

УДК: 578.7:578.832.1:578.56

РЕАССОРТАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА: МЕХАНИЗМЫ И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ МЕЖВИДОВОГО БАРЬЕРА

Попов Н. Н., Колотова Т. Ю., Давыденко М. Б.

*ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины»,
г. Харьков, Украина, e-mail: imidir@ukr.net*

В обзоре проанализированы экспериментальные данные, касающиеся реассортации вируса гриппа. Согласно современным представлениям реассортация доминирует над мутагенезом при преодолении вирусом гриппа межвидового барьера. Процесс реассортации вируса тесно связан и зависит от механизма сборки вируса. Существует две модели ассортации вируса гриппа. Согласно первой модели сборка вируса происходит случайно, и сегменты вирусной РНК включаются в вирионы с одинаковой вероятностью. Однако экспериментальные данные свидетельствуют в пользу селективной модели сборки вируса, которая предполагает неслучайный характер внедрения РНК сегментов в вирион. Существуют специфические последовательности РНК, называемые цис-элементами сборки, с помощью которых восемь сегментов РНК вируса сначала связываются в узел, а затем собираются в вирионы. Интересно, что элементы сборки сегментов генома вируса в узел расположены в генах вируса. Таким образом, гены вируса узнают друг друга и связываются друг с другом. Помимо цис-элементов РНК белок нуклеопротеина вируса гриппа играет существенную и специфическую роль в ассортации вирусного генома. При изучении влияния нуклеопротеина на процесс сборки вируса был открыт так называемый «аминокислотный код», расшифровка которого имеет общебиологическое значение.

Механизм ассортации вируса влияет на вероятность образования различных комбинаций сегментов РНК при реассортации. Цис-элементы сборки как по последовательности так и по расположению уникальны для каждого штамма вируса гриппа. Специфичность цис-элементов вирусов затрудняет обмен РНК сегментами между различными штаммами. А способность сегментов РНК узнавать друг друга и взаимодействовать друг с другом при связывании сегментов генома в узел способствует их коагрегации во время образования реассортантов. Наиболее интенсивно процесс реассортации вируса происходит в природных резервуарах вируса гриппа, которыми являются водоплавающие и прибрежные птицы.

Ключевые слова: *вирус гриппа, селективная модель ассортации вируса, реассортация, нуклеопротеин, аминокислотный код, цис-элементы сборки вируса, природные резервуары*

Филогенетические исследования показывают, что в эволюции вирусов часто происходит преодоление межвидового барьера, однако молекулярные процессы, приводящее к смене хозяина, на данный момент изучены недостаточно. Выделяют тринадцать факторов, способствующих преодолению вирусом межвидового барьера [1]. К этим факторам относится изменчивость генома вирусов, изменения климата, погоды и экосистем, изменение привычек и образа жизни человека, международная торговля и путешествия, нищета, социальное неравенство, войны [1]. Среди перечисленных факторов ключевую роль играет изменчивость генома. Для сегментированных вирусов, к которым принадлежит вирус гриппа, основными механизмами изменчивости генома являются мутации и реассортация РНК сегментов.

Вирус гриппа состоит из нескольких молекул РНК и относится к сегментированным вирусам. Общим свойством сегментированных вирусов является способность к реассортации, которая происходит при коинфицировании двумя вирусами одной клетки в том случае, когда образующиеся в клетке потомки включают РНК сегменты обоих вирусов.

Реассортация доминирует над процессом мутагенеза при пересечении вирусом гриппа межвидового барьера [2]. Изучение последовательностей генома вируса гриппа показало, что чем больше количественные различия между двумя экологическими нишами обитания вируса, тем больше значение реассортации для смены экологической ниши. Другими словами, чем виды больше эволюционно удалены, чем больше различия между ними, тем выше роль реассортации в преодолении вирусом межвидового барьера. В то же время неясно, когда происходит реассортация, в результате которой преодолевается межвидовой барьер. Реассортация может происходить до смены хозяина внутри организма предыдущего хозяина при заражении его разными штаммами вируса или после переноса вируса в новый организм.

Необходимым условием реассортации является коинфекция клетки двумя разными вирусами. Обычно в инфицированных клетках развивается механизм подавления суперинфекции и клетка, инфицированная вирусом, становится невосприимчивой к вторичной инфекции, вызываемой родственным вирусом [3]. Препятствуют дальнейшей инфекции специфические вирусные белки. Однако некоторые вирусы могут инфицировать клетку множество раз [4-6]. Множественную вирусную инфекцию одной клетки легко воспроизводят в экспериментальных системах [7].

Модели ассортации вируса гриппа. Реассортация тесно связана с процессом сборки (ассортации) вирусного генома и его упаковки в вирионы. Существует две модели ассортации вирусов. Согласно первой модели сборка вирусных

частиц является случайным процессом [8], при котором сегменты вирусной РНК включаются в вирионы с одинаковой вероятностью, но клеточная РНК или РНК других вирусов не включается. Согласно второй модели, которая называется селективной моделью сборки, ассортация вируса это неслучайный процесс [9, 10], специфические цис-элементы контролируют сборку и внедрение полного комплекта РНК сегментов в вирусные частицы.

