

ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ, ВИРУСНЫЕ СТРАТЕГИИ ЭВАЗИИ

УДК 578.821

ПРЕОДОЛЕНИЕ ОРТОПОКСВИРУСАМИ ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМ ОРГАНИЗМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2011 г. С. Н. Щелкунов^{1, 2*}

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090

Поступила в редакцию и принята к печати 09.09.2010 г.

Вирусы в процессе своей эволюции выработали различные молекулярные механизмы преодоления защитных реакций организма хозяина, познавая которые можно не только глубже понять, но и выявить новые закономерности организации и функционирования этих важнейших реакций организма, направленных против инфекционных агентов. В этом плане большую роль могут сыграть ортопоксвирусы, патогенные для человека, такие как вирусы натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров и осповакцины. Анализ экспериментальных данных позволяет заключить, что вирус натуральной оспы и другие ортопоксвирусы обладают беспрецедентным, по сравнению с вирусами других семейств, набором генов, белковые продукты которых эффективно влияют на многочисленные защитные функции организма хозяина.

Ключевые слова: ортопоксвирусы, вирус натуральной оспы, вирус оспы обезьян, вирус оспы коров, вирус осповакцины, апоптоз, воспаление, цитокины, хемокины, интерферон, комплемент, преодоление системы хозяйского иммунитета.

EVASION OF MAMMALIAN ORGANISM DEFENCE SYSTEMS BY ORTHOPOXVIRUSES, by S. N. Shchelkunov^{1, 2*} (¹Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; ²Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia, e-mail: snshchel@rambler.ru). Viruses during their evolution have mastered various molecular mechanisms to evade the defense reactions of the host organism. When understanding the mechanisms used by viruses to overcome manifold defense systems of the animal organism, represented by molecular factors and cells of the immune system, we would not only comprehend better, but also discover new patterns of organization and function of these most important reactions directed against infectious agents. Here, study of the orthopoxviruses pathogenic for humans, such as variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses, may be most important. Analysis of the experimental data, carried out in this review, allows to infer that variola virus and other orthopoxviruses possess an unexampled set of genes whose protein products efficiently modulate the manifold defense mechanisms of the host organisms compared with the viruses from other families.

Keywords: orthopoxvirus, variola virus, monkeypox virus, cowpox virus, vaccinia virus, apoptosis, inflammation, cytokines, chemokines, interferon, complement, evasion of host immune system.

ВВЕДЕНИЕ

Ажиотаж вокруг высокопатогенного для человека вируса гриппа птиц в последнее время привлек внимание широкого круга исследователей к таким общебиологическим проблемам, как изменение спектра чувствительных хозяев вирусов, механизмы защиты организма животных и человека от вирусных инфекций и молекулярные стратегии, эволю-

ционно сформированные вирусами, для преодоления этих защитных механизмов.

Вирусы не способны существовать самостоятельно. Для размножения им необходимо заражать чувствительные к ним организмы. При этом в природе постоянно идут процессы изменения генетических программ и отбора оптимальных вариантов. Оба типа процессов характерны как для вирусов, так и для высокоорганизованных организмов. Отличие

Принятые сокращения: ANK – анкирин; CPXV – вирус оспы коров; ECTV – вирус экстремелии; IFN – интерферон; γ -IFN-R – рецептор γ -интерферона; IKK – I κ B киназа; IL – интерлейкин; MPXV – вирус оспы обезьян; NF- κ B – ядерный фактор κ B; NK – натуральный киллер; RCA – регулятор активации комплемента; SCR – короткий консенсусный повтор; SPI – ингибитор сериновой протеазы; TIR-домен – домен Toll- и интерлейкин-1-рецепторов; TLR – Toll-подобные рецепторы; TNF – фактор некроза опухолей; VACV – вирус осповакцины; VARV – вирус натуральной оспы; VCP – вирусный комплемент-связывающий белок.

* Эл. почта: snshchel@rambler.ru

состоит лишь в том, что вирусы размножаются в коротком промежутке времени (несколько часов в зараженной клетке организма) и дают многочисленное потомство (сотни или тысячи дочерних вирусных частиц из одной, заразившей клетку), а многоклеточные организмы (например, человек) проигрывают вирусам по скорости и эффективности размножения. Поэтому вирусная эпидемия развивается в какой-либо реальной популяции млекопитающих или птиц, генетически не изменяющейся за короткий промежуток времени. В этом процессе размножения и распространения вируса появляются множество мутантных вариантов исходного вируса, и отбирается один из них, который в конкретных условиях имеет преимущество в распространении/размножении.

Если инфекция завершается летальным исходом, то погибают наиболее чувствительные к ней особи. При любой эпидемии обнаруживаются особи слабо чувствительные или совершенно устойчивые к конкретному инфекционному агенту. Повышенная же чувствительность, как и устойчивость к инфекции, обусловлена комбинацией генов особей. Поэтому во время массовых эпидемий возникают не только новые варианты вирусов; популяции млекопитающих и птиц также изменяются — погибают высокочувствительные к этому вирусу особи, за счет чего эта популяция обогащается особями, устойчивыми к нему. Таким образом, происходит взаимообусловленная совместная эволюция (коэволюция) вируса и его хозяина. При этом следует иметь в виду, что скорость эволюции вирусов значительно выше, чем животных. Кроме того, у животных имеется несравненно большее число генов, а мутации устойчивости к вирусу обычно затрагивают один, реже — несколько генов. Такие мутации могут влиять на адсорбцию вируса на клетках-мишенях, на размножение вируса и/или преодоление им защитных систем организма.

С каждым годом становится более очевидно, что организм животных, в том числе и человека, обладает широким спектром защитных реакций, направленных против инфекционных агентов. Первичные (немедленные) защитные реакции, называемые врожденным иммунитетом, — это реакции неспецифические, они универсальны и направлены против любых чужеродных клеток, вирусов, крупных молекул. Вторичные защитные реакции — высокоспецифичны и осуществляются системой организма, называемой адаптивным иммунитетом. На запуск этой системы необходимо некоторое время.

Вирусы в процессе своей эволюции выработали различные молекулярные механизмы преодоления защитных реакций организма хозяина [1]. По стратегии преодоления защитных барьеров организма вирусы можно разделить на две основные категории

(в зависимости от типа обусловленной ими инфекции — острой или персистентной). Например, вирус, вызывающий персистентную, или медленную, инфекцию (ретровирусы, герпесвирусы), должен обладать, прежде всего, механизмом (или механизмами) подавления иммунной системы или предотвращения узнавания клетками иммунной системы инфицированных вирусом клеток. С другой стороны, вирусам, ответственным за острую инфекцию (поксвирусы, вирусы гриппа, энтеровирусы), необходимо размножаться до уровня, который обеспечит быструю передачу другому чувствительному хозяину. Для таких вирусов в первую очередь важна эффективная защита от ранних неспецифических (врожденных) реакций организма на инфекцию.

Особую опасность вирусы представляют тогда, когда они в ходе своей эволюции приобретают способность инфицировать новые виды животных. Защитные системы таких животных, в массе своей, могут оказаться не приспособленными к противодействию новому инфекционному агенту, и многие животные погибают. В живых останутся лишь те, комбинация генов в которых случайно обеспечила им хотя бы частичную защиту от данной инфекции. Так произошло в 1918–1919 гг., когда вирус гриппа птиц приобрел не только способность заражать человека, но и эффективно передаваться от больного к здоровому и обуславливать заболевание с тяжелыми последствиями. Эпидемия этого гриппа, получившего название “испанка”, за короткий промежуток времени унесла жизни не менее 50 млн. человек [2].

Такие вирусы-убийцы, уничтожая чувствительных к ним хозяев, убивают и самих себя. Выжить в этих условиях способны лишь мутантные варианты вируса, возникающие во время эпидемии, с пониженной патогенностью для своего нового хозяина. Поэтому эпидемии с тяжелыми последствиями для популяций животных или человека, как правило, происходят не часто.

Считается, что в процессе коэволюции с организмом хозяина вирусы включали в состав своего генома кодирующие последовательности различных клеточных генов, модифицировали их, приспособив для обеспечения своей жизнедеятельности и сохранения в биосфере [3, 4]. Познавая механизмы преодоления вирусами многочисленных защитных систем организма животных, представленных молекулярными факторами и клетками иммунной системы, мы сможем не только глубже понять, но и выявить новые закономерности организации и функционирования этих важнейших реакций организма, направленных против инфекционных агентов. Как правило, вирусные белки, обладающие иммуномодулирующей активностью, синтезируются на ранних этапах инфекции и или остаются в клетке, или

выходят из зараженных клеток и взаимодействуют с ключевыми белками-регуляторами как неспецифических защитных реакций (врожденного иммунитета), так и специфических иммунных реакций (адаптивного иммунитета) организма хозяина [1].

