейрамінідази вірусів грипу..

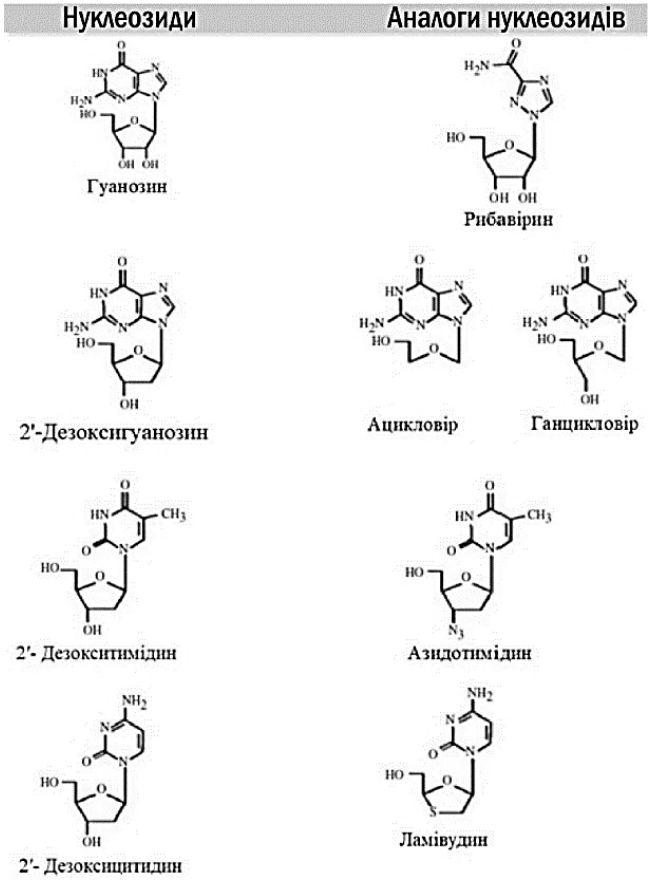
IV. Препарати, що пригнічують репродукцію вірусу: інгібітори ДНК-, РНК-полімераз вірусів, інгібітори зворотної транскриптази, інгібітори протеази.

V. Інгібітори дозрівання вірусів.

9.2.1. Приклади антивірусних препаратів, які мають клінічне застосування.

Аналоги нуклеозидів. Низка антивірусних ліків є синтетичними сполуками, структурно подібними нуклеозидам, і вони діють, втручаючись в синтез нуклеїнової кислоти вірусу. Після поглинання клітиною, аналоги нуклеозидів, подібно природним нуклеозидам, фосфорилюються і стають аналогами нуклеотидів. Таким чином, активною формою препарату є трифосфатпохідні аналогів нуклеозидів; вони діють як конкурентні інгібітори вірусної полімерази, наприклад, зворотної транскриптази. Під час синтезу нуклеїнової кислоти, якщо один з цих аналогів нуклеотидів вбудовується в зростаючий ланцюг, синтез припиняється, тому що структура аналогів нуклеотидів запобігає приєднанню наступного нуклеотиду.

Приклади аналогів нуклеозидів, які використовують з метою лікування вірусних інфекцій, наведені на Мал. 9.7.



Мал. 9.7. Нуклеозиди на їхні аналоги, що використовуються як противірусні препарати.

Рибавірин є аналогом гуанозину. Він використовується для лікування інфекцій кількох РНК-вірусів, особливо персистентних інфекцій вірусу гепатиту С. Комбінована терапія рибавірином та α-інтерфероном у багатьох пацієнтів знищує інфекцію вірусу гепатиту С.

Механізм дії рибавірину повністю не вивчений, і було запропоновано щонайменше п'ять гіпотез, які пояснюють його противірусну активність. Було показано, що препарат пригнічує декілька видів активності вірусу, включаючи синтез вірусної РНК та кепування мРНК, і цілком імовірно, що він має більше одного способу дії.

Треба зазначити, що при спроби лікувати інфекцію вірусу SARS-Cov-2 у хворих на тяжку форму ковід-19 використання рибовірину не призвело до успіху.

Аналоги нуклеозидів, які інгібують синтез ДНК вірусів герпесу. *Ацикловір* значно інгібує синтез ДНК вірусу, але справляє дуже слабкий ефект на синтез ДНК клітини. У заражених герпесвірусами клітинах, перше фосфорилювання ацикловіру здійснюється вірусною тимідинкіназою. Тимідинкінази клітини з'являються лише на певних стадіях клітинного циклу і мають набагато меншу спорідненість до ацикловіру, ніж фермент вірусу, тому фосфорилювання акцикловіру в незаражених клітинах практично не відбувається.

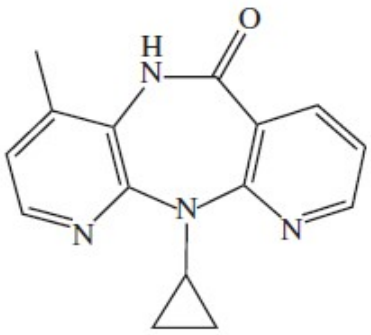
Впродовж синтезу ДНК, трифосфат акцикловіру конкурує з дезоксигуанозінтрифосфатом за включення в ланцюг, що синтезується, Коли він вставляється, синтез ДНК припиняється, оскільки у нього відсутня 3′-ОН група.

Ганцикловір, як і ацикловір, є аналогом дезоксігуанозину, і перше його фосфорилювання в клітині виконується протеїнкіназою вірусу. Проте включення ганцикловіру в ДНК клітини значно ймовірніше, ніж включення ацикловіру, внаслідок чого ганцикловір має значні побічні ефекти, зокрема викликає зниження кількості клітин крові через пошкодження клітин кісткового мозку. Ганцикловір використовують для боротьби із зараженням цитомегаловірусом, стосовно якого ацикловір є менш ефективним.

Аналоги нуклеозидів, які інгібують зворотну транскрипцію. Аналогом дезоксітимідину є азидотимідин. Він досліджувався як протипухлинні ліки, і було виявлено, що він інгібує зворотну транскриптазу ВІЛ (родина *Retroviridae*). Як і інші аналоги нуклеозидів, він фосфорилюється до трифосфату після поглинання клітиною. Азидотимідин трифосфат сильніше зв'язується із зворотною транскриптазою вірусу, ніж з ДНК-полімеразою клітини, і зворотна транскриптаза переважно включає до складу ДНК саме його, а не дезокситимідинтрифосфат. Таким чином, азидотимідин інгібує зворотну транскриптазу ВІЛ. Проте він все-таки втручається в синтез клітинної ДНК, і аналогічно ганцикловіру, може пошкодити клітини кісткового мозку.

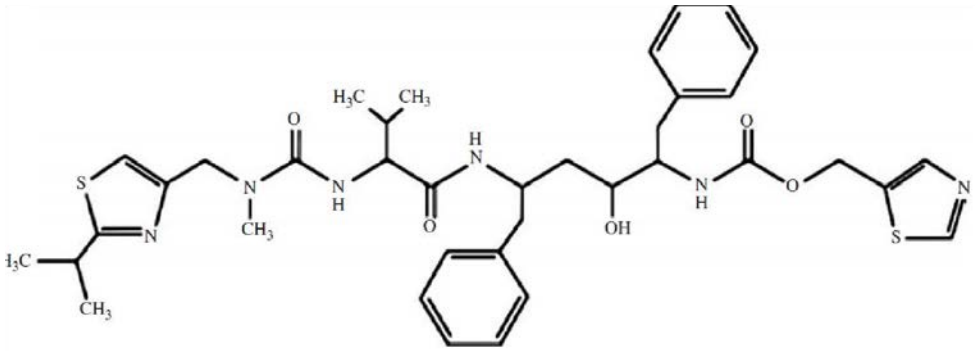
Є також низка інших аналогів нуклеозидів (наприклад, ламівудин), які інгібують зворотну транскриптазу ВІЛ і вірусу гепатиту В (родина *Hepadnaviridae*).

Ненуклеозидні інгібітори зворотної транскрипції. З використанням раціонального дизайну молекул були розроблені декілька ненуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази ВІЛ. Прикладом таких інгібіторів є невірапін (Мал. 9.8). З'єднуючись зі зворотною траскриптазою, він блокує активність РНК-залежної і ДНК-залежної полімерази.



Мал. 9.8. Невірапін - інгібітор зворотної транскриптази ВІЛ, який не є аналогом нуклеозидів.

Інгібітори протеази ВІЛ. Дозрівання віріонів ретровірусів включає розрізання вірусною протеазою білків Gag і Gag-Pol з утворенням білків віріонів. Продукти розрізання білка Gag формують матрикс, а білка Gag-Pol є ферментами віріона. Якщо розрізання не відбувається, віріони ВІЛ не стають інфекційними. Були розроблені пептиди, які імітують сайти розрізання білків, і ці продукти зв'язуються з активним сайтом протеази ВІЛ. Внаслідок такого зв'язування від заражених ВІЛ клітин відбруньковується мало віріонів, а віріони, що відбрунькувалися, є неінфекційними. Прикладом інгібітору протеази ВІЛ є ритонавір (Мал. 9.9).



Мал. 9.9. Ритонавір - пептидний інгібітор протеази ВІЛ.

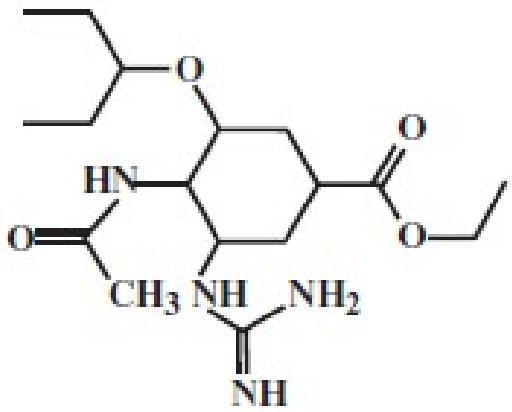
Інгібітори злиття ВІЛ. Після того, як віріон ВІЛ-1 зв'яжеться з рецептором, трансмембранний глікопротеїн gp41 повинен забезпечити злиття ліпідної оболонки віріона з мембраною клітини, щоб вміст віріона міг вивільнитися в цитоплазму. Для того, щоб це сталося, gp41 зазнає ряд конформаційних змін, які ініціюються зв'язуванням вірусу з рецептором і корецепторами на поверхні клітини (Мал. 4.7).

Була розроблена низка ліків, які інгібують злиття мембран ВІЛ-1 і потенційної клітини-хазяїна. Вони зв'язуються з gp41 і інгібують конформаційні зміни. Прикладом такого препарату є енфувіртид, що складається з 36 амінокислот, котрий зв'язується з послідовністю в регіоні gp41, який взаємодіє з іншою послідовністю gp41, викликаючи конформаційні зміни. Такими чином, на відміну від інших засобів, діючих проти ВІЛ, енфувіртид запобігає зараженню клітин ВІЛ-1. Набагато менш активним препарат є щодо ВІЛ-2, трансмембранний глікопротеїн якого лише віддалено споріднений глікопротеїну ВІЛ-1. Одним з недоліків енфувіртиду є те, що він повинен вводитися у вигляді підшкірних ін'єкцій, тоді як інші препарати для боротьби з ВІЛ приймаються оральним шляхом.

Інгібітори нейрамінідази вірусів грипу. Одним з поверхневих білків вірусів грипу типу А і В (родина *Orthomyxoviridae*) є нейрамінідаза. Цей фермент грає ключову роль впродовж завершальної стадії брунькування віріонів на заражених клітинах; у випадку інгібування

ферменту, віріони не вивільняються. Кожен виступ нейрамінідази на поверхні віріона складається з чотирьох мономерів, кожен з яких у свою чергу складається з «кульки» на «паличці».

У 1983 р. нейрамінідаза вірусу грипу була отримана в кристалічному вигляді, і була визначена її структура. Було встановлено, що мономери мають глибоку щілину, і ця щілина є активним сайтом ферменту. Були розроблені сполуки, які зв'язуються з щілиною, і низка з цих сполук інгібує активність нейрамінідази. Одна з таких сполук, озельтамівір (відомий також під патентованою назвою Таміфлю), використовується як ліки проти вірусу грипу (Мал. 9.10).



Мал. 9.10. *Озельтамівір – інгібітор нейрамінідази вірусу грипу.*

Стійкість вірусів до антивірусних препаратів. Незабаром після введення антивірусних препаратів в клінічну практику, почали з'являтися стійкі до препаратів штами вірусів. Подібно до стійких до антибіотиків штамів бактерій і стійких до пестицидів шкідливих організмів, це стало результатом тиску добору. Таким чином, почали швидко виникати стійкі генотипи вірусів, особливо РНК-геномних вірусів, і такі генотипи отримували селективну перевагу і ставали домінантними в організмі хазяїна, в якому були присутніми ліки.

Стійкі штами вірусів мають одну або більше мутацій в генах, які кодують білки, що є мішенями для антивірусних ліків. У гені зворотної транскриптази ВІЛ1 (родина *Retroviridae*) мутації, що забезпечують стійкість до аналогів нуклеозидів і до інгібіторів не нуклеозидної природи, відбуваються в різних кодонах. Деякі мутації забезпечують множинну стійкість, тобто стійкість до різних типів ліків. Більшість мутацій, спостережуваних у ВІЛ-1, є замінами амінокислот; проте деякі мутації являються делеціями або інсерціями.

Виникнення стійких штамів вірусу являє клінічну проблему. У такому випадку необхідно застосовувати альтернативні ліки. Нині стандарт лікування, наприклад, інфекції ВІЛ передбачає використання декількох препаратів в комбінації. Приміром, можуть використовуватися два інгібітори зворотної транскриптази і інгібітор протеази. Імовірність появи в організмі хворого штаму вірусу, одночасно стійкого до усіх ліків, дуже мала. Такий підхід називають високоактивною антиретровірусною терапією (ВААРТ). ВААРТ не звільняє тіло пацієнта від ВІЛ-інфекції: персистентна інфекція зберігається в латентній формі в заражених макрофагах і CD_4 Т-клітинах пам'яті і деяких інших схованках, де інфіковані клітини можуть уникнути дії противірусного препарату і/або імунної реакції організму. Але ВААРТ значно знижує смертність від СНІДу у розвинених країнах і ризик передавання ВІЛ дитині від ВІЛ-інфікованої матері.

Окрім появи стійких до ліків штамів вірусів, є інші проблеми, пов’язані з антивірусною терапією. Так, більшість ліків не видаляє вірус з тіла пацієнта, і чимало лікарських препаратів мають значні побічні ефекти. Для багатьох вірусних хвороб взагалі досі не розроблені адекватні засоби лікування. З цієї причини дослідження в галузі розробки нових противірусних препаратів залишаються вкрай актуальними. Певні надії сьогодні покладаються на використання власних механізмів антивірусного захисту організму хворого. Зокрема, в цьому плані дуже привабливим виглядає сайленсинг РНК.

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- пояснювати, яким чином противірусні вакцини допомагають контролювати вірусні захворювання
- знати методичну основу методів отримання противірусних вакцин
- знати переваги і недоліки головних типів противірусних вакцин
- знати головні механізми дії противірусних препаратів
- розуміти причини виникнення стійких до дії препаратів штамів вірусів

РОЗДІЛ 10. ПАТОГЕНЕЗ ПРІОННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Деякі інфекційні хвороби людини і тварин викликаються інфекційними агентами білкової природи – пріонами. Пріони не є вірусами, однак більшість присвячених їм досліджень публікуються в журналах з проблем вірусології; пріони фактично «за замовчанням» були віднесені до царини вірусології.

Для захворювань, що викликаються пріонами, є характерним дуже тривалий інкубаційний період – часто він вимірюється роками. Ознаки захворювання, викликаного пріонами, включають недоумство і втрату координації, пацієнт деградує, і захворювання завершується неминучою смертю.

Хвороби, що викликаються пріонами, носять загальну назву трансмісивні губчасті енцефалопатії (ТГЕ). Слово «енцефалопатія» означає захворювання мозку, а слово «губчаста» вказує на формування в мозковій тканині отворів, що надають їй подібність до губки. Нарешті, слово «трансмісивні» означає, що захворювання може передаватися за допомогою інфекційного агенту від однієї особини цього виду до іншої особини цього ж виду, або іноді від особини одного виду особині іншого виду.

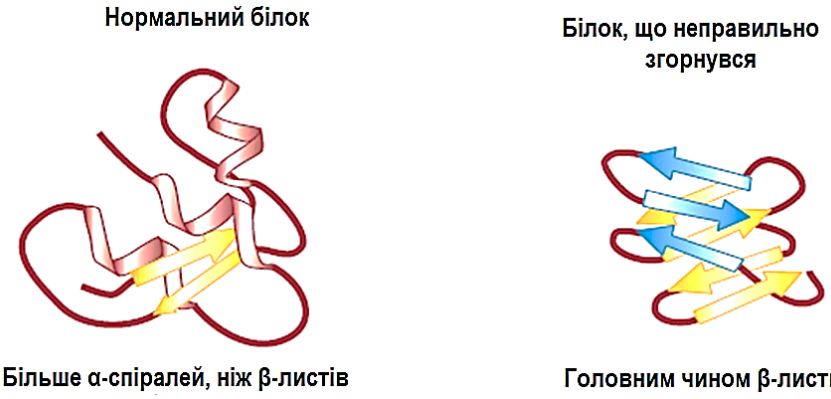
10.1. Природа пріонів

Інфекційні агенти, які викликають ТГЕ, не містять нуклеїнових кислот; вони є формами нормального білка клітини, що неправильно згорнулися. «Тільки білкова» гіпотеза сутності пріонів була розроблена американським лікарем Стенлі Прузінером (Stanley Prusiner), який і запропонував термін «пріони» (від англ. proteinaceous infectious particles – білкові заразні частинки).

Версії нормального білка клітини були знайдені у ссавців, птахів і рептилій; у людини цей білок кодується геном *PRNP* (prion protein). Роль нормальної форми білка в клітини досі не зовсім ясна. Він циклічно переміщається між ендосомами і поверхнею клітини, де закорюється в плазматичній мембрані за рахунок гідрофобного «якоря» на С-кінці. Білок PrP знайдений у багатьох типах клітин, але особливо численний в клітинах центральної нервової системи.

У нормальній формі білок має вторинну структуру, яка містить 42% α-спіралей і 3% β-листів, тоді як у вигляді форми, що неправильно згорнулася, доля ділянок з α-спіралями зменшується до 30%, а доля ділянок з β-листами зростає до 43% (Мал. 10.1). Така зміна конформації супроводжується зміною властивостей білка. Якщо нормальний білок повністю руйнується протеїназою К, то білок, що неправильно згорнувся, високо стійкий до дії ферменту. Помилкове згортання також робить білок нерозчинним в неіонних детергентах. У тканинах, що містять пріони, молекули білків, що неправильно згорнулися, формують агрегати у вигляді фібрил, паличок або інших форм, залежно від виду хазяїна і штаму пріона.

Щодо нормальної форми білків і форми білків, що неправильно згорнулися, використовуються різні позначення. Нормальний білок зазвичай означають як PrP^{c} (PrP = prion protein; c = cell), тоді як форму, що неправильно згорнулася, означають як PrP^{Sc} (Sc = scrapie) або як PrP^{res} (res = resistant to proteinase).

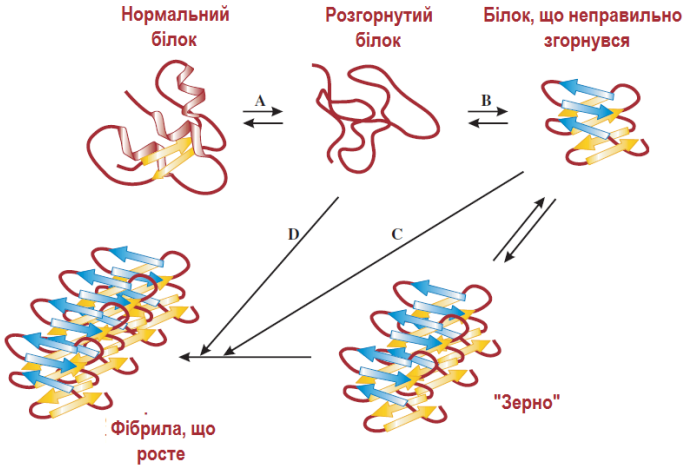


Мал. 10.1. *Схематичне зображення нормальної і неправильно згорнутої форми пріона. Неправильно згорнута форма, у порівнянні з нормальною, має більше β-листів (показані стрілками) (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Механізм, за допомогою якого пріон «реплікується», є незрозумілим. Білок, що неправильно згорнувся, якимось чином викликає неправильне згортання нормальних білків клітини, але як саме це відбувається, залишається достеменно невідомим.

Припускають, що ініціація процесу реплікації пріона вимагає чогось на кшталт «зерна», яке являє собою агрегат декількох молекул неправильно згорнутого білка (Мал. 10.2).

Таке «зерно» може бути сформоване після зараження пріонами, або після дуже рідко спостережуваної конформаційної зміни нормальної молекули, або як результат експресії мутантного гена пріона.



Мал. 10.2. *Модель реплікації пріонів. Копії нормального білка розгортаються (A) і знову згортаються у форму, яка представлена головним чином β-листами (показані стрілками). Реплікація може потребувати «зерна» критичного розміру. Приєднання до такого зерна неправильно згорнутих (C) або розгорнутих (D) молекул призводить до незворотності процесу (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Молекули білка, що неправильно згорнувся, накопичуються в ендосомах і лізосомах, що особливо виражено в нервових клітинах. За деяких пріонних захворювань такий білок виявляється також в інших органах і тканинах, включаючи селезінку і лімфатичні вузли. Накопичення пріонного білка супроводжується його агрегацією, утворенням високо впорядкованих фібрил (амілоїду), що зрештою призводить до загибелі клітини. Пріони, що вивільнилися, здатні проникати в сусідні клітини, також викликаючи їх зараження і загибель

Інфекційність пріонів зберігається під час нагрівання, вона в деякій мірі зберігається навіть після автоклавування впродовж тривалого часу. Окрім цього, пріони стійкі також до дії багатьох інших типів обробок.

10.2. Пріонні хвороби тварин і людини

Відомі пріонні хвороби *тварин* узагальнені у таблиці 10.1. В ній же наведені роки, коли для цих хвороб була встановлена здатність до передавання від хворої особини здоровій.

Таблиця 10.1. *Відомі пріонні хвороби тварин*

Хвороба, її поширення і особливості	**Рік встановлення інфекційності**
Скрепі. Поширена у кількох країнах світу. Вражаються вівці, кози.	1936
Трансмісивна енцефалопатія норок. Зустрічається дуже рідко, але смертність дорослих особин становить майже 100% при спалахах.	1965
Хронічна хвороба виснаження. Вражає лосів, чорнохвостих і білохвостих оленів. Поширена у Колорадо і Вайомінгу, США.	1983
Губчаста енцефалопатія великої рогатої худоби («коров'ячий сказ»). Був спалах у Великій Британії.	1988
Губчаста енцефалопатія котів. Вражаються домашні коти.	1991

Скрепі, що також зветься «вертячка», «почесуха», «трясучка», є відомою в Європі впродовж сотень років хворобою овець. Хворі тварини починали чухатися об тверді об'єкти, наприклад, об стовпи загорож, звідки і виникла назва хвороби – *скрепі* (англ. *scrapie*, від *scrape* – шкребти). Хворі тварини скрипіли зубами, спотикалися і падали, і врешті-решт помирали. У 1936 році було показано, що скрепі може бути передана від вівці до вівці за допомогою введення тканини мозку і при безпосередньому контакті.

У США в 1947 р. була вперше описана трансмісивна губчаста енцефалопатія у норок, що розводилися на фермі, згодом у кінці 1980-х років хронічна хвороба, що виснажує, була описана у чорнохвостих оленів і лосів, що утримувалися в неволі. Надалі це захворювання було виявлене у диких чорнохвостих оленів, білохвостих оленів і лосів; воно є єдиною формою ТГЭ у тварин, що живуть в дикій природі.

Губчаста енцефалопатія корів, або «коров'ячий сказ», уперше була описана у Великій Британії в 1986 р. Незабаром стався великий спалах цього захворювання. Хвороба поширювалася через використання для корму великої рогатої худоби м'ясо-кісткового борошна. Це борошно виробляли з тіл хворих тварин. Зовні здорові корови могли насправді містити в головному і спинному мозку великі кількості дефектних молекул білка.

Залишається невідомим, чи мав початковий інфекційний матеріал стосунок до овець, хворих на скрепі, або він належав коровам, у яких хвороба виникла спонтанно.

Коров'ячий сказ був експортований з Великої Британії в живих коровах, а також, ймовірно, в м'ясо-кістковому борошні. Згодом про губчасту енцефалопатію корів повідомили у багатьох країнах світу. У ранній період епідемії коров'ячого сказу повідомлялося про губчасту енцефалопатію багатьох тварин, у т. ч. домашніх кішок, пум і тигрів, а також бізонів і антилоп. Ймовірно, ці випадки були результатом годування цих тварин м'ясом і м'ясо-кістковим борошном корів, хворих на коров'ячий сказ.

Пріонні захворювання у людей. У людей низка захворювань, що викликаються пріонами, підрозділяється на три категорії: спонтанні, спадкові і набуті. Відомі пріонні захворювання людини наведені у таблиці 10.2.

Таблиця 10.2. *Пріонні захворювання людини.*

Категорія хвороб	Хвороба
Спонтанні	Спорадична хвороба Кройцфельда–Якоба
Спадкові	Родинна форма хвороби Кройцфельда–Якоба Синдром Герстмана-Стройсслера-Шейнкера Фатальне сімейне безсоння
Набуті	Куру Варіант хвороби Кройцфельда–Якоба Ятрогенні пріонні хвороби

Спорадична хвороба Крейтцфельдта–Якоба (ХКЯ) є найбільш поширеною і трапляється з частотою близько 1 випадок на мільйон осіб на рік. Ця хвороба була виявлена вперше на початку 20-х років XX сторіччя, коли німецький невролог Альфонс Якоб виявив п'ять випадків незвичайного ураження у людей віком від 30 до 50 років. Практично тоді ж німецький лікар Ганс-Ґергард Кройцфельд у своїй лікарні спостерігав подібну «неординарну» хворобу у 20-річної дівчини. На ранніх стадіях з'являлися порушення чутливості, біль у кінцівках, розлади вегетативної нервової системи. Пізніше наростали зміни зору аж до сліпоти, виникали неритмічні, швидкі, короткі скорочення окремих м'язів, які постійно поновлювалися. На цьому тлі помітні були ознаки наростаючого слабоумства із зубожінням спектра емоцій.

У 1977 році була зафіксована ятрогенне (обумовлена медичними процедурами) передавання збудників хвороби через заражені внутрішньомозкові електроди, які до цього були використані у людини з хворобою. Це відбулося незважаючи на попереднє знезараження електродів етанолом і формальдегідом. У 2004 році було заявлено про можливість передавання патологічних збудників при переливанні крові.

Походження спорадичних випадків ХКЯ залишається незрозумілим.

Спадкові пріонні хвороби мають високу частоту виникнення в родинах, у яких геноми кодують певні амінокислоти в деяких кодонах гена *PRNP*. На родинну форму хвороби Кройцфельда-Якоба припадає приблизно 10% усіх випадків цієї хвороби. Синдром Герстмана-Стройсслера-Шейнкера зустрічається з частотою менше 1 випадка на рік на 10 мільйонів людей. Від ХКЯ відрізняється перш за все морфологічними ознаками ураження мозку.Фатальне сімейне безсоння є нещодавно описаним аутосомно-домінантним захворюванням, яке проявляється у осіб середнього і похилого віку тяжким безсонням, вегетативними розладами, своєрідними когнітивними порушеннями. Зустрічається украй рідко.

Набуті пріонні захворювання трапляються у випадках, коли до організму здорової людини тим чи іншим чином потрапляє хвороботворний пріон хворої людини або навіть тварини.

Куру траплялася майже виключно у високогірних районах Нової Гвінеї, у аборигенів племені форі. Вперше вона була виявлена на початку XX століття. У 1950-х рр. Деніел Карлтон Гайдушек (Daniel Carleton Gajdusek) розкрив інфекційну природу куру. Живучі довгий час серед аборигенів і досліджуючи цю хворобу, він вперше пов’язав її з традицією канібалізму – поїдання мозку померлих. Він вважав, що куру викликається «латентним вірусом». Лише пізніше з’ясувалося, що інфекційний агент куру – пріон. Вважають, що перший випадок цієї хвороби являв спорадичну хворобу Кройцфельда-Якоба, і хвороботворні

варіанти пріонів почали поширюватися через канібалізм. З припиненням практики ритуального канібалізму ця хвороба фактично зникла.

Набутий варіант ХКЯ є відносно новою хворобою. Перший випадок цього захворювання стався у Великої Британії в 1995 р., коли померла молода людина. Після цього трапилося ще декілька випадків, у тому числі і за межами Великої Британії. Не було ніяких доказів, що ці випадки обумовлені спадковою формою пріонного захворювання, також вони відрізнялися від спорадичної форми. Надалі було встановлено, що пріони, які викликають коров'ячий сказ, за молекулярними характеристиками відповідні пріонам, що викликають варіант ХКЯ. Було висловлено припущення, що це захворювання спостерігалося у людей, що вживали в їжу м'ясо хворих корів, і пріон, що викликає губчасту енцефалопатію корів, став збудником варіанту ХКЯ.

Нарешті, ятрогенним шляхом хвороботворні пріони потрапляють до організму людини під час медичних процедур, які передбачають передавання тканин/екстрактів тканин між людьми. Наприклад, лікування карликовості, яка виникає через дефіцит гормону росту гіпофіза, внутрішньом'язовими ін'єкціями цього гормону призвело до низки випадків ХКЯ. Захворювання спричинило те, що гормон росту витягували з гіпофіза, отриманого з трупів, деякі з яких на момент смерті мали неявну пріонну хворобу. Ризик передавання збільшувався через необхідність зібрати матеріал від великої кількості людей, щоб отримати достатню кількість гормону для використання. Можливо також передавання пріонів через переливання крові.

10.3. Штами пріонів і їх передавання

Для деяких агентів, що викликають трансмісивні губчасті енцефалопатії, була диференційована низка штамів, кожен з яких мав фенотипічні особливості, що стійко передаються від покоління до покоління. Наприклад, різні штами агенту скрепі можуть індукувати різні клінічні синдроми у кіз. Відмінності також виявляються під час лабораторних досліджень, в яких пріон можна диференціювати за такими властивостями, як інкубаційний період у мишей після введення в мозок і ступеня стійкості до нагрівання.

Штами вірусів розрізняються по послідовностях нуклеїнових кислот. Пріони не мають нуклеїнових кислот. Тому виникає питання, чим обумовлені відмінності між штамами пріонів? Одне з передбачуваних пояснень полягає в тому, що пріон може мати декілька варіантів неправильного згортання, і кожен з варіантів представляє штам пріона. Альтернативне пояснення полягає в тому, що штами пріонів можуть розрізнятися в ступені глікозилування в двох сайтах глікозилування, так що пріон може існувати в трьох формах: негліколізильованій, моноглікозильованій і діглікозильованій. Цукри в сайтах глікозилування також можуть бути різними.

Пріони можуть бути перенесені в інших членів одного виду і часто інших видів. Ефективність перенесення залежить від входу, через який молекули пріонів потрапляють в тіло; ін'єкція в мозок набагато ефективніша, ніж поглинання з їжею. Також ефективність перенесення залежить від дози – чим вище доза пріона, тим більше вірогідне перенесення.

Іншим чинником, який впливає на ефективність перенесення пріонів, є існування невеликих варіацій в послідовності гена пріона, які призводять до варіації в сприйнятливості між генотипами. Присутність певних амінокислот в певних позиціях можуть зробити окремі особини більш або менш сприйнятливими. Наприклад, вівці сприйнятливіші до скрепі, якщо ген пріона кодує в положенні 136 валін, а не аланін. Невеликі варіації в послідовності

гена пріона також чинять значну дію на інкубаційний період і клінічний перебіг захворювання.

Численні спроби передати агентів трансмісивної губчастої енцефалопатії віддалено спорідненим видам тварин показали, що це складне завдання. У тих випадках, коли передавання вдавалася, мінімальна інфекційна доза була вища, а інкубаційний період довший, ніж протягом передавання пріона близьким видам. Це явище було назване «видовим бар'єром». Проте слід врахувати, що успішність передавання пріона оцінювали по прояву симптомів захворювання. Проте є докази, що в деяких випадках відбувалося безсимптомне зараження, і пріон реплікувався в організмі тварини до закінчення життя зараженої тварини. Інакше кажучи, тривалість життя зараженої тварини виявлялася менше, ніж того вимагав інкубаційний період хвороби. З цієї причини не виключено, що сила «міжвидового бар'єру» під час передавання пріонів переоцінюється.

Якщо пріон переноситься в інший вид тварини і потім переноситься на особини цього ж виду, то з кожним пасажом інкубаційний період стає коротше, поки не стабілізується на певному рівні. Слід брати до уваги, що кожен вид тварин має свій специфічний білок-пріон, і за умови попадання в хазяїна іншого виду початковий пріон примушує неправильно згортатися дещо інший по амінокислотній послідовності білок.

Перенесення інфекційного агенту коров'ячого сказу від корів людям у вигляді варіанту ХКЯ свідчить про подолання видового бар'єру. Про це ж свідчить захворювання домашніх кішок, а також інших видів тварин, які відбувалися під час спалаху коров'ячого сказу у Великої Британії. В той же час випадків переходу інфекційного агенту, що викликає скріпи у овець, на людину зафіксовано не було. Таким чином, в якому ступені видовий бар'єр може захистити від перенесення пріонів між видами, залишається дискусійним питанням.

У природі пріонів і хвороб, що викликаються ними, залишається дуже багато неясного. Незважаючи на вибух дослідницького інтересу до пріонів, кілька важливих питань залишається без відповіді. Наприклад, незрозуміло, чому перетворення PrP в аномальну форму в одному випадку пошкоджує одну ділянку мозку, тоді як перетворення в іншу аномальну форму пошкоджує зовсім іншу область. Але ж субстрат для перетворення, нормальний PrP^c, присутній в обох областях! Нарешті, ми повністю так і не розуміємо, яка нормальна функція білка PrP. Встановлено, що мутантні миші, у яких ген цього білка видалений (*prnp*-null) життєздатні та здорові. Таким чином, у них ця функція не є суттєвою, принаймні за умов утримання лабораторних тварин.

Профілактика та лікування ТСЕ, безсумнівно, буде залежати від більш повного розуміння цих захворювань.

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- знати визначення термінів «пріон» і «трансмісивна губчаста енцефалопатія»
- розуміти механізм виникнення хвороби з участю пріонів
- знати головні пріонні хвороби тварин і людини
- знати механізм передавання пріонів
- обґрунтувати заходи, які зменшують ризик виникнення пріонних захворювань.

РОЗДІЛ 11. ПОХОДЖЕННЯ ТА ЕВОЛЮЦІЯ ВІРУСІВ

11.1. Походження вірусів

Походження і еволюція багатьох клітинних організмів передбачаються на підставі вивчення викопних залишків. Проте стосовно вірусів, викопних залишків фактично немає. Через ці причини, питання походження вірусів є значною мірою умоглядним. Це ж стосується і еволюції вірусів, хоча останніми роками використання сучасних методів досліджень дозволяє будувати філогенетичні дерева і пропонувати раціональні пояснення механізмам еволюції вірусів принаймні у межах родини.

Віруси за визначенням є молекулярними паразитами клітини, тому до виникнення клітин віруси не могли з'явитися. Вважається, що перші викопні залишки, по яких встановлена наявність живих клітин, мають вік близько 4 млрд. років. Розумно припустити, що перші клітини з'явилися за декілька сотень мільйонів років до цього. Чимало біологів вважають, що до появи цих примітивних прокаріотів, була фаза еволюції, яка включала еволюцію органічних молекул. Цими молекулами, можливо, були білки і РНК, і деякі з РНК придбали здатність до самореплікації.

Археї і бактерії, що мешкають на земній кулі сьогодні, є прокаріотичними нащадками первинних клітин. Можливо, віруси з'явилися вже на ранній стадії еволюції цих примітивних прокаріотів, але в якій мірі віруси сучасних прокаріот нагадують ранні віруси древніх прокаріотів, залишається невідомим.

Еукаріотичні клітини з'явилися набагато пізніше, тому часова шкала вірусів, вражаючих еукаріотів, є набагато сучаснішою, ніж для вірусів прокаріотів.

У відповідь на питання, звідки взялися віруси, поки можна дати лише одну впевнену відповідь: це невідомо. На рівні припущень наводяться три можливі групи предків вірусів:

- молекулярні попередники клітинних організмів;
- компоненти клітин;
- клітинні мікроорганізми, що перейшли до внутрішньоклітинного паразитизму.

Молекулярні попередники клітинних організмів. Вважається, що в ранній історії розвитку Землі, перед появою клітинних організмів, еволюціонували молекули РНК, у яких з'явилася ферментативна активність (рибозими) і здатність до самореплікації. Після появи перших живих клітин, в деяких з них могли паразитувати декотрі з цих молекул РНК.

Якщо таке дійсно сталося, то аналогічні молекули РНК були першими вірусами. Деякі спеціалісти вбачають нащадків цього РНК-світу у віроїдах, геномі вірусу гепатиту дельта і малих замкнених в коло одноланцюгових сателітних РНК. Але інші спеціалісти вважають, що віроїди і можливо інші згадані об'єкти мають походження від інтронів.

Мобільні компоненти клітини. Можливо деякі клітинні компоненти розвинули здатність реплікуватися самостійно, незалежно від контролю з боку клітини-хазяїна, і таким чином стали паразитами клітини. До цих потенційних кандидатів на попередників вірусів входять молекули мРНК, а також такі молекули ДНК, як плазміди і транспозони (Мал. 11.1).



Мал. 11.1. Компоненти клітин, що є кандидатами в попередники вірусів (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

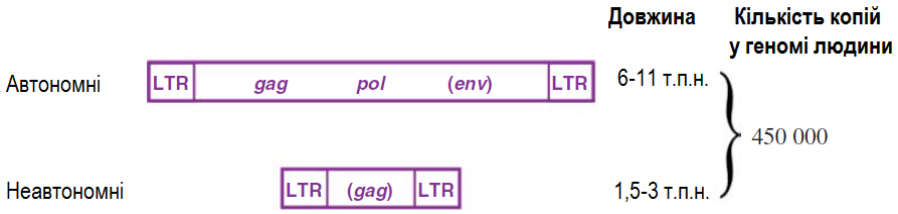
Геноми багатьох (+)РНК-вірусів еукаріотів мають характеристики клітинних мРНК, наприклад, кеп на 5′-кінці і послідовність полі(А) на 3′-кінці. Можливо, деякі РНК-віруси є нащадками клітинних мРНК?

Ковалентно замкнені в кільце молекули ДНК, відомі як плазміди, виявлені в клітинах прокаріотів та еукаріотів. Чи можуть деякі ДНК-віруси бути нащадками таких молекул? Декотрі бактерійні плазміди несуть гени, які специфікують утворення білкових трубок (пілей), які можуть прикріплятися до іншої бактерії і дозволяють переходити плазмідам з однієї клітини в іншу. Чи можуть бактеріофаги, наприклад, нитчасті фаги або фаги з хвостами, бути нащадками древніх плазмід і їх пілей? З іншого боку, передбачається, що пілі сучасних бактерій мають походження від нитчастих фагів!

Транспозони є мобільними послідовностями ДНК в геномах прокаріотів та еукаріотів. Вони названі мобільними тому, що можуть переміщатися з однієї ділянки геному в іншу за допомогою механізмів «вирізати і вставити» або «скопіювати і вставити». Можливо деякі ДНК-віруси є нащадками транспозонів.

Для того, щоб стати вірусами, ДНК транспозонів повинна була якимсь чином придбати низку генів, включаючи гени, що кодують білок або білки капсиду, а також у багатьох випадках гени полімераз для реплікації вірусних геномів.

Особливим класом клітинних компонентів, які належать до дуже вірогідних попередників вірусів, є ретротранспозони. Вони мають подібні ретровірусам послідовності в геномах еукаріотів. Ретротранспозони складаються з двох довгих термінальних повторів, які фланкують гени *gag*, *pol* і інколи *env* (Мал. 11.2). Таким чином, ретротранспозони нагадують провіруси ретровірусів. Вони реплікуються за допомогою транскрипції мРНК, яка потім транслюється у білки Gag і Gag-Pol. Далі шляхом зворотної транскрипції утворюються нові копії транспозонів, які можуть вставитися в інші сайти клітинного геному. Ретротранспозони знайдені в геномах хребетних і безхребетних тварин, рослин і грибів.



Мал. 11.2. Подібні ретровірусам елементи в геномі людини. Автономні елементи (ретротранспозони) нагадують провіруси ретровірусів. LTR – довгі кінцеві повтори (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Є цілком імовірним, що ретровіруси пішли від ретротранспозонів. Проте не менш вірогідним є те, що принаймні деякі ретротранспозони є нащадками ретровірусних провірусів, які інтегрувалися в геноми статевих клітин хазяїв. Тут ситуація до деякої міри нагадує ситуацію з яйцем і куркою.

Ретротранспозони називають автономними елементами, оскільки вони мають ген *pol*, який кодує зворотну транскриптазу і завдяки якому вони здатні реплікуватися. Проте геном людини також містить багато неавтономних елементів, які фланковані довгими повторами, але мають послідовність гена *gag*. Деякі з цих елементів можуть бути або залишками ретротранспозонів, або залишками ретровірусних провірусів.

Зрештою, геном людини містить близько 8 відсотків послідовностей, які називають ендогенними ретровірусами.

Інші віруси, що використовують стратегію зворотної транскрипції, наприклад, гепаднавіруси, можуть мати походження, аналогічне ретровірусам.

Нарешті, можливими попередниками віроїдів можуть бути інтрони, ділянки ДНК, які вирізуються з мРНК в результаті сплайсингу, і які не кодують ніяких білків.

Внутрішньоклітинні паразити. Як відомо, мітохондрії і хлоропласти еукаріотів мають походження від прокаріотичних клітин, які пристосувалися до нового стилю життя усередині клітини-хазяїна. Припускають, що предки цих органел пристосувалися до паразитичного або взаємовигідного способу внутрішньоклітинного існування, і з часом усе більш ставали залежними від своїх хазяїв, втративши здатність виконувати чимало функцій і втративши гени, які кодували ці функції.

Можливо, подібний еволюційний процес продовжився далі, що призвело до ще більшої дегенерації мікроорганізму і втрати таких функцій, як здатність до синтезу білка, і зрештою цей мікроорганізм міг перестати бути клітиною або органелою, а став вірусом.

Досить довгий час вважали, що така глибока дегенерація мікроорганізмів, яка могла б привести до повної втрати клітинної будови, неможлива. Проте відкриття мімі- і мегавірусів вдихнуло життя в цю гіпотезу. Великий геном мімівірусів і мегавірусів кодує багато білків, включаючи ферменти для синтезу полісахаридів і білки, що беруть участь в трансляції. Геноми цих вірусів також кодують шість тРНК. Треба зазначити, що продукти цих генів не є функціональними у циклі реплікації цих вірусів, і деякі спеціалісти вважають, що ці гени є генами хазяїна, які випадково потрапили у геноми вірусів (див. нижче).

Звідкіля все ж таки віруси трапилися. Поки відповіді на це питання немає. Значна різноманітність структур віріонів вірусів, типів геномів вірусів і стратегій їх реплікації вказує, що різні віруси не є нащадками одного «стародавнього» вірусу. Віруси, які належать до признаних наразі шести реалмів (див. розділ 3), напевно мають *різне* походження. Наприклад, невеликі віруси з простою структурою могли походити від молекулярних попередників, тоді як дуже складні віруси, на кшталт мімівірусів та мегавірусів, можуть походити від попередників, що мали клітинну будову (а може й ні).

Проте, є одна особливість вірусів, яка є універсальною – це ікосаедрична симетрія. Віруси з ікосаедричною симетрією мають різноманітні варіанти геному і вражають самих різних хазяїв. Проте ця спільність є вірогідним проявом конвергенції – ікосаедрична форма, разом із спіральною, з'явилася у вірусів, що мають різне походження, як економна в сенсі генетичної інформації і стабільна структура.

Слід мати на увазі, що, якого б походження віруси не мали, немає ніяких причин вважати, що їх утворення припинилося. Цілком імовірно, що сьогодні нові віруси продовжують виникати з молекулярних і клітинних попередників.

11.2. Еволюція вірусів

Незалежно від їх походження, концепція Чарльза Дарвіна щодо ролі надрепродукції і виживання найбільш пристосованих у процесі видоутворення може бути застосована не лише до живих організмів, але й до вірусів. Віруси також мають гени, які прагнуть себе «увічнити». Експресія комбінації генів, що становлять геном вірусу, робить можливою реплікацію вірусів. Зміни в окремих генах і їх комбінаціях породжують нові генотипи, більшість з яких менш успішні, ніж батьківські генотипи, і не виживають. Проте в окремих випадках нові генотипи випадково виявляються успішнішими у порівнянні з батьківськими генотипами, і можуть навіть витіснити батьківські генотипи. Іноді нові генотипи дозволяють вірусу заражати нового хазяїна. Все це призвело до надзвичайної різноманітності вірусів, які існують сьогодні.

Хоча ми маємо історичні відомості, які вказують на взаємодію вірусів з людьми, що охоплює тисячі років, самі віруси не залишають археологічних даних. Еволюцію живих організмів ми можемо досліджувати по викопних залишках. На жаль, «викопні залишки вірусів» не зберігаються. Таким чином, ми не можемо порівнювати сучасні віруси з вірусами минулого, щоб оцінити, як вони змінилися за проміжний період. Нещодавно захоплюючим успіхом стало відновлення з вічної мерзлоти незвичайного типу гігантського вірусу під назвою *Pandoravirus*, який вражав амеб близько 30 000 років тому (Мал. 2.6). Цей вірус надзвичайно схожий на своїх родичів, знайдених сьогодні, що свідчить про те, що зміни, які відбулися, не такі великі, як можна було очікувати. Крім того, вдалося вивчити геноми двох РНК-геномних вірусів – вірусу грипу А, який викликав пандемію в 1918-19 рр. і вірусу мозаїки томатів. Цей вірус є дуже стійким і його можна виявити в атмосфері. У недавній час РНК 15 штамів цього вірусу було виявлено в льодовиках Арктики, що мають вік від 500 до 140000 років.

Для інших вірусів у нас немає можливості вивчити, як віруси еволюціонували.

У поєднанні з відсутністю скам'янілостей є той факт, що велика швидкість реплікації вірусу з величезною кількістю нових вірусів-потомків, що продукуються інфікованою клітиною, дає можливість вірусам генерувати широкий спектр мутантів за короткий час. Це створює дуже складний ландшафт для вивчення еволюції вірусів. Проте сучасні методи аналізу нуклеїнових кислот здатні досліджувати різноманітність вірусних геномів, які виникають протягом дуже коротких проміжків часу, і це дало змогу зрозуміти процеси, які стимулюють еволюцію вірусу.

Важливим фактором еволюції вірусів є те, що вони облігатні паразити і потребують господаря для репродукції. Еволюція будь-якого успішного паразита має гарантувати, що і хазяїн також виживає. Різні можливі взаємодії вірус-господар можна розглядати як різні способи вирішення цієї проблеми вірусами.

11.2.1. Механізми еволюції вірусів

У багатьох стосунках механізми еволюції вірусів є аналогічними механізмам, які визначають еволюцію живих організмів. Ці механізми включають генерацію нових варіантів геному, які піддаються дії природного добору. Значна більшість нових варіантів не виживає,

але деякі з них можуть забезпечити селективну перевагу в конкретній екологічній ніші. У вірусів такою нішею може бути новий вид хазяїна або присутність в організмі хазяїна антивірусних ліків. У такій ніші новий варіант вірусу може успішно реплікуватися як новий штам вірусу. Нові варіанти геномів вірусів можуть виникати в результаті мутацій, рекомбінацій, пересортовування генів або захоплення генів клітини.

Мутації. Під час копіювання геномів вірусів полімеразою відбуваються деякі помилки. Якщо ці помилки відбуваються в послідовності, що кодує білок, і якщо помилка призводить до заміни амінокислоти у білці, то помилка призводить до мутації. Природний добір зберігає ті мутації, які забезпечують вірусу кращу пристосованість.

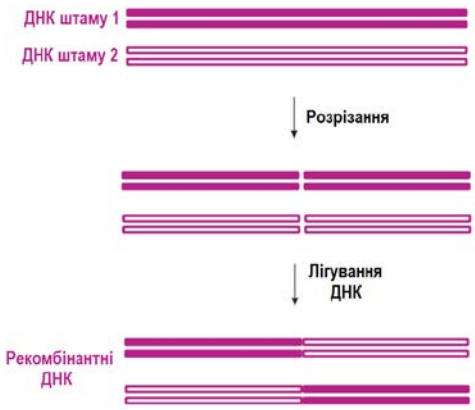
Мутації мають особливе значення для еволюції вірусів з геномами РНК (включаючи ретровіруси), оскільки, на відміну від синтезу ДНК, під час синтезу РНК немає механізму молекулярного пруфридінгу (розділ 4.2.2). Мутації накопичуються зі швидкістю приблизно одна мутація на кожні 10^3–10^5 нещодавно доданих рибонуклеотидів. Це еквівалентно в середньому одній мутації в кожному новому геномі. Для синтезу ДНК, показник частоти мутацій оцінюється як одна мутація на 10^9-10^{10} дезоксирибонуклеотидів за цикл. Іншими словами, в той час як ті самі мутаційні процеси діють для вірусів з геномами РНК або ДНК, РНК-вірус може досягти за одне покоління такого ступеня генетичної варіації, для досягнення якого геному ДНК знадобиться від 300 000 до 3 000 000 поколінь. Однак останні дані показали, що для вірусів з невеликим ДНК-геномами швидкість мутацій може бути вищою і навіть наближатися до рівня РНК-вірусів.

Таким чином, після зараження РНК-вірусом і, можливо, також невеликим ДНК-вірусом, швидко генерується велика популяція вірусів-нащадків з різними послідовностями геному, а не однорідна популяція вірусів лише з невеликими варіаціями. Іншими словами РНК-вмісні віруси не мають якоїсь фіксованої послідовності нуклеотидів в геномі. Замість цього, вірусні геноми представлені великою кількістю варіантів; для опису групи варіантів, які в сукупності представляють геном РНК-вмісного вірусу, запропонований термін «*квазівид*» (quasispecies). Модель квазівидів є однією з основних теоретичних моделей, що застосовують до еволюції вірусів. У вірусології квазівиди визначають як набір мутантних геномів, які містять вірусні популяції. Модель квазівиду має кілька наслідків для популяційної біології вірусів. Наприклад, неможливо точно визначити послідовність геному популяції вірусів. Групи мутантів піддаються добору та випадкового дрейфу; вони можуть виступати колективно як одиниця добору. Тут треба однак зазначити, що це не стосується відмінностей між консервативними консенсусними послідовностями вірусних ізолятів, які узагальнюють вплив на глобальні етапи еволюції вірусу.

У багатьох варіантів вірусних геномів спостерігається лише швидкоплинне існування, тоді як найкраще пристосовані до конкретної ніші починають в цій ніші домінувати. Відомо чимало видів тиску природного добору на віруси. Один з таких видів включає імунну відповідь хазяїна; наприклад, новий варіант антигена вірусу тварини, з якою імунна система хазяїна раніше не стикалася, матиме перевагу у порівнянні з типом антигена, проти якого у хазяїна є набута стійкість. Таким чином, є сильний тиск добору на вірусні білки, які є мішенями імунної відповіді хазяїна, наприклад, на білок gp120 ВІЛ-1. Такі білки вірусу часто є найменш консервативними, найбільш варіабельною є ділянка білка, що є мішенню для антитіла (епітоп). У еволюційного процесу, проте, є обмеження. Білки прикріплення вірусу повинні зберігати конфігурацію, яка дозволяє їм зв’язуватися з рецептором, а ферменти на кшталт зворотної транскриптази повинні зберігати свої каталітичні властивості.

Для деяких вірусів є додаткові обмеження. Наприклад, такі віруси як вірус жовтої карликовості картоплі, які повинні реплікуватися як в рослині-хазяїні, так і в комасі-хазяїнові, можуть зазнавати лише таких мутацій, які підвищують їх здатність до реплікації в одному хазяїнові і як мінімум не знижують їх здатність реплікуватися в іншому хазяїнові.

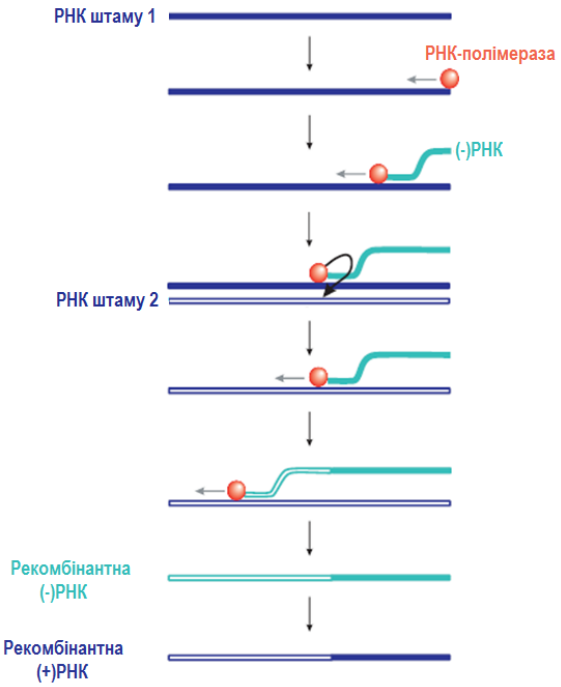
Рекомбінація є процесом, результатом якого є генетичний обмін між окремими вірусами з утворення нового геному, що походить від двох батьківських геномів (Мал. 11.3).



Мал. 11.3. Рекомбінація між ДНК двох штамів вірусу (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Рекомбінації є основною рушійною силою в еволюції вірусу і відбувається в клітині, яка одночасно інфікована двома або більше спорідненими вірусами. Генетичний обмін може відбуватися як під час реплікації геному, так і незалежно від реплікації.

Аналогічним чином рекомбінація може відбуватися між вірусами з геномом дволанцюгової РНК. Для вірусів, що містять одноланцюгову РНК, вважають, що рекомбінація може відбуватися за допомогою механізму перемикання матриці. РНК-полімераза копіює одну молекулу РНК, далі вона переміщається на іншу молекулу РНК і продовжує синтез з використанням нової матриці (Мал. 11.4).



Мал. 10.4. Рекомбінація одноланцюгової геномної РНК вірусів за допомогою механізму перемикання матриці (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Рекомбінація, яка не пов'язана з реплікацією геному, може відбуватися шляхом обміну генетичним матеріалом між двома геномами, що включає розрив і з'єднання двох або більше частин. У принципі, будь-яка подія рекомбінації може відбуватися більше одного разу в геномі. Це генерує *мозаїчні* рекомбінантні віруси, хоча кілька подій мають значно меншу ймовірність, ніж одна подія рекомбінації. Рекомбінація є основним фактором еволюції аденовірусів; встановлено, що лінійні геноми дцДНК багатьох аденовірусів людини є рекомбінантними, а частини їх послідовності походять від двох або більше інших вірусів. Цікавою можливістю, яка виникає при рекомбінації, є генерація рекомбінантних геномів, які містять дубльовані або вилучені послідовності через подію рекомбінації у негомологічних ділянках. Генерація дубльованих ділянок забезпечує можливість для однієї копії дубльованого гена мутувати без шкоди для вірусу. Це може бути механізмом, за допомогою якого віруси отримують нові гени з новими функціями.

Рекомбінація також є звичайною подією у ретровірусів і гепаднавірусів (параретровірусів). Ймовірно вона відбувається в процесі зворотної транскрипції за допомогою механізму перемикання матриці. У ретровірусів матриці РНК знаходяться у віріоні, і РНК різних штамів можуть опинитися в одному віріоні за умови спільного зараження клітини двома штамами вірусу і подальшій зборці віріонів. У параретровірусів матриці РНК різних штамів знаходяться в цитоплазмі клітини.

Рекомбінації у вірусів постійно відбуваються в природі; їх також індукують в лабораторії наприклад, для отримання штамів вірусних векторів, що несуть потрібні гени.

Пересортовування генів. Пересортовування генів є видом рекомбінації, який відбувається у вірусів з сегментованими геномами. Якщо клітина виявиться зараженою двома штамами такого вірусу, то віріони потомства можуть містити суміш сегментом геномів двох батьківських штамів. Такі віріони називають реасортантами. Реасортанти особливо притаманні вірусу грипу А, геном якого складається з 8 сегментів (–)РНК. Один з сегментів кодує гемаглютинін оболонки вірусу (H), ще один сегмент кодує нейрамінідазу N. Пересортовування забезпечує появу штамів вірусів з новими комбінаціями варіантів H і N.

Зміни генотипів і фенотипів вірусів за рахунок пересортування відбувається з більш високою частотою, ніж через мутації або рекомбінації, описані вище. Вплив на характеристики вірусу може бути величезним; наприклад, вірус грипу може отримати абсолютно новий білок оболонки за один крок. Однак життєздатний реасортантний вірус грипу вимагає сумісності між усіма вісьмома сегментами геному, і це обмежує створення нових вірусів.

Хоча віруси грипу А вражають багато видів тварин, їх природним резервуаром є дикі водні птахи. У них виявлено 16 підтипів гемаглютиніну і 9 підтипів нейрамінідази, в принципі, це забезпечує можливість генерування 144 комбінацій білків H і N. Треба зауважити, що люди, з точки зору вірусу, є другорядним компонентом його екології, і в людських популяціях переважно циркулюють H1N1 і H3N2, хоча були періодичні інфекції іншими штамами.

Антигенами вірусу грипу А, які стимулюють захисний імунітет у хазяїна, є згадані гемаглютинін і нейрамінідаза. Незважаючи на індукцію імунної відповіді після інфекції, повторне зараження вірусом грипу є поширеним явищем. Повторні інфекції можливі, оскільки H і N вірусів грипу постійно еволюціонують шляхом мутації, і раніше набутий імунітет з часом стає неефективним. Впродовж XX сторіччя у світі сталися три великі пандемії, викликані реасортантами вірусу грипу А (розділ 14.3.1.1, Табл.14.1).

Захоплення генів клітини. Відкриття схожості між деякими білками вірусів і білками клітини привело до висновку, що деякі віруси захопили гени клітини. Геноми низки ретровірусів містять онкогени, які вони ймовірно придбали у клітин своїх хазяїв, які мають схожі гени (протоонкогени). Прикладом є ген *src* вірусу саркоми Раусу, дуже схожий з геном с-*src*, який мають клітини усіх хребетних тварин (розділ 8.2.1). Ретровіруси можуть придбати онкогени за допомогою рекомбінації між провірусною ДНК і ДНК хазяїна, або під час синтезу РНК вірусу, якщо транскрипція не закінчується на провірусній ДНК і триває на протоонкогені, що знаходиться в хромосомі поряд з провірусною ДНК.

Білки, подібні до білків клітини-хазяїна, мають не лише ретровіруси. Деякі білки вірусів модулюють імунну систему хазяїна, часто імітуючи білки клітини. Наприклад, деякі герпесвіруси людини кодують білки, подібні до цитокінів і білків головного комплексу гістосумісності. Деякі великі ДНК-вмісні віруси кодують білки, подібні до інтерлейкіну-10, і деякі з цих білків пригнічують клітинну імунну відповідь. Чи мають гени вірусів, які кодують такі білки, походження від генів клітини, і якщо так, яким чином віруси можуть їх придбати?

Одним з можливих механізмів є рекомбінація. Проте для її здійснення ДНК вірусу, що реплікується, і ДНК клітини повинні опинитися у безпосередній близькості. Це цілком можливо для ДНК-вмісних вірусів, реплікація яких здійснюється в ядрі (наприклад, у герпесвірусів). Проте є ДНК-вмісні віруси, геном яких в ядро не проникає, наприклад, у вірусу віспи. У таких вірусів геноми не опиняються у безпосередній близькості від ДНК хазяїна.

Ще однією можливістю для вірусу придбати гени клітини є синтез ДНК на клітинних мРНК, з подальшою вставкою цієї ДНК в геном вірусу. Синтез ДНК на РНК-матриці вимагає наявності зворотної транскриптази, тому така можливість може бути реалізована лише за умови спільного зараження клітини вірусом і ретровірусом, або за наявності в геномі хазяїна ДНК (яка, наприклад, має ретровірусне походження), що кодує зворотну транскриптазу.

Поява нових вірусів. Час від часу з'являються нові віруси, і їх походження оточене таємницею. Проте секвенування геномів нових вірусів і деяких відомих вірусів показує, що нові віруси зазвичай є вже існуючими вірусами, що заражають нових хазяїв, в яких відбувається подальша еволюція цих вірусів. У багатьох випадках зараження нового хазяїна є глухим кутом, оскільки не відбувається передавання вірусів новим особинам. Проте іноді вірус адаптується і придбаває здатність передаватися від одного хазяїна іншому. Таким чином, потрапляючи в новий вид хазяїна, вірус повинен придбати ряд нових здібностей, зокрема реплікуватися в новому хазяїнові, уникати імунної відповіді нового хазяїна і передаватися іншим особинам нового хазяїна.

У 1978 р. новий парвовірус з'явився у собак і швидко поширився по всьому світу. Послідовність геному цього парвовірусу виявилася більш ніж на 99% ідентичною парвовірусу кішок (вірусу панлейкопенії, або інфекційного гастроентериту). Обидва віруси можуть заражати клітини кішок, але тільки вірус собак може заражати клітини собак. Вважають, що вірус кішок був предком вірусу собак.

Так само послідовності геномів ВІЛ-1 і ВІЛ-2 дуже подібні послідовності вірусу імунодефіциту мавп, знайденого у шимпанзе і темно-коричневих мангабеїв (примати родини церкопітеків) відповідно. Як вважають, обидва віруси здолали міжвидовий бар'єр під час контактів людей з м'ясом і кров'ю мавп. Після переходу на новий вид, віруси швидко еволюціонували на багато субтипів і суб-субтипів.

11.2.1. Коеволюція вірусів та їхніх хазяїв

Асоціації вірус-хазяїн, які існують впродовж тривалого часу, ймовірно розвиваються у бік таких взаємовідносин, за яких вірус завдає слабку шкоду хазяїнові, або не шкодить взагалі. Прикладами таких вірусів є депендовіруси і деякі реовіруси, які не асоційовані ні з яким захворюванням. Ймовірно, члени цих груп вірусів, які заражають *Homo sapiens*, є супутниками людей з моменту виділення людини в окремий вид.