Некодирующие районы каждого РНК сегмента вируса гриппа не содержат гены и состоят из консервативных промоторных регионов и следующих за ними неконсервативных районов. Неконсервативные некодирующие районы сегментов вирусной РНК локализованы между промотором и кодоном, с которого стартует транскрипция, или стоп кодоном. Такое строение имеют и 3', и 5' концы каждого сегмента. Консервативные вирусные промоторы состоят из 12 нуклеотидов на 3' конце и 13 нуклеотидов на 5' конце, которые по принципу комплементарности формируют специфическую вторичную структуру, узнаваемую РНК-зависимой РНК полимеразой [11]. В пользу случайной модели сборки вирусов гриппа свидетельствует тот факт, что последовательности концевых промоторов для РНК полимеразы всех восьми сегментов консервативны и являются минимальными РНК последовательностями, необходимыми для сборки вирусов [12].

Некоторые вирусные частицы гриппа содержат неполный набор сегментов, что также поддерживает модель случайной упаковки вирусов [13].

Однако экспериментальные данные свидетельствуют в пользу селективной модели сборки вирусных частиц.

Во-первых, гибридизация *in situ* показала, что большинство вирионов содержат по одной копии всех восьми рибонуклеопротеиновых РНК сегментов, каждый из которых состоит из молекулы вирусной РНК, множества молекул нуклеопротеина (NP) и РНК-зависимого РНК полимеразного комплекса [9, 14].

Во-вторых, с помощью электронной микроскопии показано, что восемь РНК сегментов вируса гриппа, собираются с образованием структуры, в которой семь сегментов вирусной РНК окружают один сегмент [15, 16]. Сеть взаимодействий между сегментами РНК вируса гриппа не является консервативной и одинаковой для всех вирусных штаммов, вирусы формируют уникальную для каждого штамма сеть РНК-РНК взаимодействий.

В-третьих, с помощью делеций, мутаций и создания рекомбинантных сегментов РНК выявлены специфические для каждого сегмента последовательности РНК, называемые сигналами сборки или цис-элементами сборки [17, 18]. Как *in vitro*, так и *in vivo* все восемь РНК сегментов вируса гриппа А взаимодействуют друг с другом с помощью специфических для каждого сегмента цис-элементов РНК [17-19]. Мутации цис-элементов сборки снижают эффективность включения как мутантных сегментов, так и других сегментов в вирионы [19, 20] и, как показывает электронная микроскопия, значительно снижают количество образующихся вирусных частиц [14, 18].

Что же собой представляют цис-элементы сборки. В разных сегментах неконсервативные некодирующие районы различны по длине и последовательности нуклеотидов. В то же время для одного и того же сегмента у различных штаммов вируса гриппа А нуклеотидные последовательности некодирующих неконсервативных районов консервативны. Поэтому эти районы называют сегмент-специфическими некодирующими районами (NCR).

Согласно результатам первых исследований специфические для каждого РНК сегмента цис-элементы сборки располагаются в 3' и 5' NCR регионах и в терминальных районах кодирующих последовательностей каждого сегмента, т. е. на концах генов. Однако дальнейшие исследования усложнили эту картину. Действительно, специфические цис-элементы вируса гриппа человека H1N1 штамма расположены в районе последних 100 нуклеотидов кодирующих последовательностей [14, 17]. Однако данные томографии показывают наличие множественных контактов между РНК сегментами, которые располагаются вдоль всех сегментов [16, 21]. Если РНК-РНК взаимодействия в случае вирусного штамма H3N2 человека в основном картированы в терминальных концах кодирующих регионов [22], то для птичьего вируса H5N2 взаимодействия локализованы и в центральных районах кодирующих регионов [23].

Цис-элементы, вовлеченные во взаимодействие между 2 и 8 РНК сегментами птичьего вируса гриппа H5N2, расположены на расстоянии более чем 250 нуклеотидов от обоих концов кодирующих последовательностей [23]. В то же время эта пара элементов не консервативна даже среди вирусов H5N2 штамма, а тем более для штаммов вируса гриппа человека H1N1 и H3N2.

Из приведенных данных следует, что цис-элементы сборки различных штаммов не совпадают и по последовательности нуклеотидов, и по точному расположению внутри РНК сегментов. Каждый штамм вируса А обладает уникальным набором цис-элементов сборки.

Специфическими цис-элементами для образования сети взаимодействия между РНК сегментами обладает не только вирус гриппа А, но и вирус гриппа В, у которого на 3' и 5' концах кодирующей последовательности 4 сегмента обнаружены цис-элементы, необходимые для упаковки сегмента в вирион [24].

Таким образом, специфические для штаммов цис-последовательности РНК обеспечивают ассортацию сегментированных вирусов. Согласно экспериментальным данным, полученным за последние несколько лет, цис-последовательности сборки состоят из двух типов элементов: элементов для внедрения в вирион и элементов для связывания сегментов друг с другом в узел [23, 25]. Элементы, служащие для внедрения в вирион, лежат в области 3' и 5' NCR некодирующих сегментов РНК. Цис-элементы связывания сегментов в узел расположены в кодирующих районах молекул РНК [25].

Рекомбинантные сегменты, состоящие из 3' и 5' NCR районов вируса, окружающих невирусный ген, включаются в вирионы. Однако при этом вирус теряет рекомбинантный сегмент после нескольких пассажей. Таким образом, цис-элементы сборки недостаточны для сохранения сегмента в вирионе в течение циклов репликации [12].

