

УДК 578.832.1;579.22

ДВЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОГОРТЫ ГЛАВНОГО НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА NP И ИХ СВЯЗЬ С КРУГОМ ХОЗЯЕВ У ВИРУСОВ ГРИППА А

© 2024 г. А. И. Чернышова¹, член-корреспондент РАН О. П. Жирнов^{1,2,*}

Поступило 10.12.2023 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принято к публикации 28.01.2024 г.

Вирус гриппа А имеет широкий природный ареал среди птиц, млекопитающих и людей. Одним из главных регуляторных адаптеров круга хозяев вируса выступает белок вирусного нуклеокапсида (NP). Посредством филогенетического анализа белка NP различных вирусов обнаружено существование двух филогенетических когорт у вирусов гриппа человека. Когорта I объединяет классические вирусы человека, вызвавшие эпидемии в 1957, 1968, 1977 гг. Когорта II ассоциирована с вирусом человека H1N1/2009pdm, имеющим смешанное птичье-свиное происхождение, который вызвал глобальную пандемию у людей в 2009 г. Возникший в 2021 г. вирус высоко вирулентного птичьего гриппа H5N1 обладает белком NP филогенетической когорты II и, следовательно, по типу адаптации к человеку близок вирусу H1N1/2009pdm и имеет высокий эпидемический потенциал для людей. Полученные данные раскрывают механизмы и динамику адаптации вирусов гриппа птиц к человеку и создают основу для системного мониторинга опасных штаммов вируса с целью выявления предвестников эпидемии и принятия своевременных предупредительных мер.

Ключевые слова: вирус гриппа, круг хозяев, белок NP, вирус H5N1

DOI: 10.31857/S2686738924030071, **EDN:** VTWTOF

Род *Alphainfluenzavirus* (вирус гриппа А по прежней классификации) относится к оболочечным вирусам, имеющим в качестве генома 8 сегментов РНК негативной или двойной (амбисенс) полярности [1, 2]. Сегмент РНК № 5 кодирует главный нуклеокапсидный белок NP (мол. масса 70 кДа; 498 а. к.), формирующий с геномной РНК и тремя субъединицами полимеразы PB1, PB2 и PA сегменты вирусного рибонуклеопротеида (РНП). На матрице РНК в составе РНП вирусные полимеразы осуществляют транскрипцию и репликацию вирусного генома. NP является мажорным структурным белком и присутствует в количестве около 1000 молекул на вирион. Помимо структурной роли в формировании вирионов и метаболической функции в транскрипции генома, NP участвует в регуляции круга хозяев вируса

[3, 4]. Вирусы гриппа А имеют широкий круг хозяев, состоящий из птиц, млекопитающих животных и человека. Птицы являются главным природным резервуаром вируса гриппа А, в котором зарождаются новые разновидности потенциально вирулентного для человека вируса, дающего начало эпидемиям и пандемиям. При этом от птиц вирусы гриппа переходят на человека, как правило, через промежуточного хозяина, роль которого чаще других могут выполнять свиньи, и возможно тюлени, норки, кошки, лисы, собаки и другие млекопитающие, а роль вирусных переносчиков в природе могут выполнять перелетные птицы, утки, чайки, гуси и др., связанные с животными цепочкой хищник–жертва [5–7].

Важную роль в переходе вируса гриппа от птиц к человеку выполняет белок NP. Эта регуляторная роль определяется тем фактом, что белок NP взаимодействует с рядом клеточных факторов, которые имеют видовую специфичность, характерную для определенного вида животного или птиц. К числу таких факторов относится фактор видового иммунитета Mx [8], ядерные регуляторы ANP32A/B, участвующие во внутриядерном процессе ацетилирования гистонов и цитоплазматического транспорта экспортированных вирусных мРНК [9], альфа-импортин, регулирующий транспорт вирусного РНП через ядерную пору

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

²Русско-немецкая академия медико-социальных и биотехнологических наук, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия

*e-mail: zhirnov@inbox.ru

в инфицированной клетке [10], клеточный фактор UAP56 сплайсинга синтезируемых в клеточном ядре РНК [11] и др. Вполне логично предположить, что взаимодействие с указанными факторами должно иметь структурно-функциональные особенности и отличия у белков NP вирусов, адаптированных к птицам или к человеку. На основании этого предположения нами ставился вопрос — будут ли NP белки вирусов птиц и человека иметь различия на этапах своей эволюции и будут ли эти специфические различия сохраняться у вирусов-мигрантов, перешедших от птиц (или млекопитающих животных) к человеку.