Коли вірус починає заражати нового хазяїна, він часто стає набагато більше вірулентним для нового хазяїна, ніж був для старого. Прикладами є вірус імунодефіциту шимпанзе і вірус імунодефіциту темно-коричневих мангобеїв, які є авірулентними для своїх хазяїв, але під час переходу на людину і перетворенні у ВІЛ-1 і ВІЛ-2 вони виявилися летальними для нового хазяїна.

Вірулентний вірус може впливати на еволюцію свого хазяїна, спричиняючи зникнення генів, які обумовлюють сприйнятливість до вірусної інфекції, поки добір сприятиме генам стійкості. ВІЛ-1 нині чинить тиск відбору на користь делеції розміром 35 нуклеотидів в гені CCR5, який підтримує сприйнятливість до зараження.

Гарним прикладом коеволюції вірусу і хазяїна є взаємовідносини вірусу міксоми і європейського кролика. У природних хазяїв вірусу, видів кроликів з Південної Америки, зараження вірусом викликає розвиток пухлин шкіри, які з часом проходять. В протилежність цьому, коли вірус міксоми заражає особини європейського кролика, він викликає міксоматоз, для якого характерні гострий кон'юнктивіт, здуття на шкірі і втрата апетиту. Захворювання майже завжди виявляється фатальним, і з цієї причини вірус був інтродукований в Австралію як агент біологічного контролю здичавілих кроликів. Після декількох років інтродукції були отримані докази еволюції вірусу. З'явилися штами вірусу міксоми з ослабленою вірулентністю, які ймовірно передаються ефективніше. Окрім цього, у кроликів почали спостерігатися випадки стійкості до вірусу. Таким чином, вірус і його новий хазяїн зазнають коеволюцію.

Завершення коеволюції вірусу і його хазяїна, ймовірно, відбувається тоді, коли геном вірусу вбудовується в геном хазяїна. Вірогідно, це сталося, коли принаймні деякі послідовності ендогенних ретровірусів/ретротранспозонів з'явилися в геномах еукаріотів.

Геноми прокаріотів також містять послідовності, які є результатом інтеграції вірусних геномів в процесі лізогенії. Послідовності фагів (профаги) виявлені у більшості геномів бактерій, які були секвеновані. Деякі з цих профагів здатні до індукції, тобто можуть активуватися, вірус починає реплікацію і клітина хазяїна лізується. Інші профаги є дефектними, і їх реплікацію індукувати не можна. Гени, пов'язані з деякими особливостями бактерій, кодуються послідовностями профагів (наприклад, холерний токсин *Vibrio cholerae*).

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- знати головні теорії походження вірусів
- пояснити, як відбувається еволюція вірусів через мутації, рекомбінації та пересортування генів
- розуміти напрямки коеволюції вірусів і їх господарів

РОЗДІЛ 12. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУСІВ

12.1. Культивування вірусів

Вірусологам потрібні методи культивування їх об'єктів досліджень. У переважній більшості випадків це означає, що віруси необхідно забезпечити відповідними клітинами, які вони можуть заразити і в яких може проходити їх реплікація. Бактеріофаги можна забезпечити клітинами бактерійної культури, віруси рослин можна культивувати в спеціально вирощуваних рослинах або в рослинних протопластах. Ймовірно, найскладніше культивувати віруси тварин.

12.1.1. Культивування вірусів в лабораторних тваринах

Аж до середини 30-х років 20 сторіччя експериментальні зараження тварин або рослин і ультрафільтрація були головними методами культивування і ідентифікації вірусів. Ці методи дозволили виділити чимало вірусів домашніх тварин, деякі віруси комах і рослин. Проте стандартні лабораторні тварини – миші, щури, морські свинки, кролики – несприйнятливі до більшості вірусних інфекцій людини.

До середини 30-х років за допомогою лабораторних тварин були відкриті збудники грипу і герпесу. До вірусу грипу дуже чутливими виявилися тхори. Використання мавп як лабораторних тварин дозволило відкрити віруси віспи, поліомієліту, жовтої лихоманки, Денге.

Вибір експериментальних тварин визначається метою роботи і видовою чутливістю до вірусу, що вивчається. Лабораторних тварин заражають різними способами залежно від тропізму вірусу до певних тканин. Так, наприклад, для культивування нейротропних вірусів зараження роблять переважно в мозок (віруси сказу, кліщового енцефаліту та ін.), культивування респіраторних вірусів здійснюється шляхом інтраназального інфікування тварин (віруси грипу), дерматотропних (вірус віспи) – шляхом нашкірного і внутрішньошкірного зараження. Під час роботи з тваринами найчастіше використовуються нашкірне, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньочеревинне і внутрішньомозкове зараження.

При первинному зараженні тварини можуть не захворіти, тому через 5–7 діб зовні здорових тварин вбивають, а з їх органів готують суспензії, якими заражають наступні партії тварин. Ці послідовні зараження називаються «пасажами».

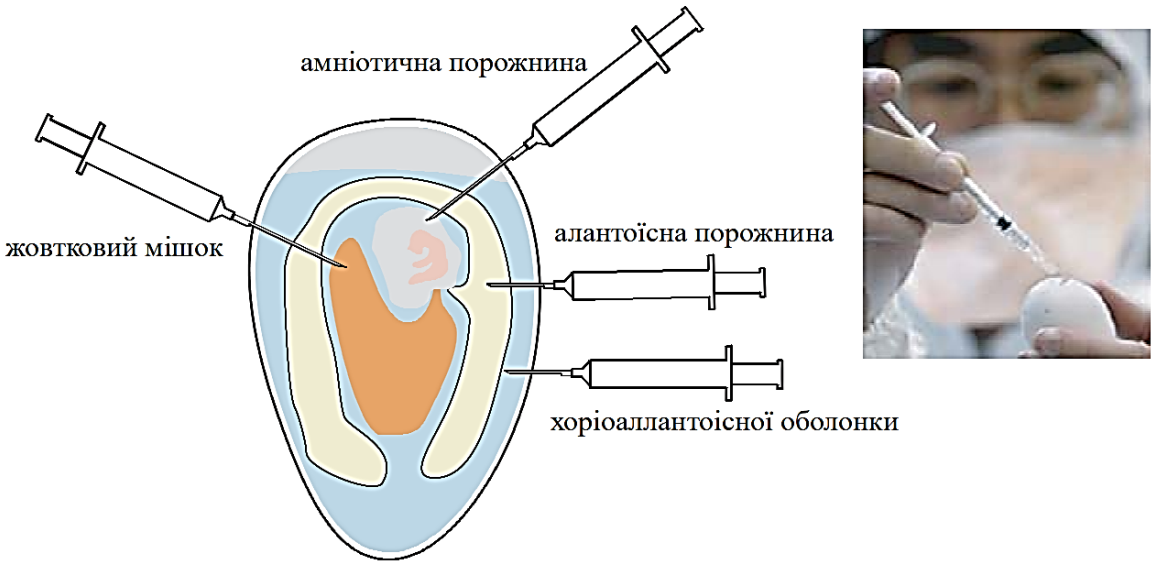
Індикацію, тобто виявлення факту розмноження вірусу, встановлюють на підставі розвитку типових ознак захворювання, патоморфологічних змін органів і тканин тварин або іншими способами, наприклад, за позитивною реакцією гемаглютинації (РГА). РГА заснована на здатності деяких вірусів викликати аглютинацію (склеювання) еритроцитів різних видів тварин, птахів і людини за рахунок поверхневого вірусного білка – гемаглютиніну.

Нині використання тварин для культивування вірусів обмежене. Окрім очевидних проблем, пов'язаних у тому числі з питаннями біоетики, культивування вірусів в тваринах має ще один недолік. За умови зараження експериментальних тварин, чутливих до того або іншого вірусу, цей останній накопичується у внутрішніх органах або нервовій тканині, звідки його важко виділити в чистому вигляді, звільнивши від клітинних білків. Крім того, не завжди є гарантія, що тварина не інфікована іншим вірусом, який не викликає у неї ознак захворювання.

12.1.2. Культивування вірусів в курячих ембріонах

В середині 1930-х років австралійський вірусолог Ф. Барнет (F. Burnet) почав використовувати новий для вірусології експериментальний об'єкт – курячі ембріони (Мал. 12.1).

Курячі ембріони є практично ідеальними моделями для культивування вірусів. Замкнена порожнина ембріона перешкоджає проникненню до нього мікроорганізмів та розвитку спонтанних вірусних інфекцій. Ембріони застосовують для первинного виділення вірусів з патологічного матеріалу; для пасивування і збереження їх, а також задля отримання необхідної кількості вірусу.



Мал. 12.1. Способи зараження вірусами курячих ембріонів (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Для зараження вірусами зазвичай використовують 10-12-денні курячі зародки, у яких в цей час добре розвинені оболонки – хоріон-алантоїсна і амніотична. Коли їх заражають вірусами, може розвинутися вірусна інфекція. Розмноження вірусу відбувається впродовж 3–4 діб, коли імунітет ще не встигає розвинутися. Розмноження вірусу в курячих ембріонах відбувається в різних частинах зародка, що пов'язано з особливостями тропізму вірусу. Розмножуючись в зародкових оболонках, вірус виділяється в алантоїсну і амніотичну рідину, де накопичується у величезних кількостях (до декількох мільярдів віріонів в 1 мл). Надалі вірус може бути осаджений в центрифузі і додатково очищений різними методами.

Методику вирощування вірусу в курячому ембріоні широко використовують під час промислового культивування. Окрім курячих ембріонів, в деяких випадках використовуються ембріони інших птахів – качок, перепелиць тощо.

12.1.3. Культивування вірусів в культурі тканин і клітин

Методи культивування тканин і клітин тварин були розроблені у середині минулого століття. Нині більшість клітин для безперервних культур мають походження від людей або інших видів тварин. Безперервна культура клітин складається з клітин, які стали безсмертними або в тілі, або в лабораторії (Мал. 12.2); такі клітини можна культивувати необмежено.



Мал. 12.2. *Походження безперервних ліній клітин.*

Дуже поширеною є клітинна лінія HeLa. Вона була отримана 8 лютого 1951 р. з ракової пухлини шийки матки пацієнтки на ім'я Генрієта Лакс (англ. Henrietta Lacks), що померла від цього захворювання 4 жовтня того ж року. Назва цієї лінії була утворена з перших літер імені і прізвища цієї жінки.

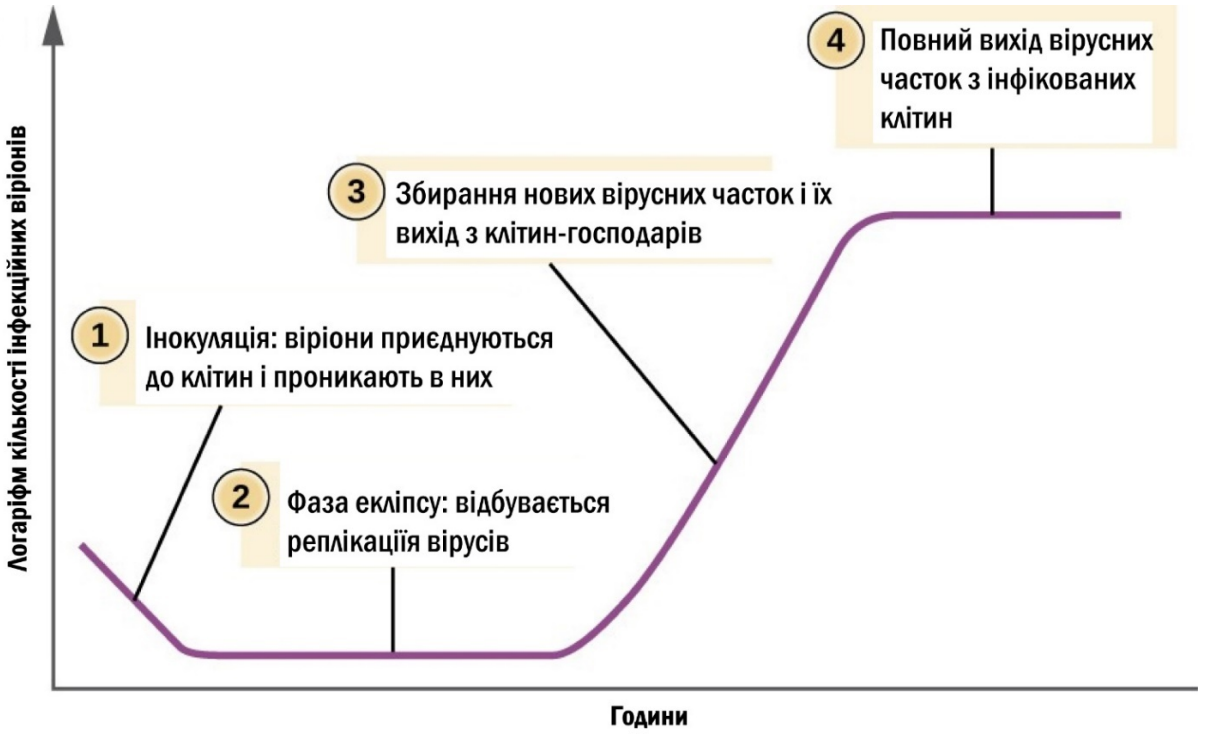
Клітини культивують в середовищах, в які додають поживні елементи. Більшість середовищ містять сироватку крові тварин, в якій є речовини, що підтримують ріст багатьох ліній клітин. Велике значення мають також осмотичний тиск і pH середовища. Більшість клітин вирощують в пластикових або скляних судинах у вигляді єдиного шару клітин, що називається моношаром. Альтернативно клітини можна культивувати у вигляді суспензії в струшуваному рідкому середовищі. Чимало типів клітин вимагають відносно високої концентрації двоокису вуглецю, який забезпечують в спеціальних інкубаторах.

Вирощування та вивчення вірусу, отриманого з клінічного зразка, в культурі, не є простим, оскільки культури клітин людини або тварин не дуже добре відповідають типам клітин, які віруси можуть заразити природним чином в організмі. Таким чином, вірус у первинному ізоляті, безпосередньо з клінічного зразка, часто буде погано рости, якщо взагалі буде рости в таких культурах. При наполегливості іноді можна примусити вірус рости з клінічних зразків після кількох сліпих пасажів (переміщення матеріалу з першої інфікованої культури до другої без спроби виявити чи підрахувати вірус у матеріалі) у добре підібраному типі клітин. Часто початковим показником успіху цього процесу є поява в культурі загиблих клітин, що відомої як *цитопатичний ефект* вірусу. Однак важливо розуміти, що такий вірус піддався потужному тиску добору і, ймовірно, буде відрізнятися за своєю послідовністю геному та ключовими особливостями від вірусу в оригінальному клінічному

зразку. Таким чином, вивчення вірусу майже неминуче передбачає його зміну; цей фундаментальний компроміс лежить в основі більшості вірусологічних досліджень.

12.1.4. Одиночний цикл репродукції вірусів в культурі

Поширеним типом експерименту, який передбачає аналіз на інфекційність вірусу, є експеримент з одним циклом репродукції вірусів. Дані такого експерименту дозволяють будувати одноступінчасті криві росту (Мал. 12.3). Вперше такі криві були створені для бактеріофагів, але надалі вони були отримані і для інших вірусів.



Мал. 12.3. Умовна одноступінчаста крива одного циклу репродукції вірусу у суспензійній культурі клітин. Після начальної інокуляц вірусом (етап 1) протягом певного періоду (фаза екліпсу) титр інфекційного вірусу залишається постійним (етап 2). У цей період вірус реплікується, але віріони не вивільняються із інфікованих клітин. Фаза екліпсу є періодом часу від проникнення вірусу до збирання першої дочірньої частинки. Коли інфіковані клітини починають гинути і вивільняти вірус, титр починає зростати (фаза 3), а коли відбувається лізис всіх інфікованих клітин, титр стабілізується (фаза 4).

Процедура отримання одноступінчастої кривої наступна:

• Суспензію віріонів змішують із суспензією клітин-хазяїв. Необхідно стежити, щоб, наскільки це можливо, всі клітини були інфіковані одночасно, тому кількість віріонів має значно перевищувати кількість клітин. Співвідношення віріонів до клітин в експерименті зазвичай варіює від 5 до 10.

• Адсорбцію віріонів на клітинах дозволяють тривати протягом відповідного періоду (приміром, 2 хвилини). Потім адсорбцію припиняють, наприклад сильно розбавляючи суміш та/або додаючи антивірусні нейтралізуючі антитіла.

• Зразки відбирають із суспензії через певні проміжки часу до завершення лізису. Для фагів експеримент зазвичай завершується менш ніж за одну годину. Для вірусів тварин, однак, часовий масштаб вимірюється в годинах або днях.

• У кожному зразку проводять аналіз бляшок (див. наступний розділ).

Цей тип експерименту дає цінну інформацію про цикл реплікації вірусу в певній системі клітини-хазяїна. Середній вихід інфекційного вірусу на клітину можна розрахувати за формулою:

$$\text{середній вихід} = \frac{\text{кінцевий тітр вірусу}}{\text{начальний тітр вірусу}}$$

12.2. Кількісний облік вірусів

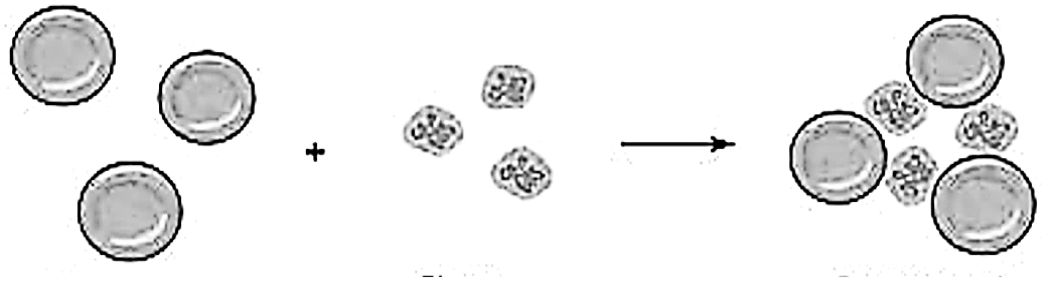
Мабуть, найважливішими методами у вірусології є ті, які дозволяють порахувати віруси. Без точного кількісного визначення вірусу неможливо провести вірусологічні досліди у відтворюваних умовах. То як ми оцінимо кількість вірусу в зразку чи вирощені в лабораторії?

Майже всі методи вимірювання кількості вірусу фактично визначають його концентрацію в зразку. Концентрацію вірусу часто називають *титром вірусу*, вираженим у одиницях вірусу на мл зразка. Є два різні показники титру вірусу, які використовують: фізична кількість вірусних частинок, тобто концентрація частинок, присутніх у зразку; і показник інфекційності, тобто концентрація наявних частинок, яка здатна успішно завершити повний інфекційний цикл у сприйнятливій системі-хазяїні – клітині або тварині. Ці два числа *не будуть* дуже подібними, і різниці у значеннях від 10 до 100 раз є звичайними для добре вивчених вірусів тварин.

Чому фізичні та інфекційні титри зразка так різко відрізняються? Частково це відображає неефективність аналізів на інфекційність, тобто не всі частинки, які потенційно можуть бути інфекційними в аналізі, насправді заражають клітини в будь-якому випадку. Ця подія є випадковою (див. розд. 4.1.5). На інфекційний титр впливає також утворення великої кількість дефектних вірусних частинок (див. розд. 4.7) при багатьох вірусних інфекціях.

12.2.1. Вимірювання фізичних титрів вірусів

Багато вірусів мають здатність зв'язуватися з поверхнею червоних кров'яних тілець (еритроцитів) і з'єднувати їх у згусток (Мал. 12.4). У цьому стані еритроцити називаються аглютинованими, тому ця властивість вірусу описується як гемаглютинація (HA).

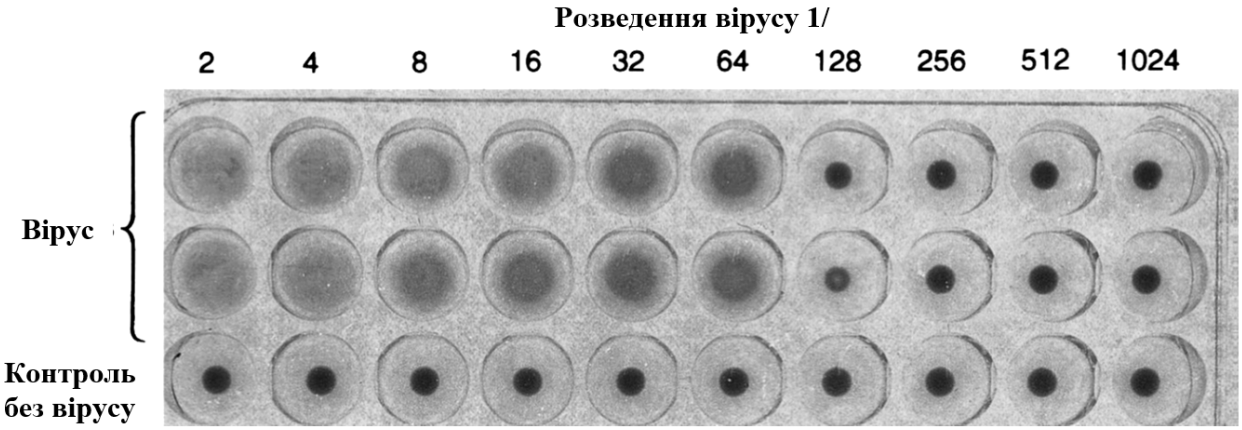


Мал. 12.4. *Реакція гемаглютинації. (за N.J. Dimmock et al., 2016).*

Ця функція обумовлена властивістю білків на поверхні віріонів, які часто також є білками, відповідальними за прикріплення до клітин під час перших кроків інфекції. Саме з цієї причини, наприклад, білок прикріплення вірусів грипу називають гемаглютиніном. Однак активність HA у вірусі не те саме, що інфекційність, і, як правило, вірус все ще може аглютинувати еритроцити, коли його інфекційність інактивована. Для кожного вірусу активність HA буде спостерігатися лише для еритроцитів певних видів.

За допомогою цієї властивості можна кількісно визначити віруси, віріони яких мають HA-активність (Мал. 12.5). Серійні дворазові розведення вірусного препарату інкубують у

буфері з фіксованою кількістю еритроцитів, щоб забезпечити аглютинацію. За кінцеву точку приймається остаточне розведення, яке все ще здатне до аглютинації, і ця кількість вірусу визначається як 1 одиниця НА. Виходячи з цього визначення, концентрацію вірусу в препараті можна обчислити в одиницях НА/мл. Зауважте, що об'єм для аналізу та кількість еритроцитів повинні залишатися постійними, щоб можна було виконувати порівняння титрів НА.

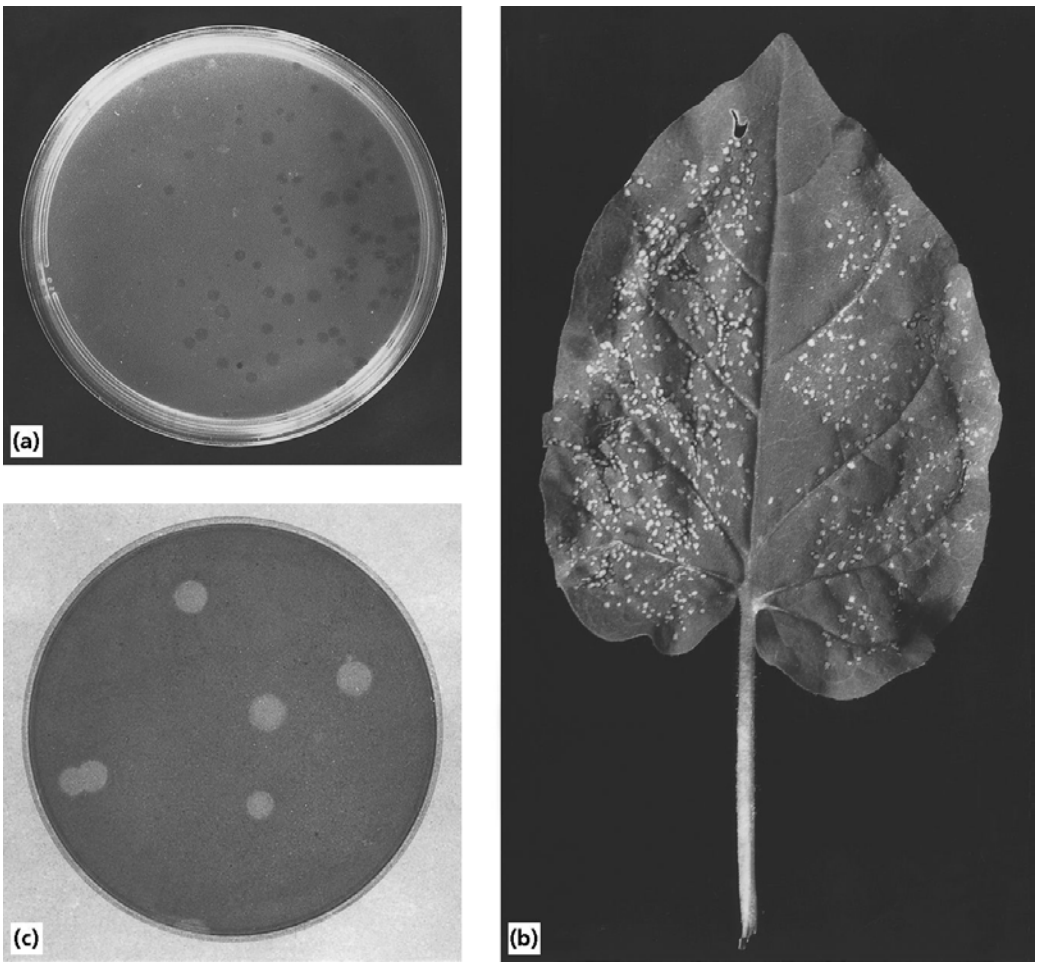


Мал. 12.5. *Тест на гемаглютинацію. Вірус грипу послідовно розводять зліва направо в лунках на пластиковій пластині. Потім додають еритроцити до 0,5% об/об і змішують з кожним розведенням вірусу. Там, де вірусу мало або зовсім немає, еритроцити осідають у вигляді плями (від 1/128), яка не відрізняється від контролю, де вірус не додається (рядок 3). При наявності достатньої кількості вірусу (розведення до 1/64), еритроцити аглютинують і осідають дифузно (за N.J. Dimmock et al., 2016).*

Зверніть увагу, цей тест дозволяє визначати *фізичну* кількість віріонів, але вона обчислюється в *умовних* одиницях НА/мл. Можливо, комусь хотілося б знати концентрацію вірусних часток у штуках в мілілітрі, але підрахувати це у якомусь зразку дуже важко.

12.2.2. Вимірювання інфекційних титрів вірусів

Класичним методом визначення титрів інфекційного вірусу є аналіз бляшок, який можна використовувати з відповідними господарями для вимірювання концентрації бактеріофагів, вірусів тварин або вірусів рослин (Мал. 12.6). Його можна використовувати тільки до тих комбінацій вірус-господар, де інфекція викликає загибель клітин, тобто є цитопатичний ефект. Для проведення аналізу на віруси ссавців, зразок послідовно розбавляють, а потім наносять відомий об'єм кожного розведення (інокулюм), щоб інфікувати моношар чутливих клітин. При менших розведеннях, тобто більш концентрованому вірусі, багато, якщо не всі клітини в культурі будуть інфіковані; такі розведення не є інформативними. Однак, коли зразок додатково розбавити так, щоб кількість наявного інфекційного вірусу була достатньо низькою, інфіковані клітини будуть фізично ізольовані в окремих місцях всередині шару неінфікованих клітин. Після зараження переміщенню вірусу між локаціями в шарі клітин запобігають шляхом покриття клітин живильним середовищем, що застигає (як правило, додавання агаризованого середовища).



Мал. 11.6. *Вірусні бляшки. (a) Бляшки бактеріофага на газоні Escherichia coli. (b) Місцеві ураження на листі Nicotiana, викликані вірусом тютюнової мозаїки. (c) Бляшки вірусу грипу на моношарі культура клітин фібробластів курячих ембріонів (за N.J. Dimmock et al., 2016).*

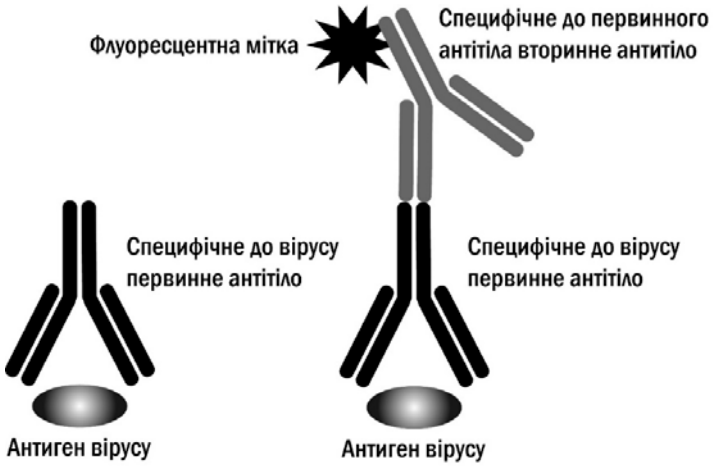
За цих обставин потомство вірусу може інфікувати лише сусідні клітини; після кількох циклів зараження кругові зони загиблих клітин у клітинному шарі, відомі як бляшки, можна побачити і підрахувати на око після фарбування клітинного матеріалу кристальним фіолетовим або нейтральним червоним барвниками. Оскільки кожна з цих бляшок виникла із інфекційного віріона в розведеному посівному матеріалі, нанесеному на клітини, титр матеріалу можна розрахувати в бляшкоутворюючих одиницях (БУО) на мл, враховуючи кількість бляшок, об'єм використаного інокулюма та його розведення. Щоб отримати точне значення, важливо використовувати лише ті підрахунки бляшок, які виникають у результаті розведень, що дають добре розташовані бляшки, а також використовувати площу чутливих клітин, якої достатньо для підрахунку 20–100 бляшок. Також важливо виконувати повторні визначення та приймати середнє значення як титр.

Точно такий же підхід використовується для титрування бактеріофагів. Тут бактерійні клітини інфікують у суспензії різними розведеннями фага, а потім висаджують у м'який агар на пластину з живильним агаром. Бактерійний газон, еквівалентний моношарам клітин ссавців, про які сказано вище, швидко росте, і на ньому з'являються бляшки.

Для вірусів рослин титрування є не таким простим, оскільки різні листки, навіть на одній рослині, не забезпечать відтворювані вимірювання титрування зразка вірусу. Однак дві половини одного листа можна використовувати для порівняльних вимірювань титрування двох зразків.

Альтернативним методом визначення інфекційного титру, який знову ж таки залежить від здатності вірусу викликати цитопатичний ефект, є аналіз 50% інфекційної дози культури тканини ($ІДКТ_{50}$). Як і раніше, зразок вірусу послідовно розбавляють і повторювані аліквоти кожного розведення наносять на сприйнятливі моношари клітин. Але замість того, щоб використовувати велику площу клітин, аналізи проводять із використанням невеликих культур у 96-лункових планшетах. Кожне з серійних розведень наноситься на кілька еквівалентних культур і дозволяється поширення вірусу потомства з однієї частини моношару в іншу за допомогою рідкого культурального середовища. Після фіксованого часу, залежного від конкретної комбінації вірус/клітина, щоби могли відбутися два або три цикли зараження, клітини фіксують і фарбують, а загальний цитопатичний ефект у кожній культурі оцінюють, щоб визначити розведення, яке дає цитопатичний ефект в 50% культур. При цьому розведенні об'єм, який використовується для зараження кожної культури, містить, за визначенням, 1 одиницю $ІДКТ_{50}$ вірусу. Потім можна розрахувати титр зразка в одиницях $ІДКТ_{50}$/мл.

Більш сучасним є так званий флуоресцентний фокусний аналіз (fluorescent focus assay). Основні його принципи такі ж, як і для аналізу бляшок, але замість того, щоб чекати кілька циклів поширення інфекції від первинно інфікованих клітин, клітини фіксують під час першого циклу (*in situ*) у той час, коли вони мають містити вірусні білки у випадку інфікування. Наявність цих білків потім виявляють шляхом обробки антитілами, які зв'язуються з будь-якими наявними вірусними білками (відомими як первинні антитіла), а потім місце розташування цих антитіл в клітинах визначають шляхом застосування міченого флуоресцентною міткою вторинного антитіла, у якого цільовий антиген - це константна ділянка первинного антитіла (Мал. 12.7).



Мал. 12.7. *Імунофлуоресцентний аналіз вірусних білків.*

Потім флуоресціюючі клітини підраховують за допомогою мікроскопії при освітленні, що викликає флуоресценцію мітки. За кількістю флуоресціюючих клітин титр можна визначити у флуоресцентних фокусних одиницях на мл так само, як і для аналізу бляшок. Також можна підрахувати інфіковані флуоресціюючі клітини за допомогою проточної цитометрії. Важливо, що цей підхід до визначення кількості інфекційних вірусних часток можна застосувати як до вірусів, які не спричиняють цитопатичний ефект в клітинах-хазяїнах, так і до цитопатичних вірусів.

Загалом, методологія забарвлення флуоресцентними антитілами має назву імунофлуоресценції, і вона має важливе застосування у наукових дослідженнях, не тільки при вивченні вірусних інфекцій.

12.3. Виділення і очищення вірусів

Часто в наукових дослідженнях або практичній роботі є потреба отримати препарати віріонів певного ізоляту або штаму вірусів в очищеному вигляді, без домішок інших штамів, залишків клітин, органел, молекул білка і нуклеїнових кислот тощо.

Чимало вірусів виділяють з використанням їх здатності викликати утворення дискретних видимих зон, бляшок, в шарі клітин хазяїна або на листках рослин (Мал. 12.6). Якщо зімкнутий шар клітин інокулювати вірусом в концентрації, за якої заражається лише невелика частина клітин хазяїна, бляшки можуть формуватися як ділянка клітин, убитих або пошкоджених вірусною інфекцією. Кожна бляшка формується, коли інфекція радіально поширюється від зараженої клітини в навколишні клітини. Бляшки формують багато вірусів тварин, коли моношар клітин заливається агарозним гелем для збереження вірусного потомства в дискретній зоні.

Припускають, що окрема бляшка є результатом зараження клітини єдиним віріоном. Якщо це так, то усі віруси, що знаходяться у бляшці, є клоном, тобто мають бути генетично ідентичними. Такий клон називають ізолятом, і якщо він відрізняється від усіх інших ізолятів, його називають штамом. Це аналогічно походженню штамів бактерій з колонії на поверхні агару.

Є імовірність, що бляшка бере походження від двох або більше віріонів, тому для збільшення вірогідності отримання генетично чистого штаму вірусу, матеріалом однієї бляшки знову заражають моношар клітин, і виділяють вірус з окремої бляшки. Про такий вірус говорять, що він був очищений методом бляшок.

Коли вірус виділяють уперше, він може погано реплікуватися в клітинах в лабораторії, проте після декількох циклів реплікації він може реплікуватися ефективніше. В результаті таких пасажів вірус може стати генетично відмінним від початкового дикого штаму; у такому випадку вірус стає лабораторним штамом.

Очищення віріонів методом центрифугування. Після того, як вірус розмножений, зазвичай необхідно очистити його від залишків клітин та інших забруднюючих матеріалів, оскільки для досліджень, для приготування вакцин або для інших цілей найчастіше використовують очищені вірусні частинки. Звичайним методом очищення є центрифугування; часткове очищення досягається диференціальним центрифугуванням, і найвища міра очищення досягається центрифугуванням в градієнті щільності.

Диференціальне центрифугування включає центрифугування з низькою швидкістю, після якого більшість віріонів залишаються в надосадковій рідині, і високошвидкісне центрифугування, після якого віруси випадають в осад у вигляді гранул (Мал. 12.8). Приміром, на першому етапі центрифугування проводять з використанням 10 000 g 20 хвилин, а на другому етапі – за 100 000 g 2 години. Таким шляхом і отримують препарат частково очищених віріонів.



Мал. 12.8. Часткове очищення віріонів диференціальним центрифугуванням (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

При центрифугуванні в градієнті щільності, вірусні частинки або молекули типу нуклеїнових кислот центрифугують в розчині із зростаючою концентрацією і відповідно щільністю. Як розчинну речовину при цьому використовують різноманітні сполуки, наприклад, сахарозу або хлористий цезій.

Існують два типи центрифугування в градієнті щільності: швидкісне зональне і рівноважне зональне центрифугування (Мал. 11.9). Під час швидкісного зонального центрифугування частково очищені віріони наносять на поверхню градієнта; далі частинки рухаються крізь градієнт, і швидкість їх руху залежить від коефіцієнта седиментації. Величина цього коефіцієнта обумовлена в основному розміром частинок. Однорідні частинки, наприклад, віріони вірусу, рухаються в градієнті у вигляді єдиної смуги, яку надалі можна зібрати. Центрифугування закінчують, коли частинки ще не досягають дна пробірки.



Мал. 11.9. Очищення віріонів швидкісним зональним або рівноважним зональним центрифугуванням (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Під час рівноважного зонального центрифугування концентрацію розчину, що створює градієнт, підбирають так, щоб щільність внизу градієнта була гарантовано більше щільності частинок, які очищаються. Частинки суспендують в градієнті, і потім під час центрифугування вони переміщаються в ту зону градієнта, в якій щільність розчину така ж, як і у

них. Плавучу щільність віріонів в градієнті розчину хлористого цезію використовують як одну з характеристик вірусних віріонів.

12.4. Дослідження структури віріонів і заражених клітин

Розміри більшості віріонів знаходяться за межами роздільної здатності світлового мікроскопа. Проте світлова мікроскопія є корисним методом для дослідження заражених вірусом клітин або для визначення флуоресцентних барвників, пов'язаних з молекулами антитіл, що зв'язалися з вірусними антигенами.

Особливо корисною у вірусології може виявитися конфокальна мікроскопія.

Більшість досліджень структури віріонів або заражених вірусом клітин були проведені з використанням електронного мікроскопа. Використання різних методів електронної мікроскопії дозволяє досліджувати як внутрішню структуру віріонів, так і їх тривимірну будову. Для отримання тривимірних зображень використовують зокрема кріоелектронну мікроскопію у поєднанні з комп'ютерною томографією.

Тонкі деталі тривимірної будови вірусів, вірусних нуклеїнових кислот і білків також досліджують за допомогою рентгеноструктурної кристалографії. Для цього методу отримують кристали віріонів або молекул, які необхідно вивчити. Далі кристали поміщаються в рентгенівські промені, які зазнають дифракцію завдяки побудові атомів та/або молекул, що повторюється. Аналіз характеру дифракції дозволяє встановити відносні позиції молекул і атомів.

Корисну інформацію стосовно структури вірусів дають також такі методи, як ядерний магнітний резонанс і атомна силова мікроскопія, електрофорез в гелі агарози або поліакриламіду.

12.5. Ідентифікація вірусів

Виявлення вірусів у клінічних або інших пробах є областю вірусної діагностики. Так як безпосереднє виявлення вірусних частинок складне, найчастіше у діагностичних методах зосереджуються на виявленні компонентів конкретного вірусу, або висновок про наявність вірусу роблять опосередковано через виявлення специфічних до вірусу антитіл.

Існує велика кількість методів, які використовуються для виявлення присутності вірусів. Вони суттєво відрізняються за своєю корисністю, за потребами в часі, в спеціалізованому обладнанні та вартості. У цьому розділі розглядаються лише ті методики, які мають поточне або важливе історичне значення.

Треба пам'ятати, що кожний аналіз має нижню межу чутливості, нижче якої він дасть негативний результат для зразка, навіть якщо він по суті позитивний. Аналіз також має певну специфічність, яка є мірою того, наскільки ймовірно він дасть позитивний результат для зразка, який є дійсно негативним. Як правило, чутливість і специфічність аналізу обернено залежні; коли ви підвищуєте чутливість, щоб зменшити хибнонегативні результати, ви збільшуєте ризик хибнопозитивних результатів. Таким чином, для максимально однозначної діагностики потрібна комбінація тестів, як правило, тест високої чутливості, який дає деякі хибнопозитивні результати, за яким поводять підтверджуючий тест високої специфічності на позитивних зразках, який виключає будь-які хибнопозитивні результати.

Методи ідентифікації вірусів і вірусних компонентів можна розподілити на чотири категорії:

1. Виявлення віріонів;

2. Визначення інфективності вірусів;
3. Виявлення вірусних антигенів;
4. Виявлення нуклеїнових кислот вірусу;
5. Виявлення противірусних антитіл.

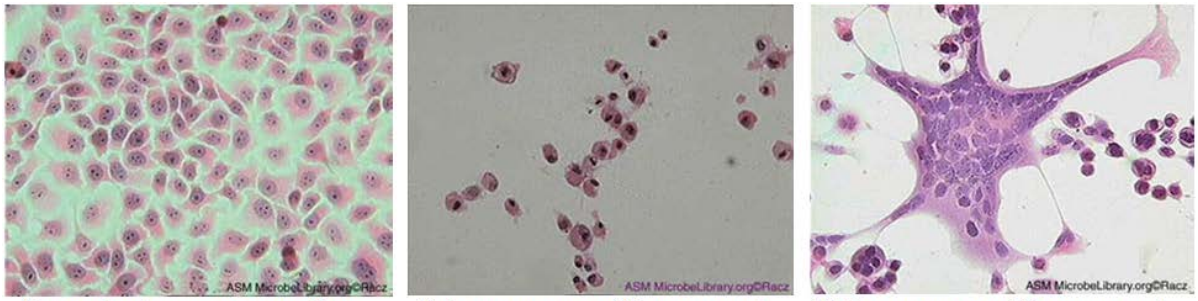
12.5.1. Виявлення віріонів

Зразки можна негативно забарвити і досліджувати в електронному мікроскопі на присутність віріонів. Обмеженнями такого підходу є висока вартість устаткування і невисока чутливість; мінімально виявлювана концентрація віріонів складає 10^6/мл. Прикладом використання такого підходу є аналіз фекалій пацієнта з гастроентеритом на присутність ротавірусних частинок.

12.5.2. Визначення інфективності вірусів

Не усі віріони мають здатність реплікуватися в клітинах хазяїна. Ті віріони, які здатні це робити, називають «інфективними», і термін «інфективність» використовують для позначення здатності вірусів заражати клітину і реплікуватися. Віріони можуть бути не інфективними через відсутність частини геному або через пошкодження.

Для встановлення, чи містять зразки інфективні віруси, ними можна інокулювати культуру клітин або організм хазяїна, для якого відомо, що він підтримує реплікацію вірусів, присутність яких очікується в зразку. Після інкубації культури клітин за відповідної температури під світловим мікроскопом можна визначити, чи з'явилися в клітинах характерні зміни, які є результатом ушкодження клітин вірусом. Зміни такого типу називають цитопатичним ефектом вірусу (Мал. 12.10).



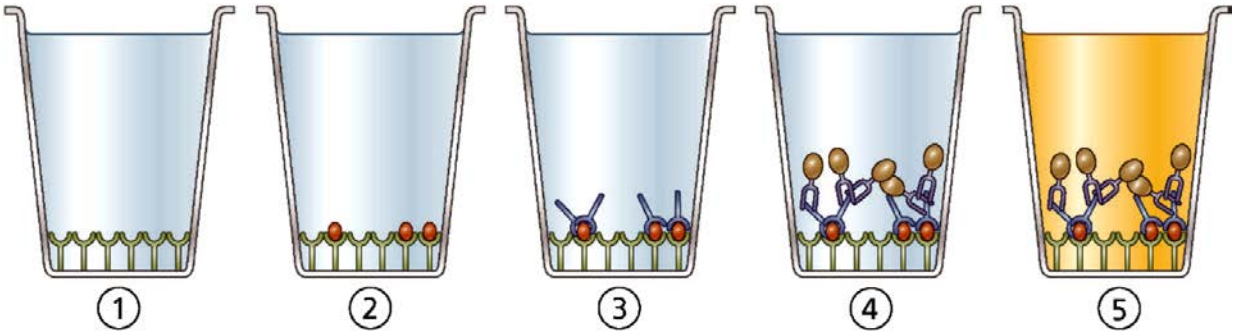
Здорові клітини культури Vero | Клітини культури Vero, уражені вірусом поліомієліту | Клітини культури Vero, уражені вірусом звичайного герпесу

Мал. 12.10. *Цитопатичні ефекти, викликані реплікацією поліовірусу і вірусу простого герпесу в культурі клітин Vero (клітини нирки мавпи). Клітини, заражені поліовірусом, зморщилися і стали округлими, тоді як мембрани заражених вірусом герпесу клітин зливаються з утворенням велетенського багатоядерного синцитію (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

12.5.3. Виявлення вірусних білків

Усі методи виявлення специфічних вірусних білків у зразках базуються на використанні специфічних для вірусу антисироваток або моноклональних антитіл.

Найбільш поширеним методом для виявлення вірусного білка є імуноферментний аналіз (ІФА), також відомий як ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Інша назва цього аналізу - сендвіч-аналіз (Мал. 12.11).



Мал. 12.11. *Сендвіч-ІФА для виявлення антигену вірусу. 1: антитіла А, специфічне до вірусного антигену, на який тестують, зв'язується з лунками 96-лункового планшета і надлишок вимивається. 2: додається дослідний зразок і присутній специфічний антиген зв'язується з антитілами, все інше змивається. 3: інші антитіла, В, також специфічні до вірусного антигену, але отримані від іншого виду тварин, ніж антитіла А, додаються і зв'язується, лише якщо антиген був присутній на етапі 2; надлишок змивається. 4: додані вторинні антитіла з приєднаним ферментом, які мають специфічність до антитіл В; вони зв'язуються, лише якщо антитіла В зв'язалися на етапі 3. 5: додається хромогенний субстрат для ферменту та інтенсивність кольору через фіксований час вимірюється спектрофотометрією за допомогою планшетного зчитувача (за N.J. Dimmock et al., 2016).*

Цей аналіз робиться швидко, а послідовність додавання рідин та промивання в багатолунковому планшеті можуть бути автоматизовані за допомогою відповідного обладнання. По суті, аналіз використовує антитіла, по-перше, щоб сконцентрувати будь-який вірусний антиген, присутній у зразку, а потім, по-друге, для виявлення присутності цього антигену в лунці планшета. Фаза виявлення є двоетапною, за участю первинних антитіл (етап 3) і вторинних антитіл (етап 4), що дає значне посилення сигналу і, отже, покращує чутливість, оскільки декілька молекул вторинного антитіла можуть зв'язуватися з кожним первинним антитілом. Важливо, щоби антитіла, які використовуються на етапах 1, 3 і 4, походили з *різних* видів тварин; наприклад, антитіла захоплення (етап 1) можуть бути отримані у мишей, первинні антитіла для виявлення (етап 3) у кроликів і вторинні антитіла (етап 4) у кіз.

Зрештою, наявність зв'язаних вторинних антитіл виявляється за дією ковалентно приєднаного ферменту, який вибирають так, щоб він був здатним перетворювати безбарвний субстрат у забарвлений продукт, наприклад лужна фосфатаза або пероксидаза хрону. Інтенсивність кольору (поглинання) є мірою кількості зв'язаного ферменту, яка пропорційна кількості іммобілізованого антигену на етапі 2. Отже, аналізуючи зразки в серійному розведенні, можна отримати кількісну інформацію.

12.5.4. Виявлення нуклеїнових кислот вірусу

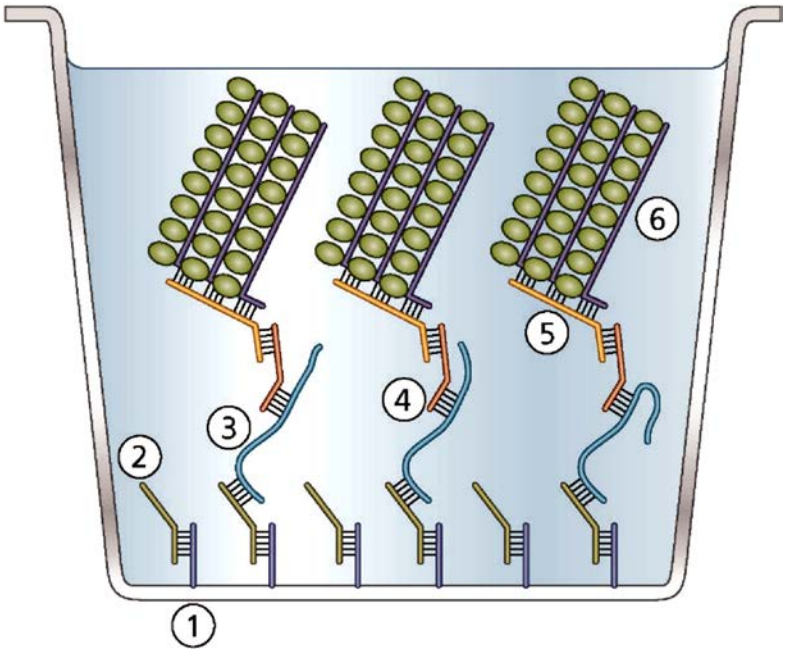
Гібридизація. Вірусні геномні нуклеїнові кислоти або матричні РНК вірусів можна виявити з використанням специфічних ДНК-зондів, які несуть відповідні мітки. Гібридизація проводиться на поверхні мембран після Саузерн-блоттінгу, який використовується для виявлення ДНК, або Нозерн-блоттингу, який використовується для виявлення специфічних РНК. Крім того, тонкі зрізи тканин можуть використовуватися для виявлення специфічних нуклеїнових кислот гібридизацією *in situ*.

Полімеразна ланцюгова реакція. Коли зразок містить невелику кількість копій нуклеїнової кислоти вірусу, імовірність її виявлення може бути збільшена за допомогою ампліфікації вірусної ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); РНК може бути скопійована у форму ДНК і потім ампліфікована за допомогою так званої RT(reverse transcriptase)-PCR.

Ця методика вимагає наявності олігонуклеотидного праймера, специфічного для консервативної послідовності вірусної нуклеїнової кислоти. Ампліфікований продукт визначається електрофорезом в гелі агарози, з подальшим перенесенням на мембрану нітроцелюлози і інкубацією з міченим зондом.

Метод так званої ПЛР в реальному часі дозволяє визначити кількість копій специфічної нуклеїнової кислоти в зразку.

Аналіз розгалуженої ДНК. Альтернативою ПЛР для швидкого та кількісного виявлення послідовностей вірусних нуклеїнових кислот є аналіз розгалуженої ДНК (branched DNA assay) (Мал. 12.12).



Мал. 12.12. *Аналіз розгалуженої ДНК. Універсальний ДНК-зонд захоплення (1) одним кінцем прив'язаний до лунок мікротитрувального планшета. Лункам забезпечують специфічність щодо послідовності нуклеїнової кислоти-мішені шляхом зв'язування з універсальним ДНК-зондом розширювача захоплення (2). Цей олігонуклеотид має дві ділянки, одна з яких здатна гібридизуватися із ДНК-зондом захоплення, а інша — специфічна для нуклеїнової кислоти-мішені (3). Зв'язана мішень виявляється шляхом комплементарної взаємодії з міченим розширювачем (4), який також має дві області, одну специфічну для іншої області мішені, і іншу, яка з'єднується з пре-ампліфікатором (5). Олігонуклеотид пре-ампліфікатора має повторювані елементи послідовності, тому може зв'язувати кілька копій олігонуклеотидного ампліфікатора, який, у свою чергу, має кілька зв'язаних з ним молекул ферменту (6) (за N.J. Dimmock et al., 2016).*

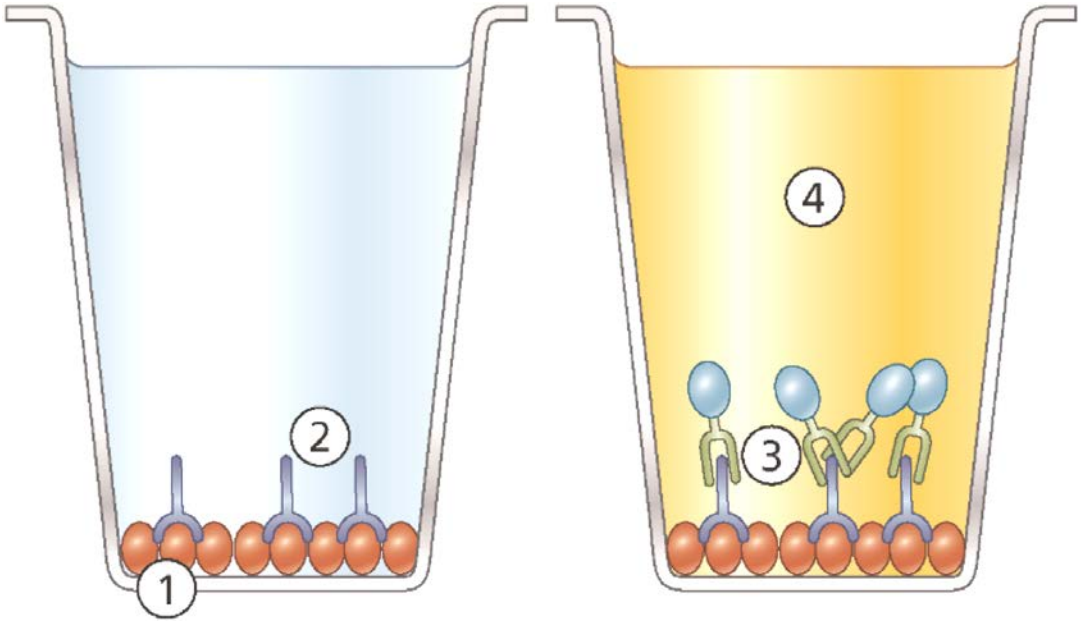
Цей аналіз базується на спаровуванні комплементарних нуклеотидів для забезпечення специфічності виявлення, але посилення сигналу для забезпечення достатньої чутливості досягається інакше, ніж при проведені ПЛР.

Будь-які молекули нуклеїнової кислоти-мішені у зразку спочатку захоплюються в лунки мікротитрувального планшета специфічними олігонуклеотидами, а потім ця зв'язана мішень виявляється шляхом утворення відгалужень завдяки спарованим нуклеотидам, що нагадує гілки дерева. В кінцевому підсумку в лунці іммобілізується велика кількість молекул ферменту. Як і при ІФА, позитивний результат виявляється при перетворенні ферментного субстрату на забарвлений продукт.

12.5.5. Виявлення специфічних для вірусу антитіл

Цей аналіз виконується тільки для вірусів людини і тварин. Аналіз базується на тому, що після перенесення вірусної інфекції у сироватці будуть наявні противірусні антитіла. Це є наслідком активації адаптивного імунітету.

На сьогоднішній день найбільш широко застосовуваною технікою для виявлення специфічних антитіл є ІФА із захопленням антитіл. Цей аналіз нагадує аналіз вірусних білків (розд. 12.5.3), але він переналаштований для виявлення противірусних антитіл (Мал. 12.13).



Мал. 11.13. *ІФА для виявлення противірусних антитіл. Лунки мікротитрувального планшета попередньо покривають вірусом або вірусним антигеном (1). Тестові зразки, які, можливо, містять специфічні антитіла до цього вірусу, додають у лунки в послідовних розведеннях (2). Після закінчення часу зв'язування, незв'язаний імуноглобулін змивається, і будь-які зв'язані антитіла виявляються шляхом додавання вторинних антитіл (3), до яких приєднано фермент (4). Позитивний результат виявляє фермент, який перетворює свій субстрат на забарвлений продукт. (за N.J. Dimmock et al., 2016).*

Досліджуваний антиген (або цілий вірус, або субодиниці білка) іммобілізують на поверхні лунок, а потім додають зразки, які, можливо, містять антитіла, у різних розведеннях і дають зв'язатися. Після змивання незв'язаного матеріалу будь-який зв'язаний імуноглобулін виявляється за допомогою вторинних антитіл, до яких прикріплено ферментом.

Однією з проблем використання наявності специфічних антитіл як тесту на наявність вірусу є те, що IgG залишається як компонент імунної пам'яті ще довго після того, як вірус, який його викликав, зник із організму. Однак ІФА для виявлення антитіл може бути спеціально налаштований для виявлення лише специфічних молекул IgM. Оскільки IgM виробляється лише під час активної первинної відповіді на антиген, його наявність свідчить про поточну інфекцію.

12.6. Дослідження генетики вірусів

Послідовності геномів. Використання методів аналізу послідовності геномної нуклеїнової кислоти дозволяє отримати чимало інформації про віруси. З використанням спеціальних комп'ютерних програм в геномах вірусів виявляються відкриті рамки зчитування і здійснюється передбачення властивостей кодованих ними білків. Наприклад, у такий спосіб мо-

жна встановити, чи є білки асоційованими з мембранами та якою ферментативною активністю вони володіють. Так саме у геномах ідентифікують регулюючі послідовності, наприклад, промотори і енхансери. На підставі послідовності нуклеотидів для певних груп вірусів будуються філогенетичні відносини. У випадку спалахів захворювання, аналіз послідовності може дозволити виявити важливу епідеміологічну інформацію, наприклад, походження штаму, що викликав захворювання.

Маніпуляції з геномами вірусів. Для маніпуляцій з нуклеїновими кислотами вірусів, особливо ДНК, доступне досить широке коло методів. Ці методи дозволяють виділити специфічний фрагмент геному, клонувати цей фрагмент у бактерійній плазміді і ввести сайт-специфічні мутації у вірусний геном. Природний процес рекомбінації або пересортовування вірусних геномів може бути відтворений в лабораторії для отримання нових генотипів вірусів.

Дослідження функції і експресії генів. Функції гена можуть бути з'ясовані, якщо його експресія блокована. У численних дослідженнях були використані віруси з мутантними генами. Впродовж більш менш тривалого часу були розроблені і використовуються методи роботи в цьому аспекті з ДНК-вмісними вірусами. Відносно нещодавно були розроблені відповідні методи для РНК-вмісних вірусів. Ці методи називають зворотною генетикою, і вони включають зворотну транскрипцію, тобто синтез ДНК на геномній РНК, впровадження мутації в ДНК, і потім транскрипція з отриманням геномної РНК, такої, що несе потрібну мутацію.

Окрім мутацій, для блокування експресії генів використовується сайленсинг РНК, тобто захисний механізм хазяїна. Для сайленсингу генів використовують короткі послідовності дволанцюгової РНК, комплементарної генам, які намагаються заглушити.

Експресію генів вірусу і клітини хазяїна досліджують з використанням методу ДНК-мікрочіпа (DNA-microarray).

РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після ознайомлення з цим розділом ви повинні:

- знати методи культивування вірусів, їх недоліки і переваги
- знати методи виділення і очищення вірусів
- знати методи кількісного обліку вірусів і аналізу їх інфективності
- знати методи ідентифікації вірусів і розуміти їх методичні засади
- розуміти головні підходи до вивчення генетики вірусів

Віруси викликають дуже багато хвороб людини, тварин, рослин. Бактеріофаги вражають прокаріот. Кожен вірус фактично використовує свою власну стратегію зараження клітини і реплікації. Деякі загальні особливості вірусного патогенезу ми обговорили вище, але повне узагальнення для всіх вірусів тут неможливе.

У наведених нижче розділах ми розглянемо віруси, які викликають головні хвороби живих організмів усіх доменів і царств, з більш детальним розглядом окремих вірусів у якості прикладу конкретної стратегії підпорядкування клітинних процесів хазяїна для власних потреб.

Оскільки цей підручник присвячений не патогенезу і контролю конкретних вірусних захворювань, а радше питанням особливостей конкретного вірусу і його реплікації у клітині, ми не будемо детально обговорювати медичні, ветеринарні, сільськогосподарські тощо аспекти. Головна увага буде присвячена саме механізмам реплікації вірусу, а не викликаній хворобі. Знайомство з матеріалом подальших розділів бажане для повного розуміння аспектів загальної вірусології, які були обговорені вище.

РОЗДІЛ 13. ВІРУСИ, ЯКІ МАЮТЬ ДНК-ГЕНОМИ (КРІМ ПАРАРЕТРОВІРУСІВ)

Усі ДНК-геномні віруси синтезують свої мРНК на дволанцюговій молекулі ДНК. Якщо віруси мають одноланцюгові геноми, на початку циклу реплікації синтезується другий ланцюг ДНК. У процесі транскрипції, як було нещодавно встановлено, на деяких вірусних геномах, крім мРНК, синтезуються міРНК, які приймають участь у регуляції експресії генів вірусу та/або клітини-господаря.

Серед ДНК-геномних вірусів, які інфікують еукаріот, у переважної більшості (крім поксвірусів, іридовірусів, асфавірусів і деяких інших) транскрипція відбувається у ядрі клітини. Таким чином, ці віруси мають можливість використовувати клітинну машинерію транскрипції і модифікації РНК.

Для реплікації власного геному ці віруси мають критичну потребу в ДНК-залежній ДНК-полімеразі. Цей фермент у клітині-хазяїні експресується тільки в фазі синтезу ДНК (фазі S) клітинного циклу, а віруси зазвичай заражають клітини, що не діляться. Для вирішення цієї проблеми віруси використовують чотири стратегії:

1. Віруси кодують власний фермент, тому він є в наявності тоді, коли треба. Це стосується усіх ДНК-вмісних вірусів, які реплікуються в цитоплазмі, а також багато інших вірусів, реплікація ДНК яких відбувається в ядрі.

2. Віруси заражають клітину і чекають, коли клітина-господар перейде в фазу S клітинного циклу.

3. Віруси заражають клітину і індукують її перехід у фазу S.

4. Віруси взагалі не потребують ДНК-залежної ДНК-полімерази, а реплікують ДНК через стадію РНК (а ДНК-залежні РНК-полімерази в клітині є завжди), на якій кодований вірусом фермент, РНК-залежна ДНК-полімераза, синтезує ДНК.

Зараз у наявності є дуже багато інформації щодо експресії генів і реплікації геномів ДНК-геномних вірусів. Нижче ми розглянемо декілька прикладів, які дозволяють добре зрозуміти, яким чином віруси регулюють як експресію власних генів, так і генів клітини.