Цис-элементы, лежащие в NCR районах РНК сегмента, кодирующего NP белок, достаточны для включения сегмента в вирионы. С другой стороны сам по себе цис-элемент связывания в узел недостаточен для включения содержащего его

сегмента в вирион. Однако при наличии других сигналов связывания цис-элемент связывания увеличивает эффективность включения в вирион как собственного сегмента, так и других сегментов РНК. Вероятно, это происходит потому, что с помощью цис-элементов связывания индивидуальные сегменты РНК взаимно рекрутируют друг друга таким образом, что в результате в вирион включаются не единичные сегменты, а весь геном. На основании этих данных предполагается, что ключевую роль в обеспечении неслучайного характера ассортации играют именно цис-элементы связывания РНК сегментов в узел.

В большинстве случаев цис-элементы связывания РНК сегментов точно не картированы, не известны их локализация, размер и полная первичная нуклеотидная последовательность. Затрудняет картирование цис-элементов связывания их расположение в кодирующих районах, а также спиральная рибонуклеопротеиновая укладка РНК сегментов. Поэтому пока неясно, образуется ли сеть взаимодействий за счет комплементарных взаимодействий между цис-элементами, за счет формирования специфических вторичных структур РНК или за счет опосредованных белками взаимодействий между РНК сегментами. Не исключается и участие клеточных факторов в процессе специфической сборки вирусного генома.

В пользу предположения о комплементарных взаимодействиях свидетельствует определение точной последовательности одной из пар взаимодействующих цис-элементов 2 и 8 РНК сегментов H5N2 вируса [23]. О необходимости комплементарных РНК-РНК взаимодействий для сборки сегментов в узел свидетельствует и изучение ассортации у представителя рода *Orbivirus* катарального вируса ВТВ. Цис-элементы для связывания РНК сегментов друг с другом у орбивирусов также специфичны, как и цис-элементы связывания в узел вируса гриппа [26, 27]. Эксперименты с использованием олигонуклеотидов, специфически взаимодействующих с цис-элементами ВТВ вируса, а также мутагенез цис-элементов убедительно доказали необходимость комплементарных РНК-РНК взаимодействий для связывания сегментов генома. Мутации только тогда не влияли на процесс связывания РНК сегментов, когда в пару взаимодействующих цис-элементов вводились компенсирующие мутации для восстановления комплементарного взаимодействия [27].

До сих пор не было обнаружено ни одного клеточного или вирусного белка специфически узнающего специфические цис-элементы. Однако недавно удалось показать, что помимо комплементарных взаимодействий между молекулами РНК, для сборки РНК сегментов вируса гриппа необходим NP белок. В среднем каждые 24 нуклеотида РНК сегмента связаны с одним мономером NP. Замена в NP белке консервативных аминокислотных остатков нарушает процесс сборки вирусных сегментов [28]. Аминокислотные остатки NP белка нужны для координированной упаковки восьми РНК сегментов в вирусную частицу, но не для включения одного сегмента в вирусную частицу. В зависимости от того, какая аминокислота NP белка и на какую другую аминокислоту заменяется, различный набор вирусных сегментов включается в вирионы. Таким образом, замена аминокислотной последовательности не просто нарушает процесс сборки, но специфическим образом изменяет его. Следовательно, и мутации цис-элементов связывания РНК сегментов в узел, и изменения аминокислотной последовательности NP белка приводят к одинаковому результату: нарушают координированную сборку генома вируса.

Это наблюдение позволило предположить существование аминокислотного кода, который задает сборку вирусных сегментов при образовании вириона. Расшифровка аминокислотного кода РНК-связывающих белков имеет общебиологическое значение, поскольку позволяет понять не только ассортацию вирусных сегментов, но и образование других комплексов, состоящих из нескольких РНК молекул.

Итак, процесс сборки вирусов гриппа обеспечивается цис-элементами сборки вирионов и цис-элементами связывания сегментов в узел, а также аминокислотным кодом NP белка.

На данный момент селективный механизм упаковки вируса гриппа в вирионы выглядит следующим образом [29]. После поступления из ядра в цитоплазму РНК сегменты накапливаются в районе центров организации микротрубочек. Вирусные РНК сегменты, представляющие собой на этой стадии уже рибонуклеопротеиновые комплексы, формируют между собой специфические связи и прикрепляются к рециркулирующим микровезикулам, содержащим фермент гуанозинтрифосфатазу Rab11 [30]. Таким образом, именно на этой стадии начинается процесс сборки генома, и формируются первые подузлы генома. На данный момент не ясно, каким образом сегменты РНК присоединяются к везикулам. Однако известно, что для этого процесса необходима PB2 субъединица полимеразного комплекса вируса. Микровезикулы транспортируют первичные подузлы к месту сборки вирусных частиц на плазматической мембране. При транспортировке рециркулирующие везикулы образуют агрегаты. По-видимому, агрегаты являются платформами для концентрации сегментов, в которых РНК сегменты узнают друг друга и образуют узлы, состоящие из 8 сегментов. Для узнавания и связывания сегментов на этом этапе нужны цис-элементы, по крайней мере часть из которых расположена в генах. Отсутствие Rab11 фермента приводит к снижению колокализации РНК сегментов в цитоплазме [30]. Затем связанные в узлы геномы перемещаются к плазматической мембране, где и включаются в вирионы. Упаковку генома в вирионы регулируют цис-элементы сборки, локализованные в NCR сегментах. На данный момент не исключается, что элементы РНК, регулирующие связывание генома в узел, частично совпадают с цис-элементами сборки в вирионы. Однако, как следует из приведенных выше данных, некоторые цис-элементы связывания в узел отличаются от элементов сборки в вирионы.