К неспецифическим реакциям немедленного действия относят апоптоз зараженных клеток, воспалительные реакции, синтез универсального противовирусного белка – интерферона, инактивацию вируса многокомпонентным белковым комплексом крови – комплементом, хемотаксис макрофагов к очагу инфекции и другие. Специфический иммунный ответ на инфекцию развивается медленнее и регулируется различными цитокинами, называемыми интерлейкинами (IL), в частности, γ -интерфероном (γ IFN) и фактором некроза опухолей (TNF). Вирусные белки в результате взаимодействия со специфическими регуляторными белками организма подавляют защитные реакции зараженного животного и обеспечивают вирусу размножение и передачу другой особи. Чем эффективнее вирусные белки инактивируют сигнальные молекулы организма, тем более бурно развивается инфекция и выше вероятность летального исхода.

Исследования последних лет показали, что из изученных вирусов наибольшим числом механизмов преодоления защитных барьеров организма млекопитающих обладают поксвирусы (сем. *Poxviridae*), сложно организованные эукариотические ДНК-содержащие вирусы, весь цикл развития которых происходит в цитоплазме клетки [5]. Особый интерес вызывают вирусы рода *Orthopoxvirus*, поскольку четыре вида этих вирусов – вирусы натуральной оспы (*variola virus*, VARV), оспы обезьян (*monkeypox virus*, MPXV), оспы коров (*cowpox virus*, CPXV) и осповакцины (*vaccinia virus*, VACV) – патогенны для человека. Важное значение в качестве экспериментальной модели имеет ортопоксвирус экстремелии (оспы мышей, ECTV).

VARV являет собой редкий случай строгого антропоноза (размножается и передается только в популяции людей); он высоко патогенен для человека (эволюционно адаптирован преодолевать защитные барьеры организма именно этого хозяина). MPXV, CPXV и VACV – возбудители зоонозных инфекций и имеют широкий круг чувствительных животных, поэтому они эволюционно адаптированы для размножения в разных видах млекопитающих. У человека данные вирусы вызывают относительно редкие спорадические заболевания при передаче от больного животного человеку. ECTV, как и VARV, имеет очень узкий круг хозяев и высокопатогенен только для некоторых линий мышей.

ПОДАВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО РАСПОЗНАВАНИЯ ВИРУСОВ

Клетки врожденной иммунной системы млекопитающих, такие как макрофаги и дендритные клетки, в ответ на инфекцию продуцируют провоспалительные цитокины. IL-1 β и IL-18 синтезируются ими как цитозольные предшественники, для перехода которых в активную форму требуется их расщепление цистеиновой протеазой, называемой каспазой-1. Этот фермент синтезируется в клетке в виде неактивного предшественника, активация которого происходит в составе большого цитозольного белкового комплекса, называемого инфламасомой [6–9]. Инфламасомы выполняют функцию внутриклеточных сенсоров, чувствительных к консервативным микробным компонентам, подобно тому, как выполняют свои функции Toll-подобные рецепторы (TLR), расположенные на поверхности клеток или в эндосомах. В белках семейства TLR имеется внутриклеточный TIR-домен, запускающий, в ответ на инфекцию, внутриклеточные сигнальные каскады, которые активируют реакции врожденного иммунитета. Подробнее эти вопросы рассмотрены в одном из обзоров данного выпуска [10].

Интересно, что в геноме ортопоксвирусов обнаружено два гена – *A46R* и *A52R*, белковые продукты которых содержат TIR-домены [11–14]. Эти вирусные белки имеют разные функции и специфично ингибируют внутриклеточные сигнальные каскады, активирующие транскрипционный фактор NF- κ B. Действие белка *A46R* направлено на факторы MyD88 и TRIF, а *A52R* – на IRAK2 и TRAF6. Известно, что фактор NF- κ B регулирует транскрипцию генов, вовлеченных в развитие адаптивного иммунного ответа, воспаления, апоптоза и в пролиферацию клеток.

Важно отметить, что вирусы CPXV и некоторые штаммы VACV кодируют оба рассмотренных белка, в то время как VARV и MPXV, наиболее патогенные для человека, не синтезируют изолага *A52R* VACV (таблица).

ВИРУСНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ДЕЙСТВИЯ ИНТЕРФЕРОНА

Интерфероны (IFN) продуцируются и секретируются клетками животных в ответ на двухцепочечные молекулы РНК (дцРНК), синтезируемые в процессе вирусной инфекции. IFN связываются со специфическими рецепторами клеток и индуцируют противовирусное состояние этих клеток [15]. По крайней мере, два ферментативных пути определяют IFN-индуцируемое противовирусное состояние клетки. В одном из них задействована IFN-индуцируемая дцРНК-активируемая протеинкиназа (так называемая

Ортопоксвирусные белки, модулирующие защитные реакции организма

Функция белка	VARV-IND		MPXV-ZAI		CPXV-GRI		VACV-COP		VACV-WR	
	ОПТ	размер, ак	ОПТ	размер, ак						
IL-18-связывающий белок	D5L	126	D6L	126	C8L	124	—	—	C9L	126
IL-1 β -связывающий белок	B15R	63	B14R	326	B14R	326	B16R	290	B15R	326
Комплемент-связывающий белок	D12L	263	D14L	216	C17L	259	C3L	263	C21L	263
Гомолог eIF-2 α , фактор устойчивости к интерферону	C3L	88	—	—	M3L	88	K3L	88	K2L	88
дРНК-связывающий белок, фактор устойчивости к интерферону, ингибитор апоптоза	E3L	190	F3L	153	F3L	190	E3L	190	E3L	190
γ -IFN-связывающий белок	B9R	266	B9R	267	B7R	271	B8R	272	B8R	272
α / β -IFN-связывающий белок	B20R	354	B16R	352	B17R	351	B19R	353	B18R	351
TNF- и хемокин-связывающий белок, СтmB	G2R	349	J2R	348	H4R	351	B28R	122	B29R	122
TNF-связывающий белок, СтmC	—	—	—	—	A56R	186	A53R	103	A58R	103
TNF- и хемокин-связывающий белок, СтmD	—	—	—	—	K2R	322	—	—	—	—
TNF-связывающий белок, СтmE	—	—	K1R	70	K3R	167	—	—	—	—
СС-хемокин-связывающий белок	G3R	253	J3R	246	I5R	255	B29R	244	B31R	244
СС- и СХС-хемокин-связывающий белок	A46L	218	A41L	221	A43L	219	A41L	219	A41L	219
Ингибитор апоптоза, SPI-1	B25R	372	B19R	357	B20R	375	C12L	353	—	353
Ингибитор апоптоза, ингибитор каспазы-1 и каспазы-8, SPI-2	B13R	344	B12R	344	B12R	345	B13R	116	B13R	345
Ассоциированный с митохондрией ингибитор апоптоза, ингибитор каспазы-9	C5L	251	C7L	219	G1L	238	F1L	226	F1L	226
Ингибитор апоптоза семейства Bcl-2 белков	P1L	117	P1L	117	Q1L	117	N1L	117	N1L	117
Ингибитор апоптоза, трансмембранный белок аппарата Гольджи	—	—	R1R	105	T1R	210	—	—	—	—
Ингибитор апоптоза, RING-домен-содержащая E3 убиквитин-лигаза	D4R	242	D5R	242	C7R	242	—	—	—	—
Ингибитор NKG2D-зависимого лизиса инфицированных клеток NK клетками	—	—	N3R	176	C2L	178	—	—	—	—
Toll-подобный рецептор, супрессия активации NF- κ B	A52R	240	A47R	240	A49R	240	A46R	214	A46R	240
Toll-подобный рецептор, супрессия активации NF- κ B	J6R	71	—	—	A55R	190	A52R	190	A52R	190

Примечание. ОПТ – открытые рамки трансляции, утраченные функции соответствующих ОПТ CPXV-GRI, выделены серым цветом. VARV-IND – VARV штамм India-1967 [52], MPXV-ZAI – MPXV штамм Zaïre-1-96 [25, 26], CPXV-GRI – CPXV штамм GRI-90 [54], VAC-COP и VACV-WR – VACV штаммы Copenhagen и Western Reserve [5], Другие сокращения – см. “Принятые сокращения”.

