

В. Х. Герлих

ЗНАЧЕНИЕ УЧАСТКОВ ПРЕ-S И ПРЕ-C В ГЕНОМЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В¹

Отдел медицинской микробиологии, Университет г. Геттингена, ФРГ

После того как стала известна полная последовательность нуклеотидов ДНК вируса гепатита В (HBV), оказалось возможным идентифицировать четыре открытые рамки считывания (ОРС) (рис. 1). Две из них удалось легко связать с известными вирусными белками. Поскольку уже были известны N- и С-концевые последовательности основного белка вирусной оболочки (P24/GP27), последовательность из 226 кодонов могла быть идентифицирована как ген, кодирующий этот белок. Неожиданностью явилось то обстоятельство, что ген S образовал только С-концевую часть соответствующей ОРС, состоящей из 400 кодонов; последняя получила название «района S». 5'-концевая последовательность района была обозначена пре-S [17]. Сходный феномен был обнаружен для ОРС, кодирующей бе-

лок кода вирусной частицы. В трансформированных штаммах *E. coli* продукт, кодируемый этой ОРС, обладал антигенными и физическими свойствами белка вирусного кока. Впоследствии, однако, было установлено, что для экспрессии белка кока не нужны первые 29 кодонов данной ОРС [2], и вследствие этого район С был разделен на зону пре-С и собственно ген С. В настоящем сообщении суммированы некоторые последние данные, полученные при изучении двух вышеуказанных зон генома HBV — пре-S и пре-С.

Структура и функция белков, кодируемых зоной пре-S. В последние годы стало очевидным, что P24/P27S не являются единственными белками, входящими в состав вирусной оболочки. Только из этих белков состоит материал вирусной оболочки, синтезируемый в избытке, — поверхностный антиген гепатита В¹ (HBsAg), полученный из плазм, в которых HBV не обнаруживается. HBsAg, полученный от носителей HBV с выраженной вирусемией, содержит также пару гликопротеинов GP33/36 большей молекулярной массы [12]. Оболочка самих вирусных частиц и филаментозные формы HBsAg дополнительно содержат пару белков P39/GP42 еще большей молекулярной массы [12]. Оболочка самих вирусных частиц и филаментозные формы HBsAg дополнительно содержат пару белков P39/GP42 еще большей молекулярной массы [2]. Изучение биохимических и иммунологических свойств всех этих белков оболочки позволило осуществить их картирование (рис. 2) [2, 3, 13].

Проведение этих исследований показало, что деление района S на ген S и зону пре-S является искусственным,

¹ Доклад на международном симпозиуме, проходившем в сентябре 1985 г. в институте вирусологии им. Д. И. Иванковского АМН СССР.

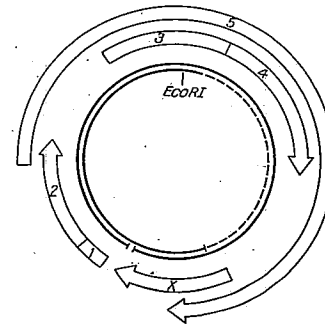


Рис. 1. Положение последовательностей пре-S и пре-С на генетической карте HBV (упрощенный вариант схемы [17]).
1 — пре-С, 2 — кор, 3 — пре-S, 4 — поверхностный антиген, 5 — обратная транскриптаза.

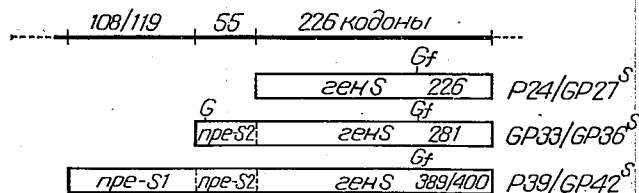


Рис. 2. Строение района S и положение 3 пар белков оболочки.
G — связанный с N-концом гликан, богатый маннозой; Gf — связанный с N-концом факультативный гликан.

поскольку весь этот район обладает кодирующей способностью, и в состав вирусной оболочки входят полипептиды, отражающие полную последовательность района S. Наличие нескольких белков оболочки обусловлено присутствием в пределах района S трех точек инициации транскрипции. Белок наибольшего размера кодируется последовательностью, начинающейся с проксимального первого иницирующего кодона. Образование транскрипта для белка среднего размера начинается со второго иницирующего кодона в положении 108 или 119 от 5' конца района пре-S. Белок наименьшего размера, являющийся основным компонентом HBsAg, кодируется последовательностью, начинающейся с третьего иницирующего кодона, расположенного через 55 нуклеотидов от второго иницирующего кодона. Синтез транскриптов для всех трех белков прекращается на едином терминирующем кодоне; все эти три белка содержат аминокислотную последовательность, соответствующую полной последовательности гена S. Наличие двойного набора трех белков оболочки объясняется факультативным гликозилированием, проходящим в точке, соответствующей кодону 146 гена S.