Неслучайный характер реассортации вируса гриппа. Из модели ассортации, представленной выше, следует, что необходимость специфических цис-элементов сборки и связывания сегментированных вирусов, а также особый аминокислотный код, ограничивают возможности реассортации вирусов, делают процесс реассортации неслучайным. Генетически более дивергировавшие вирусы образуют реассортанты значительно реже, чем генетически близкие штаммы вируса, и ключевую роль в этом процессе играет совпадение цис-элементов сборки вируса [10, 31].

Крайне редко образуются реассортанты между вирусами гриппа А и В типов, которые сходны и находятся в одной экологической нише. При замене специфических последовательностей вируса гриппа В цис-элементами сборки вируса А

удалось получить рекомбинантный A/B вирус, который вступает в реассортацию с другими вирусами гриппа А по крайней мере *in vitro* [32].

Теоретически количество генотипов, которые могут возникнуть при реассортации вируса гриппа А, составляет $256 (2^8)$, однако, образование некоторых из этих сочетаний никогда не наблюдалось ни в эксперименте, ни в природе [33, 34]. Что же ограничивает появление определенных генотипов вируса.

В образующихся реассортантах некоторые сегменты имеют тенденцию встречаться совместно. При реассортации *in vitro* между вирусом H3N2 человека и птичьим вирусом гриппа H5N2 генные сегменты, кодирующие гемагглютинин HA и М белки, сегрегируют совместно [10]. Филогенетические исследования позволяют предположить, что совместно сегрегируют при образовании реассортантов вируса гриппа А сегменты, кодирующие NS и NP белки, а также сегменты, кодирующие PB2, PB1 и PA субъединицы полимеразы [11]. Сходное явление наблюдается и для вируса гриппа В. Так при реассортации вируса гриппа В вирионы обычно содержат генные сегменты, кодирующие первую, вторую субъединицы полимеразного комплекса и ген гемагглютинина одного штамма [35]. Совместная сегрегация сегментов ограничивает возможное количество комбинаций, образуемых при реассортации.

Частое обнаружение в реассортантах определенных комбинаций генных сегментов предполагает либо предпочтительную совместную сегрегацию при реассортации сегментов, либо селективные преимущества образующихся в результате таких комбинаций реассортантов. Таким образом, возникает вопрос, является ли совместная сегрегация результатом селекции, или задается изначально самим процессом реассортации?

Два РНК сегмента вируса гриппа, кодирующих РНК полимеразу (PB1 сегмент) и нейраминидазу (NA), неслучайным образом сочетаются при реассортации. Ген PB1 содержит locus размером около ста нуклеотидов, который необходим для совместной сегрегации двух сегментов [36]. Последовательности локуса длиной от 7 до 22 нуклеотидов PB1 гена комплементарны участкам NA гена. Предполагается, однако, точно это пока не показано, что с помощью этих последовательностей образуются комплементарные взаимодействия между двумя генами, которые и определяют неслучайное сочетание двух сегментов при реассортации. Таким образом, при образовании новых реассортантов элементы последовательности PB1 гена способствуют соединению двух сегментов генома вируса и направляют совместное включение этих сегментов в вирионы. Следовательно, отсутствие некоторых комбинаций сегментов при реассортации можно объяснить не столько результатом отбора наиболее приспособленных вариантов, сколько результатом самого процесса реассортации.

Иногда при сборке вирусы гриппа формируют частицы, содержащие неполный набор геномных сегментов [37, 38]. Среди таких вирусов увеличивается скорость реассортации, несмотря на снижения их репродуктивных возможностей [37]. Пропорция вирионов, не содержащих полный набор РНК сегментов, зависит от вирусного штамма [38]. Некоторые штаммы не формируют неполные вирусные частицы вообще, а у других их количество достигает 20 %.

Эти данные не опровергают селективную модель сборки вирусов, но свидетельствуют о достаточной гибкости сборки и ее зависимости от пока не установленных генетических факторов, а также, вероятно, условий внешней среды. Действительно, изолированные штаммы вирусов гриппа А и В типов чаще содержат не полностью упакованные геномы, чем лабораторные штаммы. Таким образом, упаковка вирусов зависит от условий, в которых реплицируется вирус. Предположительно, на пропорцию может влиять тип клеток, в которых реплицируется вирус, и время после начала инфекции [38]. На первый взгляд способность вируса гриппа формировать неполные вирусные частицы невыгодна для него, но именно такая гибкость дает возможность для генетической реассортации и способствует наряду с мутагенезом созданию вирусной вариативности.

Из изложенных выше данных следует три важных вывода. Во-первых, процесс реорганизации генома при реассортации устроен таким образом, что достаточно велика вероятность возникновения жизнеспособных вариантов. Дальнейшее изучение порядка сборки сегментов в подузлы, а затем в узел позволит лучше понять то, какие комбинации с наибольшей вероятностью могут возникать при реассортации.