мая DAI-киназа), а во втором – 2-5A[ppp(A2'p)nA]-синтетаза (обычно называемая 2-5A-синтетаза). Протеинкиназа активируется в результате автофосфорилирования, которое происходит после связывания фермента с дцРНК. Активированная протеинкиназа фосфорилирует α -субъединицу эукариотического фактора инициации трансляции ($eIF-2\alpha$), ингибируя, тем самым, белковый синтез. Другой фермент – 2-5A-синтетаза – после активации молекулами дцРНК катализирует полимеризацию АТР в 2'-5'-связанные олигоаденилаты, которые, в свою очередь, активируют латентную клеточную эндорНКазу L. Эта РНКаза расщепляет молекулы матричной и рибосомной РНК, нарушая белковый синтез.

Ортопоксвирусы, несмотря на продукцию больших количеств вирус-специфичных дцРНК на поздней стадии цикла развития [16], характеризуются высокой устойчивостью к действию IFN [17]. Ген *E3L* вируса VACV кодирует ингибитор IFN-индуцируемой DAI-киназы [18]. Этот вирусный белок, синтезируемый сразу после заражения клетки, обладает способностью связываться с молекулами дцРНК, конкурируя со специфичной протеинкиназой клетки за связывание с дцРНК и ингибируя активацию фермента. Другой ген, *K3L* вируса VACV (*C3L* у VARV), кодирует гомолог $eIF-2\alpha$, который конкурирует с эндогенным фактором $eIF-2\alpha$ клетки за вступление в реакцию фосфорилирования активированной протеинкиназой [19]. Мутантный вирус VACV с нарушенным геном *K3L* проявляет чувствительность к интерферону, и продукция вирусного потомства уменьшается на два порядка [20]. Таким образом, ортопоксвирусы синтезируют белки, которые двумя независимыми способами ингибируют действие IFN-индуцируемой дцРНК-активируемой DAI-киназы.

Необходимо обратить внимание на то, что вирусный гомолог $eIF-2\alpha$ высококонсервативен внутри вида, но у белка VARV имеются множественные отличия от высокомолекулярных изологов белков VACV и CPXV. А вирус MPXV, вследствие множественных мутаций в соответствующем гене, не кодирует данный внутриклеточный фактор устойчивости к интерферону (таблица).

При инфекции вирусом VACV ген *E3L* экспрессируется с первого и второго иницирующего кодона и образует одновременно длинную и короткую формы белка соответственно [20]. N-концевой домен длинной формы необходим для связывания белка VACV с Z-ДНК и обуславливает его ядерную локализацию и проявление свойств патогенности [21, 22]. С-концевой домен как длинной, так и короткой форм этого белка обеспечивает связывание дцРНК и ингибирует активацию IFN-индуцируе-

мых DAI-киназы [23] и 2-5A-синтетазы [24]. У вируса MPXV-ZAI первый инициаторный триплет данного гена мутационно нарушен и поэтому транслироваться может лишь короткая форма этого белка. Таким образом, в отличие от других рассматриваемых видов ортопоксвирусов, MPXV уникален по организации вирусных внутриклеточных факторов устойчивости к интерферону [25, 26]. Это, по-видимому, приводит к снижению уровня его размножения *in vivo* и, как следствие, к снижению эффективности передачи вируса от больного человека здоровому воздушно-капельным путем, что и наблюдается при оспе обезьян у людей по сравнению с натуральной оспой.

Устойчивость ортопоксвирусов к IFN также обеспечивается внеклеточным γ -IFN-связывающим белком [27] и белком, связывающим IFN типа I (α/β -IFN) [28]. Нами обнаружены хорошо выраженные видоспецифичные различия в аминокислотных последовательностях α/β -IFN-связывающего белка ортопоксвирусов [1, 5]. Как эти различия влияют на свойства соответствующих белков, можно будет определить лишь в будущих опытах по экспрессии генов индивидуальных вирусных белков и сравнительному их изучению.

Таким образом, ортопоксвирусы имеют мультигенную систему, обеспечивающую им высокую устойчивость к действию интерферона. Выявленные отличия этих генов у вирусов VARV, MPXV, CPXV и VACV (таблица) требуют дополнительного изучения свойств этих вирусных белков.

ВИРУСНЫЕ ИНГИБИТОРЫ АПОПТОЗА ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Одной из первых линий неспецифической защиты организма от инфицирующих агентов и, возможно, одной из самых древних является так называемый апоптоз (программируемая гибель клетки) [29, 30]. После инфицирования клетки вирусом функция апоптоза – самоубийство этой клетки, что предотвращает размножение в ней вируса, а, следовательно, спасает соседние клетки от заражения. Апоптоз очень широко распространен, он характерен для многоклеточных организмов. Основные медиаторы апоптоза – цистеиновые протеазы – каспазы. В регуляции процессов апоптоза большое значение имеют митохондрии и белки семейства Bcl-2. Индуцируемый интерфероном синтез РНКазы L (см. выше) приводит к апоптозу, зависимому от каспаз 8, 9 и 2 [31].

Важную роль в индукции программируемой гибели клетки играет клеточная каспаза-1, специфично расщепляющая неактивный проинтерлейкин-1 β и переводящая его в зрелый интерлейкин-1 β (IL-1 β).

Следует отметить, что сам $\text{IL-1}\beta$ к индукции апоптоза отношения не имеет, т.е. мишенью каспазы-1 при запуске программируемой гибели клетки являются другие белки [9]. Оказалось, что найденный у вируса CPXV ген *SPI-2* направляет синтез ингибитора каспазы-1 и каспазы-8, являясь, тем самым, ингибитором апоптоза клеток [32, 33]. Сравнение аминокислотных последовательностей белков SPI-2 показало, что эти белки у вирусов CPXV и VACV очень сходны, но существенно отличаются от аналогичного белка VARV [34].

Другой белок вируса VACV-COP C12L (у VARV-IND обозначается B25R), отнесенный на основе компьютерного анализа аминокислотной последовательности к тому же семейству ингибиторов протеаз, в состав которого входит SPI-2, и названный SPI-1, также оказался ингибитором апоптоза. Однако механизм функционирования этого вирусного белка пока не ясен. Полагают, что SPI-1 ингибирует механизм апоптоза, который не зависит от каспазы [35].

Вирусный белок F1L VACV локализуется в митохондриях и является ингибитором каспазы-9, нейтрализуя апоптоз инфицированных клеток [36–38]. Другой консервативный ортопоксвирусный белок N1L (VACV-COP, см. таблицу), не имеющий выраженной гомологии в аминокислотной последовательности с Bcl-2, по третичной структуре соответствует белкам этого семейства и является ингибитором апоптоза [39].

У некоторых штаммов VACV, а также у вируса оспы верблюдов обнаружен ген, кодирующий трансмембранный белок, состоящий из 237 а.о. и локализованный в аппарате Гольджи; он ингибирует апоптоз инфицированных клеток [40]. Вирус CPXV кодирует несколько укороченный белок, в то время как VARV и MPXV такого белка не синтезируют (таблица).

Двухцепочечные молекулы РНК, по-видимому, также могут быть одними из индукторов апоптоза. Этот вывод сделан на основе изучения вируса VACV, мутантного по гену *E3L*. Оказалось, что нарушение этого гена приводит не только к повышению чувствительности вируса к действию интерферона (см. выше), но и к активации апоптоза инфицированных клеток [41]. Данный ортопоксвирусный ген характеризуется относительно высоким консерватизмом в ДНК разных видов.

Кроме того, первая ортопоксвирусная убиквитинлигаза, относящаяся к классу моносубъединичных, содержащих RING-домен E3-лигаз, обнаружена у вируса ECTV. Первоначально было показано, что RING-домен-содержащий белок p28 вируса ECTV является фактором вирулентности и ингибирует апоптоз клеток, индуцируемый фактором некроза опухолей (TNF) [42]. Этот вирусный белок ло-

кализуется в клетке в цитоплазматических вирусных фабриках и необходим для репликации вируса в макрофагах [43]. Учитывая накапливающуюся информацию о классе содержащих RING-домен убиквитинлигаз, изучали свойства белка p28 вирусов ECTV и VARV и показали, что данный белок выполняет функции убиквитинлигазы [44]. Этот ген высококонсервативен у вирусов VARV, MPXV, CPXV, ECTV, но инактивирован у изученных штаммов VACV. Молекулярная мишень (вирусный или клеточный белок) ортопоксвирусной убиквитинлигазы p28 пока не идентифицирована.