Три точки инициации транскрипции делят район S на три участка, которые получили названия пре-S1, пре-S2 и ген S. Два белковых домена, кодируемых пре-S, образуют легко идентифицируемые структуры на поверхности вирионов и HBsAg. Они легко удаляются протеазами [2]. Домен, кодируемый пре-S2, несет рецептор для модифицированного человеческого сывороточного альбумина [3], который в свою очередь имеет сродство к клеткам печени [16]. Возможно, что домен пре-S1 непосредственно обладает аффинитетом к клеткам печени человека (R. Neurath; личное сообщение). Оба домена пре-S, вероятно, участ-

вуют при адсорбции и внедрении HBV в клетку-мишень.

В отличие от домена, кодируемого геном S, домены пре-S1 и пре-S2 гидрофильны и не образуют дисульфидных связей. Экспрессия аминокислотных последовательностей этих доменов может быть легко получена в бактериальных [18] или эукариотических [6] системах; возможен также их химический синтез [9]. Полученные последовательности высокоиммуногенны для экспериментальных животных [7, 9, 18] и, возможно, для человека (неопубликованные результаты). Иммунизация шимпанзе комплексным белком, состоящим из домена пре-S1 и бактериального пептида, защищает животных от введения HBV (G. Sninsky, личное сообщение).

Описанные выше данные свидетельствуют, что белки, кодируемые зонами пре-S1 и пре-S2, являются протективными антигенами. Возможно, что использование этих белков позволит значительно повысить эффективность вакцинации против гепатита.

Структура кора и e-антигена. Поразительное свойство белка кора HBV (HBc) заключается в его неоднородности, выражающейся в проявлении антигенности HBcAg и HBeAg. Получение HBeAg из рекомбинантного белка кора позволило решить загадку его происхождения [5]: HBeAg представляет собой частично развернутый и деградированный белок HBc. Тем не менее некоторые важные клинические наблюдения, касающиеся HBeAg, остаются до сих пор непонятными: почему HBeAg в сыворотках крови является маркером выраженной вирусности? Каким образом анти-HBe защищает от инфекции, вызываемой HBV [8, 11], или подавляют выраженную вирусность? Также остается неясным, является ли HBeAg в сыворотке расторможенным продуктом деградации HBV или инфицированных клеток печени, или же он секретируется активно. Не-

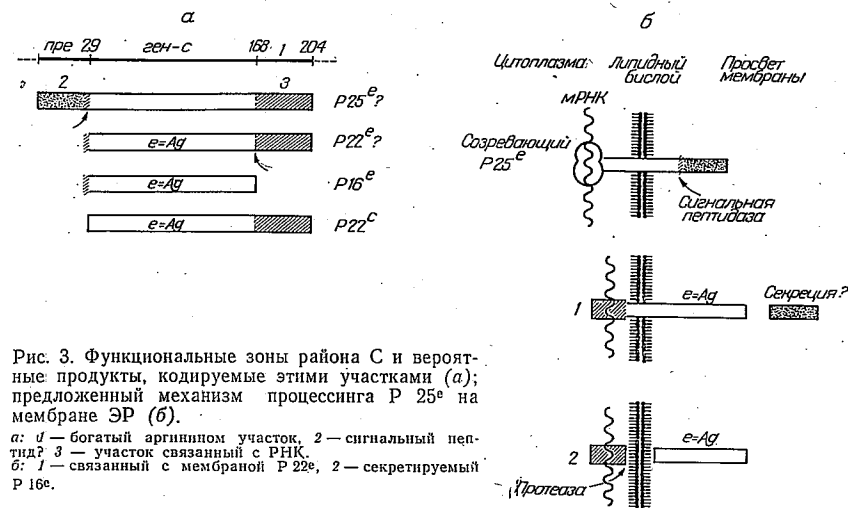


Рис. 3. Функциональные зоны района С и вероятные продукты, кодируемые этими участками (а); предложенный механизм процессинга Р 25^е на мембране ЭР (б).

