

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА И ЕГО ЗООНОЗНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) ЧАСТЬ I. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРОЕНИИ, СТРУКТУРЕ, ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ВИРУСА

А. А. Калайджян¹, А. Х. Каде², П. П. Поляков^{2,*}, А. И. Гудманова³

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», ул. Мира, д. 177, г. Сочи, 354376, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. им. Митрофана Седина, д. 4, г. Краснодар, 350063, Россия

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница № 3 города Краснодара» Министерства здравоохранения Краснодарского края, ул. Айвазовского, д. 97, г. Краснодар, 350040, Россия

Аннотация

В настоящее время нередко регистрируются вспышки заболевания людей типичными зоонозными инфекциями, ранее встречавшимися исключительно в ветеринарной практике, например оспой обезьян (весна 2003 года в США — первое зарегистрированное появление болезни за пределами африканского континента). Важным фактором, способствующим проникновению инфекций в человеческую популяцию, является тесный контакт людей с представителями фауны на фоне интенсивно разрастающихся городов, что обуславливает актуальность изучения все новых зоонозных заболеваний, потенциально опасных для человека. Так, в результате ретроспективных исследований населения Перу от 2009 года установлены случаи инфицирования вирусом энцефаломиокардита (ЭМКВ) (семейство *Picornaviridae*, род *Cardiovirus*) людей, перенесших острое лихорадочное заболевание. Новый штамм вируса, принадлежащего тому же роду, был описан в ходе вспышки среди приматов питомника обезьян в 1990–1999 годах в городе Сухум (Республика Абхазия), а также выделен в ходе вспышки среди обезьян приматологического центра на территории Краснодарского края в 2012 году. Все это послужило поводом для написания обзора накопленных данных, отражающего строение, структуру, факторы вирулентности и распространение ЭМКВ.

Ключевые слова: вирус энцефаломиокардита, строение вириона ЭМКВ, структура РНК ЭМКВ, вирусный цикл ЭМКВ

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Калайджян А. А., Каде А. Х., Поляков П. П., Гудманова А. И. Характеристика вируса энцефаломиокардита и его зоонозный потенциал (обзор литературы). Часть I. Современные представления о строении, структуре, жизненном цикле вируса. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2019; 26(2): 214–223. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2019-26-2-214-223>

Поступила 17.01.2018

Принята после доработки 18.03.2019

Опубликована 25.04.2019

THE ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS (EMCV) AND ITS ZONOTIC POTENTIAL (A LITERATURE REVIEW) PART I. MODERN VIEWS ON THE EMCV STRUCTURE AND ITS VIRAL CYCLE

Akop A. Kalajdzhjan¹, Azamat Kh. Kade², Pavel P. Polyakov^{2,*}, Alla I. Gudmanova³

¹ Scientific Research Institute of Medical Primatology,
Mira str., 177, Sochi, 354376, Russia

² Kuban State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Mitrofana Sedina str., 4, Krasnodar, 350063, Russia

³ Krasnodar City Clinical Hospital No. 3, Ministry of Healthcare of Krasnodar Krai,
Aivazovskogo str., 97, Krasnodar, 350040, Russia

Abstract

Recently. There have been a growing number of the outbreaks of human diseases with typical zoonotic infections, which have previously occurred exclusively in veterinary practice. Among them is monkeypox, whose first occurrence outside the African continent was registered in the USA in the spring of 2003. An important factor contributing to the penetration of infections into the human population is a close contact of people with fauna representatives in the context of intensively growing cities. Therefore, research into new zoonotic diseases, which are potentially dangerous to humans, seems to be critically important. Thus, retrospective studies carried out among the Peru population in 2009 revealed the cases of the encephalomyocarditis virus (EMCV) (*Picornaviridae* family, *Cardiovirus* genus) infection in people having suffered from acute febrile illness. A new virus strain belonging to the same genus was described during the infection outbreak among primates of the Sukhumi Monkey nursery (Republic of Abkhazia) in 1990–1999. This strain was also identified during the outbreak among the monkeys of the Primatological Centre in the Krasnodar Krai in 2012. In this review, we generalize the data available on the structure, virulence factors and distribution of EMCV.