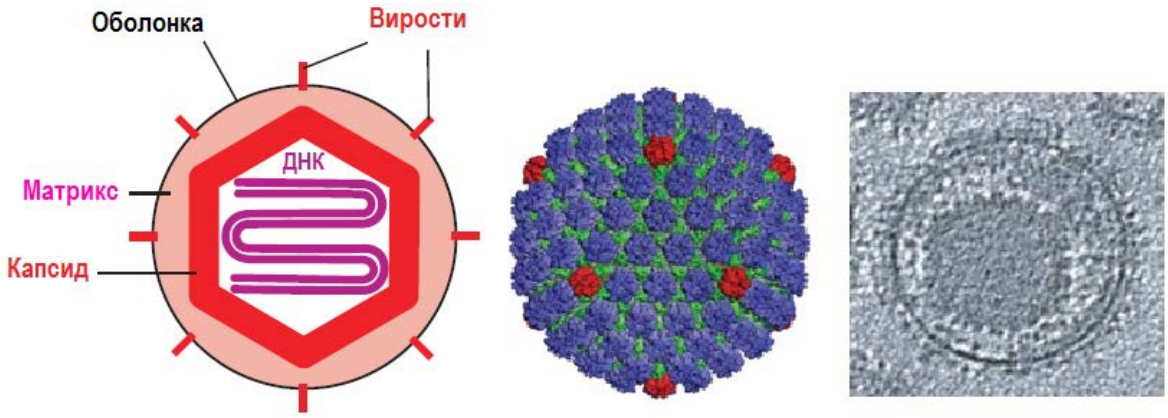
13.1. Віруси з дволанцюговою ДНК (клас 1 за Д. Балтімором)

13.1.1. Віруси людини і тварин

13.1.1.1. Родина *Herpesviridae*.

Назва родини походить від грецького слова herpein – повзати. Виділено більше 100 вірусів цієї родини, що вражають людей та інших ссавців, птахів, риб, рептилій, амфібій і молюсків. Вісім вірусів є вірусами людини. Герпесвірусами заражена переважна більшість населення нашої планети. Характеристика родини наведена у підпису до Мал. 13.1.

Примітною особливістю герпесвірусів є та, що, одного разу заразивши хазяїна, вони часто залишаються як персистентна інфекція впродовж усього його життя. Часто ця інфекція є латентною, яка час від часу реактивується, особливо якщо імунітет хазяїна послаблений. Як первинна, так і рективована інфекція герпесвірусів може бути або безсимптомною, або викликати захворювання різного ступеня тяжкості.



Мал. 13.1. Віріон вірусів родини Herpesviridae. Зліва направо: структура, реконструкція, електронна мікрофотографія. Геноми являють собою лінійну дволанцюгову ДНК, розмір якої у різних герпесвірусів варіює від 125 до 240 т.п.н. і містять 70–170 генів, з яких 43 були успадковані від предкового герпесвірусу і свідчать про спільну стратегію реплікації. Складні віріони діаметром від 120 до 300 нм складаються з трьох частин: капсид, матрикс і оболонка. Капсид ікосаедричний, складається з 162 капсомерів, 12 з яких є пентони, а інші - гексони. У матриксі міститься, щонайменше, 15 видів білків, а також деякі молекули мРНК вірусу (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

У людини виявлені вісім вірусів герпесу.

Віруси простого герпесу 1 і 2. Віруси простого герпесу 1 і 2 спочатку заражають епітеліальні клітини слизової оболонки ротової порожнини або геніталій, шкіри або рогівки. Вірус може проникати в нервові клітини і транспортуватися в їхні ядра, де здатен переходити у форму латентної інфекції.

Вірус простого герпесу 1 найчастіше заражає людину через губи або ніс. Латентна інфекція може реактивуватися, наприклад, під час стресів або зниженні імунітету за умов застуди чи переохолодження. Реактивація призводить до утворення віріонів, які приблизно в 20–40 відсотках випадків переміщаються усередині нервових волокон до місця, де віруси викликають продуктивне зараження епітеліальних клітин. Це і призводять до захворювання – герпесу. Іноді ця хвороба може давати серйозні ускладнення, наприклад, так званий герпетичний енцефаліт.

Вірус простого герпесу 2 зазвичай є збудником генітального герпесу, хвороби, що передається статевим шляхом. Він може передаватися вертикально, від дитини матері, під час внутрішньоутробного розвитку або підчас пологів, і у новонароджених він може викликати важке захворювання, яке призводить до смертельного результату приблизно в 54% випадків.

Специфічність вірусів до частин тіла не є абсолютною, і є випадки, коли вірус простого герпесу 1 інфікує геніталії, а вірус простого герпесу 2 обличчя. Крім того, у момент реактивації вірусу людина сама може перенести вірус з одного місця тіла на інше.

Вірус вітряної віспи (вірус герпесу 3). Вірус передається повітряно-крапельним шляхом. Зараження вірусом вітряної віспи відбувається зазвичай в дитинстві і призводить до захворювання вітрянкою, коли вірус поширюється по крові до шкіри, викликаючи висип. Також він може поширитися до нервових клітин, де переходить в латентний стан. Найчастіше вражаються нерви, які розташовані в ділянці обличчя або тулуба, і ці ділянки тіла є найбільш звичайним місцем прояву оперізувального герпесу, або оперізувального лишаю, коли латентна інфекція реактивується.

Вірус Епштейна-Барр (вірус герпесу 4). Вірус Епштейна-Барр передається слиною. Спочатку заражаються епітеліальні клітини, далі вірус поширюється у В-лімфоцити, які є

основними клітинами для цього вірусу, і викликає їхню проліферацію. У деяких країнах цим вірусом заражені більше 90% людей; особливо інтенсивно зараження відбувається впродовж перших років життя, коли перебіг інфекції є практично безсимптомним. У розвинених країнах частина людей заражаються в підлітковому віці, в період статевого дозрівання. Оскільки вірус передається слиною, у лікарів така форма захворювання підлітків і молоді часто носить назву «хвороби поцілунків». За умови зараження в цей час часто розвивається інфекційний мононуклеоз, або залозиста лихоманка. Крім того, у людей вірус Епштейна-Барр асоційований з розвитком низки злоякісних пухлин (розділ 8.2.1).

Цитомегаловірус людини (вірус герпесу 5). Має виражений тропізм до тканин слинної залози. Доволі поширений, трапляється приблизно у 40% людей. Зараження цим вірусом може відбуватися повітряно-крапельним шляхом, а також через слину під час поцілунків, статевим шляхом, у разі переливання крові, під час вагітності та пологів, а також через молоко матері під час грудного годування дитини.

При переважній більшості випадків зараження людей цитомегаловірусами симптоми або відсутні, або є слабкими. Проте у вагітних жінок вірус може заразити плаценту і згодом плід, для якого зараження може виявитися дуже серйозним. У США приблизно 1% дітей народжується зараженим цим вірусом. З них приблизно у 7% заражених новонароджених наявні викликані вірусом ушкодження, як-от маленький розмір мозку і збільшення печінки і селезінки. У інших новонароджених ушкодження можуть проявитися на пізнішій стадії, включаючи втрату слуху або затримку розумового розвитку.

При зараженні в дорослішому стані, цитомегаловірус зазвичай себе ніяк не проявляє. Проте у декотрих пацієнтів з ослабленим імунітетом, наприклад, у хворих СНІДом, у яких проводиться загальноприйнята протипухлинна терапія або кому призначають імунодепресанти після пересадки органів, цитомегаловірус може викликати серйозні захворювання, включаючи пневмонії та гепатити.

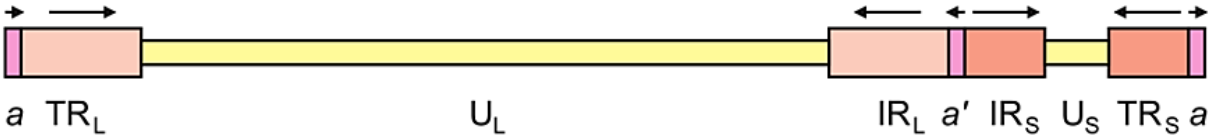
Вірус герпесу людини 6 (ВГЛ-6). ВГЛ-6 репродукується в Т-, В-лімфоцитах і макрофагах, більшою мірою вражаючи Т-лімфоцити. Має тропізм до гліальних клітин.

Механізм і шляхи передавання цього вірусу вивчені недостатньо. У природних умовах інфекція поширюється повітряно-крапельним і орально-оральним шляхами, оскільки ВГЧ-6 постійно виявляють в носоглотковому слизі і слині інфікованих осіб. Інфекція широко поширена серед людей, вірус мають від 60 до 96% здорових дорослих. У переважної більшості заражених ВГЧ-6 формується латентна інфекція. За умови зараження дітей можливий розвиток так званого раптового висипу, мононуклеозоподібного синдрому. Цей синдром виникає через 20–60 діб після зараження і триває 2–6 тижнів. Виявляється він високою температурою, ознобом, стомлюваністю, нездужанням та головним болем. У більшості випадків мононуклеозоподібний синдром закінчується повним одужанням.

Вірус герпесу людини 7 (ВГЛ-7). ВГЛ-7 був виділений в культурі CD4 Т-лімфоцитів, які мають рецептори до цього вірусу. Вірус, разом у ВГЧ-6, був пов’язаний з рядом випадків раптового висипу. Є однією з можливих причин синдрому хронічної втоми.

Герпесвіруси, асоційовані з саркомою Капоші (вірус герпесу людини 8). У 1994–1995 рр. у хворих СНІДом в тканинах саркоми Капоші були виявлені унікальні послідовності нуклеотидів, частково гомологічні послідовностям ДНК вірусу Епштейна-Барр. Ще не виділений вірус, якому належали ці унікальні послідовності, був названий герпесвірусом людини типу 8. Його роль в етіології саркоми Капоші та інших пухлин залишається дискусійною.

Особливості реплікації вірусу простого герпесу 1. Реплікацію герпесвірусів ми розглянемо на прикладі вірусу простого герпесу 1 (ВПГ-1), який є одним з найкраще вивчених вірусів родини. Спочатку обговоримо *організацію генома* вірусу (Мал. 13.2).



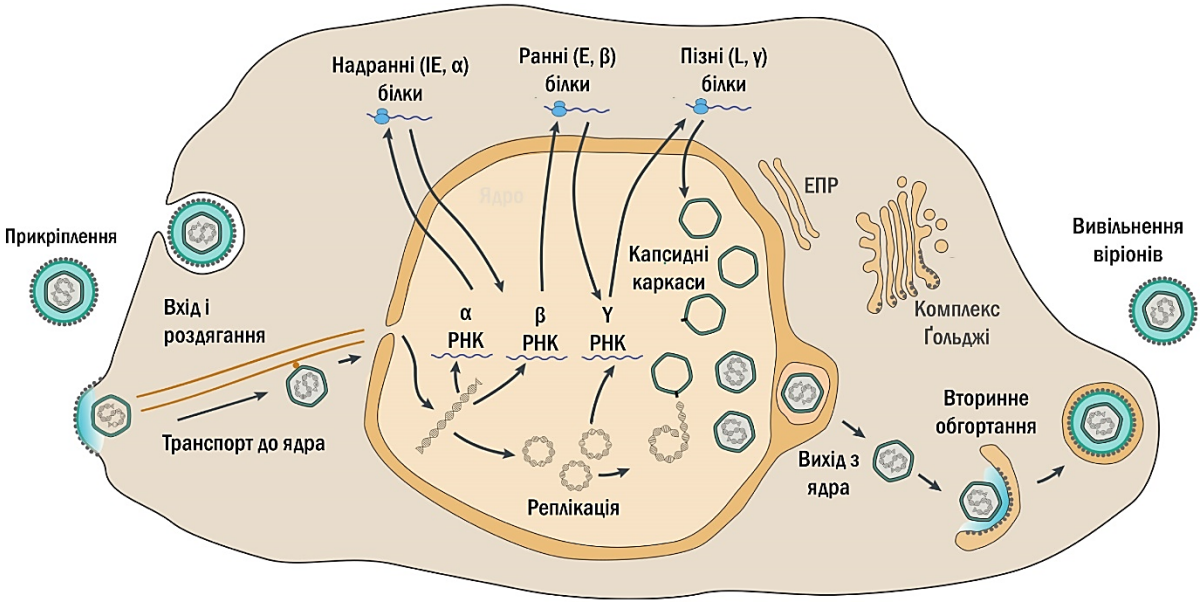
Мал. 13.2. Геном ВПГ-1. UL і US – унікальні довга і коротка послідовність відповідно; TRL і IRL – термінальний і інвертований повтори, що фланкують UL; TRS і IRS - термінальний і інвертований повтори, що фланкують US; a - кінцевий прямий повтор, який також присутній всередині в зворотній орієнтації (a'). Орієнтації повторюваних послідовностей показані стрілками. Обговорення див. у тексті (за ICTV dsDNA Viruses Herpesviridae).

Вірус має лінійний дволанцюговий ДНК-геном довжиною близько 152 т.п.н. Геном складається з двох унікальних послідовностей, кожна з яких оточена повторюваними послідовностями. Унікальні послідовності не мають однакової довжини: довша позначається U_L, а коротша – U_S. 5′- і 3′-кінці геному містять неспаровані комплементарні нуклеотиди, завдяки яким полегшується замикання геному в кільце. Після циркуляризації, кінцеві послідовності a з'єднуються.

Завдяки наявності інвертованих повторів, одиниці U_L та U_S геному можуть бути інвертовані одна відносно одної, так що можуть існувати чотири лінійних ізомери. Проте було показано, що ні наявність внутрішніх повторів, ні орієнтація компонентів геному не впливають на репродукцію вірусу в клітинах.

Геном ВПГ-1 кодує близько 90 одиниць транскрипції, і з них щонайменше 84 кодують білки. За деякими незначними винятками, кожен вірусний транскрипт кодує один білок і не містить інтронів. Деякі транскрипти не кодують відкриті рамки зчитування. Вони пов'язані з латентністю та регуляторними мікроРНК. Під час інфекції ВПГ-1 послідовно експресуються різні гени, так що експресія одного регулює експресію іншого. Відповідно до цього каскадного механізму вірусні гени класифікуються щонайменше на три групи: надранні IE (immediate), ранні E (early), та пізні L (late). У герпесвірусів також прийнято ці групи означати грецькими літерами α, β та γ для надранніх, ранніх і пізніх генів відповідно.

Продуктивна інфекція. Цикл репродукції вірусу (Мал. 13.3) починається з *прикріплення* віріона до поверхні клітини. Спочатку вірусна частинка взаємодіє з глюкозаміногліканами клітинної поверхні, зокрема гепарансульфатом. Ця взаємодія обумовлена глікопротеїнами оболонки вірусу gB та/або gC. Далі віріон прикріплюється до головного рецептора, який може представляти собою різні типи нектинів, молекул клітинної адгезії. Білком прикріплення до головного рецептора є глікопротеїн gD. Після цього, в залежності від типу клітини, яка заражається, відбувається або злиття плазматичної мембрани клітини і оболонки віріона, або опосередкований рецептором ендоцитоз, і надалі зливаються мембрана ендосоми і ліпопротеїнова оболонка вірусної частинки. Для злиття мембран потрібний комплекс глікопротеїнів gH/gL і глікопротеїн gB, хоча точні деталі цього процесу ще не зовсім зрозумілі.



Мал. 13.3. *Узагальнена схема реплікації вірусу простого герпесу людини 1. Обговорення див. у тексті (за ICTV dsDNA Viruses Herpesviridae).*

Після потрапляння вірусної частинки у цитоплазму і часткового роздягання, вона транспортується до ядерної пори з подальшим перенесенням у ядро. ВПГ-1 транспортується на досить великі відстані, особливо в нейронах. Нуклеокапсид транспортується до ядра по мережі мікротрубочок за допомогою моторного білка динеїну. Біля ядерної пори відбуваються конформаційні зміни білків капсиду. Внутрішній білок матриксу UL36 (VP1/2) має сигнал ядерної локалізації, крім того капсид безпосередньо чи опосередковано зв'язується з білками-нуклеопорінами, що як вважають є ключовим для транспорту ДНК в ядро. Все це дозволяє геномній ДНК потрапити до ядра за участю β-імпортинів клітини. У ядрі відбувається перетворення лінійної ДНК у ковалентно замкнене кільце.

Транскрипція та реплікація вірусного геному, а також збирання капсидів потомства відбуваються в ядрі. Інфекція супроводжується реорганізацією ядра, що включає збільшення його розміру, руйнування ядерця і ядерного домену 10, а також конденсацію хроматину з подальшим його руйнуванням, як і руйнуванням ядерної пластинки на пізніх стадіях зараження. Також блокуються ключові клітинні процеси – транскрипція, сплайсинг клітинної мРНК, біосинтез білка та клітинна відповідь на інфекцію. Усе це підвищує ефективність транскрипції та реплікації вірусу.

Експресія генів вірусу. Гени герпесвірусу експресуються у вигляді послідовних каскадів надранніх (α), ранніх (β) і пізніх (γ) генів. Для активації транскрипції генів α немає потреби в синтезі білка. Промотори усіх цих генів мастять консенсусну послідовність GyATGnTAATGArATTCyTTGnGGG, де y - піримідинова основа, r - пуринова основа, n - будь-яка основа. З цією послідовністю зв'язується клітинний фактор транскрипції Oct-1, з яким у свою чергу утворює комплекс структурний білок вірусу VP16. Комплекс рекрутує РНК-полімеразу II і починає транскрипцію надранніх генів.

Основною функцією білків, що кодуються α-генами, є активація експресії β-генів. Але вони виконують і інші потрібні вірусу функції. Наприклад, білок ICP0 містить домен E3, що володіє активністю убіквітин-лігази і може запускати протеолітичну деградацію деяких білків, які беруть участь у захисті клітин від вірусної інфекції.

Білки та ферменти, що кодуються β-генами, беруть участь у реплікації вірусного геному (наприклад, ДНК-полімераза ВПГ-1, UL30), регуляції метаболізму нуклеотидів (наприклад, тимідинкінази, UL23), пригніченні експресії ранніх α-генів та активації пізніх γ-генів.

Регуляція експресії генів β і γ менш упорядкована у порівнянні з регуляцією експресії α-генів. Тому початок ініціації, тривалість і рівень експресії цих генів не збігаються. Наприклад, через низьку ефективність ініціації трансляції рівень експресії ключового білка реплікації ДНК-полімерази нижчий порівняно з іншими β-генами, наприклад, тимідинкінази. Вище і нижче від сайту ініціації трансляції транскрипт цього гена містить послідовності, що утворюють стабільні шпильки, які можуть перешкоджати доступу клітинних факторів ініціації. Рівень експресії ДНК-полімерази досягає максимуму лише через 4 години після інфікування.

Таким чином, після початку експресії ранніх генів починається реплікація вірусної ДНК, яка відбувається в окремих ділянках ядра, відомих як компартменти реплікації. У реплікації беруть участь сім білків вірусу, включаючи згадану ДНК-полімеразу, а також кілька клітинних білків, таких як ДНК-лігаза, топоізомераза II та різні компоненти систем репарації ДНК та гомологічної рекомбінації.

Деякі вірусні білки беруть участь у метаболізмі нуклеотидів, наприклад згадана тимідинкіназа, рибонуклеотидредуктаза (UL39, UL40), дезоксиуридинтрифосфатаза (UL50), урацил N-глікозилаза (UL2) і лужна нуклеаза (UL12). Ці ферменти необхідні для синтезу та відновлення вірусної ДНК, оскільки виробництво відповідних ферментів клітини-хазяїна пригнічується.

Після ініціації синтезу вірусної ДНК, спочатку нові копії утворюються через тета-механізм синтезу кільцевої ДНК, потім реплікація перемикається на механізм кільця, що котиться (Мал. 4.53). Продукуються конкатемерні молекули, які розрізаються на окремі геноми під час процесу пакування у капсид.

Після ініціації реплікації вірусної ДНК підвищується рівень експресії пізніх γ-генів, особливо тих, що кодують структурні білки, необхідні для збирання віріонів потомства. Білки капсиду, деякі білки матриксу і каркасні білки потрапляють у ядро в компартменти реплікації вірусу. Але глікопротеїни оболонки віріону синтезуються на шорсткому ендоплазматичному ретикулумі і транспортуються до комплексу Гольджі.

Коли буде напрацьована певна кількість дочірніх геномів і білків капсиду, починається збирання нових вірусних часток. Прокапсид (Мал. 4.63) має більш кулясту форму, ніж зрілий капсид, і його структурна цілісність підтримується каркасними білками. Перед або в процесі пакування ДНК каркасні білки видаляються кодованою вірусом протеазою.

ДНК вірусу потрапляє до прокапсида через пору. Кожен прокапсид отримує геномну ДНК повної довжини, яка вирізається з конкатемера. Розрізання конкатемера відбувається біля сигнала упаковки, який знаходиться всередині послідовності і таким чином присутній на стику двох копій геному. Завантаження ДНК в прокапсид, розпізнавання сигналу пакування та розрізання ДНК здійснюються за допомогою комплексу вірусних білків, відомих як терміназа.

Після збирання нуклеокапсидів у ядрі, вони мають отримати білки матриксу і оболонку, а потім сформовані віріони повинні бути звільненими з клітини. Це складні процеси, і багато деталей досі невідомі, але передбачається, що послідовність подій така

- ✓ Нуклеокапсид отримує в ядрі деякі білки матриксу.

- ✓ Нуклеокапсид брунькується через внутрішню мембрану ядерної оболонки в перинуклеарний простір, що надає йому тимчасову оболонку.
- ✓ Тимчасова оболонка зливається із зовнішньою мембраною ядерної оболонки, вивільняючи нуклеокапсид в цитоплазму.
- ✓ Додається решта білків матриксу.
- ✓ Оболонку віріони набувають брунькуванням у везикулу, що походить від комплексу Гольджі. Брунькування відбувається через ділянку мембрани везикули, на якій розташовані глікопротеїни вірусу. Таким чином, віріони стають оточеними двома мембранами – внутрішньою, яка містить вірусні глікопротеїни і стане оболонкою віріона, і зовнішною мембраною везикули.
- ✓ Огорнуті двома мембранами віріони шляхом екзоцитозу транспортуються до плазматичної мембрани.
- ✓ Мембрана везикули зливається з плазматичною мембраною, вивільняючи віріон з клітини.

Хоча оболонки віріонів походять від мембран всередині клітини, деякі вірусні глікопротеїни експресується на поверхні клітини. Ці глікопротеїни можуть зливати інфіковані клітини з неінфікованими клітинами, в результаті чого формуються гігантські клітини, відомі як синцитії, які можна спостерігати як в інфікованих культурах клітин (Мал. 11.10), так і в ураженнях, викликаних ВПГ-1. У культурі, після зараження клітини гинуть через 18-24 години.

Латентна інфекція. Коли інфікування клітини герпесвірусом призводить до латентності, а не до продуктивної інфекції, геном вірусу зберігається в ядрі. Для більшості герпесвірусів латентно інфіковане ядро містить кілька копій геному у вигляді кільцевих молекул ДНК, але деякі, наприклад, герпесвірус 6 людини, інтегрують геном вірусу в клітинну хромосому. Більшість вірусного геному є виключеним під час латентності, але деякі ділянки транскрибуються в РНК, а деякі віруси також синтезують кілька білків.

Для підтримки латентності вірусу простого герпесу в нейронах, в клітинах, які не діляться, не потрібні вірусні білки, але є потреба в синтезі вірусних РНК. Ключову роль грає асоційований з латентність ген *LAT*, який розташований у кінцевих повторах геному (Мал. 13.2). Важливо, що ген *LAT* має енхансер, який специфічно діє в нейронах. Первинним транскриптом цього гена є РНК, яка не кодує білків. Процесінг первинних транскриптів призводить до утворення двох коротших РНК і серії мікроРНК. Ці РНК виконують різноманітні функції, які включають пригнічення апоптозу, що забезпечує виживання нейрона з його латентною інфекцією ВПГ-1. Крім того, блокується експресія надранніх генів, що попереджає початок продуктивної інфекції вірусу.

Під час латентності спостерігаються епігенетичні зміни в геномі вірусів, зокрема ділянка LAT має ознаки активного у сенсі транскрипції еухроматину, включаючи ацетильований гістон Н3. На противагу цьому, пов’язані з продуктивною інфекцією надранні гени мають ознаки репресованого гетерохроматину з гіпоацетилюванням гістонів

Реактивація ВПГ-1 дозволяє передавати віруси герпесу неінфікованим людям, забезпечуючи виживання вірусу. Реактивація пов’язана з УФ-випромінюванням, стресом, лихоманкою та травмою нервів. Імовірність реактивації латентної герпесвірусної інфекції підвищується, якщо у хазяїна послаблений імунітет; чим більший ступінь послаблення імунітету хазяїна, тим більша ймовірність реактивації.

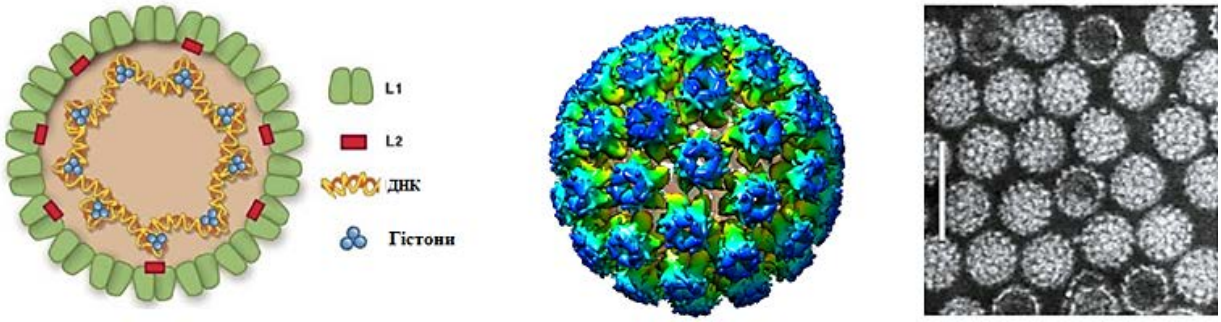
13.1.1.2. Родина *Papillomaviridae*

Папіломавіруси вражають хребетних і мають тропізм до епітелію шкіри і слизових оболонок. Відомо більше 200 типів папіломавірусів людини (ВПЛ), що розрізняються за послідовностями ДНК. Назва родини походить від латинського слова *papilla* – сосочок і грецького слова *oma* – пухлина. Віруси передаються контактно і потрапляють в організм через невеликі садна і мікротравми шкіри та слизових оболонок, а також статевим шляхом, в тому числі при оральних і анальних статевих контактах. Також можливе передавання від матері до плоду та через медичний інструментарій. Віруси заражають кератиноцити шкіри або клітини слизової оболонки. Кожен тип вірусу папіломи людини переважно заражає певні ділянки, наприклад, руки. Зараження може привести до утворення доброякісних пухлин папілом і кондилом (бородавок).

З зараженням деякими папіломавірусами пов'язане виникнення злоякісних пухлин, зокрема вони є головною причиною рака шийки матки у жінок. Онкогенний потенціал папіломавірусів було обговорено у розділі 8.2.1.

До цієї родини належать віруси з невеликими віріонами, які містять замкнену в кільце дволанцюгову ДНК. Характеристика наведена у підпису до Мал. 13.3.

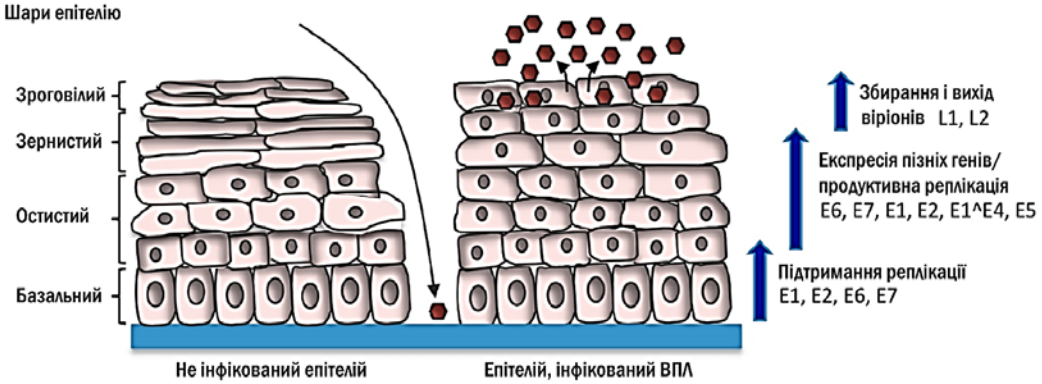
Особливості реплікації папіломавірусів. Папіломавіруси створили своєрідний, інколи кажуть навіть «геніальний», інфекційний цикл, який використовує процес самовідновлення багатошарового епітелію шкіри та слизової оболонки. У багатошаровому епітелії нижній базальний шар клітин прикріплений до базальної мембрани, і ці клітини діляться або симетрично, щоб утворити більше базальних клітин, або асиметрично, у цьому випадку одна з дочірніх клітин зазнає диференціації і рухається вгору до поверхні у процесі оновлення тканини. В останньому випадку клітини просуваються вгору крізь епітелій, поки не злущуються з поверхні тканини.



Мал. 13.3. *Віріон вірусів родин Papillomaviridae. Зліва направо: структура, реконструкція, електронна мікрофотографія. Смужка на фотографії дорівнює 100 нм. Геном являє собою замкнену в кільце дволанцюгову ДНК (близько 7,5 т.п.н.). Упакована вірусна ДНК пов'язана з основними білками гістонами, які вірус отримує від хазяїна. Віріони без оболонки, ікосаедричні, діаметром 55 нм, складаються з 72 капсомерів (T=7). Ікосаедрична структура складається виключно з пентонів, що містять 360 головних білків капсиду L1 і 12 молекул малих білків капсиду L2 (адаптовано з ICTV dsDNA Viruses Papillomaviridae).*

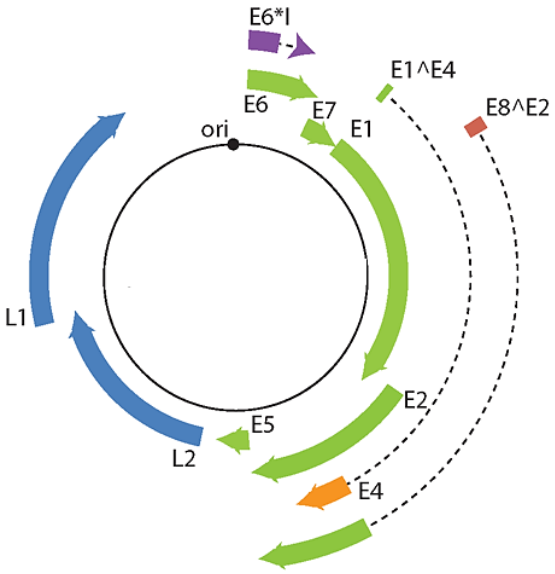
Папіломавіруси використовують цей процес, інфікуючи базальні клітини через пошкодження в епітелії і встановлюючи низький рівень персистентної інфекції. Вірусний геном реплікується позахромосомно з дуже низькою кількістю копій у базальних клітинах з мінімальною експресією вірусних білків. Потім, коли інфіковані клітини переходять через процес диференціювання, відбувається активація продуктивної інфекції, ініціюється високий рівень синтезу вірусної ДНК та експресії генів вірусу. Ця стратегія допомагає вірусу ухилятися від імунної системи, оскільки високий рівень вірусної активності спостерігається

лише в остаточно диференційованих клітинах, які майже не підлягають імунному нагляду. Інфекційний цикл ВПЛ схематично показаний на Мал. 13.4.



Мал. 13.4. Інфекційний цикл папіломавірусу людини. На схемі показані диференційовані шари багатошарового епітелію. ВПЛ інфікує базальний шар багатошарового епітелію через пошкодження. Після проникнення геном вірусу чекає, поки ядерна мембрана зруйнується під час мітозу, щоби проникнути в ядро. В ядрі вірусний геном зазнає обмеженої ампліфікації до 50-100 копій на клітину і зберігається в ядрі шляхом приєднання до хроматину господаря. Геном підтримується в постійній кількості копій у клітинах, що діляться, і поділяється шляхом взаємодії з хроматином господаря при мітозі. Після диференціювання інфікованих клітин активується продуктивна фаза циклу реплікації, що призводить до експресії пізніх генів і ампліфікації вірусних геномів до тисяч копій на клітину. Експресія E6 і E7 дозволяє клітині повторно ввійти в клітинний цикл після диференціювання, забезпечуючи клітинні фактори для продуктивної реплікації. E4 і E5 також сприяють ефективній продуктивній реплікації. Експресія L1 і L2 сприяє інкапсидації геномів вірусу, що призводить до вивільнення віріонів з самих верхніх шарів епітелію (коричневі шестикутники) (за Moody C.A., 2017).

На Мал. 13.5 схематично зображена *організація геному* вірусу папіломи людини 16. Транскрипція замкненого в коло вірусного геному відбувається лише з одного ланцюга ДНК. Вірусний геном можна розділити на три функціональні області. Рання область кодує вірусні білки, які беруть участь у транскрипції, реплікації та маніпуляціях з клітинним середовищем. Пізня область кодує білки капсиду L1 і L2.



*Мал. **13.5.** Схема геному вірусу папіломи людини 16. Показана вірусна длДНК довжиною 7,906 т.п.н.. Транскрипція геному відбувається тільки з одного ланцюга ДНК. Зовнішні стрілки позначають відкриті рамки зчитування, що кодують білок, і напрямок транскрипції. Літерами E позначені ранні білки, L – пізні білки. Пунктирні лінії представляють послідовності інтронів. Чорне коло позначає сайт початку реплікації (ori) (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae).*

Проникнення в клітину. Для ефективного встановлення інфекції, ВПЛ повинен заражати базальні або стовбурові епітеліальні клітини, що активно діляться. Щоб ініціювати інфекцію, вірус зв'язується з гепарансульфатними ланцюгами глікопротеїнів, розташованих на базальній мембрані або на поверхні клітин базального шару, за допомогою головного білка капсиду L1. Це призводить до опосередкованих циклофіліном В конформаційних змін капсиду таким чином, що N-кінець мінорного білка капсиду L2 виставляється на поверхні вірусної частинки. Розщеплення L1 в позаклітинному просторі сериновою протеазою, калікреїном-8, є ключовим для ефективної експозиції L2. В позаклітинному матриксі вірус також може зв'язуватися з тимчасовим рецептором, ламініном-322.

Далі, N-кінець малого капсидного білка L2 розщеплюється за допомогою незалежного від циклофіліна В механізму у консервативному консенсусному сайті розщеплення сериновою протеазою фурином, щоб відкрити амінокислоти 17–36, що, як вважають, є важливим для взаємодії капсиду з неідентифікованим вторинним рецептором. Як передбачають, вторинними рецепторами можуть бути рецептори епідермального фактора росту, інтегринів, анексину-А2 тощо. Використання різних рецепторів може залежати від генотипу ВПЛ і типу клітин, які інфікуються.

Проникнення віріону ВПЛ у клітину є клатрин- чи кавеолін-незалежним, але залежним від актину. Хоча подробиці ендоцитозу вірусних часток не є добре зрозумілими, вважають, що вірус поглинається шляхом макропіноцитозу і опиняється в ендосомі. Усередині ендосом капсид вірусної частинки розбирається в середовищі з низьким pH, що призводить до дисоціації головного капсидного білка L1 від малого білка капсиду L2. Білок L2 залишається зв'язаним з геномною ДНК вірусу, а білок L1 руйнується у лізосомі.

Комплекс вірусної ДНК з білком L2 і деякими білками клітини транспортується до *транс*-боку комплексу Гольджі. Надалі він транспортується до ядра, куди він може потрапити після руйнування ядерної мембрани під час мітозу. ВПЛ досягає ядра приблизно через 24 години після приєднання до клітини.

Первинна ампліфікація геному. Після потрапляння у ядро, комплекс L2-геном вірусу зв'язується з клітинними конденсованими хромосомами, що забезпечує збереження вірусної ДНК у ядрі після мітозу. Надалі відбувається експресія ранніх білків вірусу E1 і E2, які необхідні і достатні для реплікації вірусної ДНК. Транскрипція цих білків ініціюється факторами хазяїна.

E1 є геліказою, яка розкручує сайт початку реплікації (ori) на вірусній ДНК і залучає клітинні фактори хазяїна для реплікації вірусного геному. E2 є фактором транскрипції, який допомагає залучити геліказу E1 до ori, а також відіграє роль у експресії інших генів вірусу. Оскільки вірус не кодує ДНК-залежної ДНК-полімерази, використовується фермент хазяїна, який присутній у клітинах під час мітозу.

Під час первинної реплікації утворюється обмежена кількість вірусних геномів, від 50 до 100 епісомальних копій на ядро клітини. Ймовірно, некерована реплікація стримується білком-репресором E8^E2. Після цього вірус переключається на підтримання персистентної інфекції клітин. Особливості фази встановлення і підтримання інфекції не є добре зрозумілими. Вважають, що саме білок E2 відіграє в цьому ключову роль, зв'язуючись з хроматином хазяїна і забезпечуючи рівномірний розподіл епісомної вірусної ДНК між дочірніми ядрами під час поділу базальних клітин. Підтримуюча персистентна фаза інфекційного циклу вірусу може тривати від місяців до років.

Коли поділ інфікованої базальної клітини утворює транзитну клітину, яка здатна диференціюватися та переміщатися у верхні шари епітелію, відбувається перемикання на *залежну від диференціації ампліфікацію геному* (так звану вегетативну ампліфікацію) та, в кінцевому підсумку, генерацію віріонів потомства. У цей час вірус переключається на програму продуктивної інфекції з реплікацією великої кількості геномів і експресією пізніх генів, зокрема білків капсида L1 і L2.

Проблемою для вірусу є те, що диференційовані клітини в нормі не діляться і в них не експресується ДНК-залежна ДНК-полімераза. Тому для вірусу є принципово важливим повернути епітеліальні клітини до клітинного циклу, щоб забезпечити клітинні фактори для продуктивної реплікації. Ключову роль у цьому процесі відіграють вірусні білки E6 і E7, які шляхом складних взаємодій з білками клітини порушують контроль клітинного циклу (див. розділ 8.2.1) і ініціюють зокрема експресію ДНК-залежної ДНК-полімерази, а також інші зміни в зараженій клітині. З іншого боку, вірус *роз'єднує* перехід клітини в фазу S і проліферацію. Тому перехід диференційованих епітеліальних клітин у стан, подібний до S-фази клітинного циклу (псевдо-S-фаза) зазвичай не призводить до мітозу. У такому роз'єднанні важливим є згаданий білок вірусу E7 і інші вірусні білки, які втручаються у перебіг молекулярних процесів у клітині.

Після напрацювання великої кількості вірусних геномів (до 1000 на ядро) і білків капсиду, в ядрі відбувається самозбирання дочірніх віріонів. Коли клітини злущуються з поверхні епідермісу в навколишнє середовище, вони е джерелом інфекції і вивільняють інфекційні віріони, завершуючи цикл репродукції вірусу. У деяких випадках інфекція папіломавірусів є безсимптомною, але може відбуватися обмежена кількість поділів інфікованих ВПЛ клітин шкіри або слизових оболонок, що призводить до утворення папілом.

13.1.1.3. Інші віруси людини і тварин з длДНК геномами

Родина Poxviridae. До цієї родини належать віруси, патогенні для людини (вірус натуральної віспи), а також патогенні для багатьох інших ссавців, птахів і комах.

Геном поксвірусів являє собою дволанцюгову лінійну ДНК, кінці ланцюгів якої ковалентно зв'язані. Реплікація вірусу відбувається в цитоплазмі, оскільки не залежить від білків клітини-хазяїна; усі необхідні білки кодує вірус.

Віріони є великими, плеоморфними, звичайно нагадують цеглини з закругленими краями, розміром 220–450 × 140–260 нм, укриті ліпопротеїновою мембраною, на поверхні якої помітні паличкоподібні або округлі структури (Мал. 13.6).



Мал. 13.6. Віріони Poxviridae. Ліворуч – структура віріону, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів вірусу натуральної віспи.

Мембрана укриває двоввігнуту або циліндричну серцевину (кор), яка складається з ДНК і білків і формує нуклеопротеїновий комплекс. У зоні між стінкою кору і мембраною, певно, присутні одно чи два латеральні тіла, структура і функція яких досі залишаються неясними.

Протягом морфогенезу віріонів, поксвіруси можуть утворювати декілька форм. Так звані внутрішньоклітинні зрілі віріони мають на поверхні мембрану. Деякі з цих віріонів укриваються подвійною мембраною, брунькуючись через везикули апарату Гольджі або ендосоми, утворюючи так звані внутрішньоклітинні окутані віруси. Далі ці віріони можуть зливатися з плазматичною мембраною, втрачаючи один шар подвійної мембрани, і вивільнятися з клітини, формуючи так звані позаклітинні окутані віруси.

Вірус натуральної віспи неодноразово згадувався у попередніх розділах. За приблизними підрахунками науковців, з VI по XX ст. спричинена їм хвороба привела до смерті щонайменше 1 млрд людей.

Джерелом інфекції є хворі люди; збудник передається повітряно-крапельним шляхом, а також через контакт зі шкірою хворого. Потрапивши в організм, вірус циркулює у крові і згодом потрапляє у клітини шкіри та слизових оболонок, утворюючи на них характерні висипання, від яких, у разі одужання, формуються пожиттєві шрами – віспини. Розрізняють висипну та геморагічну («чорну») та інші форми захворювання.

ВООЗ оголосила про ліквідацію віспи у 1980 році, штами вірусу офіційно зберігаються лише в двох лабораторіях Землі.

Вірус віспи мавп. Віспа мавп є захворюванням, подібним до віспи у людей. Збудником є вірус з родини *Poxviridae*. Віспа мавп ендемічна для регіону вологих тропічних лісів. Можливо мавпи є основним джерелом цієї інфекції, або тільки резервуаром, при чому самі заражаються від інших тварин, зокрема, від гризунів.

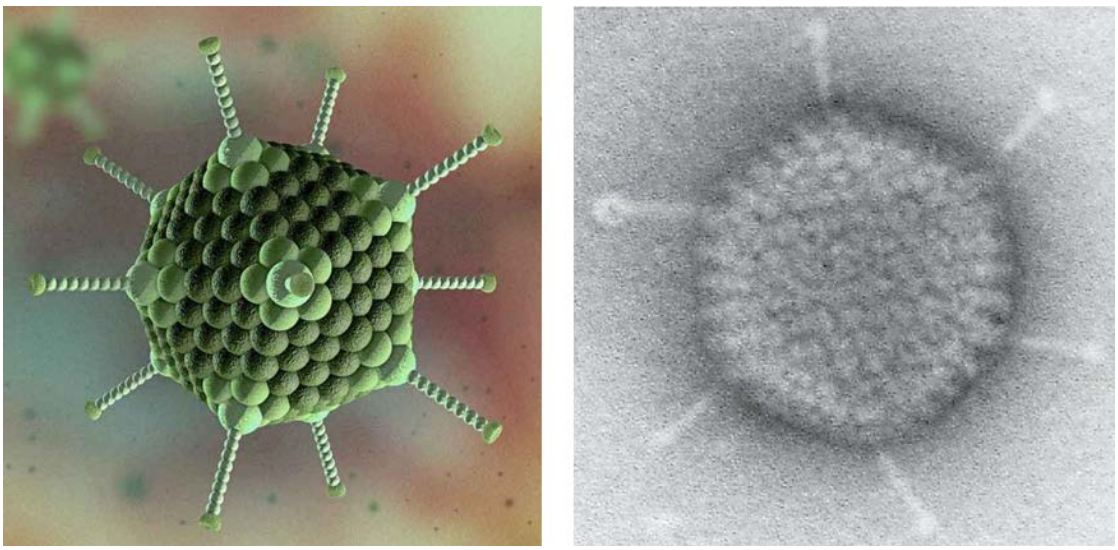
Для людей віспа мавп є зоонозним захворюванням, подібним до натуральної віспи, хоча й зі значно меншою летальністю. З 1970 р. в Африці відбуваються випадки зараження людини вірусом віспи мавп; деякі з таких випадків виявилися фатальними. У 2003 р. деякі мешканці США захворіли загадковою хворобою, симптоми якої включали висип і лихоманку. Виявилось, що ці люди заражені вірусом віспи мавп, який потрапив в США з дрібними ссавцями, імпортованими з Гани. Вірус заразив лугових собачок, яких тримали як домашніх вихованців, а потім перейшов на людей.

У травні 2022 року відбувся спалах віспи мавп у людей в багатьох країнах Європи, Північної Америки, Австралії, Ізраїлі. Багато з цих людей не мандрували до природних осередків вірусу в Центральній Африці. На момент написання цього підручника спеціалісти ще не зробили висновки щодо походження вірусу і продовжують дослідження.

Родина Adenoviridae. Назва вірусів цієї родини походить від грец. adeno – залоза, оскільки перші представники цієї групи вірусів були виділені з аденоїдів людини.

Геном являє дволанцюгову лінійну ДНК. Характеристика родини приведена у підпису до Мал. 13.7.

У людини аденовіруси є звичайними збудниками ГРЗ і кон’юнктивітів, а також кишкових інфекцій.



Мал. 13.7. Віріон вірусів родини Adenoviridae. Ліворуч – реконструкція віріону, праворуч – електронна мікрофотографія. Віріони не мають оболонки, 70–90 нм діаметром. Капсид з ікосаедричною симетрією (T=25) складається з 240 гексонів і розташованих на вершинах віріона 12 пентонів, які слугують основою для довгих фібрил, що виступають (ліворуч - за https://akm-img-a-in.tosshub.com/indiatoday/images/story/202303/health_-_getty_images-one_one.jpg?VersionId=Hia4BCNVG25e5oCAyqlxHf1iKk.co1hA, праворуч за https://drzubaidi.com/blog/adenovirus-14-virus-selsema-pembunuh/).

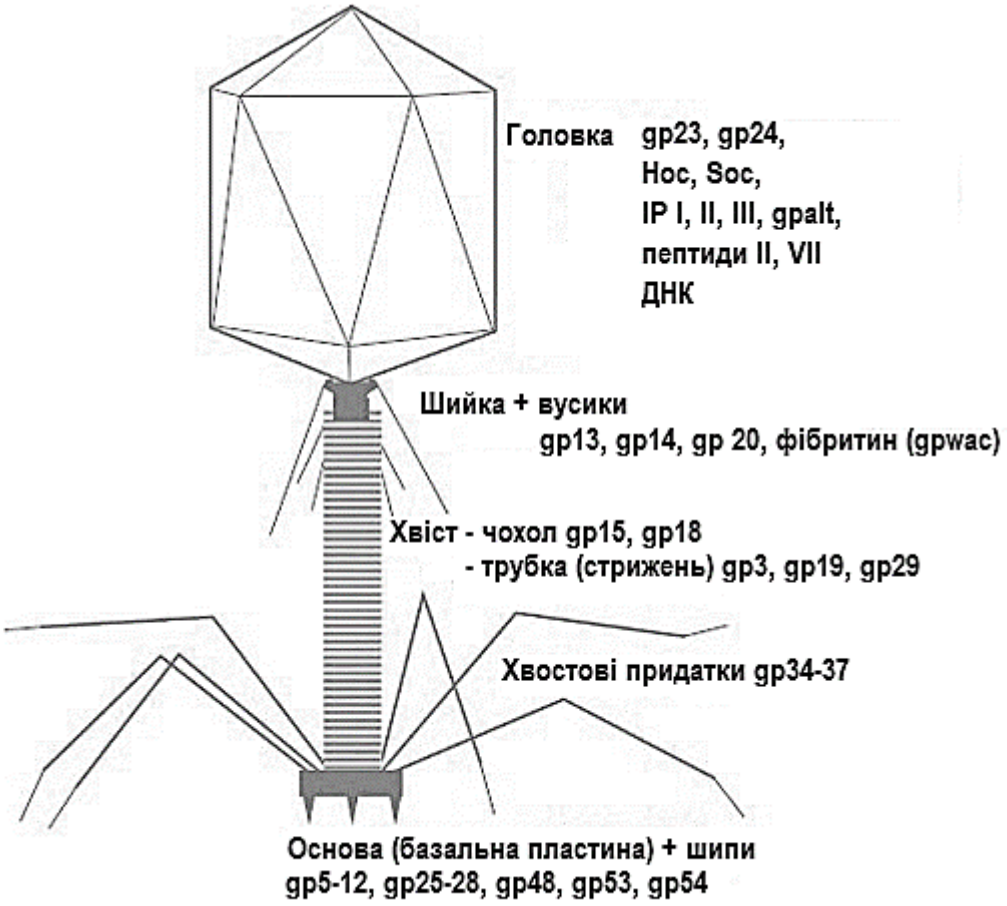
13.1.2. Віруси прокаріот

Існує велика різноманітність фагів з длДНК, з яких особливо добре охарактеризовані фаги T і λ. T2, T4 і T6 належать до родини *Myoviridae* (від грецького mys, myos, «м'яз», що стосується фагів зі скоротливими хвостами), T1 і T5 разом з λ є членами *Siphoviridae* (від грецького siphon, «трубка», що стосується фагів з довгими, гнучкими, не скоротливими хвостами), а T3 і T7 належать до *Podoviridae* (від грецького pous, podos, «нога», що стосується фагів з короткими, не скоротливими хвостами). Нижче як приклад ми розглянемо особливості реплікації добре вивченого фага *Escherichia virus T4*.

T4, T-парний фаг, має складну морфологію, що складається з подовженої ікосаедричної головки з низкою різних типів білка, включаючи два додаткових білка, Hoc (***h***ighly antigenic ***o***uter ***c***apsid protein) і Soc (***s***mall ***o***uter ***c***apsid protein), скоротливий хвіст, основу (базальну пластину), хвостові придатки та шпильки (Мал. 13.8). Зв'язування Soc стабілізує капсид і може пояснити фенотип стійкості до осмотичного шоку.

Геном T4 довжиною приблизно 168,9 т.п.н. кодує близько 300 генів, які організовані в функціональні кластери. ДНК є надлишковою на кінцях (послідовність приблизно 1,6 т.п.н. на одному кінці безпосередньо повторюється на іншому), що пов'язано з особливостями реплікації та пакування у головку. Лінійна ДНК легко перебудовується у кільцеву форму. Геном багатий на АТ і містить модифіковані нуклеотиди у вигляді 5-гідрокси-метилцитозину, а не цитозину, які захищають ДНК фага від багатьох систем рестрикції хазяїна та від кодованих фагом нуклеаз, що руйнують ДНК хазяїна, яка містить цитозин. Більше того, більшість гідроксиметильних груп гликозилуються після синтезу ДНК, щоб протидіяти системам Mcr (modified cytosine restriction) хазяїна, до яких сприйнятливі залишки гідроксиметил-цитозину. Геном містить близько 300 ймовірних генів, які різняться за часом їх експресії, з трьома різними типами промоторів: ранні (Pe), середні (Pm) і пізні (Pl). Ранні та середні гени кодують білки для реплікації ДНК та регуляції експресії пізніх генів, які в

свою чергу кодують компоненти для часток фага, а також білки для лізису клітин бактерій. Гени фага містять інтрони, аналогічно генам еукаріот.

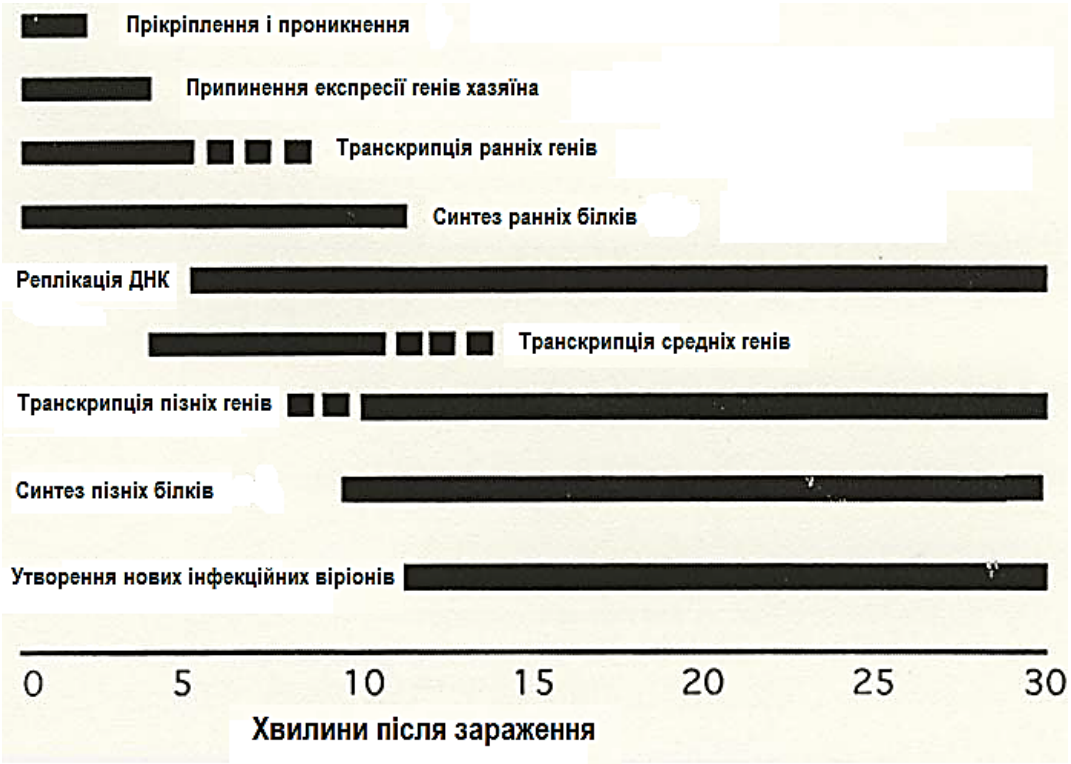


Мал. 13.8. *Схематичне зображення віріона фага T4. Віріон завдовжки до 200 нм, завширшки до 90 нм. Капсид містить багатобілкову витягнуту ікосаедричну головку (T=13), відокремлену від хвоста шийкою. Хвіст складається з двох спіральних композицій білка: одне утворює чохол, інше — трубку (стрижень), з комірцем і основою зі шпильками і хвостовими придатками. Шипи на базальній пластині прикріплюють фаг до клітини-господаря. Білки позначені відповідною назвою або номером гена, який їх кодує (gene product, gp). Лінійна длДНК щільно упакована у вигляді концентричних шарів у головці (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Цикл репродукції фага T4 в клітинах *Escherichia coli* швидкий і при 37° С завершується виходом з клітини нових віріонів приблизно через 30 хвилин після зараження. Хронологія головних подій схематично показана на Мал. 13.9.

Коли T4 зустрічається з клітиною *E. coli*, відбувається *прикріплення* фага до клітини і вхід його геному у бактерію. Один або кілька хвостових придатків зворотно зв'язуються з рецепторами на поверхні хазяїна (або диглікозильний залишок ліпополісахариду, або протеїн OmpC на зовнішній поверхні зовнішньої мембрани). Зворотне зв'язування довгих хвостових волокон дозволяє T4 «гуляти» по поверхні хазяїна і в кінцевому підсумку наближати базальну пластину до поверхні клітини. Ця подія дозволяє коротким хвостовим придаткам звільнитися зі свого положення і необоротно зв'язатися з поверхнею господаря. Це незворотне зв'язування створює напругу, яка передається на закриту конформацію гексагональної базальної пластини і змушує її розширюватися до відкритої зіркової конформації. Це викликає конформаційну зміну gp18, яка поширюється за принципом «падіння доміно», що призводить до скорочення хвостового чохла. Чохол стискається приблизно на 37% своєї

довжини і тягне за собою базальну пластину. Оскільки вона прикріплена до поверхні клітини, цей процес вводить порожнистий стрижень хвоста у бактеріальну клітину (див. Мал. 4.11). Стрижень проникає крізь клітинну стінку за допомогою gp5, лізоциму, який руйнує периплазматичний пептидоглікановий шар, і досягає зовнішньої поверхні цитоплазматичної мембрани. Через поки що невідомий процес у цитоплазматичній мембрані формується канал, а потім ДНК Т4 вивільняється в цитоплазму господаря через хвостовий стрижень. Для перенесення ДНК Т4 в цитоплазму необхідний трансмембранний електрохімічний потенціал. Перенесення ДНК відбувається лише тоді, коли стрижень взаємодіє з цитоплазматичною мембраною бактерії. Як уже зазначалося, віріон містить лінійну длДНК, але після потрапляння у клітину вона замикається в коло, як і ДНК бактерії.



Мал. 13.8. *Хронологія головних подій циклу реплікації фага Т4.*

Введення ДНК Т4 у хазяїна запускає літичний цикл реплікації Т4. Майже відразу після інфікування транскрипція та трансляція хазяїна блокуються. Це зокрема обумовлено дією вірусного білка gpAlt, який потрапляє в клітину бактерії разом з ДНК вірусу. Цей білок є АДФ-рибозилтрансферазою, яка АДФ-рибозилює одну з двох альфа-субодиниць РНК-полімерази хазяїна. Це призводить до того, що РНК-полімераза перестає розпізнавати промотори на ДНК хазяїна і переважно зв'язується з промоторами ранніх генів ДНК фага.

При транскрипції використовуються РНК-полімерази хазяїна. Ранні гени фага транскрибуються за участі факторів транскрипції (сігма-факторів) хазяїна, але для транскрипції середніх і пізніх генів вірус кодує власні сигма-фактори і інші білки, які активують транскрипцію з середніх і пізніх промоторів і блокують транскрипцію ранніх промоторів.

Низка ранніх і середніх білків беруть участь у припиненні метаболізму господаря, зокрема низка нуклеаз, які руйнують ДНК хазяїна до мононуклеотидів. Як було вже зазначено, геномна ДНК Т4 містить глюкозилований гідроксиметилцитозин замість цитозину, що дозволяє нуклеазам Т4 розрізняти геномну ДНК Т4 і геномну ДНК хазяїна. Мононуклеотидів,

отриманих в результаті деградації ДНК хазяїна, достатньо лише для синтезу близько двадцяти еквівалентів геному Т4. Решта дезоксирибонуклеотидів, необхідних для синтезу ДНК Т4, синтезуються *de novo* ферментами фага, які також є продуктами ранніх генів.

Після створення машинерії реплікації геному Т4 починається реплікація ДНК. У цей час транскрипція перемикається в «пізній» режим. Виробляються всі пізні генні продукти, включаючи білки, які беруть участь у морфогенезі та лізисі хазяїна для вивільнення потомства фага.

Що досить незвично для фагів, Т4 кодує всі необхідні білки реплікації власного геному, а також ферменти ефективної системи репарації, які забезпечує виправлення помилок реплікації. До речі, завдяки системі репарації Т4 успішно протистоїть дії противірусній CRISPR/Cas системі бактерії (розділ 6.4). Цей механізм захисту, що каталізується кодованою фагом рекомбіназою UvsX, об'єднує дуже короткі ділянки ідентичної послідовності (мінігомологічні сайти), лише 3 або 4 нуклеотиди, у фланкуючих областях сайту розщеплення ДНК, що дозволяє реплікацію, репарацію та зшивання геномних фрагментів.

Рекомбінація ДНК відбувається за механізмом кільця, що котиться. Утворюються довгі конкатемери, потім ДНК пакується в готові головки. Пакування залежить від розміру головки та супроводжується структурною зміною прокапсида. Хвіст і базальна пластинка збираються окремо. Головки прикріплюються до хвостів, а хвостові відростки додаються останніми для отримання зрілих фагів потомства. Після лізису бактеріальної клітини ферментами вірусу дочірні віріони вивільняються у середовище.

13.2. Віруси з одноланцюговою ДНК (клас 2 за Д. Балтімором)

13.2.1. Віруси людини і тварин

13.2.1.1.Родина *Parvoviridae*

Парвовіруси є одними з найменших відомих вірусів, віріони яких мають діаметри в межах 18–26 нм. Свою назву вони дістали від латинського слова parvus – маленький. Родину розділяють на дві підродини: *Parvovirinae* (віруси хребетних) і *Densovirinae* (віруси безхребетних).

Віріони не мають оболонки, 18–26 нм діаметром. Капсид має ікосаедричну симетрію, побудований з 60 білкових субодиниць, тобто містить мінімальну кількість молекул білка, яка формує ікосаедр. Капсид побудований з 60 варіантів білка VP, які зазвичай кодуються одним геном. Білок VP1 являє собою повну послідовність гена, тоді як одна або кілька менших форм (VP2–5) мають загальну С-кінцеву послідовність, але скорочені N-кінці різної довжини. Зазвичай на капсид припадає 5–10 копій VP1. Точна структура капсиду парвовірусів залишається достеменно невідомою.

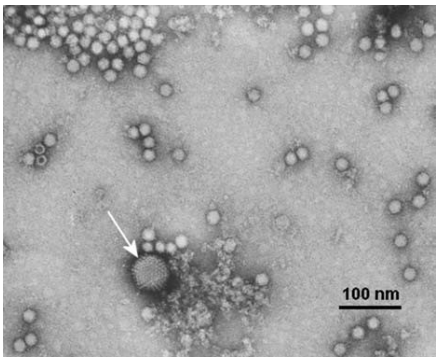
Геноми парвовірусів являють собою одноланцюгову лінійну несегментовану ДНК розміром від 4 до 6 т.п.н., в якій довга кодуюча ділянка фланкована дуже короткими (від 116 до ~ 550 нуклеотидів) неповними паліндромами (інвертовані кінцеві повтори, мал. Мал. 4.46, 13.11), які складаються в динамічні шпильки. Оскільки геном одноланцюговий, ДНК може мати позитивну або негативну полярність. Деякі парвовіруси переважно пакують у капсид геном олДНК негативної полярності, тоді як інші інкапсидують ланцюги будь-якої полярності в еквівалентних або в різних пропорціях. Ці уподобання ланцюгів значною мі-

рою відображають ефективність, з якою олДНК кожної полярності витісняються з проміжної форми дволанцюгової ДНК під час реплікації, що, у свою чергу, відображає відносну ефективність сайтів ori, розташованих на кожному кінці геному.

Віруси підродини *Densovirinae* викликають утворення щільних включень в ядрах заражених клітин. Деякі з них є патогенами тутового шовкопряда і можуть викликати економічні втрати під час виробництва шовку.

Підродина *Parvovirinae* включає цікавий рід *Dependovirus*, члени якого є дефектними і можуть нормально реплікуватися лише за умови зараження клітини спільно з вірусом-помічником. Інші парвовіруси, які не потребують присутності вірусу-помічника, називають автономними парвовірусами.

Перший депендовірус, який спостерігали в електронному мікроскопі, виглядав як забруднення препарату аденовірусу (Мал. 13.9). Це забруднення, проте, виявилося вірусом-сателітом, реплікація якого залежала від аденовірусу. Цей вірус-сателіт дістав назву аденоасоційованого вірусу. У препаратах аденовірусів були також виявлені й інші депендовіруси; виявилось, що депендовірусна інфекція повсюдно поширена.



