

УДК 578.232.4; 578.346; 578.323

# Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функция

Ю.А. Штыря, Л.В. Мочалова, Н.В. Бовин\*

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: professorbovin@yandex.ru

**РЕФЕРАТ** Рассмотрена структура нейраминидазы вируса гриппа, организация активного центра этого фермента, обсуждается механизм десалилирования углеводных цепей нейраминидазой, а также ее роль в функционировании вируса гриппа на различных стадиях инфекционного цикла. Обобщены данные по субстратной специфичности нейраминидазы и рассмотрены подходы к изучению активности данного фермента. Приведены данные по лекарствам против гриппа – ингибиторам нейраминидазы; рассмотрен механизм приобретения устойчивости современных вирусов к одному из этих лекарств.

**Ключевые слова:** вирус гриппа, нейраминидаза, субстратная специфичность.

**Список сокращений:** HA – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; Neu5Ac – N-ацетилнейраминовая кислота; 3'SiaLac – Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc; 6'SiaLac – Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc; MU-NANA – метилубеллиферил- $\alpha$ -нейраминовая кислота; BODIPY – 6-((4,4-дифторо-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диазо-8-индацин-3-пропионил)амино)-гексановая кислота, сукцинимидный эфир; MDCK – линия клеток почки собаки; VERO – линия клеток почки африканской зеленой марьшски; Neu5Gc – N-гликолилнейраминовая кислота; 3'SiaLacNAc – Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc; 6'SiaLacNAc – Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа представляет собой (-)РНК-содержащий оболочечный вирус с сегментированным геномом, генетический материал вируса гриппа закодирован в восьми сегментах РНК. Все сегменты РНК упакованы в белок нуклеокапсида, и к каждому из сегментов присоединяется комплекс полимеразных белков. В таком виде сегменты упаковываются в липопротеидную оболочку, выстланную изнутри матриксным белком, на внешней поверхности которой экспонированы гемагглютинин, нейраминидаза и М2 белок.

Нейраминидаза – это экзосиалидаза (ЕС 3.2.1.18), расщепляющая  $\alpha$ -кетозидную связь между терминальным остатком сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислоты и следующим моносахаридным остатком [1]. Аминокислотная последовательность NA закодирована в шестом сегменте РНК. У вирусов гриппа А насчитывается девять подтипов NA, у вирусов В и С – только по одному [2]. Девять подтипов нейраминидазы вируса гриппа А разделяют на две филогенетические группы. В первую входят нейраминидазы подтипов N1, N4, N5 и N8, а во вторую – N2, N3, N6 N7 и N9 [3].

Фермент вируса гриппа С не относится к нейраминидазам, его функция состоит в O-деацетилировании N-ацетил-9-O-ацетилнейраминовой кислоты, т.е. он является эстеразой, поэтому не будет рассматриваться в обзоре.

NA вируса гриппа выполняет несколько функций. Во-первых, ее активность необходима на стадии отпочковывания созревших вирусных частиц от зараженной клетки, для предотвращения агрегации вирусных частиц; кроме того, NA отщепляет остатки нейраминовой кислоты муцинов респираторного тракта, тем самым облегчая движение вируса к клетке-мишени. Подробнее эти функции будут рассмотрены далее.

## СТРУКТУРА НЕЙРАМИНИДАЗ

Полипептидная цепь NA вируса гриппа состоит из 470 аминокислотных остатков. В третичной структуре NA можно выделить несколько структурно-функциональных доменов: цитоплазматический, трансмембранный, «голову», а также «стебель», соединяющий голову фермента с трансмембранным доменом.

На поверхности вириона NA представляет собой гомоте-трамер, имеющий грибообразную форму: голова размером 80-80-40 Å на тонком стебле диаметром 15 Å и длиной от 60 до 100 Å [2]. Молекулярный вес мономера  $\approx$ 60 кДа, а тетрамера  $\approx$ 240 кДа [1]. Одна вирусная частица несет в среднем 50 тетрамеров. Тетрамеры могут собираться в кластеры на поверхности вириона [4]. Известна пространственная структура нейраминидаз N1, N2, N4, N8, N9 и В [1, 3, 5, 6, 7]. Несмотря на то что гомология NA типов А и В составляет всего лишь 30 %, их пространственные структуры практически идентичны [6].

## ГОЛОВА ФЕРМЕНТА

В голове NA расположен активный центр, а также кальций-связывающий домен, который стабилизирует структуру фермента при низких значениях pH [2, 8].

Гомология между штаммами внутри подтипа достигает 90 %, в то время как между подтипами – 50 %, а между типами А и В – 30 % [9]. Особой консервативностью отличается район а.о. 74–390 (нумерация по N2)<sup>1</sup>. Остатки, непосредственно участвующие в каталитической активности фермента (Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 и Tyr406, рис. 1), инвариантны среди всех подтипов NA, а также типа В. Это справедливо и для аминокислот, формирующих пространственную структуру активного центра: Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp198, Ile222, Glu227, Glu277, Asp293, и Glu425. Особо консервативными являются остатки аспарагина, формирующие сайт гликозилирования (в частности, Asn146), а также пролина и цистеина, которые обеспечивают необходимую укладку полипептидной цепи, стабилизируя третичную структуру молекулы [2].

Сайт связывания кальция, расположенный в глубине головы (практически «под» активным центром, если располагать его так, как изображено на рисунке), сформирован кислородами главной цепи остатков 297, 345 и 348, а также кислородом боковой цепи остатка Asp324 [1, 6]. Кроме них, в формировании сайта участвуют а.о. 293, 347, 111–115 и 139–143 [8].