В поисках филогенетических связей между белками NP у вирусов гриппа А различного происхождения исследовали первичные структуры нуклеокапсидных белков NP вирусов гриппа А, изолированных в последние ~100 лет от различных видов хозяев. Филогенетические сравнения проводили с помощью программы MEGA-10 на основании вирусных последовательностей из баз данных GISAID и GenBank. Как видно на рис. 1, были идентифицированы две основные филогенетические когорты у белка NP вирусов, эволюционное расхождение которых было ассоциировано с видом хозяина вируса. Филогенетическая когорта I ассоциирована с классическими вирусами сезонного гриппа человека, вызвавшими эпидемии среди людей в 1957, 1968 и 1977 годах. Вторая филогенетическая когорта II ассоциирована с вирусами гриппа различных субтипов, изолированных от птиц и свиней, включая циркулирующие в популяциях животных типичные для пандемических вирусов человека субтипы H1, H2, H3. Таким образом, этот результат показывает существование в природном ареале двух больших когорт нуклеокапсидного белка NP “человеческого” и “птичьего” типов.

Второе важное наблюдение касается наличия филогенетических связей у клайда пандемического вируса человека H1N1/2009pdm в рамках когорты II. Такой клайд в эволюции гена NP у вирусов гриппа А человека сформировался недавно, около 2009 года, что было связано с появлением вируса H1N1/2009pdm (рис. 1; показан стрелкой). Этот вирус возник в популяции свиней в результате смешивания генов вирусов свиней, птиц и человека, и затем возникший реассортант перешел на человека и вызвал планетарную пандемию гриппа среди людей в 2009 и последующие годы [6, 12]. Оказалось, что белок NP данного вируса человека находится в когорте II “птичьего/свиного” происхождения, из чего следует, что по своей филогенетической позиции был ближе к вирусам птиц, чем к таковой у классических вирусов гриппа А человека. Следовательно, можно предположить, что данный субтип пандемического вируса с белком NP птичьего прототипа приобрел частичную адаптацию к человеку и закрепился в популяции людей, но при этом сохранял близость прототипным

вирусам птиц. Из этого наблюдения вытекает важный вывод о том, что преодоление вирусами межвидового барьера птицы—человек возможно не только посредством шифта (приобретения гена адаптированного белка NP посредством реассортации РНК сегментов между вирусами от различных хозяев), но и посредством приспособления (адаптации) вирусного белка NP при переходе вируса к новому хозяину.

Белок NP, играющий роль регуляторного адаптера между вирусом и хозяином, для выполнения этой функции имеет определенные аминокислотные паттерны, так называемые генетические штампы (“genetic signatures”) [3, 4]. Наиболее важными для размножения в организме человека у белка NP классических вирусов гриппа А человека служат 15 специфических позиций аминокислот (генетический штамп) (рис. 2) [13, 14]. Генетический штамп белка NP вируса H1N1/2009pdm человека имел меньшее сходство с таковым у вируса гриппа классического (сезонного) гриппа человека (20% гомологичных а. к. позиций, выделены белым фоном), чем с NP вируса гриппа птиц (67% гомологичных а. к. позиций, выделены серым фоном) (рис. 2), что согласуется с данными филогенетического анализа (рис. 1). Представляется возможным, что на предэпидемическом этапе в период 2000—2009 гг. при эпидемии H1N1/2009pdm в организме свиней в результате реассортации вирусных геномов возник уникальный вирус с тандемом гена NP классического свиного (исходно птичьего) вируса и гена PB2 вируса классического гриппа человека [12].

Адаптация данного тандема к млекопитающим происходила главным образом за счет гена преадаптированного PB2 “человеческого” вируса с минимальными изменениями в “птичьем” гене NP, сохранившим существенную часть (~67%) исходных аминокислотных позиций, характерных для птичьих штампов (см. рис. 2; позиции выделены серым фоном) и одну отличительную уникальную замену в позиции 313, которая, как известно, играет важную роль в подавлении клеточной митофагии белком NP при инфекции клеток (рис. 2, выделена заштрихованным фоном) [15]. В результате, в отличие от когорты I классических вирусов человека, сложилась новая эволюционная ветвь вирусов пандемического гриппа А/H1N1/2009pdm человека (клайд H1N1/2009pdm на рис. 1), в которой белок NP оказался структурно близким к свиным вирусам гриппа А, но исходно происходящим от птиц [6, 12].