а: 1 — богатый аргинином участок, 2 — сигнальный пептид; 3 — участок связанный с РНК.
б: 1 — связанный с мембраной Р 22^е, 2 — секретируемый Р 16^е.

выяснен механизм образования HBeAg из первичного продукта транскрипции.

В крови носителей с вирусемией HBeAg представлен в виде укороченного белка кора Р 16^е, который может находиться в непрочной связи с IgG или другими белками сыворотки. Его С-конец находится перед богатым аргинином, состоящим из 36 кодонов доменом полного белка кора Р 22^е, который связывает нуклеиновые кислоты [15]. Частицы кора из печени [1] или из вирионов (неопубликованные данные) состоят только из белка Р 22^е. Белок большего размера — Р 25^е, который бы содержал дополнительно последовательность пре-С, до сих пор не обнаружен. Если Р 25^е вообще синтезируется, то он, видимо, подвергается быстрому процессингу.

Первые данные, указывающие на возможную роль последовательности пре-С, были получены в экспериментах по экспрессии района С в генетически трансформированных *E. coli*. Как уже отмечалось выше, для экспрессии в этих условиях HBeAg и частиц кора, сходных с таковыми, обнаруживаемыми в инфицированной печени, достаточно гена С [2]. Мы обнаружили, что экспрессия гена С-зоны пре-С ведет к синтезу значительных количеств Р 25^е, однако этот белок не образует частиц кора или HBcAg. Вместо этого данный полипептид обладает сродством к бактериальной

мембране и проявляет иммунологическую активность HBeAg, т. е. соответствует обозначению Р 25^е. Этот же полипептид, тем не менее, сохраняет способность связывать РНК или ДНК (неопубликованные данные).

Возможное участие пре-С в поддержании состояния вирусемии. Хотя Р 25^е и не секретируется бактериальной клеткой, его свойства, измененные по сравнению с Р 22^е, позволили нам предположить, что последовательность пре-С в зараженных клетках печени может вести себя как сигнальный пептид (рис. 3, а). Сигнальные пептиды являются необходимым интегральным компонентом секретируемых, или мембранных белков. Они состоят из 20—30 большей частью гидрофобных аминокислот и обычно локализируются на N-конце белка. Эти пептиды вызывают перемещение растущей полипептидной цепи из цитоплазмы к просвету эндоплазматического ретикулума (ЭР) и в течение этого процесса часто отрываются сигнальной пептидазой. Секретируемые белки переносятся через мембрану полностью. Перенос мембранных белков останавливается из-за наличия в их молекулах гидрофобной последовательности, за которой следуют гидрофильные аминокислоты. Благодаря этому у мембранных белков имеется внешний и цитоплазматический домены. У Р 25^е типичной стоп-последовательности не имеется, однако С-концевой домен, обладающий значительным зарядом, может

предотвращать полный перенос этого белка.

Согласно модели, представленной на рис. 3, б, полипептид Р 25^е переносится через мембрану до положения 168 кодона, вследствие чего домен из 36 кодонов, способный связываться с нуклеиновыми кислотами, остается в цитоплазме клетки. В этом случае основная часть последовательности пре-С удаляется сигнальной пептидазой и вместо полипептида Р 25^е возникает пептид Р 22^е. Пептид Р 22^е в отличие от Р 22^с-продукта гена С связан с клеточной мембраной. Если предложенная модель соответствует действительности, то последовательность пре-С должна служить в качестве мембранного якоря, соединяющего частицу кора с формирующейся вирусной оболочкой. Частицы кора и Р 22^с, очевидно, имеют сходство к клеточному ядру, в пределах которого происходит их накопление. Однако, чтобы связать прегеномную РНК HBV [18] с мембраной ЭР достаточно 1 молекулы Р 22^е. Сборка частиц кора, по-видимому, осуществляется при связывании свободно диффундирующих цитоплазматических молекул Р 22^с с прегеномной РНК. Такие связанные с мембраной частицы кора, очевидно, затем покрываются оболочкой и секретируются в виде зрелых частиц HBV.

Логичным следствием предложенной модели является возможность появления в клетках, продуцирующих HBV, избыточного числа молекул Р 22^е, присутствующих в виде связанного с мембраной HBeAg. В данной форме этот полипептид должен образовывать мишень для иммунной атаки, специфичной в отношении HBeAg. Данный элемент модели способен объяснить защитную роль анти-HBe. В этом случае анти-HBe должны рассматриваться в качестве антител, направленных против клеток, зараженных HBV.