Во-вторых, изучение механизма, который обеспечивает косегрегацию РНК сегментов при ассортации и реассортации вирусов, свидетельствует о том, что вирусные гены узнают друг друга и специфически взаимодействуют друг с другом. Фундаментальный вопрос, вытекающий из этих исследований, заключается в том, является ли способность генов узнавать друг друга частным случаем, или она имеет общебиологическое значение.

В-третьих, дальнейшая расшифровка всех деталей процесса ассортации вирусного генома позволит выявить те клеточные факторы, с помощью которых клетка и организм хозяина в целом могут регулировать процесс ассортации вирусных частиц, а, следовательно, и реассортацию вируса.

Реассортация вируса гриппа в естественных резервуарах. Инфицирование вирусом гриппа диких птиц и домашних уток практически не приносит им вреда [39]. У инфицированных птиц зафиксированы незначительное снижение массы тел [40] и кратковременное незначительное повышение температуры тела [41]. Обнаружены небольшие различия по иммунологическим показателям [42]. У диких уток снижается количество откладываемых яиц в течение одной недели после заражения. Не изменяются поведение и подвижность инфицированных и неинфицированных птиц. Инфицированные птицы не теряют способности к длинным перелетам и соответственно могут распространять вирус во время сезонных миграций [43]. Таким образом, водоплавающие и прибрежные птицы являются природными резервуарами вируса гриппа. В то же время домашние птицы не являются естественными резервуарами и чувствительны к инфицированию вирусом гриппа [44]. Птичий вирус гриппа у кур часто вызывает сильную простуду и смерть, в отличие от домашних уток, у которых птичий вирус гриппа не вызывает клинических проявлений и сильного иммунного ответа [39].

Скорость реассортации вируса гриппа в природных резервуарах чрезвычайно высока [45]. Вирусы птичьего гриппа содержат 16 типов гемагглютинаина и 9 типов нейраминидазы. У диких птиц обнаружены по крайней мере 103 из 144 типов вируса птичьего гриппа, возможных при свободном сочетании различных типов HA и NA сегментов [46]. Тот факт, что в организме диких птиц формируется большинство из возможных сочетаний HA/NA субъединиц, доказывает высокую частоту реассортации. Домашние утки также являются природными резервуарами вируса гриппа, и в них происходит реассортация различных штаммов [47].

Филогенетический анализ геномов вируса птичьего гриппа показал, что вирус в организме диких птиц существует в виде большого пула функционально эквивалентных и взаимозаменяемых генных сегментов, которые формируют так называемые «геномные созвездия» [45]. При сборке вирионов из «геномных созвездий» легко возникают практически любые сочетания вирусных сегментов. Фактически в организме диких водоплавающих птиц идет постоянная перетасовка генома вируса гриппа. По-видимому, именно повышенная выживаемость вируса в природных резервуарах позволяет успешно реплицироваться разнообразным сочетаниям РНК сегментов и способствует высокой эффективности реассортации.

Для вирусов птичьего гриппа характерна постоянная смена хозяев. Вирусы, преодолевая межвидовой барьер, инфицируют домашнюю птицу, свиней, лошадей, людей. По всей вероятности, именно постоянно идущая в организме птиц реассортация создает необходимую генетическую вариабельность, которая позволяет вирусу с высокой эффективностью преодолевать межвидовые барьеры.

Таким образом, реассортация в природных резервуарах сходна с половым размножением и создает генетический полиморфизм, который позволяет подготовиться вирусу к непредсказуемым изменениям внешней среды, в том числе и смене организма хозяина.

В то же время реассортация происходит не только в природных резервуарах. От диких птиц вирус гриппа легко передается домашним птицам, которые в свою очередь заражают свиней. Однако, несмотря на то, что свиной вирус гриппа повсеместно распространен среди домашних птиц, птичий вирус гриппа только иногда обнаруживается у свиней [49]. С другой стороны, вирус гриппа человека также заражает свиней. В литературе описаны случаи, когда свиньи заражались вирусом гриппа после контактов с фермерами, а также когда фермеры заражались вирусом гриппа после контакта со свиньями [50]. Следовательно, свиньи могут коинфицироваться различными штаммами птичьего и человеческого вирусов гриппа, а в их организме могут смешиваться птичий, свиной вирусы и вирус гриппа человека. Поэтому свиней называют «миксерами» - сосудами для смешивания вирусов [51].

Примером действия такого «миксера» является вспышка гриппа, которая произошла в 2009 году. Вирус приобрел NA ген и ген, кодирующий белок матрикса М, от вируса гриппа евразийских свиней. Остальные гены произошли от свиного вируса гриппа, который в свою очередь образовался в результате реассортации вируса человека, вируса птичьего гриппа и классического свиного вируса гриппа [52]. Реассортация вирусов произошла в организме свиней.

Реассортация в организме человека, который не является природным резервуаром вируса, наблюдается значительно реже, чем у птиц. Однако именно реассортация в организме человека способствовала появлению и распространению резистентного к амантадину штамма вирусов H3N2 [53]. Реассортация между вирусами гриппа в организме человека привела к появлению штаммов, вызвавших особенно острые вспышки эпидемии гриппа в 1947, 1951 и 2003–2004 годах [54].

