



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.233.44:577.112.853

ГЛИКОПРОТЕИНЫ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ

Деревицкая В. А.

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Обобщены данные по структуре и биосинтезу гликопротеинов — главных антигенов оболочечных вирусов. Рассмотрены методы избирательной солюбилизации и характеристики индивидуальности гликопротеинов, структура их полипептидного компонента и олигосахаридных фрагментов и методы ее установления. Изложены современные представления о механизме биосинтеза гликопротеинов, углеводные цепи которых связаны с пептидным скелетом N-гликозидной связью. Обсуждаются данные о биологической роли углеводных цепей гликопротеинов такого типа.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

I. Биосинтез гликопротеинов

- I.1. Синтез олигосахаридного блока на долипидфосфате
- I.2. Перенос олигосахаридного блока с липида на остатки аспарагина полипептидной цепи
- I.3. Трансформация олигосахаридных блоков-предшественников в комплексные (типа А) или маннозообогащенные (типа В) цепи гликопротеина
- I.4. Избирательное протеолитическое расщепление и ацилирование полипептидной цепи синтезированных гликопротеинов

II. Структура гликопротеинов вирусов

- II.1. Семейство ортомиксовирусов (*Orthomyxoviridae*)
- II.2. Семейство парамиксовирусов (*Paramyxoviridae*)
- II.3. Семейство тогавирусов (*Togaviridae*)
- II.4. Семейство рабдовирусов (*Rhabdoviridae*)
- II.5. Семейство коронавирусов (*Coronaviridae*)

Заключение

Введение

Оболочечные вирусы, относящиеся к различным семействам и родам, но объединенные общим принципом построения, являются очень важными патогенами для человека и животных. Это пара- и ортомиксовирусы, тга- и рабдовирусы, коронавирусы и др.

Всестороннее изучение оболочечных вирусов и отдельных их компонентов представляет интерес в различных аспектах. Прежде всего это необходимо для понимания механизма взаимодействия вирус — клетка, для выяснения роли каждого из компонентов вируса в процессах инфицирования клетки и репликации вируса, в его антигенности и изменчивости. Кроме того, эти вирусы являются простой моделью для изучения клеточной мембраны, удобство которой состоит в доступности и возможности получения исходного материала в чистом виде.

Исследование вирусов этого типа и особенно гликопротеинов, являющихся их антигенами, представляет также и практический интерес, так как должно способствовать созданию высококачественных гликопротеиновых вакцин, не имеющих противопоказаний, собственных цельновирионным вакцинам.

Гликопротеины играют большую роль во взаимодействии вируса с клеткой хозяина: они ответственны за адсорбцию вируса на поверхности клетки, гемолиз клеточной мембраны и слияние ее с оболочкой вируса, проникновение внутрь клетки и, следовательно, за инфицирование организма.

Изучению гликопротеинов вирусов посвящено большое число работ, имеется несколько обзоров и книг (например, [1—8]). В настоящем обзоре будут рассмотрены только те вирусы, изучение гликопротеинов которых продвинулось достаточно далеко; при этом в основном будут использованы публикации последних лет.

Все РНК-содержащие оболочечные вирусы, хотя и различаются по структуре, построены по одной схеме. Они содержат двухслойную липидную оболочку, во внешнюю поверхность которой встроены антигенные гликопротеины в виде отдельных шипов длиной 7—14 нм. Большинство оболочечных вирусов содержат два типа гликопротеинов и соответственно на поверхности липидного бислоя имеются шипы двух видов: шип определенного вида включает несколько молекул одного из гликопротеинов.

На внутренней поверхности липидного бислоя расположен так называемый мембранный, или матриксный, белок (М), который создает под липидной оболочкой каркасный слой толщиной 4—6 нм. Во внутренней части вириона находится нуклеокапсид, включающий в себя нуклеопротеид, а также фермент — полимеразу (Р). Нуклеопротеид, как правило, представляет собой одноцепочечную РНК, к которой присоединен полипептид NP. В некоторых случаях РНК может состоять из нескольких фрагментов, как, например, в ортомиксовирусах [8]. Гликопротеины различных вирусов различаются по структуре как пептидной цепи, так и углеводных фрагментов, но содержат при этом примерно одинаковый набор аминокислот и углеводов. В состав углеводов, содержание которых в гликопротеинах колеблется от 20 до 40%, входят N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактоза (Gal), манноза (Man), фукоза (Fuc) в различных соотношениях и сочетаниях и в некоторых случаях N-ацетилнейраминавая кислота (NeuAc).

Имеющиеся данные [9] свидетельствуют о том, что геном вируса кодирует синтез белков и полипептидной части гликопротеинов, а липиды формируются из плазматической мембраны инфицированной клетки при отпочковывании вируса. Считается также, что вирусы не имеют своего аппарата для биосинтеза углеводных фрагментов гликопротеинов и липидов и, следовательно, структура углеводов вируса должна определяться ферментной системой клетки-хозяина [9]. Однако данные, касающиеся этого вопроса, противоречивы. Существует также мнение, что вирус может определенным образом трансформировать гликозилтрансферазы клетки [10—12]. Этот вопрос может быть решен только путем сопоставления механизма биосинтеза и первичной структуры углеводных цепей гликопротеинов вирусов и клетки хозяина.

1. Биосинтез гликопротеинов

Биосинтез вирусных гликопротеинов — сложный многоступенчатый процесс, включающий в себя помимо стадий синтеза белка и его гликозилирования также избирательное протеолитическое расщепление и ацилирование синтезированных полипептидов.

Полипептидные цепи гликопротеинов синтезируются на мембранах шероховатого ретикулума по хорошо известному механизму [13—19], который здесь не обсуждается. Гликозилирование также начинается на мембранах шероховатого ретикулума. Углеводные цепи гликопротеинов вирусов, как правило, связаны с пептидным скелетом N-гликозидной связью (см., например, [20]). Известно, что гликозилирование в таком случае протекает путем переноса липидным переносчиком олигосахаридного блока на остатки аспарагина пептидной цепи [21—23]. На примере вируса везикулярного стоматита [24—29], вирусов гриппа [30] и Синдбис [12, 31, 32], а также других вирусов показано, что гликозилирование вирусных гликопротеинов протекает по аналогичному механизму. Процесс N-гликозилирования полипептидов достаточно хорошо изучен. Показано, что он складывается из трех основных стадий:

1) ступенчатый синтез олигосахаридного блока-предшественника на липидном носителе — долихолфосфате (DolP);

2) перенос олигосахаридного блока-предшественника на остаток аспарагина пептидной цепи;

3) трансформация олигосахаридного блока-предшественника в комплексные или маннозообогащенные цепи гликопротеинов, которые принято называть цепями типа *A* и *B* соответственно [33].

1.1. Синтез олигосахаридного блока на долихолфосфате

Первая стадия — биосинтез олигосахаридного блока на долихолфосфате протекает на мембранах шероховатого ретикулума и начинается с переноса N-ацетилглюкозаминилфосфата соответствующим ферментом α -N-

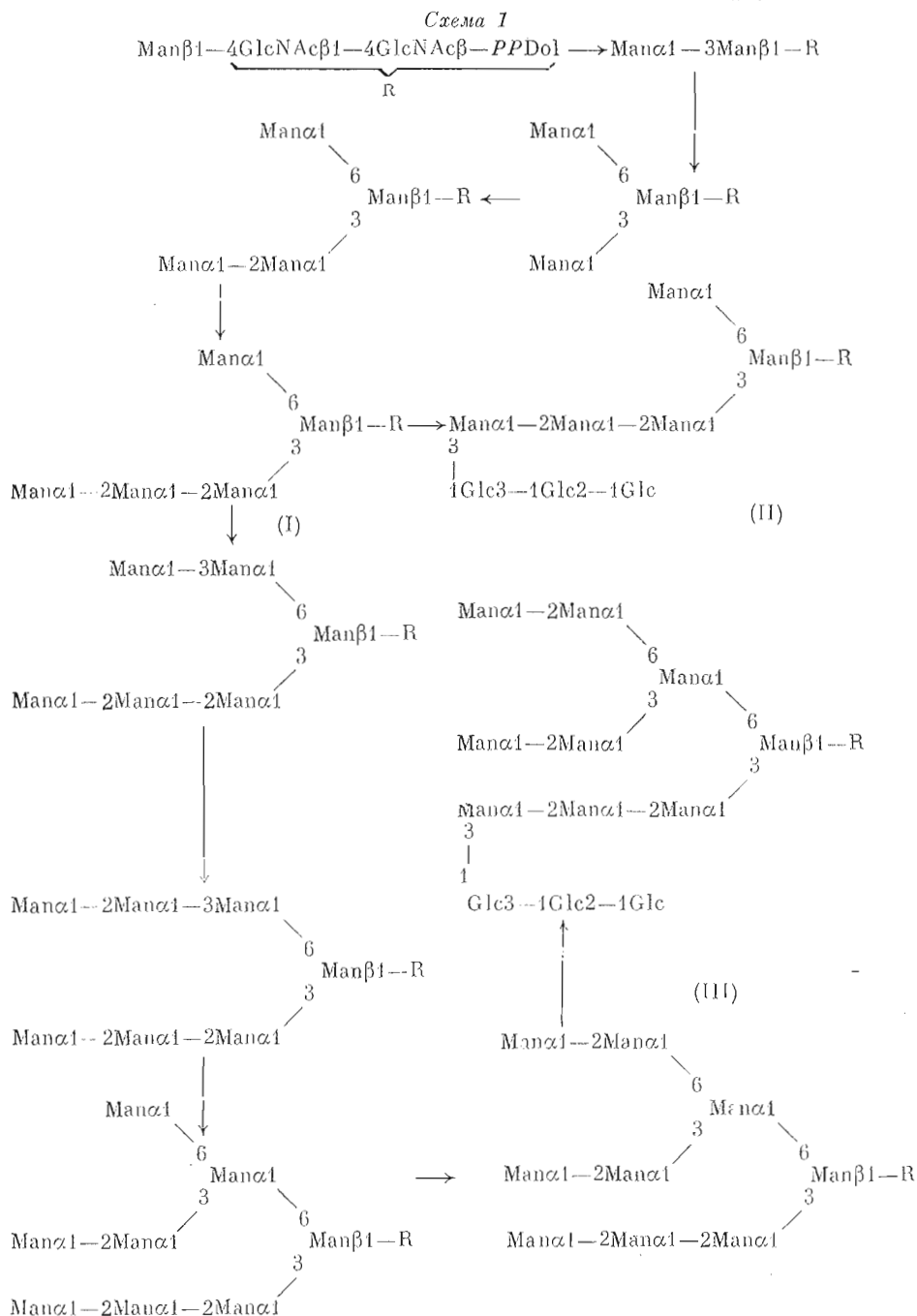


Схема биосинтеза на долихолфосфате олигосахаридного блока-предшественника углеводных фрагментов гликопротеинов, связанных с пептидным скелетом N-гликозидной связью

ацетилглюкозаминилфосфаттрансферазой с UDP-GlcNAc на долихолфосфат:



Затем с помощью β -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы присоединяется второй остаток N-ацетилглюкозамина, после чего посредством β -маннозилтрансферазы присоединяется манноза и формируется стержневой трисахарид $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$. Далее в определенном порядке [34—36] нарастают остатки α -маннозы и глюкозы (схема 1), причем в этом случае гликозилтрансферазы переносят остатки маннозы как с GDP-Man, так и с DolPMan. При этом замещение остатков маннозы, являющихся точками разветвления синтезируемых олигосахаридов, всегда протекает сначала у C3, а затем у C6.

В настоящее время из мембран различных клеток, в том числе клеток, инфицированных вирусами, выделены долихолдифосфатолигосахариды — предшественники олигосахаридных цепей гликопротеинов [24, 27, 34, 37—39] с общей формулой $(\text{Glc})_3(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2\text{—PPDol}$ и структурой (III) (схема 1) и с общей формулой $(\text{Glc})_3(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2\text{—PPDol}$ со структурой (II) (схема 1). В то же время выделен долихолдифосфатолигосахарид с общей формулой $(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2\text{—PPDol}$ и структурой (I) (схема 1) [33, 36, 40] и целый ряд промежуточных продуктов биосинтеза олигосахаридного блока, связанного с долихолдифосфатом [31, 34—36].

Возможно, что липидсвязанный олигосахарид (I) (схема 1) является промежуточным продуктом и затем может превращаться в соединения (III) или (II). И тот и другой путь превращения олигомера (I) кажется вероятным. Более того, высказано предположение [38], что присоединение к долихолдифосфатолигосахариду остатков глюкозы служит сигналом для переноса олигосахаида на пептидную цепь. Путем исследования кинетики трансклизирования полипептидов *in vitro* с помощью липидпереносчика, содержащего олигосахаридные блоки со структурой (III) и (I), показано, что скорость переноса олигосахаида, содержащего глюкозу, в 8—9 раз выше, чем скорость переноса олигосахаидов, лишенных глюкозы. Таким образом, мало вероятно, что олигосахаридные блоки, не содержащие глюкозу, используются при биосинтезе *in vivo*.

1.2. Перенос олигосахаридного блока с липида на остатки аспарагина полипептидной цепи

Стадия гликозидирования полипептидной цепи протекает также на мембранах шероховатого ретикулума и осуществляется с помощью аспарагин-N-гликозилтрансферазы [41]. При этом гликозилирование начинается после того, как синтезирован N-концевой, так называемый «сигнальный» участок пептидной цепи [42—44], который включается в мембрану. Для гликопротеина G вируса везикулярного стоматита определена последовательность такого «сигнального» участка пептидной цепи, состоящего из 16 остатков аминокислот, 75% которых гидрофобны [45]. Дальнейший синтез полипептидной цепи гликопротеина и ее гликозилирование протекают параллельно [16, 45, 46]. Доказательством взаимозависимости этих процессов служит, например, тот факт, что в клетках с частично ингибированным с помощью актиномицина синтезом полипептидов скорость синтеза липидсвязанных олигосахаридных блоков снижается и оказывается пропорциональной скорости синтеза белка. N-Концевой «сигнальный» участок полипептидной цепи постепенно, по мере передвижения ее к мембранам гладкого ретикулума и затем в аппарат Гольджи, отщепляется соответствующими протеолитическими ферментами клетки.

Перенос олигосахаридного блока на остаток аспарагина пептидной цепи возможен только в том случае, если он входит в состав триплетта Asn-X-Ser (Thr) [47]. Показано, что минимальным пептидом, содержащим триплет, который может гликозилироваться *in vitro*, является гексапептид [48, 49]. Оксиминокислоте в этом триплете отводится важная роль как в процессе распознавания ферментом сайта гликозилирования, так и в катализе реакции гликозилирования [47—52].

По предлагаемой схеме образуется водородная связь между амидной группой аспарагина и гидроксильной группой оксиаминокислоты [51, 53] (схема 2). Это приводит к увеличению нуклеофильности атома азота, что облегчает N-гликозилирование аспарагина.

Образование водородной связи подтверждается экспериментальными данными [51], полученными при исследовании синтетических гексапептидов с общей формулой Tyr-Asn-Gly-Y-Ser-Val, где Y=Thr, Ser, Cys, Val, Thr(OCH₃). Гликозилирование проводилось радиоактивной долихолдифос-

Схема 2

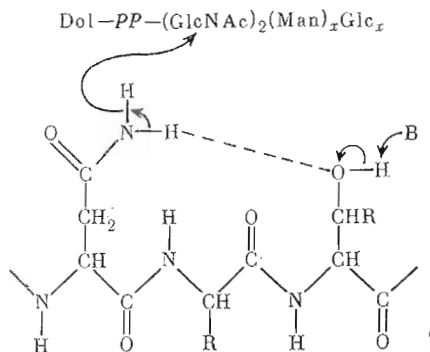


Схема образования водородной связи между β-окси-α-аминокислотой и аспарагином в триплете при N-гликозилировании аспарагина. В — основная группа фермента

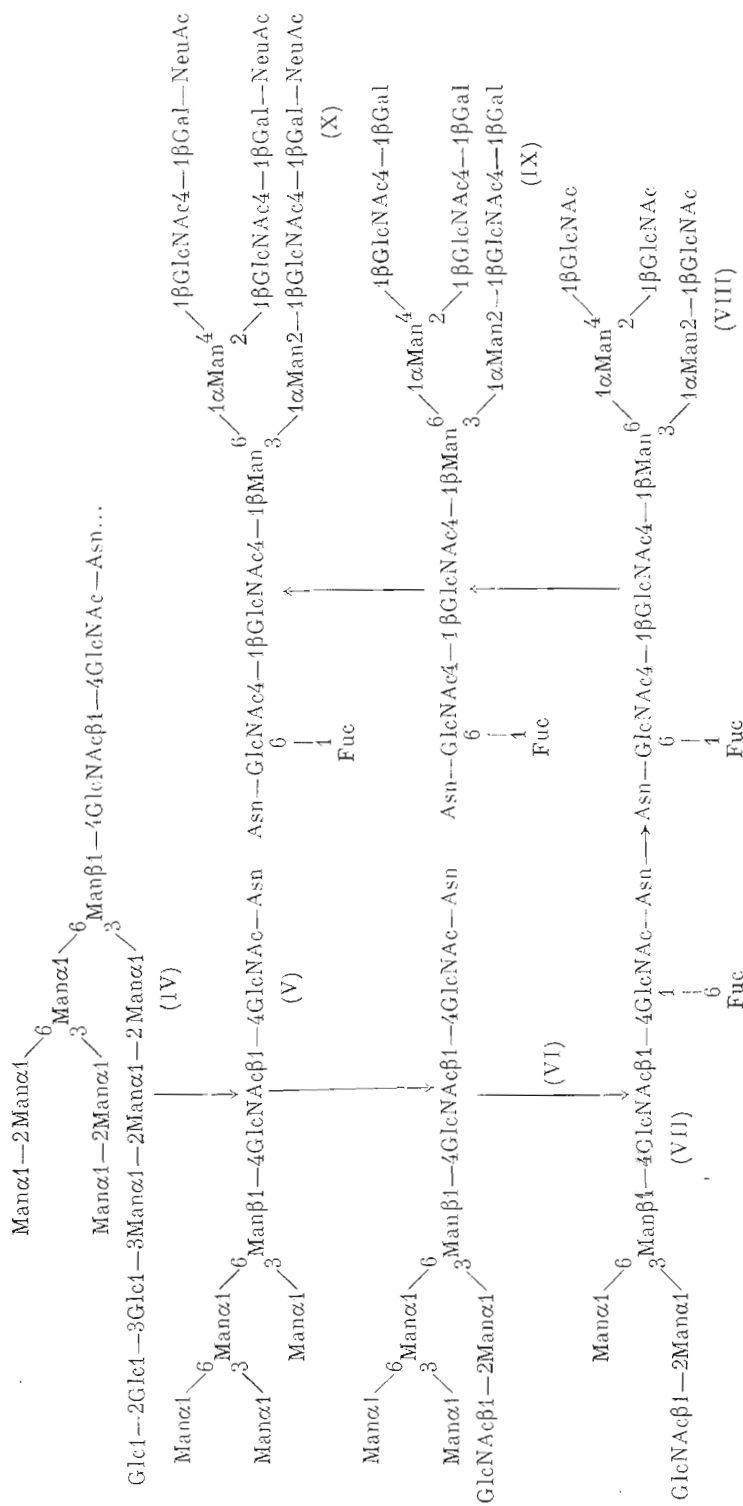
фатхитобиозой [¹⁴C]GlcNAcβ1-4GlcNAc—PPDol, в качестве препарата фермента использовалась микросомная фракция печени теленка. При этом показано, что при отсутствии в триплете оксиаминокислоты со свободной гидроксильной (тиольной) группой, когда Y=Val или Thr(OCH₃), гликозилирование не идет. В других случаях скорость гликозилирования находится в прямой зависимости от активности аминокислоты Y как акцептора для образования водородной связи. Скорость трансгликозилирования пептидов с изменением Y возрастала в ряду Thr>Ser>Cys.