На современном этапе 2021—2023 годов на всех континентах наблюдается резкий подъём заболеваемости птиц в природе и с/х популяциях высоко патогенным вирусом субтипа H5N1, вызывающим высокую популяционную летальность более 50% [16, 17]. Опасным и угрожающим для людей следствием этого роста заболеваемости птичьего вируса H5N1 служит

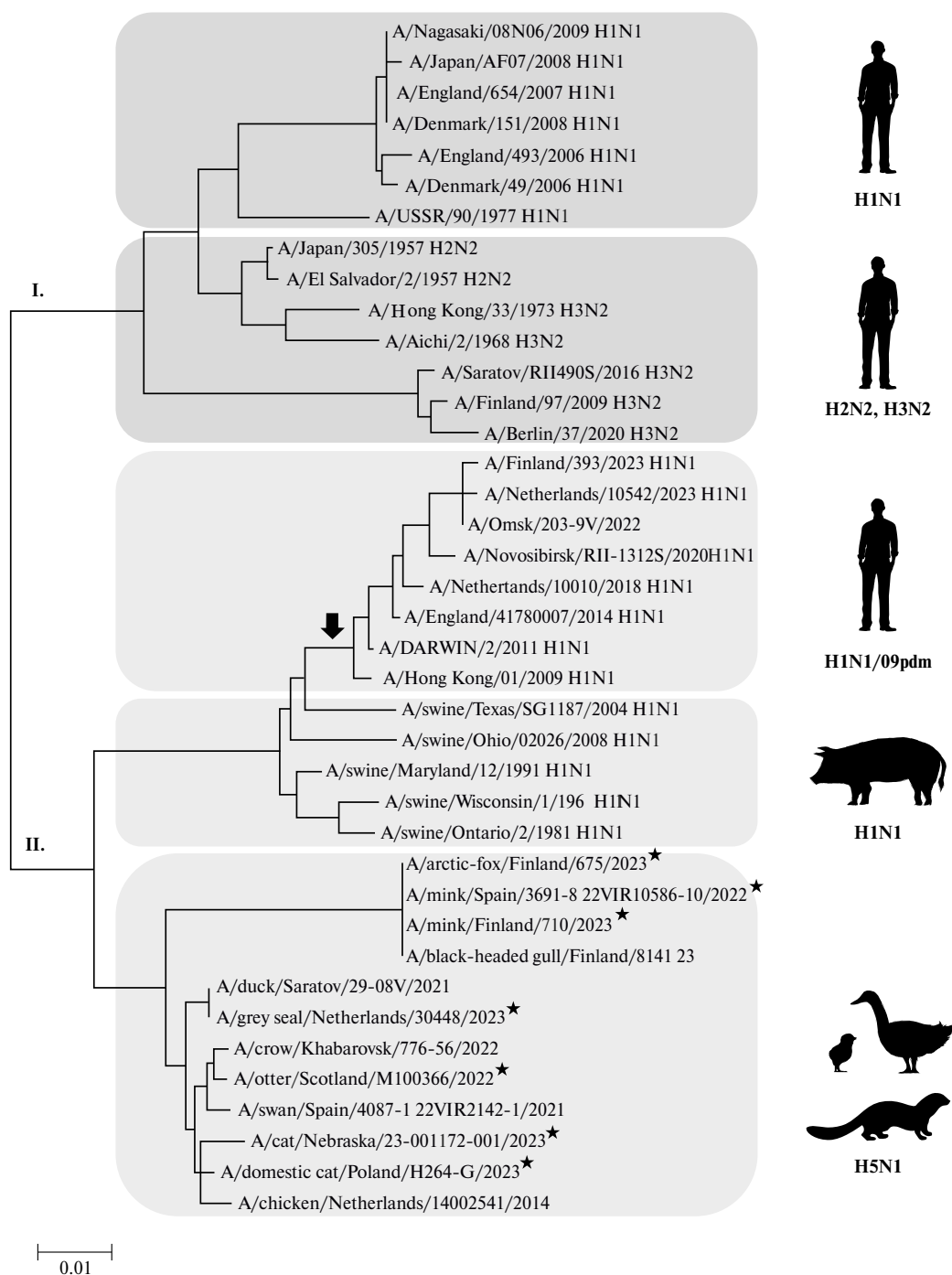


Рис. 1. Филогенетический анализ первичной структуры белка NP вирусов гриппа А птиц и млекопитающих животных, включая человека. Филогенетическое дерево белка NP построено по последовательностям белка NP из базы данных GISAID и GenBank. Исследованы вирусы гриппа А, изолированные от птиц, свиней, норок, кошек и других млекопитающих животных, включая человека, в период 1957–2023 гг. Для анализа применяли программу MEGA-10 (алгоритм ближайшего соседа – NJ). Для построения дерева использованы 39 полных последовательностей а.к. белков NP для вирусов классического гриппа человека H1N1 (1950–2008 гг.), классической линии свиных штаммов H1N1 (1961–2020 гг.), птичьих вирусов субтипа H5N1 (2014–2023 гг.), вирусов H5N1 от млекопитающих (2021–2023 гг.). GenBank: AAA51491.1; AFM72964.1; ABD60794.1; AFM71861.1; ABW36337.1; ACD85158.1; ADM18085.1; ANB51548.1; ADG59708.1; ABI84963.1; APC57870.2; GISAID: EPI243398; EPI173795; EPI168140; EPI171494; EPI168127; EPI677976; EPI138999; EPI2760375; EPI2755515; EPI2755455; EPI2737210; EPI2761157; EPI886274; EPI1922958; EPI1229955; EPI2557220; EPI1248597; EPI2748090; EPI2616223; EPI2603677; EPI1998203; EPI2220590; EPI2158641; EPI2670207; EPI181378; EPI319186; EPI1673272; EPI2587076.

факт вовлечения в эпидемический процесс млекопитающих, таких как норки, лисы, кошки, тюлени, медведи, свиньи и др. (всего 26 видов животных), создающий условия быстрой предадаптации вируса к человеку [7, 17, 18]. Возникает вопрос о филогенетической истории белка NP данного опасного варианта вируса H5N1. Оказалось, что NP вирусов H5N1 (рис. 1; штаммы отмечены звездочками), изолированных в 2022–2023 гг. от различных млекопитающих, входил в когорту II, то есть, сохранял признаки “птичьего” клэйда. Сравнение аминокислотных