Keywords: encephalomyocarditis virus, EMCV virion structure, EMCV RNA structure, EMCV viral cycle

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Kalaidzhyan A.A., Kade A.Kh., Polyakov P.P., Gudmanova A.I. The Encephalomyocarditis Virus (EMCV) and Its Zoonotic Potential (A Literature Review). Part I. Modern Views on the EMCV Structure and Its Viral Cycle. *Kubanskii Nauchnyi Meditsinskii Vestnik*. 2019; 26(2): 214–223. (In Russ., English abstract). <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2019-26-2-214-223>

Submitted 17.01.2018

Revised 18.03.2019

Published 25.04.2019

Введение. История открытия

Вирус энцефаломиокардита (ЭМКВ) был впервые выделен в 1945 году Хелвигом и Шмидтом в Майами, Флорида, США [1, 25]. Изолирован вирус был от самца гиббона, живущего в неволе, который внезапно погиб от отека легких и миокардита. У мышей, зараженных различными способами (внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно, интракраниально, а также интраназально

капельно) фильтратом отечной жидкости погибшего гиббона, в течение недели развивались параличи задних конечностей и миокардиты с летальным исходом [1].

В 1948 году Дик и др. [3] выделили вирус Менго в районе Менго в городе Энтеббе, Уганда. Вирус был получен от живущей в неволе макаки-резус, пораженной параличом задних конечностей. В 1949 году в результате перекрестных

серологических исследований не было установлено четких отличий между вирусами Менго и ЭМКВ, что позволило отнести их к одному виду. Кроме того, было установлено их родство с вирусом тейлеровского мышинного энцефаломиелита (ТМЭВ) и другими представителями рода *Cardiovirus*, вызывающими у лабораторных мышей поражение ЦНС с развитием, в зависимости от штамма, острого фатального полиомиелита или хронического демиелинизирующего заболевания [1, 4, 5, 25].

Таксономия

Согласно современной классификации вирусов по Балтимору ЭМКВ относится к IV группе: одноцепочечные РНК-вирусы с плюс-нитью, семейства *Picornaviridae*, роду *Cardiovirus*.

Характеристика вируса

Вирус ЭМКВ — маленький безоболочечный вирус с капсидом. Вирион диаметром 30 нм с икосаэдрическим типом симметрии [1]. Геном вируса представлен одноцепочечной плюс-РНК. Вирусная РНК обладает свойством инфекционности, позволяет изолированно (без участия вирусных белков) осуществлять экспрессию генов и синтез компонентов вирусных частиц после внедрения в клетку. Вирусная РНК действует как мРНК в процессе трансляции. В составе генома содержится участок длиной примерно 7,8 kb, непосредственно определяющий трансляцию РНК в полипротеин. 3'UTR-конец — около 120 нуклеотидов — состоит из коротких петлевых структур, содержащих поли(А)-концы различной протяженности (от 20 до 70 нуклеотидов). Таким образом, вирусная РНК полиаденилирована со стороны 3'-конца. Отметим, что при прикреплении к клеточной мРНК 7-метил-гуанозина 5'-конец вирусной РНК за счет ковалентного связывания образует вирусный белок длиной в 20 аминокислот, называемый Vpg (или 3В) [1].

Далее в структуре вирусного белка выделяют поли(С)-последовательность, включающую около 150 нуклеотидов (в зависимости от штамма), что характерно для ЭМКВ. ТМЭВ же, будучи также кардиовирусом, не содержит этой поли(С)-последовательности. Исследования с вирусом Менго на мышах подтверждают важную роль поли(С)-цепи в патогенности вируса [1]. К поли(С)-последовательности примыкает несколько псевдоузлов с неустановленными функциями.

5'UTR-конец — участок внутренней посадки рибосомы (internal ribosome entry site, IRES). Выделяют 5 категорий IRES на основании их первичной и вторичной структур [1, 7]. У ЭМКВ участок внутренней посадки рибосом 2 типа (IRES II) имеет высокоорганизованную структуру и состоит