У нейраминидазы N9 был найден второй сайт связывания нейрамина кислоты, т.н. НВ-сайт [10]. Последовательность а.о., соответствующая этому сайту, высоко консервативна у птичьих вирусов. Этот участок формируется тремя петлями NA:

- 367–372, которая вовлечена в связывание нейрамина кислоты через сериновые остатки 367, 370 и 372;
- 400–403, которая взаимодействует с субстратом через боковую цепь аспарагина 400, карбонильный кислород основной цепи аспарагина, и триптофан 403;
- 430–433, взаимодействует с субстратом через ε-аминогруппу лизина 432.

Все шесть отмеченных выше консервативных остатков найдены только у нейраминидазы N9. У NA вирусов птиц других подтипов обычно отсутствует лизин 432, но это не отражается на их гемоадсорбционной активности. Типичная последовательность а.о. НВ-сайта обычно не обнаруживается у вирусов гриппа человека. В то же время у двух ранних человеческих изолятов подтипа H2N2 (RI+/57 и А/Ленинград/134/57) обнаружен «контур» НВ-сайта (триада серинов и триптофан) [10, 11] – это может свидетельствовать о том, что при адаптации вируса гриппа к размножению в организме человека происходит элиминация данного сайта.

Функция НВ-сайта пока не ясна. Предполагается, что он может играть роль альтернативного сайта связывания нейрамина кислоты, т.е. функционировать как суррогат НА вируса гриппа; такое предположение отталкива-

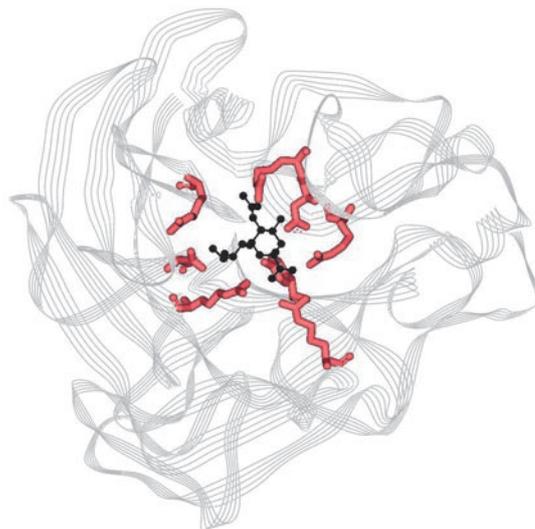


Рис. 1. Активный центр нейраминидазы вируса гриппа А (подтипа N2) в комплексе с Neu5Ac2en (2-деокси-2,3-дидегидро-N-ацетилнейраминавой кислотой). Neu5Ac2en обозначена черным, функциональные а.о. активного центра – красным

ется от факта существования вирусов, у которых функции NA и HA совмещены в одном белке, как, например, в ND вирусе. Описанный НВ-сайт характерен для NA тех вирусов, гемагглютинин которых взаимодействует с α2-3-сиалилированными углеводными цепями (т.е. вирусов гриппа птиц и лошадей), в то время как у вирусов с α2-6-специфичностью (человеческих, свиных, и H9N2 вирусов домашней птицы) этот сайт изменен по ключевым аминокислотным позициям. Интересно, что вирусы H9N2, выделенные из домашней птицы в Гонконге, и вирусы подтипов H2N2 и H3N2, вызывавшие пандемии у человека, имеют сходные замены в НВ-сайте. Эти данные позволяют предположить, что некоторые виды домашней птицы могут служить промежуточными хозяевами при переносе вирусов гриппа из их естественного резервуара (в популяции водоплавающих птиц) к человеку [11].

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ УКЛАДКА

Пространственная структура цитоплазматического и трансмембранного доменов, а также стебля NA пока не решена (в связи с особенностями ферментативного отщепления этого мембранного белка от вириона кристаллизуемый продукт начинается с остатков ~74–77) [6]. Существует гипотеза об α-спиральной укладке участка полипептидной цепи, не вошедшего в состав кристаллизуемого продукта, частично подтвержденная при помощи криоэлектронной микроскопии [4]. Поэтому с определенностью можно говорить об укладке полипептидной цепи только в районе головы (в составе тетрамера). Голова представляет собой большой домен, состоящий из шести идентичных антипараллельных β-слоев (мотивов), организованных в пропеллер-подобную структуру. Наиболее важными для функционирования фермента являются петли между

<sup>1</sup> Так как аминокислотные последовательности различных нейраминидаз отличаются друг от друга вставками и делециями, то принято указывать подтип NA, на основании которого приведены номера аминокислотных остатков, обычно, как и в данном случае, подтип N2.

этими мотивами, а также между вторым и третьим тяжами каждого мотива [2]. Петли являются наиболее вариабельной частью структуры всех НА, варьируя по длине и даже неся элементы упорядоченности, типичные для вторичной структуры. В петлях N9, например, найдены  $\alpha$ -спиральные участки: остатки 106–110 формируют один виток ( $\alpha$ ), лежащий над С-концом полипептидной цепи, образующим, в свою очередь, тоже один виток  $\alpha$ -спирали наряду с а.о. 144–146 соседней субъединицы ( $3_{10}$ ). Спираль  $3_{10}$  образует с двумя цепями (106–110 и С-концевой) антипараллельный слой [6]. Петля, соединяющая четвертый и пятый мотивы, является самой длинной, она стабилизирована дисульфидным мостиком между Cys318 и Cys337, содержит консервативную ионную пару Asp330-Arg364 и сайт связывания иона  $Ca^{2+}$  [1].

### ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ

Углеводные цепи прикреплены к остаткам Asn, находящимся на разных участках поверхности головы НА, а именно: гликаны, присоединенные к аспарагинам 86 и 234, ориентированы в сторону липидной мембраны, ближе к стеблю, а к Asn146 – в сторону от липидной мембраны, вблизи активного центра; наконец, сайт Asn200 расположен на боковой поверхности, соединяющей субъединицы. При Asn86 и Asn200 обнаружены короткие цепи олигоманнозного типа. Углеводные цепи при Asn146 и Asn234 относятся к комплексному типу. Сайт гликозилирования по Asn146 является консервативным для всех НА, а углеводная цепь в этой позиции отличается по структуре от всех, обнаруженных в составе гликопротеинов вирусов гриппа, а именно содержит сульфатированный по О-4 N-ацетилгалактозамин [1]. Гликозилирование Asn146, по-видимому, играет регуляторную функцию; известно, что его отсутствие обуславливает нейровирулентность вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1). Показано, что углеводная цепь при Asn146 влияет на ферментативную активность НА, снижая ее в 20 раз [12]. Удаление сайта гликозилирования 144 нейраминидазы подтипа N8 (А/утка/Украина/1/63) приводит к изменению профиля субстратной специфичности НА [13], а отсутствие сайтов гликозилирования по 83 и 398 а.о. приводит к неправильному фолдингу.

### ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ

В НА найдено восемь консервативных дисульфидных мостиков, а также один дополнительный – в подтипах N2, N8, и N9. Инвариантность дисульфидных связей подтверждает их важность для формирования стабильной структуры НА. Предполагается, что благодаря близости к оси симметрии тетрамера неспаренный Cys161 в НА (N1) участвует в соединении двух субъединиц. Механизм сборки тетрамера не универсален, так, в нейраминидазах вируса гриппа В связи между субъединицами образуются за счет Cys54, в то время как Cys78 участвует в связывании пар полипептидных цепей (здесь нумерация по N2), [2].

### СТРОЕНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА

Сайт связывания Neu5Ac расположен «над» первыми тяжами третьего и четвертого мотивов, в большом кармане на поверхности НА. Активный центр находится на N-конце центральных параллельных тяжей [2] (рис. 1). Он представ-

ляет собой кратер диаметром 16 Å и глубиной от 8 до 10 Å, расположенный на расстоянии 32 Å от оси симметрии четвертого порядка. Сайт фланкирован двенадцатью гибкими петлями, которые тянутся вверх и наружу от этой оси [6].

Активный центр фермента сформирован функциональными остатками Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 и Tyr406, а также структурными остатками Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp (или Asn у N7 и N9) 198, Ile222, Glu227, Glu277, Asp293 и Glu425.

Функциональные а.о. контактируют непосредственно с продуктом ферментативной реакции – сиаловой кислотой, а все образуемые ими контакты полярны, за исключением Arg224, в котором алифатическая часть образует неполярный контакт с глицериновым фрагментом остатка Neu5Ac [9] (рис. 1).

Недавние результаты рентгеноструктурных исследований нейраминидаз, относящихся к первой филогенетической группе, показали, что, по сравнению с нейраминидазами, относящимися ко второй филогенетической группе, они обладают несколько другим строением полипептидной цепи, которая окружает активный центр фермента. В частности, вблизи активного центра расположена полость, которая сформирована изменением пространственной ориентации «петли 150». Данные пространственные различия позволяют начать разработку ингибиторов НА вируса гриппа, специфично взаимодействующих только с НА, относящихся к первой филогенетической группе, в частности к НА H5N1 вирусов гриппа [3].

### МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

Механизм действия НА (схема 1) был предложен на основании рентгеноструктурных данных исследования кристаллического белка [7].

Формирование оксокарбониевого иона при атоме С2 молекулы Neu5Ac является ключевым шагом в гидролизе олигосахарида-субстрата. После попадания остатка Neu5Ac в активный центр, из-за сильных ионных взаимодействий между карбоксилатом субстрата и гуанидиновыми группами аргининов 118, 292 и 371 остаток Neu5Ac переходит из конформации кресла в конформацию полукресла, т.е. образуется оксокарбониевый ион, что в конце концов приводит к расщеплению гликозидной связи. Агликон уходит из активного центра фермента с гликозидным кислородом, протонированным растворителем. Многочисленные контакты между интермедиатом и а.о. активного центра (наиболее важны Tyr406 и Asp151) стабилизируют положительно заряженный оксокарбониевый ион с сохранением планарного углерода при С2. Интермедиат в планарной конформации похож на Neu5Ac2en [6], в котором С2 находится в  $sp^2$ -состоянии. На этой стадии реакции остаток нейраминовой кислоты ковалентно связан с гидроксильной группой Tyr406 белка, что характерно для всех экзосиалидаз [15, 17]. Лимитирующей стадией ферментативного процесса является гидроксильное оксокарбониевое иона растворителем с уходом продукта реакции в виде Neu5Ac из активного центра фермента. Следует отметить, что существенных изменений в координатах активного центра НА по ходу реакции не происходит [18].

Наличие инвариантных остатков в составе активного центра, сходство пространственной организации, а также

архитектура комплексов с Neu5Ac и с Neu5Ac2en позволяют сделать вывод о том, что механизм действия нейраминидаз вирусов гриппа А и В одинаков [6].

### ИНГИБИТОРЫ НЕЙРАМИНИДАЗ И МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСОВ К ИХ ДЕЙСТВИЮ

Структура активного центра консервативна не только между подтипами, но и типами фермента, что указывает на важность всех составляющих его компонентов, а также эволюционно-отлаженную систему его функционирования. Данное наблюдение позволило разработать ингибитор NA вируса гриппа, напоминающий переходное состояние реакции гидролиза, а также Neu5Ac2en (рис. 2а), а именно 4-гуанидино-Neu5Ac2en, который сейчас применяется в медицине под названием занамивир [14] (рис. 2б).

Успех занамивира инициировал цикл работ по дизайну новых ингибиторов NA. Основным элементом структуры нового класса ингибиторов (без кислородного атома в цикле) являются шести- или пятичленные циклы.