Мал. 13.9. *Віріон аденовірусу (указаний стрілкою) і депендовіруси (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Депендовіруси виявилися дуже корисним вектором для вбудовування генів в культури клітин для продукування певних білків. Також вони досліджуються як потенційний вектор для вбудовування генів в клітини пацієнтів, що мають генетичні захворювання і пухлини. Цінною перевагою депендовірусів перед іншими системами є те, що вони не викликають ніяких захворювань, на відміну від інших вірусів, які також намагаються використати як вектори, наприклад, ретровірусів.

Коли клітина заражена депендовірусом і відповідним вірусом-помічником, відбувається продуктивна інфекція обох вірусів. Проте клітина може бути заражена депендовірусом у відсутності вірусу-помічника. В цьому випадку геном депендовірусу, після перетворення на форму дволанцюгової ДНК, може інтегруватися в хромосому клітини. Це призводить до латентної інфекції. У клітинах людини депендовірус завжди інтегрується в специфічній ділянці хромосоми 19. Латентна депендовірусна інфекція знайдена у низці клітинних ліній, що походять від людей або мавп. Якщо клітина з латентною інфекцією депендовірусу виявиться зараженою відповідним вірусом-помічником, спостерігається продуктивна інфекція обох вірусів.

Парвовіруси, які не вимагають вірусів-помічників, виявляють в сироватці крові, яку здають здорові донори. Вірус, який був названий по партії крові B19, заражає попередники червоних клітин крові. Багато випадків зараження вірусом B19 не призводять ні до яких

симптомів або ознак захворювання, проте в деяких випадках спостерігаються хвороби, наприклад, інфекційна еритема. Інфекційна еритема – поширене дитяче захворювання під час якого у дітей з'являється така ознака, як «нашльопані щоки» (Мал. 13.10).



Мал. 13.10. Дитина, хвора на інфекційну еритему («нашльопані щоки») (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Інші захворювання, що викликаються вірусом B19, включають:

– гострий артрит;

– апластичена анемія у осіб з хронічною гемолітичною анемією;

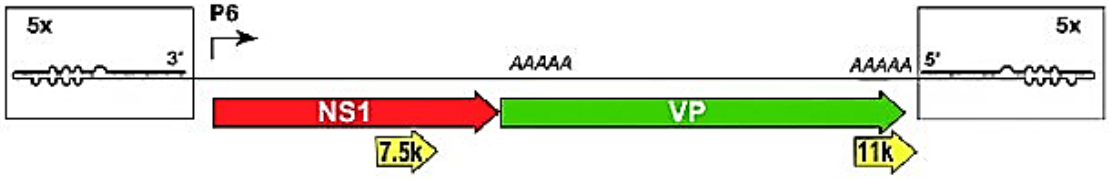
– набряк плоду (інфекція може перенестися від вагітної жінки до плоду і вбити його).

У 2005 р. з використанням методики молекулярного скринінгу для дослідження носоглоткових виділень, у дітей із захворюванням нижніх дихальних шляхів, був відкритий новий парвовірус людини. Цей вірус був віднесений до раніше відомого роду *Bocavirus*.

Цикл репродукції парвовірусу людини B19 (B19V). Парвовірус B19 (B19V) є патогенним для людини і демонструє високий тропізм до клітин-попередників еритроїдних клітин з кісткового мозку та печінки, хоча часто повідомлялося про обмежену інфекцію і інших тканин (зокрема ендотеліальних клітин міокарда та моноцитів). Обмеження реплікації B19V в клітинах еритроїдної лінії частково пояснюється експресією рецептора та корецептора(-ів) на поверхні цих клітин людини і частково залежить від внутрішньоклітинних факторів, необхідних для реплікації вірусу.

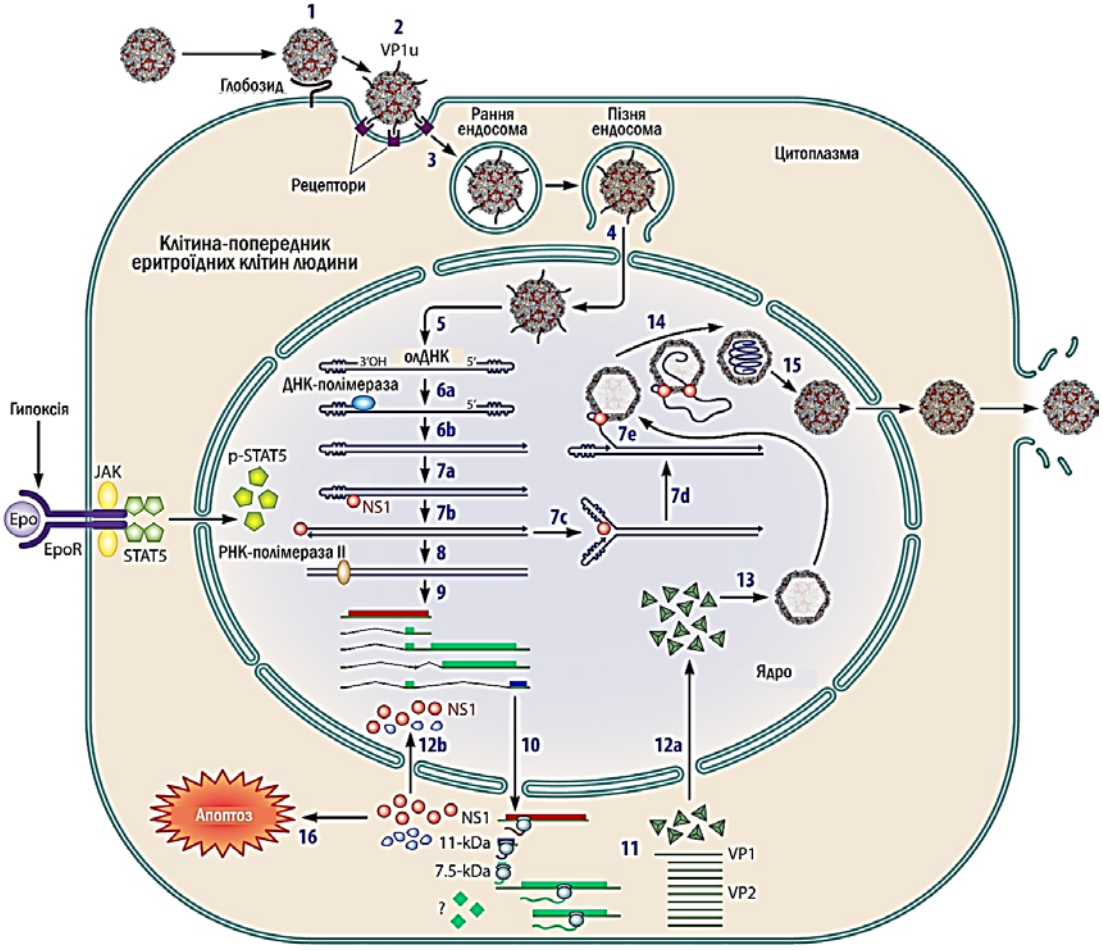
B19V містить лінійний геном одноланцюгової ДНК, який має довжину 5596 нуклеотидів. Центральна область кодування фланкована з обох боків ідентичними інвертованими кінцевими повторами (Мал. 13.11). Окремі віріони містять позитивний або негативний ланцюг ДНК у рівному співвідношенні.

Геном B19V складається з генів великого неструктурного білка (NS1) і генів капсидного білка (VP1/2). Крім того, геном B19V містить два гени, які кодують невеликі неструктурні білки, білок 7,5 кДа в середині і білок 11 кДа на правому кінці. У геномі B19V використовує один промотор P6 для транскрипції однієї пре-мРНК, з якої загалом утворюється 12 зрілих мРНК в результаті альтернативного сплайсингу та поліаденілювання.



Мал. 13.11. Організація геному парвовірусу B19V. Кінцеві шпильки зображені збільшеними відносно області кодування, щоб показати передбачені вторинні структури. ORF позначені стрілками. Основні відкриті рамки зчитування, які кодують білки, показані у вигляді витягнутих прямокутників із стрілками, деякі з них кодують допоміжні білки. Ділянка, що кодує білок-ініціатор реплікації, NS1, затінена червоним кольором, ділянка, що кодує білки капсиду, VP, зеленим, а ті, які є унікальними для допоміжних білків, жовтими (але вони також мають спільні інтрони з NS1, як зазначено). Суцільні кутові стрілки представляють промотори транскрипції, AAAAA вказує на сайти поліаденілювання (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae).

Цикл реплікації B19V схематично показаний на Мал. 13.12.



Мал. 13.12. Схема циклу реплікації парвовірусу людини B19V. Вірус спочатку взаємодіє з антигеном P (глобозидом) (етап 1). Ця взаємодія викликає зміну конформації VP1, який переміщується на поверхню віріона (етап 2). Ділянка VP1u на віріоні зв'язує передбачуваний корецептор поверхні клітини (білок, що взаємодіє з VP1u), який опосередковує проникнення віріона всередину клітини, імовірно, шляхом ендоцитозу (етап 3). Віріони проходять кілька етапів внутрішньоклітинного транспорту в ендосомі і зрештою вивільняються з ендосоми через завдяки мотиву VP1u і потрапляють в ядро (етап 4). У ядрі віріон вивільняє геном олДНК (етап 5). Геном олДНК перетворюється на дволанцюгову ДНК, у якості праймера виступає 3′-кінець лівого інвертованого кінцевого повтору (етап 6), цей процес вимагає наявності клітинної ДНК-полімерази та інших факторів реплікації ДНК. Вірогідно, на дволанцюговій ДНК зразу ж відбувається транскрипція, і далі трансляція з утворенням вірусного білка NS1. Для реплікації вірусної ДНК необхідним є фосфорильований STAT5 (p-STAT5), який активується через шлях Epo/Epo-R/Jak2/STAT5. NS1 розрізає ДНК у специфічному сайті (етап 7a). Ця подія створює новий 3′-кінець, який є праймером для синтезу ДНК, що згодом призводить до проміжного продукту дволанцюгової ДНК (етап 7b). Ця ДНК або йде на нові раунди

синтезу і пакування геномів (етапи 7c, 7d, 7e), або використовується для транскрипції (етап 8) клітинною РНК-полімеразою II з утворенням пре-мРНК, і різні мРНК B19V генеруються шляхом альтернативного сплайсингу пре-мРНК (етап 9) і експортуються в цитоплазму (етап 10). Білки капсиду VP1 і VP2 і неструктурні білки NS1, 11-кДа і 7,5-кДа транслюються в цитоплазмі (етап 11). VP1 і VP2 збираються як тримери (попередники капсидів), які транспортуються в ядро (етап 12a), щоб зібрати порожні капсиди (етап 13). Вірусний геном олДНК, коли доступний порожній капсид, пакується за допомогою передбачуваного механізму пакування, опосередкованого NS1 (етап 14). NS1 транспортується до ядра (етап 12b) і є важливим для реплікації вірусної ДНК. NS1 також індукує зупинку клітинного циклу на фазі G2. Нарешті, індукується апоптоз, у якому важливу роль відіграють як NS1, так і білок 11 кДа (етап 16). Апоптоз звільняє дозрілий віріон із інфікованих клітин через пошкоджену ядерну мембрану (етап 15). Етапи 6, 7 і 12–14 частково гіпотетичні (за J. Qiu et al., 2017).

Первинним рецептором прикріплення вірусу є глобозид (антиген Р еритроцитів). Особи, чиї еритроцити не мають глобозиду, природно стійкі до інфекції B19V. Однак не всі клітини, що експресують Р-антиген, є сприйнятливими до інфікування B19V. Це вказує на те, що антиген Р необхідний, але недостатній для опосередкування інфекції. Зрілі еритроцити людини, незважаючи на експресію Р-антигену, не допускають проникнення вірусу. Як потенціальні корецептори були запропоновані інтегрин α5β1 і білок Ku80, однак остаточного підтвердження така думка не отримала, і корецептор(-и) не є ідентифікованим.

Білком прикріплення до глобозиду є VP2. Прикріплення спричиняє конформаційні зміні, і унікальний N-термінальний домен мінорного білка капсиду VP1 (VP1u), прихований в середині капсиду, експонується на поверхні віріона і, можливо, зв'язується з неідентифікованим корецептором. Домен VP1u абсолютно необхідний для потрапляння віріона в клітину.

Вхід в клітину B19V відбувається шляхом клатрин-залежного ендоцитозу. У цитоплазму віріони потрапляють з пізньої ендосоми, у виході в цитоплазму важливу роль відіграє домен VP1u. Імовірно, це зумовлене тим, що домен VP1u володіє активністю фосфоліпази А2. Надалі по мікротрубочках віріон спрямовується до ядерної пори. Віріони парвовірусів досить малі, щоб проходити через ядерну пору.

Оскільки вірус не кодує власної ДНК-полімерази і залежіть від ферменту хазяїна, він може реплікуватися в попередниках еритроїдних клітин тільки на певних фазах клітинного циклу, а саме в S-фазі. Після потрапляння геному в ядро, одноланцюгова вірусна ДНК зразу ж добудовується до дволанцюгової завдяки самопраймуванню, і після цього імовірно відбувається експресія гена білка NS1. Цей білок виконує множинні функції, і зокрема він необхідний для реплікації ДНК вірусу. B19V індукує зупинку клітинного циклу інфікованих клітин у фазі G2 і використовує клітинні фактори S-фази для реплікації вірусної ДНК.

Реплікація B19V також залежить від еритропоетину (Epo). Цей гормон, що виробляється інтерстиціальними фібробластами нирок людини у відповідь на локальний парціальний тиск кисню, тонко регулює еритропоез. Зв'язування Epo з рецептором еритропоетину (EpoR) производить до активації EpoR, який активує декілька сигнальних шляхів. Для реплікації вірусу важливим є активація кінази Jak2 шляхом автофосфорилювання. Активована Jak2 зокрема активує активатор транскрипції 5A (STAT5A), і фосфорилювання STAT5A є важливим для реплікації B19V. Цікаво, що гіпоксія сприяє реплікації B19V через регуляцію сигнального шляху Epo/Epo-R, посилюючі активацію STAT5A.

Як було зазначено вище, транскрипція вірусного геному починається з єдиного промотора, таким чином що синтезується один попередник матричних РНК. Надалі відбувається

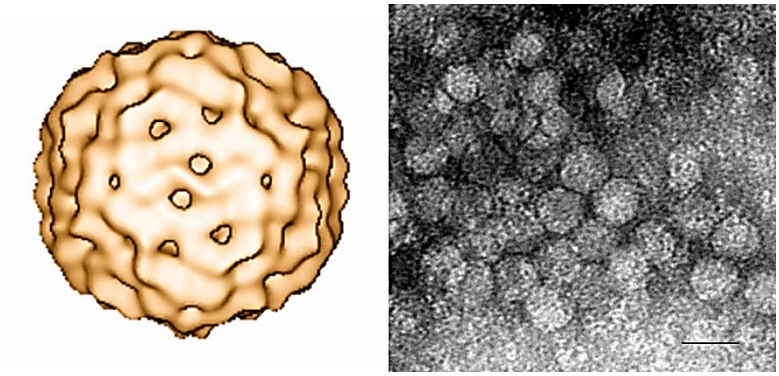
процесінг пре-мРНК, і в результаті альтернативного сплайсингу та поліаденілювання утворюються 12 функціональних мРНК, на яких синтезуються вірусні білки, деякі з яких позначені на Мал. 13.12.

Одночасно напрацьовуються нові вірусні геноми. Як зазначено у підпису до Мал. 13.12, деякі подробиці реплікації є частково гіпотетичними. Після реплікації, геноми пакуються у пусті капсиди з допомогою білка NS1, і в ядрі утворюються нові інфекційні віріони.

Після напрацювання певної кількості нових віріонів, за участі вірусного білка NS1 і деяких інших, в інфікованих клітинах індукується апоптоз, ядерна оболонка і плазматична мембрана розриваються, і віріони вивільняються.

13.2.1.2. Інші віруси людини і тварин з олДНК геномами

Родина Circoviridae. Назва родини «circo» походить від грецького кореня «gyro», що означає кільце або круглий. Це пов'язано з кільцевою формою геному цирковірусів. Віріони містять одну молекулу ковалентно замкненої кільцевої олДНК, розмір якої коливається від 1,7 до 2,1 т.п.н. Морфологія віріонів була досліджена тільки у роду *Circovirus* (Мал. 13.13). Віріони без оболонки, мають ікосаедричну симетрію і складаються з 60 молекул білка (*T*=1), які організовані в 12 пентамерів.



Мал. 13.13. *Цирковірус. (Зліва) 3D-реконструкція цирковірусу свині 2. Запропоновано структурну модель, що містить 60 субодиниць (T=1), розташованих у 12 пентамерних морфологічних одиницях. (Праворуч) Просвітна електронна мікрофотографія цирковірусу 2 свині з негативним забарвленням. Масштабна смужка дорівнює 20 нм (за ICTV ssDNA Viruses Circoviridae).*

Цирковіруси вражають багато видів ссавців і птиць. Заслуговує на згадку цирковірусна інфекція свиней. Хвороба вражає в першу чергу поросят, яких забрали від свиноматки. Вона дуже поширена в свинарських господарствах по всьому світу, а збудник передається від носіїв респіраторним шляхом, із слиною, з фекаліями і іншими виділеннями. Рідше, але все ж можливе, зараження поросят від свиноматки. Вважається, що в даний час не існує свинарських господарств, вільних від цирковірусної інфекції. Але в одних випадках хвороба призводить до загибелі до 70% стада, а в інших - не проявляється взагалі або дає про себе знати одиничними випадками.

Після потрапляння в організм поросяти вірус заражає макрофаги, пригнічуючи імунітет. Потім він починає активно розмножуватися в клітинах лімфоїдної тканини, на слизовій носа і легенів, в кишківнику, нирках, печінці і в підшлунковій залозі. Інкубаційний період захворювання триває 3-4 тижні. Хворі поросята відстають в рості, виснажені, мають пригнічений стан, некроз кінчиків вух, жовтушність, анемію тощо. В окремих випадках спостерігається тремор і парез кінцівок, поросята можуть раптово загинути, і тоді наявність цирковірусної інфекції можна підтвердити тільки лабораторно, зробивши розтин.

Найчастіше на тлі зниженого імунітету у тварин розвиваються вторинні інфекції.

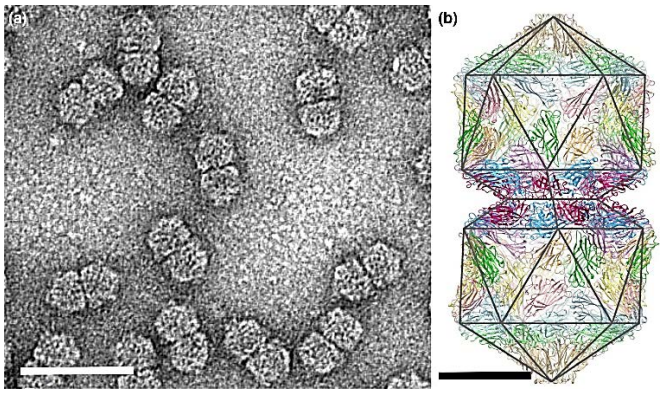
13.2.2. Віруси рослин

Більшість одноланцюгових ДНК-вірусів рослин належать до родини *Geminiviridae*, декілька до неспорідненої родини *Nanoviridae*.

13.2.2.1. Родина *Geminiviridae*

Родина *Geminiviridae* — це родина невеликих вірусів без оболонки, геноми яких містять одну або дві одноланцюгові кільцеві ДНК розміром 2,5–5,2 т.п.н. Вони викликають економічно важливі захворювання в більшості тропічних і субтропічних регіонів світу. Гемінівіруси вражають дводольні та однодольні рослини і передаються різними комахами з чотирьох родин рівнокрилих (білокрилки, листоїди, попелиці та щитівки). З деякими гемінівірусами асоційовані сателітні ДНК (див. розд. 4.8).

Гемінівіруси мають унікальну морфологію віріонів у вигляді здвоєних (спарованих) ікосаедрів (Мал. 13.14).

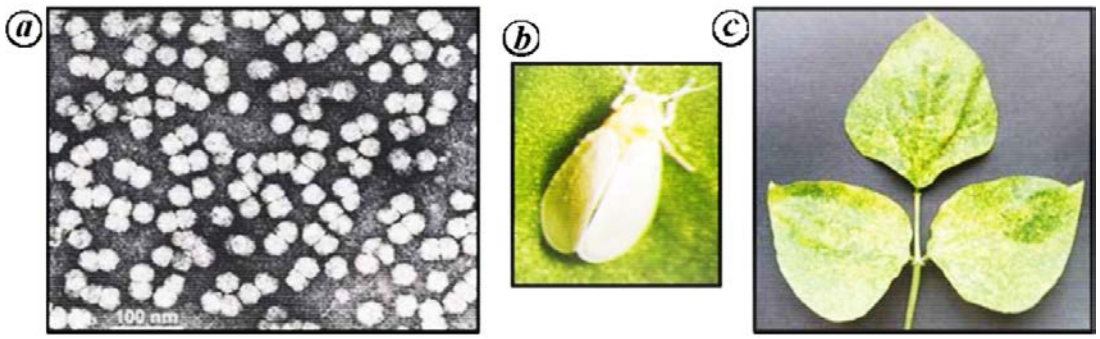


Мал. 13.14. *Віріони Geminiviridae. (a) Очищені частинки вірусу смугастості кукурудзи, пофарбовані уранілацетатом, демонструють типові подвійні квазіізометричні капсиди, які мають розміри 22 × 38 нм і складаються з двох неповних ікосаедрів (T=1), що містять 110 субодиниць капсидного білка, організованих у вигляді 22 пентамерних капсомерів. Інших білків у капсиді не виявлено. Смужка дорівнює 50 нм. (b) Повна атомна модель для всіх 110 білкових субодиниць у капсиді вірусу пожовтіння жилок довгоцвіту, що демонструє симетрію віріону і показує, що N-кінець капсидного білка приймає три різні конформації, необхідні для побудови інтерфейсу між половинками віріону. Смужка дорівнює 10 нм (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021).*

Здвоєні віріони містять одну копію кільцевої ДНК. Отже, для вірусів, геном яких складається з двох сегментів, для інфікування необхідні два віріони, що містять різні компоненти геному. Сателітні олДНК, якщо присутні, також інкапсульовані у капсид.

До захворювань рослин, пов’язаних із цією вірусів, належать мозаїки, пожовтіння, смугастості, відставання в рості і зниження врожайності, яке може бути дуже значним.

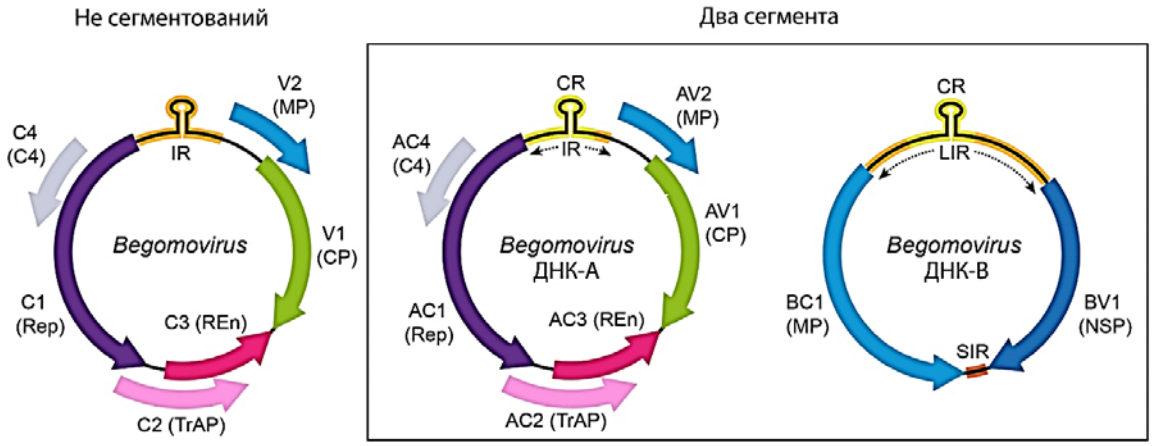
Гемінівіруси, що мають найбільше економічне значення та набули значного географічного поширення, належать до роду *Begomovirus*. Бегомовіруси інфікують тільки дводольні рослини й передаються білокрилками — *Bemisia tabaci*. Наразі тютюнову білокрилку вважають однією з найсерйозніших загроз для сільськогосподарських культур у всьому світі, переважно через велику кількість вірусів, які ця комаха передає. Бегомовіруси зазвичай викликають тяжкі симптоми у своїх господарів, включаючи жовту мозаїку, золотисту мозаїку та скручування листя (Мал. 13.15). Для бегомовірусу жовтого скручування листя томатів було продемонстровано, що окрім рослин-господарів, його реплікація також відбувається в слинних залозах комах-переносників. З бегомовірусами пов’язані три класи сателітних кільцевих ДНК: альфа-сателіти, бета-сателіти та дельта-сателіти.



Мал. 13.15. Будова, переносник і симптоматика бегомовірусної інфекції. a, Електронна мікрофотографія, яка демонструє подвійну структуру віріонів бегомовірусів. b, Білокрилка (Bemisia tabaci) є переносником бегомовірусів. c, Листя маша (квасолі золотистої) з типовими симптом жовтої мозаїки (за https://www.semanticscholar.org/paper/Begomovirus-DNA-replication-and-pathogenicity-Yadava-Suyal/c37482cf147003ed21d1e0447284156041f6fb23).

Особливості реплікації вірусів роду Begomovirus. *Геном* може складатися з двох сегментів (дві кільцеві молекули олДНК, ДНК-А і ДНК-В, кожна приблизно 2,6 т.п.н.), або бути не сегментованим (одна кільцева молекула олДНК розміром приблизно 2,7 т.п.н.) (Мал. 13.16).

Два сегмента ДНК мають однакову ділянку приблизно 200 нуклеотидів (загальна область), яка включає сайт початку реплікації. ДНК-А кодує капсидний білок (ORF AV1, CP), передбачуваний транспортний білок (ORF AV2, MP, відсутній у бегомовірусів Нового Світу), білок, пов'язаний з реплікацією (ORF AC1, Rep), активатор транскрипції (ORF AC2, TrAP), підсилювач реплікації (ORF AC3, REn) і білок C4 (ORF AC4, C4). ДНК-В кодує ядерний човниковий білок (ORF BV1, NSP) і транспортний білок (ORF BC1, MP). Геноми не сегментованих бегомовірусів нагадують компонент ДНК-А бегомовірусів з геномами з двох сегментів.



Мал. 13.16. Організація геному бегомовірусів. Показані відкриті рамки зчитування (ORF) ([A]V1, [A]V2, [A]C1, [A]C2, [A]C3, [A]C4, BV1 і BC1) та їхні білкові продукти (CP, капсидний білок; MP, транспортний білок; Rep, білок, пов'язаний з реплікацією; TrAP, білок-активатор транскрипції; REn, білок-підсилювач реплікації; C4, білок C4; NSP, білок ядерний човник.. IR, міжгенна область; LIR, довга міжгенна область; SIR, коротка міжгенна область; CR, загальний регіон. Шпилька, яка включає сайт початку реплікації, вказана в IR/LIR (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae).

Як повинно бути зрозумілим з попередніх розділів цього підручника, віріон бегомовірусів не прикріплюється до поверхні клітини – він вводиться безпосередньо у цитоплазму переносником. Після первинного потрапляння вірусу в клітину-господаря, крім білка капсиду CP, інші вірусні білки відсутні. Таким чином, рух до ядра має повністю залежати від

СР та використання транспортних механізмів господаря. Неясно, чи вірус, інокульований вектором, рухається до ядра як віріон, чи він декапсидується і рухається як нуклеопротеїновий комплекс. СР бере участь на цій стадії транспортування, ймовірно, через взаємодію з транспортною мережею хазяїна. Взаємодія вірусної ДНК, покритої капсидним білком, з імпортином α або каріоферином α1 полегшує надходження в ядро. Питання, чи потрапляє уся вірусна частинка в ядро, залишається без відповіді.

Бегомовіруси (як і гемінівіруси взагалі) не кодують власну ДНК-полімеразу і залежать виключно від полімераз хазяїна та асоційованих факторів для реплікації вірусної ДНК. Але ці віруси інфікують диференційовані клітини, коли клітинний цикл зупиняється. Більше того, особливістю реплікації гемінівірусів є те, що вона не відбувається в меристемі рослини, де здійснюється активна реплікація ДНК та поділ рослинної клітини. Тому віруси кодують білки, які переводять клітину рослин у S-фазу клітинного циклу, як роблять наприклад папіломавіруси тварин (розділ 13.1.1.1). Але при первинному інфікуванні ядра хазяїна туди потрапляє тільки *одноланцюгова* ДНК, не придатна для транскрипції, і капсидний білок. Яким чином відбувається експресія вірусних генів?

Після первинного потрапляння несегментованої вірусної олДНК або двох сегментів вірусної олДНК (ДНК-А і ДНК-В) за участі факторів хазяїна відбувається особлива і не зовсім добре зрозуміла *суперспіралізація* (supercoiled) цієї олДНК таким чином, що утворюється дволанцюгова ДНК, придатна для транскрипції, і відбувається транскрипція і трансляція зокрема білків Rep і REn.

Білки Rep і REn взаємодіють з подібним ретинобластомі білком рослин і перенаправляють клітинний цикл через E2F-залежну транскрипцію регуляторів клітинного циклу (аналогічно тому, як показано на Мал. 8.3). Ці вірусні білки рекрутують ДНК-полімерази рослин і взаємодіють з декількома факторами хазяїна. Білки AC4/C4 вірусів також маніпулюють різними регуляторами диференціації клітин, що призводить до ектопічного (ектопія, дав.-грец. ἔκτοπος — зміщений, неправильний) поділу і розтягнення інфікованих клітин. Крім того, білки AC4/C4 або запобігають дії регуляторів клітинного циклу, або опосередковують їх деградацію і важливі для створення сприятливого середовища для реплікації вірусу.

Після появи ДНК-полімерази і інших факторів реплікації, одноланцюгові геноми вірусів добудовуються до дволанцюгових, на яких відбувається транскрипція білків вірусів. Реплікація вірусної ДНК здійснюється переважно механізмом кільця, що котиться. Нові вірусні геноми або пакуються у віріони, можуть потрапляти в переносника і заражати нові рослини, або у комплексі з транспортними білками і білками капсиду переміщуються до суміжних клітин через плазмодесми, або системно поширюються по рослині по флоемі.

Заслуговує на згадку, що віруси кодують також білки, які пригнічують у рослин імунну відповідь (і PTI, і ETI, розділ 6.3). Зокрема, білок V2 блокує як сайленсинг вірусних РНК, так і запрограмовану загибель клітини рослини (надчутливу відповідь). Молекулярний механізм такої активності в цьому підручнику ми розглядати не будемо.

13.2.2.2. Родина *Nanoviridae*

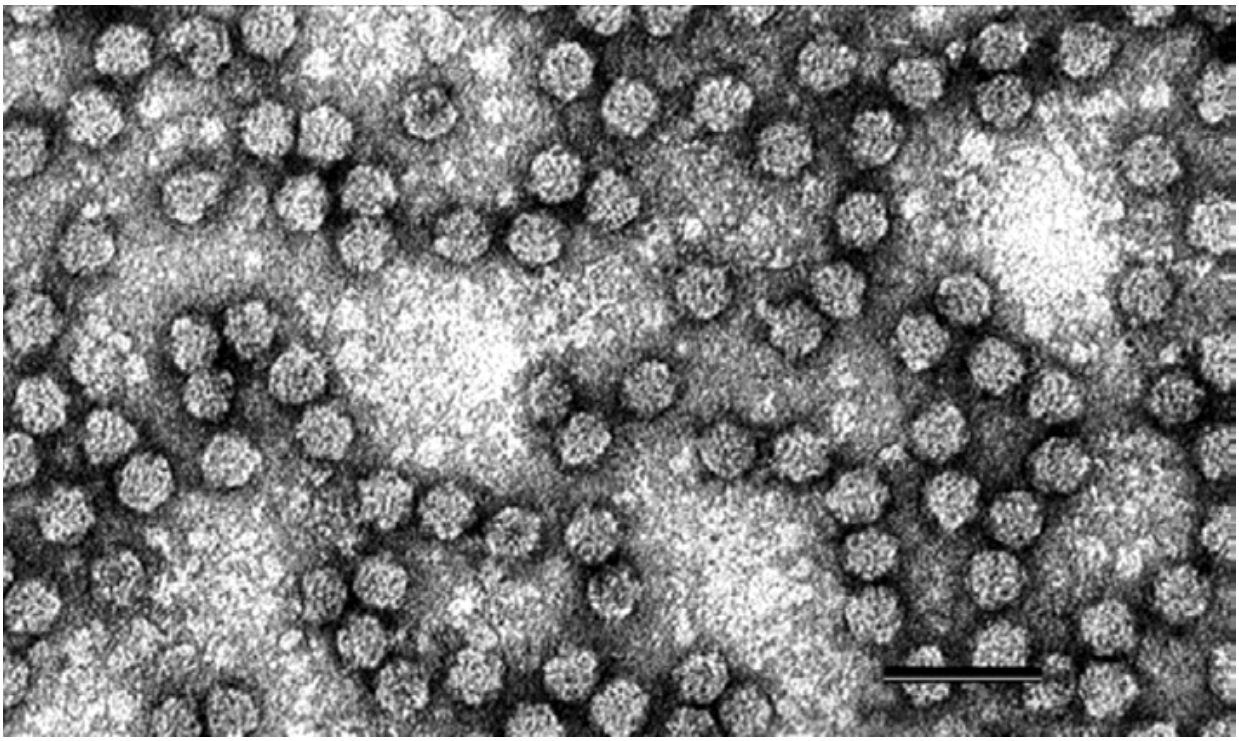
Назва родини походить від давньогрецького слова νᾶνος (нанос), що означає «карлик», у зв'язку з маленьким розміром віріонів, а також затримкою росту, яку ці віруси викликають

у інфікованих рослин. Родина *Nanoviridae* включає віруси рослин із сегментованим кільцевим, одноланцюговим геномом ДНК, якій складається з 6 сегментів (рід *Babuvirus*) або 8 сегментів (рід *Nanovirus*).

Маленькі ізометричні віріони містять один сегмент геному кожен та передаються попелицями циркулятивним персистентним способом, тобто без реплікації у попелицях. Рослинами-господарями вірусів є дводольні, переважно бобові (рід *Nanovirus*), і однодольні, переважно з порядку *Zingiberales* (рід *Babuvirus*).

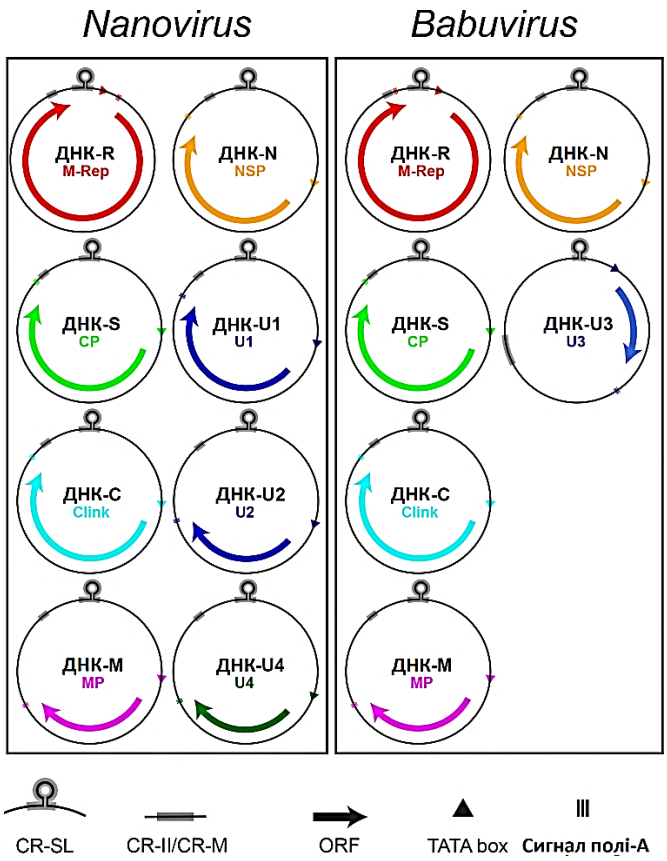
Віріони без оболонки мають діаметр 17–19 нм і, імовірно, ікосаедричну симетрію з T=1, складаються з 60 субодиниць білка капсиду. Віріони можуть мати кутасту або шестикутну форму, якщо дивитися вздовж їх осі симетрії 3-го порядку (Мал. 13.16).

Організація геному вірусів родини своєрідна. Геноми представників роду нановірус складаються з восьми незалежно інкапсульованих кільцевих одноланцюгових сегментів ДНК, кожен розміром 0,9–1,0 т.п.н. Бабувіруси мають шість таких компонентів, кожен розміром 1,0–1,1 kb (Мал. 13.17). Віруси двох родів мають спільний набір із п’яти гомологічних компонентів ДНК, які позначають ДНК-R (кодує M-Rep), ДНК-S (капсидний білок), ДНК-C (Clink), ДНК-M (транспортний білок) і ДНК-N (білок ядерний човник). Також була ідентифікована ДНК, що кодує білки невідомої функції, у нановірусів (DNA-U1, DNA-U2 і DNA-U4) і бабувірусів (DNA-U3).



Мал. 13.16. *Електронна мікрофотографія віріонів вірусу некротичного пожовтіння кінської квасолі. Смужка дорівнює 50 нм (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Nanoviridae).*

З багатьма ізолятами вірусів обох родів пов’язані незалежно інкапсульовані молекули альфа-сателітів розміром 1,0–1,1 т.п.н., які автономно реплікуються.



Мал. 13.17. Організація геному вірусів родини Nanoviridae. Кольцові ДНК (0,9–1,1 т.п.н.) позначені їхньою назвою та назвою кодованого білка, ORF позначено стрілками. Також показані позиції загальної області стовбурової петлі (CR-SL) і другої спільної області (CR-II/CR-M) (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Nanoviridae).

Як передбачають, функції білків наступні:

M-Rep – білок-ініціатор реплікації для всіх геномних ДНК;

CP – структурний білок, білок капсиду:

Clink – регулятор клітинного циклу;

MP – транспортний білок, опосередковуючий переміщення між клітинами через плазмодесми, також є супресором сайленсингу РНК;

NSP – передбачуваний білок ядерний човник, допоміжний компонент для передавання вірусу попелицями.

Усі геномні ДНК нановірусів мають подібну структурну організацію, яка містить консервативні інвертовані повторювані послідовності, потенційно утворюючи структуру стовбурової петлі в загальній петлі «регіон-стебло» (CR-SL), яка також містить три короткі повторювані послідовності (ітерони), які, як припускають, є сайтами зв'язування для M-Rep. Друга загальна область, консервативна в геномах вірусів, називається CR-M (бабувіруси) або CR-II (нановіруси). Кожен сегмент ДНК кодує окремий білок (за винятком ДНК-R вірусу пучкової верхівки банана, який має другу меншу ORF, розташовану всередині більшої ORF).

Вважається, що реплікація вірусу відбувається в ядрі за механізмом кільця, що котиться з синтезом вірусної дволанцюгової ДНК за допомогою ДНК-полімерази господаря та мРНК, транскрибованої РНК-полімеразою господаря. Білок M-Rep має активність ендонуклеази і нуклеотидтрансферази, і вважається, що він ініціює реплікації всіх геномних сегментів ДНК нановірусів.

13.2.3. Віруси прокаріот

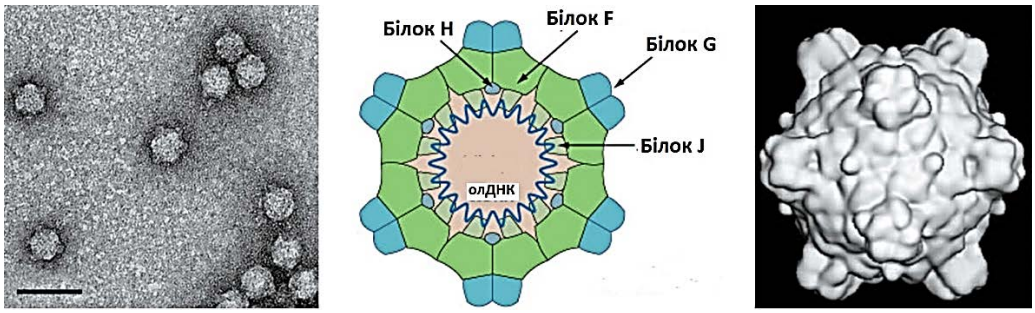
Існує дві групи фагів з олДНК: ікосаедричні та ниткоподібні.

13.2.3.1. Родина *Microviridae*

Ікосаедричні фаги без оболонки з олДНК-геномом належать до родини *Microviridae* (від грецького micros — «маленький»). У цих фагів вперше було виявлене перекривання генів і реплікація ДНК механізмом кільця, що котиться. Фаги цієї родини інфікують грамнегативні бактерії або облігатних внутрішньоклітинних паразитів без клітинної стінки, таких як хламідії, спіроплазми і молікути (мікоплазми).

Найбільш вивченим у родині *Microviridae* є фаг φX174, особливості якого ми й розглянемо.

Віріони мають ікосаедричну симетрію (T=1) і 12 білкових виростів (спайків). Структура віріонів наведена на Мал. 13.18.



Мал. 13.18. *Віріони бактеріофага φX174. Зліва направо: електронна мікрофотографія, схема будови і реконструкція віріона. Смужка дорівнює 50 нм. Діаметр віріонів 22–33 нм залежно від орієнтації, вибраної для вимірювання. Основу капсида складає капсидний білок F. Білкові вирости в кожній з 12 вершин ікосаедра складаються з пентамерів білка G (усього 60 молекул цього білка на капсид). Всередині капсида розташовані 60 молекул білка J, які зв'язані з геномною ДНК. Структурний білок H також знаходиться всередині капсида під кожним з 12 виступів. Вважають, що частина молекул білка H знаходиться на поверхні віріона у асоціації з білком G. Ілюстрації взяті з загальнодоступних джерел Інтернету.*

Геном фага φX174 являє собою кільцеву молекулу олДНК з 5386 нуклеотидів, що кодує одинадцять білків. Це був перший повністю секвенований геном ДНК-геномних вірусів. Організація геному схематично показана на мал. 13.19.



Мал. 13.19. *Організація геному бактеріофага φX174. Кільцевий геном показаний у розгорнутому вигляді. Літерами позначені гени, які кодують відповідні білки фага. Усі гени транскрибуються в одному напрямку Обговорення див. у тексті (за ICTV 9th Report ssDNA Viruses Microviridae)*

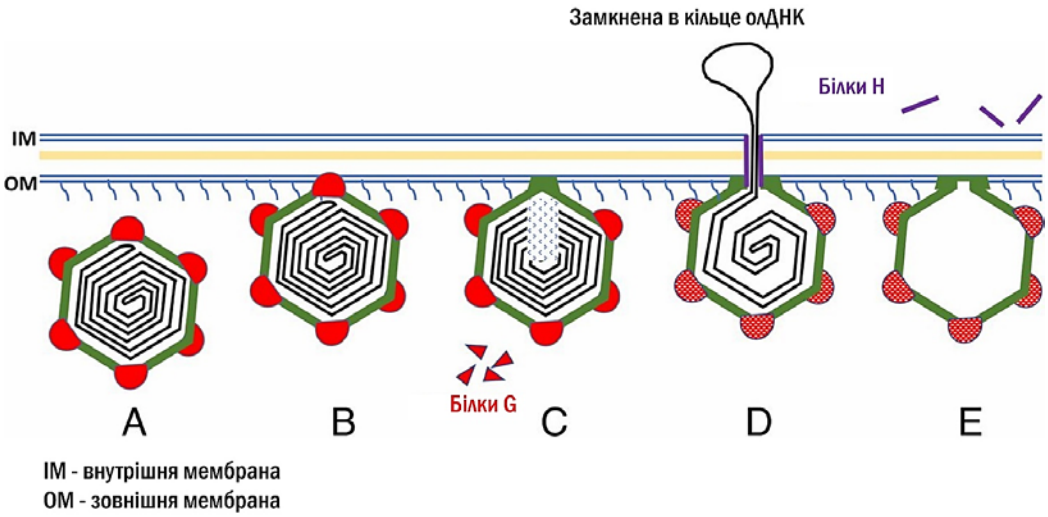
Гени фага щільно згруповані і розділені невеликими некодуючими послідовностями. Саме для цього фага було показано, що у вірусів довжина геному може бути менша, ніж потрібно для кодування усіх білків, якби кожна ділянка геному кодувала тільки один білок. Інформаційна ємність геному підвищується шляхом широкого використання генів, що перекриваються, трансляції в альтернативних рамках зчитування або використання різних стартових кодонів. Наприклад, ген *A* містить внутрішній сайт ініціації трансляції для кодування білка A*, який відповідає С-кінцевій області білка A; *B* закодовано в *A* в іншій рамці зчитування; *K* знаходиться в кінці гена *A* і перекриває ген *C* і транслюється в іншій рамці зчитування відносно *A* і *C*; *E* повністю знаходиться в *D*, але в іншій рамці зчитування; кодон

термінації для *D* перекриває кодон ініціації для *J* (Мал. 13.19). Усі гени транскрибуються в одному напрямку.

Фаг φX174 розпізнає рецепторний ліпополісахарид у зовнішній мембрані штамів Enterobacteriaceae, таких як *E. coli* та *Salmonella typhimurium*, за допомогою білків G і H, з яких будуються вирости на поверхні віріона. Деякі дані вказують, що у процесі прикріплення може приймати участь ще невідомий рецептор бактерій. Після прикріплення, згідно з запропонованою моделлю, молекули білка G дисоціюють, а білок H утворює трубку, через яку ДНК фага потрапляє в клітину-господаря (Мал. 13.20), хоча яким саме чином переміщується ДНК і якими силами це переміщення спрямовується, залишається не зовсім зрозумілим.

Усередині клітини бактерії реплікація геному φX174 відбувається в три етапи та включає дволанцюговий проміжний продукт. Спочатку вірусна олДНК перетворюється на длДНК ферментами хазяїна. Надалі відбувається транскрипція і трансляція білків, кодованих фагом. Реплікація длДНК відбувається механізмом кільця, що котиться і потребує кодованого фагом білка A. Третій етап - асиметрична реплікація дочірніх геномів олДНК.

Трансляція триває доти, доки не буде синтезовано достатню кількість структурних білків, які збираються в порожні частинки-попередники капсидів. Морфогенез віріонів опосередковується каркасними білками (D і B), які тимчасово асоціюються з білками капсиду та індукують конформаційні перемикання, направляючі процес збирання. Утворюється прокапсид, причому D утворює зовнішню оболонку, а B займає внутрішнє розташування. Надалі захоплюються ланцюги вірусної олДНК, і упаковуються разом з основним білком J (який нейтралізує негативно заряджений геном). J-протеїн зв'язується як з ДНК, так і з внутрішньою поверхнею капсиду, витісняючи білок B і утворюючи провіріон. Видалення білка D дозволяє утворити зрілі інфекційні віріони. Віріони накопичуються в цитоплазмі та вивільняються шляхом лізису клітин. Це вимагає експресії вірусного гена *E*, продукт якого стимулює виробництво ендолізинів бактерії.

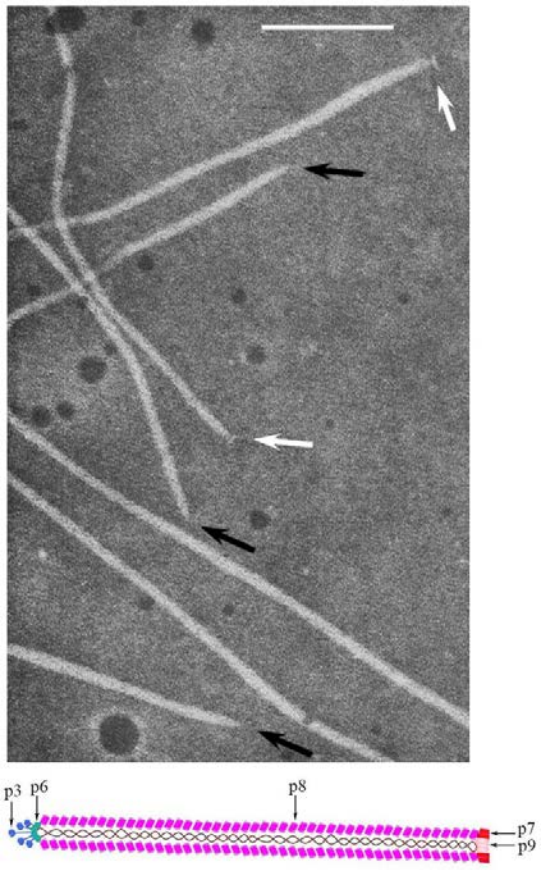


Мал. 13.20. *Запропонована модель для ін'єкції ДНК фага φX174 в клітину бактерії. (A і B) Фаг розпізнає свого хазяїна, який несе на поверхні певний ліпополісахарид, гіпотетично з допомогою одного із виростів, утворених білком G (червоний). (C) Взаємодія дестабілізує вміст G і викликає його дисоціацію, так що взаємодія з клітинною стінкою господаря підтримується білком F. (D) Дисоціація G-білків викликає наступні конформаційні зміни в F-білках (зелений) і H-білках (фіолетовий). Білок F утворює отвір в капсиді, а білок H трубку, і разом вони співпрацюють у транслокації геному (чорний) через клітинну стінку господаря. (E) Отвір, який використовує ДНК, залишається відкритим після входу ДНК в клітину (за Sun Y. et al., 2017).*

13.2.3.2. Родина *Inoviridae*

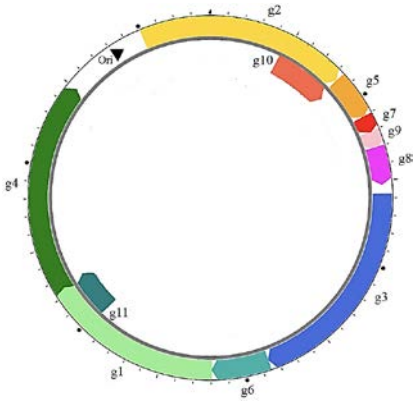
Ниткоподібні фаги з геномами олДНК належать до родини *Inoviridae* (грецьке ina, «волокно, нитка»). Хазяїнами для фагів, що належать до родини *Inoviridae*, є грамнегативні бактерії, і до цього часу були описані фаги, що інфікують роди *Escherichia, Salmonella, Pseudomonas, Xanthomonas, Stenotrophomonas, Vibrio* та *Ralstonia*. Рецепторами для деяких фагів є F-ворсинки (кон'югативні пілі), кодованими F-плазмідами, які можуть бути передані шляхом латерального переносу генів новим штамам бактерій. Інші типи ворсинок також можуть використовуватися як рецептори.

Віріони представників родини *Inoviridae* характеризуються відносно простою морфологією. Їх білкова оболонка спірально організована навколо позитивної одноланцюгової кільцевої ДНК, і віріони являють собою довгі гнучкі нитки без оболонки (Мал. 13.21). Для представників найбільш вивченого виду, вірусу M13, віріони побудовані з основного білка оболонки (CoaB; p8), присутнього в 2700 копіях, і чотирьох додаткових білків, присутніх лише у п'яти примірниках кожен: p7 і p9 на тупому кінці та p3 і p6 на заокругленому кінці.



Мал. 13.21. *Структура віріону представників родини Inoviridae: (Вгорі) Електронна мікрофотографія показує ниткоподібну структуру віріона фага M13, що інфікує ентеробактерії; чорні стрілки вказують на загострені кінці віріона, а білі вказують на тупі кінці. Смужка представляє 100 нм. (Внизу) Схематична діаграма віріону фага M13 (за ICTV ssDNA Viruses Inoviridae).*

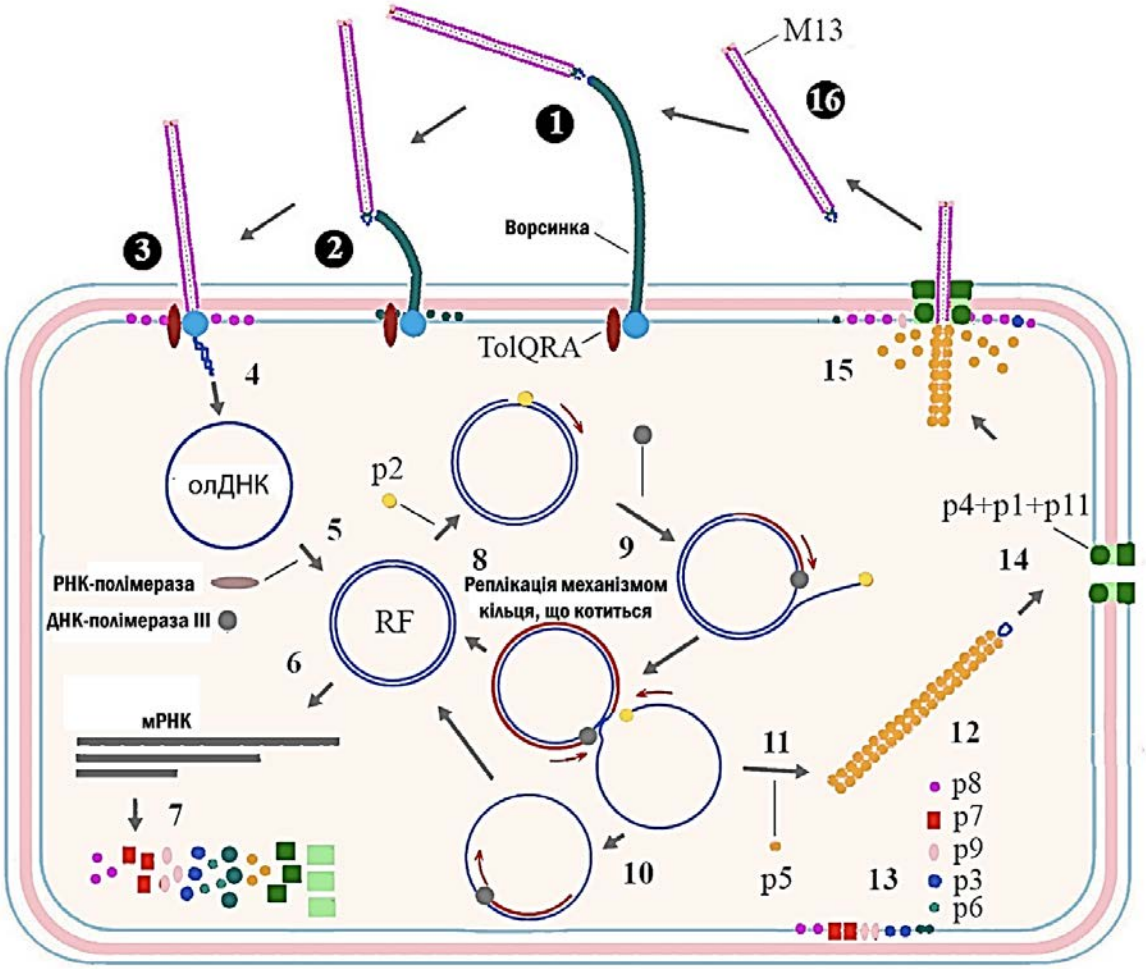
Геном являє собою суперскручену кільцеву молекулу олДНК розміром від 5,5 до 10,6 т.п.н., що кодує 7-15 білків. Структурно геном представників родини *Inoviridae* має модульну організацію. Геном M13 має модуль реплікації ДНК (g2, g5 і g11), структурний модуль (g7, g9, g8, g3 і g6) і модуль морфогенезу, тобто модуль збірки/екструзії (g1, g4 і g11). Міжгенні області містять точку початку реплікації (ori), сигнали упаковки та промотори різної сили (мал. 13.22).



Мал. 13.22. Кругове зображення геному фага M13. Гени (кольорові стрілки) організовані в модулях генів реплікації (g2, g5 і g10), структурних генів (g7, g9, g8, g3, g6) і генів морфогенезу (g1, g4 і g11) (за ICTV ssDNA Viruses Inoviridae).

Гени щільно розташовані в геномі, і деякі з них перекриваються або повністю знаходяться всередині більших генів, транслюючись із внутрішніх стартових кодонів. Наприклад, g11 і g10 M13 є С-кінцевими частинами g1 і g2 відповідно. Фаги, які здатні інтегруватися в бактеріальну хромосому, мають геноми, що містять інсерційні послідовності та кодують білки для регуляції латентної стадії (репресори). Геноми багатьох бактеріофагів також мають додаткові гени.

Серед *Inoviridae* найбільш детально вивчено цикл реплікації фага M13 (Мал. 13.23).



Мал. 13.23. Цикл реплікації типового представника родини Inoviridae фага M13. Подробиці в тексті (за ICTV ssDNA Viruses Inoviridae).

Інфекція починається, коли білок p3 взаємодіє з рецептором - кінчиком ворсинки на поверхні бактерії (Мал. 13.23, 1). Ця взаємодія запускає ретракцію (скорочення) ворсинки (Мал. 13.23, 2), наближаючи фаг до поверхні клітини бактерії, у безпосередній близькості від корецептора - білка TolQRA (Мал. 13.23, 3). Геном фага згодом переноситься в цитоплазму бактерії, а білки капсиду інтегруються в цитоплазматичну мембрану господаря (Мал. 13.23, 4). Геном олДНК фага перетворюється на кільцеву дволанцюгову реплікативну форму (RF), за допомогою короткого праймера, створеного РНК-полімеразою господаря, і комплементарного ланцюга ДНК, синтезованого ДНК-полімеразою III хазяїна (Мал. 13.23, 5). мРНК транскрибуються з RF РНК-полімеразою хазяїна (Мал. 13.23, 6) і далі транслюються, утворюючи білки фага (Мал. 13.23, 7). Трансляція відбувається з використанням рамок зчитування, що перекриваються, і альтернативних стартових кодонів.

Реплікація ДНК починається, коли білок p2, який володіє ендонуклеазною активністю, розрізає длДНК у сайті початку реплікації (Мал. 13.23, 8). Потім ДНК-полімераза хазяїна синтезує олДНК з комплементарного ланцюга реплікативної форми за допомогою механізму кільця, що котиться (Мал. 13.23, 9). Згенеровані молекули олДНК далі перетворюються на RF (Мал. 13.23, 10), які також використовуються для транскрипції, і утворюється більше фагових білків.

Трансльований білок p5 має спорідненість до олДНК, і коли його концентрація стає достатньо високою, він покриває щойно синтезовані молекули олДНК (Мал. 13.23, 11). Це гальмує подальше перетворення олДНК на RF і згортає ДНК у філаменти з непокритим дволанцюговим сигналом пакування на одному кінці (Мал. 13.23, 12). Відповідні структурні білки інтегруються в цитоплазматичну мембрану бактерії (Мал. 13.23, 13) разом із допоміжними білками, які є 14-мерним агрегатом p4, закупореним p1 і p11, утворюючи пори для екструзії (виштовхування) віріону через внутрішню та зовнішню мембрани бактерії (Мал. 13.23, 14). Віріони вивільняються шляхом екструзії шляхом заміни p5 на p8, головного білка оболонки (Мал. 13.23, 15). Першими екструдуються білки p7 і p9, а потім численні копії p8, тоді як p3 і p6 додаються в кінці процесу, і нові віріони вивільняються в навколишнє середовище (Мал. 13.23, 16).

Іновіриди створюють у бактерій персистентну продуктивну інфекцію, безперервно вивільняючи віріони з інфікованих клітин шляхом екструзії, в той час як клітини залишаються життєздатними та неушкодженими. Інфікована клітина зазвичай демонструє повільніші темпи росту, і багато іновіридів не утворюють бляшок на газоні чутливих бактерій, або якщо вони утворюються, бляшки зазвичай каламутні.

ДНК деяких іновіридів зберігається в бактерійній клітині в кільцевій позахромосомній формі, схожій на плазміди, будучи нездатною інтегруватися в геном клітини. Інші іновіруси можуть інтегруватися в бактерійну хромосому за допомогою кодованих фагом сайт-специфічних інтегрази або транспозази. Іновіриди, які мають інтегразу, зазвичай інтегруються в певному місці бактеріального генома, головним чином у генах тРНК, тоді як фаги з транспозазами здатні інтегруватися в кількох сайтах. У деяких інших випадках фагова ДНК також інтегрована в бактеріальний геном, хоча фаг не кодує жодних розпізнаних ферментів для інтеграції. У цьому випадку до процесу залучаються відповідні ферменти хазяїна.

Профаги представників родини *Inoviridae* можна виявити в багатьох бактеріальних геномах. Наприклад, понад 60% штамів *P. aeruginosa* мають принаймні один генетичний елемент, пов’язаний із фагом. Зазвичай у бактерійному штамі можна виявити більше ніж один

профаг, і іноді вони організовані як тандемні повтори з двох-чотирьох копій. Це свідчить про те, що ці фаги можуть відігравати певну роль в еволюції та мінливості бактерій.

Деякі фаги кодують гени, які беруть участь у вірулентності бактерій, і після інтеграції в бактерійний геном викликають лізогенну конверсію своїх господарів. Типовим прикладом є фаг Vibrio CTXphi, який кодує три токсини, пов'язані з холерою: CT (холерний токсин), Zot (zonula occludens токсин) і Ace (додатковий холерний токсин). Навпаки, інші фаги можуть зменшувати вірулентність, як, наприклад, у взаємодії представників роду *Habenivirus* із патогеном рослин *Ralstonia solanacearum*. Фаги впливають на формування бактеріями біоплівки, виробництво екзополісахаридів, різні типи рухливості тощо.

14. ВІРУСИ, ЯКІ МАЮТЬ РНК-ГЕНОМИ (КРІМ РЕТРОВІРУСІВ)

РНК-геномні віруси (крім ретровірусів) завжди кодують власну РНК-залежну РНК-полімеразу для транскрипції і реплікації геномів, оскільки навіть в тих випадках, коли клітина-хазяїн має відповідний фермент, віруси його не використовують. Матричні РНК утворюються на дволанцюгових РНК-геномах або на геномах (-)РНК. Якщо у геномі міститься (+)РНК, транскрипція відбувається через проміжну форму (-)РНК. У вірусів з одноланцюговими РНК-геномами реплікація також відбувається через комплементарну проміжну форму.

Як ми обговорювали вище (розділ 4.2.2), у випадку одноланцюгових РНК-геномів транскрипція і реплікація геномів може бути тим самим процесом, який виконується тим самим ферментом.