из примерно 450 нуклеотидов, закрученных в виде спирали, которая, в свою очередь, подразделяется на 5 структурных доменов, обозначаемых H, I, J, K, L. Также непосредственно к иницирующему кодону AUG прикреплен богатый пиримидиновыми основаниями участок [1, 8]. IRES позволяет связываться с рибосомами, иницируя процесс трансляции открытой рамки считывания (open reading frame, ORF), кодирующей полипротеин 2292 аминокислот. В недавних исследованиях процесса программированного считывания рибосомальной рамки было выявлено, что синтез 2 В вирусного протеина не связан с исследуемой ORF [1, 8]. Полученные данные указывают на существование у ЭМКВ по меньшей мере двух ORF, вместе кодирующих 13 зрелых белков. Геном пикорнавирусов также содержит высокоорганизованную структуру РНК, а еще — цис-активный репликативный элемент (ЦРЭ), используемый в качестве основы для 3D полимеразы-иницированного уридилирования Vpg, обязательно для инициации процесса репликации вирусной РНК. В случае с ЭМКВ ЦРЭ располагается в участке, кодирующем VP2-белок, и представлен спиралевидной структурой с установленной AAACA последовательностью НК в петле [1]. Вирусная РНК кодирует длинный полипротеин (L-1ABCD-2ABC-3ABCD), который подвергается каскадному протеолизу с образованием не менее 13 белков. Вирусные белки и их предшественники у ЭМКВ, как и у других пикорнавирусов, получили свои названия в зависимости от позиции в полипротеине: L (leader) белок; P1 (precursor, предшественник) белок, содержащий капсидные белки 1A, 1B, 1C и 1D, также именуемые VP4, VP2, VP3 и VP1 соответственно; P2 и P3 — предшественники неструктурных белков 2A, 2B и 2C; 3A, 3B (также называемый VPg), 2B*, протеаза-3 C и 3D (РНК-зависимая-РНК-полимераза) [1].

Функции некоторых белков ЭМКВ установлены на примере уже изученных, аналогичных им белков других кардиовирусов: полиовируса (ПВ), вируса тейлеровского мышинного энцефаломиелита (ТМЭВ) и ящура (ВЯ) [1].

Вирусный капсид имеет икосаэдрическую форму с 60 копиями каждого из структурных белков. В основании капсида — протомер, состоящий из связанных VP1, VP2, VP3 и VP4. Белок VP4 расположен на внутренней поверхности капсида и связан с вирусной РНК. 5 протомеров объединены в пентамер. В свою очередь, 12 пентамеров формируют капсид. Капсид выстраивается на симметричных вершинах с 2-, 3- и 5-плоскостной симметрией. На вершинах с 5-плоскостной симметрией группируется по пять VP1, а VP2 и VP3, чередуясь, располагаются на вершинах с 3-плоскостной

симметрией. У вирусов Менго и ТМЭВ 5 копий VP1 образуют плато в форме пятиконечной звезды. На ее вершинах имеются выпуклые структуры (петли) — наиболее открытые участки поверхности капсида вируса Менго. Каждая из ветвей плато отделена так называемыми ямками. Ямки соответствуют местам соприкосновения VP1 и VP3 и считаются аналогами «каньонов», обнаруженных на капсидах ПВ. Предполагается, что ямки вируса Менго, как и каньоны ПВ, служат участками для связывания вируса с рецепторами клетки-хозяина. В поддержку этой теории — тот факт, что в ямках лучше, нежели на остальной поверхности капсида, сохраняются и скапливаются остатки веществ, что также подтверждается при компьютерном моделировании: остатки сиаловой кислоты обнаруживаются в «карманах» на дне ямок на глубине 22-Å [1].

Жизненный цикл вируса

На этапах адсорбции и проникновения вирусные частицы прикрепляются к молекулам клеточной мембраны: рецепторам или ко-рецепторам [1]. Молекула адгезии клеток сосудов 1 (Vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) — сиалогликопротеин, содержащийся в эндотелиальных клетках сосудов мышей, идентифицирован как рецептор для ЭМКВ [1].

В качестве прикрепительных клеточных белков для ЭМКВ также описан другой сиалогликопротеин (массой 70 кДа), обнаруженный на клетках в культурах HeLa и K562, а также сиалированный гликофорин А (в эритроцитах) [1, 9]. Сиалогликопротеины — это «липкие» белки, способные прикрепляться неспецифически, из-за чего основной специфический рецептор для ЭМКВ, как клеточный, так и вирусный, еще не определен. В недавних исследованиях на культуре BRL (перевиваемой линии клеток печени крысы) установлено, что способность вируса взаимодействовать с остатками сиаловой кислоты на поверхности клетки является важным фактором вирулентности [1, 10]. Следует также отметить, что свойства сиаловой кислоты отмечаются не для всех штаммов ЭМКВ [1].