штампов гена NP вирусов гриппа H5N1 с вирусами сезонного и пандемического вируса гриппа человека показало, что по мере персистенции в популяции млекопитающих белки NP вирусов птиц H5N1, подобно вирусу H1N1/2009pdm, теряли сходство с белком классических прототипных вирусов птиц, снизив гомологию до 80% и 67% соответственно, при исходной 100%-ной гомологии (рис. 2). Параллельно с таким снижением гомологии к вирусам птиц белок NP вируса H5N1, изолированного от млекопитающих, подобно пандемическому вирусу человека H1N1/2009pdm, приобрел частичное сходство с генетическим штампом белка NP классического вируса гриппа человека в 13% и 20% соответственно (рис. 2).

Представленные данные позволяют сделать предположение о том, что адаптация птичьего вируса H5N1 к организму млекопитающих идет по механизму постепенного сближения с NP вируса человека и отдаления от NP вируса птиц. Сходная динамика сближения с вирусами человека имела место в аналогичном процессе, произошедшем ранее в организме свиней у пандемического вируса H1N1/2009pdm на этапе, занявшем около 10 лет, до его эпидемического выхода в популяцию людей в 2009 г. [6, 12, 19] и, возможно, подобная динамика эволюции и перехода от птиц к человеку имела место ранее у эпидемического вируса H1N1/1918, вызвавшего планетарную пандемию в 1918–1920 гг., так называемую “испанку” [6, 20]. Вполне логично допустить, что аналогичный процесс смены хозяина и сцепленного изменения генетического штампа вирусных белков носил закономерный характер и вероятно происходил в природе неоднократно и раньше (на дистанции нескольких млн лет в эпоху возникновения и существования приматов [21]) при начальном биогенезе прототипа(ов) классической линии вирусов человека, ставшей затем предшественником современных эпидемических субтипов H2N2 (1957), H3N2 (1968), H1N1 (1977). Суммируя представленные данные, можно заключить, что на современном этапе в популяции людей сформировались и автономно эволюционируют две филогенетические когорты вирусов гриппа А, несущие различные прототипы гена NP “человеческого” и “птичьего/свиного” происхождения, когорты I и II соответственно (см. рис. 1).