Список литературы

1. Taylor, L. H. Risk factors for human disease emergence [Text] / L. H. Taylor, S. M. Latham, M. E. J. Woolhouse // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 2001. – V. 356. – P. 983–989.
2. Ma, E. J. Reticulate evolution is favored in influenza niche switching [Text] / E. J. Ma, N. J. Hill, J. Zabilansky, K. Yuan, J. A. Runstadler // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – V. 113 (19). – P. 5335–5344.
3. Huang, I. C. Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection [Text] / I. C. Huang, W. Li, J. Sui, W. Marasco, H. Choe, M. Farzan // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – P. 4834–4777.
4. Bollyky, P. A. Recombination between sequences of hepatitis B virus from different genotypes [Text] / P. Bollyky, A. Rambaut, P. Harvey, E. Holmes // *Journal of Molecular Evolution.* – 1996. – V. 42. – P. 97–102.
5. Dang, Q. Nonrandom HIV-1 infection and double infection via direct and cell-mediated pathways [Text] / Q. Dang, J. Chen, D. Unutmaz, J. M. Coffin, V. K. Pathak, D. Powell, V. N. KewalRamani [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2004. – V. 101. – P. 632–637.
6. Cicin-Sain, L. Frequent coinfection of cells explains functional in vivo complementation between cytomegalovirus variants in the multiply infected host [Text] / L. Cicin-Sain, J. Podlech, M. Messerle, M. J. Reddehase, U. H. Koszinowski // *J. Virol.* – 2005. – V. 79 (15). – P. 9492–9994.
7. Bodewes, R. Use of influenza A viruses expressing reporter genes to assess the frequency of double infections in vitro [Text] / R. Bodewes, N. J. Nieuwkoop, R. J. Verburgh, R. M. Fouchier, A. D. Osterhaus, G. F. Rimmelzwaan // *J. Gen. Virol.* – 2012. – V. 93. – P. 1645–1653.
8. Bancroft, C. T. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome [Text] / C. T. Bancroft, T. G. Parslow // *J. Virol.* – 2002. – V. 76. – P. 7133–7139.
9. Chou, Y. One influenza virus particle packages eight unique viral RNAs as shown by FISH analysis [Text] / Y. Chou, R. Vafabakhsh, S. Doganay, Q. Gao, T. Ha [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – V. 109. – P. 9101–9106.
10. Essere, B. Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses [Text] / B. Essere, M. Yver, C. Gavazzi, O. Terrier, C. Isel [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – V. 110. – P. E3840–E3848.
11. McDonald, S. M. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes [Text] / S. M. McDonald, M. I. Nelson, P. E. Turner, J. T. Patton // *Nat Rev Microbiol.* – 2016. – V. 14 (7). – P. 448–508.
12. Luytjes, W. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus [Text] / W. Luytjes, M. Krystal, M. Enami, J. D. Pavin, P. Palese // *Cell.* – 1989. – V. 59. – P. 1107–1113.