Одним из таких соединений стала (3S,4R,5R)-3-амино-4-ацетамидо-5-(1-этилпропокси)-1-циклогексен-1-карбоновая кислота (озелтамивир, или тамифлю, Tamiflu) (рис. 2в). Структура этого вещества «подогнана» к координатам тех остатков активного центра, которые взаимодействуют с глицериновой цепью Neu5Ac2en [20]. Успех применения данного соединения стимулировал разработку новых ингибиторов NA, содержащих гидрофобные группы [21].

Кроме того, синтезирован ингибитор NA на основе циклопентанового кольца, где сохранены все функционально важные фрагменты занамивира (карбоксил, ацетамид, С4-гидроксил и глицериновый), которые вписываются в активный центр NA. Только ориентация гуанидиновой группы отличается от таковой у занамивира. Однако это различие имеет свои преимущества: ВСХ-1812 (преамивир) (рис. 2г) сохраняет ингибирующую активность по отношению к занамивир-устойчивым вариантам вируса гриппа [22]. В настоящее время ведутся разработки аналогов этого соединения [23].

Занамивир и озелтамивир уже используются как лекарственные препараты, а ВСХ-1812 находится на последней стадии клинических испытаний.

До недавнего времени считалось, что активное неконтурируемое применение озелтамивира и занамивира не повлияет значимо на ситуацию с появлением резистентных штаммов вируса гриппа. Т.е. даже при появлении резистентности устойчивые вирусы не смогут эффективно реплицироваться в отсутствие ингибитора [24]. В клинических исследованиях резистентные вирусы составляли менее 1 %, доля их среди сезонных вирусов гриппа по всему миру была того же порядка.

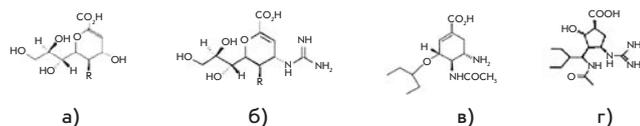


Рис. 2. Структура а) Neu5Ac2en, б) 4-занамивира, в) озелтамивира, г) ВСХ-1812 (преамивира), где R=NHAc

Но в январе 2008 года данная ситуация резко изменилась: некоторые из вирусов гриппа подтипа H1N1 приобрели устойчивость к озелтамивиру за счет мутации His274Tyr в NA [25], а в эпидемическом сезоне 2008–2009 годов устойчивость достигла практически 100 % среди вирусов, выделенных от пациентов (по данным <http://ecdc.europa.eu>); характерно, что все эти вирусы сохраняли чувствительность к занамивиру. Мутация His274Tyr ранее обнаруживалась в исследованиях устойчивости *in vitro* и *in vivo*, а также в клинических изолятах [26]. Тем не менее полностью прекращать использование данного лекарства рано, так как, по последним данным, циркулирующий в настоящее время в человеческой популяции предпандемический вирус H1N1 подтипа (A/California/11/2009) пока чувствителен к озелтамивиру (по данным центра по контролю и предотвращению опасных заболеваний США ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov))), что оставляет надежду на то, что штамм вируса гриппа, который вызовет следующую пандемию, будет чувствителен к данному ингибитору NA.

### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ NA

Существуют данные о том, что NA необходима вирусу гриппа на различных стадиях инфекционного цикла. Во-первых, считается, что она облегчает подход вируса к клеткам-мишеням посредством удаления сиаловых кислот с муцинов респираторного тракта [26]. Во-вторых, может участвовать в процессе слияния вирусной частицы с клеткой [27]. В-третьих, помогает отпочковыванию созревших вирионов от поверхности клетки, предотвращая агрегацию вирусов, вызванную взаимодействием NA одного вириона с сиалилированными гликанами другого [27]. Кроме того, есть данные о том, что NA усиливает гемагглютинирующую активность NA посредством отщепления терминальных остатков нейраминовой кислоты от олигосахаридов, окружающих рецептор-связывающий участок NA [28].

Одной из наиболее интересных особенностей вируса гриппа является сосуществование двух белков, функции которых в какой-то степени антагонистичны, а именно: гемагглютинин выполняет рецептор-связывающую функцию, а нейраминидаза – рецептор-разрушающую. Так как оба эти белка узнают терминальный остаток нейраминовой кислоты, возникает вопрос о кооперации, или, наоборот, их конкуренции за рецептор/субстрат, а также о роли этих взаимоотношений в жизненном цикле вируса. Исследования вирусов, устойчивых к ингибиторам NA, искусственно полученных реассортантов (несущих NA и NA различного происхождения), а также полученных с помощью «обратной генетики» вирусов, лишенных активности NA или HA, – все это указывает на то, что NA и HA вируса гриппа действуют concertно и эволюционируют взаимозависимо [29–35]. Кроме того, возникает вопрос об их олигосахаридной специфичности, так как в организмах, которые являются хозяевами для вирусов гриппа, Neu5Ac-терминированные углеводные цепи весьма разнообразны.

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ NA

Одним из наиболее популярных субстратов для определения активности NA является MU-Neu5Ac или MU-NANA (рис. 3а). Метод, основанный на его использовании,

был впервые предложен [36] как альтернатива колориметрическим и радиоактивным методам. MU-Neu5Ac при отщеплении нейраминной кислоты образует флуоресцентное соединение, возбуждаемое светом с длиной волны 360 нм, и максимумом флуоресценции при pH 10. Ближайшим аналогом MU-Neu5Ac является 4-трифторметилумбеллиферил- $\alpha$ -N-ацетилнейраминная кислота, максимум флуоресценции которой находится при нейтральных значениях pH. Высокая интенсивность флуоресценции (в 10 раз выше, чем для MU-Neu5Ac) дает преимущества при анализе нейраминидаз низкой активности [37].