Как видим, у ортопоксвирусов обнаружено уже семь генов, белковые продукты которых ингибируют апоптоз по самым разным механизмам (таблица). Это еще раз подтверждает важное значение апоптоза в противовирусной защите млекопитающих.

ВИРУСНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ОРГАНИЗМА

Воспалительные процессы играют важную роль в ранней неспецифической защите организма от вирусной инфекции [1, 5, 33]. Воспаление развивается быстро, ограничивая распространение вируса в первые часы и дни после инфицирования, пока формируется адаптивный иммунный ответ. Известно, что ключевую роль в индукции воспалительных реакций играют такие цитокины, как $\text{IL-1}\beta$, IL-18 , TNF и γ -интерферон (γ -IFN), которые в дальнейшем запускают молекулярные воспалительные каскады, в частности, экспрессию хемокинов. Кроме того, ряд других медиаторов прямо или опосредовано влияет на развитие воспалительного процесса. Поэтому для эффективного подавления воспалительных реакций поксвирусам необходимо иметь несколько генов, белковые продукты которых могли бы воздействовать как ингибиторы различных этапов развития воспаления.

Первый вирусный ген, продукт которого угнетает развитие воспалительного ответа на инфекцию, был обнаружен у вируса CPXV и назван SPI-2 [45] (см. выше). Как отмечено, белок SPI-2 является ингибитором каспазы-1 и, тем самым, предотвращает созревание про- $\text{IL-1}\beta$ в $\text{IL-1}\beta$ и секрецию его из инфицированной клетки, подавляя таким образом индукцию воспалительных реакций в районе инфицированной клетки. Кроме того, оказалось, что SPI-2 ингибирует образование медиаторов воспаления (лейкотриенов) в процессе метаболизма арахидоновой кислоты [46]. И, более того, как мы видели выше, SPI-2 участвует и в подавлении апоптоза инфицированной клетки. Таким образом, этот белок, по-видимому, играет важную роль в определении патогенных свойств ортопоксвирусов *in vivo*. Следует от-

метить, что аминокислотные последовательности белка SPI-2 VARV и гомологов CPXV и VACV несколько различаются [34].

Экспериментально обнаружено, что ген вируса VACV-WR *B15R* кодирует секретлируемый гликопротеид со свойствами растворимого (секретлируемого из клетки) рецептора IL-1 β . Продукция вирусом VACV этого растворимого рецептора предотвращает развитие системных реакций (лихорадку, повышение температуры тела) в организме инфицированных мышей [48]. Оказалось, что нарушение гена вируса VACV-WR *B15R* приводит к увеличению вирулентных свойств вируса VACV при интраназальном введении мышам [49]. Дальнейший анализ показал, что штаммы VACV, обеспечивающие более высокую частоту поствакцинальных осложнений у человека, не обладают IL-1 β -связывающей активностью [48]. Эти результаты хорошо согласуются с тем фактом, что соответствующий ген VARV фрагментирован (разрушен) (таблица).

Таким образом, можно предположить, что вирус VARV супрессирует продукцию и секрецию инфицированными клетками IL-1 β (ген *B13R*, см. таблицу), но не ингибирует действие внеклеточного IL-1 β , синтезируемого другими клетками организма. Исходя из этого, логично заключить, что вирус VARV подавляет местные воспалительные реакции в зоне размножения благодаря продукции SPI-2, но не ингибирует системные реакции организма, поскольку не синтезирует IL- β -связывающего белка. Уменьшение интенсивности местных воспалительных реакций может приводить к более активному размножению вируса, а неконтролируемое развитие системных реакций ослабляет общую устойчивость организма к инфекции. Одновременное развитие этих реакций, по-видимому, обуславливает усиление патогенного эффекта вирусной инфекции на хозяйский организм.

Ортопоксвирусы кодируют также IL-18-связывающий белок, ген которого имеется у VACV-WR, но не у менее вирулентного VACV-COP (таблица). Этот вирусный белок секретлируется из клетки и подавляет активность провоспалительного IL-18 [50].

Как и другие цитокины, TNF многофункционален [51]. В частности, как уже отмечалось выше, он является — наряду с IL-1 β и IL-18 — ключевым цитокином, индуцирующим воспалительные реакции в организме инфицированного хозяина. Оказалось, что вирус VARV-IND содержит ген *G2R*, кодирующий белок SrmB, гомологичный TNF-рецептору типа II [52, 53]. Такой белок — важный секретлируемый фактор вирулентности вируса миксомы кроликов (поксвирус, относящийся к роду лепорипоксвирусов). Аналогичными свойствами, по-видимому, обладает и его аналог *G2R* вируса натуральной оспы.

Существенным отличием вирусов VARV и VACV является то, что у последнего нет генов, кодирующих аналоги рецептора TNF. У вируса CPXV нами обнаружено пять генов, включенных в семейство рецепторов TNF [54]. Четыре из них (таблица) обладают TNF-связывающей активностью [55–58]. По-видимому, такой неожиданно большой набор TNF-связывающих белков обеспечивает вирусу CPXV эволюционную приспособленность и возможность размножаться в широком спектре животных.

При анализе аминокислотных последовательностей белков-изолатов SrmB обнаружили множественные видоспецифичные различия. Нами получены в бакуловирусной системе экспрессии индивидуальные белки SrmB вирусов VARV, MPXV и CPXV, и показано, что они значительно различаются по свойству подавлять биологическую активность TNF человека, мыши и кролика [59–61]. По-видимому, это результат эволюционной адаптации вирусных рецепторов к лигандам своих хозяев.

Недавно показано, что ортопоксвирусный TNF-связывающий белок SrmB обладает дополнительной биологической активностью, а именно — способностью связывать с высокой аффинностью ряд хемокинов, играющих ключевую роль в механизме привлечения в очаг воспаления В- и Т-лимфоцитов и дендритных клеток [62]. Эта иммуномодулирующая активность обусловлена уникальным С-концевым доменом, названным SECRET (Smallpox virus-Encoded Chemokine Receptor). В аминокислотной последовательности SECRET-домена нет гомологии ни с известными белками позвоночных животных, ни с описанными вирусными хемокин-связывающими белками. В результате моделирования пространственной структуры этого домена *de novo* мы обнаружили, что, по-видимому, он является структурным гомологом секретлируемого СС-хемокин-связывающего белка G3R VARV (таблица), несмотря на невысокое сходство их аминокислотных последовательностей.

Хемокины являются хемоаттрактантными цитокинами, регулирующими перемещение и эффекторные функции лейкоцитов, и играют, таким образом, важную роль в развитии воспалительной реакции и защите от патогенов [63]. Штамм *Lister* VACV продуцирует на ранних этапах инфекции в большом количестве секретлируемый из клеток белок [64], связывающий целый ряд СС-хемокинов и ингибирующий их активность [65]. У многих других штаммов VACV этот ген нарушен (таблица). По-видимому, эти белки (G3R для VARV) у разных видов ортопоксвирусов обладают разными свойствами, так как их аминокислотные последовательности в большом наборе штаммов видоспецифичны [5].

Белок A41L вируса VACV и его ортопоксвирусные изоляты также являются секретируемыми гликопротеидами, которые с высокой эффективностью и селективно связываются с некоторыми СС- и СХС-хемокинами, предотвращая хемокин-индуцированную миграцию лейкоцитов к месту инфекции [66, 67]. Этот вирусный хемокин-связывающий белок, по-видимому, важен на этапе размножения вируса, так как сохраняется у всех изученных видов ортопоксвирусов.

Интересно, что все рассматриваемые ортопоксвирусы синтезируют также растворимый рецептор γ -интерферона (γ -IFN-R), который способен модулировать воспалительный ответ хозяина на ортопоксвирусную инфекцию [68–70]. Белок VARV-IND B9R и аналогичный белок VACV-COP различаются по длине и имеют относительно много точечных отличий по аминокислотной последовательности. Возможно, эти видоспецифичные отличия в структуре вирусного γ -IFN-R отражают различия вирусов VARV и VACV по вирулентным свойствам.

Кроме рассмотренных выше генов, ортопоксвирусы содержат ген комплемент-связывающего белка (*D12L* у VARV) [71], одна из функций которого может быть связана с регуляцией воспалительных реакций. Система комплемента состоит из более, чем двадцати белков плазмы крови. Механизмы антивирусного действия системы комплемента включают нейтрализацию вируса, лизис вирус-инфицированных клеток, усиление воспалительного и адаптивного иммунного ответов [72].