В связи с вышеизложенным становится более понятной закономерность, найденная ранее при исследовании гликозилирования синтетических пептидов [48], а также при анализе многочисленных гликопротеинов [54]: триплеты Asn-X-Ser, в которых X=Pro, остаются негликозилированными. Известно, что остаток пролина является очень жесткой связкой между соседними аминокислотами [55] и, следовательно, может препятствовать образованию водородной связи между оксиаминокислотой и аспарагином в триплете. Имеются также данные, что остаток аспарагина, входящий в состав триплета, где X=Asp [52], также не гликозилируется, что можно объяснить конкуренцией карбоксильной группы аспарагиновой кислоты и амидной группировки аспарагина в образовании водородной связи.

Возникает вопрос: почему во многих гликопротеинах животного происхождения аспарагинсодержащие триплеты полипептидной цепи, которые потенциально могут гликозилироваться, использованы в процессе биосинтеза не полностью [52] или вовсе не использованы [56]. Удивительно, например, что панкреатические рибонуклеазы А и В при одинаковой последовательности аминокислот и соответственно одинаковом расположении сайтов гликозилирования, резко различны в этом плане — одна из них (рибонуклеаза В) гликозилирована, а другая (рибонуклеаза А) не содержит углеводов [56].

В настоящее время на основании исследования конформации участков пептидных цепей, включающих сайты N-гликозилирования, высказано предположение, что гликозилируются главным образом сайты, расположенные в области β-структуры пептидной цепи [57—59]. При этом отмечается, что остатки аспарагина, серина и треонина — основные компоненты триплетов — редко встречаются в области α-спирали [57, 58].

Схема 3



Последовательность, трансформации олигосахаридных блоков-предшественников в комплексы углеводные фрагменты гликопротеинов типа 4

Недавно путем анализа структуры гемагглютини́на вируса гриппа [60] и иммуноглобулина G [61] с помощью рентгеноструктурного анализа высокого разрешения (2—3 Å) показано, что углеводные цепи этих гликопротеинов расположены исключительно в участках пептидной цепи, не включенных в α - и β -структуры. Это главным образом петли пептидных цепей, соединяющие отдельные элементы β -структуры.

Таким образом, наличие в полипептидной цепи триплета Asn-X-Ser(Thr) является необходимым, но не достаточным требованием для ее N-гликозилирования. Гликозилируемые сайты, по-видимому, должны быть расположены в области β -структуры пептидной цепи, причем не на элементах этой структуры, а на связках между ними. Гликозилирование затруднено либо совсем невозможно, если в триплете X=Pro или Asp.

1.3. Трансформация олигосахаридных блоков-предшественников в комплексные (типа А) или маннозообогатенные (типа В) цепи гликопротеинов

Эта стадия биосинтеза протекает в аппарате Гольджи. Механизм трансформации олигосахаридов-предшественников в комплексные цепи А гликопротеинов достаточно хорошо изучен [24—28, 30]. Первоначально от олигосахарида-предшественника (IV) (схема 3) отщепляются остатки глюкозы и остатки маннозы, соединенные 1→2-связями. Далее на остаток маннозы 1→3-ветви переносится с помощью N-ацетилглюкозаминилтрансферазы остаток N-ацетилглюкозамина (см. соединение (VI)), что служит сигналом для соответствующих α -маннозидаз, которые снимают два остатка маннозы с ветви 1→6 (см. (VII)). На освободившийся при этом остаток маннозы также переносится один или два остатка N-ацетилглюкозамина (см. (VIII)). Затем на остатки N-ацетилглюкозамина с помощью галактозилтрансфераз переносится галактоза, которая далее может спалироваться (см. (IX), (X)).

Довольно часто в олигосахаридах такого типа остаток N-ацетилглюкозамина, связанный с аспарагином, замещен по C6 фукозой. Интересно, что фукозилтрансфераза может перенести фукозу на остаток упомянутого N-ацетилглюкозамина на любой стадии биосинтеза олигосахаридов типа А, но только после того, как манноза на ветви 1→3 будет замещена N-ацетилглюкозамином (схема 3, соединения (VII)—(X)) [62, 63], т. е. когда начнется формирование олигосахаридных цепей комплексного типа. Именно поэтому олигосахаридные цепи типа В в гликопротеинах никогда не содержат фукозу.

До сих пор остается невыясненным, выполняют ли маннозообогатенные цепи какие-то определенные функции в молекуле гликопротеина и предопределены структурой его молекулы или являются продуктом незаконченного биосинтеза комплексных углеводных цепей. Имеются сведения, что маннозообогатенные цепи участвуют в межклеточных взаимодействиях [64, 65], однако окончательно это еще не доказано. Неизвестно также, какие факторы влияют на гликозилирование белков и определяют число и тип углеводных фрагментов.

На основании анализа последовательности аминокислот трипептидов Asp-X-Ser(Thr) ряда гликопротеинов высказано предположение [54], что природа аминокислоты X определяет тип углеводной цепи, связанной с остатком аспарагина. Остаток аспарагина, если X — полярная аминокислота (Ser, Glu, Lys, Thr), несет цепи типа А, если X — неполярная аминокислота (Met, Leu, Ala), несет цепь типа В. При этом выдвинута гипотеза о том, что боковые группы неполярных аминокислот экспонированы внутрь молекулы гликопротеина, вследствие чего олигосахаридные цепи типа В могут быть менее доступны для взаимодействия с ферментами, осуществляющими их трансформацию в цепи типа А [54]. Однако данные, полученные при изучении последовательности аминокислот главного антигена вируса гриппа А/Гонконг — гемагглютини́на, находятся в противоречии с предложенной закономерностью. Гемагглютини́н этого вируса содержит семь углеводных цепей, из них пять типа А и две типа В. Из семи

трипептидов, несущих эти цепи, только в двух аминокислота X является полярной (Ser, Glu), и цепи здесь типа A, другие три олигосахариды того же типа связаны с трипептидами, где X — неполярные аминокислоты (Gly, Ala, Val). Более того, из двух трипептидов одинаковой структуры (Asn-Gly-Thr) один несет цепь типа A, а второй — типа B. Следует лишь заметить при этом, что в случае, когда X — полярная аминокислота, углеводные фрагменты всегда только типа A. Возможно, что трансформация цепей типа B в цепи A как-то зависит от более дальнего окружения остатка Asn в пептидной цепи и от надмолекулярной структуры молекулы.

1.4. Избирательное протеолитическое расщепление и ацилирование полипептидной цепи синтезированных гликопротеинов

В процессе биосинтеза вирусных гликопротеинов помимо синтеза полипептидных цепей, их гликозилирования и последующей трансформации олигосахаридных фрагментов гликопротеинов происходит избирательное расщепление протеиназами клетки-хозяина полипептидных цепей синтезированных гликопротеинов-предшественников. Это расщепление, протекающее на мембранах гладкого ретикула [18], не является необходимым для формирования вирионов, но приводит к значительной активации функций гликопротеинов и инфекционности вируса [12, 66]. Так, один из гликопротеинов вируса гриппа — гемагглютинин (HA) синтезируется в виде предшественника с $M \sim 75$ кДа. В результате расщепления образуется гликопротеин, состоящий из двух цепей с $M \sim 50$ и ~ 25 кДа, связанных дисульфидной связью [12, 30—32]. В парамиксовирусах оба гликопротеина HN и F также синтезируются в виде предшественников HN₀ и F₀ с M 82 и 68 кДа соответственно [18, 67—69].

Гликопротеины, полученные в результате протеолитического расщепления предшественников HN₀ и F₀, также построены из двух цепей, соединенных S—S-связями [70, 71]. Аналогичная картина наблюдается и для других оболочечных вирусов. Степень расщепления гликопротеинов-предшественников зависит от типа или штамма вируса и времени его созревания, от типа клетки-хозяина или от среды, в которой выращен вирус, от наличия в ней соответствующих протеиназ [12]. Так, например, в вирусе гриппа, выращенном на эмбрионах цыплят, происходит практически полное превращение гликопротеина-предшественника в активный гликопротеин, тогда как тот же вирус, выращенный на других клетках, содержит практически только гликопротеин-предшественник [12]. В последнем случае инфекционность вируса можно повысить протеолитическим расщеплением этих гликопротеинов путем обработки вируса соответствующими протеиназами *in vitro*.

Гликопротеины вирусов одного рода, относящихся к различным видам и штаммам, различаются по устойчивости к протеолитическому расщеплению, и в этих вирусах соотношение предшественник — активный гликопротеин может сильно колебаться даже при выращивании их в одних и тех же клетках [18].

В связи с такой четкой зависимостью инфекционности вирусов от степени протеолитического расщепления гликопротеинов-предшественников большой интерес представляют работы [72, 73], в которых на примере вируса гриппа исследовалось взаимодействие гликопротеинов вируса, включенных в липосомы, с мембраной клетки. Для выделения гликопротеинов из вируса использовали β -октилглюкопиранозид. Выделенные гликопротеины включали в липосомы путем их совместного диализа с липидами вируса. При взаимодействии липосомы, содержащей расщепленный гликопротеин вируса, с мембраной клетки наблюдалось их слияние; в случае липосомы, содержащей нерасщепленный гликопротеин, ее слияния с мембраной не происходило. Наблюдаемые явления стали понятными после того, как на примере гликопротеина F вируса Синдбис [74] было показано, что специфическое протеолитическое расщепление гликопротеинов-предшественников приводит к изменению конформации гликопротеина, сопровождающемуся значительным возрастанием гидрофобной поверхно-

сти молекул. Это, по-видимому, облегчает слияние оболочки вируса с мембраной клетки и проникновение нуклеокапсида вируса в клетку, что приводит в свою очередь к возрастанию инфекционности вируса.

Как уже упоминалось, протеолитическое расщепление гликопротеинов-предшественников протекает на мембранах гладкого ретикулума, т. е. когда гликозилирование пептидной цепи (перенос олигосахаридного блока с липида-переносчика на пептидную цепь) закончено. Это, по-видимому, имеет значение для специфичности протеолитического расщепления гликопротеинов-предшественников. Так, в некоторых случаях отмечено [30, 75], что при выращивании вируса в присутствии ингибитора гликозилирования туникомицина наблюдается неспецифическое, значительно более интенсивное расщепление гликопротеинов.

Помимо аминокислот и углеводов в гликопротеинах вирусов Синдбис [76], везикулярного стоматита и гриппа [76, 77] обнаружены жирные кислоты, главным образом пальмитиновая кислота, которая отщепляется от гликопротеина только путем щелочной обработки. Предполагается, что она связана сложноэфирной связью с пептидным скелетом через остатки серина, треонина или тирозина. Протеолитическое расщепление гликопротеинов приводит к гликопептидам и пептидам, содержащим пальмитиновую кислоту. Включение жирной кислоты в молекулу гликопротеина происходит при переходе его от мембран гладкого ретикулума в аппарат Гольджи или в самом аппарате Гольджи. При выращивании вируса с радиоактивной пальмитиновой кислотой в присутствии ингибитора процесса гликозилирования полипептидов туникомицина включения кислоты в полипептид не наблюдалось. Механизм ацилирования гликопротеинов и местоположение ацильных остатков в их молекуле не установлены; неизвестна также функциональная роль этих остатков.

II. Структура гликопротеинов вирусов

Структура гликопротеинов вирусов видоспецифична и будет рассмотрена ниже на конкретных примерах.

II.1. Семейство ортомиксовирусов (*Orthomyxoviridae*)

К семейству ортомиксовирусов относятся вирусы гриппа А, В и С, из которых наиболее распространен вирус гриппа А, часто являющийся виновником пандемий гриппа. Поэтому основная часть исследований, посвященных изучению белков, РНК и гликопротеинов вирусов гриппа, относится к вирусу гриппа А. Вирус гриппа С встречается значительно реже вирусов А и В и занимает особое место в этом ряду.

Состав частиц вируса гриппа, вирионов, колеблется в довольно широких пределах в зависимости от клетки хозяина и однородности популяции вируса, но в среднем содержание в них белка составляет 70–75%, РНК 0,8–1,4%, липидов 20–24% и углеводов 5–8% [78].

Имеется монография, посвященная вирусу гриппа [8], поэтому в обзоре кратко будут приведены только данные, необходимые для общей характеристики вируса и его компонентов, а более подробно рассмотрены работы главным образом последних лет.

Нуклеокапсид вирусов этого семейства включает в себя фрагментированную РНК [8, 79]. Каждый из восьми фрагментов содержит соответствующую одноцепочечную РНК и белок NP с $M \sim 60$ кДа. Белок NP является типоспецифичным антигеном, соответственно его структура меняется при переходе от одного серотипа вируса к другому. В нуклеокапсид входят также белки P₁ и P₂, обладающие транскриптазной активностью. На поверхности липидного бислоя вирионов гриппа А и В находятся шипы двух видов, каждый из которых включает в себя один из гликопротеинов: гем-агглютинин (HA) или нейраминидазу (NA). Вирус гриппа С не содержит нейраминидазы [80] и имеет соответственно шипы одного типа. Внутренний слой липидной оболочки вирионов устроен мембранным матриксным белком M с $M \sim 25$ кДа [81]. Гликопротеины вирусов А и В —

гемагглютиниин с $M \sim 75$ кДа, нейраминидаза с $M \sim 60$ кДа и гликопротеин ГП1 вируса С с $M \sim 100$ кДа [82–84] являются основными поверхностными антигенами этих вирусов.

Главная функция гемагглютинина — адсорбция вируса на поверхности клетки-хозяина, гемолиз и слияние клеточной мембраны с оболочкой вируса [9, 79, 85]. Главная функция нейраминидазы — отщепление с поверхности вирионов остатков N-ацетилнейраминовой кислоты, являющихся акцепторами для собственного гемагглютиниина, что предупреждает агрегацию вновь образующихся вирионов. Нейраминидаза отщепляет N-ацетилнейраминовую кислоту также с акцепторов инфицированной клетки, что способствует отпочковыванию вируса [86]. Удаление N-ацетилнейраминовой кислоты с углеводных цепей синтезированного гемагглютиниина может способствовать его селективному протеолитическому расщеплению, необходимому для повышения инфекционности вируса [86–89]. Кроме того, нейраминидаза участвует, по-видимому, в процессах гемолиза и слияния мембран.

Для выделения индивидуальных гликопротеинов HA и NA из вируса используют два различных подхода, заключающихся или в избирательном извлечении из вируса одного из гликопротеинов, или в одновременной солиubilизации обоих гликопротеинов с последующим их разделением. Первый подход основан на различной устойчивости гликопротеинов HA и NA к определенным протеолитическим ферментам. Для выделения гемагглютиниина используют бромеланин [90–92], который отщепляет от него C-концевой гидрофобный фрагмент с $M \sim 7$ кДа, погруженный в липидную оболочку. Это влияет на гемагглютинирующие свойства освобожденного гликопротеина, иммунологические свойства сохраняются, значительно снижается его склонность к ассоциации. Гемагглютинин выделяют затем ультрацентрифугированием. Он может быть получен также в виде кристаллов из раствора цитрата натрия [60, 90, 91]. Следует заметить, что для успешного использования этого подхода большое значение имеет чистота фермента [93]. Коммерческие препараты бромеланина часто являются сложной смесью ферментов, включающей в себя и гликозидазы, вследствие чего непригодны для выделения чистого гемагглютиниина, так как в этом случае могут отщепляться углеводные фрагменты и осуществляться неспецифическое протеолитическое расщепление обоих гликопротеинов (HA и NA).