14.1. Віруси з дволанцюговою РНК (клас 3 за Д. Балтімором)

Проблемою для вірусів з дволанцюговою РНК є те, що така РНК є індуктором низки захисних реакцій клітини, включаючи сайленсинг РНК. Більшість з цих вірусів вирішують цю проблему у такий спосіб, що їхня РНК увесь період реплікації залишається усередині структури з вірусних білків і не вивільняється в цитоплазму.

14.1.1. Віруси людини і тварин

14.1.1.1. Порядок *Reovirales*

Нещодавно віруси цього порядку належали до *родини Reoviridae*, але зараз ранг цієї групи вірусів було підвищено до порядку (а дві підродини стали родинами). Чимало вірусів цього порядку виявлено у тварин (а також у рослин і грибів). Багато з цих вірусів викликають захворювання, проте за ними зберегли початкову назву реовіруси, яка була дана їм, коли з ними не асоціювали жодної хвороби (reovirus – **r**espiratory **e**teric **o**rphan viruse, дихальний кишковий сирітський вірус).

Порядок *Reovirales* поділяються на дві родини. Родина ***Spinareoviridae*** включає віруси, які мають відносно великі вирости або башточки (турелі), розташовані в 12 вершинах ікосаедричного віріону або серцевинної частинки. Родина ***Sedoreoviridae*** включає віруси, які не мають великих виступів на поверхні своїх віріонів або серцевинних частинок, що надає їм майже сферичного або «гладкого» вигляду.

Геном реовірусів складається з 9, 10, 11 або 12 сегментів дволанцюгової лінійної РНК. Віріони не мають оболонки, 60–80 нм діаметром. Капсид має ікосаедричну симетрію. Білки капсиду організовані в один, два або три шари, які оточують геном.

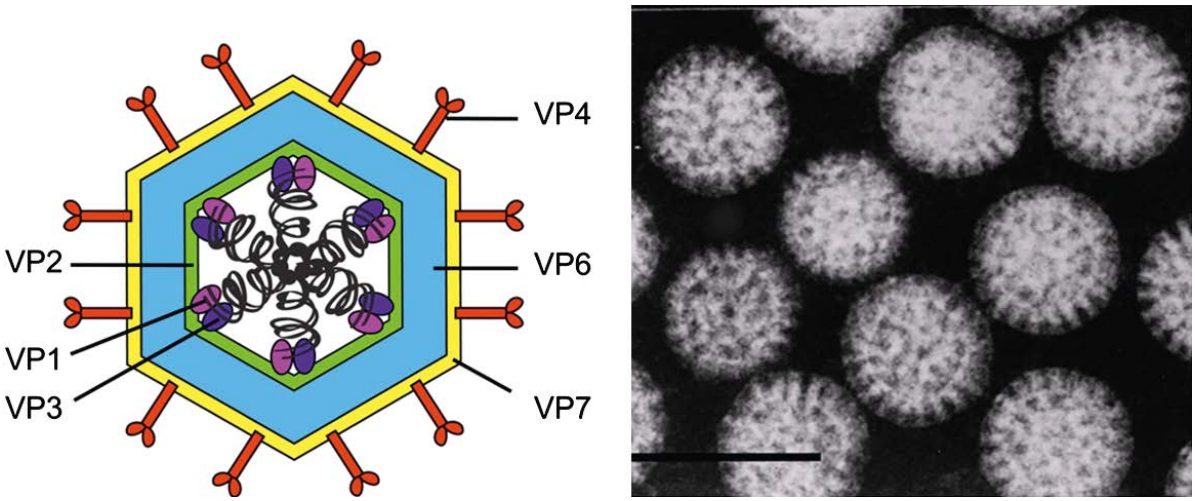
Найбільший інтерес в цьому порядку викликають віруси роду *Rotavirus* (родина *Sedoreoviridae*), оскільки їх найактивніше вивчали як важливих агентів гастроентеритів людей і тварин. Ротавіруси вперше були відкриті в 1963 р., коли під електронним мікроскопом вивчали фекалії мавп і мишей. Були описані округлі віріони діаметром близько 75 нм із структурою, що нагадує спиці колеса. Схожі віруси через 10 років спостерігали в зразках фекалій дітей, що страждали на діарею.

Ротавірус виділяється у великих кількостях під час епізодів асоційованої з ротавірусом діареї. Вірус передається переважно фекально-оральним шляхом, головним чином під час

тісного контакту від людини до людини, і потрібна невелика кількість віріонів, щоб викликати захворювання у сприйнятливих господарів. Заражені фоміти також відіграють важливу роль у передавання ротавірусу, особливо в закладах догляду поза домом та лікарнях. Передавання ротавірусу повітряно-крапельним шляхом є припущенням, яке пояснює швидке отримання антиротавірусних антитіл у перші 3 роки життя, незалежно від гігієнічних та санітарних умов. Але повітряно-крапельний шлях передавання наразі не є доведеним.

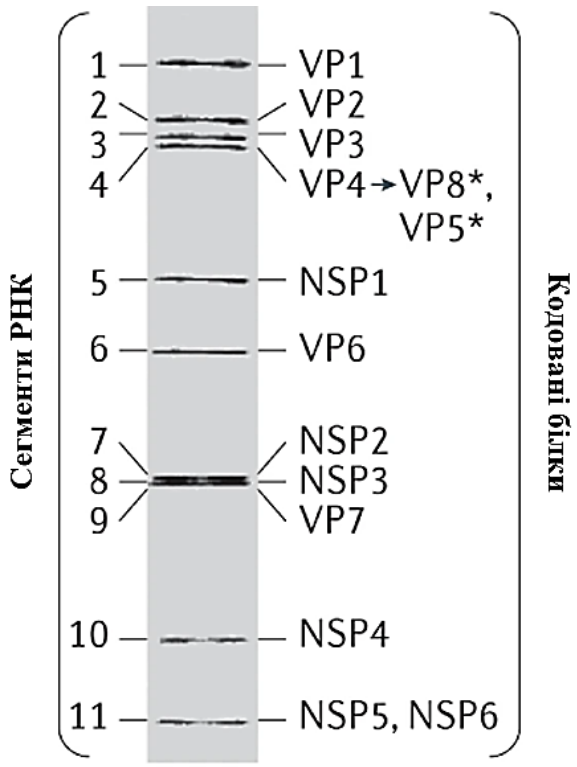
Ротавіруси заражають клітини, що називаються ентероцитами, на кінці ворсинок, що формуються в тонкій кишці. В результаті зараження ентероцити руйнуються, і це призводить до зниження інтенсивності поглинання води, солей і цукрів з просвіту кишечника. Окрім цього, щільні контакти між клітинами порушуються завдяки неструктурному білку вірусу (ентеротоксину) NSP4; через це в просвіт кишківника поступають рідини. Усі ці ефекти вірусного зараження, разом з виділенням води і розчинів секреторними клітинами, призводить до діареї та зневоднення організму. Окрім діареї, ротавірусна інфекція може викликати блювоту та лихоманку. Блювання сприяє зневодненню та може перешкоджати ефективності терапевтичного втручання, такого як пероральна регідратаційна терапія (відновлення нормального рівню рідини у пацієнта розчинами солей і цукрів). З 2006 року почалося глобальне використання живих послаблених пероральних вакцин проти ротавірусів більш ніж в 100 країнах світу. До введення вакцин ротавірус-асоційований гастроентерит спричиняв понад 500 000 смертей у дітей віком до 5 років щорічно. Хоча запровадження вакцин зменшило кількість смертей, в країнах з низьким рівнем доходу ротавірусний гастроентерит все ще призводить до >200 000 смертей маленьких дітей щорічно.

Особливості реплікації ротавірусів. *Структуру віріонів* показана на Мал. 14.1. Капсид складається з 3-х білкових шарів і під електронним мікроскопом віріони нагадують колеса (лат. *rota*); такий вигляд призвів до назви роду *Rotavirus*.



Мал. 14.1. Морфологія віріону ротавірусів. (Ліва панель) Схематичне зображення тришарової частинки ротавірусу. Чорні спіралі представляють сегменти геномної длРНК, також позначені білки. Точні місця розташування VP1 і VP3 невідомі. (Права панель) Електронна мікрофотографія частинок ротавірусу. Смужка представляє 100 нм (за ICTV dsRNA Viruses Genus: Rotavirus).

Геном ротавірусів складається з 11 сегментів длРНК. Сегменти кодують шість структурних вірусних білків (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 і VP7) і шість неструктурних білків (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 і NSP6) (мал. 14.2).



Мал. 14.2. *Профіль електрофоретичної міграції 11 сегментів геномної дволанцюгової РНК і кодовані білки ротавірусу приматів штам SA11. VP, структурні білки; NSP, неструктурні білки. VP4 протеолітично розщеплюється на VP8* і VP5* (за Crawford S. et al., 2017).*

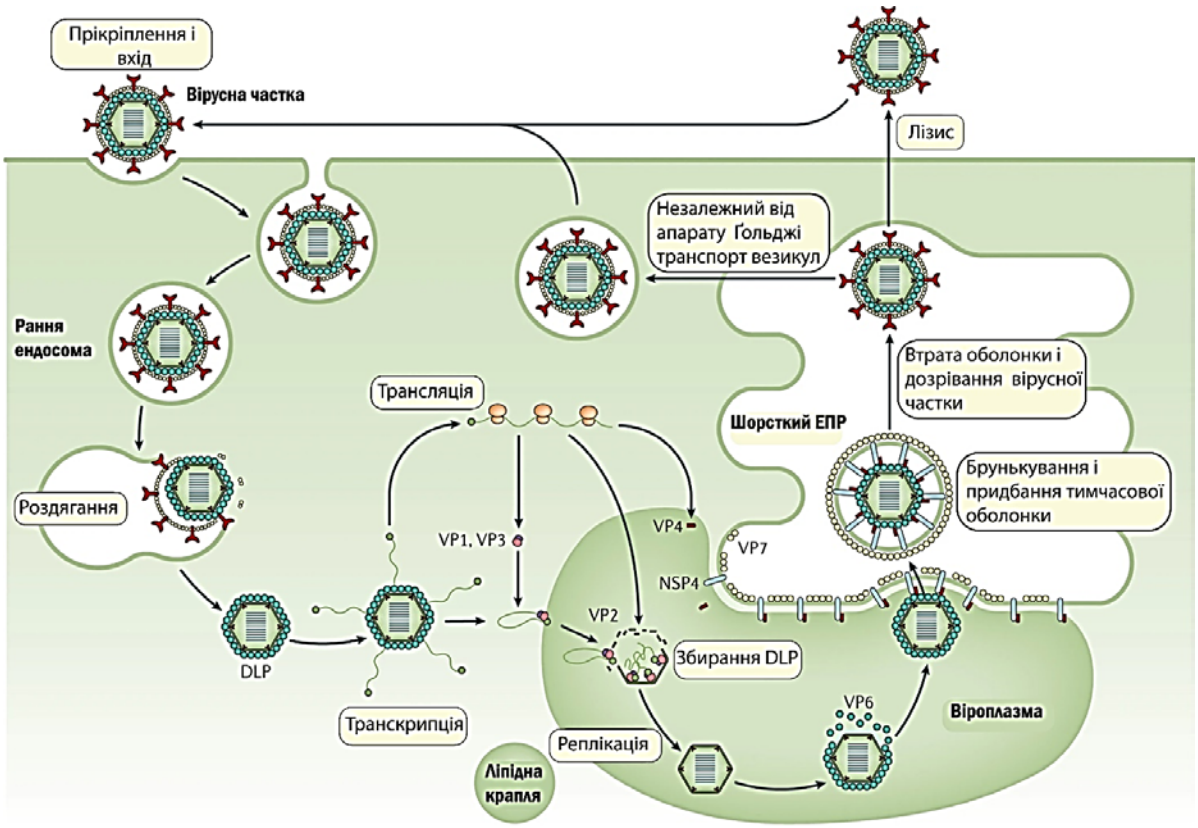
Структурні білки обумовлюють тропізм вірусу, забезпечують вхід в клітину та ферментативні функції, необхідні для виробництва вірусних транскриптів. Неструктурні білки беруть участь у реплікації геному та пригніченні вродженої імунної відповіді (особливо NSP1) і включають вірусний ентеротоксин NSP4.

Цикл реплікації ротавірусів схематично показаний на Мал. 14.3.

Ротавіруси заражають клітини, що називаються ентероцитами, у середині і на кінці ворсинок, що формуються в тонкій кишці, а також ентероендокринні клітини тонкої кишки. *Прикріплення* ротавірусу до клітин-господарів опосередковується зовнішнім капсидним білком VP4. Цей білок розщеплюється до менших білків VP8* та VP5*, можливо за участі подібних трипсину ферментів у кишківнику. Рецептори і корецептори на поверхні клітини-хазяїна, як передбачається, включають гангліозиди GM1 і GD1a, антигени гістогрупи крові, інтегрини, білок теплового шоку 70 і деякі інші клітинні білки. У зв'язуванні з рецепторами/корецепторами також приймає участь білок VP7.

Залежно від штаму ротавірусу, вірус *проникає* в клітини шляхом ендоцитозу клатрин-залежним або клатрин-незалежним і кавеолін-незалежним способом. Вважається можливим, що ротавіруси проникають у клітину також прямим проникненням через плазматичну мембрану. Це може бути опосередковано гідрофобною областю VP5*; ця область прихована в нерозщепленому VP4.

Потрапивши в клітину тим чи іншим чином, віріон втрачає зовнішній шар капсиду, і залишається двошарова частинка (DLP, Мал. 14.3), в якій активується транскрипція. Цілком імовірно, що кожен з 11 сегментів геному пов'язаний з молекулою VP1 (синтезує нові копії (+)РНК) і молекулою VP3 (кепує 5'-кінці нових РНК). Нуклеотиди для синтезу РНК надходять у частинки через канали в білкових шарах, і транскрипти видавлюються з частинок через ті самі канали.



Мал. 14.3. Схематичне зображення циклу реплікації ротавірусів. Ротавіруси приєднуються до різних гліканових рецепторів на поверхні клітини-господаря через взаємодію з доменом вірусного білка (VP8) VP4. Після початкового зв'язування білок VP7 і домен VP5* VP4 можуть взаємодіяти з декількома з цих корецепторів, які зосереджені на ліпідних рафтах, щоби опосередкувати проникнення вірусу. Низький рівень кальцію всередині ендосоми викликає видалення зовнішнього капсидного шару, який вивільняє транскрипційно активну двошарову частинку (DLP) у цитоплазму. Вірусна мРНК використовується для трансляції або як матриця для синтезу РНК під час реплікації геному; потім РНК упаковується в нові DLP у віроплазмах (вірусних фабриках), для формування яких потрібні компоненти ліпідних крапель. Тришарове складання частинок включає зв'язування новоутворених DLP з неструктурним білком 4 (NSP4), який служить внутрішньоклітинним рецептором, з подальшим брунькуванням DLP в ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР). Крім того, NSP4 опосередковує підвищення рівня цитоплазматичного кальцію, який необхідний для реплікації вірусу. У ЕПР можна спостерігати тимчасові вірусні частинки з оболонкою, а білки зовнішнього шару капсиду VP4 і VP7 додаються до DLP. Після цього оболонка втрачається, частинки вірусу дозрівають, а віріони-потомки вивільняються з клітин через лізис або за допомогою механізму везикулярного транспорту і екзоцитозу в поляризованих епітеліальних клітинах (за Crawford S. et al., 2017).*

Після початку трансляції, вірусні білки накопичуються в цитоплазмі в структурах, відомих як віроплазми; білки NSP2 і NSP5 відіграють головну роль у їх формуванні. Для формування віроплазм також потрібні компоненти ліпідних крапель. У віроплазмах наново синтезовані молекули (+)РНК зв'язують VP1 і VP3, а потім VP2, що утворює приблизно сферичні структури нових незрілих віріонів. Сувора процедура відбору гарантує, що кожна структура отримує по одному з 11 сегментів РНК, тобто повний геномний комплемент. Ця процедура, яка діє для всіх вірусів з сегментованими геномами, передбачає розпізнавання унікальної послідовності в кожному сегменті геному.

Активність РНК-полімерази VP1 активується взаємодією з VP2, і (+)-ланцюги РНК діють як матриці для синтезу (–)РНК, утворюючи 11 молекул длРНК геному в кожній структурі. Таким чином, длРНК віріону, що інфікував клітину, залишається інтактною, а спосіб реплікації геному є *консервативним*, на відміну від напівконсервативної реплікації ДНК

або длРНК деяких інших вірусів (Мал. 4.22). VP6 додається до кора, утворюючи другий шар капсида. Отримана структура є двошаровою частинкою, подібною до тієї, що походить від вихідного віріону.

Подальший раунд транскрипції (вторинна транскрипція) відбувається всередині двошарових частинок потомства. На відміну від ранніх транскриптів, пізні транскрипти не кеповані. Механізм трансляції зазнає змін і тепер вибирає не кеповані транскрипти. Білок NSP3 відіграє певну роль у з'єднанні 5'-кінця мРНК з її 3'-кінцем. Отже, трансляція клітинних білків припиняється, а трансляція вірусних білків триває.

Останні етапи морфогенезу віріону включають додавання зовнішнього шару капсиду та виростів. Існує певна невизначеність щодо деталей, але є докази, які свідчать про наступну серію подій. VP7 і NSP4 синтезуються і N-гликозилуються в шорсткому ендоплазматичному ретикулумі, де вони накопичуються в мембрані. NSP4 має сайти зв'язування як для VP4, так і для двошарових частинок. Після того, як ці компоненти зв'язуються, частинка брунькується через мембрану у везикулу всередині ендоплазматичної мережі. Мембрана везикули утворює тимчасову «оболонку», що містить VP7. VP4 додається до двошарової частинки для формування виростів віріону. Розщеплення молекул VP7 вивільняє їх з мембрани, щоб створити зовнішній капсид і зафіксувати вирости на місці. Новоутворені віріони ротавірусу *вивільняються* з клітин через лізис або через незалежний від апарату Ґольджі везикулярний транспорт і екзоцитоз (Мал. 14.3).

Вірус «синього язика». Вірус «синього язика», або блутангу, або катаральної лихоманки овець, належить до роду *Orbivirus* (родина *Sedoreoviridae*) Він викликає захворювання жуйних тварин, включаючи овець, кіз і корів. Переносниками вірусу слугують комахи. Усі жуйні тварини сприйнятливі до вірусу, але зараження призводить до важкого захворювання лише у деяких хазяїв, головним чином у деяких порід овець і деяких видів оленів. У хворих тварин язик може стати опухлим і набути синього кольору. Заражені і не хворі інфіковані тварини є резервуаром інфекції. Вірус переноситься деякими видами кусючої мошки роду *Culicoides*. Зона поширення вірусу обмежена територіями, де трапляються ці мошки. Крім того, передавання вірусу обмежено часом, коли мошки є активними.

Блутанг впродовж тривалого часу відомий в Африці і на Середньому Сході. У Європі цей вірус траплявся лише зрідка, проте з 1998 р. вірус почав поширюватися на північ. В 2004 р. він проявився на 800 км північніше, ніж коли-небудь раніше, і захворювання вбило більше мільйона овець. Виявилось, що мошки, які є переносником вірусу, почали поширюватися на північ, в Європу, ймовірно внаслідок потепління клімату.

14.1.2. Віруси рослин, грибів і найпростіших

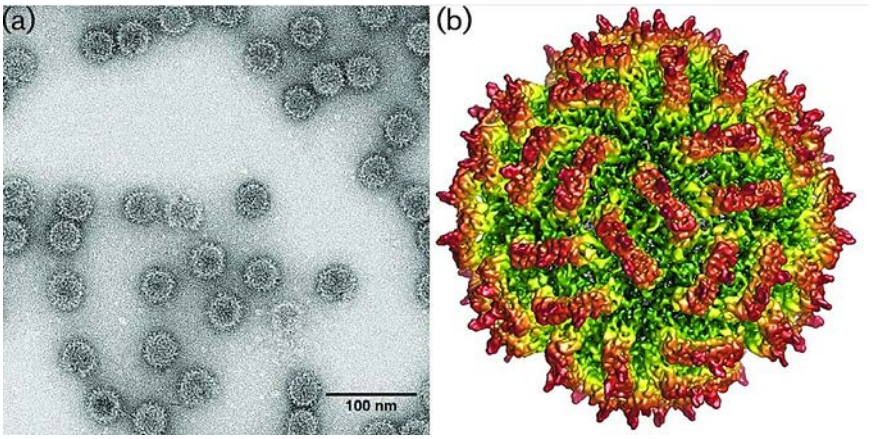
14.1.2.1. Родина *Partitiviridae*

Partitiviridae — родина невеликих ізометричних вірусів без оболонки з геномами длРНК, які складаються з двох сегментів розміром 3–4,8 т.п.н. Назва походить від латинського слова partitius, що означає розділений, і відноситься до сегментованого геному партитівірусів. Два сегменти геному інкапсульовані у окремі віріони. Родина включає п'ять родів із специфічними господарями для членів кожного роду: рослини або гриби для родів *Alphapartitivirus* і *Betapartitivirus*; гриби для роду *Gammapartitivirus*, рослини для роду *Deltapartitivirus* і найпростіші для роду *Cryspovirus*. Дуже часто зараження партитівірусами не призводить до появи якихось симптомів, зокрема у грибів.

Партитівіруси, як правило, пов'язані із персистентними інфекціями їх господарів. Відомих природних переносників не існує. Грибні партитівіруси передаються внутрішньоклітинно під час поділу клітин, анастомозів гіф та спорогенезу. У деяких аскоміцетів (наприклад, *Gaeumannomyces graminis*) вірус зазвичай елімінується під час утворення аскоспор. Партитівіруси рослин передаються через насіння. У зародок вони потрапляють через яйцеклітину та пилок. Немає їх передавання через щеплення рослин і, мабуть, немає транспорту від клітини до клітини, за винятком події поділу клітини. Таким чином, на відміну від інших вірусів рослин, партитівіруси *не кодують* транспортних білків, які обумовлюють переміщення вірусів рослин через плазмодесми. У протистів *Cryptosporidium* партитівіруси розповсюджуються через ооцисти.

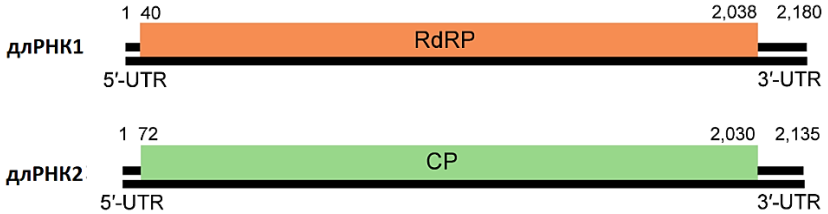
Роди *Alphapartitivirus* і *Betapartitivirus* включають віруси грибів або рослин. Таким чином, ймовірною є здатність до випадкового успішного передавання цих вірусів між грибними та рослинними господарями.

Віріони вірусів родини ізометричні, без оболонки, діаметром 25–43 нм (Мал. 14.4). Капсид складається з 120 копій єдиного білка (CP), організованого у вигляді 60 димерів з ікосаедричною симетрією *T*=1. Усередині кожної вірусної частинки упакований єдиний сегмент геному і одна або дві молекули РНК-залежної РНК-полімерази.



Мал. 14.4. ***(a)*** *Трансмісійна електронна мікрофотографія віріонів Penicillium stoloniferum virus S, представника роду Gammapartitivirus.* ***(b)*** *Кріо-ЕМ-реконструкції віріону Penicillium stoloniferum virus S з роздільною здатністю 0,45 нм і візуалізовані за допомогою радіального кольорового мапування (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Partitiviridae).*

Геном вірусів складається з двох сегментів, длРНК1 і длРНК2, кожен з яких містить одну велику відкриту рамку зчитування (ORF) на позитивному ланцюзі РНК (Мал. 14.5). Менший із двох сегментів геному длРНК зазвичай кодує білок оболонки (CP), а більший зазвичай кодує асоційовану з віріоном РНК-полімеразу. Лінійні сегменти длРНК окремо інкапсульовані.



Мал. 14.5. *Геном вірусу Atkinsonella hypoxylon (AhV), ізолят типового виду роду Betapartitivirus, має геном, що складається з двох сегментів: длРНК1 і длРНК2. RdRP – РНК-залежна РНК-полімераза, CP – білок оболонки, UTR – регіони, що не транслюються (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Partitiviridae).*

Оскільки партитівіруси фактично постійно знаходяться у клітині-хазяїні, таких подій, як прикріплення і вхід до клітини не відбувається. Реплікація здійснюється в цитоплазмі і починається з того, що РНК-залежна РНК-полімераза у вірусній частинці синтезує (+) ланцюг РНК на матриці геномної длРНК (у даному випадку синтез є незалежним від праймера). Цей (+)-ланцюг зберігається у віріоні як частина длРНК, тоді як батьківський ланцюг позитивної полярності (який кодує РНК-залежну РНК-полімеразу або білок капсида) вивільняється з вірусної частинки і використовується як мРНК для трансляції відповідного білка рибосомами клітини. Також цей ланцюг може пакуватися у нові віріони і правити за матрицю для синтезу вже упакованою РНК-полімеразою (-)-ланцюга РНК, відновлюючи сегмент геному. Таким чином, реплікація длРНК у партитівірусів відбувається напівконсервативним шляхом. Вважають, що можуть утворюватися проміжні вірусні частинки, які містять по дві копії кожного сегменту длРНК, з яких потім формуються віріони з однією копією сегменту длРНК.

Загалом, подробиці циклу реплікації вірусів цієї родини не є добре зрозумілими.

14.1.3. Віруси прокаріот

14.1.3.1. Родина *Cystoviridae*

Назва родини *Cystoviridae* походить від грецького kystis, «сечовий міхур, мішок». Віруси родини містять сегментований геном длРНК. Цистовіруси є літичними бактеріофагами, які індукують лізис клітини-господаря в кінці циклу репродукції вірусу. Природними хазяями є грамнегативні бактерії - патогени рослин або людини. Найбільш вивченим представником родини є фаг φ6 (*Pseudomonas phage φ6*).

Віріони з оболонкою мають сферичну форму, діаметром близько 85 нм і вкриті виростами (Мал. 14.6). Виключенням є фаг φ8, у якого відсутня оболонка нуклеокапсиду. Цистовіруси є єдиними бактеріофагами, які мають на поверхні віріона ліпідну оболонку.

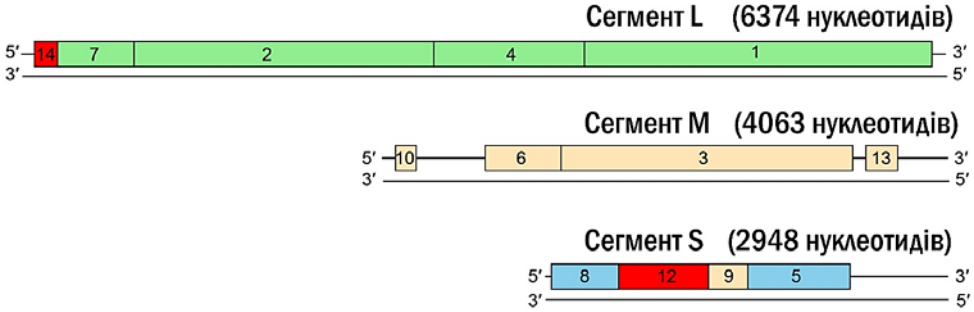


Мал. 14.6. *Віріон фага φ6. Ліворуч: схематичне зображення вірусної частинки із розташуванням білків віріона. Середина: тривимірна реконструкція нуклеокапсиду. Праворуч: електронна мікрофотографія частинок фага φ6, прикріплених до рецепторів на ворсинці господаря. Смужка дорівнює 200 нм. Три сегмента геномної длРНК позначені як малий S, середній M і великий L (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Cystoviridae).*

Сферичний віріон цистовірусу має три структурних шари. Зовнішній шар — це ліпідна двошарова оболонка, що складається з фосфоліпідів, отриманих від хазяїна, і чотирьох кодованих вірусом інтегральних мембранних білків (P6, P9, P10, P13). Вирости, які є сайтами прикріплення до хазяїна (утворені білком P3) прикріплюються до оболонки через білок P6. Оболонка охоплює нуклеокапсид, що складається з двох концентричних білкових шарів: поверхневої оболонки нуклеокапсиду та ядра (кора) полімеразного комплексу. Поверхнева оболонка нуклеокапсиду містить 200 копій тримерів білка P8, організованих у ікосаедричну

решітку з T=13. Внутрішнє ядро полімеразного комплексу складається з чотирьох типів білка: основного структурного білка P1, РНК-залежної РНК-полімерази P2, гексамерної упаковки нуклеотидтрифосфотази P4 і кофактора збирання P7. Структурний каркас ядра полімеразного комплексу утворений 120 копіями білка P1, які організовані як асиметричні димери на ікосаедричній решітці з T=1 (Мал. 14.6).

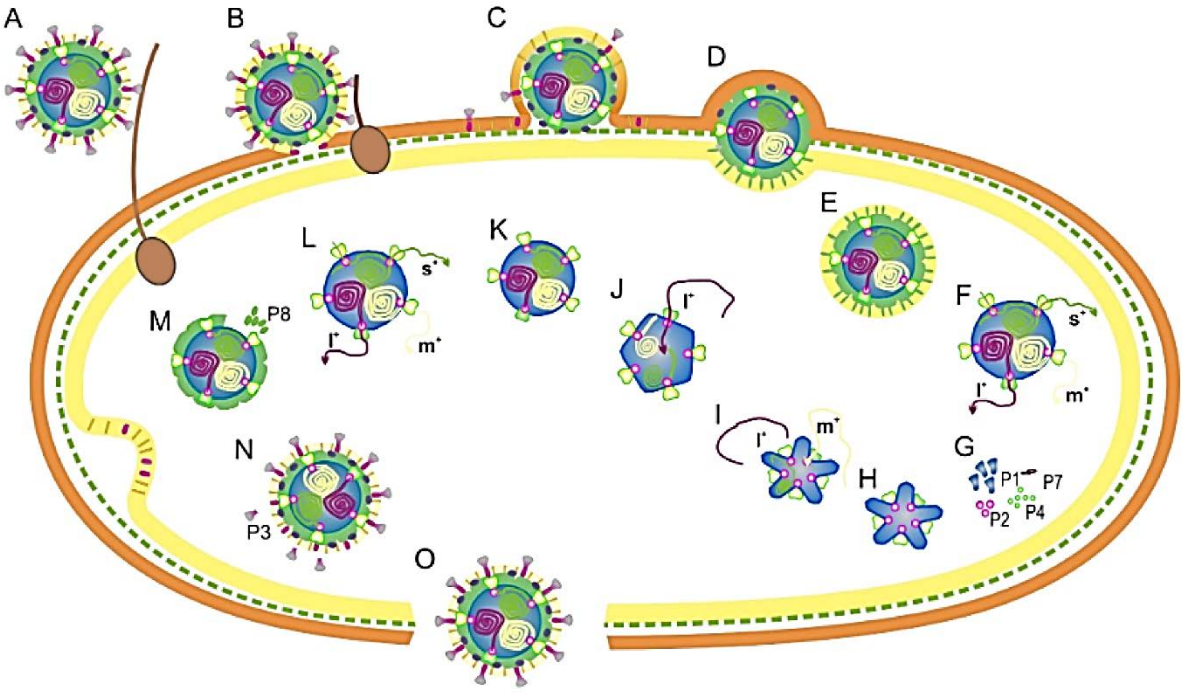
Геном цистовірусів складають три сегменти лінійної дволанцюгової РНК, названі відповідно до їх розміру L (великий, 6,4 т.п.н.), M (середній, 4,1 т.п.н.) і S (малий, 2,9 т.п.н.) (мал. 14.7). Одна копія кожного сегмента геному пакується у віріон.



Мал. 14.7. *Організація геному фага φ6. Номери генів і білків однакові. Кольори вказують на гени, що кодують складові полімеразного комплексу (зелений), нуклеокапсиду (синій), білки, асоційовані з оболонкою (кремовий) і неструктурні білки (червоний) (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Cystoviridae).*

У кожному сегменті гени згруповані у функціональні групи. Кодуючі області фланковані кінцевими некодуючими ділянками, що містять сигнали для упаковки геному та реплікації.

Цикл реплікації вірусів схематично показаний на Мал. 14.8.



Мал. 14.8. *Цикл реплікації бактеріофага φ6. (A) Прикріплення до ворсинки клітини-хазяїна. (B) Опосередковане протеїном P6 злиття між вірусною оболонкою та зовнішньою мембраною бактерії. (C) Ендопептидаза P5 розщеплює шар пептидоглікану. (D-E) Проникнення крізь плазматичну мембрану клітини-хазяїна. (F) Рання стадія транскрипції. (G-H) Збирання порожніх полімеразних комплексів з білків P1, P2, P4 і P7. (I) Послідовне пакування трьох геномних + + + попередників геномних сегментів S, M і L. (J-K) Полімеразний комплекс каталізує синтез комплементарних мінусланцюгів геномних сегментів. (L) Пізня стадія транскрипції. (M) Синтез і збирання білка P8 нукле-*

окапсиду, а також одночасний синтез мембранних білків вірусу на плазматичній мембрані бактерії. (N) Внутрішньоклітинна транслокація ліпопротеїнових оболонок на нуклеокапсид, збирання виростів P3 на віріонах, що охоплюють оболонку. (O) Вивільнення зрілих віріонів шляхом індукованого вірусом лізису клітини-господаря. Обговорення див. в тексті. (За P. Sarin, 2010, https://helda.helsinki.fi/items/a18dd84f-8e24-4353-8a41-809d53647359).

Інфекція починається, коли віріони прикріплюються до ворсинки хазяїна (Мал. 14.8, A). Коли ворсинка втягується, частинка вірусу досягає зовнішньої мембрани бактерії. Згодом білок оболонки P6 індукує злиття між оболонкою вірусу та зовнішньою мембраною хазяїна, що призводить до вивільнення нуклеокапсиду в периплазматичний простір (Мал. 14.8, B). Після злиття мембран фермент фага мурамідаза (лізоцим) P5 розщеплює шар пептидоглікану господаря (Мал. 14.8, C), а нуклеокапсид проникає в клітину шляхом ендоцитозу через плазматичну мембрану за допомогою білка P8 (Мал. 14.8, D).

Всередині хазяїна віріон втрачає плазматичну мембрану та поверхневу оболонку нуклеокапсиду (білок P8) за допомогою невідомого механізму (Мал. 14.8, E), з подальшою ранньою транскрипцією трьох геномних сегментів-попередників S, M і L (Мал. 14.8, F). Надалі транскрибовані з сегмента L білки PC, P1, P2, P4 і P7 транслюються (Мал. 14.8, G), і з них утворюються порожні полімеразні комплекси або прокапсиди (Мал. 14.8, H). Порожній полімеразний комплекс упаковує геномні попередники олРНК (Мал. 14.8, I), і після того, як усі сегменти S, M і L упаковані, синтезуються комплементарні ланцюги з утворенням длРНК, і починається пізня транскрипція (Мал. 14.8, J).

З пізніх транскриптів сегментів геному M і S транслюються білки поверхневої оболонки нуклеокапсиду та оболонки. Спочатку навколо генома, що містить полімеразний комплекс, формується оболонка білка P8, утворюючи таким чином нуклеокапсид (Мал. 14.8, K). Нарешті, ліпопротеїнова оболонка, отримана з плазматичної мембрани господаря, охоплює нуклеокапсид в середині клітини-господаря (Мал. 14.8, L). Зрештою, зрілі віріони вивільняються після індукованого вірусом лізису клітин-господарів (Мал. 14.8, M).

14.2. Віруси, що містять плюс-ланцюг РНК (клас 4 за Д. Балтімором)

Геном (+)РНК-геномних вірусів є одночасно матричною РНК, на якій у цитоплазмі клітини-господаря зразу ж може відбуватися *трансляція*. Однак фундаментальна проблема, з якою стикаються ці віруси під час використання механізму трансляції еукаріотів, полягає в тому, що, як правило, транслюється лише 5'-цистрон у поліцистронній мРНК, і трансляція припиняється на першому стоп-кодоні, таким чином, що усі наступні цистрони залишаться нетрансльованими. Щоб уникнути цього, віруси розробили низку стратегій, які гарантують трансляцію всіх їхніх генів. Нагадаємо, що багато згаданих нижче стратегій реплікації геномів, транскрипції і трансляції вірусів з РНК-геномами ми обговорювали у розділах 4.2.2 і 4.2.3.

Важливо, що у вірусів 4 класу за Д. Балтімором (з (+)РНК-геномами) інфекційною є «гола» РНК, оскільки вона може правити за матрицю для трансляції і на ній зразу ж буде синтезована РНК-залежна РГК-полімераза. Таким чином, цей фермент є неструктурним білком і немає потреби його пакувати у віріон (на відміну від вірусів з длРНК-геномом або геномом (-)РНК). Для (+)РНК-геномних вірусів немає або майже немає потреби вводити в клітину крім геному ще якісь білки.

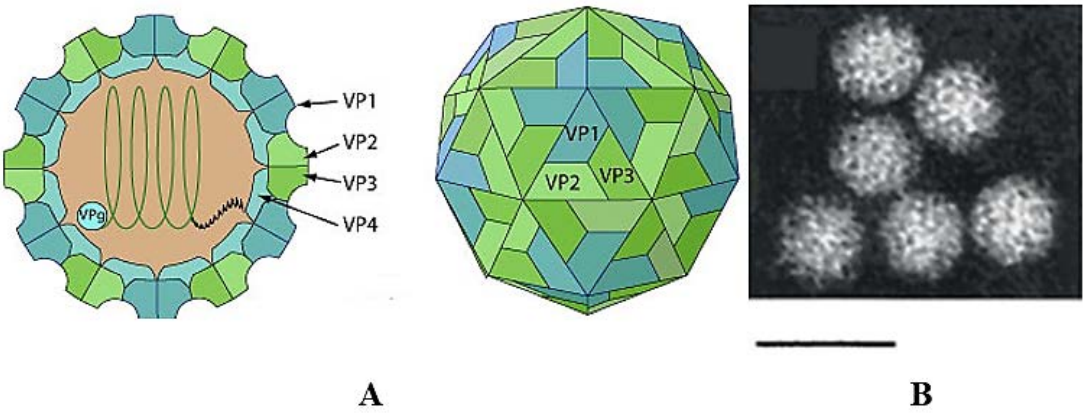
14.2.1. Віруси людини і тварин

14.2.1.1. Родина *Picornaviridae*.

Представники пікорнавірусів виявлені у ссавців і птахів. Свою назву пікорнавіруси отримали від сполучення іспанського слова pico – мала величина і англомовного скорочення RNA (РНК). Таким чином, пікорнавіруси є невеликими РНК-геномними вірусами, що мають відносно просту структуру. Їхній геном представлений плюс-ланцюгом РНК, який може функціонувати як мРНК, коли вивільняється в цитоплазму.

Віріони не мають оболонки, 30–32 нм у діаметрі. Капсид пікорнавірусів має ікосаедричну симетрію і побудований з 60 структурних одиниць (протомерів), кожна з яких складається з однієї копії вірусних білків VP1, VP2, VP3 і VP4 (Мал. 14.9).

У багатьох пікорнавірусів на поверхні віріона є глибока щілина. Ці ущелини, які часто називають каньйонами, були виявлені за допомогою рентгенівської кристалографії та кріоелектронної мікроскопії. Вони мають глибину приблизно 2 нм. Каньйони вистелені С-кінцями молекул VP1 і VP3 і містять ділянки, які зв'язуються з клітинними рецепторами.



Мал. 14.9. *Віріон пікорнавірусів. (А) Схема будови віріона пікорнавірусів. Ікосаедричний капсид з T=1 (псевдо T=3) побудований з 60 протомерів. Кожен протомер складається з однієї копії вірусних білків VP1, VP2, VP3 і VP4, так що перші три білка розташовані на поверхні, а четвертий на внутрішній поверхні. Три протомера складають кожну з 20 граней ікосаедра. Зліва у середині капсида також показаний геном одноланцюгової (+)РНК, до якої приєднаний білок VPg. (В) Електронна мікрофотографія вірусу Aichi A1, що демонструє структуру поверхні віріона. Смужка дорівнює 50 нм (А за ViralZone Swiss Institute of Bioinformatics, В за ICTV Positive-sense RNA Viruses).*

Більшість пікорнавірусів, для яких ідентифіковано природних господарів, є специфічними для одного або дуже небагатьох видів господарів (винятки становлять вірус ящуру і вірус енцефаломіокардиту). Передавання вірусів відбувається горизонтально, в основному фекально-оральним або повітряно-крапельним шляхом. Також можливе передавання через фоміти. Передавання членистоногими векторами невідоме.

Пікорнавірусна інфекція, як правило, є цитолітичною, але для деяких видів повідомляється про персистентні інфекції. Пікорнавіруси викликають важкі захворювання у людини і свійських тварин.

Поліовірус (Enterovirus C). Поліовірус, збудник поліомієліту (від дав.-гр. πολιός — сірий, дав.-гр. μυελός — мозок і лат. itis — запалення), є об'єктом пильних досліджень, оскільки може призводити до паралічу. Фактично у більшості випадків зараження вірусом поліомієліту виявляється безпечніше за інші інфекції ротоглотки або кишківника, і близько 70% заражень відбувається безсимптомно. Серйозне захворювання спостерігається тільки

після того, як зараженими стають інші тканини внаслідок віремії – попадання вірусу в кров – і поширення вірусу до центральної нервової системи.

Збудник належить до групи ентеровірусів (кишкових вірусів). Джерело інфекції – людина (хворий або той, що переносе зараження безсимптомно); збудник виділяється через рот і з екскрементами. Зараження може статися повітряно-краплинним шляхом, але частіше – під час попадання в рот активного вірусу (через фоміти, забруднені руки, їжу). Механічним переносником вірусу можуть бути мухи.

Вхідними воротами інфекції є слизова оболонка носоглотки або кишківника. Під час інкубаційного періоду вірус розмножується в лімфоїдних утвореннях глотки і кишківника, потім може проникнути в кров і досягти нервових клітин. Зараження поліовірусами центральної нервової системи може привести до менінгіту (після якого більшість пацієнтів повністю видужують), енцефаліту і/або паралітичного поліомієліту. Паралітичний поліомієліт обумовлений реплікацією вірусів в моторних нейронах спинного мозку або стволової частини головного мозку. Нервові клітини піддаються дистрофічно-некротичним змінам, розпадаються і гинуть, що призводить до паралічу м'язів кінцівок або навіть дихальних м'язів. У м'язах, іннервація яких постраждала, розвивається атрофія (Мал. 14.10).



Мал. 14.10. *Діти, уражені паралітичним поліомієлітом (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Спалахи поліомієліту стимулювали дослідницькі програми по розробці вакцин, і ці зусилля привели до появи інактивованої вакцини і атенуйованої (послабленої) вакцини. Використання обох типів вакцини забезпечило дуже ефективну профілактику поліомієліту, і на початку 21 століття щорічна кількість випадків захворювання знизилася до 3500, що складає 1% випадків від 1988 року. Поліомієліт фактично є викорененим у багатьох частинах земної кулі; очікується, що незабаром станеться його повна ліквідація. Але остаточно поліомієліт ще не подолали.

Вірус гепатиту А. Гепатит А особливо поширений в країнах, що розвиваються, з поганою санітарією. У більшості новонароджених або маленьких дітей інфекція протікає безсимптомно або з середньою тяжкістю, і призводить до довічного імунітету. За умови зараження дорослих людей в 75% випадків розвивається жовтяниця. Рідкісним ускладненням є

важкий гепатит, який може бути фатальним. Вірус передається фекально-оральним шляхом, через заражену їжу і воду. Після попадання в організм, вірус гепатиту А проникає в кровоносну систему через клітини епітелію ротової частини глотки або кишківник. Вірус є гепатотропним, і коли кров переносе його до печінки, вірусні частинки заражають гепатоцити і клітини Купфера (спеціалізовані макрофаги печінки, що руйнують в першу чергу нефункціональні клітини крові).

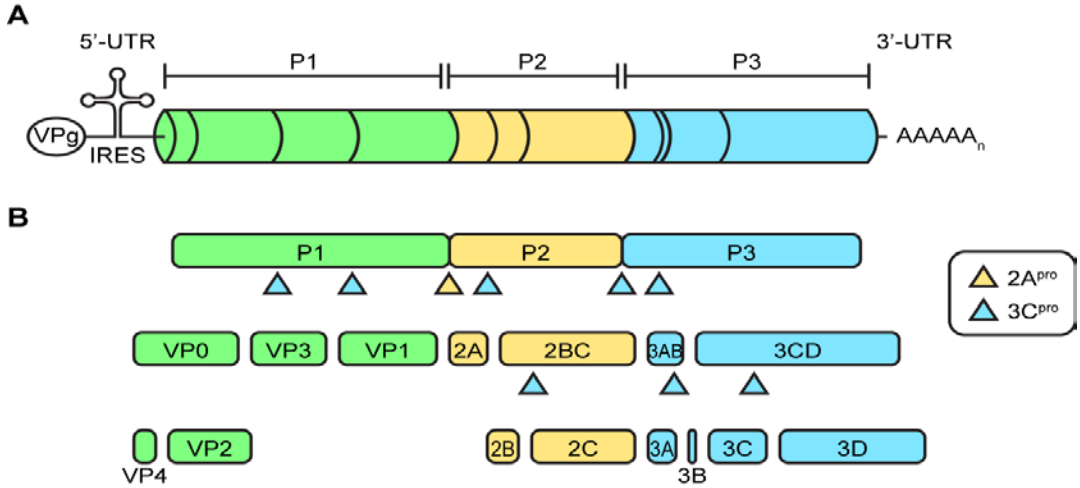
Вірус Коксакі. Це ентеровірус, який добре розмножується в шлунково-кишковому тракті. Вірус дістав назву за містом Коксакі (США), де він був знайдений в 1948 р. дослідниками, які шукали спосіб лікування поліомієліту. Вірус Коксакі може викликати ряд медичних проблем, включаючи міокардит, менінгіти і висипання. Цей вірус поширений повсюдно; зростання захворюваності відзначають у літньо-осінні місяці. Основні механізми передавання вірусів Коксакі – фекально-оральний і контактний (з виділеннями носоглотки). Шляхи проникнення вірусів Коксакі і поширення ідентичні таким у поліовірусів.

Риновіруси є найбільш звичайними агентами, що викликають інфекції верхніх дихальних шляхів у людей (ГРЗ). У дорослих близько 50% випадків застуди викликані саме риновірусами. Реплікація риновірусів відбувається в епітелії верхніх дихальних шляхів. Деякі риновіруси ймовірно можуть викликати захворювання і нижніх дихальних шляхів.

Вірус ящуру має набагато ширше коло хазяїв, ніж інші пікорнавіруси. Він заражає цілу низку ссавців, таких як корови, вівці, кози і свині. Вірус ящуру проявляє дерматотропність, тобто тропізм до клітин шкірних покривів. У хворих тварин стають ураженими ступні і язики. Вірус ящуру у випадку епізоотій заподіює величезний збиток тваринництву.

У якості прикладу реплікації вірусів цієї родини, ми більш детально розглянемо цикл реплікації поліовірусів.

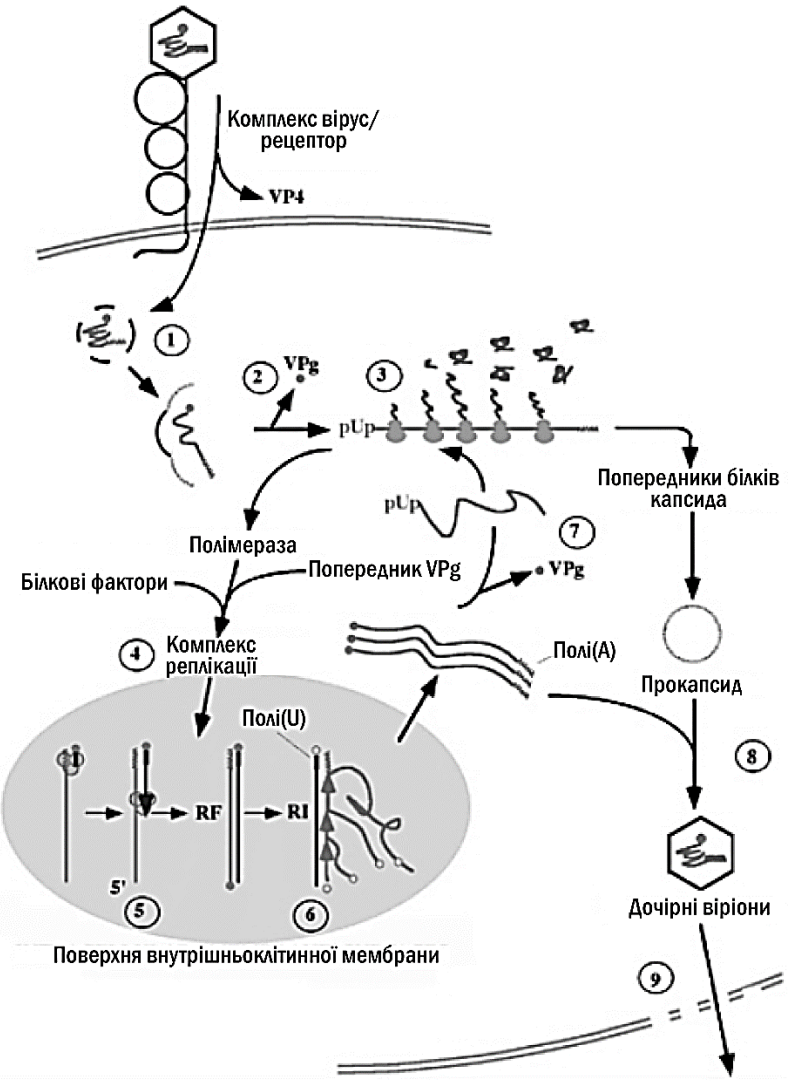
Особливості реплікації поліовірусів. Структура *віріона* була розглянута вище (Мал. 14.9). *Геном* поліовірусів є одночасно матричною РНК, має поліаденіловий хвіст та ковалентно зв'язаний з кодованим вірусом білком (VPg) на його 5'-кінці. Геном кодує одну відкриту рамку зчитування (ORF), яка фланкована з обох боків нетрансльованими областями (UTR) (Мал. 14.11).



Мал. 14.11. Організація геному поліовірусу і кодовані білки. (А) Геном довжиною 7372 нуклеотиди кодує один поліпротеїн, умовно поділений на ділянки P1 (білки капсида), P2 і P3 (неструктурні білки). На 5′- та 3′-кінцях геном містить нетрансльовані ділянки (UTR). 5′-UTR містить внутрішній сайт входження рибосоми (IRES) для ініціації трансляції, незалежної від кепа. На 5′-кінці геном РНК ковалентно зв'язаний з вірусним білком VPg, який використовується як праймер під час реплікації РНК; (В) Поліпротеїн перетворюється на вірусні білки вірусними протеазами 2A^{pro} та 3C^{pro} (за van der Linden L. Et al., 2015).

Цикл реплікації поліовірусів схематично показаний на Мал. 14.12. *Прикріплення* поліовірусів відбувається через клітинний рецептор CD155, глікопротеїн, який належить до імуноглобулінів і бере участь у клітинній адгезії, проліферації, міграції тощо.

Деякий час була певна невизначеність, яким чином геном поліовірусу *проникає* до клітини – вважали можливим і вхід шляхом опосередкованого рецептором ендоцитозу, і пряме проникнення геномної РНК через плазматичну мембрану (яке ми обговорювали у розділі 4.1.2, Мал. 4.4). Останні експериментальні дані підтверджують першу гіпотезу та припускають, що поліовірус зв'язується з CD155 і поглинається шляхом ендоцитозу. Одразу після інтерналізації частинки відбувається вивільнення вірусної РНК.



Мал. 14.12. *Схематичне зображення циклу реплікації поліовірусу. (1) Після зв'язування з рецептором CD155 віріон транспортується в клітину. (2) Вважається, що 5'-кінцевий ковалентно приєднаний білок VPg відщеплюється від генома клітинним ферментом, після чого (3) РНК транслюється у поліпротеїн. Останній згодом процесується в численні функціональні білки. (4) Мембраноасоційований комплекс реплікації формується клітинними мембранами і вірусними та клітинними білками (можливо, за участю гелікази). (5) Плюс-ланцюгова РНК геному транскрибується в мінус-ланцюг із утворенням дволанцюгової «реплікативної форми» (RF). (6) Мінус-ланцюги далі функціонують як матриці для синтезу плюс-ланцюгів. (7) Щойно синтезовані плюс-ланцюги РНК або повторно вводяться в реплікацію геному (4), або слугують мРНК у трансляції (7) або асоціюватися з прокапсидами (8) для утворення зрілих віріонів, які вивільняються з клітини шляхом лізису) (за https://doi.org/10.17226/11599).*

Коли геном вірусу вивільняється в цитоплазмі, білок VPg видаляється з 5'-кінця клітинним ферментом. Після цього ініціюється незалежна від 5´-кінця мРНК трансляція поліпротеїна вірусу (нагадаємо, питання ініціації трансляції було обговорено у розділі 4.2.3). В ініціації трансляції приймають участь клітинні фактори ініціації, за виключенням кеп-зв'язуючого фактора eIF4E, що є важливим.

Поліпротеїн надалі розрізається вірусними протеазами на структурні і неструктурні вірусні білки (Мал. 14.11, В). Що важливо, кодовані вірусом протеази $2A^{pro}$ і $3C^{pro}$ також розщеплюють фактор ініціації eIF4E і полі(А)-зв'язуючий білок. Це призводить до блокування трансляції клітинних білків. Крім того, вірусні протеази розщеплюють кілька інших клітинних факторів. Також у клітинах, заражених поліовірусом, усі три типи РНК-полімераз хазяїна інгібуються, припиняючи транскрипцію. Це призводить до фактичного відключення експресії генів господаря, так що підтримується репродукція вірусу, але пригнічується вроджена противірусна відповідь.

Після вивільнення з поліпротеїну, неструктурні білки опосередковують реплікацію вірусного геному. Реплікація РНК-геному ініціюється уридилуванням білкового праймера VPg вірусною РНК-залежною РНК-полімеразою 3Dpol з використанням вторинної РНК-структури у вірусному геномі, яка називається *цис*-діючим елементом реплікації (Cre) як матрицею (див. розд. 4.2.2, Мал. 4.17). Потім VPgpUpU подовжується за допомогою 3Dpol з утворенням негативно-ланцюгового проміжного продукту, який, у свою чергу, використовується як матриця для синтезу позитивно-ланцюгових молекул РНК. (+)РНК можуть або вступити в інший раунд трансляції та реплікації, або вони можуть бути упаковані в капсиди для отримання інфекційних вірусних частинок.

Типова для вірусів з позитивним ланцюгом РНК реплікація вірусної РНК відбувається на клітинних мембранах, які реорганізуються під час інфікування вірусом. У інфікованих поліовірусом клітинах спостерігаються як одно-, так і двомембранні структури («вірусні фабрики», комплекси реплікації). Дослідження виявили, що на ранніх стадіях вірусної інфекції (коли реплікація РНК вже максимальна) переважають одномембранні трубчасті структури, тоді як на більш пізніх стадіях ці структури, можливо, сплющуються, викривляються та зливаються, утворюючи везикули з подвійними мембранами. Потім ці везикули можуть бути обгорнуті кількома додатковими цистернами та утворювати багатошарові структури.

Точне походження мембран цих структур поки неясно. Були наведені докази того, що мембрани походять від раннього секреторного шляху, тоді як інші дані припускають, що вони були похідними від шляху аутофагії. В обох припущеннях може бути певний сенс, причому ранній секреторний шлях виступає джерелом для одиничних мембранних канальців, а шлях аутофагії бере участь у формуванні везикул з подвійними мембранами. Нагадаємо, біогенез вірусних фабрик був обговорений у розділі 4.5.

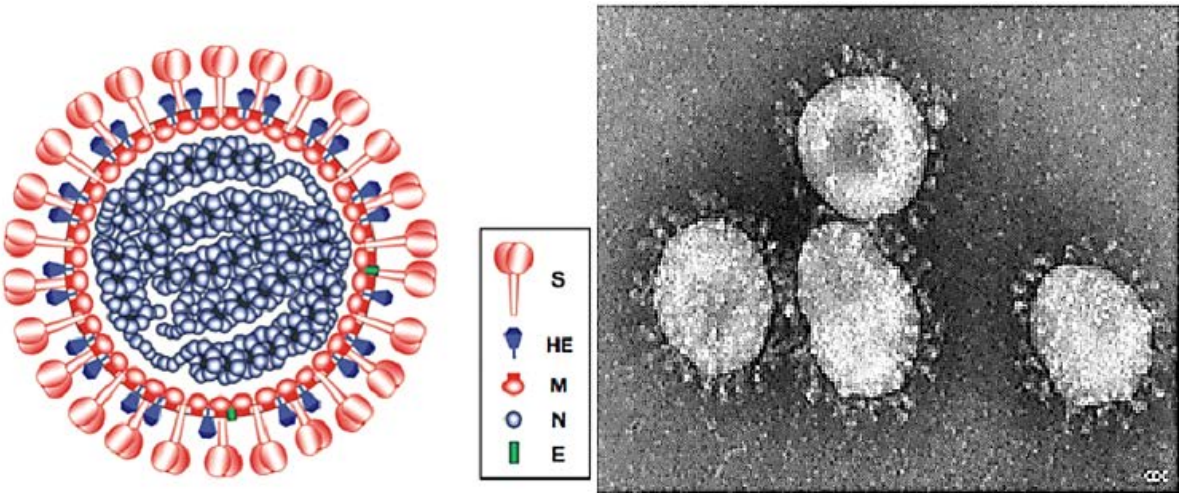
Збірка нових віріонів ініціюється вивільненням попередника капсиду P1 з поліпротеїну. Згодом він згортається білком-шапероном Hsp90 і розщеплюється $3CD^{pro}$, вивільняючи VP0 (попередник VP4 і VP2), VP1 і VP3. Ці капсидні білки збираються у спонтанному процесі, утворюючи протомер. П'ять протомерів разом утворюють пентамери, які, у свою чергу, збираються, утворюючи прокапсид.

Надалі вірусна (+)РНК пакується у прокапсиди з утворенням нових віріонів. Цей процес пов'язаний з активною реплікацією, оскільки пакуються лише нещодавно синтезовані геноми. Він керується взаємодією між білком 2C, який розташований у комплексі реплікації, та капсидним білком VP3.

Останнім етапом є дозрівання віріону шляхом індукованого РНК розщеплення VP0 на VP2 і VP4, з утворенням інфекційних вірусних частинок, які покидають клітину після її лізису.

14.2.1.2. Родина *Coronaviridae*

Геном вірусів цієї родини представлений несегментованою одноланцюговою (+)РНК. Віріони мають ліпідну оболонку і прикрашені довгими, 15–20 нм, виступами, які утворюють щось на кшталт корони. Через них родина і дістала свою назву. Нуклеокапсид, розташований під мембраною, має спіральну симетрію і складається з лінійної РНК, зв'язаної з численними копіями білка *фосфопротеїна*. Віріони коронавірусів плеоморфні і мають розмір 70–200 нм по різних осях. (Мал. 14.13).



Мал. 14.13. *Віріон вірусів родини Coronaviridae. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. S – білок, з якого побудовані виступи; HE – гемаглютинінестераза (її мають окремі групи коронавірусів) , M – інтегральний глікопротеїн мембрани; E – білок оболонки, який є мінорним структурним компонентом і присутній у кількості близько 20 молекул на віріон; N – білок нуклеокапсиду, який зв'язується з одноланцюговою РНК (ліворуч – за https://link.springer.com/article/10.1007/s10441-020-09382-z, праворуч – за https://www.worldscientific.com/doi/pdf/10.1142/S1793984421300077).*

Коронавіруси мають найбільші серед вірусів РНК-геноми, 27–31 тис. нуклеотидів. Це, зважаючи на хімічну нестабільність РНК, ставить їх перед необхідністю розвитку надійних систем *репарації* РНК, тобто відновлення її нормальної структури після спонтанних мутацій. І дійсно, на відміну від більшості РНК-вірусів, коронавіруси мають фермент *3′-5′-екзорибонуклеазу* (ExoN), який здійснює виправлення помилок спаровування основ і видаляє дефектні нуклеотиди. Репарація вірусної РНК утруднює розробку ефективних проти коронавірусів лікарських препаратів. Наприклад, вірус атипової пневмонії SARS-CoV виявився стійким до препарату рібовірин, який у вигляді аналога нуклеотиду вбудовується у склад РНК, заміщаючи там нормальні нуклеотиди: репаративні білки просто вирізають рібовірин з геномної РНК.

Коронавіруси інфікують птахів і ссавців. Передавання відбувається не біологічними векторами, а – залежно від виду вірусу – через фоміти або аерогенним та/або фекально-ора-

льним шляхом. У людей коронавіруси відомі ще з 1964 року і викликають переважно сезонні ГРЗ, вражаючи верхні дихальні шляхи. Але нещодавно з'явилися нові коронавіруси, які є досить небезпечними для людини – збудники SARS, MERS та COVID-19. Усі патогенні для людини коронавіруси належать до підродини *Orthocoronavirinae*, роду *Betacoronavirus*.

Вірус SARS-CoV (атипової пневмонії). У 2002 р. нове респіраторне захворювання людини з'явилось в південному Китаї. Наступного року один з лікарів, який лікував хворих, поїхав в подорож до Гонконгу, де захворів і помер. Згодом люди, які зупинялися в тому ж готелі, що і цей лікар, поїхали в Сінгапур, В'єтнам, Канаду і США, і вони прихопили з собою інфекційний агент. Так почалася епідемія захворювання, яке отримало назву важкого гострого респіраторного синдрому (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS), або атипової пневмонії. Слід зазначити, що влада Китаю спочатку приховувала факт появи нового захворювання, що сприяло його поширенню.

Ознаки і симптоми атипової пневмонії нагадували грип і включали жар, біль в м'язах і горлі, кашель і задуху. Близько 90% хворих видужували, але для інших 10% це захворювання виявилося летальним. Це були в основному люди, які мали додаткові захворювання на кшталт діабету, хвороб серця або послаблений імунітет. На перший погляд атипова пневмонія належить до хвороб дихальних шляхів, але у багатьох хворих інфекція поширювалася також на інші частини тіла. У деяких пацієнтів розвивалася діарея, і через декілька тижнів вірус знаходили в калі і сечі.