№ а.а.	Hu	Sw	Pdm09	Min	Av
16	D	G/D*	G	G/D*	G
33	I	I	I	I	V
61	L	I	I	I	I
100	V	V	I/V*	R	R
109	V	I	I	V	I
214	K	R	R	R	R
283	P	L	L	L	L
293	K	R	R	R	R
305	K	K	K	R	R
313	Y	F	V	F	F
357	K	K	K	Q	Q
372	D	E	E	E	E
422	K	R	R	R	R
442	A	T	T	T	T
455	E	D	D	D	D
Hu % →	100	33	20	13	0
Av % →	0	67	67	87	100

Рис. 2. Сравнение аминокислотных штампов белка NP у вирусов гриппа А, изолированных от млекопитающих и птиц. Номера 15 позиций аминокислот (а.к.), формирующих генетические штампы в белке NP (м.м. 70 кДа; 498 а.к.), характерные для вирусов человека, свиньи и птиц [4, 14], указаны слева на право по порядку от N-концевого метионина. В верхней части столбцов указаны филогенетические клэйды вирусов классического гриппа человека H1N1 (Hu), классических свиных вирусов H1N1 (Sw), пандемического вируса гриппа человека H1N1/2009pdm (Pdm09), вирусов гриппа H5N1, изолированных от норок (Min), классической линии вирусов птиц H5N1 (Av). В нижней части по горизонтали приведены значения доли (%) а.к. позиций, совпадающих у данной группы вирусов с птичьими (Av) и человеческими (Hu) генетическими штампами (“genetic signatures”). Позиции а.к. показаны в общепринятом однобуквенном латинском обозначении в формате Logos (<http://weblogo.threeplusone.com/>). (*) Отмеченные позиции аминокислот имеют гетерогенность в вирусных популяциях, в которых указанная после косой линии аминокислота обнаруживается в 10–20% вирусных изолятов. Для идентификации а.к. вариаций различным фоном показаны позиции аминокислот у вирусов человека (белый фон) и вирусов птиц (серый фон). Горизонтальным штрихом обозначен фон в а.к. позиции 313 NP, которая отличается от таковой у обоих референсных вирусов.