Для выделения нейраминидазы используют обработку вируса трипсином [94–96] или ферментным препаратом негаразой [97–99]. При этом от нейраминидазы отщепляется N-концевой гидрофобный фрагмент с M около 12 кДа, погруженный в липидный слой вируса. Это сильно снижает склонность нейраминидазы к ассоциации, не влияя на ее активность [100, 101]. С помощью протеолитического расщепления вируса с хорошим выходом (по активности) была выделена и очищена нейраминидаза и определен ее аминокислотный и углеводный состав [102]. Для отщепления нейраминидазы от вируса используют также и проназу [96, 103–107]. Описанный подход к выделению гликопротеинов вируса связан с потерей для исследователя одного из них.


Другой вариант более привлекателен, так как совместное выделение двух гликопротеинов (HA и NA) — главных антигенов вируса гриппа, обладающих кооперированными функциями, очень важно для создания эффективных гликопротеиновых субвирионных вакцин, лишенных характерных для цельновирионных вакцин побочных действий на организм. Совместное выделение гликопротеинов вируса является часто первой стадией получения индивидуальных гликопротеинов.

Для избирательной солиubilизации суммы гликопротеинов HA- и NA-вируса используют различные детергенты, методы работы с которыми подробно описаны (см., например, [108–110]). Применяют как непонные детергенты — тритон N 101 [111, 112], тритон X 100 [113], β -октилглюкопиранозид [114–117], твин-20 [75, 118], нонидет NP 40 [119, 120], Na-соль N-лаурилсаркозина NL 30, так и ионные — дезоксихолат натрия [102, 121, 122], аммония [123], алюминия [123], додецилсульфат натрия (SDS)

[12, 82, 94, 103, 124, 125], цетилтриметиламмонийбромид [126, 127]. Избирательность и полнота солюбилизации гликопротеинов зависят от концентрации вируса и детергента, а также от времени обработки, но определяются главным образом соотношением детергент — белок вируса. Оптимальные условия солюбилизации гликопротеинов, включая тип детергента, могут в значительной степени колебаться для различных вирусов и должны быть определены экспериментально в каждом конкретном случае. При достаточно хорошей очистке вируса и правильном выборе детергента и условий можно практически избирательно перевести в раствор ~80% гликопротеинов. Из имеющихся в настоящее время, по-видимому, наиболее перспективны катионные детергенты типа четвертичных солей [126] и неионные детергенты типа тритона [111, 112] и октил- β -D-глюкопиранозида [114, 115, 116].

Разделение гликопротеинов HA и NA является сложной задачей, так как они относительно близки по величине молекулярной массы (75—80 и 50—60 кДа соответственно) и склонны к ассоциации. Один из достаточно широко используемых методов выделения гемагглютинина — солюбилизация гликопротеинов с помощью SDS и последующее их разделение электрофорезом на ацетате целлюлозы [60, 124, 128, 129]. Ограниченность этого метода обусловлена тем, что гликопротеины HA и NA многих штаммов вируса денатурируются SDS. Более того, часто, если в определенном штамме вируса оба гликопротеина устойчивы к этому детергенту, они не разделяются с помощью электрофореза. При таких ограничениях этим способом можно выделить только один из гликопротеинов, жертвуя другим. Например, для выделения гемагглютинина используют такой штамм вируса, нейраминидаза которого в числе других белков денатурирует в SDS и при электрофорезе (pH 9) мигрирует в отличие от гемагглютинина к аноду. Из других штаммов можно выделить нейраминидазу [123], если именно этот гликопротеин устойчив к SDS.

Предложен также метод разделения гликопротеинов HA и NA с помощью анионообменной хроматографии [119, 130]. Гликопротеины после солюбилизации в неионном детергенте понидет NP40 разделяют на DEAE-целлюлозе в присутствии детергента. Однако этот метод не нашел дальнейшего развития и применения.

Как известно [131], эффективным методом выделения и очистки гликопротеинов, в особенности ферментов, является аффинная хроматография. В качестве лигандов при этом могут быть использованы лектины, субстраты или ингибиторы ферментов. Так, для разделения гликопротеинов вируса гриппа, солюбилизированных в дезоксихолате натрия, использовался фитогемагглютинин из чечевицы, иммобилизованный на сефарозе 4В. Чистые гликопротеины не удалось получить этим способом — они содержали в качестве примеси белок NP [121]. В качестве субстрата нейраминидазы в аффинной хроматографии используют кетозиды N-ацетилнейраминовой кислоты [132] и обогащенные этой кислотой гликопротеины — фетуин [133] или α -кислый гликопротеин [134]. Так, колонка с фетуином, иммобилизованным на сефарозе 4В, была с успехом использована для разделения гликопротеинов парамиксовирусов [11, 135]. Недостатком методов, основанных на использовании указанных субстратов нейраминидазы, является их малая доступность и в некоторых случаях быстрая потеря активности по мере отщепления N-ацетилнейраминовой кислоты. Значительно более перспективны методы разделения вирусных гликопротеинов, основанные на использовании в качестве лигандов синтетических ингибиторов нейраминидазы. В качестве такого ингибитора была предложена N-(n-аминофенилоксиаминовая кислота) NH_2 --NHC(O)COOH (XI)

[98, 136]. Для ее иммобилизации к агарозе был привязан трипептид Gly-Gly-Тур, к остатку тирозина которого путем диазотирования присоединялась кислота (XI). При аффинной хроматографии с использованием соединения (XI), иммобилизованного на агарозе, удалось выделить нейраминидазу из бактерий *Vibrio cholerae* и *Clostridium perfringens*, а также из вакцины вируса гриппа [98]. Этот метод получил дальнейшее развитие в

работе [136], где нейраминидаза выделялась из различных штаммов вируса гриппа. Для солиubilизации гликопротеинов были использованы последовательно SDS и тритон X100, для аффинной хроматографии кислота (XI) была иммобилизована на агарозе [136] или сефарозе [137]. Нейраминидазу элюировали раствором NaHCO_3 (рН 9,1), содержащим тритон X100. В другом варианте [120] для выделения этого гликопротеина также использовали кислоту (XI), иммобилизованную на сефарозе 4В, а предварительную солиubilизацию гликопротеинов проводили с помощью нонедета NP40. Нейраминидазу элюировали раствором NaHCO_3 , содержащим нонедет. При этом было реализовано 90% нейраминидазной активности вируса.

Позднее для аффинной хроматографии гликопротеинов орто- и парамиксовирусов была предложена тирозинсульфанлиловая кислота, иммобилизованная на агарозе [144]. Гликопротеины солиubilизировали с помощью октил- β -D-глюкопиранозида. Элюцию нейраминидазы проводили при рН 9,1. При этом получен с хорошим выходом и, судя по электрофорезу в ПААГ, чистый гемагглютинин. Выделенная нейраминидаза не была полностью очищена от примеси гемагглютинина.

Таким образом, в настоящее время нет еще отработанного метода полного разделения и выделения индивидуальных гликопротеинов вируса гриппа. В то же время, как было показано выше, методы выделения из вируса только гемагглютинина или только нейраминидазы достаточно хорошо отработаны, но они связаны с потерей одного из гликопротеинов.

Гемагглютинин составляет 25–35% суммы белков вириона; в нем содержится 15–20% углеводов. Он представляет собой тример с $M \sim 220$ кДа, каждая субъединица которого имеет M 75–80 кДа [138]. Гемагглютинини вирусов А и В первоначально синтезируется в виде предшественника (HA_0) с M 75–80 кДа, который в процессе биосинтеза может расщепляться [30, 139] с образованием двухцепочечного гликопротеина HA , тяжелая цепь которого (HA_1) с M 47–50 кДа и легкая цепь (HA_2) с M 25 кДа соединены дисульфидной связью [91]. Гликопротеин вируса С также синтезируется в виде предшественника (ГП) с M 100 кДа, который расщепляется протеиназами клетки на две цепи с M 65 и 30 кДа [83], связанные дисульфидным мостиком.

Следует заметить, что разница в молекулярных массах цепей HA_1 и HA_2 обусловлена в значительной степени более высоким содержанием в тяжелой цепи углеводов — 24,4% против 4,7% в легкой. Молекулярная масса пептидной цепи HA_1 по сравнению с легкой цепью в некоторых штаммах вируса больше лишь на 29% [30, 140].

Отсутствие протеолитического расщепления предшественников HA_0 и ГП не влияет на формирование вирионов и гемагглютинирующую способность вируса, но это расщепление необходимо для проявления ими полной инфекционности [9, 66, 97, 141, 142]. Это связано с определенным изменением конформации гликопротеинов в результате такого расщепления [74, 143]. Вирусы с нерасщепленным предшественником можно активировать путем обработки трипсином *in vitro*, равно как и добавлением этого фермента в среду при выращивании вируса.

Влияние типа клетки и среды, в которой выращен вирус, на избирательное протеолитическое расщепление предшественников продемонстрировано на ряде примеров. Так, в вирусах А и С, выращенных на эмбрионах цыплят, гликопротеины HA_0 и ГП практически полностью расщепляются [15, 86, 97, 122], тогда как в вирусе, выращенном на клетках почек крупного рогатого скота (для А) или клетках куриных фибробластов (для С), содержатся только предшественники. Добавка в среду, где выращивается вирус, ингибитора протеиназ исключает расщепление гликопротеина HA_0 [144].

Этот важный процесс протеолитического расщепления предшественника гемагглютинина в ходе биосинтеза вируса изучен еще недостаточно. Известно, что он протекает различно для различных вирусов. Так, предшественник HA_0 вируса В значительно более устойчив к протеолитическому расщеплению, чем вируса А, поэтому в процессе биосинтеза не всег-

да протекает расщепление гликопротеина HA_0 вируса В даже при наличии в клетке необходимых протеиназ [83].

При изучении N- и C-концевых аминокислот тяжелой и легкой цепей гемагглютинаина было показано, что при протеолитическом расщеплении предшественника HA_0 теряется какое-то число аминокислот. Известно, что специфическое расщепление полипептидов трипсином протекает по связи, образованной карбоксильной группой остатков аргинина или лизина. В то же время C-концевой аминокислотой полипептидной цепи HA_0 является треонин, а N-концевой кислотой HA_2 — глицин [145—149], что соответствует расщеплению по связи Thr-Gly, неизвестному для трипсина. Этот факт свидетельствует о том, что в протеолитическом расщеплении предшественника HA_0 участвуют, по-видимому, кроме трипсина другие протеиназы, в результате чего элиминируется какой-то участок пептидной цепи с потерей части остатков аргинина и лизина. Сравнение последовательности аминокислот предшественника HA_0 вируса гриппа птиц с C-концевой последовательностью полученной из него тяжелой цепи и N-концевой последовательностью легкой цепи [145, 146] также подтвердило потерю нескольких остатков аргинина и лизина при расщеплении, тогда как расщепление предшественника HA_0 вируса А/Гонконг [60] приводит к потере только одного моля аргинина. Эти данные еще раз демонстрируют различную устойчивость предшественников гемагглютинаина различных типов вируса к протеолитическим ферментам.

Цепи HA_1 и HA_2 могут быть получены в индивидуальном виде после восстановления S—S-связей и разделения гликопротеинов в градиенте плотности сахарозы или хлоридрата гуанидина [133, 150]. Была сделана попытка разделения тяжелой и легкой цепей с помощью гель-хроматографии [125], но она не привела к получению чистых продуктов. Недавно легкая цепь была выделена [127] с помощью препаративного электрофореза в ПААГ продуктов восстановления гемагглютинаина и пептидазы, солиобилизованных с помощью катионного детергента — цетилтриметиламмонийбромида [126].

Исследованию структуры гемагглютинаина посвящено большое число работ и в настоящее время установлена аминокислотная последовательность его полипептидной цепи и определены точки присоединения углеводных фрагментов для различных штаммов вируса. С этой целью использовались химические методы, главным образом бромциановое расщепление [140, 147—149, 151—162], протеолитическое расщепление, а также рентгеноструктурный анализ [60]. При этом установлено, что тяжелая цепь гемагглютинаина и его легкая цепь являются соответственно N- и C-концевыми фрагментами предшественника HA_0 .

Связь гемагглютинаина с липидной оболочкой осуществляется через легкую цепь, гидрофобный C-конец которой пронизывает эту оболочку [147, 156]. Следует заметить, что цепь HA_2 вируса В более глубоко погружена своим гидрофобным концом полипептида в липидную мембрану, чем цепь HA_2 вируса гриппа А [83].

Молекула гликопротеина HA_1 амфифильна, на ее N-концевой части сосредоточены главным образом гидрофильные аминокислотные остатки, а C-концевой участок гидрофобен [148, 154, 155]. Антигенной частью гемагглютинаина является его тяжелая цепь, которая непосредственно взаимодействует с антителами, полученными против вируса [149, 154, 157]. Более того, на примере вируса А/Гонконг показано, что антигеном является только N-концевой участок полипептидной цепи HA_1 , содержащий 168—170 аминокислотных остатков [149, 157], тогда как всего в полипептидной цепи HA_1 этого вируса содержится 328 аминокислотных остатков. Это на 10 остатков больше, чем в других штаммах вируса А, и среди этих 10 аминокислот дополнительный гликозилированный остаток Asn. Легкая цепь не обладает антигенными свойствами [156].

Известно, что для вируса гриппа, особенно группы А, характерен так называемый антигенный «дрейф», т. е. изменчивость последовательности нуклеотидов в РНК и соответственно аминокислот в вирусных белках, а следовательно, и его иммунологической характеристики. Для различных

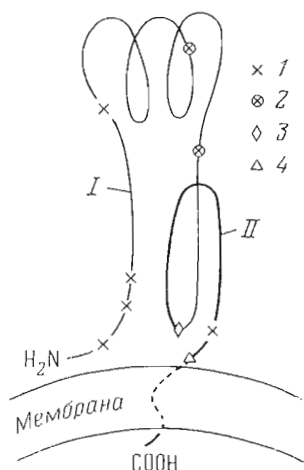


Схема пространственной структуры гемагглютинина вируса А/Гонконг и А/Мемфис. Указаны места прикрепления углеводных цепей типа А (1), типа В (2), место селективного протеолитического расщепления (—328—(Arg)—300—) гемагглютинина на тяжелую (НА₁) и легкую (НА₂) цепи (3) и место отщепления гемагглютинина от поверхности вириона с помощью бромелайна (4). I — полипептидная цепь НА₁, II — полипептидная цепь НА₂

штаммов вируса изучены геномы, кодирующие структуру полипептида гемагглютинина [159, 160, 163, 164], и показаны различия в их нуклеотидной последовательности [96, 165—171], которые соответственно коррелируются с изменением в последовательности аминокислот [14, 145, 168, 171, 172]. Именно этой изменчивостью структуры РНК и белков вируса гриппа объясняют в последнее время изменчивость и многообразие его форм. Разница в аминокислотной последовательности гемагглютининов отдельных серотипов вируса гриппа человека не меньше, чем, например, для вирусов гриппа человека и птиц [58]. Высказано предположение, что «дрейф» антигенности вирусов — результат рекомбинации отдельных фрагментов его РНК [173] или РНК вирусов человека и животных [172]. Наиболее варибельной частью гемагглютинина по последовательности аминокислот, а также по расположению углеводных фрагментов является N-концевой фрагмент тяжелой цепи [149, 160, 168, 171], который и ответствен за антигенность этого гликопротеина. В то же время сравнением аминокислотной последовательности гемагглютининов вирусов гриппа различных штаммов [147, 149, 157, 159, 160, 168 и др.] было установлено, что 22% остатков аминокислот в цепи НА₁ и 45% в цепи НА₂ консервативны, включая шесть дисульфидных связей и такие важные для конформации полипептидных цепей аминокислоты, как глицин и пролин.

Недавно с помощью рентгеноструктурного анализа при разрешении 3 Å [60] была установлена полная первичная и пространственная структура полипептидной цепи гемагглютинина вируса А/Гонконг и фиксировано расположение на ней углеводных фрагментов. При этом показано, что тример гемагглютинина с *M* 224 640 Да, расположенный на поверхности оболочки вируса в виде шипов, представляет собой вытянутый цилиндр длиной 135 Å. Полипептидная цепь включает в себя участки β- и α-структуры.

На рисунке представлена упрощенная схема пространственного построения субъединицы предшественника гемагглютинина НА₀. Полипептидная цепь предшественника НА₀ состоит из 550 остатков аминокислот. Гидрофобный С-конец легкой цепи, который пронизывает двойной липидный слой вириона, содержит 46 остатков аминокислот. Протеолитическое расщепление предшественника НА₀ этого вируса на цепи НА₁ и НА₂ протекает на участке 328—(Arg)—330, при этом молекула НА₀ теряет 1 моль аргинина. Цепи НА₁ и НА₂ вируса А связаны одной S—S-связью; кроме того, четыре такие внутримолекулярные связи содержатся в тяжелой цепи и одна — в легкой [60, 158, 174].