Причиною захворювання виявився новий коронавірус SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus). У природі не знайдено видів, що є резервуаром для вірусу атипової пневмонії. Коронавіруси з близькими вірусу атипової пневмонії геномами були виділені у продавців тварин в регіоні Китаю, де атипова пневмонія уперше з'явилася. Антитіла до цих вірусів були знайдені у працівників магазинів, але ніхто з них не хворів на атипову пневмонію. Схожий вірус також був виділений з декількох видів кажанів. Існує імовірність, що коронавіруси людини та інших видів ссавців неодноразово схрещувалися в організмі людей, але більшість вірусів, що з'явилися таким шляхом, були нездатні ефективно передаватися від людини людині.

Швидше за все, коронавірус атипової пневмонії виявився результатом подібного схрещування рідкісних вірусів, який придбав здатність передавання від однієї людини до іншої. Спалах атипової пневмонії контролювався з використанням карантинних заходів, але, не зважаючи на це, було зафіксовано 8437 випадків захворювання, серед яких 800 людей померло.

Вірус MERS-CoV (близькосхідного респіраторного синдрому). Перші випадки захворювання, яке спричинив новий вірус, були зареєстровані у людей на початку осені 2012 р. у Саудівській Аравії. Захворювання з переважним ураженням органів дихання спричиняв новий вид вірусу, який в 2013 р. отримав офіційну назву «коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому» (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV). До літа 2015 випадки MERS-CoV були виявлені в 23 країнах світу, включаючи, зокрема, Саудівську Аравію, Велику Британію, Катар, Ємен, Об'єднані Арабські Емірати, Францію, Німеччину, Італію, Грецію, Туніс, Єгипет, Малайзію, Південну Корею. Станом на 2016 р. в світі було зареєстровано 1 638 підтверджених випадків захворювання та 587 смертей від нього. Припускають, що вірус MERS-CoV перейшов на людей від верблюдів.

Коронавірус SARS-CoV-2 (від англ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, другий коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому), спочатку відомий як 2019-nCoV (novel Coronavirus 2019) викликає у людини так звану коронавірусну хворобу 2019 року, COVID-19 (COronaVIrus Disease 2019).

Пандемія, спричинена SARS-CoV-2 у 2019–2022 рр., призвела до безпрецедентних у новітній історії глобальних наслідків, включаючи колапс цілих галузей господарства та світову економічну кризу.

Наприкінці грудня 2019 р. уряд Китаю повідомив ВООЗ про спалах невідомої пневмонії у м. Ухань провінції Хубей. 22 січня 2020 р. місто було закрите на карантин, але локалізувати епідемію не вдалося. Згідно з деякими джерелами, поширенню епідемії сприяло те, що влада Китаю певний час її приховувала, так само, як і епідемію SARS-CoV-1 у 2002 р.

30 січня 2020 р. ВООЗ визнала спалах COVID-19 надзвичайною ситуацією міжнародного значення, а вже 11 березня 2020 р. оголосила, що він набув характеру пандемії.

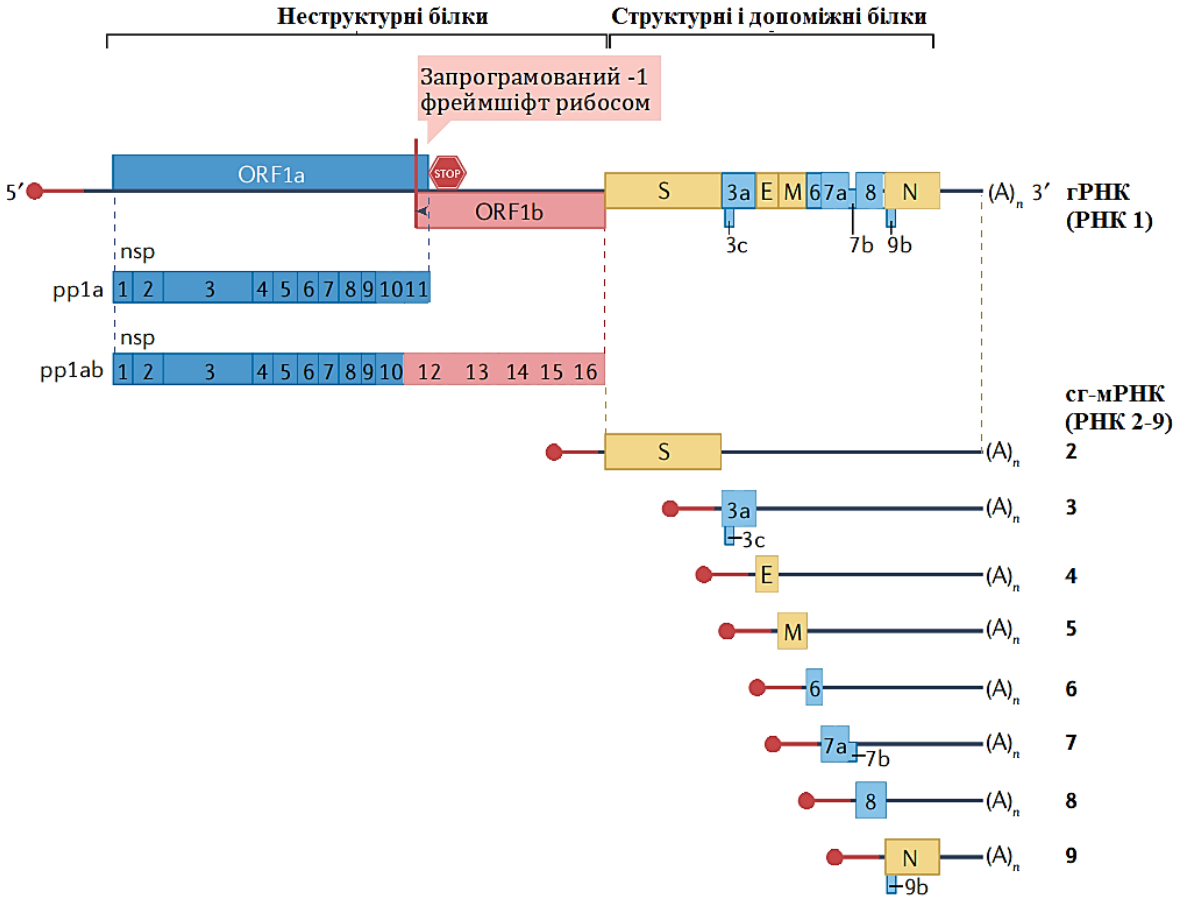
Пандемія охопила усі без винятку країни світу (щоправда, дані про ситуацію у країнах, які не підтримують повноцінного співробітництва з міжнародною спільнотою, наразі відсутні). За офіційною статистикою, на 01.01.2023 року всього інфіковано 664 995 199 осіб, летальних випадків 6 697 402, або 1,0%, видужали 636 910 280 осіб. Але летальність хвороби дуже залежить від віку і стану здоров'я хворих, і у старших вікових групах летальність захворювання в деяких країнах досягла 12% від кількості осіб, в яких воно було діагностовано. Наразі, на момент написання підручника, загальний рівень летальності хвороби значно знизилася, як відмічають спеціалісти (коеволюція вірусу і хазяїна? Див. розділ 11.2.1).

Як і усі інші коронавіруси, SARS-CoV-2 є зооантропонозним патогеном. Скоріш за все він виник у популяції кажанів: ідентичність геномної послідовності SARS-CoV-2 і пов'язаного з SARS коронавірусу кажанів RaTG13 складає 96,2%. Однак зараження людини сталося не безпосередньо від кажанів, а через посередництво іншого хазяїна, можливо – китайського паноголіна (*Manis pentadactyla*). Принаймні, функціональна ділянка гену, якій кодує антирецептор на поверхні віріонів SARS-CoV-2, ідентична відповідній ділянці геному коронавірусів, виділених з панґолінів. Вважається, що передавання вірусу людині сприяла специфічна атмосфера китайських ринків диких тварин, де і кажани, і панґолінів вільно продавались як домашні тварини та їжа.

Цікаво, що новий коронавірус має не дуже велику генетичну подібність з коронавірусом атипової пневмонії SARS-CoV (близько 79%) і коронавірусом близькосхідного респіраторного синдрому MERS-CoV (близько 50%). Таким чином, спорідненість між цими патогенами вказує лише на сам факт активної еволюції патогенних властивостей коронавірусів у поточний час. Характерно, що SARS-CoV-2 може передаватися від людини іншим ссавцям, зокрема кішкам, тхорам і тиграм.

Реплікація вірусу SARS-CoV-2. Основним рецептором, з яким *зв'язується* віріон SARS-CoV-2, є *ангіотензинперетворюючий фермент 2* (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2). Цікаво, що цей же рецептор використовується і збудником атипової пневмонії SARS-CoV. Приєднання до ACE2 обумовлено білком виростів S. Цей білок складається з двох частин, S1 і S2, які забезпечують приєднання до клітинної мембрани та злиття з нею відповідно. Після приєднання, необхідним кроком є розщеплення S клітинними протеазами, такими як трансмембранна серинова протеаза 2 (TMPRSS2), що активує його здатність до злиття мембран.

Геном являє собою одноланцюгову РНК довжиною 29870 нуклеотидів, ця РНК має 5′-кеп і 3′ полі(А) хвіст змінної довжини. Геном кодує принаймні 13 відкритих рамок зчитування (ORF), організованих переважно лінійно від 5'-кінця до 3'-кінця (Мал 14.14). Ділянка геному, що кодує білки, фланкована 5' нетрансльованою областю (UTR) і 3' UTR, які складаються з 265 і 337 нуклеотидів (за винятком хвоста плді(А)), відповідно. Геномна РНК має низку регуляторних послідовностей.



Мал. 14.14. *Структура геному коронавірусу SARS-CoV-2 і стратегія експресії вірусних генів. Відкриті рамки зчитування (ORF) зображені не в масштабі. Геномна РНК (гРНК) має 5'-кеп (червоне коло), за яким йде лідерна послідовність (червона лінія), яка є спільною в усіх субгеномних мРНК (сг-мРНК), і 3'-полі(А) хвіст. 5'-проксимальні три чверті геному кодують поліпротеїни реплікази pp1a і pp1ab, які розщеплюються з утворенням 16 неструктурних білків (nsp1–nsp16; синій від ORF1a і червоний від ORF1b). 3'-проксимальна одна чверть геному кодує структурні (жовтий) і додаткові (блакитний) білки. Структурні та допоміжні білки експресуються з вкладеного набору субгеномних мРНК (сг-мРНК), причому ORF3c, ORF7b і ORF9b експресуються за допомогою «послабленого сканування» рибосом. Знак STOP означає стоп-кодон ORF1a. E — білок оболонки; M — мембранний білок; N, нуклеокапсидний білок; S, білок виросту (за B. Malone et al., 2022).*

Після злиття мембран геномна РНК SARS-CoV-2 вивільняється в цитоплазму.

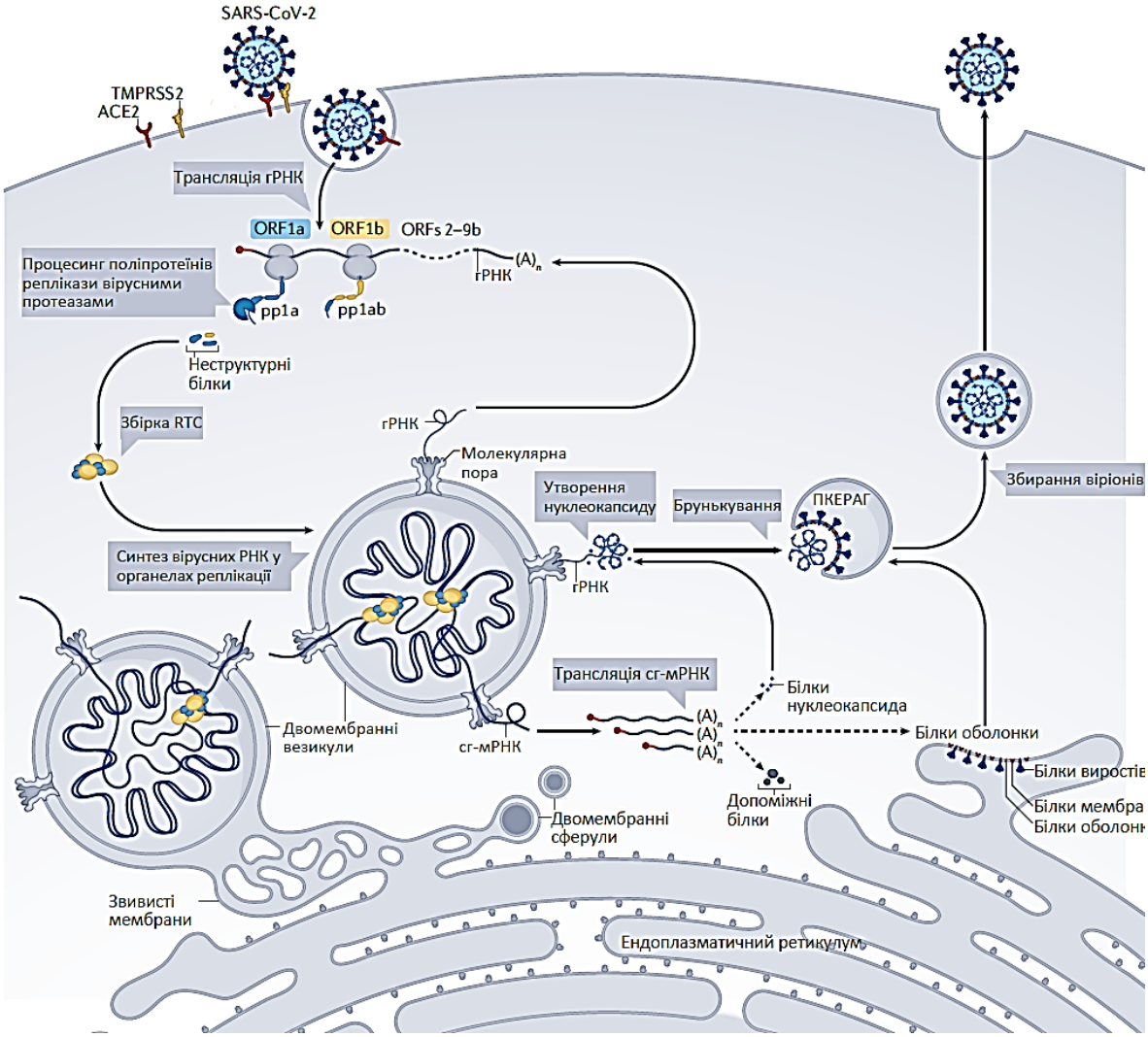
Подібно до всіх (+)РНК-геномних вірусів еукаріотів, реплікація SARS-CoV-2 відбувається повністю в цитоплазмі. Геномна РНК спочатку рекрутує рибосоми господаря і служить мРНК для трансляції двох великих ORF репліказ: ORF1a та ORF1b, які складають приблизно три чверті геному (Мал. 14.14).

Утворення pp1ab залежить від ділянки -1 фреймшіфту рибосом, безпосередньо перед стоп-кодоном ORF1a, таким чином у випадку зсуву рамки зчитування транскрипт pp1a подовжується на поліпротеїн, кодований ORF1b.

Шістнадцять зрілих неструктурних білків вивільняються з поліпротеїнів pp1a та pp1ab після протеолітичних розщеплень, які виконуються кодованою вірусом папаїноподібною

протеазою (PL^{pro}), розташованою у неструктурному білку 3 (nsp3) та хімотрипсиноподібною або основною протеазою (M^{pro}) у nsp5. Таким чином, pp1a утворює від nsp1 до nsp11, тоді як його більша версія pp1ab розщеплюється на nsp1-nsp10 і nsp12-nsp16.

В узагальненому вигляді схема циклу реплікації вірусу зображена на Мал. 14.15.



Мал. 14.15. *Цикл реплікації SARS-CoV-2. Білок виросту віріону взаємодіє з білком клітинної поверхні - ангіотензинперетворюючим ферментом 2 (ACE2), розщеплюючись при цьому клітинними протеазами (TMPRSS2), що активує його активність у злитті мембран віріона і клітини. Геномна РНК (гРНК), кепована на 5'-кінці (червоне коло) і поліаденільована ((A)n) на 3'-кінці, вивільняється з вірусної частинки та транслюється в два поліпротеїни реплікази, pp1a і pp1ab. Протеази розщеплюють pp1a і pp1ab на 16 неструктурних білків, які збираються в комплекси реплікації-транскрипції (RTC). Синтез вірусної РНК відбувається в двомембранних везикулах, які є частиною індукованих вірусом мембранних органел реплікації (вірусних фабрик). RTC продукують нові гРНК і набір субгеномних мРНК (сг-мРНК). Нещодавно створені гРНК можуть транслюватися, щоби отримати додаткові білки, служити матрицею для подальшого синтезу РНК або бути упакованими в нові віріони. Збирання віріонів починається з покриття гРНК нуклеокапсидними білками, нуклеокапсиди брунькуються у проміжний компартмент ендоплазматичного ретикулюму – апарата Гольджі (ПКЕРАГ), таким чином набуваючи ліпідний подвійний шар, що містить білки виростів, мембрани та оболонки віріонів (за B. Malone et al., 2022).*

Білок nsp1, що швидко вивільняється, опосередковує припинення трансляції мРНК хазяїна, тоді як інші неструктурні білки утворюють білкові комплекси, які беруть участь у синтезі вірусної РНК і називаються комплексами реплікації-транскрипції (RTC). Реплікація та транскрипція виконується переважно ферментами, що містяться в nsp12, nsp13, nsp14 та nsp16. Інші білки RTC виконують допоміжні ролі, модулюють вроджену імунну відповідь

хазяїна або переробляють клітинні мембрани в своєрідні двомембранні структури, вірусні фабрики, відомі як «органели реплікації», які сприяють синтезу вірусної РНК. Формування органел реплікації зазвичай передує експоненціальній фазі синтезу вірусної РНК.

Невідомо, чи є ідентичним склад RTC, які беруть участь у синтезі проміжного мінус-ланцюга геномної РНК, і RTC, в яких синтезується субгеномні мРНК. Можливо, баланс між реплікацією та транскрипцією може регулювати взаємодія зі специфічними білковими факторами.

Мембранні білки, білки оболонки і білки виростів вірусу вбудовуються в мембрану ендоплазматичного ретикулюму, і ця ділянка відбруньковується як проміжний компартмент ендоплазматичного ретикулюму і апарата Гольджі. В той же час геномні (+)РНК вкриваються білками нуклеокапсиду і брунькуються у цей проміжний компартмент таким чином, що утворюється двомембранна ендоцитозна везікула, внутрішня мембрана якої є ліпопротеїновою оболонкою віріона, а зовнішня мембрана зливається з плазматичною мембраною клітини під час екзоцитозу. Таким чином, нові віріони вивільняються із зараженої клітини.

У організмі людини найбільш вразливим цільовим органом для SARS-CoV-2 є легені. Справа в тому, що 83% клітин, які експресують ACE2, є клітинами легеневого альвеолярного епітелію II типу (alveolar epithelial type II cells, AECII). Однак не менш активно ACE2 експресується і на поверхні епітеліальних клітин кишківника, функціонуючи там як корецептор в процесі поглинання поживних речовин, зокрема амінокислот. Тому кишківник також може виявитися важливими воротами інфекції. Існує припущення, що людина може заразитися SARS-CoV-2, спершу торкаючись поверхонь, що несуть на собі вірус, а потім – власних слизових оболонок, хоча беззаперечних доказів таке припущення не має.

Різноманіття алельних варіантів гену, що кодує ACE2, може впливати на летальність COVID-19. Так, у італійців були виявлені варіанти цього гену, особливо сприятливі для інфікування SARS-CoV-2.

Після потрапляння в організм, SARS-CoV-2 може спричинити у ньому патологічні стани різного ступеню важкості. У приблизно 80% випадків захворювання протікає як типове сезонне ГРВІ і не потребує специфічного лікування. Але важкі форми COVID-19 призводять до специфічних ускладнень, у т. ч. пневмонії та дихальної недостатності з великим ризиком смерті. Ці явища частіше розвиваються у літніх людей та пацієнтів з супутніми захворюваннями: астмою, діабетом та хворобами серця.

Небезпеку коронавірусної хвороби посилюють і суто епідеміологічні чинники. Спалах призвів до перевантаження системи охорони здоров'я у багатьох країнах світу, і для порятунку пацієнтів іноді просто не вистачало обладнання. Сприяє поширенню захворювання і незвично тривалий інкубаційний період, що досягає 14 діб. Нарешті, важливою проблемою є наявність безсимптомних носіїв (їхній відсоток наразі не встановлений), що здатні заражати оточуючих.

14.2.1.3. Інші віруси людини і тварин з (+)РНК-геномами

Родина Flaviviridae. Родина дістала таку назву від вірусу жовтої лихоманки (лат. flavus - жовтий). Жовта лихоманка, у свою чергу, зветься так через жовтяницю, що розвивається у деяких пацієнтів. Геном складається з несегментованої одноланцюгової (+)РНК, яка одночасно є мРНК вірусу. Особливістю геномної РНК вірусу є відсутність полі(А)-хвоста на 3′-кінці. Віріони покриті ліпідною оболонкою, мають сферичну форму, діаметр близько 40–60 нм; розмір віріонів варіює у різних родів.

Родина містить низку некласифікованих вірусів і три роди:

− *Flavivirus* – вірус жовтої лихоманки, вірус лихоманки Західного Нілу, вірус лихоманки Денге;

− *Hepacivirus* – вірус гепатиту С (єдиний вид роду);

− *Pestivirus* – вірус діареї худоби, вірус класичної лихоманки, або чуми свиней.

Найбільш небезпечними захворюваннями, які викликають віруси цієї родини, наведені нижче.

Вірус жовтої лихоманки викликає гостре захворювання, поширене в Африці і Південній Америці. Передається з укусом комарів. Джерелом і резервуаром інфекції слугують дикі тварини (мавпи, опосуми, рідко інші види), а також хвора людина. Переносники – комарі.

Існує три варіанти жовтої лихоманки у людей. Це лихоманка джунглів (сільський тип), міська лихоманка і проміжний тип. У випадку сільського типу у тропічних лісах (сельві) жовта лихоманка має місце у мавп, інфікованих укусами «диких» комарів (комарі роду *Aedes*). Заражені мавпи можуть поширювати інфекцію, передаючи її здоровим комарам. Інфіковані «дикі» комарі з укусом передають вірус людям, що знаходяться в лісі. Цей ланцюжок приводить до окремих випадків інфекції переважно у молодих людей, що працюють на лісозаготівлі, не приводячи до епідемій і великих спалахів. Інфекція також може поширюватися і між інфікованими людьми. Проміжний варіант інфекції має місце у вологих або напівсухих африканських саванах, є домінуючою формою інфекції на території континенту. Мають місце епідемії обмеженого масштабу, що відрізняються від міського варіанту інфекції. «Напівдомашні» комарі заражають і тварин, і людей. Протягом таких епідемій одночасно може бути уражено кілька сіл, однак летальність за такого варіанта жовтої лихоманки нижче, ніж у випадку міського. Міський варіант інфекції супроводжується епідеміями великого масштабу, які викликані припливом мігрантів в урбанізовані регіони, що відрізняються високою щільністю населення. «Домашні комарі» (виду *Aedes aegypti*) переносять вірус від людини до людини, мавпи не беруть участь в епідемічному ланцюжку передавання захворювання.

Загалом, щорічно у світі відбувається близько 200000 випадків захворювання жовтою лихоманкою, з яких 15% закінчуються смертю.

Вірус жовтої лихоманки проникає в організм людини під час укусу інфікованим комаром. Відомі випадки лабораторних заражень аерогенним шляхом. Від місця впровадження збудник поширюється по лімфатичних шляхах і досягає регіонарних лімфатичних вузлів, де відбувається його реплікація і накопичення. Через декілька днів вірус проникає в кров, де його можна виявити впродовж 3–5 днів. Гематогенним шляхом вірус проникає в різні органи (печінка, селезінка, нирки, кістковий мозок, лімфатичні вузли), викликаючи їх ураження. Розвивається тромбогеморагічний синдром, який проявляється у вигляді множинних крововиливів в різних органах. Ураження печінки веде до вираженої жовтяниці. Зміни виявляють в нирках (набряк, крововиливи, некроз ниркових канальців), селезінці, міокарді, лімфатичних вузлах.

У важких випадках смерть настає від ниркової недостатності або інфекційного колапсу (інфекційно-токсичного шоку). У випадку сприятливого результата з 7– 9-ї діб стан хворого поступово покращується. У легких випадках симптоми хвороби виражені слабо, жовтяниці

і тромбогеморагічного синдрому може не бути. За умови дуже важкої форми хворі можуть померти на 2–3-й день хвороби ще до розвитку жовтяниці (блискавична форма).

У людей, що перенесли хворобу, виникає довічний імунітет.

Специфічних препаратів для лікування жовтої лихоманки не існує.

Заходи профілактики включають вакцинацію людей, що виїжджають в ендемічні райони. Вакцина містить ослаблений вірус, і надійний імунітет розвивається впродовж одного тижня у 95% прищеплених і зберігається впродовж 30– 35 років (можливо довічно).

Хворий є джерелом зараження навіть у випадку легких форм захворювання і має бути абсолютно захищений від укусів комарів. З цією метою навколо ліжка встановлюють сітки, металеві або марлеві. Така ізоляція хворого потрібна упродовж перших 4 днів, оскільки пізніше за цей термін він вже не є джерелом зараження комарів.

Неспецифічна профілактика включає запобігання укусам комарів і дезінфекцію довколишніх водойм.

Вірус лихоманки Денге передається комарами і у випадку первинного зараження викликає середньої тяжкості гарячковий стан, схожий з грипом, або не викликає ніяких симптомів. Віруси циркулюють в крові інфікованих людей впродовж 2–7 днів, і приблизно впродовж цього ж часу триває лихоманка. Після первинного зараження у людини залишаються антитіла до вірусу, і за умови повторного зараження, використовуючи антитіла як рецептори, вірус заражає моноцити і макрофаги. Активна реплікація вірусу в цих клітинах може призводити до серії вторинних реакцій (активація комплементу, системи кінінів та ін.) і до розвитку тромбогеморагічного синдрому, що призводить до загрозливої для життя геморагічної лихоманки Денге або шокового синдрому Денге. Під час цього у хворого підвищується проникність і крихкість капілярів, знижується вміст тромбоцитів, розвивається кровотеча внаслідок недостатності деяких факторів системи згортання крові. Геморагічні прояви виникають не лише в шкірі, слизових оболонках, але і у внутрішніх органах: ендо- і перикарді, плеврі, очеревині, слизовій оболонці шлунку, кишківнику, головному мозку.

Вірус гепатиту С. Гепатит С звуть «ласкавим вбивцею» через здатність маскуватися під виглядом безлічі інших захворювань. Він щорічно вбиває більше півмільйона жителів нашої планети. Зараження вірусом гепатиту С відбувається парентерально, тобто не через шлунково-кишковий тракт. Заразитися гепатитом, який знищує печінку, можна в манікюрному кабінеті, через зубну щітку, під час переливання крові, через шприц, в перукарні, роблячи пірсинг або татуювання. Джерелом інфекції є хворі з активною формою гепатиту С і люди, що несуть вірус в латентній формі.

Від моменту зараження до клінічних проявів проходить від 2-х до 26-и тижнів.

У більшості випадків ніяких клінічних проявів хвороби під час первинного зараження не виникає і людина довгі роки не підозрює, що хворіє, але вона є джерелом інфекції.

Часто люди дізнаються про те, що вони є переносником вірусу гепатиту С після здачі аналізу крові протягом звичайного медичного обстеження або під час донорства крові. Багато людей живуть від 20 до 40 років з вірусом і не стають серйозно хворими, і у них не розвивається печінкова недостатність . Проте хронічна форма хвороби нерідко переходить в цироз і рак печінки. Хронічний перебіг розвивається приблизно у 90% дорослих хворих і до 20% – у хворих дітей. Онкогенний потенціал вірусу гепатиту С ми обговорювали у розділі 8.2.1.

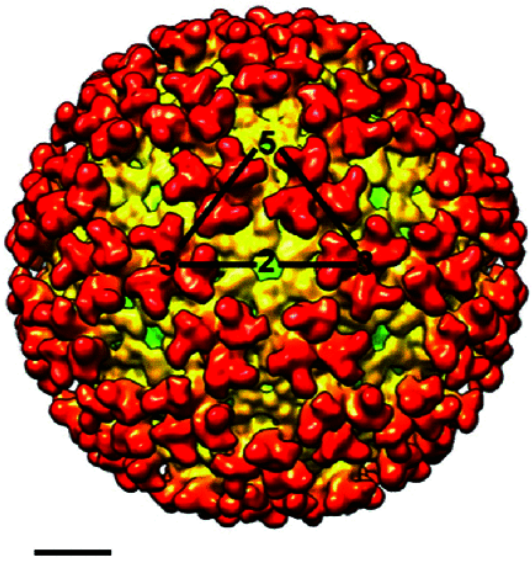
Вірус лихоманки Західного Нілу. У 1999 р. деякі мешканці Нью-Йорка захворіли вірусним енцефалітом; частина хворих померла. В цей же час захворіли деякі птахи в зоопарку, спостерігалася і загибель диких птахів, особливо ворон.

Діагностичні тести показали, що хворі люди і птахи були інфіковані вірусом Західного Нілу. Цей вірус відомий з 1937 року, коли уперше був виділений у жінки з регіону Західного Нілу в Уганді. Окрім Африки, цей вірус траплявся в Східній Європі, Західній Азії і Середньому Сході, але ніколи до 1999 р. не траплявся в Північній Америці. У більшості випадків зараження людей вірусом Західного Нілу протікає безсимптомно, але близько 20% інфікованих захворює. Симптомами захворювання є лихоманка і біль в м'язах. Менш ніж у одного відсотка інфікованих людей інфекція поширюється до центральної нервової системи, викликаючи важке захворювання на кшталт енцефаліту, який може призвести до смерті. Як правило, це трапляється у людей старше 60 років. Захворювання, що викликається вірусом, відоме як енцефаліт Західного Нілу або лихоманка Західного Нілу.

Вірус має широке коло хазяїв і вражає птахів, людей та інших хребетних тварин. Також він реплікується в комарах, які і є переносниками вірусу між різними хребетними тваринами. Захист від цього вірусу включає використання репелентів, що відлякують комах, і обробку ділянок розмноження комарів інсектицидами.

Залишається невідомим, яким чином вірус потрапив до США в 1999 р., але нині він дуже поширився, за п'ять років досягнувши Канади, Центральної Америки і Карибських островів. Цей вірус викликав сотні смертей людей в Північній Америці. Можливо вірус поширювався птахами, адже специфічні до нього антитіла були виявлені у сорок і чорних дроздів, хоча ці птахи були здоровими.

Родина Togaviridae. Геном тогавірусів являє собою несегментовану одноланцюгову (+)РНК, що має кеп на 5′- кінці і полі(А)-хвіст на 3′- кінці. Віріони мають оболонку і утворюють сферичні частинки діаметром 65–70 нм, з виступами глікопротеїну. Нуклеокапсиди мають ікосаедричну симетрію, побудовані з 240 мономерів (T=4) (Мал. 14.16).



Мал. 14.16. Віріон вірусів родини Togaviridae. Тривимірна кріоелектронна реконструкція вірусу чикунгунья з роздільною здатністю 10,2 Å. Трикутник окреслює одну ікосаедричну одиницю з позначеними осями симетрії. Смужка дорівнює 10 нм (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae).

Родина включає рід *Alphavirus*. Раніше до цієї родини належав і род *Rubivirus*, але в 2022 році він був віднесений до нової родини *Matonaviridae* (див. нижче). Альфавіруси виклика-

ють захворювання тварин і людини. Переносники вірусів і резервуари інфекції – членистоногі (комарі і кліщі), які трансоваріально передають їх потомству, а також примати. Прояв захворювання сезонний, осередковий. Патогенез і клініка альфавірусних інфекцій дуже різноманітні. Це або лихоманка (Синдбіс, Карельська, Чикунгунья, О'Ньон-Ньонг, лісу Семлики) з більш-менш вираженими ураженнями внутрішніх органів (печінка, селезінка), іноді з появою висипів, або – важкі форми енцефаломієлітів (Східний, Західний, Венесуельський).

Родина Matonaviridae. Родина *Matonaviridae* включає віруси з оболонкою з геномом +РНК розміром 9,6–10 т.п.н. До цієї родини належить єдиний рід *Rubivirus*. Рід *Rubivirus* включає вірус краснухи (вид *Rubivirus rubellae*), що інфікує людей, вірус рухугу (ruhugu virus, за ім'ям регіону Рутете в Уганді та за місцевою назвою кажанів) (вид *Rubivirus ruteetense*), що інфікує кажанів, і вірус рустрели (rustrela virus, за назвою лагуни у Балтійському морі) (вид *Rubivirus strelense*), що інфікує гризунів і тварин зоопарку.

Вірус краснухи. До рубівірусів належить збудник краснухи (лат. rubella) – епідемічного вірусного захворювання з інкубаційним періодом близько 15–24 діб. Після інкубаційного періоду з'являється дещо підвищена температура з головним болем, фарингітом, кон'юнктивітом, висипанням. Це зазвичай досить безпечне захворювання, що зачіпає в основному дітей, але воно може спровокувати серйозні вроджені вади, якщо жінка заражається на початку вагітності.

Джерелом інфекції є лише людина. Це або хворі з клінічно вираженою формою краснухи, або особи, у яких краснуха протікає атипово, без висипу, а також діти з вродженою краснухою, в організмі яких вірус може зберігатися протягом багатьох місяців (до 1,5 років і більше). До введення в практику активної імунізації краснуха траплялася у вигляді епідемічних спалахів з інтервалом 6–9 років. Введення щеплень проявилося в різкому зниженні захворюваності. Наприклад, в США в 1964 р. зареєстровано більше 1,8 млн. хворих краснухою, причому в результаті вродженої краснухи народилося понад 20000 дітей з аномаліями розвитку. У 1984 р. краснухою захворіло всього 745 чоловік.

Вірус краснухи протягом природної інфекції проникає в організм через слизові оболонки дихальних шляхів. Надалі настає віремія. З кров'ю вірус розноситься по усьому організму, має дерматотропні властивості, викликає зміни лімфатичних вузлів, які збільшуються вже у кінці інкубаційного періоду. Антитіла в сироватці з'являються через 1–2 дні після висипання. Надалі їхній титр наростає. Після перенесеного захворювання виникає стійкий довічний імунітет.

Вірус краснухи має також тропізм до ембріональної тканини і значно порушує розвиток плоду. Частота поразок плоду залежить від термінів вагітності. Захворювання краснухою на 3-4-му тижнях вагітності обумовлює природжене каліцтво в 60% випадків, на 9-12-му тижні – в 15% і на 13-16-му тижні – в 7% випадків. За умови захворюванні вагітних краснухою під час віремії вірус потрапляє в плаценту, там розмножується і інфікує плід. Інфекція викликає порушення мітотичної активності, хромосомні зміни, що призводить до відставання у фізичному і розумовому розвитку. За умови вродженої краснухи, незважаючи на наявність в сироватці крові антитіл до вірусу, збудник тривалий час (до 31 місяця) зберігається в організмі дитини. Дитина протягом усього цього часу може бути джерелом інфекції для інших дітей.

14.2.2. Віруси рослин

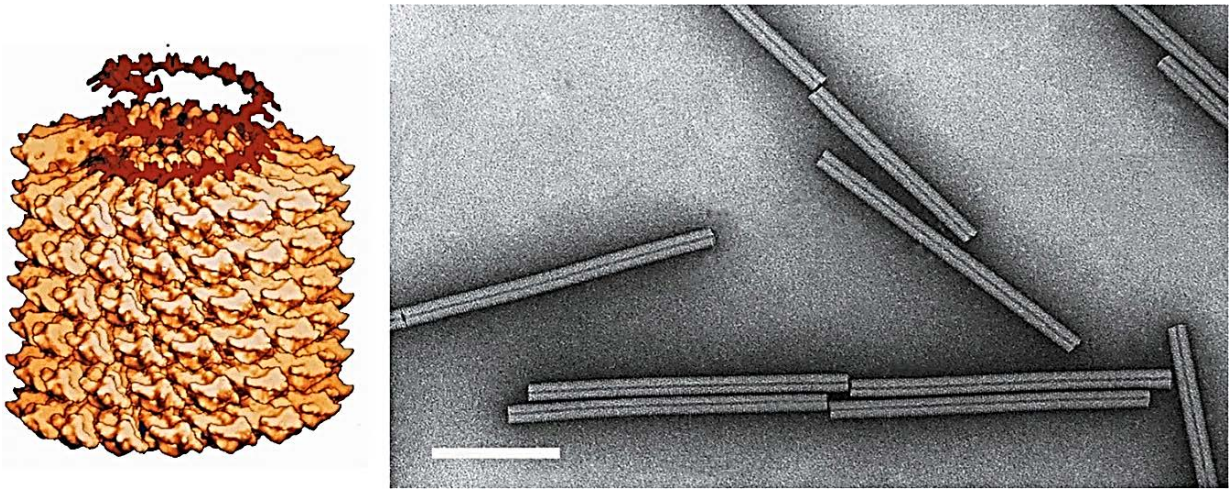
Віруси рослин з (+)РНК-геномами дуже рясно зустрічаються. Навіть перший вірус, ідентифікованій саме як вірус, збудник хвороби особливої небактерійної природи – вірус тютюнової мозаїки – належав саме до таких вірусів.

14.2.2.1. Родина *Virgaviridae*

Родина *Virgaviridae* — родина вірусів рослин із паличкоподібними віріонами, геномом оцРНК із 3′-кінцевою тРНК-подібною структурою. Назва родини походить від латинського слова virga (стрижень), оскільки всі віруси цієї родини паличкоподібні. Віруси досить різноманітні. Повідомлялося про їх виявлення у широкого діапазону видів трав'янистих, однота дводольних рослин, але діапазон господарів окремих представників зазвичай обмежений. Усі представники можуть бути передані експериментально шляхом механічної інокуляції, і для представників роду *Tobamovirus* це єдиний відомий спосіб передавання. У деяких родів передавання відбувається ґрунтовими переносниками, тоді як представники роду *Hordeivirus* і *Goravirus* передаються через пилок і насіння.

У якості прикладу реплікації вірусів цієї родини розглянемо класичний приклад - **вірус тютюнової мозаїки (ВТМ)**. Цей вірус належить до роду *Tobamovirus.*

Віріон вірусу тютюнової мозаїки не має оболонки, паличкоподібний (Мал. 14.17).



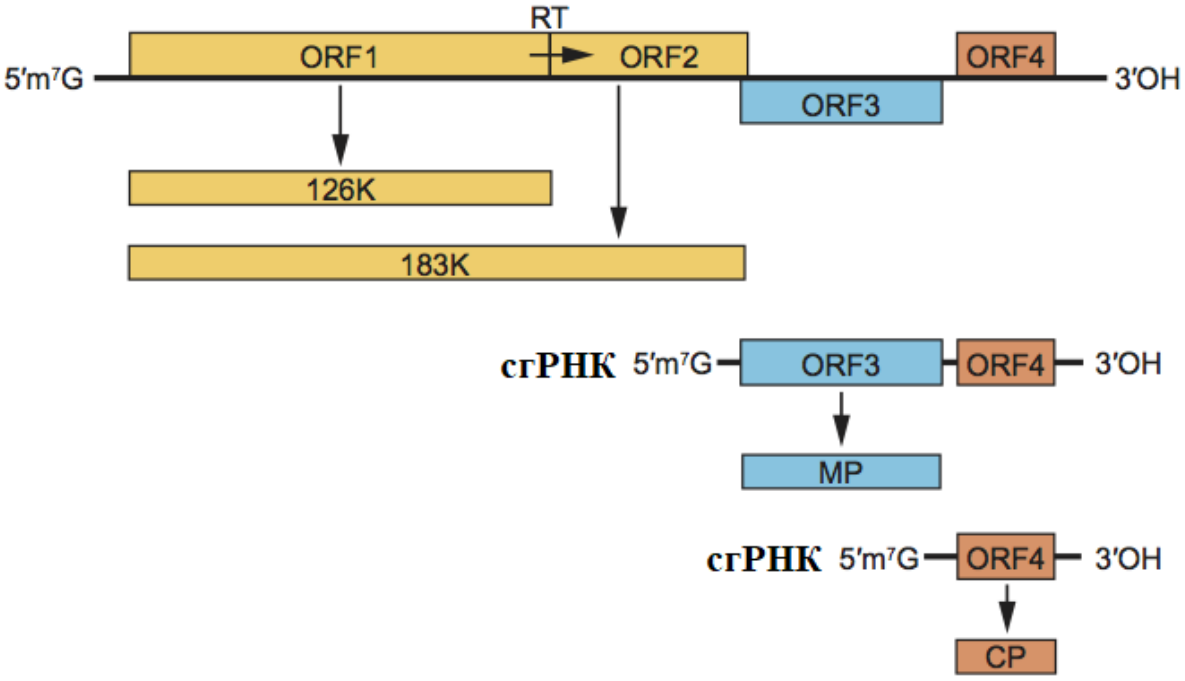
Мал. 14.17. *Віріон ВТМ. (Ліворуч) Модель частинки вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ). Показана РНК, яка, як вважається, бере участь у процесі складання. (Праворуч) Електронна мікрофотографія частинок ВТМ, пофарбованих уранілацетатом. Смужка дорівнює 100 нм (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Virgaviridae).*

Його капсид складається з 2130 молекул білка оболонки, який самозбирається у паличкоподібну спіральну структуру (16,3 молекул білка на виток спіралі) навколо РНК. Білковий мономер складається з 158 амінокислот. Віріони мають ~300 нм у довжину та ~18 нм у діаметрі. Негативно пофарбовані електронні мікрофотографії показують чіткий внутрішній канал радіусом ~2 нм. РНК розташована в радіусі ~4 нм і захищена від дії клітинних ферментів білком оболонки.

Геном вірусу тютюнової мозаїки кодує чотири білка (Мал 14.18). Білки реплікази 126 кДа і 183 кДа транслюються безпосередньо з 5'-проксимальної ORF геномної РНК. Білок 126 кДа містить домени метилтрансферази і гелікази. Білок 183 кДа додатково містить домен РНК-полімерази, і його транскрипт утворюється шляхом випадкового зчитуванням «слабкого» кодону термінації транскрипції ORF1.

Білок-репліказа 183 кДа є єдиним білком, необхідним для реплікації, але білок реплікації 126 кДа підвищує її ефективність. Нижчі ORF кодують транспортний білок (MP) та білок капсиду (CP), які транслюються з відповідних 3′ ко-кінцевих субгеномних РНК, обидві з яких містять 5′ кеп.

Вірус тютюнової мозаїки проникає в рослинні клітини лише через механічні ушкодження, які або тимчасово пошкоджують плазматичну мембрану, або дозволяють вірусній частці потрапити в клітину шляхом піноцитозу. Протягом 3-х хвилин після входу в клітину, починає декапсидація геномної РНК, і видалення білків капсиду дозволяє трансляцією вірусної (+)РНК. Вірусна РНК утворює невеликі гранули в цитоплазмі менш ніж через п’ять хвилин після проникнення в клітину. Гранули асоційовані з ендоплазматичним ретикулумом і фактично являють собою вірусні фабрики. Цікаво, що для утворення гранул потрібен 5'-метілгуанозиновий кеп: за його відсутності гранули не утворюються і вірусна РНК деградує.



Мал. 14.18. Організація геному ВТМ. Геномна РНК довжиною близько 6400 нуклеотидів кепована і є матрицею для експресії білків 126 і 183 кДа. Дистальні 3′ ORF транспортного білка (MP) і білка капсида (CP) експресуються з окремих 3′ кокінцевих субгеномних РНК (сгРНК). Кеп показаний як 5′m⁷G, RT – «слабкий» кодон термінації у кінці ORF1, через який випадковим чином відбувається транскрипція з утворенням транскрипту білка 183 кДа (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Virgaviridae).

Видалення білків капсиду вірусної РНК може зробити її доступною для системи сайленсингу. Показано, що згаданий вище білок 126 кДа діє як супресор сайленсингу РНК. Білок 126 кДа зв’язується з дуплексами міРНК, можливо, секвеструє їх, щоби запобігти утворенню РНК-індукованого комплексу сайленсингу.

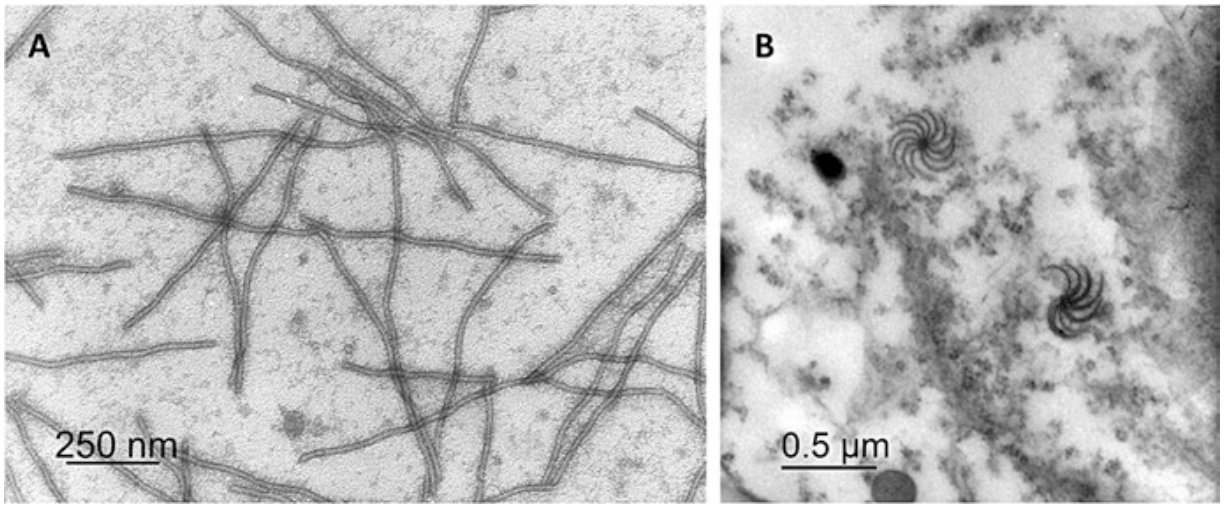
Після утворення реплікази, ВТМ використовує свої батьківські геноми для синтезу проміжних комплементарних негативних ланцюгів, які служать матрицями для синтезу повнорозмірних позитивних ланцюгів потомства та субгеномних мРНК, що кодують MP та CP. Реплікація ВТМ відбувається в асоційованому з мембранами комплексі, що містить білки реплікації 126 кДа і 183 кДа, транспортні білки, вірусну РНК та білки клітини-господаря.

Після того, як буде напрацьована достатня кількість білкових субодиниць капсиду і дочірніх вірусних геномів, починається збирання нових віріонів. Клітини-господарі залишаються живими, а віруси переміщуються від однієї клітини до іншої через плазмодесми, а також по флоемі, викликаючи системну інфекцію.

Вірус тютюнової мозаїки дуже стійкий, і може роками існувати в сигарах і сигаретах, виготовлених із зараженого листя, не втрачаючи інфекційності.

14.2.2.2. Родина *Potyviridae*

Потівіруси — це найбільша родина РНК-вірусів рослин, члени якої мають одноланцюгові геноми позитивної РНК і гнучкі ниткоподібні віріони довжиною 680–900 нм і шириною 11–20 нм (Мал. 14.19, А). Більшість геномів є не сегментованими, але геноми представників роду *Bymovirus* складаються з двох сегментів. Деякі представники викликають серйозні епіфітотії культурних рослин. Більшість представників мають вузьке коло природних господарів, але деякі представники заражають види до 30 родин рослин. Передавання експериментальним господарям легко здійснюється шляхом механічної інокуляції. У природі, крім механічного шляху, віруси передаються багатьма видами неспецифічних переносників, наприклад попелицями, неперсистентним способом. Багато вірусів широко поширені. У деяких випадках поширенню сприяє передавання насінням.



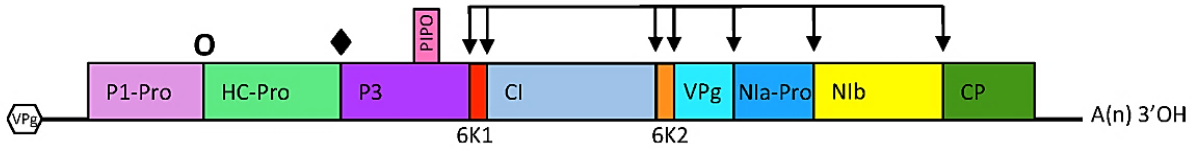
Мал. 14.19. *Potyviridae. Електронно-мікроскопічні мікрофотографії віріонів вірусу Y картоплі (A) і структур типу «вертушки» або «сувої» (B) в інфікованих клітинах рослин (за Lacomme C., Jacquot E., 2017).*

Усі представники родини під час інфекції утворюють цитоплазматичні циліндричні включення (Мал. 14.19, В) — масив вірусного білка 70 кДа, який володіє АТФ-азною та геліказною активністю. Деякі потівіруси індукують тільця ядерних включень, які є співкристалами двох кодованих вірусом білків – NIa та NIb – які присутні в еквімолярних кількостях. Аморфні тільця включення (гранули, індуковані потівірусом) також помітні в цитоплазмі під час певних потівірусних інфекцій і представляють собою агрегації вірусних неструктурних білків.

Типовим представником родини є вірус картоплі Y (*potato virus Y*, PVY). PVY вперше був пов’язаний із захворюванням, що спричиняє дегенерацію («виродження») картоплі, на початку 1930-х років. Вірус поширений у всьому світі та має широкий діапазон господарів, що складається з культивованих видів пасльонових і багатьох пасльонових і непасльонових бур’янів. Це один з найбільш економічно важливих патогенів рослин і викликає шкодо-

чинні захворювання культурних рослин, таких як картопля, тютюн, томати та перець, а також декоративних рослин. Вірус передається від рослини до рослини більш ніж 40 видами попелиці неперсистентним способом, також може передаватися механічно, а у картоплі – при посадці заражених вірусом насіннєвих бульб.

Віріони PVY мають ниткоподібну гнучку форму з довжиною 730 нм і діаметром 12 нм (Мал. 14.19, А). *Геномна* (+)РНК має довжину 9,7 т.н., ковалентно пов'язана з кодованим вірусом білком VPg на 5′-кінці та має 3′-поліаденільований хвіст. Геном експресується як поліпротеїн із приблизно 3062 амінокислотних залишків, який розщеплюється трьома вірус-специфічними протеазами в 11 зрілих білків (Мал. 14.20).



Мал.14.20. *Організація геному і кодовані білки вірусу картоплі Y. Геном показано лінією, а ORF поліпротеїна витягнутим прямокутником, у якому показані зрілі продукти протеолітичного розщеплення. VPg - зв'язаний з геномом вірусний білок, ковалентно приєднаний до 5'-кінцевого нуклеотиду, представлений шестикутником; P1-Pro (протеаза протеїну 1), білок із сериновою протеолітичною активністю, HC-Pro (протеаза допоміжного компонента), протеїн з активністю допоміжного компонента для передавання попелицями та протеолітичною активністю цистеїнової протеази; P3 (білок 3); PIPO (pretty interesting Potyviridae ORF, досить цікавий Potyviridae ORF); 6K (пептид шість кілодальтон); CI білок цитоплазматичних включень; NIa-Pro протеаза ядерного включення А,; Nib білок ядерного включення В, РНК-залежна РНК-полімераза; CP білок оболонки. Показано сайти розщеплення протеазами P1-Pro, (O), HC-Pro (◆) і NIa-Pro (↓) (за Lacomme C., Jacquot E., 2017).*

Після проникнення віріонів в клітину механічним шляхом або з допомогою переносників, геномна РНК вірусу спочатку має бути трансльована в цитоплазмі. Декапсидація віріонів може відбуватися ко-трансляційно, і після трансляції утворюється один поліпротеїн. Ковалентно зв'язаний з 5′-кінцем РНК білок VPg відіграє ключову роль в ініціації трансляції (див. Мал. 4.26). Трансльований поліпротеїн розщеплюється вірусними протеазами на функціональні білки (Мал. 14.20). Зсув рамки зчитування рибосоми на цистроні P3 призводить до виробництва білка P3N-PIPO, який є транспортним білком, розташований у плазмодесмах і бере участь у русі вірусу від клітини до клітини.

Згодом за участю вірусних білків і ймовірно факторів господаря формується вірусний комплекс реплікації. Вважають, що в його утворенні приймає участь ендоплазматичний ретикулум. В ньому NIb-РНК-залежна РНК-полімераза, вірусний геномний білок (VPg), білок циліндричного включення (CI) і білок оболонки (CP) у поєднанні з захопленим еукаріотичним фактором ініціації трансляції клітини-господаря (eIF4E) або його ізоформою (eIF(iso)4E) забезпечують як реплікацію геному, так і складання нових віріонів. У цьому комплексі на матриці геномної (+)РНК синтезується комплементарний (-)-ланцюг через утворення проміжного дволанцюгового продукту, і надалі синтезуються численні (+)РНК вірусу.

Оскільки дволанцюгова РНК є потужним індуктором противірусного захисту, зокрема сайленсингу РНК, вірусу потрібно протидіяти цьому процесу. Як показано, супресором сайленсингу є білок HC-Pro, хоча можливо приймають участь і деякі інші вірусні білки.

Стратегія експресії потівірусів через поліпротеїн передбачає виробництво еквімолярних кількостей усіх генних продуктів, що призводить до значного надлишку деяких білків, які можуть формувати тільця включення. Цікаво, що в той час як «вертушки» CI утворюються

завжди (4.19, В), аморфні включення HC-Pro або кристалічні включення NIa/NIb присутні при деяких, але не при всіх, потівірусних інфекціях.

Після утворення дочірніх віріонів, вони через плазмодесми потрапляють у суміжні клітини. У цьому процесі беруть участь три білка: транспортний білок P3N-PIPO, білок циліндричного включення (CI) і білок оболонки (CP).

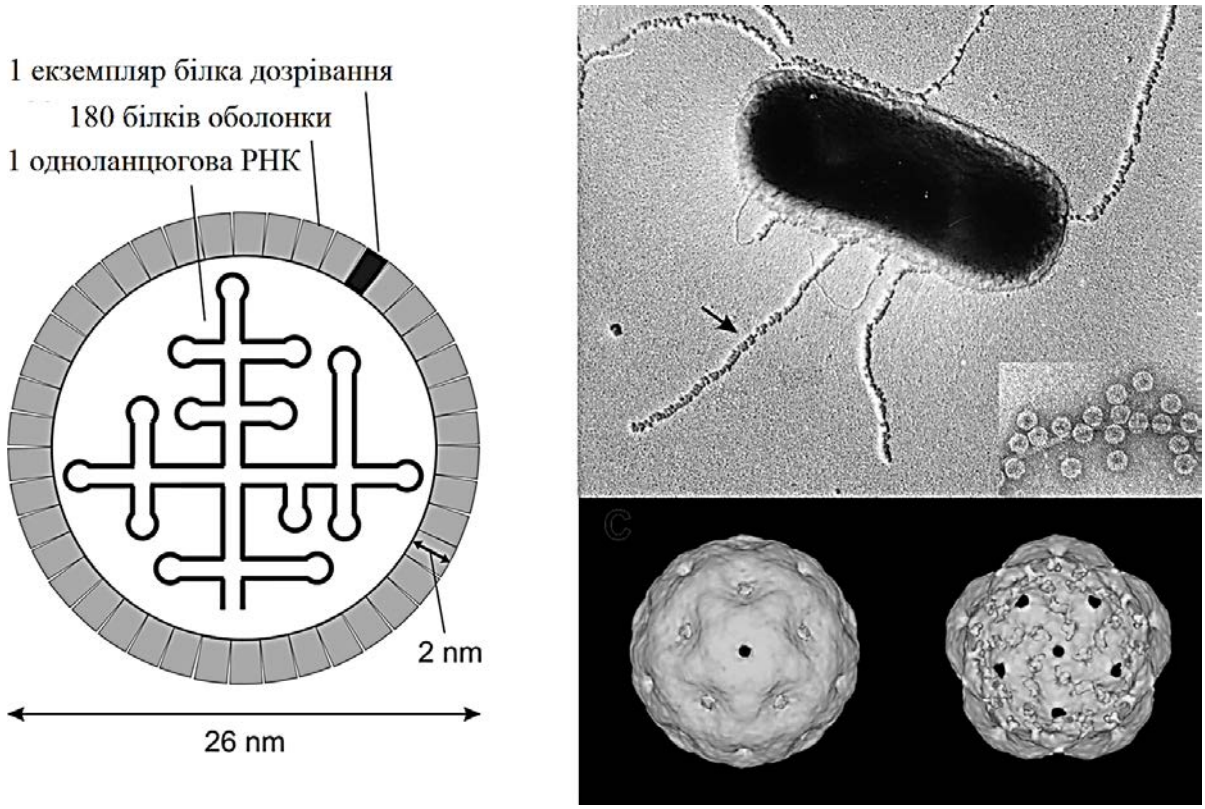
Системно по рослині вірус розповсюджується по флоемі.

14.2.3. Віруси прокаріот

14.2.3.1. Родина *Leviviridae*

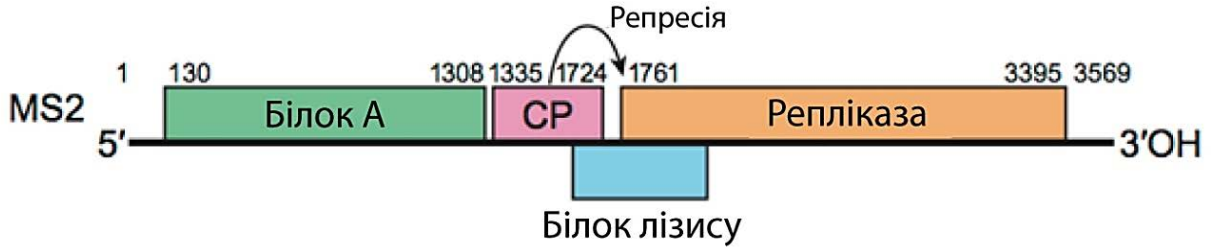
Всі одноланцюгові РНК-фаги належать до родини *Leviviridae* (від латинського levis — «світлий»), мають ікосаедричні капсиди без оболонки. Фаги цієї родини мають одні з найменших геномів РНК. Їх геном - це (+)РНК, яка кодує лише кілька генів. Фаги інфікують різні грамнегативні бактерії, включаючи *E. coli*, *Pseudomonas* spp. і *Caulobacter* spp. Одним з добре вивчених фагів роду *Levivirus* є фаг *Enterobacteria phage MS2*.

Віріони мають сферичну форму і демонструють ікосаедричну симетрію (T=3) з діаметром близько 26 нм (Мал. 14.21). Віріони містять 180 молекул білка капсиду і одну молекулу білка дозрівання (A), необхідного для дозрівання і приєднання до бактерій. Варто нагадати, що залишається невідомим, яким чином цей білок вбудовується в капсид, не порушуючи взаємодій між білками капсида (Розд. 2.5).



Мал. 14.21. *Віріон фага MS2. (Зліва) Схематичне зображення віріона: РНК усередині віріона має високу структурованість. (Угорі праворуч) бактерія Escherichia coli з частинками фага MS2, прикріпленими до її F-ворсинок. Вставка - ворсинка з прикріпленими фагами зі збільшенням. (Внизу праворуч) Реконструкція фагів MS2 з зображення, отримана за допомогою кріоелектронної мікроскопії. Вигляд ззовні (ліворуч) і зсередини (праворуч) (за ICTV Positive Sense RNA Viruses Family: Leviviridae).*

Геном представлений однією молекулою (+)РНК довжиною близько 3600 нуклеотидів (Мал. 14.22). 5'-нуклеотид містить трифосфат, тоді як на 3'-кінці за допомогою реплікази додається нематричний залишок А.



Мал. 14.22. *Геном і кодовані білки фага MS2. Геном складається з 3569 нуклеотидів із чотирма відкритими рамками зчитування (ORF) для основного білка оболонки (CP), білка дозрівання (A), реплікази (субодиниці II) і білка лізису. Ген білка лізису перекриває ген реплікази у фреймшифті +1. Стрілки вказують на репресію трансляції реплікази шляхом зв'язування білка капсиду зі структурою шпильки РНК, присутньою на початку гена) (за ICTV Positive Sense RNA Viruses Family: Leviviridae).*

Реплікація фага MS2. Інфекція починається з *прикріплення* фага до піліну (субодиниці ворсинки) уздовж довжини статевої (F) ворсинки чутливого хазяїна через білок А. Фізіологічна функція F-ворсинки полягає в тому, щоб зв'язувати та зближувати бактерійні клітини донора та реципієнта для подальшого обміну генетичним матеріалом. Це досягається шляхом ретракції, яка, по суті, є скороченням F-ворсинки, що складається з багатьох ідентичних білкових мономерів піліну, шляхом деполімеризації. Після ретракції F-плазміда проникає в бактерії через пору кон'югації, утворену білками, кодованими плазмідами. Зв'язування фагів може блокувати кон'югацію в *E. coli*, і фаги здатні перепрофілювати цей механізм перенесення плазмід, щоб доставити свої геноми в клітини-мішені.

Після приєднання до ворсинки на поверхні бактеріальної клітини білок А розщеплюється на дві частини, викидається з капсиду разом із геномом і проникає в бактерії за допомогою наразі погано зрозумілого механізму. Комплекс тільки А і геномної РНК є інфекційним для клітини, що свідчить про те, що білок капсиду CP лише захищає вірусну РНК від навколишнього середовища і не відіграє жодної іншої ролі в процесі інфікування.

Як тільки геномна РНК потрапляє в цитоплазму клітини-господаря, вона може діяти безпосередньо як мРНК для синтезу білка. Кількість білків, що транслюються, регулюється різними механізмами, включаючи доступність сайтів зв'язування рибосом, утворення елементів вторинної структури РНК, взаємодію білок-РНК і зчитування стоп-кодонів при трансляції. У згорнутому геномі бактеріофага MS2 тільки ген CP спочатку доступний рибосомі. Під час трансляції гена CP вторинна структура РНК частково змінюється, дозволяючи доступ до сайту зв'язування рибосом у гені реплікази. Після трансляції реплікази може початися реплікація геному. Репліказа є каталітичною субодиницею РНК-залежної РНК-полімерази, але повністю функціональний голофермент містить 3 додаткові білки, які є білками бактерії – фактори елонгації EF-Tu та EF-Ts та рибосомний білок S1. Таким чином утворюється РНК-специфічна полімераза фага, яка утворює як (+), так і (–) ланцюги РНК.