Белок C3L вируса VACV, секретируемый из инфицированных этим вирусом клеток и контролирующей реакции активации комплемента (*Vaccinia Virus Complement Control Protein* – VCP), состоит из четырех коротких вырожденных повторов, обозначаемых как SCR (*Short Consensus Repeat*, около 60 аминокислотных остатков каждый), которые характерны для семейства белков-регуляторов активации комплемента (RCA) [73]. Полагают, что ген для VCP первоначально возник в результате включения в вирусный геном части или всей кодирующей последовательности одного из белков семейства RCA хозяинского организма с последующей адаптацией (изменением) этого гена для выполнения функций, необходимых вирусу [74]. При помощи рентгеноструктурного анализа показано, что SCR-последовательности VCP образуют дискретные компактные домены, последовательно тесно сцепленные друг с другом [75].

Показано, что белок VCP – это уникальный многофункциональный вирусный белок, который функционально схож с такими разными белками семейства RCA, как фактор H, мембранный кофакторный белок, рецептор комплемента типа 1 и фак-

тор, ускоряющий разрушение (DAF – *Decay-Accelerating Factor*). Белок VCP, во-первых, связывается с компонентами комплемента C3b и C4b; во-вторых, блокирует каскад комплемента на разных его этапах и ингибирует как классический, так и альтернативный пути комплемента; в-третьих, блокирует активируемую противовирусными антителами нейтрализацию вируса системой комплемента; и, наконец, связывается с гепарин-подобными молекулами, покрывающими поверхность эндотелиальных клеток, блокируя связывание хемокинов и, тем самым, предотвращая передачу сигнала хемотаксиса [72]. На модели мышей, инфицированных CPXV, показано, что VCP угнетает развитие воспалительного ответа *in vivo* [76, 77].

Белки VCP вирусов VARV, CPXV и VACV содержат четыре SCR. При этом последовательности VCP вирусов VACV и VCP VARV отличаются по 12 аминокислотам. В бакуловирусной системе синтезированы индивидуальные белки VCP VARV и VACV [78]. Оказалось, что белок VCP VARV ингибирует комплемент человека с гораздо большей эффективностью, чем аналогичный белок VACV. Это, в частности, подтверждает концепцию эволюционной адаптации вирусных растворимых рецепторов к лигандам организма хозяина.

Нами выявлена уникальная структура белка VCP вируса MPXV [5, 79]. В результате преждевременной терминации синтеза этот белок имеет укороченную последовательность с делецией С-концевого SCR-4, что существенно отличает этот вид от других изученных видов ортопоксвирусов, патогенных для человека.

Таким образом, у ортопоксвирусов обнаружена мультигенная система, способная контролировать развитие воспалительных реакций. По набору и структуре этих генов у ортопоксвирусов существуют видоспецифичные различия (см. таблицу).

МОДУЛИРОВАНИЕ ОРТОПОКСВИРУСАМИ КЛЕТОЧНЫХ ИММУННЫХ ОТВЕТОВ ОРГАНИЗМА НА ИНФЕКЦИЮ

Основные механизмы врожденного клеточного иммунитета направлены на лизис клеток, инфицированных вирусом, клетками NK (*Natural Killer*) [80]. Последние активируются растворимыми медиаторами или при прямом клеточном контакте. Пик размножения NK-клеток приходится на вторые-третьи сутки после ортопоксвирусной инфекции, однако одни только эти клетки не способны полностью предотвратить распространение инфекции в организме [81]. Активация NK-клеток регулируется путем интеграции сигналов нескольких ингибирующих и активирующих рецепторов, многие из кото-

рых используют в качестве лигандов белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I или белки этого семейства. Один из цитотоксичных рецепторов, активирующих НК-клетки, — белок NKG2D. Оказалось, что вирусы CPXV и MPXV содержат ген белка, сходного с белком МНС класса I (OMCP; C2L у вируса CPXV-GRI), который блокирует узнавание хозяйских лигандов и ингибирует NKG2D-зависимый лизис инфицированных клеток НК-клетками [82]. Вирусы VARV и VACV этого гена не содержат (таблица).

Как указывалось выше, ортопоксвирусы синтезируют секретлируемый IL-18-связывающий белок, который ингибирует не только провоспалительную активность IL-18, но и индуцируемую им цитотоксичность НК-клеток [50, 83].

Адаптивный иммунный ответ на инфекцию является собой сложное взаимодействие клеток разного типа, контролируемое цитокинами [84], в результате которого появляются В-лимфоциты, синтезирующие специфичные противовирусные антитела, и возникают вирусспецифичные цитолитические Т-лимфоциты. Специфичные антитела могут взаимодействовать с вирусными частицами и их компонентами индивидуально или в комплексе с комплементом. Специфичные антитела против поксвирусов не эффективны в подавлении первичной инфекции, но могут быть важны в предотвращении повторной инфекции [81]. Клеточный иммунный ответ — важнейший на этапе специфичной защиты организма от поксвирусной инфекции [85]. Пик размножения вирусспецифичных цитолитических Т-лимфоцитов приходится на пятый-шестой день после инфекции. Ключевыми цитокинами являются TNF, IL-1 β и γ -IFN и, наряду с регулированием воспалительных реакций, они контролируют адаптивный иммунный ответ организма на инфекцию. Например, γ -IFN участвует в активации макрофагов, индуцирует экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости и направляет развитие Т-клеточного цитолитического ответа на инфекцию. Цитокины TNF и γ -IFN обладают также прямой антивирусной активностью по отношению к инфицированным клеткам, которая усиливается при их совместном действии.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОРТОПОКСВИРУСОВ С УБИКВИТИН-ЛИГАЗНОЙ И УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНОЙ СИСТЕМОЙ КЛЕТКИ

В последние годы обнаружено, что деградация белков — важнейший элемент регулирования огромного числа различных процессов в клетках [86, 87]. В большинстве случаев при деградации белков в эукариотических клетках используется убиквитин-на-

правляемый механизм. Убиквитин состоит из 76 а.о.; он один из эволюционно наиболее консервативных эукариотических полипептидов, который ковалентно присоединяется к целевым белкам в результате согласованного действия трех классов ферментов [88].

В последние годы стали активно изучать, как вирусы могут участвовать в регулировании убиквитинлигазной и убиквитин-протеасомной систем эукариотических клеток. Известно еще немного, но уже обнаружено, что вирусы разных семейств могут влиять на убиквитинирование белков для преодоления защитных механизмов клетки, включающих апоптоз, на ответ интерферона типа 1, на представление антигенов главным комплексом гистосовместимости класса I и других [89–91].

Весь цикл развития ортопоксвирусов проходит в цитоплазме клетки. Они реплицируются в дискретных цитоплазматических структурах, называемых вирусными фабриками, или виросомами. Эти структуры окружены мембранами эндоплазматического ретикулума, напоминая цитоплазматические “мини-ядра” [92].

При исследовании вируса VACV показано, что ингибиторы протеасомы предотвращают образование вирусных фабрик в цитоплазме перmissive клеток, что приводит к подавлению размножения вируса [93, 94]. Сделано заключение, что для нормального развития ортопоксвирусной инфекции необходима функционирующая убиквитин-протеасомная система.

Известно, что вирусные инфекции активируют клеточные антивирусные сигнальные и воспалительные ответы. Важную роль при этом играет ядерный фактор κ B (NF- κ B), который регулирует транскрипцию генов, вовлеченных в развитие иммунного ответа, воспаления, в апоптоз и пролиферацию клеток [95]. Активация NF- κ B контролируется анкирин(ankyrin)-подобными (ANK) белками семейства I κ B, которые взаимодействуют с ним. В неактивной форме NF- κ B (димер p65/p50) связан с ингибиторным белком I κ B α , который через шесть ANK-повторов взаимодействует с субъединицей p65. В ответ на молекулярные сигналы инфекции I κ B-киназа (IKK) фосфорилируется клеточной протеинкиназой и затем фосфорилирует I κ B α по остаткам серина в положениях 32 и 36. Фосфорилированный I κ B α полиубиквитинируется убиквитинлигазой по остатку лизина 48 и разрушается протеасомным комплексом 26S. В результате этого снимается ингибирование NF- κ B, этот фактор перемещается в ядро клетки и стимулирует транскрипцию генов через взаимодействие со специфичными последовательностями ДНК [96].