Кроме того, с помощью рентгеноструктурного анализа были исследованы участки пептидной цепи, ответственные за взаимодействие гемагглютинина с антителами, и изменчивость этих участков, приводящая к появ-

лению новых эпидемиологических серотипов вирусов, которые наблюдались с 1968 по 1975 г. [175]. При этом показано, что для появления нового серотипа достаточно замены по одной аминокислоте в каждом таком участке. Гемагглютинин вируса А/Гонконг содержит семь олигосахаридных фрагментов [60, 148, 176]: шесть в цепи HA_1 и один — в HA_2 , причем они всегда расположены в областях β -структуры пептидной цепи, главным образом на петлях, соединяющих элементы этой структуры.

В состав углеводных цепей гемагглютинина входят остатки GlcNAc, Gal, Man, Fuc. N-Ацетилнейраминная кислота в вирусе А и В отсутствует вследствие паличия нейраминидазы. Вирус гриппа С не содержит нейраминидазы. В гликопротеинах оболочечных вирусов, не проявляющих нейраминидазной активности, всегда обнаруживают N-ацетилнейраминную кислоту [177, 178]; содержит ее и вирус гриппа С [10, 179].

Число и тип углеводных цепей и их распределение по пептидной цепи гемагглютинина неодинаково для различных типов и штаммов вируса [180]. Так, уже упоминалось, что в гемагглютинине вируса А/Гонконг семь углеводных цепей, а в гемагглютинине вируса А/Япония обнаружено пять углеводных фрагментов, из них четыре в тяжелой цепи и одна — в легкой. В гемагглютинине вируса птичьей чумы, который также относится к ортомиксовирусам, — шесть углеводных фрагментов, причем четыре в тяжелой и две в легкой цепи [180].

В состав гемагглютинина входят углеводные цепи двух типов А и В (см. раздел I.3) [20, 94, 102, 181, 182], что характерно также для гликопротеинов животного происхождения с N-гликозидной углевод-пептидной связью [183]. Углеводные фрагменты, соединенные с пептидной цепью O-гликозидными связями через остатки серина или треонина, в вирусах гриппа не обнаружены [20, 176].

В некоторых штаммах вируса гриппа и в других вирусах найден связанный с углеводами сульфат [20, 181, 184—188]. На примере вируса гриппа было показано [185], что наличие сульфата в гемагглютинине определяется клеткой хозяина. В вирусе гриппа, выращенном на куриных эмбрионах, в состав которых входят сульфатированные пептидогликаны типа кератосульфата, гемагглютинин содержит сульфат, тогда как гемагглютинин того же вируса, выращенного на утиных эмбрионах, не содержащих сульфатированных пептидогликанов, не содержит сульфатных групп. Предполагается, что сульфатирование олигосахаридов гликопротеинов вирусов обусловлено наличием соответствующих ферментов в клетке хозяина [185]. Важно заметить, что присутствие сульфата в гемагглютинине повышает его устойчивость к денатурации в SDS. Антигенную специфичность клетки хозяина, обнаруженную в некоторых вирусах, также объясняют присутствием в них сульфатированных углеводов.

При изучении олигосахаридных фрагментов гемагглютининов различных вирусов гриппа с использованием включенных радиоактивных сахаров было найдено, что с изменением клетки хозяина или типа и даже штамма вируса может изменяться не только число олигосахаридных фрагментов и их распределение между цепями HA_1 и HA_2 , но и соотношение углеводных цепей типа А и В. Так, в вирусе, выращенном на фибробластах эмбрионов цыплят, преобладают структуры типа В как в тяжелых, так и в легких цепях гемагглютинина, тогда как в его легких цепях того же вируса, выращенного на клетках почек крупного рогатого скота или собаки, содержатся олигосахаридные фрагменты только типа А. Это демонстрирует зависимость строения углеводных цепей от клетки хозяина [181]. С другой стороны, в тяжелых цепях гемагглютинина различных вирусов, выращенных на одной клеточной культуре, также наблюдается различное соотношение олигосахаридов типа А и В, что демонстрирует зависимость типа углеводных цепей от вида вируса.

По-видимому, в зависимости от первичной структуры полипептидной цепи гемагглютинина изменяется ее вторичная структура, что приводит не только к смещениям углеводных фрагментов по полипептидной цепи, но и к изменению соотношения углеводных цепей типа А и В. Вероятно, конформационная перестройка полипептидной цепи [143] и соответствен-

Поло- жение Asn	Вирус А/Мемфис					Вирус А/Эйчи				
	GlcNAc	Man	Gal	Fuc	тип цепи	GlcNAc	Man	Gal	Fuc	тип цепи
Тяжелые цепи										
8	4	4	5	2	A	4	5	2,6	2	A
22	4	2	2	1	A	4	3	2	2	A
38	4	5,4	2,5	0,6	A	2	6	0,6	0,3	A
81	3	2,5	2	0,2	A	4	3	3	1	A
165	2	6	—	—	B	2	9	—	—	B
285	2	5	—	—	B	2	4	—	—	B
Легкие цепи										
154	4	2,6	2	1	A	4	4	2	1,5	A
						3	3	1,5	1	A

до изменение пространственного положения остатков аспарагина, которые должны гликозилироваться, приводит к нарушению условий трансформации маннозобогащенных цепей *B* в комплексные цепи типа *A* [20, 181, 182].

В настоящее время наиболее плодотворным направлением изучения первичной структуры олигосахаридных фрагментов гемагглютинаина является расщепление полипептидной цепи с помощью бромциана и выделение индивидуальных гликопептидов, несущих одну углеводную цепь, расположенную в заранее известной позиции. Естественно, что использование такого подхода может быть особенно эффективным в случае гликопротеинов с известной первичной структурой полипептидной цепи и соответственно местами расположения гликозилированных остатков аспарагина. Таким способом были выделены гликопептиды из гемагглютинаина вируса А/Гонконг (Мемфис) и другого его варианта А (Эйчи) [148, 176]. Из гемагглютинаина каждого вируса было выделено после расщепления бромцианом по семь индивидуальных гликопептидов и определен их углеводный состав. При этом каждый из полученных гликопептидов содержал одну углеводную цепь, связанную с аспарагином, занимающим определенную позицию в пептидной цепи. Различия в структуре пептидных цепей гемагглютининов этих двух вирусов не затрагивают положения трилетов-маркеров, содержащих гликозилированные остатки аспарагина. В обоих вирусах гликозилированы остатки аспарагина в позициях 8, 22, 38, 81, 165, 285 тяжелой цепи и Asn¹⁵⁴ легкой цепи. Углеводный состав выделенных гликопептидов (в молях на пептидную цепь) приведен в таблице.

В цепи NA₁ вируса А/Мемфис обнаружено около 1 моль сульфата, связанного с одним из углеводных фрагментов [184]. Как видно из таблицы, легкие цепи гемагглютинаина обоих вирусов содержат только одну цепь — типа *A*, соединенную с остатком Asn¹⁵⁴, причем в случае вируса А/Эйчи эти цепи гетерогенны — выделены два соответствующих гликопептида, различающихся по составу углеводов. Все углеводные фрагменты, выделенные из цепи NA₂, содержат фукозу, в то же время легкие цепи вируса *B*, выращенного на клетках почек хомячка, также имеют одну углеводную цепь типа *A*, но фукоза в ней отсутствует [83].

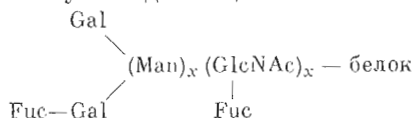
Сопоставление состава углеводных фрагментов, связанных с остатком Asn в одной и той же позиции полипептидной цепи NA₁ этих двух вирусов (Мемфис и Эйчи), показывает, что они не идентичны (см., например, позиции 8,38). Однако углеводные цепи каждого вируса также гетерогенны. Так, в олигосахаридных фрагментах типа *A* содержание маннозы колеблется от 2 до 5 или от 3 до 6 моль, галактозы — от 2 до 5, а фукозы — от 0 до 2 моль. Более того, из цепи NA₂ вируса А/Эйчи удалось выделить две различные по мопосахаридному составу углеводной цепи, привязанные к остаткам Asn¹⁵⁴. Вследствие этого нельзя сделать определенных выводов из приведенных данных, так как наблюдаемые колебания в составе углеводов укладываются в пределы обычной гетерогенности углеводных цепей гликопротеинов. В настоящее время гетерогенность углеводных цепей гликопротеинов различного происхождения продемонстрирована для

гликопротеинов как с N-гликозидной (см., например, [189]), так и с O-гликозидной углевод-пептидной связью [190].

Была сделана попытка провести анализ углеводных цепей на целом вирусе гриппа [142] с использованием метода метилирования и периодатного окисления. При этом было установлено, что фукоза и часть остатков галактозы и маннозы являются концевыми, а часть остатков маннозы находится в разветвлении. Полученные данные ничего не добавляют к сведениям о структуре N-связанных олигосахаридов различных гликопротеинов, тем более что в вирусе гриппа имеются цепи типа A и B.

При воздействии на гемагглютинин различными гликозидазами было также показано наличие на невосстанавливающих концах олигосахаридных фрагментов остатков фукозы и галактозы [102].

На основании полученных весьма скромных данных и главным образом по аналогии со структурой других известных гликопротеинов предложена общая схема построения углеводных цепей типа A для гемагглютинина.



Следует заметить при этом, что предложенная структура противоречит механизму биосинтеза N-связанных олигосахаридов гликопротеинов (см. схему 3). Во всех известных до настоящего времени гликопротеинах с N-гликозиламиной связью галактоза должна быть связана с остатками N-ацетилглюкозамина, но не с маннозой, а фукоза — с N-ацетилглюкозаминном, а не с галактозой.

Таким образом, структура углеводных цепей гемагглютинина в настоящее время еще не установлена.

Нейраминидаза (NH) составляет ~7% суммы белков в вирусе и содержит 40–46% углеводов, в состав которых входят Man, Gal, Fuc, GlcNAc и GalNAc. Нейраминидаза представляет собой тетрамер с M 200–250 кДа, каждая из субъединиц которого имеет M 50–60 кДа. Субъединицы в тетрамере связаны попарно S-S-связями [96, 100, 151]; пары полипептидов не связаны ковалентно. Предложена и другая модель, согласно которой все субъединицы связаны между собой дисульфидными связями [97]. Было высказано предположение [96, 151], что в тетрамеры могут быть объединены субъединицы нескольких типов нейраминидазы, различающихся по структуре, однако анализ пептидных карт нейраминидазы целого ряда вирусов гриппа [152] не подтверждает это предположение.

Нейраминидаза, как и гемагглютинин, является антигеном вируса гриппа, и для нее также характерен антигенный «дрейф», связанный с изменчивостью аминокислотной последовательности. Антигенные свойства нейраминидазы гриппа A резко изменились в 1957 г., когда тип фермента N1 превратился в N2 [191]. Пептидные карты и антигенные свойства этих двух типов ферментов сильно различаются [152].

Недавно была определена первичная структура нейраминидазы вируса гриппа A, исходя из последовательности нуклеотидов РНК, кодирующей 454 аминокислоты полипептида, с M 51 кДа [192]. Определены потенциальные сайты гликозилирования — остатки аспарагина в положениях 44, 58, 72, 121, 220. Предполагается, что во всех триплеттах Asn-X-Ser(Thr) остаток аспарагина гликозилирован, за исключением триплетта, где аминокислотой X является пролин. Белок нейраминидазы обогащен цистеином [152] (19 остатков), но позиции и число дисульфидных связей в молекуле неизвестны. Ранее предполагалось [100], что как на С-, так и на N-конце полипептидной цепи этого белка имеются гидрофобные области, погруженные в липидный слой, так как молекулярная масса гликопротеина, выделенного путем обработки вируса трипсином, на 7 [100] или 12 кДа [101] меньше молекулярной массы того же гликопротеина, полученного с помощью электрофореза после солиubilизации детергентом. Позже было показано [192], что гидрофобная область молекулы, в которой из 29 остатков аминокислот 18 гидрофобных, расположена близко к N-концу. Первыми остатками, лежащими за этой областью, по которым и идет, по-ви-

димому, расщепление трипсином, являются Lys⁵⁷ и Lys⁶³. Трипсин отщепляет от белка пептид с M 6 кДа, погруженный в мембрану, что согласуется с данными работы [100].

На С-конце молекулы имеется область из 16 аминокислот (420—435), которые не изменяются в процессе антигенного «дрейфа», но из них только пять гидрофобных. В С-концевой части молекулы сайтов для N-гликозилирования нет, тогда как с N-конца под действием трипсина отщепляется пептид, содержащий углеводы (сайты с остатками Asn⁴⁴ и Asn⁵⁸).

Таким образом, ориентация полипептидной цепи нейраминидазы, N-конец которой связан с липидной оболочкой, противоположна ориентации молекулы гемагглютинина и многих других мембранных гликопротеинов, таких, как гликофорин [191, 194], HLA-антиген [195], гликопротеин G вируса везикулярного стоматита [196], у которых С-конец молекулы погружен в мембрану. Небезынтересно, что N-концевая последовательность нейраминидазы и С-концевая последовательность гликофорина близки, особенно по степени гидрофобности. Имеются гликопротеины с аналогичной нейраминидазе ориентацией полипептидной цепи — это ферменты мальтаза [196а] и изомальтаза [197], у которых гидрофобный участок, связанный с мембраной, также находится на N-конце пептидной цепи.

Углеводы нейраминидазы почти не изучались. Определен состав и соотношение моносахаридов для нейраминидазы рекомбинантного штамма вируса X7 [97]: Gal — Man — Fuc — GlcNAc — GalNAc, 32 : 9 : 8 : 27 : 16. Кроме того, были обнаружены ксилоза, рибоза и глюкоза, которые авторы работы [97] относят за счет примесей.

Приведенный состав и соотношение моносахаридов заслуживает внимания. Наличие маннозы и в то же время в значительном количестве N-ацетилгалактозамина, который обычно входит в узел O-гликозидной углевод-пептидной связи, позволяет предположить, что в нейраминидазе имеются углеводные цепи, связанные с полипептидной цепью как N-гликозидной, так и O-гликозидной связями. В пользу такого предположения свидетельствует также высокое содержание углеводов по сравнению с гемагглютинином (45% против 25%) при почти одинаковом количестве сайтов N-гликозилирования и близких значениях молекулярных масс полипептидных цепей этих гликопротеинов. Довольно трудно предположить, что разница в содержании углеводов обусловлена размерами углеводных цепей при примерно равном их числе. Ответ на эти вопросы может быть получен только при выделении углеводных цепей нейраминидазы и установлении их первичной структуры.

Свойства нейраминидазы как фермента достаточно хорошо изучены; они в значительной степени зависят от типа и штамма вируса. Так, изоэлектрическая точка колеблется от 5 до 6, значения оптимума pH — от 6,4 до 7,0 [91]. Константа Михаэлиса при использовании в качестве субстрата N-ацетилнейраминиллактозы при pH 7,0 колеблется в зависимости от штамма вируса от $1,0 \cdot 10^3$ до $4,0 \cdot 10^3$ М.

Термостойкость нейраминидазы также колеблется для различных типов и штаммов вируса, особенно заметна разница в термостойкости нейраминидаз N1 и N2. Более термостойким является тип N2. Ионы Ca²⁺ повышают как активность, так и термостабильность фермента. Что касается его специфичности, то это α -N-ацетилнейраминидаза, расщепляющая связи 2→3 и практически не расщепляющая связи 2→4 и 2→6 [198].

II.2. Семейство парамиксовирусов (*Paramyxoviridae*)

Наиболее хорошо изученными вирусами этого семейства являются вирусы парагриппа (SV5), ньюкаслской болезни, кори и вирус Сендай.

Нуклеокапсид этих вирусов включает в себя нефрагментированную молекулу РНК (M $7 \cdot 10^3$ кДа), связанную с полипептидом, молекулярная масса которого составляет 55 кДа [72]. Мембранный белок имеет M 42 кДа.

На поверхности липидной оболочки вирионов имеются шипы двух видов [199], каждый из которых содержит один из двух антигенных гликопротеинов — гликопротеин HN, молекулярная масса которого колеблется от 65 до 74 кДа, или гликопротеин F с M 65 кДа [200]. В отличие от

ортомиксовирусов в парамиксовирусах гемагглютинирующая и нейраминидазная активности сосредоточены в одной молекуле гликопротеина HN [72, 135, 201]. Основной функцией гликопротеина HN является адсорбция вириона на поверхности клетки и отщепление остатков N-ацетилнейраминной кислоты. Функция гликопротеина Н состоит в проникновении вируса в клетку путем гемоллиза и слияния мембраны клетки с оболочкой вируса [67]. В вирусе кори в отличие от других парамиксовирусов имеется только один гликопротеин с M 79 кДа, при этом отсутствует нейраминидазная активность [202].

При биосинтезе гликопротеинов этих вирусов также происходит специфическое расщепление соответствующих предшественников протеолитическими ферментами клетки хозяина. В результате этого образуются двухцепочечные гликопротеины, цепи которых соединены дисульфидными связями. Так, в вирусе ньюкаслской болезни был обнаружен предшественник гликопротеина HN — гликопротеин HN₀ с M 82 кДа [67, 203].

Тот факт, что гликопротеин HN₀ является предшественником HN, был установлен путем сравнения пептидных карт фрагментов, полученных после бромцанового расщепления этих двух гликопротеинов [203]. Гликопротеин HN содержит две цепи HN₁ и HN₂, соединенные дисульфидной связью. Переход от HN₀ к HN сопровождается резким возрастанием агглютинирующей способности. Небезынтересно, что протеолитическое расщепление предшественника гемагглютинина вируса гриппа на цепи HA₁ и HA₂ не влияет на его агглютинирующую способность при возрастании только инфекционности вируса [203, 204].