Чувствительность хемилюминесцентного метода определения активности NA [38] на два порядка выше, чем MU-Neu5Ac-теста, в качестве субстрата здесь используется субстрат «NA-Star» (рис. 3б). Недостатком данного метода является короткое время жизни хемилюминесцентного продукта гидролиза, который должен быть зарегистрирован в течение 5 мин.

Другая группа методов основана на отщеплении нейраминной кислоты от высокомолекулярных субстратов, таких как фетуин,  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин или целые эритроциты. Как правило, далее определяют количество отщепившейся нейраминной кислоты [39]; наиболее удобный тиобарбитуратный метод измерения количества Neu5Ac позволяет делать это в присутствии исходного сиаилированного субстрата [40].

Альтернативный подход основан на определении второго продукта гидролиза – десиаилированного гликопротеина с помощью лектина (например, *Peanut agglutinin*), специфичного к освободившейся терминальной галактозе [41, 42]. Этот метод требует особого внимания к контролям, так как в любом гликопротеине изначально присутствуют терминальные  $\beta$ -Gal остатки.

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Под субстратной специфичностью NA понимают способность фермента дискриминировать сиаловые кислоты (например, Neu5Ac и Neu5Gc), тип связи сиаловой кислоты с последующим остатком (2–3, 2–6 или 2–8), а также внутренние участки углеводной цепи. В частности, для определения специфичности использовались:

- свободные трисахариды (3' SiaLac и 6' SiaLac) [43–45];
- гликопротеины, содержащие или только 2–3, или только 2–6-связанную нейраминную кислоту [45, 46];
- пересиаилированные с помощью 2–3-или 2–6-сиалилтрансфераз гликопротеины или эритроциты [47].

Методы, основанные на использовании этих субстратов, решают только одну из трех перечисленных задач, а именно выявляют специфичность на уровне Sia2-3Gal или Sia2-6Gal. Специфичность в более широком смысле может быть

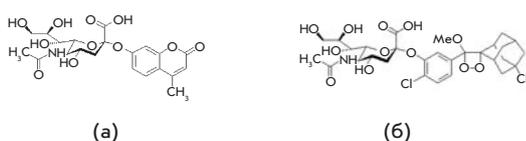


Рис. 3. Структура MU-Neu5Ac (а) и NA-Star (б)

определена с помощью метода, основанного на применении набора синтетических субстратов. В работе [42] использован набор из трех олигосахаридов: 3'SiaLac, 6'SiaLac и 6'SiaLacNAc, в виде конъюгатов с полиакриламидом; нейраминидазную активность определяли с помощью лектина, специфичного к появляющимся в результате действия NA остаткам галактозы (см. выше). Недавно был разработан простой и чувствительный метод определения субстратной специфичности NA [48], основанный на использовании сиалилполисахаридов, меченных BODIPY. Флуоресцентная метка ковалентно соединена с олигосахаридом (3'SiaLac, 3'SiaLacNAc, SiaLe<sup>c</sup>, SiaLe<sup>a</sup>, SiaLe<sup>x</sup>, 6'SiaLac, 6'SiaLacNAc) через спейсер, т.е. удалена от сайта расщепления. Преимуществами данной метки являются стабильность, относительная гидрофильность, электронейтральность, небольшой размер и возможность использовать стандартный флуоресцеиновый фильтр при ее детекции. Ступ метода заключается в количественном разделении электронеутрального продукта реакции и отрицательно-заряженного непрореагировавшего субстрата, что делается либо на микрокартридже с анионообменной смолой, либо с помощью планшетов, полупроницаемое дно которых состоит из анионообменного материала. Для большей достоверности можно определять количество не только продукта, но и непрореагировавшего субстрата. Высокая чувствительность метода позволяет работать с низкими концентрациями как субстратов ( $10^{-11}$  моль), так и вирусов. Высокая достоверность (больше 95 %) и хорошая воспроизводимость (98 %) нового метода позволяют изучать кинетические характеристики фермент-субстратного взаимодействия. Исследование кинетики десиаилирования, а именно скорости реакции и ее зависимости от концентрации субстрата реакции и фермента, важно для понимания механизма реакции, а также для выбора правильного концентрационного диапазона. В свою очередь, правильный диапазон позволяет изучать специфичность десиаилирования, когда экспериментатор не знает точно количества NA в образце [49]. Следует подчеркнуть, что только этот подход позволяет изучать субстратную специфичность NA в широком смысле (см. выше), т.е. влияние типа сиаловой кислоты, типа связи между ней и следующим остатком, а также внутренних остатков гликана.

### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ НЕЙРАМИНИДАЗ ВИРУСА ГРИППА

Как уже упоминалось выше, для исследования активности и специфичности NA вирусов гриппа возможно применение как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных субстратов. Низкомолекулярные субстраты позволяют изучать механизм и кинетику десиаилирования, неосложненные мультивалентностью взаимодействия (NA является тетрамером) и возможным влиянием NA, который взаимодействует с мультивалентным конъюгатом на 3–5 порядков сильнее, чем с мономерным [50]. Высокомолекулярные субстраты являются более корректной моделью для исследования взаимодействий, наиболее приближенных к реальным, т.е. когда необходимо принимать во внимание такие факторы, как тетрамерность NA, кластерность экспонирования молекул NA на клетке, а также соучастие в процессе десиаилирования второго белка вируса гриппа, NA, которого на поверхности вириона значительно больше.

Большой интерес представляет исследование эволюции субстратной специфичности вирусов гриппа, выделенных от человека, а также ее сравнение со специфичностью вирусов других хозяев, таких как утки и свиньи. Первое может дать ответ на вопрос о том, чем обусловлена уникальность пандемических НА, а второе – заранее выявлять те свойства фермента, которые необходимы ему для пересечения видового барьера.