13. Brooke, C. B. Most influenza A virions fail to express at least one essential viral protein [Text] / C. B. Brooke, W. L. Ince, J. Wrannert, R. Ahmed, P. C. Wilson [et al.] // *J. Virol.* – 2013. – V. 87. – P. 8267–8267.
14. Hutchinson, E. C. Genome packaging in influenza A virus [Text] / E. C. Hutchinson, J. C. von Kirchbach, J. R. Gog, P. Digard // *J. Gen. Virol.* – 2010. – V. 91 (Pt 2). – P. 313–328.
15. Fournier, E., A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments [Text] / E. Fournier, V. Moules, B. Essere, J. C. Paillart, J. D. Sirbat, C. Isel, A. Cavalier, J. P. Rolland, D. Thomas, B. Lina, R. Marquet // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40. – P. 2197–2209.
16. Noda, T. Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus [Text] / T. Noda, Y. Sugita, K. Aoyama, A. Hirase, E. Kawakami, A. Miyazawa, H. Sagara, Y. Kawaoka // *Nat. Commun.* – 2012. – V. 3. – P. 639.
17. Fujii, K. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions [Text] / K. Fujii, Y. Fujii, T. Noda, Y. Muramoto, T. Watanabe, A. Takada, H. Goto, T. Horimoto, Y. Kawaoka // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – P. 3766–3774.
18. Liang, Y. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments [Text] / Y. Liang, Y. Hong, T. G. Parslow // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – P. 10348–10355.
19. Muramoto, Y. Hierarchy among viral RNA(vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions [Text] / Y. Muramoto, A. Takada, K. Fujii, T. Noda, K. Iwatsuki-Horimoto, S. Watanabe, T. Horimoto, H. Kida, Y. Kawaoka // *J. Virol.* – 2006. – V. 80. – P. 2318–2325.
20. Marsh, G. A. Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging [Text] / G. A. Marsh, R. Rabadan, A. J. Levine, P. Palese // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – P. 2295–2304.
21. Gavazzi, C. A functional sequence-specific interaction between influenza A virus genomic RNA segments [Text] / C. Gavazzi, M. Yver, C. Isel, R. P. Smyth, M. Rosa-Calatrava, B. Lina, V. Moules, R. Marquet // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. – P. 16604–16609.
22. Fournier, E. Interaction network linking the human H3N2 influenza A virus genomic RNA segments [Text] / E. Fournier, V. Moules, B. Essere, J. C. Paillart, J. D. Sirbat, A. Cavalier, J. P. Rolland, D. Thomas, B. Lina, C. Isel [et al.] // *Vaccine.* – 2012. – V. 30. – P. 7359–7367.
23. Gavazzi, C. An in vitro network of intermolecular interactions between viral RNA segments of an avian H5N2 influenza A virus: comparison with a human H3N2 virus [Text] / C. Gavazzi, C. Isel, E. Fournier, V. Moules, A. Cavalier, D. Thomas, B. Lina, R. Marquet // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – P. 1241–1254.
24. Sherry, L. Identification of cis-acting packaging signals in the coding regions of the influenza B virus HA gene segment [Text] / L. Sherry, K. Punovuori, L. E. Wallace, E. Prangley, S. DeFries, D. Jackson // *J Gen Virol.* – 2016. – V. 97 (2). – P. 306–321.
25. Goto, H. The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal [Text] / H. Goto, Y. Muramoto, T. Noda, Y. Kawaoka // *J. Virol.* – 2013. – V. 87. – P. 11316–11322.
26. Fajardo, T. Generation of infectious RNA complexes in Orbiviruses: RNA-RNA interactions of genomic segments [Text] / T. Fajardo, Jr, K. AlShaikhahmed, P. Roy // *Oncotarget.* – 2016. – V. 8; 7 (45). – P. 72559–72570.
27. Boyce, M. Inter-segment complementarity in orbiviruses: a driver for co-ordinated genome packaging in the Reoviridae? [Text] / M. Boyce, M. A. McCrae, P. Boyce, J. T. Kim // *J. Gen. Virol.* – 2016. – V. 97 (5). – P. 1145–1202.
28. Moreira, É. A. A conserved influenza A virus nucleoprotein code controls specific viral genome packaging Moreira [Text] / É. A. Moreira, A. Weber, H. Bolte, L. Kolesnikova, S. Giese, S. Lakdawala, M. Beer, G. Zimmer, A. García-Sastre, M. Schwemmler, M. Juozapaitis // *Nat Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 12861.
29. Giese, S. The Feat of Packaging Eight Unique Genome Segments Viruses [Text] / S. Giese, H. Bolte, M. Schwemmler. – 2016. – V. 17; 8 (6). – P. E165.
30. Chou, Y. Y. Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis [Text] / Y. Y. Chou, N. S. Heaton, Q. Gao, P. Palese, R. H. Singer, T. Lionnet // *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9. – P. e1003358.
31. Marshall, N. Influenza virus reassortment occurs with high frequency in the absence of segment mismatch [Text] / N. Marshall, L. Priyamvada, Z. Ende, J. Steel, A. C. Lowen // *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9 (6). P. e1003421.
32. Baker, S. F. Influenza A and B virus intertypic reassortment through compatible viral packaging signals [Text] / S. F. Baker, A. Nogales, C. Finch, K. M. Tuffy, W. Domm, D. R. Perez, D. J. Topham, L. Martínez-Sobrido // *J Virol.* – 2014. – V. 88 (18). – P. 10778–10869.
33. Li, C. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses [Text] / C. Li, M. Hatta, S. Watanabe, G. Neumann, Y. Kawaoka // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – P. 11880–11888.
34. Jackson, S. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses in ferrets: A public health risk assessment [Text] / S. Jackson, N. Van Hoeven, L. M. Chen, T. R. Maines, N. J. Cox, J. M. Katz, R. O. Donis // *J. Virol.* – 2009. – V. 83. – P. 8131–8140.
35. Dudas, G. Reassortment between influenza B lineages and the emergence of a coadapted PB1-PB2-HA gene complex [Text] / G. Dudas, T. Bedford, S. Lycett, A. Rambaut // *Mol Biol Evol.* – 2015. – V. 32. – P. 162–254.
36. Gilbertson, B. Influenza NA and PB1 Gene Segments Interact during the Formation of Viral Progeny: Localization of the Binding Region within the PB1 Gene [Text] / B. Gilbertson, T. Zheng, M. Gerber, A. Printz-Schweigert, C. Ong, R. Marquet, C. Isel, S. Rockman, L. Brown // *Viruses.* – 2016. – V. 8(8). – E238.
37. Fonville, J. M. Influenza virus reassortment is enhanced by semi-infectious particles but can be suppressed by defective interfering particles [Text] / J. M. Fonville [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2015. – V. 11. – P. e1005204.
38. Nakatsu, S. Complete and Incomplete Genome Packaging of Influenza A and B Viruses [Text] / S. Nakatsu, H. Sagara, Y. Sakai-Tagawa, N. Sugaya, T. Noda, Y. Kawaoka // *MBio.* – 2016. – V. 7(5). – P. e01248–e01264.
39. Kida, H. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune-response [Text] / H. Kida, R. Yanagawa, Y. Matsuoka // *Infect. Immun.* – 1980. – V. 30. – P. 547–553.
40. Latorre-Margalef, N. Effects of influenza A virus infection on migrating mallard ducks [Text] / Latorre-Margalef N. [et al.] // *Proc. R. Soc.* – 2009. – V. 276. – P. 1029–1036.
41. Jourdain, E. Influenza virus in a natural host, the mallard: experimental infection data [Text] / Jourdain E [et al.] // *PLoS ONE.* – 2010. V. 5, – P. e8935.
42. van Dijk, J. G. Minor differences in body condition and immune status between avian influenza virus-infected and noninfected mallards: a sign of coevolution? [Text] / van Dijk J. G., Fouchier R. A., Klaassen M., Matson K. D. // *Ecol Evol.* – 2015. – V. 5 (2). – P. 436–485.
43. Bengtsson, D. Does influenza A virus infection affect movement behaviour during stopover in its wild reservoir host? [Text] / D. Bengtsson, K. Safi, A. Avril, W. Fiedler, M. Wikelski, G. Gunnarsson, J. Elmer, T. Olsen, J. Waldenström // *R Soc Open Sci.* – 2016. – V. 10; 3 (2). – P. 150633.