Предшественником гликопротеина F является гликопротеин F₀ с M 68 кДа, который был обнаружен в вирусах Сендай [205], SV-5 [68] и в вирусе ньюкаслской болезни [67, 68, 203—206]. Гликопротеин F₀ также содержит две цепи F₁ и F₂ с M 48—56 и 16—10 кДа соответственно, соединенные дисульфидной связью [10, 32, 67, 203, 205, 207]. Протеолитическое расщепление F₀ *in vivo* или *in vitro* приводит к активации его функций, что связано с изменением конформации молекулы [74].

В то время как расщепление предшественника HN₀ может протекать при действии различных протеиназ, F₀ расщепляется только трипсином [71], хотя гликопротеин F₀ вируса Сендай может быть активирован также действием химотрипсина или эластазы [208]. В зависимости от наличия в инфицированной клетке необходимых протеиназ, а также от вида и штамма вируса предшественник F₀ расщепляется в большей или меньшей степени. Так, вирус Сендай, выращенный на клетках почек хомячка, содержит в основном F₀, тогда как тот же вирус, выращенный на куриных эмбрионах, содержит преимущественно гликопротеин F [205]. В то же время для различных штаммов вируса ньюкаслской болезни, выращенных в одних и тех же клетках, также наблюдается различная интенсивность протеолитического расщепления гликопротеинов F₀ [67], что, по-видимому, связано с различиями в структуре их полипептидной цепи.

Для выделения гликопротеинов вирусов этого семейства обычно используют неионные детергенты, такие, как тритон X 100, в некоторых случаях с добавкой глицерина и солей [10, 72, 200, 205], эмульгоген ВС [11], смесь твина 20, тритона X 100, сахарозы и глицерина [208] или эмпиген ВВ [209]. Выделенные гликопротеины разделяют далее градиентным центрифугированием в водном растворе смеси сахарозы с тритоном [200], аффинной хроматографией на фетуйне [135] или лектине из чечевицы [209] или с помощью электрофокусирования [69].

Изучение структуры гликопротеинов некоторых вирусов этого семейства продвинулось достаточно глубоко. Изучена N-концевая последовательность аминокислот гликопротеина F вируса Сендай [209], причем отдельно для цепей F₁ и F₂. При этом установлено, что молекулярная масса гликопротеинов F₁ и F₂ равна 51 и 11 кДа соответственно; каждый из них содержит 15% углеводов. Анализ показал [209], что N-конец цепи F₂ закрыт, а на N-конце цепи F₁ имеется последовательность 15 гидрофобных аминокислот, которая в шести позициях совпадает с N-последовательностью легкой цепи гемагглютинина вируса гриппа. Гидрофобному участ-

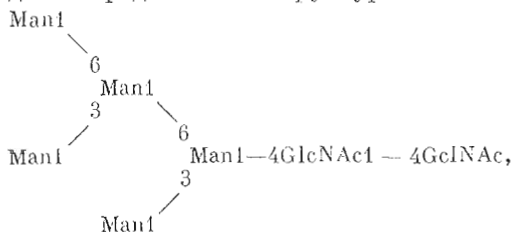
ку на N-конце гликопротеинов, который обычно находится на поверхности оболочки вируса, отводят значительную роль во взаимодействии оболочки вируса с мембраной клетки [85, 210, 211]. Полная первичная структура полипептидной цепи гликопротеинов вирусов этого семейства еще не установлена.

Углеводный компонент гликопротеинов этих вирусов содержит четыре моносахарида (Man, Gal, Fuc, GlcNAc), часть моносахаридов сульфатированы [212]. Вследствие нейраминидазной активности гликопротеина HN N-ацетилнейраминовая кислота в этих вирусах отсутствует.

В вирусе кори из углеводов обнаружены лишь галактоза и N-ацетилглюкозамин и небольшое количество N-ацетилнейраминовой кислоты. Углеводные цепи типа B отсутствуют [202].

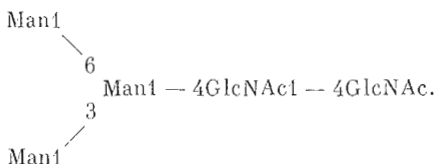
Для характеристики структуры углеводных цепей гликопротеинов HN и F вируса Сендай их разделяли с помощью электрофокусирования [69]. Полученный гликопротеин HN содержал 9%, а F — 15% углеводов. Полученные после протеолитического расщепления каждого из гликопротеинов гликопептиды хроматографировали на биогеле Р6. Показано, что в гликопротеине HN имеются цепи как типа A, так и B, тогда как в F углеводные цепи только типа B.

Позднее из этого же вируса, выращенного на радиоактивных сахарах, были выделены гликопротеины HN и F [212], от которых с помощью гидразинолиза отщеплялись углеводные фрагменты. Из обоих полимеров выделены олигосахариды двух типов (A и B), причем некоторые из них содержали кислый компонент. Основная часть кислых олигосахаридов получена из гликопротеина F (80%) и 18% из HN. В гликопротеине HN большинство олигосахаридных фрагментов были типа B, а в гликопротеине F — в основном типа A, что противоречит данным предыдущей работы [69]. Всего выделено и изучено девять олигосахаридов, из них четыре типа B и пять типа A. Основой структуры цепей B является стандартный скелет. Однако предлагаемая структура

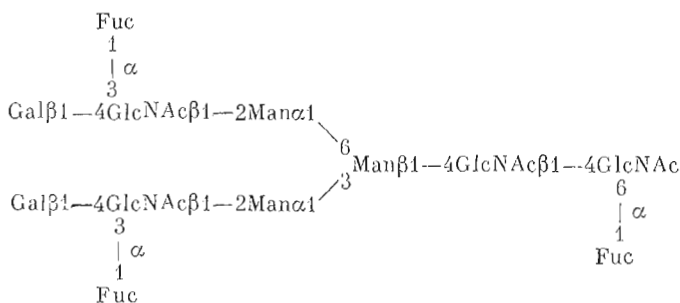


противоречит схеме биосинтеза олигосахаридов типа B (ср. схему 1, (I) и далее).

Олигосахариды типа A значительно сложнее и разнообразнее, хотя тоже имеют стандартный скелет



Наиболее сложный из выделенных олигосахаридов представлен формулой



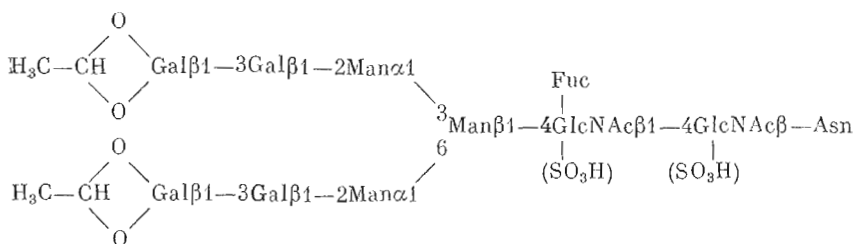
Кислые олигосахариды и соответственно природа кислотного компонента не исследовались, но, поскольку ранее было установлено [213] наличие в составе углеводных фрагментов этих вирусов сульфатных групп, можно предположить, что речь идет о сульфатированных олигосахаридах.

Интересные результаты получены при исследовании углеводных фрагментов гликопротеинов HN, F₁ и F₂ вируса парагриппа SV5 [11]. Для выделения гликопротеинов из вируса, выращенного на радиоактивных сахарах и сульфате и очищенного гель-хроматографией на сефарозе CL4B, использовался детергент эмульгоген BC-720. Выделенные гликопротеины разделяли аффинной хроматографией на колонке с фетуипсефарозой. При этом гликопротеин HN удается получить в чистом виде, пригодном для химических исследований, а гликопротеин F вследствие большой склонности к ассоциации выделялся лишь после карбоксиметилирования. Фрагменты F₁ и F₂, полученные в результате восстановления гликопротеина F, разделяли хроматографией на оксиапатите. Каждый из полученных гликопротеинов расщепляли с помощью проназы и гликопептиды разделяли хроматографией на сефадексе G-50 и затем на DEAE-целлюлозе. Гликопротеины HN, F₁ и F₂, как и полученные из них гликопептиды (M 2 кДа), содержали Fuc, Man, Gal, GlcNAc и ацетальдегид в соотношении 1:3:4:2:2. Следовательно, все три гликопротеина имеют углеводные цепи только типа А. В гликопротеинах HN и F₁ по три таких цепи и в F₂ одна. Только 10% олигосахаридов сульфатированы.

Структурный анализ углеводных фрагментов гликопротеинов проводился на очищенной суммарной фракции HN и F. Олигосахариды, содержащие радиоактивную фукозу и сульфат, выделялись или в виде гликопептидов после расщепления гликопротеинов с помощью проназы, или после отщепления олигосахаридов путем гидразинолиза. Интересно, что гликопептиды, полученные после действия проназы, отличались высокой гетерогенностью, тогда как олигосахариды, полученные в результате гидразинолиза, выходили с сефадекса G-25 одним четким пиком. Возможно, гетерогенность гликопептидов обусловлена различиями в их пептидной части, но нельзя исключить также, что в жестких условиях гидразинолиза от олигосахаридов отщеплялись какие-то лабильные группировки, в результате чего их структуры нивелировались.

Выделенные олигосахариды и гликопептиды устойчивы к действию гликозидаз, олигосахариды щелочелабильны. Сульфат отщеплялся с помощью дауэкса 50, X-8 (H⁺), при этом терялась также значительная часть фукозы и ацетальдегида. Модифицированные таким образом олигосахариды были более устойчивы в щелочной среде, что позволяет предположить, что именно сульфат был причиной их щелочелабильности.

Для установления структуры олигосахаридов использовались метод метилирования, деацетилирование N-ацетилглюкозамина с последующим дезаминированием, периодатное окисление. Ацетальдегид идентифицирован в виде динитрофенилгидразона. В результате предложена следующая структура олигосахаридных фрагментов гликопротеинов вируса SV-5 [11]:



Поскольку эта структура необычна для N-связанных с пептидной цепью углеводных цепей и также противоречит механизму их биосинтеза, она требует более основательного доказательства. Необычна последовательность двух остатков галактозы вместо дисахарида Gal1-4GlcNAc, обычного следующего за маннозой, а также ацетальная группировка на галактозе,

которая ранее была обнаружена только в бактериях [214]. Не доказана и позиция сульфатных групп.

Высказано предположение [11], что ацетальная защита на концевом остатке галактозы заменяет отсутствующую в этих гликопротеинах *N*-ацетилнейраминую кислоту и является сигналом обрыва роста углеводной цепи при биосинтезе. При этом отмечено, что в мембранах клеток почек крупного рогатого скота, в которых выращен вирус, и в культуральной жидкости содержится гликопротеин с *M* 70 кДа, углеводные фрагменты которого по составу аналогичны углеводным фрагментам гликопротеинов вируса. Экспериментальные данные по этой части исследования в работе [11] не приводятся.

Как упоминалось выше, из гликопротеинов вируса Сендай выделены олигосахаридные фрагменты, для которых предложена и в значительной степени доказана совсем другая структура, чем в случае вируса SV-5. Более того, если в гликопротеинах вируса Сендай были обнаружены углеводные цепи двух типов, вирус SV-5 содержит углеводные цепи только типа А. Однако какие-либо серьезные выводы на основании различной структуры углеводных фрагментов гликопротеинов двух вирусов, относящихся к одному семейству, делать преждевременно. Для этого необходимы более строгие доказательства первичной структуры углеводных фрагментов гликопротеинов для вирусов, выделенных в нативном состоянии.

11.3. Семейство тогавирусов (*Togaviridae*)

Наиболее изученными для этого семейства являются вирус Синдбис и вирус леса Семлики, которые относятся к роду альфа-вирусов. Эти вирусы переносятся комарами и способны инфицировать клетки различных, главным образом мелких, животных. В их состав входят РНК (5,6–6,3%), белки (56–61%), липиды (27–30%) и углеводы (6–8%) [215–217]. Нуклеокапсид включает в себя нефрагментированную линейную молекулу РНК с *M* 4–4,5 МДа, связанную с несколькими копиями полипептида с *M* 30 кДа [218]. На поверхности двойного липидного слоя расположены гликопротеины в виде шипов длиной 7–8 нм. Вирус Синдбис содержит два гликопротеина E_1 и E_2 , каждый из которых имеет *M* ~50 кДа. В вирусе Семлики также обнаружены два аналогичных гликопротеина E_1 и E_2 с *M* 52 и 49 кДа соответственно. Кроме того, имеется еще и гликопротеин E_3 с *M* 10 кДа [219]. Эти три гликопротеина в виде тримеров образуют поверхностные шипы вируса соответственно трех типов. В этом вирусе был обнаружен белок с *M* 130 кДа, и высказано предположение [220, 221], что в результате его протеолитического расщепления образуется белок нуклеопротеида (30 кДа), представляющий собой *N*-концевой фрагмент исходного белка, а также гликопротеин с *M* 62 кДа. Последний является в свою очередь предшественником гликопротеинов E_2 и E_3 [193, 222, 223]. Вирионы содержат по 290–300 молекул каждого гликопротеина и столько же белка, связанного с РНК. Молекулы гликопротеинов E_1 и E_2 амфифильны, их гидрофобные С-концы (примерно 30–50 аминокислотных остатков) пронизывают двойной липидный слой и каким-то образом связаны с нуклеокапсидом [224–228, 242]. При действии протеолитических ферментов (бромелаина, термолитина) погруженная в липидный слой часть отщепляется от гликопротеинов E_1 и E_2 [226, 227, 229]. Гликопротеины E_1 и E_2 близки как по величине молекулярной массы, так и по аминокислотному и углеводному составу, но выполняют разные функции [225, 230, 231]. Гликопротеин E_1 является гемоглютинином и дает перекрестную реакцию с антисывороткой, полученной против различных альфа-вирусов. Гликопротеин E_2 типоспецифичен и взаимодействует только с антисывороткой, полученной против вируса, в состав которого он входит [232]. Этот гликопротеин, по-видимому, ответствен за гемолиз, слияние вируса с мембраной клетки хозяина и проникновение его в клетку.

Для сольubilизации гликопротеинов вирусов Синдбис и Семлики используют как ионные, так и неионные детергенты [230, 233–236],

дезоксихолат натрия [215], тритон X-100 [224, 225, 230, 234, 237–241], понидет NP-40 [241]. Методы выделения, очистки и характеристика этих вирусов освещены в ряде обзоров [242–244].

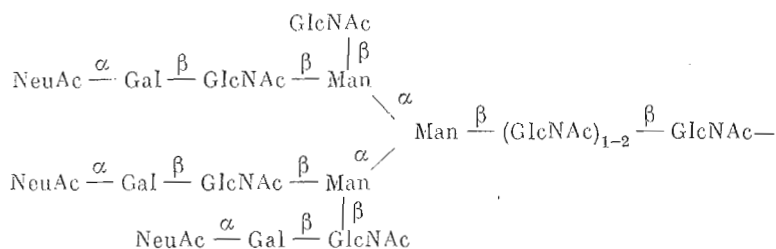
Для выделения отдельных гликопротеинов используют препаративный электрофорез в полиакриламидном геле [233, 245], метод электрофокусирования [232], центрифугирование в градиенте сахарозы, гель-хроматографию [225], хроматографию на оксиапатите [219] или стекловолочке [245]. Отмечаются большие трудности в разделении гликопротеинов E_1 и E_2 вируса Синдбис и в выделении из вируса гликопротеина E_2 [230]. Высказано предположение, что эти гликопротеины достаточно прочно нековалентно связаны друг с другом, а гликопротеин E_2 связан каким-то образом с нуклеокапсидом. Для выделения индивидуальных гликопротеинов используют также протеолитические ферменты — бромелаин или термолизин [226, 229, 231]. При этом получают гликопротеины, лишённые гидрофобного фрагмента, погруженного в мембрану.

Структуре гликопротеинов E_1 , E_2 и E_3 посвящено значительное число работ. Установлен их аминокислотный и углеводный состав [230, 231]. Углеводная часть построена из остатков GlcNAc, Man, Gal, Fuc, NeuAc. Первичная структура полипептидной цепи гликопротеинов не установлена. Изучены лишь N-концевые последовательности аминокислот гликопротеинов E_1 и E_2 вируса Синдбис [237]. Гликопротеины выделялись из вируса с помощью тритона X-100 с последующей хроматографией на стекловолочке. Состав этой части пептидной цепи (50 аминокислотных остатков) аналогичен составу других водорастворимых белков. N-Концевой аминокислотой гликопротеина E_1 является тирозин, а E_2 — серин. Углеводы в этой части полипептидной цепи отсутствуют, что отличает гликопротеины этого вируса от гемагглютинина вируса гриппа, в котором N-конец пептидной цепи обогащён углеводами [60].

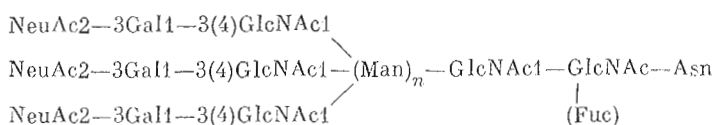
Для исследования структуры углеводных фрагментов вирусов Семлики и Синдбис использовались вирусы, содержащие радиоактивные сахара [132, 219, 246, 247]. Гликопротеины вируса Семлики разделяли с помощью препаративного непрерывного электрофореза [219, 134, 233] или других методов [219, 225, 232, 236, 248]. Гликопептиды, полученные после гидролиза с помощью проназы гликопротеинов [233, 246, 248] или исходного вируса [233, 235], хроматографировали на биогеле [223, 235] или DEAE-сефадексе [230, 246] и определяли соотношение гликопротеинов, содержащих углеводные цепи типа A и B [233, 235, 249], или выделяли отдельные гликопептиды и изучали их состав и принципы построения [230].