Разные штаммы вируса VACV ингибируют активацию клеточного транскрипционного фактора NF-κB, обеспечивая тем самым подавление развития воспалительных реакций. Оказалось, что высокоаттенуированный штамм VACV MVA не ингибирует активацию NF-κB. Рекомбинационное введение в состав генома MVA гена *K1L* из штамма WR VACV приводит к восстановлению свойства вируса подавлять активацию клеточного фактора NF-κB [95]. Полагают, что вирусный белок K1L, содержащий ANK-повторы, может угнетать деградацию клеточного IκBα, конкурируя с ним за фосфорилирование ферментом IKK и последующее убиквитинирование и деградацию.

В наших работах [26, 54, 97] показано, что ортопоксвирусы кодируют большой набор ANK белков. Это самое многочисленное семейство ортопоксвирусных белков, причем каждый вид имеет свой специфичный набор генов данного типа. Вирус CPXV, инфицирующий наиболее широкий круг животных, имеет в составе генома 14 уникальных ANK-генов, вирус MPXV – 8, а строго антропонозный вирус VARV – 5. Вирус VACV-COP кодирует пять ANK-белков и три из них соответствуют белкам вируса VARV.

При изучении гена *kelch* дрозофилы обнаружено, что он кодирует белок из 688 а.о., в С-концевой части которого шестикратно тандемно повторены элементы длиной около 50 а.о. [98]. Этот повтор получил название *kelch*-мотив, а блок этих повторов – *kelch*-домен. Оказалось, что, кроме того, *kelch*-белок в N-концевой части содержит ВТВ-домен [99]. Сравнение *kelch*-повторов и ВТВ-доменов по базам данных аминокислотных последовательностей показывает, что оба этих мотива древние и в процессе эволюции широко распространились среди разных типов организмов [100, 101]. Сформировано суперсемейство белков, содержащих *kelch*-повторы, которые участвуют в разных аспектах жизнедеятельности клеток, таких как изменения цитоскелета и плазматической мембраны, регулирование экспрессии генов, сплайсинг мРНК и другие.

При компьютерном анализе геномов ортопоксвирусов обнаружилось [102], что вирус CPXV кодирует шесть белков ВТВ-*kelch*-семейства длиной около 500 а.о., сходных по аминокислотной последовательности в интервале 22–26%. Вирус VACV кодирует только три полноразмерных *kelch*-подобных белка, высоко гомологичных соответствующим белкам вируса CPXV. В геноме вируса MPXV представлен единственный ген ВТВ-*kelch*-белка, а в геноме VARV все гены данного семейства не функционируют из-за множественных мутаций. Отсутствие генов этого семейства в разных изолятах вируса VARV и возможность их делетирования у VACV без потери

его жизнеспособности в культуре клеток [103] указывают на то, что эти гены не являются жизненно важными для ортопоксвирусов. По-видимому, все эти гены необходимы для проявления видоспецифичных свойств ортопоксвирусов в системе *in vivo*. Предполагают, что роль этих генов может быть адаптивной, т.е. обуславливающей круг хозяев (тканевой тропизм) и/или возможность персистенции вируса в организме животного [54]. Так, малопатогенный для человека и имеющий наиболее широкий круг чувствительных к нему животных вирус CPXV кодирует самый многочисленный набор ВТВ-*kelch*-белков [102, 104]. У вируса VARV, высокопатогенного для своего единственного хозяина – человека, в организме которого нет персистенции этого вируса, все гены ВТВ-*kelch*-подсемейства мутационно разрушены. Имеющиеся данные указывают на то, что различные ВТВ-*kelch*-белки являются субстрат-специфичными адапторами для Cul3-убиквитинлигазного комплекса и регулируют модификацию и/или деградацию различных белков [105].

Исследования последних лет показали, что многие из ANK-подобных белков ортопоксвирусов взаимодействуют с клеточной Cullin1-содержащей убиквитин-протеин-лигазой, а *kelch*-подобные белки ортопоксвирусов способны взаимодействовать с Cullin3-содержащей убиквитин-протеин-лигазой. По всей видимости, белки этих двух семейств участвуют в организации многофакторной, сложно организованной системы взаимодействий ортопоксвирусных белков между собой и с клеточными компонентами. Мы полагаем, что такие взаимодействия могут обеспечивать широкий спектр типов тканей и видов животных, чувствительных к CPXV, а также обуславливать шадящий режим отношений этого вируса с хозяином. Характерное для вируса VARV разрушение большинства генов белков этих двух семейств, вероятно, и явилось причиной резкого сужения круга хозяев и перехода его в режим “агрессора”. Подробнее гены этих семейств рассмотрены в обзоре [106].

Несомненно, необходимы дальнейшие исследования свойств *kelch*-подобных и ANK-подобных белков ортопоксвирусов, что позволит глубже понять закономерности взаимодействий этих вирусов как с зараженной клеткой, так и с организмом в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С эволюционной точки зрения наиболее приспособленным является вирус, который поддерживает баланс между патогенным воздействием на организм хозяина и возможностью продуктивного размножения вируса в организме в течение относительно длительного периода. Такой вирус способен эффек-

тивно передаваться от животного к животному в условиях невысокой плотности их популяции. Из ортопоксвирусов такие свойства наиболее ярко проявляет CPXV. Интересно отметить, что он кодирует полный набор обнаруженных у ортопоксвирусов иммуномодуляторных белков, а также kelch-подобных и ANK-подобных белков, в то время как вирусы VARV, MPXV и VACV обладают неполным набором этих генов, характерным для каждого вида ортопоксвирусов (таблица). Это, в частности, свидетельствует о том, что CPXV, по-видимому, эволюционно более древний, по сравнению с вирусами VARV, MPXV и VACV, которые эволюционировали после отделения от вируса-предшественника независимыми путями.

Суммируя, можно заключить, что VARV и другие ортопоксвирусы обладают беспрецедентно широким, по сравнению с вирусами других семейств, набором генов, белковые продукты которых эффективно модулируют многочисленные защитные функции организма хозяина (таблица). На примере ортопоксвирусов в ближайшее время можно будет проследить закономерности коэволюции вирусных факторов патогенности и защитных систем млекопитающих. Заслуживает пристального внимания направление исследований по использованию иммуномодуляторных белков ортопоксвирусов, и прежде всего VARV, в качестве лечебных препаратов [107].

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-00055 и 10-04-00387).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Щелкунов С.Н. 2003. Иммуномодуляторные белки ортопоксвирусов. *Молекуляр. биология*. **37**, 41–53.
- de Wit E., Fouchier R.A.M. 2008. Emerging influenza. *J. Clin. Virol.* **41**, 1–6.
- Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. 1998. *Патогенные для человека ортопоксвирусы*. М.: Товарищество научных изданий КМК, 386 с.
- Alcami A., Koszinowski U.H. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol. Today* **21**, 447–455.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. 2005. *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. Springer, Berlin, Heidelberg, N.Y.
- Lamkanfi M., Dixit V.M. 2009. The inflammasomes. *PLoS Pathogens*. **5**, e1000510
- Abdul-Sater A.A., Sand-Sadier N., Ojcius D.M., Yilmaz O., Kelly K.A. 2009. Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. *Drug Today*. **45**, 105–112.
- Pedra J.H., Cassel S.L., Sutterwala F. S. 2009. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 10–16.
- Netea M.G., Simon A., van de Veerdonk F., Kullberg B.J., van der Meer J.W., Joosten L.A. 2010. IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathogens*. **6**, e1000661.
- Друцкая М.С., Белоусов П.В., Недоспасов С.А. 2011. Врожденное распознавание вирусов. *Молекуляр. биология*. **45**, 00–00.
- Bowie A., Kiss-Toth E., Symons J.A., Smith G.L., Dower S.K., O'Neill L.A. 2000. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 10162–10166.
- Harte M.T., Haga I.R., Maloney G., Gray P., Reading P.C., Bartlett N.W., Smith G.L., Bowie A., O'Neill L.A. 2003. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J. Exp. Med.* **197**, 343–351.
- Stack J., Haga I.R., Schröder M., Bartlett N.W., Maloney G., Reading P.C., Fitzgerald K.A., Smith G.L., Bowie A.G. 2005. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J. Exp. Med.* **201**, 1007–1018.
- Maloney G., Schroder M., Bowie A.G. 2005. Vaccinia virus protein A52R activates p38 mitogen-activated protein kinase and potentiates lipopolysaccharide-induced interleukin-10. *J. Biol. Chem.* **280**, 30838–30844.
- Samuel C.E. 1991. Antiviral action of interferon. Interferon regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology*. **183**, 1–11.
- Varich N.L., Sychova I.V., Kaverin N.V., Antonova T.P., Chernos V.T. 1979. Transcription of both DNA strands of vaccinia virus genome *in vivo*. *Virology*. **96**, 412–430.
- Whitaker-Dowling P., Younger J.S. 1984. Characterization of a specific kinase inhibitory factor produced by vaccinia virus which inhibits the interferon-induced protein kinase. *Virology*. **137**, 171–181.
- Watson J.C., Chang H.-W., Jacobs B. 1991. Characterization of a vaccinia virus-encoded double-stranded RNA-binding protein that may be involved in inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Virology*. **185**, 206–216.
- Davies M.V., Chang H.-W., Jacobs B.L., Kaufman R.J. 1993. The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *J. Virol.* **67**, 1688–1692.
- Beattie E., Tartaglia J., Paoletti E. 1991. Vaccinia-virus encoded eIF-2 α homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology*. **183**, 419–422.
- Romano P.R., Zhang F., Tan S.L., Garcia-Barrio M.T., Katze M.G., Dever T.E., Hinnebusch A.G. 1998. Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7304–7316.
- Brandt T.A., Jacobs B.L. 2001. Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *J. Virol.* **75**, 850–856.
- Chang H.-W., Watson J.C., Jacobs B.L. 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the inter-