Представленные в работе данные указывают на необходимость дальнейшего углубленного мониторинга и изучения динамики природной изменчивости гена NP у вирусов гриппа А. Получение подобных знаний открывает новые подходы к раскрытию основополагающих механизмов адаптации вирусов гриппа птиц к организму других видов животных, включая человека, лежащую в основе возникновения угрожающих пандемий, и создают платформу для системного мониторинга вирусов гриппа с целью выявления эпидемических предвестников возникновения опасной инфекции у животных и человека и принятия своевременных предупредительных мер.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в порядке личной инициативы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., et al. Recent Changes to Virus Taxonomy Ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses // Arch. Virol. 2022. V. 167(11). P. 2429–2440.
2. Zhirnov O.P. The Unique Genome of the Virus and Alternative Strategies for its Realization // Acta Naturae. 2023. V. 15(2). P. 14–19. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11904>
3. Zhirnov O.P. The Host Origin of Influenza A Viruses Can Be Assessed by the Intracellular Cleavage of the Viral Nucleocapsid Protein // Arch. Virol. 1988. V. 99(3–4). P. 277–284.
4. Mänz B., Dornfeld D., Götz V., Zell R., Zimmermann P., Haller O., Kochs G., Schwemmler M. Pandemic Influenza A Viruses Escape from Restriction by Human MxA through Adaptive Mutations in the Nucleoprotein // PLoS Pathog. 2013. V. 9(3). P. e1003279. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003279>
5. Hall J.S., Teslaa J.L., Nashold S.W., et al. Evolution of a Reassortant North American Gull Influenza Virus Lineage: Drift, Shift and Stability // Virol. J. 2013. V. 10. P. 179.
6. Lycett S.J., Duchatel F., Digard P. A Brief History of Bird Flu // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2019. V. 374 (1775). P. 20180257.
7. WHO: Ongoing Avian Influenza Outbreaks in Animals Pose Risk to Humans. 2023, July 12: [https://www.who.int/ru/news/item/12-07-2023-ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-](https://www.who.int/ru/news/item/12-07-2023-ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-animals-pose-risk-to-humans)
8. Haller O., Kochs G. Mx Genes: Host Determinants Controlling Influenza Virus Infection and Trans-species Transmission // Hum. Genet. 2020. V. 139(6–7). P. 695–705.
9. Peacock T.P., Sheppard C.M., Lister M.G., et al. Mammalian ANP32A and ANP32B Proteins Drive Differential Polymerase Adaptations in Avian Influenza Virus // J. Virol. 2023. V. 97(5). P. e0021323.
10. Tome-Amat J., Ramos I., Amanor F., Fernández-Sesma A., Ashour J. Influenza A Virus Utilizes Low-Affinity, High-Avidity Interactions with the Nuclear Import Machinery to Ensure Infection and Immune Evasion // J. Virol. 2018. V. 93(1). P. e01046–18.
11. Morris A.K., Wang Z., Ivey A.L., Xie Y., Hill P.S., Schey K.L., Ren Y. Cellular mRNA Export Factor UAP56 Recognizes Nucleic Acid Binding Site of Influenza Virus NP Protein // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 525(2). P. 259–264.
12. York I., Donis R. O. The 2009 Pandemic Influenza Virus: Where Did It Come From, Where Is It Now, and Where Is It Going? // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2013. V. 370. P. 241–257.
13. Gamarra-Toledo V., Plaza P.I., Gutiérrez R., Inga-Díaz G., Saravia-Guevara P., Pereyra-Meza O., et al. Mass Mortality of Sea Lions Caused by Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus // Emerg. Infect. Dis. 2023. V. 29 (12). P. 2553–2556. <https://doi.org/10.3201/eid2912.230192>
14. Chen G.W., Gong Y.N., Shih S.R. Influenza A Virus Plasticity – A Temporal Analysis of Species-associated Genomic Signatures // J. Formos. Med. Assoc. 2015. V. 114(5). P. 456–463.
15. Zhang B., Xu S., Liu M., et al. The Nucleoprotein of Influenza A Virus Inhibits the Innate Immune Response by Inducing Mitophagy // Autophagy. 2023. V. 19(7). P. 1916–1933.
16. Shi J., Zeng X., Cui P., Yan C., Chen H. Alarming Situation of Emerging H5 and H7 Avian Influenza and Effective Control Strategies // Emerg. Microbes Infect. 2023. V. 12(1). P. 2155072.
17. Adlhoch C., Fusaro A., Gonzales J.L., et al. Avian Influenza Overview December 2022 – March 2023 // EFSA J. 2023. V. 21 (3). P. e07917.
18. Agüero M., Monne I., Sánchez A., et al. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in Farmed Minks, Spain, October 2022 // Euro. Surveill. 2023. V. 28 (3). P. 2300001.
19. Smith G.J., Vijaykrishna D., Bahl J., et al. Origins and Evolutionary Genomics of the 2009 Swine-origin H1N1 Influenza A Epidemic // Nature. 2009. V. 459(7250). P. 1122–1125.
20. Worobey M., Han G.Z., Rambaut A. Genesis and Pathogenesis of the 1918 Pandemic H1N1 Influenza A Virus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111 (22). P. 8107–8112.
21. Lyov D.K., Gulyukin M.I., Zaberezhnyi A.D., Gulyukin A.M. Formation of Population Gene Pools of Zoonotic Viruses, Potentially Threatening Biosafety // Vopr. Virusol. 2020. V. 65(5). P. 243–258. (in Russian).

TWO PHYLOGENETIC COHORTS OF THE NUCLEOCAPSID PROTEIN NP AND THEIR CORRELATION WITH THE HOST RANGE OF INFLUENZA A VIRUSES

A. I. Chernyshova^a, Corresponding Member of the RAS O. P. Zhirnov^{a,b,#}

^a*D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology,
Ministry of Health, Moscow, Russian Federation*

^b*The Russian-German Academy of Medico-Social and Biotechnological Sciences,
The Innovation Center of Skolkovo, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: zhirnov@inbox.ru*

Influenza A virus has a wide natural areal among birds, mammals and humans. One of the main regulatory adaptors of the virus host range is the major NP protein of the viral nucleocapsid. Phylogenetic analysis of the NP protein of different viruses has revealed the existence of two phylogenetic cohorts in human influenza virus population. Cohort I includes classical human viruses that caused epidemics in 1957, 1968, 1977. Cohort II includes the H1N1/2009pdm virus, which had a mixed avian-swine origin, but caused global human pandemic. Also, the highly virulent H5N1 avian influenza virus emerged in 2021 and caused outbreaks of lethal infections in mammals, including humans, appeared to have the NP gene of the second phylogenetic cohort and, therefore, by the type of adaptation to human is similar to the H1N1/2009pdm virus and seems to possess a high epidemic potential for humans. The data obtained shed light on pathways and dynamics of avian influenza viruses adaptation to humans and propose phylogenetic algorithm for systemic monitoring of dangerous virus strains to predict epidemic harbingers and take immediate preventive measures.

Keywords: influenza virus, host range, NP protein, H5N1 virus