Наиболее обогащённым углеводами оказался гликопротеин E_3 (45% углеводов), в то время как гликопротеины E_1 и E_2 содержали 7,5 и 11,5% сахаров соответственно, причем в гликопротеинах E_3 и E_1 углеводные цепи только типа A, тогда как в гликопротеине E_2 имеются углеводные цепи обоих типов (A и B) [134]. Структура углеводных цепей гликопептидов изучалась путем последовательного отщепления моносахаридов с помощью гликозидаз. Результаты каждой ступени такой деградации оценивались только с помощью гель-хроматографии остающихся фрагментов.

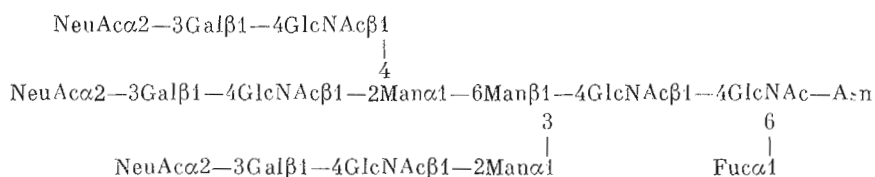
На основании полученных данных предложена следующая структура наиболее сложных углеводных цепей в гликопротеинах E_1 и E_3 вируса Семлики, которую никак нельзя считать доказанной.



ной цепи имеется гидрофильный участок (29 остатков аминокислот), обогащенный основными аминокислотами и содержащий остаток цистина, а за ним следует гидрофобный участок (20 аминокислот). Предполагается [262], что С-конец гликопротеина G пронизывает двойной липидный слой вириона так, что гидрофильный участок полипептидной цепи погружен внутрь вириона и каким-то образом взаимодействует с компонентами нуклеокапсида, а гидрофобный участок находится в мембране. Остальная часть полипептидной цепи гликопротеина G (около 90%), содержащая углеводы, выходит на внешнюю поверхность мембраны вириона [262]. Относительно предшественника гликопротеина G и его протеолитического расщепления в процессе биосинтеза сведений не имеется. В состав углеводных цепей гликопротеина G, как и в случае большинства других оболочечных вирусов, входят Man, Gal, Fuc, GlcNAc, NeuAc в соотношении 5:3:3:1:3 [255, 264]. Изучению механизма биосинтеза этой макромолекулы и особенно процессу гликозилирования посвящено значительное число работ [13, 16, 23—29, 45, 77, 263—265] (см. также раздел I). В результате этих работ было установлено, что в гликопротеине G имеются две углеводные цепи типа A. Были выделены промежуточные продукты биосинтеза этих цепей и установлены основные черты их строения. Первоначально структура олигосахаридных цепей была установлена химическими методами и с помощью гликозидаз [255, 257, 266]. Гликопротеин, содержащий радиоактивные сахара, расщеплялся с помощью проназы, и полученные гликопептиды фракционировались. Далее для установления структуры углеводных фрагментов гликопептидов использовались гликозидазы и периодатное окисление [265]. Отмечена гетерогенность олигосахаридов. Предложена структура углеводной цепи гликопротеина G.



Несколько позднее структура углеводных цепей гликопротеина G была окончательно доказана [255]. С этой целью в гликопротеин был введен остаток [$6\text{-}^3\text{H}$]GlcNAc. Два гликопептида, выделенные после гидролиза гликопротеина с помощью проназы, содержали углеводные цепи одного типа. Их структура была установлена с помощью набора соответствующих гликозидаз и периодатного окисления. При этом все промежуточные продукты распада выделялись, определялся их состав и для изучения структуры использовался метод метилирования. Кроме того, гликопептиды были подвергнуты гидразинолизу и структура полученных при этом олигосахаридов определялась с помощью метода метилирования, периодатного окисления и распада по Смиту, дезацетилирования и последующего дезаминирования остатка N-ацетилглюкозамина. В результате подтверждено, что гликопротеин G содержит две цепи типа A, и установлена первичная структура этих цепей:



При этом показано [255] отсутствие углеводных цепей, связанных с полипептидной цепью O-гликозидными связями через остатки серина и треонина, хотя ранее было высказано предположение [264] о возможности наличия в гликопротеине G углеводных цепей такого типа.

Таким образом, вирус везикулярного стоматита пока является единственным оболочечным вирусом, для гликопротеина которого строго установлена первичная структура углеводных цепей.

II.5. Семейство коронавирусов (*Coronaviridae*)

Из этого семейства наиболее полно изучен вирус А-59, который вызывает гепатит у мышей и более крупных животных. Вирионы этих вирусов по своей конструкции подобны вирионам других оболочечных вирусов. Нуклеокапсид включает одноцепочечную РНК с M 58–61 кДа и белок N с M 50 кДа [267]. На внешней поверхности липидной оболочки вирионов имеются три гликопротеина: ГП 180 (M 180 кДа), ГП 90 (M 90 кДа) и гликопротеин E_1 с M 23 кДа.

Исследование пептидных карт гликопротеинов ГП 90 и ГП 180 показало их полную идентичность, и поэтому их обозначают как гликопротеин E_2 . Следует заметить, что выращивание вируса в присутствии ингибитора протеиназ не сказывается на соотношении ГП 180 — ГП 90. Под действием трипсина *in vitro* ГП 180 расщепляется с образованием ГП 90 [268] без заметного увеличения инфекционности вируса, что находится в противоречии со свойствами других оболочечных вирусов. Например, в вирусе гриппа [9, 141] имеется прямая зависимость его инфекционности от степени специфического протеолитического расщепления предшественника гемагглютинина. Возможно, что ГП 180 является димером ГП 90, в котором связь между мономерами чувствительна к трипсину. Вопрос этот остается пока неясным.

Гликопротеин E_1 называют мембранным [269]. Он расположен не на внутренней поверхности липидной оболочки вириона, как мембранные белки других оболочечных вирусов [23, 71, 81], но он пронизывает липидный слой, и небольшая его часть (20%), обогащенная углеводами, выходит на поверхность вириона. Предполагают, что конец молекулы E_1 , пронизывающий оболочку вириона, связан каким-то образом с нуклеокапсидом.

Для выделения гликопротеинов из вируса используют обычно SDS [267, 268, 270], тритон X-100 или нонидет NP40 [269, 270]; гликопротеины разделяют с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

Углеродные цепи этого вируса построены из остатков Man, Gal, Fuc, GalNAc, GlcNAc, NeuAc [268, 270]. Такой уникальный для оболочечных вирусов мonosахаридный состав гликопротеинов коронавирусов обусловлен, по-видимому, тем, что их олигосахаридные цепи связаны с пептидным скелетом не только N-гликозидной связью, характерной для вирусов других семейств, но и O-гликозидной через остатки оксисаминанокислот.

Подтверждением этому служит тот факт, что при выращивании вируса в присутствии туникамицина — ингибитора N-гликозилирования полипептидов — углеводы не включались в гликопротеин E_2 , а только в E_1 . Это свидетельствовало о том, что гликозилирование последнего протекает по механизму, отличающемуся от механизма N-гликозилирования [270]. Щелочная деградация гликопротеина E_1 в условиях элиминирования углеводных цепей с остатков серина и треонина полипептидной цепи [271] привела к отщеплению олигосахаридов, содержащих остатки Gal, GlcNAc и GalNAc, что окончательно доказывало наличие в E_1 углеводных фрагментов, связанных с пептидной цепью O-гликозидными связями.

К сожалению, данные о структуре углеводных цепей гликопротеинов этих вирусов пока отсутствуют. Наличие одновременно двух типов углевод-пептидных связей в гликопротеинах вируса обнаружено впервые, и это позволило назвать коронавирусы вирусами нового типа [270].

Заключение

Из изложенных выше данных следует, что изучение структуры гликопротеинов — главных антигенов вируса — продвинулось в отдельных случаях достаточно далеко. Самым крупным достижением химии и биохимии в этой области является установление, главным образом на примере вируса гриппа, связи первичной структуры пептидной цепи гликопротеинов с иммунологической характеристикой вирусов и ее изменчивостью. В то же

время ни для одного гликопротеина вирусов не установлена пока полная первичная структура. Наиболее полно изучен один из гликопротеинов вируса гриппа — гемагглютинин. Установлена первичная структура полипептидной цепи и пространственная структура молекулы этого гликопротеина [60, 175], найдены точки присоединения углеводных цепей, но остается неизвестной их структура. Для главного антигена вируса везикулярного стоматита гликопротеина G установлена первичная структура углеводных фрагментов [239, 255], но лишь частично изучена структура пептидной цепи [43, 253, 261].

Остается еще много нерешенных вопросов, в их числе такие важные, как возможность вирусспецифической трансформации углеводных фрагментов гликопротеинов и роль углеводов в жизненном цикле вирионов. В настоящее время можно считать установленным, что биосинтез углеводных цепей гликопротеинов вирусов осуществляется ферментной системой инфицированной клетки, так как геном вируса не располагает информацией для кодирования синтеза гликозилтрансфераз. В то же время в ряде работ допускается вирусспецифическая модификация углеводной части гликопротеинов [12, 181, 249]. Результаты многочисленных работ, направленных на выяснение вопроса о вкладе собственного генетического аппарата вируса в биосинтез его олигосахаридных цепей, противоречивы. Эти исследования посвящены характеристике углеводных фрагментов гликопротеинов различных вирусов, выращенных в одних и тех же клетках, или одного какого-либо вируса, выращенного в различных клетках. Гликопротеины, содержащие радиоактивные сахара, выделяли из вируса тем или иным способом и расщепляли с помощью проназы. Полученные гликопептиды подвергали гель-хроматографии и определяли соотношение гликопептидов, содержащих углеводные цепи типа A и B, приблизительную молекулярную массу и в некоторых случаях состав фракций.

Таким образом было показано, например, что углеводные цепи гликопротеинов одного типа вируса (гриппа, везикулярного стоматита или Спидбис), выращенного на различных клетках, различаются только количеством входящей в их состав N-ацетилнейраминовой кислоты [30, 223, 236, 248]. В некоторых случаях в зависимости от условий отмечены различия в молекулярных массах углеводных цепей [94] и в соотношении углеводных цепей типа A и B [181, 246, 247]. В то же время гликопротеины различных вирусов, выращенных в одних и тех же клетках, также различаются соотношением углеводных цепей типа A и B [181]. Так, известно, что главный гликопротеин вируса везикулярного стоматита содержит две углеводные цепи типа A, состав которых практически не зависит от клетки, в которой выращен вирус [249, 258].

Выводы, которые можно сделать из приведенных работ, весьма неопределенны, так как колебания в содержании N-ацетилнейраминовой кислоты и даже более значительная гетерогенность углеводных цепей характерны для гликопротеинов различного происхождения [189]. Что касается изменения соотношения углеводных цепей типа A и B, то это в значительной степени, по-видимому, определяется структурой пептидной цепи (см., например, [94, 272]) гликопротеинов, которая изменяется не только от вируса к вирусу, но и от штамма к штамму вируса (см. с. 590).

Обращает на себя внимание независимое от клетки постоянство углеводных цепей гликопротеина вируса везикулярного стоматита [249, 258], но это показано только с помощью хроматографии. Этот важный вопрос о зависимости структуры углеводных компонентов вируса от типа вируса может быть решен только путем сопоставления первичной структуры углеводных фрагментов гликопротеинов различных вирусов и клеток хозяина.

Вторым серьезным вопросом, который требует своего разрешения, является выяснение роли углеводных фрагментов гликопротеинов вирусов в жизненном цикле вирионов. Одним из подходов к решению этого вопроса является использование соответствующих гликозидаз для отщепления углеводов с поверхности вирионов [273] или от гликопротеинов вируса [274]. При действии на вирус гриппа препарата гликозидаз из *Diplococcus pneumoniae* [274] удалось отщепить около 20—25% углеводов, при этом

темагглютинирующая способность и инфекционность вируса не изменялась. От гемагглютинина удаётся с помощью гликозидаз отщепить 50% углеводов без изменения его иммунологических свойств [273, 275], но при значительном снижении способности к гемагглютинации. Нейраминидазная активность при этом сохранялась [275]. Повторное действие гликозидаз не привело к дополнительному отщеплению углеводов. Углеводные цепи, содержащие фукозу, при этом не затрагивались. В обоих случаях углеводы отщеплялись частично, и четкие выводы сделать из полученных результатов не представляется возможным. В то же время на других вирусах показано [276], что удаление N-ацетилнейраминовой кислоты не сказывается на антигенности вирусов, а удаление галактозы и N-ацетилглюкозамина уничтожает антигенность.

Другим подходом к изучению функции углеводов в жизненном цикле вируса является использование ингибиторов гликозилирования при выращивании вируса. Такие ингибиторы, как туникамицин, глюкозамин, 2-дезоксиглюкоза и др., достаточно широко используются с этой целью при исследовании биологического значения гликозилирования различных гликопротеинов [173]. Полученные данные очень противоречивы. Показано [277, 278], что введение в инфицируемые клетки глюкозамина или 2-дезоксиглюкозы ингибирует образование инфекционного вируса леса Семлики и вируса Синдбис. С другой стороны, вирус везикулярного стоматита формируется при аналогичном ингибировании, при этом образуется негликозилированный белок [279]. Однако установлено, что негликозилированный гликопротеин G [280], а также негликозилированный гемагглютинин вируса гриппа [281] склонны при физиологической температуре к агрегации.

При выращивании вируса Синдбис на клетках, отличающихся дефицитом UDP-GlcNAc, образуется вирус с пониженной инфекционностью [277]. Отмечено, что эффективность ингибирования гликозилирования гликопротеинов вирусов зависит от клетки хозяина [282].

Показано, что отщепление от вируса везикулярного стоматита N-ацетилнейраминовой кислоты приводит к потере его инфекционности [277]. С другой стороны, сиалилирование вирионов гриппа приводит к потере агглютинирующей активности при сохранении инфекционности и нейраминидазной активности [277, 282—284].

Наиболее интересные результаты получены при ингибировании процесса гликозилирования гликопротеинов вирусов туникамицином, который ингибирует начальную стадию синтеза олигосахаридного блока на липидном носителе — присоединение N-ацетилглюкозаминилфосфата к фосфорилдолохолу. При частичном ингибировании гликозилирования с помощью туникамицина образуются гликопротеины с пониженным содержанием углеводов, но при этом в их состав входит меньшее число углеводных цепей, которые, однако, все достроены [182], что дополнительно подтверждает механизм действия ингибитора. Установлено [280], что туникамицин полностью подавляет образование частиц вируса леса Семлики и чумы птиц, но в первом случае синтез белка протекает нормально, а в вирусе чумы птиц наблюдается неспецифический протеолиз полипептидов. Неспецифическое расщепление полипептидных цепей гликопротеинов при ингибировании гликозилирования отмечалось и для других вирусов [12, 75, 285].

На основании данных, полученных при изучении влияния туникамицина на формирование и биологические свойства вирусов везикулярного стоматита, гриппа и Синдбис, высказано предположение, что углеводы могут играть важную роль в транспорте гликопротеинов на поверхность клетки и их внутриклеточную миграцию [280, 281, 286, 287]. Влияние углеводов на внутриклеточную миграцию отмечено и для других гликопротеинов [288, 289]. При этом на примере вируса везикулярного стоматита показано [280], что для одних штаммов углеводы необходимы для миграции гликопротеинов на поверхность клетки и формирования вирионов, другие штаммы менее чувствительны к отсутствию углеводов. Далее было показано, что ингибирование гликозилирования по-разному влияет

на формирование и биологические свойства вируса в зависимости от штамма вируса и температуры [279, 290, 291]; на этом основании высказано предположение, что углеводы ответственны за поддержание конформации антигенных гликопротеинов.

На примере вируса Семлики установлено [292—294], что при действии туникамицина параллельно изменению конформации полипептидной цепи гликопротеинов изменяется их иммунологическая характеристика. Небезынтересно, что восстановление дисульфидных связей в гликопротеинах этого вируса [295] сопровождается изменениями их конформации и иммунологических свойств, аналогичными тем, которые наблюдаются при ингибировании гликозилирования этих гликопротеинов. Результаты этих исследований хорошо согласуются с данными, полученными для гликопротеинов различного происхождения по влиянию углеводных фрагментов на конформацию молекулы [296—298]. В то же время известно, что ингибирование гликозилирования гликопротеинов не сказывается на формировании частиц вируса гриппа [299], хотя способность вируса к агглютинации резко падает. Следовательно, доля участия углеводов в формировании и поддержании необходимой конформации молекулы гликопротеинов для различных вирусов различна.

Известно, что для включения гликопротеина в плазматическую мембрану клетки и нормального функционирования вируса необходима вполне определенная конформация его полипептидной цепи [280, 290]. Различные вирусы и даже штаммы одного вируса имеют различную первичную и, по-видимому, пространственную структуру полипептидной цепи гликопротеинов; соответственно на них по-разному сказывается отсутствие углеводов. По-видимому, для некоторых гликопротеинов необходимая конформация полипептидной цепи возможна без участия углеводов, для других, и таких вирусов, очевидно, большая часть, в отсутствие углеводов конформация изменяется и, таким образом, углеводы опосредованно влияют на иммунологические свойства антигенных гликопротеинов вируса.

Таким образом, в настоящее время выявлены три основные линии влияния углеводов на жизненный цикл вирионов: 1) транспорт гликопротеинов на поверхность клетки и внутриклеточная миграция; 2) участие в формировании и поддержании необходимой для проявления иммунологических свойств конформации гликопротеинов; 3) защита полипептидной цепи гликопротеинов от неспецифического расщепления протеиназами клетки.