Особенности механизмов проникновения и разведения кардиовирусов слабо изучены. Известно, что уменьшение pH не оказывает влияния на проникновение ЭМКВ. Таким образом, в отличие от ВЯ, проникновение которого сопровождается рецептор-опосредованным эндоцитозом с окислительным разрушением эндосомы, для ЭМКВ взаимодействие вирусной частицы с клеточным рецептором считается достаточным для активации конформационных изменений капсида вируса и высвобождения РНК в цитоплазму

[1]. Эти структурные изменения описаны на примере ПВ: происходит разрушение связей между пентамерами, что инициирует разделение вирусной РНК. N-конец белка VP1 содержит амфипатическую спираль, которая встраивается в клеточную мембрану, формируя пору, через которую происходит «впрыскивание» вирусной РНК в цитоплазму [1]. Однако описанная двухступенчатая схема разделения вируса не полностью подходит для кардиовирусов в связи с некоторыми структурными различиями с ПВ [1]. Потому механизм проникновения вирусного генома ЭМКВ в цитоплазму считается пока полностью не изученным.

Этап трансляции начинается после проникновения вирусной РНК в цитоплазму. В процесс репликации не вовлекается клеточная РНК-полимераза. Вирусная частица в клетку проникает без ферментов. 5'-конец плюс-однонитевой РНК вируса не экпирован, но связан с VPg-белком вируса. Роль VPg-белка в процессе трансляции достоверно не определена. Установлено, что он может отсоединяться от вирусной РНК клеточными ферментами [11], после чего происходит трансляция вирусных белков, необходимых для репликации генома и образования новых вирусных частиц. Для ЭМКВ характерна экп-независимая трансляция с использованием IRES. Выделяют 5 типов IRES, отличающихся по первичной и вторичной структурам, по расположению иницирующего кодона и по различной активности в различных типах клеток. Все пикорнавирусы имеют IRES. ЭМКВ и другие кардиовирусы содержат IRES II типа (в отличие от энтеровирусов и др., содержащих IRES I типа) [1].

Для IRES ЭМКВ необходимо связывание с клеточными факторами, в том числе всеми факторами инициации эукариот (eIFs) (за исключением eIF4E), N-концевым участком eIF4G и белком, связывающим полипиримидиновый тракт (PTB) [1, 12]. Сформированный комплекс связывается с 40S субъединицей рибосом и, при участии некоторых факторов инициации трансляции (eIF-1A, eIF-GTP-met-tRNA и eIF3), напрямую запускает трансляцию со стартового кодона. В отличие от экп-зависимой трансляции, трансляция IRES не требует формирования eIF4F комплекса: компоненты eIF4E присоединяются к экп-участку на 5'UTR-конце мРНК с последующим захватом 40S субъединицы рибосомы, которая, в свою очередь, «сканирует» некодируемый 5'UTR-участок до тех пор, пока не достигнет подлинного стартового кодона. При любом из вариантов трансляции 60S субъединица вовлекается в процесс по достижении иницирующего AUG-кодона, неизбежно происходит активация иницирующих факторов и, в итоге, достраивание цепи [1].

Трансляция РНК пикорнавирусов ведет к образованию вирусных белков, часть которых ингибируют кэп-зависимую трансляцию. 2А-белок энтеровирусов (ЭВИ) разрушает eIF4E. Подобное действие предполагается для L-белка афтовиров. Кардиовирусы, содержащие только один белок — 3С, скорее всего, имеют несколько различных стратегий, направленных на ингибирование процесса трансляции клетками хозяев, несмотря на меньшую скорость и эффективность этих механизмов [1, 3, 4]. Для реализации ингибирующего действия у ЭМКВ в качестве основного рассматривается 2А-белок [1].

Процессинг полипротеина осуществляется преимущественно 3 С-белком (3 СPro) ЭМКВ. Однако на первой стадии расщепление полипротеина носит не протеолитический характер, а, напротив, осуществляется в ходе трансляции участка цепи между 2А- и 2В-белками, еще до образования 3СPro ЭМКВ. Последовательность NPG (P) на стыке между этими двумя белками ведет к перепрыгиванию рибосомы. Между глутамином 2А- и пролином 2В-белков отсутствует пептидная связь, что ведет к образованию двух отдельных белков [1].