Специфичность нейраминидазы подтипа N2 вирусов человека постепенно изменилась от 3'SiaLac (штаммы H2N2 1957 года) к двойственной специфичности, т.е. 3'SiaLac/6'SiaLac (штаммы между 1972 и 1987 годами). Гидролитическую активность по отношению к 6'SiaLac регистрировали только у вирусов, выделенных, начиная с 1967 года, а начиная с 1972 года наблюдалось увеличение активности по отношению к этому субстрату [46].

Недавно было показано, что вирусы N2 высокоактивны по отношению к 3'SiaLac, тогда как для 6'SiaLac активность варьирует от предельно низкой (у птичьих и ранних человеческих вирусов) до высокой (у свиных вирусов и современных человеческих вирусов). Показано, что активность НА по отношению к 6'SiaLac зависит также от вида хозяина, а для вирусов человека – и от года изоляции [45].

Для штаммов N1 70–80-х годов выделения [43, 44] было показано, что нейраминидаза практически одинаково узнает 3'SiaLac и 6'SiaLac.

С помощью BODIPY-меченных синтетических олигосахаридов [48–51] получены данные по субстратной специфичности N1 и N2 НА некоторых изолятов вирусов гриппа уток, свиней и человека. Все исследованные НА десилилировали  $\alpha$ 2–3-субстраты лучше, чем  $\alpha$ 2–6-варианты. В случае вирусов с N1 нейраминидазой соотношение активностей  $\alpha$ 2–3/ $\alpha$ 2–6 составляет ~60 для вируса утки, ~20 для вирусов свиней и ~4 для человеческого вируса. В случае вирусов подтипа H9N2 сходные соотношения  $\alpha$ 2–3/ $\alpha$ 2–6 наблюдаются для вируса утки, в то время как для вирусов домашней птицы данное соотношение находится в пределах от 30 до 15, а для вируса свиней ~6, наконец, для вируса человека ~10. Было показано для всех НА вирусов человека, что они различают тонкую структуру  $\alpha$ 2–3-субстратов, т.е. узнают природу внутренних участков углеводных цепей сиалоолигосахаридов.

При использовании полиакриламидных конъюгатов с 3'SiaLac, 6'SiaLac и 6'SiaLacNAc было показано, что большая часть вирусов (подтипы H1N1 и H3N2), выращенных на куриных эмбрионах и клетках MDCK, предпочтительно расщепляет 3'SiaLac, а VERO-изоляты тех же вирусов предпочтительно гидролизуют 6'SiaLacNAc. Таким образом, на субстратную специфичность НА влияет природа хозяйской клетки, используемой для накопления вируса [42]; причина этого явления остается невыясненной.

Результаты изучения субстратной специфичности, полученные разными авторами, как правило, трудно сопоставимы, так как использовались не только различные штаммы вирусов, но и различные субстраты или кардинально разные концентрации субстратов. Так, если Кобаса [45] показал, что максимальная активность НА по отношению к 6'SiaLac не превышает активности по отношению к 3'SiaLac, то в работе Баум и Паульсона [46] она была гораздо выше для тех же вирусов. Следует также отметить, что еще

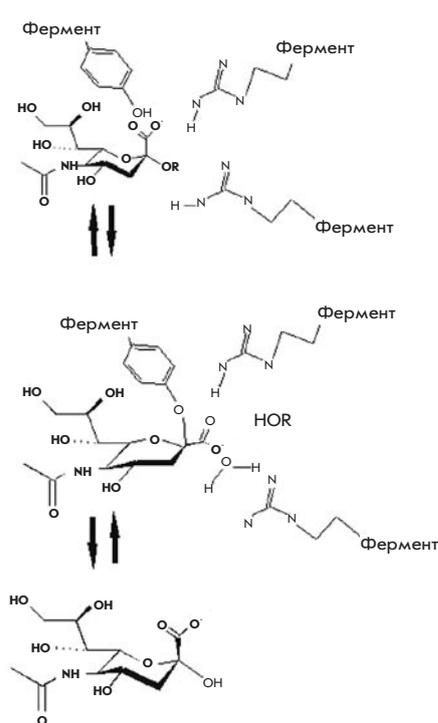


Схема Механизм десилилирования субстрата нейраминидазой вируса гриппа (по [7], [15] и [16])

ни разу при определении специфичности вируса гриппа не использовались одновременно как низко-, так и высокомолекулярные субстраты известной структуры.

Несмотря на ограниченность опубликованных на данный момент результатов, уже выявляются некоторые закономерности. Во-первых, субстратная специфичность НА человеческих вирусов гриппа отличается от таковой вирусов гриппа птиц. Во-вторых, олигосахаридная специфичность НА вирусов гриппа, циркулирующих в различных видовых популяциях (птицы, свиньи, человек), заметно отличается по крайней мере по параметру «отношение скоростей гидролиза 2–3-олигосахаридов к 2–6-олигосахаридам». В-третьих, субстратная специфичность нейраминидаз вирусов, выращенных на различных клетках, может быть различной.