Однотипность функций N-связанных углеводных цепей в гликопротеинах различного происхождения [39, 279, 290, 292—294, 296—299], а также близость построения этих олигосахаридов, различающихся главным образом числом и местом детерминантных моносахаридов SA и Fuc, наводит на мысль, что перечисленные функции являются основными для N-связанных олигосахаридов гликопротеинов клеток различных организмов и лишь детерминантные моносахариды вносят различия в биологическую специфичность этих гликопротеинов.

Все эти вопросы требуют еще тщательного изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Negative strand viruses / Eds Mahy B. W. S., Barry R. D. N. Y.: Acad. Press, 1975, 947 p.
2. *Strauss J. H., Strauss E. G.* Molecular biology of animal viruses / Ed. Nayak D. P. New York — Basel — Marsel: Dekker Inc., 1977, v. 1, 546 p.
3. Общая и частная вирусология / Ред. Жданов В. М., Гайдемович С. Я. М.: Медицина, 1982, т. 1, 493 с.
4. Общая и частная вирусология / Ред. Жданов В. М., Гайдемович С. Я. М.: Медицина, 1982, т. 2, 339 с.
5. Биология вирусов животных / Ред. Феннер Ф., Мак-Ослен Б., Мимс С., Сэмбрук Дж., Уайт Д. М.: Мир, 1977, т. I, 447 с.
6. Биология вирусов животных / Ред. Феннер Ф., Мак-Ослен Б., Мимс С., Сэмбрук Дж., Уайт Д. М.: Мир, 1977, т. II, 624 с.
7. Structure and variation in influenza virus / Eds Lever G., Air G. N. Y.: Elsevier, 1980, 295 p.
8. Вирусы гриппа и грипп / Ред. Кильбурн Э. Д. М.: Медицина, 1978, 585 с.

9. Klenk H. D. In: The molecular basis of microbiol. pathogenicity/Eds Smith H., Skehel J., Turner M. Welnheim, 1980, p. 55-66.
10. Nakamura K., Herrler G., Petri T., Maier-Ewert H., Compans R. W. J. Virology, 1979, v. 29, p. 997-1005.
11. Prehm P., Scheid A., Choppin P. W. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 9669-9677.
12. Klenk H. D., Rott R. In: Corrent topics in microbiology and immunology, 1980, v. 90, p. 19-47.
13. Katz F. N., Rothman J. E., Lingappa V. R., Blobel G., Lodish H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 3278-3282.
14. Skehel J. J. Virology, 1972, v. 49, p. 23-36.
15. Stanley B., Candhi J. J., White D. B. Virology, 1973, v. 53, p. 92-106.
16. Rothman J. E., Ladish H. F. Nature, 1977, v. 269, p. 775-780.
17. Compans P. W. Virology, 1973, v. 55, p. 541-545.
18. Nagai Y., Ogura H., Klenk H. D. Virology, 1976, v. 69, p. 523-538.
19. Minor P. D., Hert J. C., Dimmock N. J. Virology, 1979, v. 97, p. 482-487.
20. Klie W., Klenk H. D., Schwarz R. T. J. Virology, 1979, v. 31, p. 253-256.
21. Schuchter H., Roseman S. In: The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans/Ed. Lennarz W. J. N. Y.: Plenum Press, 1980, p. 85-108.
22. Hubbard S. C., Ivatt R. S. Annu. Rev. Biochem., 1981, v. 50, p. 55-83.
23. Struck D. K., Lennarz W. J. In: The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans/Ed. Lennarz W. J. N. Y.: Plenum Press, 1980, p. 35-73.
24. Tabas I., Schlesinger S., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 716-722.
25. Li E., Tabas I., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 7762-7770.
26. Kornfeld S., Li E., Tabas I. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 7771-7778.
27. Tabas I., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 7779-7786.
28. Hunt L. A., Etchison J. R., Summers D. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 754-758.
29. Hunt L. A., Etchison J. R., Summers D. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 756.
30. Nakamura K., Compans R. W. Virology, 1979, v. 93, p. 31-47.
31. Sefton B. Cell, 1977, v. 10, p. 659-668.
32. Krag S. S., Robbins P. W. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 2621-2629.
33. Johnson J., Clamp J. R. Biochem. J., 1974, v. 123, p. 739-745.
34. Chapman A., Li E., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 10243-10249.
35. Wijay I. K., Perdeu G. H. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 11221-11226.
36. Wijay I. K., Perdeu G. H., Lewis D. E. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 11210-11220.
37. Hubbard S. C., Robbins P. W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 11782-11793.
38. Turco S. J., Stetson B., Robbins P. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 4411-4414.
39. Hubbard S. C., Ivatt A. J. Annu. Rev. Biochem., 1980, v. 50, p. 555-583.
40. Li E., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 2754-2758.
41. Das R. C., Heath E. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 3811-3815.
42. Blobel G., Sabatini D. D. In: Biomembrans/Ed. Manson L. A. N. Y.: Plenum Press, 1971, v. 2, p. 193-195.
43. Lingappa V. R., Katz F. N., Lodish H. F., Blobel G. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 8667-8670.
44. Elder K. T., Bye J. M., Skehel J. J., Waterfield M. D., Smith A. F. Virology, 1979, v. 95, p. 343-350.
45. Kruppa J. Biochem. J., 1979, v. 181, p. 295-300.
46. Blobel G., Dobberstein B. J. Cell Biol., 1975, v. 67, p. 835-851.
47. Marshall R. D. Annu. Rev. Biochem., 1972, v. 41, p. 673-702.
48. Bause E. FEBS Lett., 1979, v. 96, p. 179-182.
49. Bause E., Hettkamp H. FEBS Lett., 1979, v. 109, p. 341-344.
50. Eylar E. H. J. Theor. Biol., 1965, v. 16, p. 87-92.
51. Bause E., Legler G. Biochem. J., 1981, v. 195, p. 639-644.
52. Struck D. K., Lennarz W. S. In: The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans/Ed. Lennarz W. S. N. Y.: Plenum Press, 1980, p. 35-53.
53. Bause E., Hettkamp H., Leglar S. In: Glycoconjugates in Proc. of the Intern. Symposium on Glycoconjugates/Eds Yamakawa T., Osawa T., Handa S. Tokyo, 1981, p. 126-127.
54. Jackson R. L., Hirs H. W. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 624-635.
55. Понов Е. М., Лункин Г. М. Молекулярн. биология, 1971, т. 5, с. 624-636.
56. Lenstra J. A., Hotsteenge J., Beintema J. J. J. Mol. Biol., 1977, v. 109, p. 185-189.
57. Chou P. Y., Fasman G. D. Biochemistry, 1974, v. 13, p. 211-222.
58. Chou P. Y., Fasman G. D. Biochemistry, 1974, v. 13, p. 22-28.
59. Auberg J. P., Beserte G., Loucheux-Lefebvre M. H. Arch. Biochem. and Biophys., 1976, v. 175, p. 410-418.
60. Wilson I. A., Skehel J. J., Wiley D. C. Nature, 1981, v. 289, p. 366-378.
61. Deisenhofer J. Biochemistry, 1981, v. 20, p. 2361-2370.
62. Schachter H., Roseman S. In: The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans/Ed. Lennarz W. J. New York - London: Plenum Press, 1980, p. 85-126.
63. Wilson J. R., Williams D., Schachter H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 72, p. 909-916.
64. Heifetz A., Lennarz W. J. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 6119-6127.
65. Day J. F., Thornburg R. W., Thorpe S. R., Baynes J. W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 2360-2365.

66. Klenk H. D., Rott R., Orlich M. J. Gen. Virol., 1977, v. 36, p. 151-161.
67. Nagai J., Klenk H. D., Rott R. Virology, 1976, v. 72, p. 494-508.
68. Peluso R. W., Lamb R. A., Choppin P. W. J. Virol., 1977, v. 23, p. 177-187.
69. Kohama T., Shimizu K., Ishida N. Virology, 1978, v. 90, p. 226-234.
70. Hightower L. E., Morrison T. G., Bratt M. A. J. Virol., 1975, v. 16, p. 1599-1607.
71. Scheid A., Choppin P. W. J. Virol., 1973, v. 11, p. 263-271.
72. Huang R. T. C., Wahn K., Klenk H. D., Rott R. Virology, 1980, v. 104, p. 294-302.
73. Huang R. T. C., Wahn K., Klenk H. D., Rott R. Virology, 1979, v. 97, p. 212-217.
74. Hsu M., Scheid A., Choppin P. W. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 3557-3563.
75. Schwarz R. T., Rohzscheider J. M. J. Virol., 1976, v. 19, p. 782-791.
76. Schmidt M. F. G., Bracha M., Schlesinger M. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 1687-1691.
77. Schmidt M. F. C., Schlesinger M. J. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 3334-3339.
78. Шоппин П. В., Компанс Р. В. В кн.: Вирусы гриппа и грипп/Ред. Кильбурн Э. Д. М.: Медицина, 1978, с. 33-71.
79. Barnet F. M. Intervirology, 1979, v. 11, p. 201-214.
80. Meier-Ewert H., Herrler G., Negele A., Compans R. W. In: Structure and variation in influenza virus/Eds Laver W. G., Air G. N. Y.: Elsevier, 1980, p. 357-365.
81. Oxford J. S., Schild G. C. Virology, 1976, v. 74, p. 394-402.
82. Herrler G., Compans R. W., Meier-Ewert H. Virology, 1979, v. 99, p. 49-56.
83. Choppin P. W., Lazarowitz S. G., Goldberg A. R. In: Negative strand viruses/Eds Many B. M. J., Barry R. D. London - San Francisco: Acad. Press, 1975, v. 1, p. 106-119.
84. Compans R. W., Bishop D. H. L., Meier-Ewert H. J. Virol., 1977, v. 21, p. 658-665.
85. Maeda T., Asano A., Ohki K., Okada Y., Ohnishi S. I. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 3736-3741.
86. Klenk H. D., Rott R., Orlich M., Blödorn J. Virology, 1975, v. 68, p. 426-439.
87. Lazarowitz G., Choppin P. W. Virology, 1975, v. 68, p. 440-454.
88. Schulman J. L., Palese P. J. Virol., 1977, v. 24, p. 170-176.
89. Nakajima S., Sugiura A. Virology, 1980, v. 101, p. 450-457.
90. Brand C. M., Skehel J. J. Nature New Biol., 1972, v. 238, p. 145-147.
91. Wiley D. C., Skehel J. J. J. Mol. Biol., 1977, v. 112, p. 343-347.
92. Wiley D. C., Skehel J. J. Topics Infect. Dis., 1978, v. 3, p. 135-138.
93. Муканова Г. Н., Силяков М. С., Харитоненков И. Г. Вopr. вирусологии, 1981, т. 3, с. 275-280.
94. Nakamura K., Compans R. W. Virology, 1978, v. 86, p. 432-472.
95. Moyron L. W., Robest B., Winzler R. J., Refelson M. E. Arch. Biochem. and Biophys., 1961, v. 92, p. 475-481.
96. Kendal A. F., Biddle F., Belyavin G. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 165, p. 419-431.
97. Groome N. P., Belyavin G., Landsdell A., Ashford D. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 495, p. 58-70.
98. Cautracases P., Illiane G. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, v. 44, p. 178-184.
99. Kendal A. F., Eckert E. A. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 258, p. 484-495.
100. Lazdins I., Haslam E. A., White D. O. Virology, 1972, v. 49, p. 758-765.
101. Wrigley N. G., Skehel J. J., Charlwood P. A., Brand C. M. Virology, 1973, v. 51, p. 525-529.
102. Collins J. K., Knight C. A. J. Virol., 1978, v. 26, p. 457-467.
103. Wrigley H. G., Laver W. G., Dowhie J. E. J. Mol. Biol., 1977, v. 109, p. 405-421.
104. Drzeniek R., Seto J. T., Rott R. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 128, p. 547-558.
105. Seto J. T., Drzeniek R., Rott R. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 113, p. 402-404.
106. Laver W. G. Virology, 1978, v. 86, p. 78-87.
107. Wright C. E., Laver W. G. J. Mol. Biol., 1978, v. 120, p. 133-136.
108. Gulik-Krzywicki T. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 415, p. 1-28.
109. Helenius A., Simons K. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 415, p. 29-81.
110. Dunker A. K., Kenyon A. Biochem. J., 1976, v. 153, p. 191-197.
111. Brady M. I., Furminger I. G. S., Stones P. B. Postgraduate Med. J., 1976, v. 52, p. 368-372.
112. Brady M. I., Furminger I. G. S. J. Myg. Comb., 1976, v. 77, p. 161-172.
113. Gentsch J. R., Bishop D. H. L. J. Virol., 1979, v. 30, p. 767-770.
114. Bosch F. X., Mayer A., Huang R. T. C. Med. Microbiol., Immunol., 1980, v. 168, p. 249-259.
115. Baron C., Thompson T. E. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 282, 276-285.
116. Харитоненков И. Г., Закомырдин Ю. А., Григорьев В. Б., Себякин Ю. А., Волкова Л. В. Вopr. вирусологии, 1982, т. 3, с. 358-362.
117. Newcomb W., Brown J. C. J. Virol., 1981, v. 39, p. 295-299.
118. Webster R. G., Darlington R. W. J. Virol., 1969, v. 4, p. 182-187.
119. Gregoriades A. Virology, 1972, v. 49, p. 333-336.
120. Phelan M. A., Mayner R. E., Bucher D. S., Ennis F. A. J. Biol. Standart., 1980, v. 8, p. 233-242.
121. Hayman M. J., Skehel J. J., Crympton M. J. FEBS Lett., 1973, v. 29, p. 185-188.
122. Skehel J. J., Waterfield M. D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 93-97.
123. Laver W. G., Webster R. G. Postgraduate Med. J., 1976, v. 52, p. 373-379.
124. Laver W. G. J. Mol. Biol., 1964, v. 9, p. 109-124.

125. Bucher O. G., Li S. S. L., Kehoe J. M., Kilbourne E. D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 238-242
126. Bachmeyer H. Intervirology, 1975, v. 5, p. 260-272.
127. Харитоненков И. Г., Мукажанова Г. Н. Вopr. вирусологии, 1982, т. 2, с. 181-183.
128. Laver W. G. Virology, 1963, v. 20, p. 251-256.
129. Laver W. G. Virology, 1971, v. 45, p. 275-288.
130. Stenley P., Crook N. E., Streader L. C., Davidson B. E. Virology, 1973, v. 56, p. 640-645.
131. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980, с. 471.
132. Halmquist L., Nilsson G. Acta path. microbiol. Scand., 1979, v. 87B, p. 129-135.
133. Neville D. M. J. Biol. Chem., 1971, v. 246, p. 6328-6334.
134. Giesow M. J. Biochem. J., 1975, v. 151, p. 181-183.
135. Tozawa W., Watanabi M., Ishida N. Virology, 1973, v. 55, p. 242-253.
136. Bucher D. J. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 482, p. 393-399.
137. Харитоненков И. Г., Закомырдин Ю. А., Елизарова Г. В. Вopr. вирусологии, 1982, т. 2, с. 183-184.
138. Wiley D. C., Skehel S. S., Waterfield M. Virology, 1977, v. 79, p. 446-448.
139. Lazarowitz S. G., Compans R. W., Shoppin P. W. Virology, 1973, v. 52, p. 199-212.
140. Ward C. W., Dopheide Th. A. A. FEBS Lett, 1976, v. 65, p. 365-368.
141. Klenk H. D., Bosch F. X. In: 30 Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie / Eds Holzer H., Tschesche H. Mosbach / Baden, 1979, p. 139-149.
142. Bosch F. X., Orlich M., Klenk H. D., Rott R. Virology, 1979, v. 95, p. 197-207.
143. Flanagan M. T., Skehel J. J. FEBS Lett., 1977, v. 80, p. 57-60.
144. Klenk H. D., Rott R. J. Virol., 1973, v. 41, p. 823-831.
145. Waterfield M. D., Espélie K., Elder K., Skehel J. J. Brit. Med. Bull., 1979, v. 35, p. 57-63.
146. Ward C. W., Dopheide Th. A. A. Brit. Med. Bull., 1979, v. 35, p. 51-56.
147. Dopheide Th. A. A., Ward C. W. Eur. J. Biochem., 1979, v. 85, p. 393-398.
148. Ward C. W., Dopheide Th. A. A. Biochem. J., 1981, v. 193, p. 953-962.
149. Jackson D. C., Dopheide Th. A. A., Bussell R. J., Whiza D. O., Ward C. W. Virology, 1979, v. 93, p. 458-465.
150. Laver W. G., Webster R. G. Virology, 1973, v. 51, p. 383-391.
151. Bucher D. J., Kilbourne E. D. J. Virol., 1972, v. 40, p. 60-66.
152. Skehel J. J., Schied G. G. Virology, 1971, v. 44, p. 396-401.
153. Porter A., Webster R. G., Been W. J. Virology, 1980, v. 104, p. 235-238.
154. Jackson D. C., Russell R. S., Ward C. W., Dopheide Th. A. A. Virology, 1978, v. 89, p. 199-205.
155. Doheide Th. A. A., Ward C. W. Virology, 1979, v. 92, p. 230-235.
156. Ward C. W., Dopheide Th. A. A. Virology, 1979, v. 95, p. 107-118.
157. Ward C. W., Dopheide Th. A. A. Virology, 1980, v. 103, p. 37-53.
158. Dopheide Th. A. A., Ward C. W. FEBS Lett., 1980, v. 110, p. 181-183.
159. Min-Jou W., Verholyen M., Devos K. Cell, 1980, v. 19, p. 683-696.
160. Gething M. J., Bye J., Skehel J. J., Waterfield M. D. Nature, 1980, v. 287, p. 301-306.
161. Dopheide Th. A. A., Ward C. W. In: Structure and variation in influenza virus / Eds Laver W. G., Air G. N. Y.: Elsevier, 1980, p. 21-26.
162. Gething M. J., Bye J., Skehel J. J., Waterfield M. D. In: Structure and variation in influenza virus / Eds Laver W. G., Air G. N. Y.: Elsevier, 1980, p. 1-10.
163. Min-Jou W., Verholyen M., Devos R., Saman E., Huylebzolck D., Van Rompuy L., Fang R. X., Fiers W. In: Structure and variation in influenza virus / Eds Laver W. G., Air G. N. Y.: Elsevier, 1980, p. 63-68.
164. Sleight M. S., Both G. W., Brownlla G. G., Bender V. J., Moss B. A. In: Structure and variation in influenza virus / Eds Laver W. G., Air G. N. Y.: Elsevier, 1980, p. 69-78.
165. Scholtissek C. Virology, 1979, v. 93, p. 594-597.
166. McGloch D., Fillner P., Newton C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 3045-3049.
167. Nakayama R., Disselberger U., Palese P. Nature, 1979, v. 274, p. 334-339.
168. Laver W. G., Air G. M., Webster R. G., Gerhard W., Ward C. W., Dopheide Th. A. A. Virology, 1979, v. 98, p. 226-234.
169. Brownlle G. G. In: Structure and variation in influenza virus / Eds Laver W. G., Air G. N. Y.: Elsevier, 1980, p. 385-390.
170. Laver W. G., Air G. M., Dopheide Th. A. A., Ward C. W. Nature, 1980, v. 283, p. 454-457.
171. Verholyen M., Fang R., Min-Jou W., Devos R., Haylbrolek D., Samon E., Fiess W. Nature, 1980, v. 286, p. 771-776.
172. Laver W. G., Gerhard W., Webster R. G., Frankel M. E., Air G. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 1425-1429.
173. Schwarz R. T., Datema R. Trends in Biochem. Sci., 1980, v. 5, p. 65-67.
174. Waterfield M., Scrace G., Skehel J. J. Nature, 1980, v. 289, p. 422-429.
175. Willey D. C., Wilson I. A., Skehel J. J. Nature, 1981, v. 289, p. 373-378.
176. Ward C. W., Gleeson P. A., Dopheide Th. A. A. Biochem. J., 1980, v. 189, p. 649-652.
177. Klenk H. D. Choppin P. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 66, p. 57-64.
178. Klenk H. D., Compans R. W., Choppin P. W. Virology, 1970, v. 42, p. 1158-1162.
179. Nerome K., Ishida M., Nakayama M. Arch. Virol., 1976, v. 50, p. 241-244.
180. Klenk H. D., Keil W., Niemann H., Schwarz R. T. In: Glycoconjugates in Proc. of