3СPro — единственная протеаза и основной белок ЭМКВ. Это цистеиновая протеаза, обладающая высокой субстратной специфичностью. Сравнение известных мест расщепления вирусной протеазой у ЭМКВ не выявило четких сходств в последовательностях нуклеотидов в этих участках, хотя определенные закономерности были установлены. 3СPro ЭМКВ «разрезает» последовательность преимущественно между Q- или E- и G-, S- или A-остатками [1]. Предшественники 3АВС, 3СD и Р3 ЭМКВ обладают способностью к расщеплению, сопоставимой с 3С. Отметим, 3СD-белок ЭМКВ способен расщеплять Р1, а 3СD ПВ — нет [1].

3С-белок ЭМКВ характеризуется чрезвычайно высокой лабильностью *in vivo* и *in vitro*. Последовательность аминокислот LLVRGRTLTVV определяется как сигнал для деструкции 3С протеосомами [1, 13, 14]. 3С-белок ЭМКВ также способен расщеплять участок распознавания РНК — RIG-1, по крайней мере *in vitro* [1].

В процессе инфицирования ЭМКВ, с момента образования 3С-протеазы, фермент сразу активируется и начинает расщепление полипротеина. После отсоединения от полипротеина 3СPro продолжает расщепление вновь синтезированного в процессе трансляции полипротеина. Последнее расщепление происходит во время созревания вириона, после инкапсидации РНК, когда VP0 под воздействием фермента распадается на VP4 и VP2 [1].

Репликация генома пикорнавирусов происходит в цитоплазме. Инфицирование вызывает пролиферацию и перестройку внутриклеточных мембран. Перестраиваются эндоплазматическая сеть (ЭПС) и комплекс Гольджи (КГ), а в цитоплазме формируются везикулы с двуслойной мембраной. Место вирусной репликации — поверхность везикул. Установлено, что у ПВ белки 3А и 2ВС располагаются в ЭПС и вместе способны индуцировать формирование везикул [1].

Наиболее исследованный среди пикорнавирусов, 2В-протеин энтеровирусов — маленький гидрофобный белок порин [1]. Он расположен на ЭПС и КГ и снижает уровень Ca^{2+} в органеллах клетки за счет способности формировать трансмембранные поры. Помимо изменения структуры внутриклеточных мембран, 2В ЭВИ также влияет на белковый транспорт в КГ, ингибируя его [1, 15, 16].

Непосредственно для ЭМКВ роль 2В-протеина не установлена. Хотя Де Йонг и соавторы в исследованиях от 2003 года [27] продемонстрировали, что 2В ЭМКВ (как и 2В вируса ящура) не имеет выраженного сходства (менее 20% идентичности последовательностей) с таковым белком ЭВИ, который к тому же намного меньших размеров. 2В ЭМКВ содержит один или несколько гидрофобных участков, но, в отличие от 2В энтеровирусов, не имеет в составе катионных амфипатических α -спиралей. В случае низкого уровня 2В-протеина ЭМКВ в клетке у белка не определяется четкой локализации в ЭПС. Кроме того, снижение уровня Ca^{2+} регистрируется только в ЭПС, но не в КГ [1, 27]. Механизмы, лежащие в основе этого ингибирующего действия, а также причины, определяющие локализацию 2В, в контексте ЭМКВ-инфекции на данный момент не установлены. В схожих исследованиях 2В-белков различных пикорнавирусов установлено, что у ЭМКВ и вируса ящура, в отличие от энтеровирусов, 2В-белок самостоятельно не влияет на белковый транспорт [1].