Данные о функционировании НА будут неполными, если не брать в расчет второй поверхностный белок вируса гриппа, гемагглютинин. Работ, где одновременно проводилось исследование субстратной специфичности НА и NA, а также исследовалась их связь с инфекционными свойствами вируса гриппа, практически нет. Представленные в данном обзоре новые методы исследования НА теперь «догнали» более продвинутые, разрабатывавшиеся с опережением методы исследования НА; поэтому несложно предсказать, что одной из основных тенденций в изучении вируса гриппа ближайших лет будет именно совместное изучение активности и специфичности НА и NA. ●

Обзор написан при поддержке гранта № 04-04-49669 Российского фонда фундаментальных исследований, а также гранта «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Varghese J.N., Colman P.M. Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution. // *J. Mol. Biol.* 221: 473–486 (1991).
- Colman P.M. NA enzyme and antigen. // In *The influenza viruses* (R. M. Krug, ed.). Plenum Publishing Corporation, New York: 175–218. 1989.
- Russell R.J., Haire L.F., Stevens D.J., Collins P.J., Lin Y.P., Blackburn G.M., Hay A.J., Gamblin S.J., Skehel J.J. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. // *Nature*. 44: 45–49. 2006.
- Harris A., Cardone G., Winkler D.C., Heymann J.B., Brecher M., White J.M., Steven A.C. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. // *PNAS*. 103:19123–19127. 2006.
- Varghese J.N., Colman P.M., van Donkelaar A., Blick T.J., Sharasrabudhi A., McKimm-Breschkin J.L. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. // *Biochem.* 94: 11808–11812. 1997.
- Bossart-Whitaker P., Carson M., Babu Y.S., Smith C.D., Laver W.G., Air G.M. Three-dimensional structure of influenza A N9 neuraminidase and its complex with the inhibitor 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl neuraminic acid. // *J. Mol. Biol.* 232: 1069–1083. 1993.
- Janakiraman M.N., White C.L., Laver W.G., Air G.M., and Luo M. Structure of influenza virus neuraminidase B/Lee/40 complexed with sialic acid and dehydro analog at 1.8-Å resolution: implications for the catalytic mechanism. // *Biochem.* 33: 8172–8179. 1994.
- Takahashi T., Suzuki T., Hidari K.I.-P.J., Miyamoto D., Suzuki Y. A molecular mechanism for the low-pH stability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidases. // *FEBS Lett.* 543: 71–75. 2003.
- Colman P.M., Hoynes P.A., Lawrence M.C. Sequence and structure alignment of parainfluenza virus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. // *J. Virol.* 67: 2972–2980. 1993.
- Varghese J.N., Colman P.M., van Donkelaar A., Blick T.J., Sharasrabudhi A., McKimm-Breschkin J.L. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. // 94: 11808–11812. 1997.
- Matrosovich M.N., Krauss S., Webster R.G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. // *J. Virol.* 281: 56–162. 2001.
- Li S., Schulman J., Itamura S., Palese P. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. // *J. Virol.* 67: 6667–6673. 1993.
- Saito T., Kawano K. Loss of glycosylation at Asn144 alters the substrate preference of the N8 influenza A virus neuraminidase. // *J. Vet. Med. Sci.* 59: 923–926. 1997.
- von Itzstein M., Wu W.-Y., Kok G.B., Pegg M.S., Dyason J.C., Jin B., Phan T.V., Smythe M.L., White H.F., Oliver S.W., Colman P.M., Varghese J.N., Ryan D.M., Woods J.M., Bethel R.C., Hotham V.J., Cameron J.M., Penn C.R. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. // *Nature* 363: 418–423. 1993.
- Watts A.G., Oppezzo P., Withers S.G., Alzari P.M., Buschiazzo A. Structural and Kinetic Analysis of Two Covalent Sialosyl-Enzyme Intermediates on *Trypanosoma rangeli* Sialidase. // *J. Biol. Chem.* 281: 4149–4155. 2006.
- von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 967–74. 2007.
- Watts A.G., Withers S.G. The synthesis of some mechanistic probes for sialic acid processing enzymes and the labeling of a sialidase from *Trypanosoma rangeli*. // *Can. J. Chem.* 82: 1581–1588. 2004.
- Colman P.M., Smith B.J. The trypanosomal trans-sialidase: two catalytic functions associated with one catalytic site. // *Structure* 10: 1466–1468. 2002.
- Oxford J.S., Bossuyt S., Eswarasaran R., Lambkin R. Drugs to combat the epidemic and pandemic faces of influenza. // In *Influenza* (C.W. Potter ed.) Elsevier: 201–234. 2002.
- Hanessian S., Wang J., Montgomery D., Stoll V., Stewart K.D., Kati W., Maring C., Kempf D., Hutchins C., Laver W.G. Design, synthesis, and neuraminidase inhibitory activity of GS-4071 analogues that utilize a novel hydrophobic paradigm. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 3425–3429. 2002.
- Babu Y.S., Chad P., Bantia S., Kotian P., Dehgan A., El-Kattan Y., Lin T.-H., Hutchison T.L., Elliot A., Parker C., Ananth S., Horn LaSun L., Laver G., Montgomery J. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. // *J. Med. Chem.* 43: 3482–3486. 2000.
- Bianco A., Brufani M., Dri D.A., Melchioni C., Filocamo L. Design and synthesis of a new furanonic silylimimetic as a potential influenza neuraminidase inhibitor. // *Letters in organic chemistry* 2: 83–88. 2005.
- Blick T.J., Sahasrabudhe A., McDonald M., Owens I.J., Morley P.J., Fenton R.J., and McKimm-Breschkin J.L. The interaction of hemagglutinin and neuraminidase mutations in influenza virus in resistance to 4-guanidino-Neu5Ac2en. // *J. Virol.* 246: 95–103. 1998.
- Lackenby A., Hungnes O., Dudman S.G., Meijer A., Paget W.J., Hay A.J., Zambon M.C. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe. // *EUROSURVEILLANCE* 13. 1–2. 2008.