Приблизно через 10-20 хвилин трансляція гена реплікази припиняється внаслідок репресії білком оболонки, який зв'язується зі стебловою петлею РНК, що містить область ініціації трансляції реплікази. Це гарантує, що транслюється лише необхідна кількість молекул реплікази: занадто багато репліказ може бути шкідливим для господаря.

Після синтезу реплікази може відбутися реплікація геному; таким чином геном перемикається з матриці для трансляції на матрицю для реплікації. Могла б існувати топологічна проблема, якби реплікація та трансляція відбувалися одночасно, оскільки комплекси реплікації і трансляції рухаються в протилежних напрямках уздовж матриці (3′ → 5′ та 5′ → 3′ відповідно). Однак виявляється, що трансляція білка оболонки пригнічується репліказою, яка потім поновлюється, коли синтезується достатня кількість (–)РНК. Реплікація відбувається в два етапи і включає реплікативні проміжні продукти, що складаються з кількох вихідних ланцюгів РНК, синтезованих з однієї матриці, і реплікази. Таким чином мінус-ланцюги діють як матриці для синтезу плюс-ланцюгів для використання їх в якості мРНК. Вторинна структура, яка утворюється, коли кожен новий ланцюг синтезується з матричного ланцюга, служить для утримання двох ланцюгів окремо, у свою чергу запобігаючи утворенню дволанцюгового проміжного продукту.

Надалі в інфекційному циклі синтезується білок оболонки, який необхідний у великих кількостях для збирання віріону. Невелика кількість білка лізису синтезується під час трансляції гена білка оболонки через фреймшіфт +1 (Мал. 14.22).

Експресія білка А відбувається незалежно від інших і обмежується періодами початку синтезу (+)-ланцюга РНК. Сайт приєднання рибосоми гена *A* маскується згортанням геномної РНК, і тимчасово оголюється, коли починається синтез (+)-ланцюга, через затримку згортання щойно синтезованого ланцюга. Це дозволяє рибосомам транслювати ген *A*. Таким чином кількість молекул білка А підтримується відповідно до кількості нових ланцюгів (+)РНК.

Збирання віріонів фагів включає спонтанну агрегацію, під час якої (+)РНК асоціюється з білком А та інкапсулюється через специфічне розпізнавання РНК фага димерами білка оболонки. Віріони-потомки зазвичай вивільняються шляхом лізису клітин бактерій, утворюючи приблизно 10^4 потомків на бактерію. Білки лізису MS2 вставляються в клітинну мембрану, створюючи канали, проникні для іонів. Це порушує електростатичний потенціал клітинної мембрани та активує клітинні автолізини.

14.3. Віруси, що містять мінус-ланцюг РНК (клас 5 за Д. Балтімором)

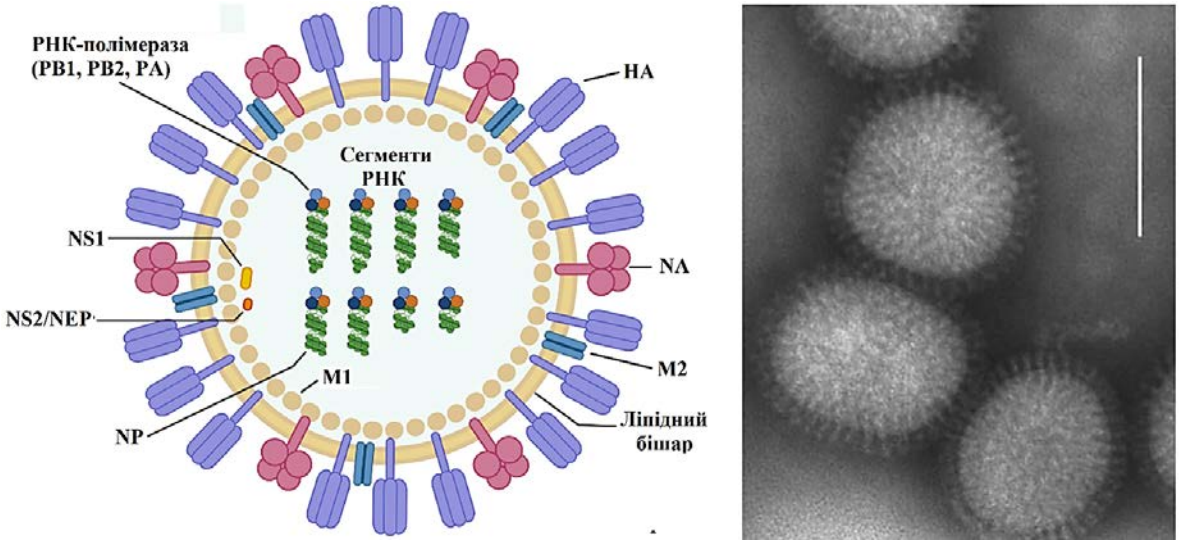
Оскільки геномна (–)РНК вірусів не може правити за матрицю в синтезі білка, зрозуміло, що віруси цієї групи повинні пакувати у віріон РНК-залежну РНК-полімеразу, яка буде здійснювати транскрипцію – синтез мРНК на геномній РНК.

14.3.1. Віруси людини і тварин

14.3.1.1. Родина *Orthomyxoviridae*

До родина *Orthomyxoviridae* належать п’ять родів, з яких найважливішими є вірус грипу А (Influenzavirus A), вірус грипу В (Influenzavirus B) і вірус грипу С (Influenzavirus C).

Віріони покриті оболонкою, сферичні або плеоморфні, діаметром 80–120 нм, але щойно виділені іноді є ниткоподібними, довжина яких зазвичай перевищує 300 нм. На поверхні віріона є виступи глікопротеїнів і неглікозильованих білків завдовжки 10–14 нм (Мал. 14.23), серед яких виділяються гемаглютинін (антиген H) та нейрамінідаза (антиген N).



Мал. 14.23. *Віріон вірусів родини Orthomyxoviridae. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. HA – гемаглютинін, NA – нейрамінідаза, M1 – білок матриксу, M2 – білок оболонки (іонний канал), NP – нуклеопротеїн, NS1 – неструктурний білок 1, NS2/NEP – неструктурний білок 2/білок ядерного експорту, PB1, PB2, PB3 – три білка, які разом складають гетеротримерну РНК-залежну РНК-полімеразу. Два білка віріону спочатку вважалися неструктурними (NS1 і NS2), але згодом були виявлені в зрілих віріонах, тому їх назва вводить в оману. Смужка на фото праворуч дорівнює 100 нм (ліворуч - за https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-influenza-A-virus-IAV-is-a-negative-stranded-RNA-virus-belonging-to-the_fig1_341126657, праворуч – за https://health.uct.ac.za/medical-virology/teaching/electron-micrograph-images).*

Геном ортоміксовірусів складається з сегментів одноланцюгової лінійної (–)РНК. Кількість сегментів залежить від виду вірусу і складає вісім у вірусів грипу А і В і сім у вірусу грипу С. Кожен сегмент геномної РНК формує нуклеокапсид, що має спіральну симетрію.

Існує 16 типів антигена Н і 9 типів антигена N; у кожному типі є багато підтипів. Час від часу з'являються нові комбінації Н і N, сформовані пересортовуванням генів (реасортанти, розд. 11.2.1), які викликають пандемії. Зазвичай люди заражаються лише вірусами які мають Н типу 1, 2 або 3 і N типу 1 або 2.

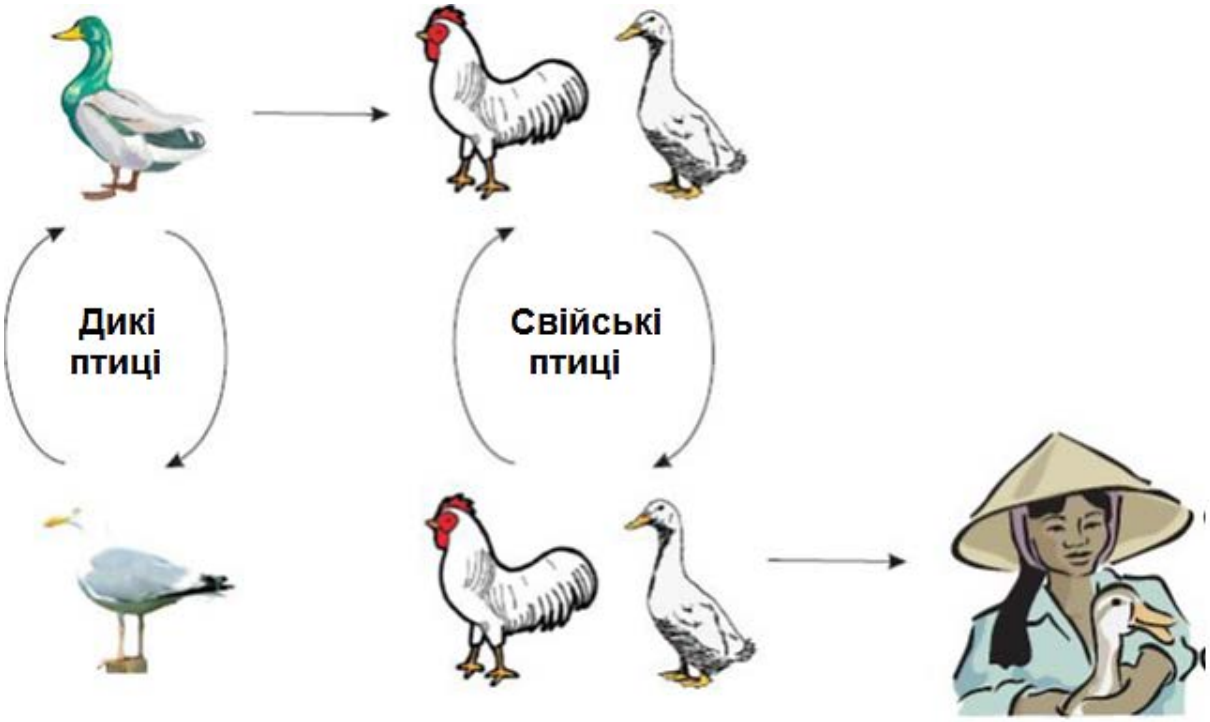
Вірус типу А здатний заражати як людей, так і тварин. Він постійно видозмінюється і провокує великі епідемії грипу. Вірус грипу В поширюється тільки серед людей, але викликає менш важку хворобу, ніж тип А, і не викликає пандемій. Вірус грипу С уражає лише людей і не викликає важких симптомів і епідемій.

Проникнувши у верхні дихальні шляхи, віруси грипу вражають слизову оболонку, розмножуючись в епітеліальних клітинах. Виникає дистрофія клітин циліндричного епітелію, знижується бар'єрна функція слизової оболонки. Коли вірус грипу потрапляє у кров, це спричиняє розвиток загального токсикозу. За інтоксикацію відповідальні ліпіди оболонки вірусу. Токсична дія проявляється у вигляді підвищення температури, ознобу, міальгій (болів у м'язах), головного болю.

Хазяями вірусу грипу А є головним чином коловодні птахи, наприклад, качки, гуси і чайки. Вони заражаються під час ковтання або вдихання, після чого вірус потрапляє до їхніх травних та/або дихальних шляхів. Віруси можуть поширюватися в нові місця під час міграції птахів.

Іноді деякі штами грипу А здатні переходити від диких птахів на свійську птицю і людей (Мал. 14.24). Така ситуація сталася в Гонконзі в 1997 р., коли вірус типу H5N1 викликав спалах захворювання свійської птиці. Вірусом також заразилися вісімнадцятеро людей, і

шість з них померло. Щоб покласти край спалаху захворювання, уся свійська птиця в Гонконзі була забита. Вірус H5N1 з'являвся в азійських країнах в 2003 р., в Європі в 2005 р. і в Африці в 2006 р. Мільйони качок, курей і індичок померли від захворювання або були забиті.



Мал. 14.24. *Шляхи передавання вірусу «пташиного грипу» H5N1 і H9N2 (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).*

Приблизно в цей же час в Азії з'явився вірус H9N2, який викликав захворювання свійської птиці з певною кількістю випадків переходу на людину. Були виявлені також інші варіанти вірусу «пташиного грипу», наприклад, H7N3. Спалахи пташиного грипу серед диких або свійських птиць періодично виявляють у різних країнах. Більшість випадків захворювання людей пташиним грипом, викликаних вірусами H5N1 і H9N2, а можливо і усі такі випадки, відбувалися з людьми, які працювали зі свійською птицею і які ймовірно заразилися вірусом або під час прямого контакту з самими птахами, або з послідом птахів. Як і багато інших вірусів тварин, ці віруси пташиного грипу очевидно не мають вираженої здатності передаватися від людини людині. Вірус H5N1 заражає також інших ссавців, включаючи кішок; у зоопарку Таїланду тигри і леопарди померли від грипу в результаті зараження через живлення м'ясом курей, які містили вірус.

На грип хворіють також свині. Практично у всьому світі спалахи хвороби виникають серед свиней круглий рік, а в зонах з помірним кліматом – найчастіше восени і зимою. У багатьох країнах проводиться регулярна вакцинація популяцій свиней від грипу. Найчастіше віруси грипу свиней належать до підтипу H1N1, але серед свиней циркулюють й інші підтипи (наприклад, H1N2, H3N1 і H3N2).

Глікопротеїни H і N зустрічаються у великій різноманітності антигенних форм і постійно створюють нові варіанти (процес, відомий як антигенний дрейф). Окремі люди не мають імунітету або мають обмежений імунітет до нового варіанту, залежно від того, якими штамами вірусу вони були інфіковані раніше, тому в більшості років виникають епідемії грипу, який зазвичай називають сезонним грипом. За оцінками, у більшість років епідемії грипу

викликають серйозні захворювання у 3–5 мільйонів людей і 250 000–500 000 смертей. Найбільш уразливими є маленькі діти, люди похилого віку та люди з такими проблемами зі здоров'ям, як захворювання легенів або серця.

У новітній історії віруси грипу А спричинили чотири пандемії (табл. 14.1).

Таблиця 14.1. *Пандемії XX сторіччя, викликані реасортантами вірусу грипу А.*

Рік	Реасортант вірусу грипу А	«Побутова» назва реасортанта	Батьківські віруси
1918	H1N1	Іспанський грип	Невідомі
1957 -1958	H2N2	Азійський грип	H2N2 птиць, людини
1968 - 1969	H3N2	Гонконгський грип	H3 птиць, N2 людини
2009 - 2010	H1N1	Свинячий грип	H1N1 свині, людини, птиць

Найбільш руйнівна пандемія спостерігалася в 1918–1919 роках, коли кількість людей, убитих вірусом, перевищувала кількість убитих під час Першої світової війни. З використанням легеневих тканин померлих, фіксованих у формаліні і уміщених в парафін, а також занурених у вічну мерзлоту на Алясці, було встановлено, що вірус, який викликав пандемію 1918 року, належав до типу H1N1.

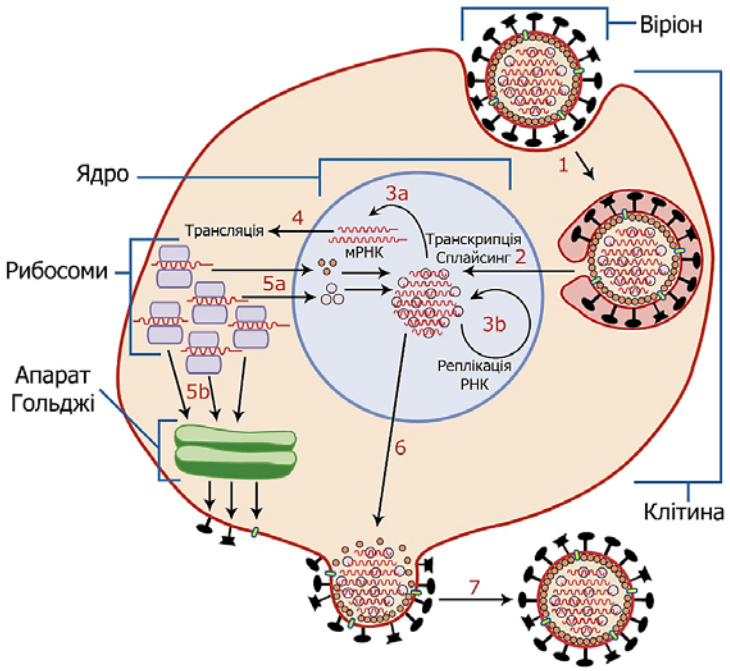
Проте його геном відрізняється від геному будь-якого вірусу грипу, відомого сьогодні, і походження цього вірусу залишається невідомим. Невідомою також залишається причина, з якої зараження людей цим вірусом призвело до такої великої летальності серед хворих.

Походження вірусів, відповідальних за останні пандемії грипу, було виявлено. У більшості випадків вірус був реасортантом між вірусом людини та вірусом птиці; реассортант 1957 року отримав гени H і N з пташиного вірусу, тоді як реассортант 1968 року отримав ген H з пташиного вірусу.

Вважається, що перегрупування, яке відбувається в інфікованих свиней, має важливе значення для створення нових вірусів грипу, які заражають людей. Вірус «свинячого грипу», який з'явився в 2009 році, мав гени H і N, отримані від вірусів свиней, а також інші гени від вірусів людського та пташиного грипу. Походження штаму «свинячого грипу» точно не відоме. Проте Всесвітня організація по охороні здоров'я тварин (World Organization for Animal Health) повідомляє, що епідемічне поширення вірусу цього ж штаму не вдалося встановити серед свиней. Інакше кажучи, у свиней не було епідемії того вірусу, на який хворіли люди! Свині можуть бути інфіковані вірусом грипу людини, і саме це могло статися під час спалаху «свинячого грипу», коли з деяких тварин були виділені відповідні віруси.

Цикл реплікації вірусу грипу А. Цикл реплікації схематично показаний на Мал. 14.25.

Прикріплення віріонів відбувається до залишків сіалової кислоти на мембранних глікопротеїнах і гліколіпідах клітин. Білком прикріплення з боку вірусу виступає гемаглютинін НА. У зрілих віріонах НА складається з двох субодиниць (НА1 і НА2), з яких НА1 відповідає за прикріплення. Після прикріплення, *вхід* віріону відбувається шляхом ендоцитозу або шляхом макропіноцитозу. Віріон потрапляє в ендосому, де низький pH активує іонний канал М2 і викликає значні конформаційні зміни в НА таким чином, що субодиниця НА2 виставляється для участі в злитті оболонки віріона і ендосоми. Відкриття іонного каналу М2 підкислює внутрішню частину вірусної частинки, вивільняючи упаковані геномні РНК у вигляді нуклеопротеїнів з оточення білка М1, що забезпечує їх перенесення у цитоплазму хазяїна.



Мал. 14.25. *Цикл реплікації вірусу грипу. 1 - прикріплення. 2 - вхід. 3a - транскрипція. 3b - реплікація. 4 – трансляція. 5a і 5b – транспорт вірусних білків у ядро та мембран апарату Гольджі відповідно. 6 – збирання. 7 – вивільнення шляхом екзоцитозу (за Biology LebreTexts: 9.9C:Replicative Cycle of Influenza A).*

Після цього РНК вірусу переносяться до ядра. Вважають, що молекули вірусних білків, які оточують РНК, мають на поверхні сигнали ядерної локалізації, до яких залучаються молекули адаптерного білка імпортину-α. Після зв'язування з вірусними нуклеопротеїнами імпортин-α розпізнається транспортним рецептором імпортином-β, який спрямовує нуклеопротеїни до ядерних пор, через які вони транспортується в нуклеоплазму.

Транскрипція мРНК вірусу з матриць геномної (-)РНК потребує праймера. Вірусна полімераза отримує праймери за допомогою механізму, який називається «зривання капелюха». Для захоплення кепа вірусна полімераза використовує субодиницю PB2 для зв'язування з 5'-кепами зароджуваних транскриптів хазяїна і ендонуклеазний домен субодиниці PA для розщеплення 10–13 нуклеотидів нижче 5'-кепа. Потім отриманий кепований праймер подовжується за допомогою вірусної (-)РНК як матриці (Мал. 4.19Б). Нарешті, кожен транскрипт поліаденілюється.

На кожному сегменті геномної РНК вірусу після транскрипції утворюється один транскрипт, однак транскрипти M і NS зазнають альтернативного сплайсингу, використовуючи клітинну машинерію сплайсингу. Таким чином, з одного первинного транскрипту утворюються мРНК білків M1 і M2 та NS1 і NS2.

Реплікація сегментів геномної РНК відбувається в ядрі в два етапи через проміжні продукти (+)РНК. Цікаво, що транскрипція, як зазначено вище, є залежною від праймера, але реплікація геному, яку здійснює та сама РНК-залежна РНК-полімераза вірусу, не потребує праймера і відповідно ані проміжні (+)РНК, ані геномні (-)РНК не є кепованими.

Синтез вірусних білків здійснюється вільними рибосомами в цитоплазмі (білки PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 та M1 та рибосомами, асоційованими з ендоплазматичним ретикулумом для мембранних білків HA, NA і M2. Послідовності ядерної локалізації на щойно синтезованих білках NP і субодиницях полімерази (PB1, PB2 і PA) спрямовують ці білки в

ядро. У ядрі ці нещодавно синтезовані білки допомагають у транскрипції мРНК вірусу та реплікації геномної РНК.

Подробиці збирання вірусних геномних (-)РНК і вірусних білків у рибонуклеопротеїни (РНП) не дуже зрозумілі. Після збирання, РНП покидають ядро і рухаються до певних ділянок плазматичної мембрани, куди вбудувалися білки оболонки вірусу HA, NA і M2.

Гемаглютинін надходить з ЕР як попередник, який називається HA0. Щоби функціонувати у злитті мембран (див. вище), HA має бути розщеплений на субодиниці HA1 і HA2. Розщеплення у людей здійснюється різними протеазами в респіраторних епітеліальних клітинах людини, зокрема TMPRSS2, трипсиноподібною протеазаою дихальних шляхів людини. TMPRSS2 знаходиться в *транс*-мережі Гольджі, де вона і розщеплює HA на шляху до плазматичної мембрани. Вважається, що іонний канал M2 запобігає передчасній активації HA після розщеплення шляхом врівноваження слабокислого pH апарату Гольджі.

Яким чином вісім РНП (сегменти геному вірусу) і білки M1, HA, NA та M2 націлюються на певні ділянки мембрани, не зовсім зрозуміло. Можливо, що NA і HA створюють мембранні домени з унікальним ліпідним профілем, які мають високу спорідненість до білка матриксу M1, якій синтезується в цитозолі, або відбувається щось інше. Як би там не було, на плазматичний мембрані утворюється вигинання, у яке потрапляє білок M1 і сегменти геному, і ця ділянка відбруньковується.

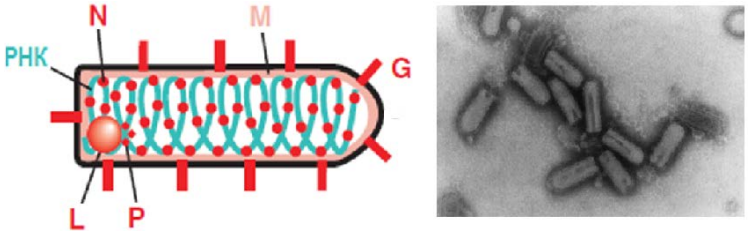
Після того, як нещодавно зібрані віріони брунькуються, їх вивільнення сильно залежить від активності нейрамінідази (сіалідази). NA полегшує вивільнення вірусу, каталізуючи гідроліз глікозидного зв'язку, який приєднує сіалову кислоту до молекул цукру. Локально видаляючи залишки сіалової кислоти на поверхні клітини, NA запобігає зв'язуванню з ними гемаглютиніну, що полегшує вивільнення вірусу під час брунькування.

14.3.1.2. Інші віруси людини і тварин з (-)РНК-геномами

Родина Rhabdoviridae. Рабдовіруси мають геном, що містить (–)РНК розміром 11–15 тис. пар нуклеотидів. Назву ці віруси дістали від грецького слова rhabdos, яке означає паличка. Віріони деяких рабдовірусів, особливо тих, які вражають рослини, має форму палички із закругленими кінцями, тоді як інші рабдовіруси, в основному ті, які вражають тварин, мають форму кулі з рушниці.

Віріони рабдовірусів покриті оболонкою, нуклеокапсид має спіральну симетрію (Мал. 14.26).

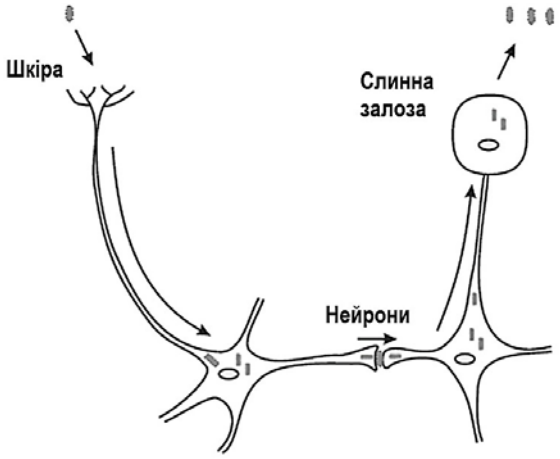
Рабдовіруси вражають багатьох хазяїв, що належать до тварин і рослин. Багато рабдовірусів мають широке коло хазяїв. Наприклад, рабдовіруси рослин можуть здійснювати реплікацію як в рослині, так і в комасі-переноснику.



Мал. 14.26. Віріон вірусів родини Rhabdoviridae. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. Усі рабдовіруси містять у віріоні п'ять білків: нуклеопротеїн покриває РНК, формуючи нуклеокапсид зі спіральною симетрією. З нуклеокапсидом пов'язані білки P (фосфопротеїн) і L (великий білок). Білок матриксу M утворює шар між нуклеокапсидом і оболонкою віріона, і глікопротеїн G у вигляді тримерів проникає через оболонку і формує виступи (за https://basicmedicalkey.com/rhabdoviruses-and-other-minus-strand-rna-viruses/).

Вірус сказу. Важливим представником цієї родини є вірус сказу. Він, як і багато інші рабдовірусів, має виключно широке коло хазяїв. У природі цей вірус заражає дуже багато видів ссавців, а в умовах лабораторії можуть також бути заражені птахи і лінії клітин рептилій і комах.

Вірус сказу викликає специфічний енцефаліт (запалення головного мозку) у тварин і людини. Передається із слиною під час укусу хворою твариною. Вірус, який міститься в слині, через пошкоджену шкіру дістає доступ до нервових клітин (Мал. 14.27). Потім, поширюючись по нервових шляхах, вірус досягає слинних залоз і нервових клітин кори головного мозку, гіпокампу, бульбарних центрів, і, вражаючи їх, викликає важкі безповоротні порушення.

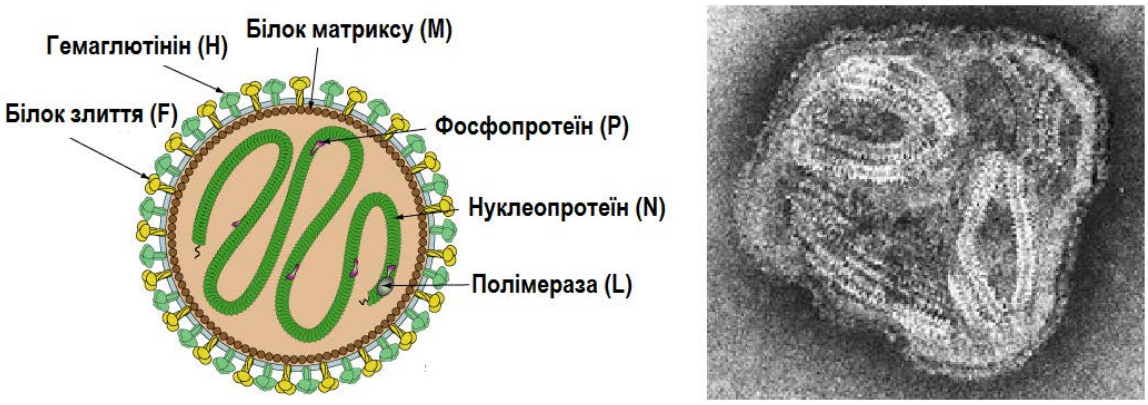


Мал. 14.27. Шлях вірусу сказу в тілі тварини (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Щороку сказ вбиває значну кількість людей, собак, великої рогатої худоби та інших видів тварин. Точні цифри не відомі, але за оцінками, сказ щорічно вбиває більше 60000 людей. Більшість заражень людини відбуваються через укуси скажених собак.

У багатьох регіонах світу основним резервуаром вірусу сказу слугує єдиний вид тварини; наприклад, в Західній Європі це руда лисиця, а в Австралії – кажани.

Родина *Paramyxoviridae*. Геном являє собою несегментовану одноланцюгову лінійну (–)РНК. Віріони покриті оболонкою, сферичні або плеоморфні, діаметром 150 нм або більше. Нуклеокапсид має спіральну симетрію. Довжина нуклеокапсиду досягає 1000 нм у деяких родів (Мал. 14.28).



Мал. 14.28. Віріон вірусів родини Paramyxoviridae. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія (за https://viralzone.expasy.org/556).

До родини належать зокрема віруси, що викликають кір, епідемічний паротит (свинку), парагрип, чуму собак.

Вірус кору. Кір – гостре інфекційне вірусне захворювання з високим рівнем сприйнятливості, яке характеризується високою температурою (до 40,5°С), запаленням слизових оболонок порожнини рота і верхніх дихальних шляхів, кон'юнктивітом і характерним плямисто-папульозним висипом шкірних покривів, загальною інтоксикацією.

Проникнення вірусу в організм людини відбувається через слизову оболонку верхніх дихальних шляхів і далі з потоком крові (первинна віремія) вірус потрапляє до ретикулоендотеліальної системи (лімфатичних вузлів) і вражає усі види білих кров'яних клітин. Після розмноження в лімфатичних вузлах вірус знову потрапляє в кров, розвивається повторна (вторинна) віремія, з якою пов'язаний початок клінічних проявів хвороби. Вірус кору пригнічує діяльність імунної системи (можливе безпосереднє ураження Т-лімфоцитів), відбувається зниження імунітету і як наслідок розвиток важких вторинних, бактерійних ускладнень з переважною локалізацією процесів в органах дихання.

Вірус кору є однією з головних причин дитячої смертності в країнах, що розвиваються, і є відповідальним за деяку частину дитячої смертності в розвинених країнах. Згідно з статистикою ВООЗ, в 1980 р., до впровадження широкої вакцинації в глобальному масштабі, від кору померли 2 млн. 600 тис. чоловік. Після початку вакцинації, глобальна смертність від кору знизилася до 733000 випадків смерті в 2000 р. і до 164000 випадків в 2008 році. Утім, в 2008 р. від кору помирало майже 450 осіб в день, або 18 людей в годину.

Наприкінці 20-го сторіччя в розвинених країнах кількість випадків захворювань кором знизилося до одиничних без смертельних випадків, завдяки вакцинації. Проте через розповсюдження загалом необґрунтованих побоювань відносно безпеки вакцинації, вакцинують все менше дітей. Завдяки цьому чисельність хворих почала зростати. Таким чином, віруси кору (і свинки) є вірусами, які можна назвати такими, що загрожують здоров'ю людей знову завдяки зусиллям супротивників вакцинації.

До цієї ж родини належать і відносно нещодавно виявлені віруси, Хендра і Ніпах.

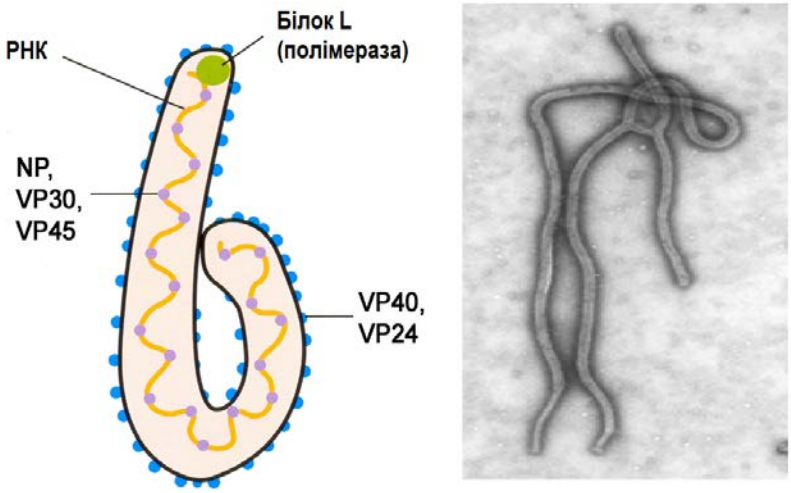
Вірус Хендра. У 1994 р. в тренувальному комплексі Хендра (Hendra) на околиці міста Брісбен в Австралії знаменитий в Квінсленді тренер коней Вік Райл (Vic Rail), працівники стайні і більшість коней захворіли загадковою хворобою, і впродовж декількох днів тренер і 14 коней померли. Як виявилося, коні і люди були уражені вірусом, що відноситься до родини параміксовірусів. Незабаром був виділений збудник хвороби; він виявився раніше невідомим вірусом, що згодом він був названий вірусом Хендра (Hendra virus).

Через два роки у людини, яка жила на 800 км на північ від Хендри, стався епілептичний напад, після чого наступив параліч. Як виявилося, чоловік був заражений вірусом Хендра; згодом він помер від менінгоенцефаліту. З'ясувалося, що ця людина допомагала розтинати трупи двох коней 13 місяцями раніше. Тканини цих коней зберіглися, і після їхньої перевірки виявилось, що вони містили вірус Хендра. Таким чином, виявилось, що інфіковані люди заразилися вірусом від коней, але джерело вірусу для самих коней виявилося загадкою. Були ініційовані дослідження, і отримані докази, що вірус є присутнім в популяції кажанів, що живляться фруктами; специфічні для вірусу Хендра антитіла були виявлені в усіх чотирьох локальних популяціях кажанів роду *Pteropus*, і у одного кажана був виділений інфекційний вірус. Мабуть, кажани є природними хазяями вірусу Хендра, але зараження не викликає у них ознак хвороби. Очевидно, що час від часу трапляється передавання

вірусу коням, і ще рідше відбувається передавання від коней людям. У такому випадку результат зараження коней і людей вірусом Хендра дуже відрізняється від результату зараження кажанів – заражаючи коней і людей, вірус проявляє високу ступінь вірулентності з вірогідним летальним результатом захворювання.

Вірус Hinax. У 1997 р. в Малайзії з'явилося нове захворювання свиней. У хворих тварин розвивалися хвороби дихальних шляхів і енцефаліт. Пізніше у працівників свиноферм, де були зареєстровані хворі тварини, почав розвиватися енцефаліт. Впродовж дворічного періоду було зареєстровано декілька сотень випадків захворювання, і померли більше 100 людей. У 1999 р. з мозку одного з померлих був виділений новий вірус. Вірус виявився параміксовірусом, який мав особливості, подібні до вірусу Хендра; обидва віруси віднесені до одного роду *Henipavirus*. Виявлений вірус був названий вірусом Ніпах (Nipah virus), по назві селища, в якому він проявився. У спробі стримати спалах інфекції, було знищено більше мільйона свиней. Пошук природного резервуару інфекції виявив, що, як і з вірусом Хендра, джерелом вірусу є кажани роду *Pteropus*, що живляться плодами. Вірус міститься в сечі і слині кажанів, і ймовірно свині заразилися, поїдаючи фрукти, забруднені слиною і сечею кажанів-вірусоносіїв. Ситуація в Малайзії мала багато спільного з вірусом Хендра. Після епідемії захворювання в Малайзії, сталося декілька спалахів викликаного вірусом Ніпах енцефаліту у жителів Індії і Бангладеш. Судячи з усього, в цих випадках передавання вірусів від кажанів людині відбувалася безпосередньо, без участі свиней. Найімовірніше, у Бангладеш і Індії люди заражалися під час споживання фруктів або продуктів з них (наприклад, свіжого соку фінікової пальми), забруднених сечею або слиною інфікованих кажанів. Також були отримані докази прямого передавання вірусу від людини людині.

Родина Filoviridae. Геном вірусів цієї родини представляє собою несегментовану одноланцюгову лінійну (–)РНК. Віріони покриті оболонкою, паличкоподібні або ниткоподібні, іноді виглядають розгалуженими, сильно варіюють по довжині. Нуклеокапсид має спіральну симетрію (Мал. 14.29). До родини належать віруси Марбург і Ебола, які викликають захворювання з високою летальністю.



Мал. 14.29. Віріон вірусів родини Filoviridae. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія вірусу Ебола (за https://www.researchhistory.org/2011/05/01/ebola-hemorrhagic-fever/).

Вірус лихоманки Марбург. У 1967 р. в місті Марбург в Німеччині 31 працівник лабораторії захворів геморагічною лихоманкою. Ці люди контактували з кров'ю, органами і культурою клітин зелених мавп, яких упіймали в Уганді в Африці. Семеро хворих померли, і

було п’ять випадків захворювання серед персоналу лікарні, який мав контакт з кров’ю хворих. Дослідження виявили, що мавпи були заражені вірусом, який передався співробітникам лабораторії і від них працівникам лікарні.

Вірус виявився такого типу, який раніше не траплявся, з подовженими віріонами, деякі з яких були прямими, а деякі зігнутими. Цей вірус був названий вірусом Марбург, і віднесений до родини філовірусів (*Filoviridae*), від латинського слова filum, що означає нитку.

Вірус Ебола. У 1976 р. стався спалах подібного захворювання в Африці біля річки Ебола в Заїрі і Судані. У хворих був виділений вірус, подібний до вірусу Марбург, і цей новий вірус назвали вірусом Ебола. Після 1976 р. сталася ще низка спалахів захворювання в різних районах центральної Африки. Захворювання, що викликаються вірусами, дістали назву геморагічна лихоманка Марбург і геморагічна лихоманка Ебола. Вірус Ебола виявився більш небезпечним, у випадку зараження смертність варіює від 50 до 90%.

Епідемія лихоманки Ебола сталася протягом 2014–2016 рр. у деяких країнах Африки, зокрема Гвінеї, Ліберії, Сьєрра-Леоне, Нігерії, Сенегалі. Летальність складала біля 60–70%; загалом від хвороби померло біля 20000 осіб, більше, ніж за період після відкриття вірусу у 1976 р. до 2014 р.

Яким чином ініціюються спалахи захворювання, залишається досить загадковим. Низка даних вказує на те, що в деяких випадках люди заражалися через контакт з кров’ю заражених нелюдиноподібних приматів. Після первинного спалаху в Німеччині стало відомо, що африканські зелені мавпи можуть бути інфіковані вірусом Марбург. Також було встановлено, що горили, шимпанзе і антилопи-дукери можуть бути заражені вірусом Ебола, і цей вірус може нести відповідальність за значну смертність у цих видів.

Природний осередок вірусу Ебола, найвірогідніше, розташований у вологих лісах африканського континенту. Радше за все джерелами інфекції є кажани, які живляться фруктами і, можливо, дрібні наземні гризуни (на цей час вірус виділили лише з декількох особин кажанів, мишей та бурозубок в Африці). Експериментальні зараження кажанів не призводили до їхньої смерті, що дало підставу підозрювати їх як головне джерело і резервуар інфекції. Дослідження показали, що обмежена циркуляція вірусу можлива серед кажанів, яких було виловлено у дикій природі в Китаї і Бангладеш.

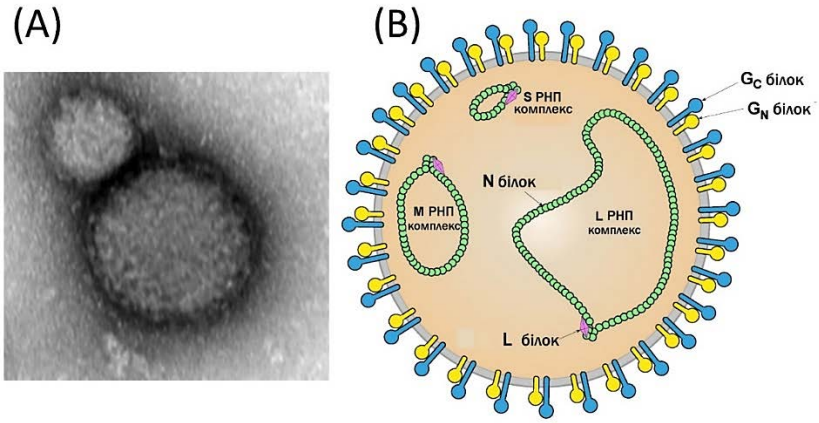
У Кот-д’Івуарі, Республіці Конго і Габоні є документально підтверджені випадки інфікування людей вірусом Ебола в результаті контакту із зараженими шимпанзе, горилами, лісовими антилопами, дикобразами, як мертвими, так і живими. З трупів цих тварин вірус було виділено. Мавпи, антилопи, дикобрази, однак, не є первинним джерелом чи резервуаром інфекції в природі, позаяк у них, як і в людей, розвивається гостре захворювання, часто з летальним наслідком. В осередках епідемій виявлено безсимптомне ураження певної кількості собак, у яких відбувається вироблення антитіл до вірусу та які, як вважають, заражаються від людей або через контакти з тваринним падлом. Люди, які заразилися в природних умовах, стають інтенсивним вторинним джерелом інфекції для здорових осіб.

Вважається вірогідним, що декілька інших видів тварин є резервуарами вірусів Марбург і Ебола, і зараження у цих видів певно не призводить до серйозного захворювання. Незважаючи на численні експедиції, на сьогодні немає чітких даних стосовно круга хазяїв цих вірусів і видів, які є їхніми резервуарами.

Родина Nairoviridae. Назва родини походить від слів Nairobi (Найробі, Кенія), де вперше було виділено вірус найробійської хвороби овець, і -viridae, суфікса для родини вірусів. Ці

віруси циркулюють в членистоногих або передаються кліщами серед ссавців, птахів або кажанів.

Віріони мають оболонку, сферичні або поліморфні, 80–120 нм діаметром, покриті глікопротеїнами, що виступають. Нуклеокапсид зазвичай (але не завжди) має спіральну симетрію (Мал. 14.30).



Мал. 14.30. *Віріон вірусів родини Nairoviridae. А) Електронна мікрофотографія віріона вірусу геморагічної лихоманки Крим-Конго. Збільшення 50 000х. В) Схематичне зображення віріона. Показано сферичну частинку з оболонкою (сірого кольору) з глікопротеїновими виростами (G_N жовтий, G_C синій). Комплекси (сегменти) S (маленький), M (середній) і L (великий) РНП (рибонуклеопротеїн) всередині віріона складаються з N (білок нуклеокапсиду, зелений) і L (великий білок, рожевий) (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Nairoviridae).*

Геном представлений трьома сегментами лінійної (–)РНК, які за рахунок спаровування останніх азотистих основ утворюють нековалентно замкнені кільця. Сегменти позначають як великий L (large), середній M (medium) і малий S (small).

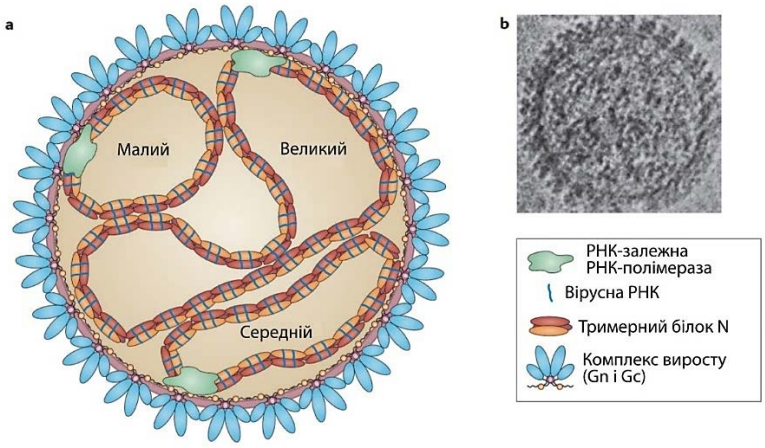
Найважливішим найровірусом, який впливає на здоров'я людини, є вірус геморагічної лихоманки Крим-Конго, який передається кліщами та є ендемічним у більшій частині Азії, Африки, Південної та Східної Європи. Захворювання характеризується лихоманкою, вираженою інтоксикацією і крововиливами на шкірі і внутрішніх органах. Уперше виявлено в 1944 р. в Криму. Збудник був виявлений в 1945-му. У 1956 р. в Конго було виявлено схоже захворювання. Дослідження вірусу встановили його повну ідентичність з вірусом, виявленим в Криму.

Природний резервуар збудника – гризуни, велика і дрібна рогата худоба, птахи, дикі види ссавців, а також кліщі, які є вірусоносіями довічно і здатні передавати вірус потомству через яйця. Джерело збудника – хвора людина або інфікована тварина. Вірус передається через укуси кліща, або під час проведення медичних процедур, пов'язаних з ін'єкціями або забором крові. Спалахи захворювання спостерігаються на території Росії в Краснодарському і Ставропольському краю, Астраханської, Волгоградської і Ростовської областях, в республіках Дагестан, Калмикія і Карачаєво-Черкесії. Захворювання також трапляється на півдні України, в країнах південної Європи, Центральної Азії, Китаї, Центральній, Східній і Південній Африці (Конго, Кенія, Уганда, Нігерія та ін.). Смертність серед хворих варіює від 2 до 50%.

Найбільш значущим найровірусом, який має ветеринарне значення, є вірус Найробійської хвороби овець, який також передається кліщем і викликає летальний геморагічний гастроентерит у дрібних жуйних в Африці та Індії.

Родина Hantaviridae. Хантавіруси дістали назву по назві річки Хантаан в Кореї, де перші віруси були виділені у солдатів, що брали участь у війні в Кореї. У солдатів розвивалася геморагічна лихоманка з нирковим синдромом (геморагічний *нефрозонефрит*). Схожі віруси відомі також і в інших місцях Азії і Європи.

Родина *Hantaviridae* включає віруси з віріонами, оточеними оболонкою, і геномом (-)РНК, який складається з трьох сегментів. Середній діаметр віріонів 135 нм. Загалом, морфологія віріонів хантавірусів (Мал. 14.31) подібна віріонам попередньо розглянутої родини.



Мал. 14.31. *Віріон хантавірусів. а) Схематичне зображення віріону. Віріон містить три сегмента (-)РНК, що включають малу, середню та велику ORF. Вони інкапсульовані білком нуклеокапсиду (N). Зовнішня частина віріону складається з виростів, що містять чотири одиниці кожного глікопротеїну, Gn і Gc. б) Віріон хантавірусу, досліджений за допомогою кріоелектронної мікроскопії (за Vaheri A.et al., 2013, https://doi.org/10.1038/nrmicro3066).*

Вірусна РНК кожного сегмента містить ORF, фланковану некодуючими ділянками на 3'- і 5'-кінцях кожного сегмента. Кінці некодуючих ділянок містять комплементарні нуклеотиди, які замикають РНК у нековалентно зв'язане кільце і утворюють структуру, яка функціонує як вірусний промотор і є вирішальною для транскрипції та реплікації. ORF сегментів геному, які називаються малими, середніми та великими, відповідно кодують білок нуклеокапсиду (N), попередник глікопротеїну (GPC, який зрештою дозріває в глікопротеїни Gn та Gc) та РНК-залежну РНК-полімеразу. У деяких хантавірусів на додаток до кодування білка N, малий сегмент геному містить перекриваючу рамку зчитування, яка кодує неструктурні білки NS, які можуть функціонувати як слабкий інгібітор інтерферону або виконувати інші функції.

Вірус Сін Номбре. У 1993 в регіоні південного заходу США, відомому як Чотири Кути, де сходяться штати Аризона, Нью Мехіко, Колорадо і Юта, деякі жителі почали страждати від захворювання, що нагадувало грип; у деяких з хворих виникало важке ураження легенів, і вони померли. Цей регіон США в нормі дуже сухий, проте того року ішли незвично сильні дощі, що привело до посилення росту рослин і вибухового росту популяцій дрібних ссавців. Одним з цих ссавців був оленячий хом'як – гризун, який тяжіє до людського житла. Під час досліджень виявилося, що багато хом'яків були персистентно інфіковані вірусом, який виділявся з їхньою сечею, екскрементами і слиною. У людей, що контактували з цими речовинами, розвивалися дихальні інфекції. Вірус був охарактеризований як новий хантавірус, і хвороба дістала назву хантавірусного легеневого синдрому.

Відносно назви вірусу, знайденого в Чотирьох Кутах, розгорнулися палкі спори. Жителі цього району не хотіли, щоб вірус був названий з використанням назви місця, де він був виділений, оскільки не жадали, щоб туристів відштовхувала погана слава, що оточує вірус.

Врешті-решт вірус назвали іспанською назвою Сін Номбре (Sin Nombre virus, зараз *Sin Nombre orthohantavirus*), що в перекладі означає ортохантавірус без імені.

Після 1993 р. хантавирусній легеневий синдром, викликаний вірусом Сін Номбре, почав траплятися у багатьох частинах Північної і Південної Америки, із смертністю серед хворих близько 50%.

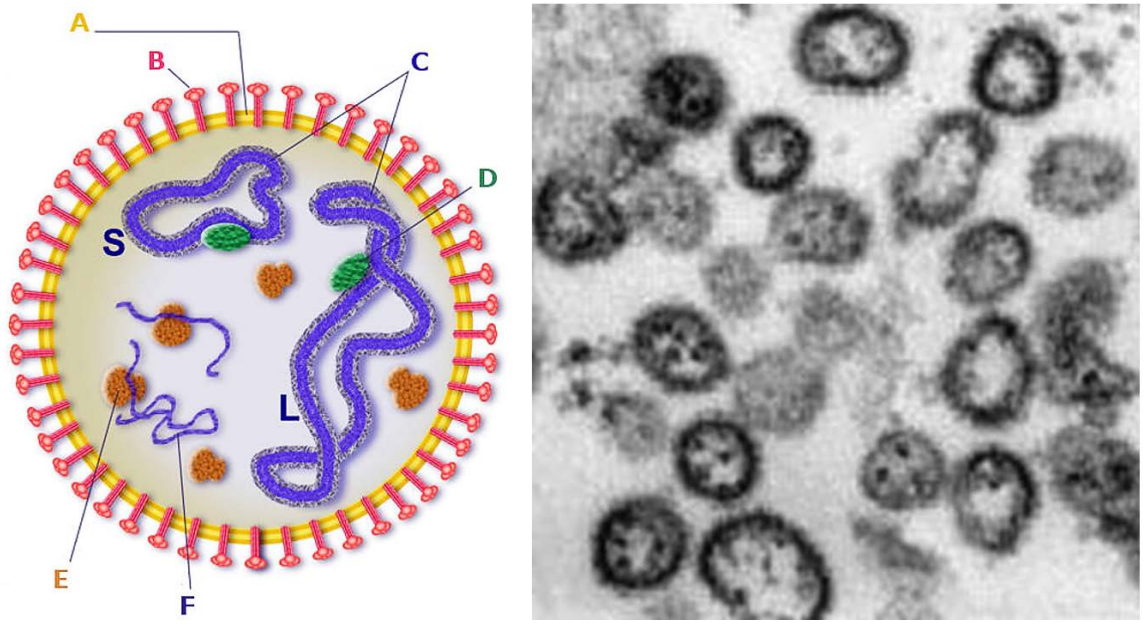
Загалом виділяють дві великі категорії хантавірусів: хантавіруси Старого Світу та хантавіруси Нового Світу. Хантавіруси є робовірусами, тобто їх поширення відбувається через гризунів. Крім того, відомі випадки, коли зараження відбувалося після укусу деяких видів комахоїдних кажанів.

Найчастіше у природного резервуара немає ніяких ознак захворювання від «рідного» ним хантавируса. При зараженні альтернативними видами хантавірусів дорослі гризуни повністю виводять його з організму протягом 25—50 діб, але для молодих особин зараження найчастіше смертельно.

Хантавірусні інфекції та захворювання, які вони викликають, є зростаючою проблемою здоров'я людини, і наразі не існує терапії чи вакцини, яка використовується у всьому світі. Детальні знання про точний механізм хантавірусної інфекції наразі обмежені. Цілком можливо, що розуміння патогенезу хантавірусних інфекцій буде отримано шляхом вивчення патологічних механізмів, які призводять до просочування судин при інфекціях іншими вірусами, що викликають геморагічні лихоманки (флавівіруси, філовіруси та аренавіруси).

Родина Arenaviridae. Назва родини походить від латинського arena — пісок, через наявність рибосом хазяїна у віріоні, які під електронним мікроскопом нагадують піщинки.

Віріони покриті ліпідною мембраною, мають щільно розташовані великі виступи на поверхні. Форма округла або плеоморфна, діаметр віріонів 50–300 нм. Два нуклеокапсиди мають форму кілець і ймовірно представлені суперспіральними структурами з лінійною організацією нуклеосомних субодиниць. Крім того, у віріон пакується різна кількість нефункціональних рибосом клітини-хазяїна (Мал. 14.31).



Мал. 14.31. *Віріон вірусів родини Arenaviridae. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. A – ліпідна мембрана, B – вирости, утворені тетрамерами глікопротеїну, C – L і S-сегменти РНК, D – L-білок (репліказа), E – нефункціональні рибосоми хазяїна, F – негеномна РНК (ліворуч – за https://uk.wikipedia.org/wiki/Аргентинська_геморагічна_гарячка, праворуч за https://www.sciencedirect.com/topics/veterinary-science-and-veterinary-medicine/lassa-virus).*

Геном представлений двома або трьома сегментами лінійної РНК, які позначають як великий L (large), середній M (medium) і малий S (small). Крім того, у віріоні містяться негеномні РНК клітини-хазяїна. Зазвичай аренавіруси розглядають як віруси з (–)РНК, але фактично їхня геномна РНК амбісенсова (двозначна), тобто частина кожного сегменту геномної РНК вірусів є *комплементарною* відповідним мРНК, а інша частина має послідовність нуклеотидів, яка *співпадає* з послідовністю мРНК.

Аренавіруси умовно поділяють на віруси Старого Світу і Нового Світу. Серед чотирьох вірусів Старого світу виділяють ***вірус лімфоцитарного хоріоменінгіту***, що трапляється у гризунів по всьому світу, а також вірус лихоманки Ласса. Хвороба вперше описана у 1969 р. в м. Ласса у медсестри місіонерського госпіталю, а потім і в м. Джосе (Нігерія), хоча і до цього в Західній Африці була описана хвороба з подібними проявами під назвою «тропічний висипний тиф». Надалі спалахи цієї хвороби спостерігалися в С'єрра-Леоне і Ліберії. Існування вогнищ інфекції серологічно доведено й в інших країнах Африки (Берег Слонової Кістки, Гвінея, Малі, Мозамбік, Сенегал та ін.). Летальність досягала 36–67%. В наступні роки лихоманка Ласса неодноразово траплялася в ряді країн Європи і Америки у медичного персоналу внаслідок зараження від хворих, які прибули із Західної Африки.

Віруси Нового світу трапляються у щурів в Південній Америці. До них належать віруси Хунін (збудник аргентинської геморагічної лихоманки), Мачупо (збудник болівійської геморагічної лихоманки) і Гуанаріто (збудник венесуельської геморагічної лихоманки).

Основний резервуар аренавірусів – різні гризуни. Для вірусів цієї родини характерна тривала персистенція в інфікованих тваринах. Вірус виділяється із сечею, слиною, виявлений у секреті респіраторного тракту. Протягом тривалого часу він зберігається у висохлих виділеннях. Гризун часто проникає в житла людей і забруднює своїми виділеннями продукти та інші предмети. Хвора людина також стає джерелом збудників інфекції і становить велику небезпеку для оточуючих. Вірус виявлений у крові, виділеннях (кал, блювотні маси, сеча), крапельках слини, і виділення вірусу хворими може продовжуватися до одного місяця і більше. Зараження людини може відбуватися аліментарним і повітряно-пиловим шляхом, а також під час попадання на шкіру (через мікротравми) крові або виділень хворого. Так інфікуються медичні працівники, що доглядають за хворими, і працівники лабораторій протягом досліджень матеріалу від хворих. Смертність досягає 70% хворих.

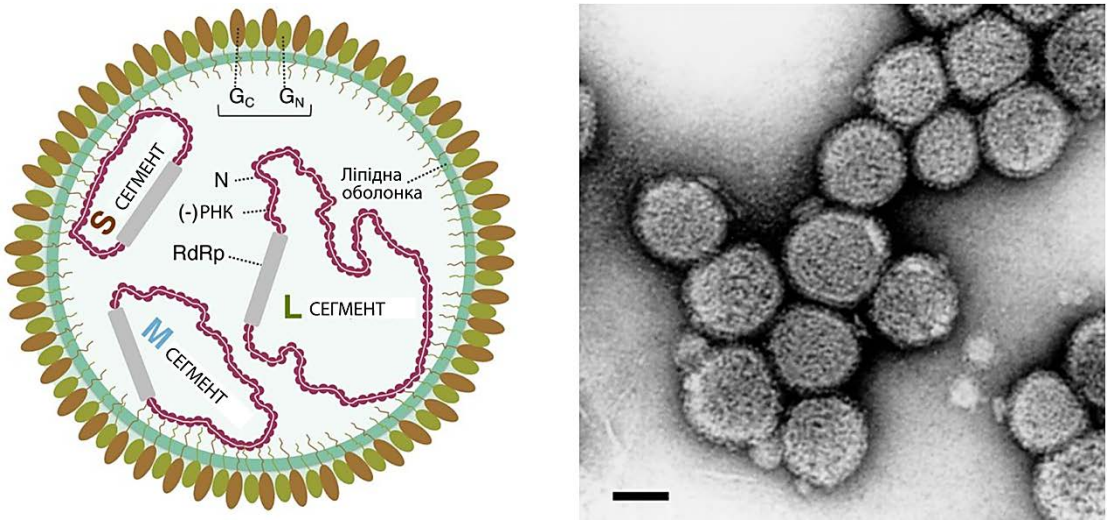
14.3.2. Віруси рослин

14.3.2.1. Родина *Tospoviridae*

Нещодавно визнана родина *Tospoviridae* має назву, утворену від назви виду *Tomato spotted wilt ortotospovirus* (ортотосповірус плямистого в'янення томатів, ВПВТ, який українською мовою ще звуть вірусом бронзовості томату). Наразі до родини входить один род *Orthotospovirus*.

ВПВТ є одним із найбільш економічно шкодочинних вірусів рослин із світовими збитками, що перевищують 1 мільярд доларів на рік. Хвороба плямистого в'янення томатів була вперше описана в 1915 році в Австралії. ВПВТ заражає садові та агрономічні культури в помірних, субтропічних і тропічних регіонах світу. Основними культурами, чутливими до вірусу, є томати, перець, салат, картопля, папайя, арахіс, тютюн і хризантеми. Симптоми залежать від рослини-господаря, пори року та умов навколишнього середовища та включають затримку росту, некроз, хлороз, кільцеві плями та кільцеві/лінійні малюнки, що проявляються на листі, стеблах та плодах.

Віріони тосповірусів являють собою псевдосферичні або плеоморфні частинки з оболонкою, приблизно 70-110 нм у діаметрі, які містять принаймні чотири типи білка: внутрішній нуклеокапсидний білок (N); два мембранних глікопротеїна (G_C і G_N), і великий (L) білок, РНК-полімераза (Мал. 14.32).



Мал. 14.32. *Віріон ортотосповірусу плямистого в'янення томатів. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. Смужка дорівнює 100 нм. G_C і G_N – глікопротеїни оболонки. RdRp – РНК-залежна РНК-полімераза (білок L). Показані три сегменти геному - L (великий), M (середній) і S (короткий) (https://ictv.global/report_9th/RNAneg/ Tospoviridae).*

Геном складається з трьох лінійних молекул одноланцюгової РНК, які утворюють комплекси з білками N, утворюючи кільцеві нуклеокапсиди. Молекула L (велика) РНК має негативний сенс; M (середня) і S (коротка) РНК є амбісенсові. L-білок кодується L-РНК, два глікопротеїни та N-білок кодуються (-)-послідовністю M- і S-РНК відповідно. Два неструктурних білка (NSs і NSm) кодуються (+)-послідовністю S і M РНК. Білок NSm представляє транспортний білок, що забезпечує поширення вірусу від клітини до клітини і, отже, є важливим для системного зараження рослини. Білок NSs відіграє вирішальну роль у передавання TSWV трипсами і функціонує як супресор РНК-сайленсингу для захисту від системи вродженого імунітету рослин.

Стратегію транскрипції і реплікації амбісенсових РНК-геномів ми розглядали у розділі 4.2.2, Мал. 4.20.

Тосповіруси — це арбовіруси, які зазвичай переносяться трипсами. Принаймні десять видів трипсів, що належать до родини *Thripidae*, були підтверджені як вектори для передавання тринадцяти або більше тосповірусів. Трипси можуть бути інфіковані тосповірусом лише на личинкових фазах розвитку, оскільки лялькування та метаморфоз роз'єднують зв'язок між слинними залозами та інфікованою м'язовою тканиною середньої кишки. Дорослі передають вірус через інфіковані слинні залози, а неінфіковані дорослі не передають вірус.

15. ВІРУСИ, РЕПЛІКАЦІЯ ЯКИХ ВІДБУВАЄТЬСЯ ЧЕРЕЗ ЗВОРОТНУ ТРАНСКРИПЦІЮ (КЛАСИ 6 І 7 ЗА Д. БАЛТІМОРОМ)

15.1. Віруси людини і тварин

15.1.1. Родина *Retroviridae*

Ретровіруси (від лат. retro — зворотній) широко поширені в природі та зустрічаються у багатьох хребетних. Багато ретровірусів є важливими патогенами людини та свійських тварин, пов'язаними з різноманітними захворюваннями, включаючи лейкемії, лімфоми, саркоми, карциноми молочної залози, печінки, легенів і нирок; імунодефіцити (наприклад, СНІД), автоімунні захворювання, захворювання рухових нейронів, низку гострих захворювань. Передавання відбувається горизонтально через різні шляхи, включаючи кров, слину та статевий контакт, а також через пряме зараження ембріона, що розвивається, або через молоко чи перинатальний шлях.

Віріони діаметром 80-100 нм мають ліпідну оболонку, на який виступають вирости вірусних глікопротеїнів, і внутрішнє білкове ядро, яке містить вірусний геном і ферменти. Морфологія внутрішнього ядра змінюється і часто є характерною для вірусів одного роду. Реплікація включає зворотну транскрипцію, при цьому вірусний позитивно-смисловий РНК-геном служить матрицею для синтезу дволанцюгової ДНК з подальшою її інтеграцією в хромосомну ДНК клітини-хазяїна, що створює *провірус*. Інтеграція в тканини/клітини зародкової лінії може призвести до спадкових провірусів, відомих як ендогенні ретровіруси, і більшість геномів хребетних містять тисячі ендогенних ретровірусів.