В ЭПС также определяется 3А-протеин — маленький трансмембранный гидрофобный белок. Известно, что, в отличие от 3А ЭВИ, аналогичный белок ЭМКВ, ящура и ТМЭВ не ингибирует ЭПС-КГ протеиновый транспорт [1, 17, 18]. Таким образом, у ЭМКВ 2В- и 3А-протеины не снижают белковый транспорт в инфицированной клетке, поэтому механизмы блокировки протеинового транспорта между ЭПС и КГ для ЭМКВ еще предстоит установить. Для ВЯ наличие 2ВС-белка либо одновременно 2В- и 2С-белков является необходимым условием для блокировки белкового транспорта в пораженных клетках [1, 19]. Все еще предстоит установить сам факт ингибирующего дейст-

вия ЭМКВ-инфекции на белковый транспорт в инфицированных клетках. Отметим, что, даже если ЭМКВ не блокирует транспорт белка между ЭПС и КГ в клетках, уже установлено его индуцирующее действие на пролиферацию и реорганизацию мембраны в пораженных клетках [1, 21, 22].

Предполагается, что мембранные липиды встраиваются в оболочку везикул при прохождении через ЭПС [1, 16]. В то же время сами везикулы формируются методом инвагинации при проникновении в клетку через цитоплазматическую мембрану. Установлено, что при ПВ-инфекции везикулы формируются аутофагическим путем при прохождении через ЭПС, о чем свидетельствует содержание в них цитоплазматических структур, двухслойной мембраны и маркеров аутофагоцитоза, таких как LC3 и LAMP1 [1]. В 2009 году проводились схожие исследования ЭМКВ и ВЯ: при ЭМКВ-инфекции описано взаимодействие 3', VP1-белков вируса и LC3-маркера на поверхности мембраны везикулы [1, 21]; а при ВЯ — 2', 2' - и 3' -белков с LC3 и LAMP1, а также VP1 с Atg5 (клеточный белок, ответственный за формирование аутофагосом) [1, 22]. Согласно ряду данных, угнетение аутофагоцитоза ведет к снижению вирусной нагрузки ЭМКВ, в то время как стимуляция его рапамицином вызывает увеличение титра вируса [1, 21]. Можно сделать вывод о роли аутофагоцитоза для ЭМКВ и других пикорнавирусов при формировании мембраны везикул в процессе репликации вируса [1]. Таким образом, репликация ЭМКВ осуществляется в цитоплазме при участии репликативных комплексов, расположенных на поверхности мембран сгруппированных везикул. Репликативный комплекс фактически состоит из вирусной РНК-зависимой-РНК-полимеразы, связанной с 3Cpro-, 2C- и 2AB-белками [1].

Следует также отметить, что большинство данных, особенно по репликации вирусов, получены в исследованиях на энтеровирусах, в частности на ПВ, а потому требуют подтверждения в отношении ЭМКВ [1].

Установлено, что для начала транскрипции минус-нити вирусной РНК у пикорнавирусов необходима остановка трансляции плюс-нити [1, 23]. Синтез минус-нити вирусной РНК — это первый этап репликации. Механизм перехода от трансляции к репликации до конца не изучен, хотя в недавних исследованиях описана модель процесса на примере ПВ. Модель включала расщепление белка РСВР2 протеином 3CDpro. Однако непосредственно для ЭМКВ процесс не описан [1].

Вопрос инициации синтеза минус-нити РНК остается дискуссионным. На модели ПВ процесс стартует с взаимодействия клеточного

белка РСВР (поли р (С) связывающий протеин) с 3CD-белком. Сформированный комплекс прикрепляется к одной из структур на 5'UTR-конце вирусного генома [1]. Для ЭМКВ характерно прикрепление к следующим участкам: S-фрагменту или поли(С)-цепи. Таким образом, 3'- и 5'-концы вирусного генома временно взаимодействуют посредством белковых мостиков, образуя так называемый рибонуклеопротеиновый комплекс. Такая формация комплекса позволяет 3Dpol уридиллировать VPg-белок, используя участок с последовательностью AAACA сге или поли(А)-цепь в качестве плато для реакции [1].

Сге — петлевой участок генома в структуре вирусной РНК, занимающий последовательность, кодирующую VP2 ЭМКВ [1]. Петля содержит AAACA; остатки первых двух азотистых оснований (А) выступают платформой для образования VPg-pU и VPg-pUpU (в процессе уридиллирования) и, таким образом, инициируют процесс репликации РНК [1]. Мутации данного участка вызывают снижение вирусной репликации. Следует отметить, что позиция петли не имеет решающего значения для ее функционирования и может изменяться в процессе трансляции [1]. Предположительно VPg-pUpU связывается с poly(A)3'-концом и выступает в роли праймера для синтеза минус-нити РНК при участии 3Dpol. Элонгация минус-нити ведет к формированию двухцепочечной РНК, называемой репликативной формой (РФ). После образования РФ стартует синтез плюс-нити РНК [1].