Предложенная модель также объясняет факт присутствия в сыворотке крови Р 16^е. Строение С-конца белка Р 16^е объясняет, что предшественник подвергся расщеплению трипсиноподобной тканевой протеазой. Обработка частиц кора трипсином или клост-

рипином вызывает образование фрагментов, отличных от Р 16^е, из-за того, что участок расщепления, обеспечивающий появление последнего, защищен (неопубликованные данные). Таким образом, весьма вероятно, что Р 16^е не возникает из Р 22^с, который либо быстро утилизируется при формировании частиц кора, либо расщепляется на другие фрагменты. Если богатый аргинином цитоплазматический домен Р 22^с отщепляется, то оставшийся Р 16^е должен полностью перемещаться в просвет ЭР или подвергаться секреции.

Лица с вирусемией, по-видимому, обладают толерантностью к HBeAg из-за присутствия в их сыворотке высоких титров HBeAg. Исчезновение HBeAg из сыворотки обычно сопряжено с исчезновением вирусемии. Последний процесс часто сопровождается повреждением клеток печени. Логично высказать предположение, что большие количества секретируемого HBeAg отвлекают на себя иммунную систему, не позволяя ей атаковать клетки печени, несущие HBeAg. Обе гипотетические функции Р 25^е — мембранная якорная и секреция HBeAg — должны заключаться в обеспечении поддержания персистентной вирусемии. Результатом нарушения одной или обеих этих функций явится остановка созревания вируса и его секреции.

В момент своего появления предложенная модель почти не имела фактического подкрепления, однако недавно Oh и Rutter (личное сообщение) удалось показать, что клетки животных, экспрессирующие Р 25^е, действительно секретируют HBeAg и содержат HBeAg, связанный с мембраной. В клетках, экспрессирующих Р 22^с, напротив, образуется ядерный и цитоплазматический HBcAg. В настоящее время проводятся дальнейшие исследования, направленные на изучение высказанной гипотезы.

Приведенные неопубликованные данные были получены совместно с V. Bruss, U. Goldman, K. H. Heermann, H. Köchel, A. Uy. Приношу благодарность проф. Thomssen за поддержку и полезное обсуждение.

- et al. // Gastroenterology. — 1984. — Vol. 86. — P. 910—918.
4. Machida A., Kishimoto S., Ohnuma H. et al. // Ibid. — 1983. — Vol. 85. — P. 268—274.
5. McKay P., Lees J., Murray K. // J. med. Virol. — 1981. — Vol. 8. — P. 237.
6. Michel M. L., Pontisso P., Sobczak E. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 7708—7712.
7. Milich D. R., Thornton G. B., Neurath A. R. et al. // Science. — 1985. — Vol. 228. — P. 1195—1198.
8. Murray K., Bruce S. A., Hinnen A. et al. // EMBO J. — 1984. — Vol. 3. — P. 645.
9. Neurath A. R., Kent S. B., Strick N. // Science. — 1984. — Vol. 224. — P. 392—395.
10. Stahl S., McKay P., Magazin M. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 1606.
11. Stephan W., Prince A. M., Brotman B. // J. Virol. — 1984. — Vol. 51. — P. 420—424.
12. Stibbe W., Gerlich W. H. // Virology. — 1982. — Vol. 123. — P. 436—442.
13. Stibbe W., Gerlich W. H. // J. Virol. — 1983. — Vol. 46. — P. 626—628.
14. Summers J. Replication of hepatitis B viruses. In: see reference 1. — 1984.
15. Takahashi K., Michada A., Funatsu G. et al. // J. Immunol. — 1983. — Vol. 130. — P. 2903.
16. Thung S. N., Gerber M. A. // Liver. — 1983. — Vol. 3. — P. 290.
17. Tiollais P., Dejean A., Brechot C. et al. // Viral Hepatitis and Liver Disease / Eds. G. N. Vyas, J. L. Dienstag, J. H. Hoofnagle. — Orlando, 1984.
18. Wong D. T., Nath N., Sninsky J. J. // J. Virol. — 1985. — Vol. 55. — P. 223—231.

Поступила 08.01.86

ЛИТЕРАТУРА

1. Gerlich W. H., Goldmann U., Müller R. et al. // J. Virol. — 1982. — Vol. 42. — P. 761—766.
2. Heermann K. H., Goldmann U., Schwartz W. et al. // J. Virol. — 1984. — Vol. 52. — P. 396.
3. Machida A., Kishimoto S., Ohnuma H.