- feron-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 4825–4829.
24. Rivas C., Gil J., Melkova Z., Esteban M., Diaz-Guerra M. 1998. Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (IFN)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology*. **243**, 406–414.
25. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Babkin I.V., et al. 2001. Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison. *FEBS Lett.* **509**, 66–70.
26. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Safronov P.F., et al. 2002. Analysis of the monkeypox virus genome. *Virology*. **297**, 172–194.
27. Alcamí A., Smith G.L. 1995. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J. Virol.* **69**, 4633–4639.
28. Symons J.A., Alcamí A., Smith G.L. 1995. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell*. **81**, 551–560.
29. Kerr J.F., Wyllie A.N., Currie A.R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. **26**, 239–257.
30. Hilleman M.R. 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 14560–14566.
31. Domingo-Gil E., Esteban M. 2006. Role of mitochondria in apoptosis induced by the 2-5A system and mechanisms involved. *Apoptosis*. **11**, 725–738.
32. Macen J., Takahashi A., Moon K.B., Nathaniel R., Turner P.C., Moyer R.W. 1998. Activation of caspases in pig kidney cells infected with wild-type and CrmA/SPI-2 mutants of cowpox and rabbitpox viruses. *J. Virol.* **72**, 3524–3533.
33. Seet B.T., Johnston J.B., Brunetti C.R., Barrett J.W., Everett H., Cameron C., Sypula J., Nazarian S.H., Lucas A., McFadden G. 2003. Poxvirus and immune evasion. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 377–423.
34. Shchelkunov S.N. 2001. Species-specific differences in organization of molecular virulence factors of variola, cowpox, and vaccinia virus. *Infect. Dis. Rev. Suppl.* **3**, 16–25.
35. Luttge B.G., Moyer R.W. 2005. Suppressors of a host range mutation in the rabbitpox virus serpin SPI-1 map to proteins essential for viral DNA replication. *J. Virol.* **79**, 9168–9179.
36. Taylor J.M., Quilty D., Banadyga L., Barry M. 2006. The vaccinia virus protein F1L interacts with Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax. *J. Biol. Chem.* **281**, 39728–39739.
37. Postigo A., Martin M.C., Dodding M.P., Way M. 2009. Vaccinia-induced epidermal growth factor receptor-MEK signalling and the anti-apoptotic protein F1L synergize to suppress cell death during infection. *Cell Microbiol.* **11**, 1208–1218.
38. Zhai D., Yu E., Jin C., Welsh K., Shiao C.W., Chen L., Salvesen G.S., Liddington R., Reed J.C. 2010. Vaccinia virus protein F1L is a caspase-9 inhibitor. *J. Biol. Chem.* **285**, 5569–5580.
39. Aoyagi M., Zhai D., Jin C., Aleshin A.E., Stec B., Reed J.C., Liddington R.C. 2007. Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein Sci.* **16**, 118–124.
40. Gubser C., Bergamaschi D., Hollishead M., Lu X., van Kuppeveld F.J.M., Smith G.L. 2007. A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathogens*. **3**, e17.
41. Zhang P., Langland J.O., Jacobs B.L., Samuel C.E. 2009. Protein kinase PKR-dependent activation of mitogen-activated protein kinases occurs through mitochondrial adapter IPS-1 and is antagonized by vaccinia virus E3L. *J. Virol.* **83**, 5718–5725.
42. Senkevich T.G., Koonin E.V., Buller M.I. 1994. A poxvirus protein with RING zinc finger motif is of crucial importance for virulence. *Virology*. **198**, 118–128.
43. Senkevich T.G., Wolffer E.J., Buller M.I. 1995. Ectromelia virus RING finger protein is localized in virus factories and is required for virus replication in macrophages. *J. Virol.* **69**, 4103–4111.
44. Huang J., Huang Q., Zhou X., et al. 2004. The poxvirus p28 virulence factor is an E3 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **279**, 54110–54116.
45. Palumbo G.J., Pickup D.J., Frederickson T.N., McIntyre L.J., Buller R.M.L. 1989. Inhibition of an inflammatory response is mediated by 38-kDa protein of cowpox virus. *Virology*. **172**, 262–273.
46. Palumbo G.L., Glasgow W.C., Buller R.M.L. 1993. Poxvirus-induced alteration of arachidonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 2020–2024.
47. Alcamí A., Smith G.L. 1992. A soluble receptor for interleukin-1beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of viral modulation of the host response to infection. *Cell*. **71**, 153–167.
48. Alcamí A., Smith G.L. 1996. A mechanism for the inhibition of fever by a virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 11029–11034.
49. Alcamí A., Smith G.L. 1992. A soluble receptor for interleukin-1beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of viral modulation of the host response to infection. *Cell*. **71**, 153–167.
50. Born T.L., Morrison L.A., Esteban D.J., VandenBos T., Thebeau L.G., Chen N., Spriggs M.K., Sims J.E., Buller R.M.L. 2000. A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *J. Immunol.* **164**, 3246–3254.
51. Tracey K.J., Cerami A. 1994. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann. Rev. Med.* **45**, 491–503.
52. Shchelkunov S.N., Blinov V.M., Sandakhchiev L.S. 1993. Genes of variola and vaccinia viruses necessary to overcome the host protective mechanisms. *FEBS Lett.* **319**, 80–83.
53. Блинов В.М., Щелкунов С.Н., Сандакчиев Л.С. 1993. Возможный молекулярный фактор, обуславливающий генерализацию инфекции вирусом натуральной оспы. *Докл. Акад. Наук.* **328**, 109–111.
54. Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V., Kotwal G.J. 1998. The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus

- strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology*. **243**, 432–460.
55. Upton C., Macen J.L., Schreiber M., McFadden G. 1991. Мухома вирус expresses secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology*. **184**, 370–382.
 56. Smith C.A., Hu F.-Q., Smith T.D., Richards C.L., Smolak P., Goodwin R.G., Pickup D.J. 1996. Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not Lt. *Virology*. **223**, 132–147.
 57. Loparev V.N., Parsons J.M., Knight J.C., Panus J.F., Ray C.A., Buller R.M., Pickup D.J., Esposito J.J. 1998. A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 3786–3791.
 58. Saravia M., Alcamí A. 2001. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J. Virol.* **75**, 226–233.
 59. Гилева И.П., Рязанкин И.А., Максюттов З.А., Тотменин А.В., Лебедев Л.Р., Нестеров А.Е., Агеенко В.А., Щелкунов С.Н., Сандахчиев Л.С. 2003. Сравнительное изучение свойств ортопоксвирусных растворимых рецепторов фактора некроза опухолей. *Докл. РАН*. **290**, 688–692.
 60. Гилева И.П., Рязанкин И.А., Непомнящих Т.С., Тотменин А.В., Максюттов З.А., Лебедев Л.Р., Афиногенова Г.Н., Пустошилова Н.М., Щелкунов С.Н. 2005. Экспрессия генов TNF-связывающих белков ортопоксвирусов в клетках насекомых и изучение свойств рекомбинантных белков. *Молекуляр. биология*. **39**, 245–254.
 61. Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Lebedev L.R., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.V., Shchelkunov S.N. 2006. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different. *Biochim. Biophys. Acta*. **1764**, 1710–1718.
 62. Alejo A., Ruiz-Arguello M.B., Ho Y., Smith V.P., Saraiva M., Alcamí A. 2006. A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 5995–6000.
 63. Rollins B.J. 1997. Chemokines. *Blood*. **90**, 909–928.
 64. Patel A.H., Gaffney D.F., Subak-Sharpe J.H., Stow N.D. 1990. DNA sequence of the gene encoding a major secreted protein of vaccinia virus, strain Lister. *J. Gen. Virol.* **71**, 2013–2021.
 65. Smith C.A., Smith T.D., Smolak P.J., et al. 1997. Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits β chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology*. **236**, 316–327.
 66. Bahar M.W., Kenyon J.C., Putz M.M., Abrescia N.G., Pease J.E., Wise E.L., Stuart D.I., Smith G.L., Grimes J.M. 2008. Structure and function of A41, a vaccinia virus chemokine binding protein. *PLoS Pathogens*. **4**, e5.
 67. Ruiz-Arguello M.B., Smith V.P., Campanella G.S., Baleux F., Arenzana-Seisdedos F., Luster A.D., Alcamí A. 2008. An ectromelia virus protein that interacts with chemokines through their glycosaminoglycan binding domain. *J. Virol.* **82**, 917–926.
 68. Seregin S.V., Babkina I.N., Nesterov A.E., Sinyakov A.N., Shchelkunov S.N. 1996. Comparative studies of gamma-interferon receptor-like proteins of variola major and variola minor viruses. *FEBS Lett.* **382**, 79–83.
 69. Upton C., Mossman K., McFadden G. 1992. Encoding of a homolog of IFN- β receptor by myxoma virus. *Science*. **258**, 1369–1372.
 70. Mossman K., Upton C., Buller R.M., McFadden G. 1995. Species specificity of ectromelia virus and vaccinia virus interferon-gamma binding proteins. *Virology*. **208**, 762–769.
 71. Kotwal G.J., Moss B. 1988. Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature*. **335**, 176–178.
 72. Kotwal G.J. 1996. The great escape – immune evasion by pathogens. *Immunologist*. **4**, 157–164.
 73. Liszewski M.K., Atkinson J.P. 1998. *The human complement system in health and disease*. Eds Volanakis J.E., Frank M.M. N.Y.-Basel-Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., pp. 149–165.
 74. Kirkitadze M.D., Henderson C., Price N.C., Kelly S.M., Mullin N.P., Parkinson J., Dryden D.T.F., Barlow P.N. 1999. Central modules of the vaccinia virus complement control protein are not in extensive contact. *Biochem. J.* **344**, 167–175.
 75. Smith S.A., Mullin N.P., Parkinson J., et al. 2000. Conserved surface-exposed K/R-X-K/R motifs and net positive charge on poxvirus complement control proteins serve as putative heparin binding sites and contribute to inhibition of molecular interactions with human endothelial cells: a novel mechanism for evasion of host defense. *J. Virol.* **74**, 5659–5666.
 76. Miller C.G., Shchelkunov S.N., Kotwal G.J. 1997. The cowpox virus-encoded homolog of the vaccinia virus complement control protein is an inflammation modulatory protein. *Virology*. **229**, 126–133.
 77. Howard J., Justus D.E., Totmenin A.V., Shchelkunov S.N., Kotwal G.J. 1998. Molecular mimicry of the inflammation modulatory proteins (IMPs) of poxviruses: evasion of the inflammatory response to preserve viral habitat. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 68–71.
 78. Rosengard A.M., Liu Y., Nie Z., Jimenez R. 2002. Variola virus immune evasion design: expression of a highly efficient inhibitor of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 8808–8813.
 79. Uvarova E.A., Shchelkunov S.N. 2001. Species-specific differences in the structure of orthopoxvirus complement-binding protein. *Virus Res.* **81**, 39–45.
 80. Jonjic S., Babic M., Polic B., Krmpotic A. 2008. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 30–38.
 81. Buller R.M.L., Palumbo G.J. 1991. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol. Rev.* **55**, 80–122.
 82. Campbell J.A., Trossman D.S., Yokoyama W.M., Carayannopoulos L.N. 2007. Zoonotic orthopoxviruses encode a high-affinity antagonist of NKG2D. *J. Exp. Med.* **204**, 1311–1317.
 83. Okamura H., Tsutsui H., Kashiwamura S., Yoshimoto T., Nakanishi K. 1998. Interleukin-18: a novel cytokine

- that augments both innate and acquired immunity. *Adv. Immunol.* **70**, 281–289.
84. Spriggs M.K. 1996. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 101–130.
85. Demkowitz W.E., Ennis F.A. 1993. Vaccinia virus-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in humans. *J. Virol.* **67**, 1538–1544.
86. Ciechanover A. 2006. Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Exp. Biol. Med.* **231**, 1197–1211.
87. Bosu D.R., Kipreos E. 2008. Cullin-RING ubiquitin ligase: global regulation and activation cycles. *Cell Division.* **3**, 7.
88. Hochstrasser M. 2009. Origin and function of ubiquitin-like protein. *Nature.* **458**, 422–429.
89. Gao G., Luo H. 2006. The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**, 5–14.
90. Lindner H.A. 2007. Deubiquitination in virus infection. *Virology.* **362**, 245–256.
91. Blanchette P., Branton P.E. 2009. Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway by small DNA tumor viruses. *Virology.* **384**, 317–323.
92. Tolonen N., Doglio L., Shleich S., Locker J.K. 2001. Vaccinia virus DNA-replication occurs in ER-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 2031–2046.
93. Teale A., Cambell S., Buuren N.V., Magee W.C., Watmough K., Couturier B., Shipclark R., Barry M. 2009. Orthopoxviruses require a functional ubiquitin-proteasome system for productive replication. *J. Virol.* **83**, 2099–2108.
94. Satheshkumar P.S., Anton L.C., Sanz P., Moss B. 2009. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system prevents vaccinia virus DNA replication and expression of intermediate and late genes. *J. Virol.* **83**, 2469–2479.
95. Shisler J.L., Jin X.-L. 2004. The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF- κ B activation by preventing I κ B α degradation. *J. Virol.* **78**, 3553–3560.
96. Chang S.-J., Hsiao J.-C., Sonnberg S., Chiang C.-T., Yang M.-H., Tzou D.-L., Mercer A.A., Chang W. 2009. Poxvirus host range protein CP77 contains an F-box-like domain that is necessary to suppress NF- κ B activation by tumor necrosis factor alpha but is independent of its host range function. *J. Virol.* **83**, 4140–4152.
97. Shchelkunov S.N., Blinov V.M., Sandakhchiev L.S. 1993. Ankyrin-like proteins of variola and vaccinia viruses. *FEBS Lett.* **319**, 163–165.
98. Xue F., Cooley L. 1993. Kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell.* **72**, 681–693.
99. Bork P., Doolittle R.F. 1994. *Drosophila* kelch motif is derived from a common enzyme fold. *J. Mol. Biol.* **236**, 1277–1282.
100. Adams J., Kelso R., Cooley L. 2000. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell. Biol.* **10**, 17–24.
101. Ahmad K.F., Engel C.K., Prive G.G. 1998. Crystal structure of the BTB domain from PZLF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 12123–12128.
102. Shchelkunov S., Totmenin A., Kolosova I. 2002. Species-specific differences in organization of orthopoxvirus kelch-like proteins. *Virus Genes.* **24**, 157–162.
103. Perkus M.E., Goebel S.J., Davis S.W., Johnson G.P., Norton E.K., Paoletti E. 1991. Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology.* **180**, 406–410.
104. Kochneva G., Kolosova I., Maksyutova T., Ryabchikova E., Shchelkunov S. 2005. Effects of deletions of kelch-like genes on cowpox virus biological properties. *Arch. Virol.* **150**, 1857–1870.
105. Wilton B.A., Campbell S., van Buuren N., Garneau R., Furukawa M., Xiong Y., Barry M. 2008. Ectromelia virus BTB/kelch proteins, EVM150 and EVM167, interact with cullin-3 based ubiquitin ligases. *Virology.* **374**, 82–99.
106. Shchelkunov S.N. 2010. Interaction of orthopoxviruses with the cellular ubiquitin-ligase system. *Virus Genes.* **41**, 309–318.
107. Непомнящих Т.С., Щелкунов С.Н. 2008. Иммуномодулирующие белки поксвирусов как новые средства иммунокорректирующей терапии. *Молекуляр. биология.* **42**, 904–912.