- Hui-Ling Y., Ilyushina N.A., Salomon R., Hoffmann E., Webster R.G., Govorkova E.A. Neuraminidase Inhibitor-Resistant Recombinant A/Vietnam/1203/04 (H5N1) Influenza Viruses Retain Their Replication Efficiency and Pathogenicity In Vitro and In Vivo. // *J. Virol.* 81: 12418–12426. 2007.
- Matrosovich M., Matrosovich T., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.-D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. // *J. Virol.* 78: 12665–12667. 2004.
- Wagner R., Wolf T., Herwig A., Pleschka S., Klenk H.-D. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza growth: a study by reverse genetics. // *J. Virol.* 74: 6316–6323. 2000.
- Ohuchi M., Feldmann A., Ohuchi R., Klenk H.D. Neuraminidase is essential for fowl plague virus hemagglutinin to show hemagglutinating activity. *Virology*. Sep 10;212(1):77–83. 1995.
- Rudneva I.A., Kovaleva V.P., Varich N.L., Farashyan V.R., Gubareva L.V., Yamnikova S.S., Popova I.A., Presnova V.P., Kaverin N.V. Influenza A virus reassortants with surface glycoprotein genes of avian parent viruses: effects of HA and NA gene combinations on virus aggregation. // *Arch. Virol.* 133: 437–450. 1993.
- Rudneva I.A., Sklyanskaya E.I., Barulina O.S., Yamnikova S.S., Kovaleva V.P., Tsvetkova I.V. and Kaverin N.V. Phenotypic expression of HA – NA combinations in human – avian influenza A virus reassortants. // *Arch. Virol.* 141: 1091–1099. 1996.
- Kaverin N.V., Gambaryan A.S., Bovin N.V., Rudneva I.A., Shilov A.A., Khodova O.M., Varich N.L., Sinitin B.V., Makarova N.V., Kropotkina E.A. Postreassortment changes in influenza A virus hemagglutinin restoring HA – NA functional match. // *J. Virol.* 244: 315–321. 1998.
- Castrucci M.R., Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. // *J. Virol.* 67: 759–764. 1993.
- Mitnaul J., Matrosovich M.N., Castrucci M.R., Tuzicov A.B., Bovin N.V., Kobasa D., Kawaoka Y. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A viruses. // *J. Virol.* 74: 6015–6020. 2000.
- Wagner R., Wolf T., Herwig A., Pleschka S., Klenk H.-D. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza growth: a study by reverse genetics. // *J. Virol.* 74: 6316–6323. 2000.
- Hughes M., Matrosovich M., Rodges M., McGregor M., Kawaoka Y. Influenza A viruses lacking sialidase activity can undergo multiple cycles of replication in cell culture, eggs, or mice. // *J. Virol.* 74: 5206–5212. 2000.
- Potier M., Mamei L., Belisle M., Dallaire L., Melancon S.B. Fluorometric assay with a sodium (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic) substrate. // *Anal. Biochem.* 94: 287–296. 1979.
- Engstler M., Talhouk J.W., Smith R.E., Schauer R. Chemical synthesis of 4-trifluoromethylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid glycoside and its use for the fluorometric detection of poorly expressed natural and recombinant sialidases. // *Anal. Biochem.* 250: 176–180. 1997.
- Buxton R.C., Edwards B., Joo R.R., Voyta J.C., Tisdale M., Bethel R.C. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. // *Anal. Biochem.* 280: 291–300. 2000.
- Jourdain G.W., Dean L., Roselman S. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of five sialic acids and their glycosides. // *Am. J. Hyg.* 43: 430–435. 1971.
- Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. // *J. Biol. Chem.* 234: 1971–1975. 1959.
- Lambre C.R., Terzidis H., Greffard A., Webster R.G. Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtitre plates coated with natural substrates. // *J. Immunol. Meth.* 135: 49–57. 1990.
- Kattinger D., Mochalova L., Chinarev A., Bovin N., and Romanova J. Specificity of neuraminidase activity from influenza viruses isolated in different hosts tested with novel substrates. // *Arch. Virol.* 149: 2131–2140. 2004.
- Rudneva I.A., Kovaleva V.P., Varich N.L., Farashyan V.R., Gubareva L.V., Yamnikova S.S., Popova I.A., Presnova V.P., Kaverin N.V. Influenza A virus reassortants with surface glycoprotein genes of avian parent viruses: effects of HA and NA gene combinations on virus aggregation. // *Arch. Virol.* 133: 437–450. 1993.
- Couceiro J.N.S.S., Baum L.J. Characterization of the hemagglutinin receptor specificity and neuraminidase substrate specificity of clinical isolates of human influenza A viruses. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 89: 587–591. 1994.
- Kobasa D., Kodihalli S., Luo M., Castrucci M.R., Donatelli I., Suzuki Y., Suzuki T., Kawaoka Y. Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. // *J. Virol.* 73: 6743–6751. 1999.
- Baum L.G., Paulson J.C. The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. // *J. Virol.* 180: 10–15. 1991.
- Paulson J.C., Weinstein J., Dorland L., van Halbeek H., Viegant J.F.J. Newcastle disease virus contains a linkage-specific glycoprotein sialidase. // *J. Biol. Chem.* 257: 12734–12738. 1982.
- Mochalova L.V., Korchagina E.Y., Kurova V.S., Shtyrya Y.A., Gambaryan A.S., Bovin N.V. Fluorescent assay for studying the substrate specificity of neuraminidase. // *Anal. Biochem.* 341, 190–193. 2005.
- Mochalova L., Kurova V., Shtyrya Y., Korchagina E., Gambaryan A., Belyanchikov I., Bovin N.V. Oligosaccharide specificity of influenza H1N1 virus neuraminidases. // *Arch. Virol.* 152, 2047–2057. 2007.
- Gambaryan A.S., Matrosovich M.N. A solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity. // *Journal of Virological Methods.* 39, 111–123. 1992.
- Shtyrya Y.A., Mochalova L.V., Gambaryan A.S., Korchagina E.Y., Xu X., Klimov A.I., Bovin N.V. Neuraminidases of H9N2 influenza viruses isolated from different hosts display various substrate specificity. // *Proceedings of international conference on options for the control of influenza VI held in Toronto, Ontario, Canada June 17–23. 2007.* Editor Jacqueline M. Katz., International Medical Press. 64–65. 2008.