44. Taubenberger, J. K. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation [Text] / J. K. Taubenberger, J. C. Kash // Cell Host Microbe. – 2010. – V. 7 (6). – P. 440–451/
45. Dugan, V. G. The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds [Text] / V. G. Dugan, R. Chen, D. J. Spiro, N. Sengamalay, J. Zaborsky [et al.] // PLoS Pathog. – 2008. – V. 4. – P. e1000076.
46. Munster, V. J., Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds [Text] / V. J. Munster, C. Baas, P. Lexmond, J. Waldenstrom, A. Wallensten [et al.] // PLoS Pathog. – 2007. – V. 3. – P. e61.
47. Huang, K. Establishment and lineage replacement of H6 influenza viruses in domestic ducks in southern China [Text] / K. Huang, H. Zhu, X. Fan, J. Wang, C. L. Cheung, L. Duan, W. Hong, Y. Liu, L. Li, D. K. Smith [et al.] // J. Virol. – 2012. – V. 86 (11). – P. 6075–6083
48. Chen, H. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl [Text] / H. Chen, G. J. Smith, S. Y. Zhang, K. Qin, J. Wang, K. S. Li, R. G. Webster, J. S. Peiris, Y. Guan // Nature. – 2005. – V. 436 (7048). – P. 191–192.
49. van Reeth, K. Avian influenza in swine: a threat for the human population? [Text] / van K. Reeth, K. Verh // Acad Geneesk Belg. – 2006. – V. 68 (2). – P. 81–101.
50. Karasin, A. I. Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada 2003 to 2005 [Text] / A. I. Karasin, S. Carman, C. W. Olsen // J Clin Microbiol. – 2006. – V. 44 (3). – P. 1123–1129. [PubMed: 16517910]
51. Shi, W. Genetic analysis of four porcine avian influenza viruses isolated from Shandong, China. [Text] / W. Shi [et al.] // Archives of virology. – 2008. – V. 153. – P. 211–217.
52. Garten, R.J. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin A(H1N1) influenza viruses circulating in humans [Text] / R. J. Garten, C. T. Davis, C. A. Russell [et al.] // Science. – 2009. – V. 325 – P.197–201.
53. Simonsen, L. The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance [Text] / L. Simonsen, C. Viboud, B. T. Grenfell, J. Dushoff, L. Jennings [et al] // Mol Biol Evol. – 2007. – V. 24. – P. 1811–1831.
54. Nelson, M. I. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918 [Text] / M. I. Nelson, C. Viboud, L. Simonsen, R. T. Bennett, S. B. Griesemer, K. St. George, J. Taylor, D. J. Spiro, N. A. Sengamalay, E. Ghedin, J. K. Taubenberger, E. C. Holmes // PLoS Pathog. – 2008. – V. 4. – P. e1000012.

INFLUENZA VIRUS REASSORTMENT: MECHANISMS AND OUTCOMES FOR INTERSPECIES TRANSMISSION

Popov N. N., Kolotova T. Yu., Davydenko M. B.

SI “Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kharkov, Ukraine

In this review we focus on the role of reassortment in influenza virus evolution and explain the mechanisms of reassortment. The influenza A virus genome comprises eight negative-sense viral RNAs. A major consequence of the genome segmentation is the capacity for reassortment to occur during co-infection. The data from the influenza genome sequencing and a phylogenetic approach show that reassortment predominates over mutagenesis in transmission between different host species. The emergence of new influenza genes in humans have been consistently linked with reassortment of novel and previously circulating viruses.

Two mechanisms for virus assortment have been proposed. The random packaging model posits that viral RNA is incorporated in virions an even chance. However, mounting evidence supports an alternative selective packaging model, which proposes that the virus-specific packaging signals (cis-element) required for effective segment incorporation into virions. Also influenza A virus nucleoprotein (NP) controls specific viral genome packaging. NP harbors an amino acid code that dictates genome packaging.

The selective packaging model imposes various levels of restrictions on random reassortment between cocirculating influenza viruses. The specificity of packaging cis-element and NP protein could explain the lack of reassortment between the influenza virus strains.

Furthermore, studies of human influenza viruses have shown that certain combinations of gene segments were consistently detected in surveillance, suggesting preferential assortment of these gene segments. It has been confirmed an association between viral genes that are cosegregated during packaging. Moreover it has identified a region of the RNA segment that influences the association between viral genes to direct their cosegregation during reassortment. The specific interaction and cosegregation of specific genes may be critical to the emergence of new reassortant viruses with pandemic potential.

The greatest frequency of influenza reassortment is observed in their natural reservoir wild aquatic birds. It has been proposed that virus in wild birds forms transient “genome constellations,” continually reshuffled by reassortment. However, reassortment is more restrictive in other hosts, particularly humans.

Keywords: *influenza virus, reassortment, model of virus assortment, selective packaging model, packaging cis-element, influenza virus nucleoprotein, amino acid code, natural reservoirs*