Родина включає дві підродини: *Orthoretrovirinae* і *Spumaretrovirinae*.

Геном у представників підродини *Orthoretrovirinae* складається з двох копій одноланцюгової (+)РНК. Ці дві копії утримуються разом водневими зв’язками; окрім цього, з кожною молекулою РНК через спаровування комплементарних основ сполучена молекула тРНК хазяїна, яка служитиме праймером для синтезу ДНК. У підродини *Spumaretrovirinae* геном пакується у вірусні частинки також у вигляді РНК, але вона зворотно транскрибується всередині частинок, **до** вивільнення віріонів з ураженої клітини, тому віріони цієї підродини містять ДНК; точна структура цієї ДНК залишається невизначеною. Інфекційними є саме віріони з ДНК-геномами.

Родина *Retroviridae* містить 7 родів, приклади представників яких наведені у табл. 15.1.

Таблиця 15.1. *Роди вірусів родини Retroviridae*

Рід	Представники	Рід	Представники
Alpharetrovirus	Вірус саркоми Рауса	*Deltaretrovirus*	Т-лімфотропні віруси людини 1 і 2
Betaretrovirus	Вірус раку молочних залоз мишей	*Epsilonretrovirus*	Вірус лейкоми рогівки
Gammaretrovirus	Вірус лейкемії мишей	*Lentivirus*	Вірус імунодефіциту людини
Spumavirus	Пінистий вірус шимпанзе		

Особливістю підродини *Spumavirinae* («пінисті віруси», від лат. spuma, піна) є їхня здатність викликати своєрідний ефект, що проявляється злиттям клітин. Культура клітин, уражених цими вірусами, виглядає нібито спіненою, звідси назва – «пінисті». Віруси поширені всюди, екзогенні, знайдені у багатьох ссавців. У 1960–1970-х рр. віруси цієї підродини були виділені від мавп, людини, кішки, хом'яка, бика та ін. Хоча в природних умовах представники *Spumavirinae* рідко викликають хворобу у своїх хазяїв, але вони здатні викликати нейродегенерацію, коли їх експресують як трансген у мишей, і можуть інфікувати різні види ссавців, у тому числі людей. Природного інфікування людей не зареєстровано, відзначалися окремі випадки зараження людей від нелюдиноподібних мавп. Зв'язку спумавірусів з якоюсь відомою патологією доки не встановлено, в той же час потрібно розуміти і те, що вони існують завдяки ресурсам клітини.

Ендогенні ретровіруси. Впродовж деякого часу було відомо, що геноми хребетних тварин містять ретровірусні послідовності. Нині в геномі людини виявлені майже 100000 таких послідовностей; їх виявляють в кожному новому виді, геном якого секвенують. Послідовності більшості цих ендогенних ретровірусів є дефектними.

Деякі з цих послідовностей близько споріднені з нормальними ретровірусами. Дуже імовірно, що ці ретровірусні послідовності з'явилися під час зараження ретровірусом зародкової лінії клітин, тобто сперматозоїдів і/або яйцеклітин. Час від часу ендогенні ретровіруси копіюють самі себе в інші частини геному, створюючи родини споріднених ендогенних ретровірусних елементів.

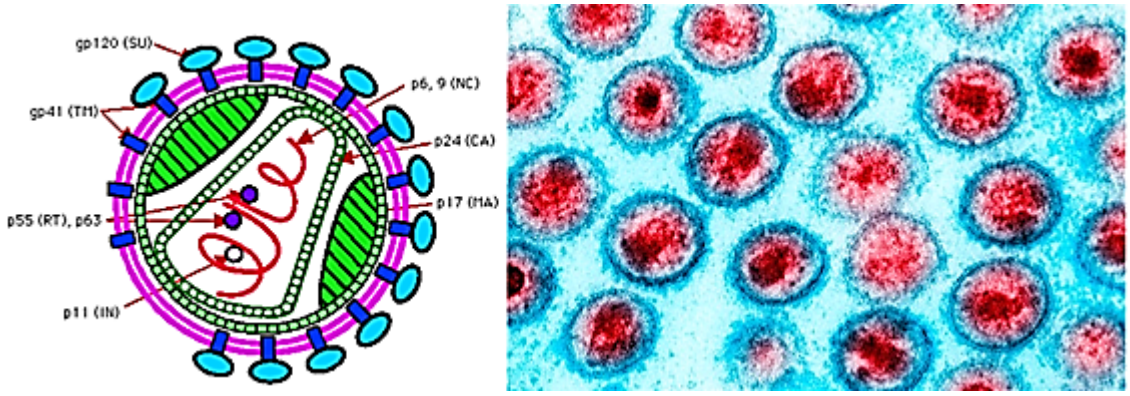
Оскільки ендогенні ретровірусні послідовності дефектні, вони не можуть нормально реплікуватися. Проте в деяких випадках реплікація може відбуватися. Порушену функцію одного ретровірусу може доповнити послідовність іншого ретровірусу або екзогенного ретровірусу, який заразив клітину. Деякі ендогенні ретровіруси не можуть реплікуватися в клітинах видів, в яких вони трапляються, але починають реплікуватися в клітинах інших видів; наприклад, деякі ендогенні ретровіруси мишей і свиней реплікуються в клітинах людини. Деякі ендогенні ретровіруси не є дефектними, вони мають повний геном і можуть ініціювати продуктивну інфекцію.

15.1.1.1. Вірус імунодефіциту людини

Відомо два типи вірусу імунодефіциту людини – ВІЛ-1 і ВІЛ-2. Їхнє походження пов'язане з двома різними вірусами імунодефіциту мавп (ВІМ). ВІМ не є небезпечним для своїх хазяїв-приматів, але ВІЛ руйнує імунну систему, внаслідок чого тіло людини стає сприйнятливим до зараження широким колом бактерій, вірусів, грибів і протистів. Такий стан зветься синдромом набутого імунодефіциту (СНІД). Слід звернути увагу, що неправильно буде сказати «вірус ВІЛ», оскільки тут слово вірус є зайвим. Не слід також говорити «вірус СНІДу» або «заражений СНІДом».

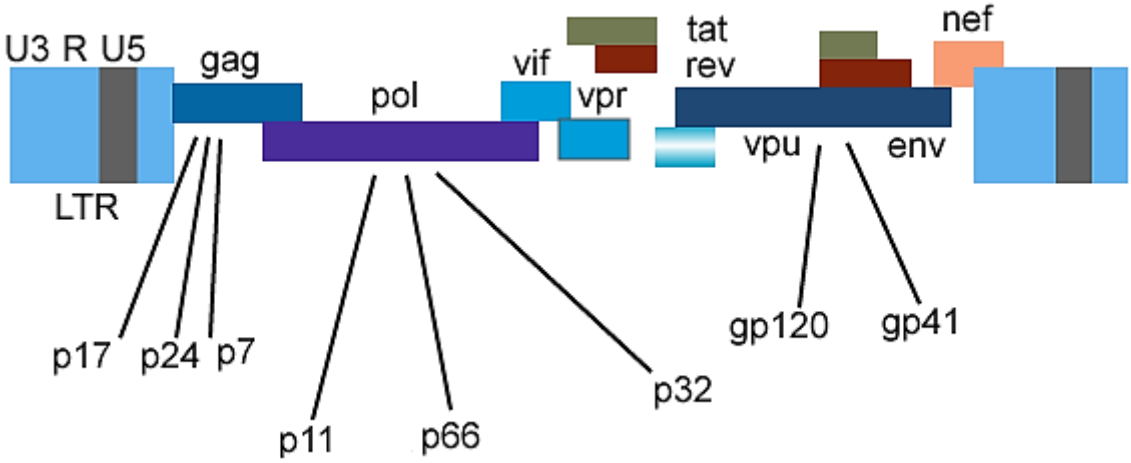
ВІЛ-1 поширений значно ширше, ніж ВІЛ-2; саме ВІЛ-1 відповідальний за пандемію СНІДу. Поширеність ВІЛ-2 обмежується Західною Африкою. За оцінками, нині щороку в середньому відбуваються 5 млн. нових випадків зараження ВІЛ, і приблизно 5 млн. смертей від СНІДу, який став четвертою по важливості причиною смерті у людей. Небезпека цієї проблеми привела до виділення величезних ресурсів на розробку противірусних препаратів і вакцини. Певний успіх був досягнутий в розробці противірусних препаратів, надійну вакцину створити доки не вдалося.

Віріон ВІЛ має усі особливості віріонів ретровірусів, проте, на відміну від більшості ретровірусів, нуклеокапсид має конусну форму, з діаметром 40-60 нм на широкому кінці і 20 нм у вузькому кінці (Мал. 15.1). Зазвичай у віріоні буває один капсид, хоча спостерігали віріони з двома і більше капсидами. Загальний діаметр віріона складає 80–110 нм.



Мал. 15.1. *Віріон ВІЛ. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. MA – білки матриксу, CA – білки капсиду, NC – нуклеокапсид, SU – глікопротеїни поверхні, TM – трансмембранні глікопротеїни, RT – зворотна транскриптаза, IN – інтеграза (адаптовано з відкритих джерел інтернету).*

Організація *геному* ВІЛ показана на Мал. 15.2.



Мал. 15.2. *Геном ВІЛ представлений двома копіями (+)РНК. Геном ВІЛ-1 має довжину близько 9000 нуклеотидів. Кінці геному мають довгі кінцеві повтори (long terminal repeat, LTR). Пояснення див. у тексті (за Los Alamos National Laboratory. HIV Sequence Compendium 2008).*

9 генів ВІЛ-1 кодують, принаймні, 15 білків. Ген *pol* кодує ферменти: зворотну транскриптазу, інтегразу і протеазу. Ген *gag* кодує поліпротеїн Gag/p55, який вірусна протеаза розщеплює на структурні білки p6, p7, p17 і p24. Ген *env* кодує білок gp160, що його клітинна ендопротеаза фурин розщеплює на структурні білки gp41 і gp120. Інші шість генів — *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* (*vpx* у ВІЛ-2) — кодують білки, необхідні для реплікації вірусу.

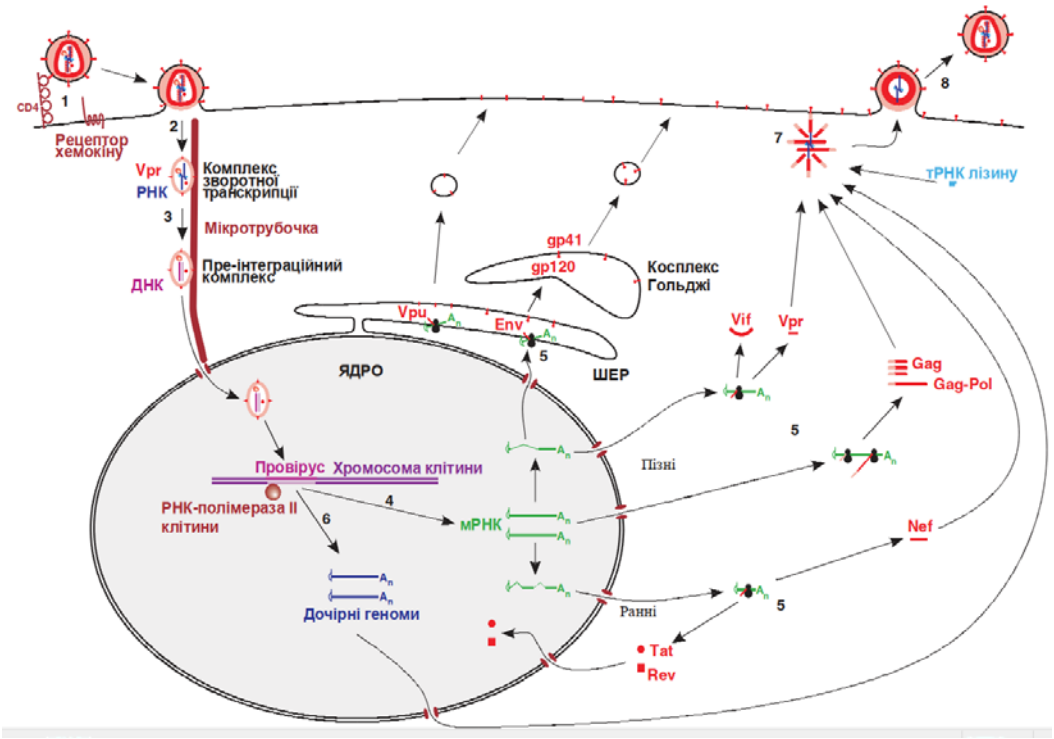
Загальна схема реплікації ВІЛ показана на Мал. 15.3.

На етапі прикріплення (Мал. 15.3, 1) рецепторами клітини для ВІЛ-1 є білки CD4, які знаходяться на поверхні клітин декількох типів, включаючи Т-хелперні клітини і деякі макрофаги; основною мішенню є CD4 Т-лімфоцити.

Після зв'язування з рецептором, віріон ВІЛ також повинен зв'язатися з корецепторами на поверхні клітини. Корецепторами слугують рецептори *хемокінів*.

Під час імунної відповіді ці рецептори зв'язують хемокіни, і ця взаємодія контролює переміщення лейкоцитів і диференціювання Т-лімфоцитів. Хемокіни за своєю структурою

розподіляються на два головні класи, і для кожного з класів є свій рецептор, а саме CCR і CXCR.



Мал. 15.3. Головні етапи реплікації ВІЛ. Пояснення у тексті. 1. Прикріплення. 2. Вхід в клітину. 3. Зворотна транскрипція. 4. Транскрипція. 5. Трансляція. 6. Реплікація геному. 7. Збирання. 8. Вихід віріонів (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Більшість штамів ВІЛ-1 як корецептор використовують CCR5, і їх позначають як штами R5. Цікаво, що у деяких людей, які багаторазово піддавалися дії вірусу, але не заразилися, є делеція в гені *CCR5*. У гомозигот по цій мутації рецептор CCR5 не експресується, тож їхні клітини є високостійкими до зараження ВІЛ-1. Ця мутація виявлена головним чином у жителів Європи.

Штами ВІЛ-1, які використовують як корецептор CXCR4, називають штамами X4; є також невелика кількість штамів, які можуть використати будь-який з корецепторів. Ці штами означають як R5X4. Штами R5 не можуть заражати наївні Т-лімфоцити, але усі три штами заражають Т-клітини імунологічної пам'яті.

Взаємодія білка вірусу gp120 з рецептором і корецепторами призводить до змін конформації білка gp41, в результаті яких відбувається злиття мембран клітини і вірусу (Мал. 15.3, 2; подробиці зображені на Мал. 4.7) і вміст віріона, що знаходиться в оболонці, вивільняється в цитоплазму. Тут формується комплекс зворотної транскрипції, що містить білки і геном вірусу. Після завершення зворотної транскрипції пре-інтеграційний комплекс, який містить білки вірусу і клітини-хазяїна, переміщається уздовж мікротрубочки до ядра (Мал. 15.3, 3). Як раніше було відмічено, більшість ретровірусів можуть викликати продуктивне зараження лише у разі руйнування ядерної оболонки, тобто коли клітина-хазяїн ділиться. Проте пре-інтеграційний комплекс ВІЛ-1 може входити в ядер, що покоються, наприклад ядра неактивних Т-лімфоцитів або макрофагів. У низки білків вірусу, що входять до складу пре-інтеграційного комплексу, виявлений сигнал ядерної локалізації.

Далі відбувається інтеграція провірусу в хромосому хазяїна. Існують докази, що інтеграція провірусу в CD4 Т-лімфоцити, що покоються, може привести до латентної інфекції.

Ці клітини можуть бути резервуаром інфекції в організмі, що має велике значення для виживання вірусу у людей, які одержують антивірусну терапію.

Після впровадження провірусу, в клітині відбувається експресія генів вірусу, яку підрозділяють на дві фази – ранню (Мал. 15.3, 4) і пізню (Мал. 15.3, 5). На кожній з цих фаз синтезуються свій набір білків. На завершальних етапах патогенезу синтезуються дочірні геноми (Мал. 15.3, 6), відбувається самозбирання вірусних часток, які не забувають прихопити лізинову тРНК хазяїна (Мал. 15.3, 7), і дочірні віріони вивільняються з клітини шляхом брунькування (Мал. 15.3, 8).

Незабаром після того, як людина заражається ВІЛ, відбувається значне збільшення вмісту віріонів в крові. У деяких людей в цей час спостерігається захворювання, що нагадує ангіну або грип. Імунна система хазяїна в цей період до деякої міри контролює реплікацію вірусу, і найчастіше цей період протікає безсимптомно. За умови відсутності застосування ліків, цей період в типовому випадку триває 8–10 років, але він може бути і значно коротше, і значно довше, залежно від особливостей хазяїна і вірусу.

Впродовж усього безсимптомного періоду здійснюється екстенсивна реплікація вірусу, і за оцінками більше 1000 нових віріонів ВІЛ-1 продукується щодня. Інфекція виживає, незважаючи на імунну реакцію проти вірусу. Причин цьому декілька. Одна з них полягає в тому, що вірус вбиває клітини (CD4 Т-лімфоцити і макрофаги), які беруть участь в імунній відповіді. Відомі також дані, що неінфіковані вірусом CD4 Т-лімфоцити гинуть через індукцію апоптозу. CD4 Т-лімфоцити грають центральні ролі як хелпери різних типів клітин імунної системи, включаючи В-лімфоцити, попередники цитотоксичних Т-клітин, клітин природних кілерів і макрофагів. Таким чином, імунна реакція значною мірою виявляється порушеною.

Друга причина полягає в тому, що протягом інфекційного процесу вірус еволюціонує, утворюючи нові антигенні варіанти, які можуть не розпізнаватися антитілами і наявними Т-клітинами. Більше того, в клітинах, які містять латентну інфекцію, вірус захищений від імунної системи.

У приблизно 50% заражених людей впродовж безсимптомного періоду починають з’являтися штами ВІЛ X4 і R5X4; таким чином у вірусу змінюються корецептори, яким він віддає перевагу.

Деякий час тіло людини може витримувати натиск вірусу на імунну систему, швидко замінюючи зруйновані вірусом клітини новими, але концентрація CD4 Т-лімфоцитів в крові постійно знижується і досягає точки, коли в крові різко збільшується вміст вірусних часток і розвивається СНІД. Для СНІДу характерно посилене зараження людини патогенними мікроорганізмами, також швидко можуть розвитися захворювання мозку і пухлини.

Якщо порівняти між собою ВІЛ-1 і ВІЛ-2, то під час зараження ВІЛ-2 безсимптомний період триває довше, прогресування хвороби відбувається повільніше.

Впродовж реплікації геному ретровірусів з високою інтенсивністю трапляються помилки, через відсутність механізму виправлення помилок протягом синтезу ДНК на матриці РНК. Через це ВІЛ-1 є особливо мінливим вірусом, який постійно утворює нові групи і підтипи. Варіабельність ВІЛ-1 проявляється в таких особливостях, як антигени, круг клітин, що вражаються, і стійкість до антивірусних препаратів.

Високу варіабельну проявляють антигени ВІЛ-1. Білок оболонки gp120 є особливо варіабельним. Винятково висока варіабельність цього білка ймовірно обумовлена тиском добору, який виявляється з боку імунної системи хазяїна.

Коло клітин, що вражаються вірусом, залежить від корецепторів, які потрібні для прикріплення вірусу і входу його в клітину. Встановлено, що перенесення ВІЛ-1 на нового хазяїна здійснюється майже завжди штамами R5, і цей тип штамів домінує впродовж гострої і безсимптомної фази інфекції. Потім у 50% заражених людей, у міру розвитку СНІДу, зростає доля штамів типу X4 і R5X4.

Нарешті, у випадку проведення антиретровірусної терапії, присутність ліків в організмі чинить тиск добору на вірус, внаслідок чого швидко виникають стійкі варіанти.

15.1.2. Родина *Hepadnaviridae*.

Гепаднавіруси дістали свою назву, оскільки вони викликають гепатити і мають ДНК-геноми (HEPAtic-DNA-virus). Реплікація геномів цих вірусів здійснюється через стадію зворотної транскрипції. ДНК-геномні віруси, які реплікуються через стадію РНК, відомі також у рослин. Ці віруси, разом з гепаднавірусами, дістали назву параретровіруси.

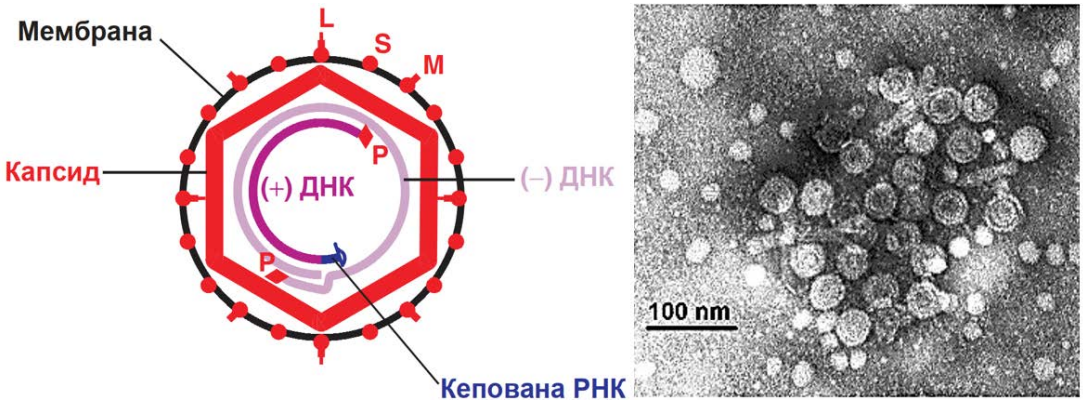
Деякі гепаднавіруси заражають комах, інші заражають птахів. З точки зору здоров'я людини, найбільше значення має вірус гепатиту В, оскільки він викликає небезпечне захворювання, яке може призвести до смерті.

15.2.2.1. Вірус гепатиту В

Невідомо, скільки людей заражені вірусом гепатиту В (*hepatitis B virus*, HBV), але, за оцінками, їх близько 400 мільйонів. Більшість з них мешкає в Азії і Африці. Вірус є присутнім в крові, і шляхи його передавання загалом схожі з ВІЛ. Щороку вірусом заражаються більше 50 мільйонів людей, в основному це діти, які отримують вірус від хворих матерів. Близько 8 мільйонів заражень щорічно відбувається через повторне використання шприців, в основному в країнах, що розвиваються.

Багато випадків зараження HBV приводять до слабких симптомів хвороби або взагалі є безсимпомними, особливо у дітей. Проте протягом зараження саме дітей найімовірніше перехід вірусу в персистентну форму, коли людина на багато років стає носієм вірусу. Люди, що мають персистентну інфекцію гепатиту В, можуть залишатися здоровими впродовж тривалого часу, проте в деяких випадках може розвинутися важкий гепатит, який переходить в цироз і зрештою в злоякісну пухлину печінки. З цієї причини щороку помирає близько мільйона людей.

Віріони вірусу гепатиту В покриті ліпідною оболонкою, сферичні, діаметром 42-50 нм. Нуклеокапсид має ікосаедричну симетрію. Геном складається з частково дволанцюгової ДНК, яка замкнена в кільце за рахунок спаровування нуклеотидів (Мал. 15.4).



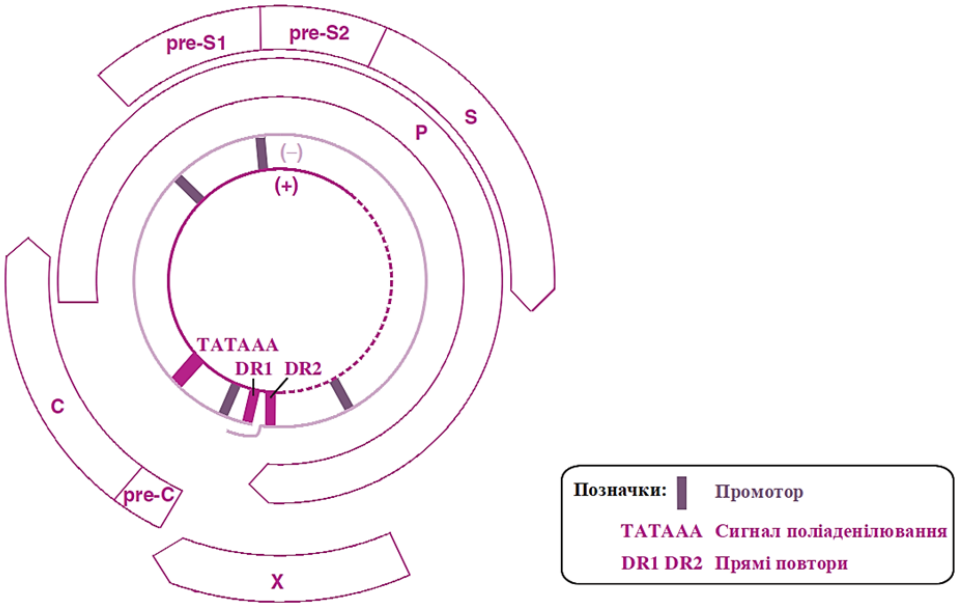
Мал. 15.4. Віріон вірусу гепатиту В людини. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. S – малий білок оболонки, M – середній білок оболонки, L– великий білок оболонки, P – полімераза (зворотна транскриптаза) (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Незвичайною особливістю інфекційного процесу, викликаного вірусом гепатиту В, є присутність в крові не лише віріонів, але також великої кількості неінфекційних часток, які вивільняються із заражених вірусом клітин. Ці частинки складаються з ліпідів і білків оболонки вірусу, але вони не містять нуклеокапсиду. Ці частинки можуть бути сферичної або нитчастої форми.

Віріони вірусу і неінфекційні частинки набагато численніші в крові, ніж у печінці, і неінфекційні частинки значно перевищують за кількістю віріони. Як відмічають, вірус вочевидь має переконливу причину для продукування такої кількості неінфекційних часток, але ця причина залишається незрозумілою. Припускають, що ці частинки є свого роду підсадними качками для антитіл, переймаючи на себе їхню атаку і таким чином захищаючи віріони від імунної системи хазяїна, проте остаточних доказів цьому припущенню поки що немає.

На додаток до віріонів і неінфекційних часток, в крові заражених людей також знаходять розчинний вірусний білок. Цей білок відомий як е-антиген гепатиту В (HBeAg). Він подібний до білка капсиду вірусу, але має додаткові 10 амінокислотних залишків на С-термінальному кінці. Функція або функції цього білка залишається невідомою.

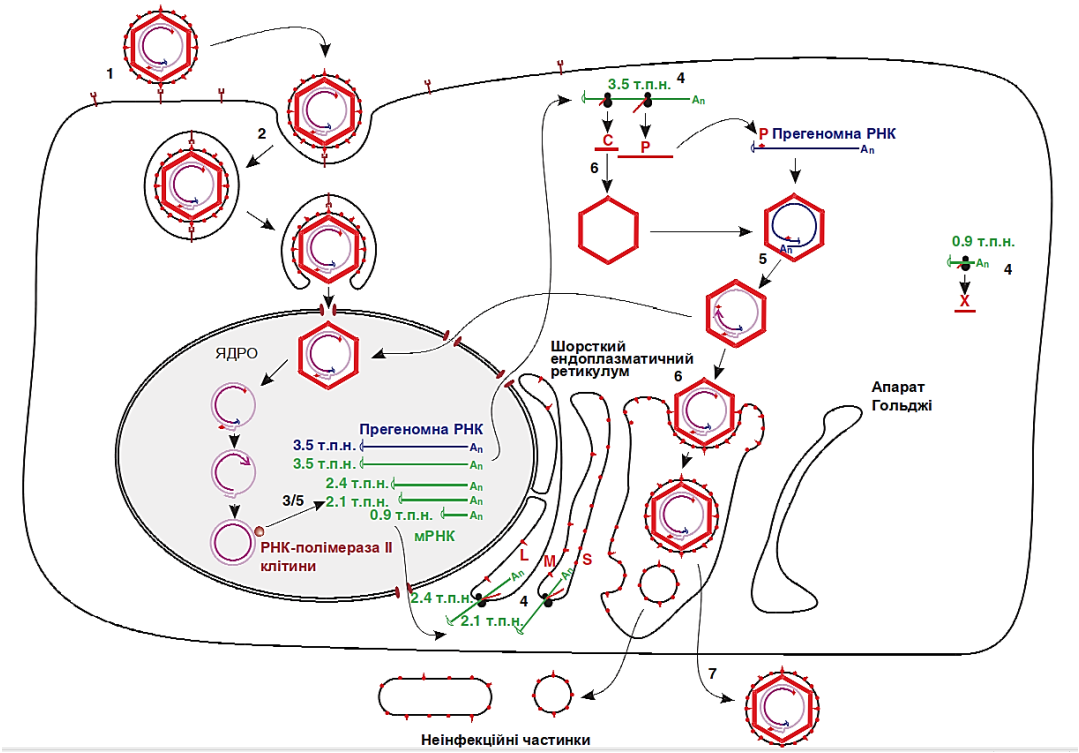
Реплікація вірусу гепатиту В. *Геном* HBV складається з частково дволанцюгової ДНК, яка замкнена в кільце за рахунок спаровування нуклеотидів (Мал. 15.5).



Мал. 15.5. Організація геному вірусу гепатиту В. Неповний (+)-ланцюг і повний (–)- ланцюг ДНК показані в оточенні чотирьох відкритих рамок зчитування (ORF). Геном невеликий, має розмір 3,2 т.п.н. Існує чотири ORF (C, P, S, X), з яких транслюється сім білків. P ORF, яка займає близько 80% геному, перекриває C і X ORF, а S ORF повністю знаходиться в P ORF. Геном містить прямі повтори 11 нуклеотидів, відомі як DR1 і DR2 (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Зараження вірусом гепатиту В гепатоцитів хазяїна починається з *прикріплення* до поверхні клітини-господаря (Мал. 15.6, 1). Довгий час рецептори для зв'язування HBV були невідомі, і лише за останні 10 років ситуація змінилася. Спочатку віріон неспецифічно і з низькою спорідненістю зв'язується з такими факторами, як протеоглікани гепарансульфату, такими як гліпікан 5, а потім взаємодіє зі своїм рецептором(-ами) більш специфічно та з високою афінністю. Як рецептор HBV був визначений котранспортуючий пептид таурохолату натрію (NTCP/SLC10A1), який специфічно експресується в печінці та функціонує для поглинання солей жовчі в гепатоцити. NTCP зв'язується з білком L віріона. Після

зв'язування з рецептором, HBV потрапляє до клітини шляхом опосередкованого рецептором ендоцитозу. Надалі відбувається злиття між вірусною оболонкою та везикулярною мембраною клітинного походження, хоча механізм злиття мембран залишається в основному невідомим. Нуклеокапсид, що надходить у цитоплазму, спрямовується до ядра по мікротрубочках і імпортується в ядро через комплекс ядерних пор залежним від імпортинів шляхом. Можливо, нуклеокапсид входить у ядро, оскільки було опубліковано докази того, що капсиди HBV можуть проходити через ядерні пори. Однак невідомо, чи відбувається це, чи відбувається декапсидація всередині ядерної пори, чи геном вивільняється в ядро, а капсид залишається в цитоплазмі.



Мал. 15.6. Схема циклу реплікації вірусу гепатиту В. Реплікація геному включає синтез РНК в ядрі, потім копіювання з РНК в ДНК (зворотна транскрипція) у капсидах. Етапи збирання віріону включають будівництво капсиду та отримання оболонки шляхом брунькування. Спосіб виходу віріонів і неінфекційних частинок з клітини не показано. 1. Прикріплення. 2. Вхід в клітину. 3. Транскрипція. 4. Трансляція. 5. Реплікація геному. 6. Збирання. 7. Вихід віріонів (за J. Carter, Vol. Saunders, 2013).

Коли геном вірусу опиняється в ядрі, він перетворюється на кільцеву дволанцюгову молекулу ДНК за рахунок дії факторів хазяїна. Ця молекула може довгий час існувати в клітині як епісома, мініхромосома, і використовуватися для реплікації вірусу, хоча яким чином вона підтримується у клітині, залишається невідомим.

длДНК вірусу в ядрі є матрицею для транскрипції (Мал. 15.6., 3). Геном HBV має чотири промотори (Мал. 15.5), розташовані вище за ділянки pre-S1, pre-S2, X і pre-C. Принаймні два з промоторів є високоспецифічними для клітин печінки, і було показано, що деякі залучені фактори транскрипції є білками клітин печінки. Це є принаймні частиною пояснення того, чому HBV є специфічним для клітин печінки. Швидкість транскрипції з усіх чотирьох промоторів контролюється зв'язуванням клітинних факторів транскрипції з двома енхансерними послідовностями, присутніми в геномі HBV. Вважається, що вірусний білок X також є фактором транскрипції, хоча, ймовірно, і не типовим. Транскрипція здійснюється клітинною РНК-полімеразою II і призводить до синтезу чотирьох класів (за розміром) мРНК. Усі транскрипти кеповані та поліаденільовані. Заслуговує згадки, що 3,5 т.п.н. РНК довші за

геном, який становить 3,2 т.п.н. Під час їх синтезу частина геному транскрибується двічі, отже, ці РНК мають прямі кінцеві повтори.

Серед РНК довжиною приблизно 3,5 к.п.н. є два підмножини, які дещо відрізняються за розміром. Коротший піднабір, який не включає стартовий кодон для послідовності пре-С, діє як мРНК для білків С і Р. ORF білка С знаходиться вище (upstream) за ORF білка Р, і більшість рибосом, які зв'язуються з цими мРНК, починають трансляцію зі стартового кодону білка С (Мал. 15.6, 4).

Існує принаймні три додаткових стартових кодону перед стартовим кодоном білка Р. Щоб транслювати ORF Р, вірогідно, рибосома обходить стартові кодони вище за допомогою «послабленого сканування». Таким чином HBV виробляє набагато більше капсидного білка, ніж полімерази. Коротша підмножина РНК довжиною 3,5 т.п.н. також діє як прегеном (див. нижче).

HBeAg транслюється з довшої підмножини мРНК довжиною 3,5 т.п.н., які включають стартовий кодон для послідовності pre-C. Після трансляції HBeAg виділяється з клітини.

Існують також підгрупи мРНК розміром 2,1 т.п.н. Білок М транслюється з найдовшої підмножини, а білок S — з кількох коротших підмножин.

Після трансляції, деякі з молекул білка оболонки стають глікозильованими, а L міристилюється на N-кінці.

Коли напрацьовується певна кількість вірусних білків, починається *збирання* дочірніх віріонів (Мал. 15.6, 6). Білок С може самозбиратися. Він утворює димери, які збираються в капсиди. Більшість капсидів складається з 120 димерів, але меншість побудована з 90 димерів і є меншими.

Молекула білка Р разом із кількома білками клітини зв'язується з молекулою РНК розміром 3,5 т.п.н., яка функціонуватиме як прегеномна РНК. Р зв'язується на ділянці всередині послідовності, відомої як ε (грецька буква епсилон), яка має специфічну вторинну структуру. Послідовність ε знаходиться в межах кінцевого повтору і тому присутня на обох кінцях прегеномної РНК. Однак незрозуміло чому білок Р зв'язується лише на 5′-кінці. Структура ε зі зв'язаним білком Р діє як сигнал упаковки для включення прегеномної РНК у капсид.

У капсиді відбувається синтез ДНК (Мал. 15.6, 5). Прегеномна РНК є матрицею, а ДНК синтезується доменом зворотної транскриптази білка Р з нуклеотидів, які входять через отвори в капсиді. Кінцевий білковий домен Р діє як праймер для ініціації синтезу мінус-ланцюга ДНК. Ковалентний зв'язок утворюється між групою –ОН залишку тирозину поблизу N-кінця Р і першим нуклеотидом. Схема реплікації геному вірусу гепатиту В наведена на Мал. 4.61.

Під час синтезу (+)-ланцюга ДНК нуклеокапсид може або мігрувати до ядра, щоб збільшити пул длДНК, або може зазнати процесу дозрівання, що дає йому змогу брунькуватися через мембрану, що містить білки оболонки вірусу. Синтез ДНК припиняється при брунькуванні, оскільки нуклеокапсид відрізається від пулу нуклеотидів у цитоплазмі. Це пояснює, чому (+)-ланцюг ДНК у віріоні є неповним.

Мембрани, через які відбувається брунькування, є частиною компартмента між ендоплазматичним ретикулумом і комплексом Гольджі. У міру брунькування копії білка L з N-кінцями на цитоплазматичних поверхнях мембран зв'язуються з капсидами (Мал. 15.6, 7). Віріони транспортуються на поверхню клітини, де вивільняються з клітини. Вважається, що транспорт відбувається всередині везикул, які зливаються з плазматичною мембраною,

вивільняючи віріони шляхом екзоцитозу. З клітини також вивільняються неінфекційні частинки.

15.2. Віруси рослин

Справжні ретровіруси невідомі в рослинах; однак параретровіруси рослин мають багато спільних з ретровірусами властивостей, реплікуючись шляхом транскрипції в ядрі з подальшою зворотною транскрипцією в цитоплазмі.

15.2.1. Родина *Caulimoviridae*

Caulimoviridae — родина вірусів рослин, члени якої реплікуються через зворотну транскрипцію. Назва родини утворена по назві типового члена - вірусу мозаїки цвітної капусти (**CAULI**flower **MO**saic virus). Віріони не мають оболонки, ізометричні, 45–52 нм у діаметрі, або бацилоподібні частинки 30×60–900 нм. Геном являє собою нековалентно замкнуту кільцеву дволанцюгову ДНК розміром 7,1–9,8 т.п.н.

Каулімовіруси заражають широкий спектр однодольних і дводольних рослин, хоча члени одного виду мають, як правило, вузькі діапазони господарів. Деякі віруси цієї родини викликають економічно важливі хвороби тропічних і субтропічних культур. Деякі віруси передаються комахами-переносниками, також віруси можуть передаватися при вегетативному розмноженні рослин.

Географічний ареал багатьох каулімовірусів широкий, вони можуть зустрічатися від тропіків до субарктичних регіонів.

Симптоми, спричинені цими вірусами, різноманітні та залежать від вірусу, хазяїна та кліматичних умов. Загалом, переважають мозаїки, міжжилкові хлоротичні плями, відставання в рості, жовто-оранжеве знебарвлення листя та смуги. Більшість вірусів у родині інфікують більшість типів клітин своїх господарів, хоча деякі представники родів *Tungrovirus* і *Badnavirus* обмежені ситоподібними трубками флоеми та паренхімою ксилеми.

Представники родів *Badnavirus, Caulimovirus, Cavemovirus, Petuvirus* і *Solendovirus* можуть мати як ендогенні (вірусна ДНК інтегрована в ядерний геном господаря), так і екзогенні епісомальні форми. Ендогенні вірусні елементи, схожі на існуючі каулімовіруси, широко поширені в геномах судинних рослин, що свідчить про існування в минулому додаткових вірусів у родині, які зараз існують лише як викопні послідовності в геномі свого хазяїна. Інтеграція вірусної ДНК в геном не є обов'язковим кроком у циклах реплікації цих вірусів, а скоріше ДНК захоплюється ядерним геномом хазяїна шляхом негомологічного з'єднання кінців (також відомого як нелегітимна рекомбінація). Здатні до реплікації ендогенні форми каулімовірів зустрічаються у видів рослин *Musa balbisiana, Petunia hybrida* та *Nicotiana edwardsonii*. Вони можуть призвести до спонтанних інфекцій епісомальними формами вірусного геному через активацію біотичним або абіотичним стресом. Дефектні не здатні до реплікації ендогенні каулімовірусні елементи широко поширені в дводольних і однодольних рослинах.

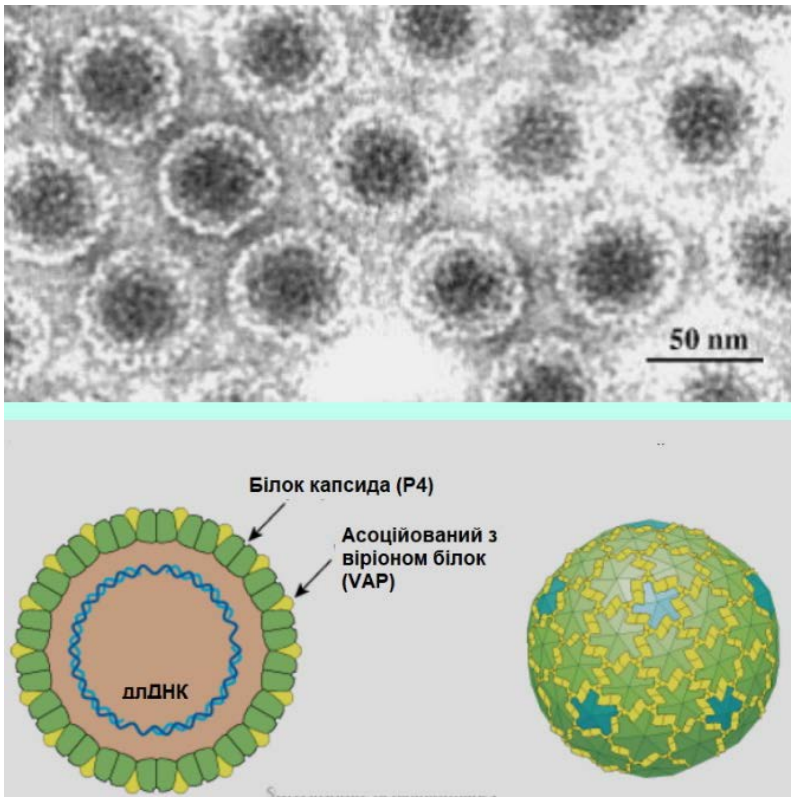
15.2.1.1. Вірус мозаїки цвітної капусти

Вірус мозаїки цвітної капусти (*cauliflower mosaic virus,* CaMV) інфікує переважно рослини родини *Brassicaceae* (такі як цвітна капуста та ріпа), але деякі штами також здатні інфікувати види *Solanaceae* родів *Datura* та *Nicotiana*. CaMV викликає різноманітні системні сим-

птоми, такі як мозаїка, некротичні ураження на поверхні листя, затримка росту та деформація загальної структури рослини. Виявлені симптоми відрізняються залежно від штаму вірусу, екотипу господаря та умов навколишнього середовища.

CaMV передається між рослинами-господарями більш ніж 27 видами попелиць напівперсистентним і нециркулюючим способом, тобто після того, як попелиця отримує вірус від інфікованої рослини, він не циркулює і не реплікується всередині комахи. Вірус зберігається протягом короткого періоду (кілька годин) у стилетах попелиць (ротовому апараті), де нещодавно були ідентифіковані рецептори CaMV. Потім вірус може вивільнитися, щоб ініціювати нову інфекцію під час живлення попелиці здоровими рослинами. Немає відомих випадків передавання вірусу через насіння.

Ізометричні *віріони* вірусу мозаїки цвітної капусти мають діаметр 52 нм з ікосаедричною симетрією (T=7) (Мал. 15.7).



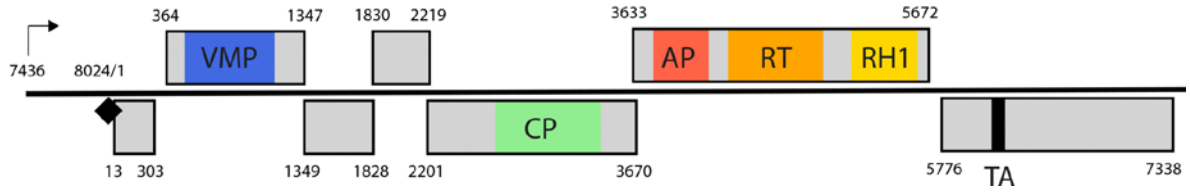
Мал. 15.7. *Віріон вірусу мозаїки цвітної капусти. Зверху – електронна мікрофотографія, знизу – схема будови і реконструкція (зверху – за https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1364-3703.2002.00136.x, знизу – за https://viralzone.expasy.org/119.html?outline=complete_by_protein,).*

Капсид віріону складається з трьох концентричних оболонок, побудованих з 420 молекул білка капсида P4 (CP), зібраних у капсомери у вигляді 60 гексонів і 12 пентонів. Внутрішня порожнина має діаметр близько 25 нм. Білки P3 (асоційований з віріоном білок, VAP) включені у віріон як трискеліонні[1] структури, які цементують разом три гексамери або пентамери. N-кінець білка P3 звернений назовні від капсида вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV). Він містить два спиральні мотиви з протилежною спрямованістю, що утворюють

[1]Трискеліон, трисцеліон або трискеле - це мотив, що складається з трьох блокуючих спіралей або трьох згинаних ніг людини. Слова складаються з грецького "τρισκέλιον" або "τρισκελής", "триногий", з префіксу "τρι-", "три рази" + "σκέλος", "нога".

димери шляхом антипаралельної взаємодії з сусідніми молекулами P3 для створення мережі навколо вірусної частинки. С-кінець білка P3, який має мотив зв'язування нуклеїнової кислоти, вбудований у пори, що оточують капсомери, і проходить через шари білка P4, досягаючи геномної ДНК.

Геном CaMV, як було зазначено, містить кільцеву дволанцюгову молекулу ДНК довжиною приблизно 8,0 т.п.н., переривану розривами, які є результатом дії РНКази H під час зворотної транскрипції. Негативний ланцюг ДНК має один розрив, а позитивний ланцюг ДНК — два або три розриви. Організація геному показана на Мал. 15.8.



Мал. 15.8. *Організація геному вірусу мозаїки цвітної капусти. Лінеаризована карта починається з місця початку транскрипції прегеномної РНК. Нумерація починається з першого нуклеотиду сайту зв'язування праймера тРНК метіоніну (чорний ромб). Світло-сірі поля позначають відкриті рамки зчитування (ORF). Консервативні білкові домени забарвлені: синій — транспортний білок вірусу (VMP), червоний — ретропепсин (пепсиноподібна аспарагінова протеаза) (AP), помаранчевий – зворотна транскриптаза (RT), жовтий – РНКаза H1 (RH1). Консервований С-кінець білка оболонки (CP) позначений зеленим кольором. Домен консервативного трансактиватора трансляції (TA) показаний чорним кольором (за ICTV Virus Taxonomy Profile: Caulimoviridae).*

Геном кодує сім білків, шість з яких можна виявити в інфікованих вірусом рослинах. Найпершою відкритою рамкою зчитування, є продукт гена VII, P7. P7 – це невеликий основний білок невідомої функції, який не був виявлений в інфікованих рослинах і можливо не транслюється. Інші білки такі: P1, транспортний білок; P2, фактор передавання попелицями/комахами, хелперний компонент; P3, асоційований з віріоном білок (VAP), структурний білок, здатний зв'язуватися з ДНК; P4, білок капсида (CP); P5, pro-pol, протеаза, біфункціональна зворотна транскриптаза та РНКазаH; P6: трансактиватор/віроплазмін, утворює тільця включення, має інші функції (див. нижче).

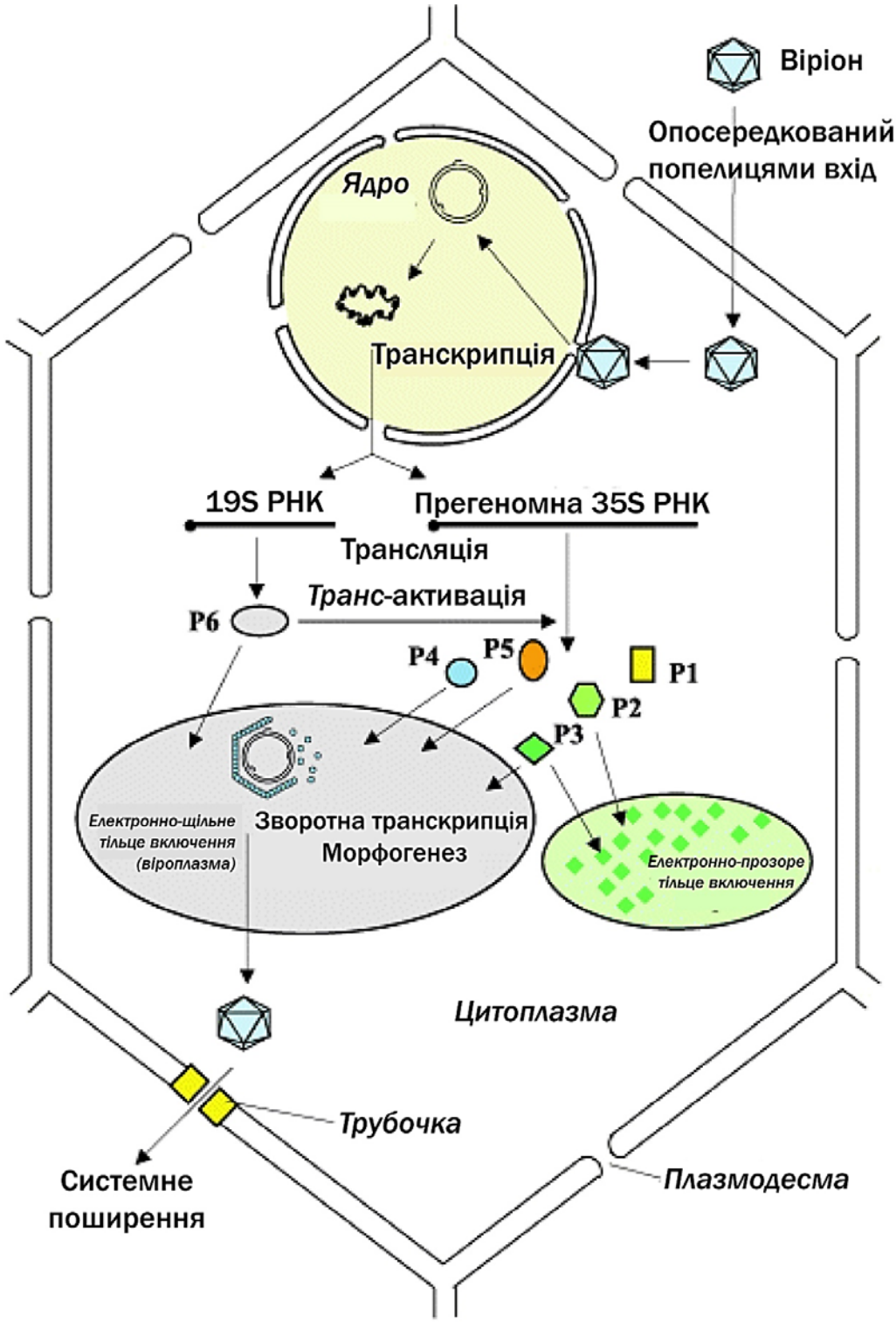
Цикл реплікації вірусу мозаїки цвітної капусти наведений на Мал. 15.9.

Після *входу* в клітину рослини-господаря віріони мігрують до ядерної оболонки рослинної клітини за допомогою сигналу ядерної локалізації на N-кінці капсидного білка. Геном вірусу потрапляє в ядро, де за рахунок дії факторів хазяїна розриви ДНК відновлюються, зв'язується з гістонами і утворюється суперскручена міні-хромосома. Інтеграції вірусної ДНК у хромосому хазяїна, як у ретровірусів, не відбувається.

Міні-хромосома CaMV *транскрибується* клітинною РНК-полімеразою II у два основних кепованих і поліаденільованих транскрипти, 35S і 19S РНК. Ці РНК транскрибуються з власних промоторів, локалізованих у великих і малих міжгенних областях відповідно.

19S РНК моноцистронною та кодує білок P6. 35S РНК охоплює весь геном і додатково має близько 180 нуклеотидів, тому вона термінально надмірна. Надмірність пояснюється тим фактом, що РНК-полімераза II ігнорує під час свого першого проходження сигнал поліаденілювання, розташований приблизно на 180 нуклеотидів нижче від місця початку транскрипції. 35S РНК служить і як поліцистронна матрична РНК для синтезу білків P1 до P5, і як матриця для зворотної транскрипції. Але 35S РНК може зазнавати альтернативний сплайсинг, і до 70% загальної вірусної РНК є сплайсованими версіями 35S РНК.

Також утворюється 8S РНК з лідерної області прегеномної РНК, яка служить «підсадною качкою», приманкою, відволікаючи противірусний механізм сайленсингу РНК від інших областей вірусного геному.



Мал. 15.9. Схематичне зображення циклу реплікації вірусу мозаїки цвітної капусти. Основними етапами є: (i) опосередковане попелицею проникнення вірусу в клітину-хазяїна, (ii) опосередковане сигналом ядерної локалізації транспортування частинок CaMV до ядерної пори, (iii) імпорт вірусної ДНК у ядро, (iv) відновлення розривів послідовності ДНК та асоціація з гістонами з утворенням мініхромосоми, (v) транскрипція вірусної ДНК клітинною РНК-полімеразою II, (vi) трансляція 19S РНК і 35S РНК і альтернативно сплайсованих версій, (vii) реплікація геному та морфогенезу вірусних частинок в електронно-щільних віроплазмах і (viii) переміщення вірусних частинок від клітини до клітини через плазмодесми (за M. Bureau et al., 2002, https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00136.x).

Трансляція продуктів генів вірусу, ймовірно, відбувається на поверхні тілець включення (вірусні фабрики, віроплазми), що складаються з вірусного білка P6. Важливо, що накопичення полісом можна спостерігати навколо цих структур, і всі білки, крім P2, що експресуються з РНК CaMV, знаходяться в тільцях включень.

Багатофункціональний білок P6 відіграє вирішальну роль під час вірусного циклу. Він є основним компонентом вірусних фабрик, віроплазм, які мають діаметр 5–10 мкм і є ознакою зараження рослинних клітин каулімовірусами. Вони є місцем синтезу вірусної ДНК та білка, морфогенезу та зберігання вірусних частинок. Крім того, завдяки взаємодії цього білка з клітинними факторами ініціації транскрипції і білками рибосоми відбувається трансляція віх білків поліцістронної 35S РНК шляхом термінації-реініціації трансляції. Також цей білок приймає участь у транспорті віріонів у суміжні клітини і формуванні симптомів ураження. Крім того, P6 є ефектором (Розд. 6.3, Мал. 6.11), який пригнічує імунні відповіді базального імунітету рослин, зокрема сайленсинг РНК.

Загалом, під час інфекції CaMV зазвичай утворюються два типи тілець включення: ті, що складаються переважно з білка P6, і ті, що складаються переважно з білка P2. Білок P6 утворює електронно-щільні віроплазми, аналоги вірусних фабрик. Білок P2 тимчасово асоціюється з мікротрубочками і утворює електронно-прозорі тільця включення. Збірка цих тілець відбувається в три етапи: P2 спочатку синтезується в вірусній фабриці, потім розподіляється вздовж мікротрубочок і зрештою утворює один агрегат. Електронно-прозорі тільця включення є динамічними, дисоціюють у відповідь на різні стимули та повторно асоціюються, коли стимули припиняються. Вважають, що їх дисоціація і наступний розподіл P2 уздовж мікротрубочок сприяє наступній передавання вірусу попелицями, і їх назвали трансмісійними тільцями.

Реплікація геному вірусу відбувається у цитоплазмі (сформованих білком P6 віроплазмах). При синтезі негативного ланцюга ДНК як праймер використовується метионінова тРНК господаря. Синтез обох ланцюгів здійснюється вірусною зворотною транскриптазою та РНКазою H1. Стійкі до РНКази H1 поліпуринові ділянки служать праймером для початку синтезу позитивного ланцюга ДНК

Після утворення у віроплазмах певної кількості дочірніх віріонів, вони транспортуються через плазмодесми у суміжні клітини, або поглинаються попелицями, які харчуються на хворих рослинах. Міжклітинний транспорт віріонів здійснюється при певній участі білка P6. Хоча механізми переміщення віріонів, нуклеопротеїнів або навіть центрів реплікації вірусів рослин по плазмодесмах не дуже зрозумілі, вважають, що агрегати транспортного білка P1 мігрують до клітинної плазмодесми, де збираються та утворюють трубчасті структури, що охоплюють мембрану та клітинну стінку. Потім вірусні частинки накопичуються всередині канальців. Транспортування здійснюється таким чином, що або вірусні частинки рухаються через канальці, або транспортні білки і віріони рухаються через плазмодесми разом у механізмі типу бігової доріжки, тобто збираючись на стороні донора та розбираючи на стороні приймача.

Попелиці отримують віріони завдяки взаємодії білка P2, який є хелперним компонентом, фактором передавання попелицями, зі специфічним рецептором у стилеті попелиці, а з іншого боку – з білком, асоційованим з віріоном (P3, VAP).

Білок P2 накопичується всередині інфікованої клітини, як вже зазначалось, у електронно-прозорих «трансмісійних тільцях». Він поглинається попелицею з цих трансмісійних

тіл і зв’язується через свій N-кінцевий домен зі специфічним неглікозильованим рецепторним білком, вбудованим у хітиновий матрикс, що вистилає кінчик стилета попелиці. Вірусні частинки поглинаються або з інфікованої клітини, або з флоеми. Віріони адсорбуються у стилеті за рахунок взаємодії між P2 і P3. Невідомо, як вірусні частинки вивільняються при повторному зараженні, чи розривається при цьому зв’язок P2-VAP або VAP-віріон. Цілком можливо, що відмінності в pH та іонних умовах рослинного соку та слини комах можуть контролювати зв’язування і вивільнення віріонів.

ДЖЕРЕЛА ІЛЮСТРАЦІЙ

1. Arslan D., Legendre M., Seltzer Vol., Abergel C., Claverie J.M. Distant Mimivirus relative with a larger genome high-lights the fundamental features of Megaviridae // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. Vol. 108, N42. P. 17486–17491.
2. Carter J., Saunders Vol. Virology: principles and applications. 2nd Edition. Chichester, England, John Wiley & Sons Ltd. 2013. 400 pp.
3. Crawford, S., Ramani, S., Tate, J. et al. Rotavirus infection. Nat Rev Dis Primers 3, 17083 (2017).
4. Diener, T. O. Discovering viroids—a personal perspective. Nature Reviews Microbiology, 2003, 1(1), 75-80.
5. Dimmock N. J., Easton A.J., Leppard K.N. Introduction to modern virology: 7th ed. Malden: Blackwell Publishing. 2016. 519 pp.
6. Enquist L.W., Skalka A. M., Flint S. J., Rall G. F., Racaniello, Vol. R. Principles of Virology, Vol. 1. Washington, DC: ASM Press, 2015. 574 pp.
7. Flores R., Gago-Zachert S., Serra P. , Sanjuán R., Elena, S. F. Viroids: survivors from the RNA world? // Annual review of microbiology. 2014. Vol. 68. P. 395-414.
8. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea // Science. 2010. Vol. 327, N. 5962. P. 167-170.
9. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens EB., Lefkowitz E.J. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press, 2012. 1372 pp.
10. Lacomme C., Jacquot E. General characteristics of Potato virus Y (PVY) and its impact on potato production: an overview. Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management. 2017. P. 1-19.
11. Malone B., Urakova N., Snijder E.J., Campbell E.A. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design// Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2022. Vol. 23, N 1. P. 21-39.
12. Maxwell, K. L. Bacterial twist to an antiviral defence // Nature. 2019. Vol. 574. P. 638-639.
13. Moody C.A. Mechanisms by which HPV induces a replication competent environment in differentiating keratinocytes // Viruses. 2017. Vol. 9. P. 261.
14. Qiu J., Söderlund-Venermo M., Young N.S. (2017). Human parvoviruses // Clinical microbiology reviews. 2017. V.30, N1. P. 43-113.
15. Raoult D., Forterre P. Redefining viruses: lessons from Mimivirus // Nat. Rev. Microbiol. 2008. Vol. 6, N4. P. 315–319.
16. Sun Y. et al. Structural changes of tailless bacteriophage ΦX174 during penetration of bacterial cell walls // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017. 114.52. P. 13708-13713.
17. van der Linden L., Wolthers K.C., Van Kuppeveld, F.J. Replication and inhibitors of enteroviruses and parechoviruses // Viruses. 2015. Vol. 7, N8. P. 4529-4562.

ЛІТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДАЛЬШОГО І ДОДАТКОВОГО ЧИТАННЯ

1. Bamford D.H.; Zuckerman M. Encyclopedia of virology. Academic Press, 2021.
2. Carter J., Saunders Vol. Virology: principles and applications. 2nd Edition. Chichester, England, John Wiley & Sons Ltd. 2013. 400 pp.
3. Dimmock N. J., Easton A.J., Leppard K.N. Introduction to modern virology: 7th ed. Malden: Blackwell Publishing. 2016. 519 pp.
4. Enquist L.W., Skalka A. M., Flint S. J., Rall G. F., Racaniello, Vol. R. Principles of Virology, Vol. 1, 2. Washington, DC: ASM Press, 2015.
5. Flint J., Racaniello V.R., Rall G.F., Hatziioannou T., Skalka A.M. Principles of virology, Vol. 1, 2. John Wiley & Sons., 2020.

Навчальне видання

Шамрай Сергій Миколайович
Леонтьєв Дмитро Вікторович

Вірусологія

Підручник

Видання друге, доповнене

Друкується в авторській редакції
Оригінал-макет підготовлено С. М. Шамраєм.
Дизайн обкладинки – Д.В. Леонтьєв.

Підписано до друку 12.10.2024.
Формат 21,0×29,7.
Гарнітура Times New Roman.



Шамрай Сергій Миколайович

кандидат біологічних наук, доцент. Працював на кафедрі мікології і фітоімунології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Автор понад 40 наукових і науково-методичних публікацій. Галузь наукових інтересів – механізми імунної відповіді рослин на ураження вірусами, бактеріями і грибами. Брав участь у піонерських для України дослідженнях можливості контролю ґрунтових патогенів флуоресцентними бактеріями роду *Pseudomonas*.



Леонтьєв Дмитро Вікторович

завідувач кафедри ботаніки ХНПУ імені Г.С. Сковороди, доктор біологічних наук, професор, соросівський, фулбрайтівський и гумбольдтівский стипендіат, головний редактор журналу «Біорізноманіття, екологія та експериментальна біологія», член Експертної групи МСОП з охорони міксоміцетів, вчитель вищої категорії. Автор близько 400 наукових і науково-методичних публікацій. Галузь дослідницьких інтересів – морфологія, систематика, молекулярна філогенетика, синекологія та созологія грибів і грибоподібних протистів. Описав 32 нових для науки види живих організмів, є ініціатором створення першої в світі філогенетичної класифікації міксоміцетів.

Друге видання