- the Intern. Symposium on Glycoconjugates/Eds Jamakawe T., Osawa T., Handa S. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1981, p. 16-17.
181. Nakamura K., Compans R. W. *Virology*, 1979, v. 95, p. 8-23.
 182. Schwarz R. T., Schmidt M. F. D., Anver U., Klenk H. D. *J. Virol.*, 1977, v. 23, p. 217-226.
 183. Zinn A. B., Plantner J. J., Carlson D. M. In: *Glycoconjugates*/Eds Horowitz M. I., Pigman W. New York - San Francisco - London: Acad. Press Inc., 1977, p. 69-83.
 184. Ward C. W., Downie J. C., Brown L. F., Jackson D. C. In: *Structure and variation in influenza virus*/Eds Laver W. G., Air G. N. Y.: Elsevier, 1980, p. 233-241.
 185. Downie J. C. *J. Gen. Virol.*, 1978, v. 41, p. 283-293.
 186. Huang R. T. C. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1976, v. 162, p. 169-173.
 187. Nakamura K., Compans R. W. *Virology*, 1977, v. 79, p. 381-392.
 188. Compans R. W., Pinter A. *Virology*, 1975, v. 66, p. 151-160.
 189. Endo Y., Yamashita K., Jachibana Y., Jojo Sh., Kobata A. *J. Biochem.*, 1979, v. 85, p. 669-675.
 190. Derevitskaya V. A. *Pure Appl. Chem.*, 1981, v. 53, p. 89-106.
 191. Furthmayr H., Galardy R. E., Tomita M., Marchesi V. T. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1978, v. 185, p. 21-29.
 192. Field J., Winter G., Brownlee G. G. *Nature*, 1981, v. 290, p. 213-217.
 193. Schlesinger M. J., Schlesinger S., Burge B. W. *Virology*, 1972, v. 47, p. 539-541.
 194. Tomita M., Marchesi V. T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, v. 47, p. 2964-2968.
 195. Rabb R. J., Terhorst C., Strominger J. L. *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, p. 5319-5324.
 196. Rose J. K., Welch W. J., Setton B. M., Esch F. S., Ling N. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, p. 3884-3888.
 - 196a. Brunner J., Hauser H., Braun H., Wieson K. J., O'Nelli B., Semenza G. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, p. 1821-1828.
 197. Maroux S., Lauvard D. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 419, p. 189-195.
 198. Букер Д., Палеюзу П. В кн.: *Вирусы гриппа и грипп*/Ред. Кильбуры Э. Д. М.: Медицина, 1978, с. 109-155.
 199. Mountcastle W. E., Compans R. W., Choppin P. W. *J. Virol.*, 1971, v. 7, p. 47-52.
 200. Scheid A., Coliguirri L. A., Compans R. W., Choppin P. W. *Virology*, 1972, v. 50, p. 640-652.
 201. Seto J. T., Becht H., Rott R. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1973, v. 159, p. 1-12.
 202. Anttonen O., Jakinen M., Salmi A., Vainionpaa R., Gahmberg C. G. *Biochem. J.*, 1980, v. 185, p. 189-194.
 203. Nagai J., Klenk H. D. *Virology*, 1977, v. 77, p. 125-134.
 204. Scheid A., Choppin P. W. *Virology*, 1974, v. 57, p. 457-490.
 205. Homma N., Ohuchi M. *J. Virol.*, 1973, v. 12, p. 1457-1465.
 206. Samson A. C. R., Fox C. F. *Virology*, 1973, v. 12, p. 579-587.
 207. Ozawa M., Acano A., Okada J. *J. Biochem.*, 1979, v. 86, p. 1361-1369.
 208. Scheid A., Choppin P. W. *Virology*, 1976, v. 69, p. 265-277.
 209. Whitto J. M., Watersfield B. D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, p. 2737-2740.
 210. Maeda T., Asano A., Okada Y., Ohnishi S. I. *J. Virol.*, 1977, v. 21, p. 232-241.
 211. Diringer H., Rott R. *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 65, p. 155-160.
 212. Pinter A., Compans R. W. *J. Virol.*, 1976, v. 16, p. 859-866.
 213. Yoshima H., Nakanishi M., Okada J., Kobata A. In: *Glycoconjugates in Proc. of the 6th Intern. Symposium on Glycoconjugates*/Eds Yamakawe T., Osawa T., Handa S. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1981, p. 116-117.
 214. Garegg P. S., Lindberg B., Onn T., Sutherland I. W. *Acta chem. scand.*, 1971, v. 25, p. 2103-2108.
 215. Garoff H., Simons K. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 436, p. 319-331.
 216. Laine R. *Intervirology*, 1973, v. 1, p. 110-118.
 217. Pfefferkorn E. R., Hunter H. S. *Virology*, 1963, v. 20, p. 433-445.
 218. Simons K., Kaariainen L. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1970, v. 38, p. 981-988.
 219. Garoff H., Simons K., Renkonen O. *Virology*, 1974, v. 61, p. 493-504.
 220. Lachmi B. *J. Virol.*, 1975, v. 16, p. 1615-1629.
 221. Kaariainen L., Renkonen O. In: *Cell Surface Reviews*, 1977, v. 4, p. 758-760.
 222. Simons K., Keranen S., Kaariainen L. *FEBS Lett.*, 1973, v. 29, p. 87-91.
 223. Strauss J. H., Burge B. W., Darnell J. E. *J. Mol. Biol.*, 1970, v. 47, p. 437-481.
 224. Garoff H., Simons K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, p. 3988-3992.
 225. Helenius A., Bonsdorff C. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 436, p. 895-899.
 226. Utermann G., Simons K. *J. Mol. Biol.*, 1974, v. 85, p. 569-587.
 227. Garoff H., Soderlund H. *J. Mol. Biol.*, 1978, v. 124, p. 535-549.
 228. Utermann G., Simons K. *FEBS Lett.*, 1972, v. 28, p. 179-182.
 229. Wirth D. F., Katz F., Small B., Lodish H. F. *Cell*, 1977, v. 10, p. 253-263.
 230. Burke D. J., Keegstra K. *J. Virol.*, 1976, v. 20, p. 676-686.
 231. Sefton M. M., Keegstra K. *J. Virol.*, 1974, v. 14, p. 522-530.
 232. Dalrymple J. M., Schlesinger S., Russel P. P. *Virology*, 1976, v. 69, p. 93-103.
 233. Matilla K., Luukkonen A., Renkonen O. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 419, p. 435-444.
 234. Ziemilski A., Garoff H. *J. Mol. Biol.*, 1978, v. 122, p. 259-269.
 235. Pesonen M., Renkonen O. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 455, p. 510-525.
 236. Hakimi J., Atkinson P. H. *Biochemistry*, 1980, v. 19, p. 5619-5624.
 237. Bell J. R., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Strauss J. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, p. 2722-2726.

238. *Helenius A., Soderbund H.* Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 307, p. 287-300.
239. *Morein B., Helenius A., Simons K.* Nature, 1978, v. 276, p. 715-718.
240. *Simons K., Keranen S. J.* Mol. Biol., 1973, v. 80, p. 119-133.
241. *Strauss J. H., Burge B. W., Pfefferkorn E. R., Darnell J. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, v. 59, p. 533-537.
242. *Strauss J. H., Strauss E. G.* Molecular Biolog. Animal Viruses/Ed. Marcel Dekker. New York - Besel, 1977, v. 1, p. 111-166.
243. *Lenard J.* Annu. Rev. Biophys. and Bioeng/Ed. Nayak D. P., 1978, v. 7, p. 39-92.
244. *Kaariainen L., Kenkonen O.* In: Cell Surface Reviews. Amsterdam.- Oxford: North-Holland Publishing Company, 1977, v. 4, p. 741-801.
245. *Garoff H., Schwarz R. T.* Nature, 1978, v. 274, p. 484-490.
246. *Burke D. J., Keegstra K. J.* Virol., 1979, v. 29, p. 546-554.
247. *Hakimi J., Corver J., Atkinson P. H.* Biochemistry, 1981, v. 20, p. 7314-7319.
248. *Keegstra K., Sefton B. M., Burke D. J.* Virol., 1975, v. 16, p. 613-620.
249. *Sefton B. M. J.* Virol., 1976, v. 17, p. 85-93.
250. *Феннер Ф., Ман-Ослави Б., Мимс С., Сэмбрук Дж., Уайт Д.* Биология вирусов животных. М.: Мир, 1977, т. 1, с. 171-176.
251. *Каверин Н. В.* В кн.: Общая и частная вирусология / Ред. Жданов В. М., Гайдемович С. Я. М.: Медицина, 1982, т. 2, с. 224-226.
252. *Nagner R. R., Emerson S. U., Imblum R. L., Kelley J. M.* In: Negative strand viruses/Eds Mahy M. W., Barry R. D. Virginia USA, 1975, v. 1, p. 1-24.
253. *Schnitzer T. J., Lodish H. F. J.* Virol., 1979, v. 29, p. 443-447.
254. *Kelley J. M., Emerson U., Wagner R. R. J.* Virol., 1972, v. 10, p. 1231-1235.
255. *Reading Ch. L., Penhoet E. E., Ballou C. E. J.* Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 5600-5612.
256. *Hunt L. A. J.* Virol., 1980, v. 35, p. 362-370.
257. *Atkinson P. H., Summers D. F. J.* Virol., 1976, v. 18, p. 167-175.
258. *Etchison J. R., Holland J. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 4011.
259. *Schmidt M. F. G., Schlesinger M. J.* Cell, 1979, v. 17, p. 813-819.
260. *Irving R. A., Toniguzzo F., Rhee S. H., Hofmann Th., Chosh H. P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 570-574.
261. *Etchison J. R., Holland J. J.* Virology, 1974, v. 60, p. 217-229.
262. *Kose J. K., Welch W. J., Sefton B. M., Esch F. C., Ling N. C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 3884-3888.
263. *Toniguzzo F., Chosh H. P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 1516-1520.
264. *Toniguzzo F., Chosh H. P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 715-719.
265. *Etchison J. R., Summers D. F. J.* Virol., 1976, v. 19, p. 871-878.
266. *Etchison J. R., Robertson J. S., Summers D. F.* Virology, 1977, v. 78, p. 375-392.
267. *Sturman L. S.* Virology, 1977, v. 77, p. 637-649.
268. *Sturman L. S.* Virology, 1977, v. 77, p. 650-660.
269. *Sturman L. S. J.* Virol., 1980, v. 33, p. 449-462.
270. *Nieman H., Klenk H. D.* In: Biochemistry and biology coronaviruses/Eds Menlen V., Siddel St., Wege H. Plenum Press, 1981, p. 1-13.
271. *Carlson D. M. J.* Biol. Chem., 1968, v. 243, p. 616-626.
272. *Nakamura K., Bhowan A. S., Compans R. W.* Virology, 1981, v. 107, p. 208-221.
273. *Харитоненков И. Г.* Вопр. вирусологии, 1981, т. 3, с. 262-271.
274. *Collins R. J. K., Knight C. A. J.* Virol., 1978, v. 27, p. 164-171.
275. *Березин В. Э., Колесников В. В., Харитоненков И. Г.* Вопр. вирусологии, 1979, т. 6, с. 624-631.
276. *Eldik L. J. V., Paulson J. C., Green R. W., Smith R. E.* Virology, 1978, v. 86, p. 193-204.
277. *Schlesinger S., Gottlieb Ch., Flie P., Geld N., Kornfeld S. S. J.* Virol., 1976, v. 17, p. 239-241.
278. *Gibson R., Schlesinger S., Kornfeld S. J.* Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 3600-3607.
279. *Scholtissek C., Rott R., Hau R., Kaluza G. J.* Virol., 1974, v. 13, p. 1186-1193.
280. *Chatis P. A., Morrison T. G. J.* Virol., 1981, v. 37, p. 307-316.
281. *Compans R. W., Nakamura K., Roth M. G., Holloway W. L., Kemp. M. C.* In: Structure and variation in influenza virus/Eds Laver W. G., Air G. N. Y.: Elsevier, 1980, p. 223-232.
282. *Schulze I. T.* Virology, 1978, v. 88, p. 314-324.
283. *Lakshmi M. V., Schulze I. I.* Virology, 1978, v. 88, p. 314-324.
284. *Schwarz R. T., Ronrschneider J. M., Schmidt M. F. G. J.* Virol., 1976, v. 19, p. 782-791.
285. *Marnell L. L., Wartz G. W.* Virology, 1979, v. 98, p. 88-98.
286. *Leavitt R., Schlesinger S., Kornfeld S. J.* Virol., 1977, v. 21, p. 375-385.
287. *Leavitt R., Schlesinger S., Kornfeld S. J.* Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 9018-9023.
288. *Bergman L. W., Harris E., Kuehl W. M. J.* Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 701-706.
289. *Sidman Ch., Potash M. J., Köhler G. J.* Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 13180-13187.
290. *Gibson R., Leavitt R., Kornfeld S., Schlesinger S. Cell*, 1978, v. 13, p. 671-679.
291. *Gibson R., Kornfeld S., Schlesinger S. J.* Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 456-462.
292. *Kaluza G., Rott R., Schwarz R.* Virology, 1980, v. 102, p. 286-299.
293. *Kaluza G., Scholtissek C., Rott R. J.* Gen. Virol., 1972, v. 14, p. 251-259.
294. *Kaluza G.* Virology, 1975, v. 16, p. 602-612.
295. *Kaluza G., Pauli G.* Virology, 1980, v. 102, p. 300-309.
296. *Klaine R., Shmakowa F. V., Lapuk V. A., Vicha G. V., Kaverzneva E. D.* Immunochimistry, 1975, v. 12, p. 825-831.
297. *Wang F. F., Hirst C. H. W. J.* Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 8358-8364.

298. *Chu F. K., Tremble R. B., Maley F. J.* Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 8691-8693.
299. *Nakamura K., Compans R. W.* Virology, 1978, v. 84, p. 303-319.

Поступила в редакцию
3.IX.1982
После доработки
11.XI.1982

GLYCOPROTEINS OF RNA-CONTAINING ENVELOPED VIRUSES

DEREVITSKAYA V. A.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Literature on the structure and biosynthesis of glycoproteins, main antigens of enveloped viruses, is summarised. Methods of selective solubilization, isolation and identification of glycoproteins are analyzed. Data on structure elucidation of their peptide and carbohydrate components as well as current views on the biosynthesis of glycoproteins, whose carbohydrate chains are linked to a peptide skeleton by the N-glycosidic bond, are presented. Biological role of the carbohydrate chains in such glycoproteins is discussed.