Образование РФ полностью не объясняет механизмы инициации синтеза плюс-нити РНК у пикорнавирусов. Существуют две основные гипотезы относительно роли уридиллирования VPg в процессах синтеза нитей РНК. Первая предполагает участие VPg-белка, в избытке уридиллированного в период образования минус-нити, в процессе инициации синтеза плюс-нити [1]. Согласно второй гипотезе, формирование VPg-pUpU на poly(A)-конце плюс-нити РНК запускает синтез минус-нити РНК, в то время как построение плюс-нити активируется непосредственно уридиллированием оснований на сге-участках [1]. Предполагается, что структура РФ разматывается для синтеза положительной цепи. 2С-вирусный белок обладает АТФазной активностью, содержит область с хеликазой (несмотря на то что о хеликазной активности никогда не сообщалось) и, по-видимому, имеет важное значение для синтеза плюс-нити РНК [1]. Установлено, что 2С-белок прикрепляется к 3'-концу минус-нити РНК вместе с клеточным протеином р38. Их взаимодействие предположительно дестабилизирует структуру репликативной формы. Также в процесс могут вовлекаться клеточная хелика-

за и ядерные белки, учитывая свойства инфекционности РФ-структур [1]. Таким образом, вновь синтезированная минус-нить РНК выступает в качестве основы для образования плюс-нити РНК. Формирование двухцепочечной РНК происходит частями с образованием промежуточных репликативных форм, что позволяет осуществлять одновременный синтез нескольких положительных нитей РНК от одной отрицательной [1].

На заключительном этапе цикла ЭМКВ происходит одевание вновь синтезированной вирусной РНК, созревание провириона и высвобождение его из клетки. Вопросы механизмов, вовлеченных в процессы созревания и выхода вирусных частиц из клетки, еще не разрешены, но они считаются завершающими в вирусном цикле [1].

Сборка вирусных частиц осуществляется в цитозоле посредством 3Срго-опосредованного каскадного протеолиза Р1-предшественника на VP0-, VP1-и VP3-белки, которые автоматически собираются с образованием протомеров, содержащих единственную копию каждого белка. Пять протомеров образуют пентамер, а 12 пентамеров собираются в икосаэдрический капсид. Для инкапсидации РНК пикорнавирусов существует 2 модели. Согласно первой, протомеры образуют пустой капсид, в который затем встраивается РНК. В поддержку этой модели говорят обнаруженные пустые капсиды в инфицированных пикорнавирусами клетках. Вторая модель: пентамеры собираются строго вокруг вновь синтезированной вирусной РНК. Капсид образуется только вокруг плюс-нити РНК, связанной с VPg-белком. Вероятно, существует связь между активной репликацией и инкапсидацией, так как последней подвергается лишь вновь синтезированная РНК [1].

Экспериментальное подавление функции Р1-белка не нарушило инкапсидации вирусной РНК в процессе трансляции. Это указывает на то, что предполагаемый сигнал инкапсидирования не обнаруживается в области Р1-протеина вирусной РНК [1]. Фактически, многочисленные попытки идентифицировать сигнал инкапсидации РНК не удались. В единственном исследовании сообщается, что сигнал инкапсидации, возможно, рас-

полагается в пределах 5'UTR-участка вируса Аичи вместе с L-протеином [1, 24]. Однако в недавней статье, которая подтверждает вторую модель, специфика инкапсидации пикорнавирусов объясняется тройным взаимодействием вРНК-2 С–VP3 [1]. Лиу и соавторами описан новый механизм, предполагающий, что инкапсидация начинается на участке, где вновь синтезированные геномы возникают из репликативного комплекса, поскольку морфогенез связан с репликацией генома. 2С АТФаза является компонентом репликативного комплекса и обладает специфической аффинностью к VP3-капсидному белку. Исследователи показали, что для химерного вируса, состоящего из вирусов Полио и Коксаки, который не может поддерживать инкапсидацию, ее удалось восстановить при вовлечении Р1- и 2 С-белков тех же вирусов. В недавних исследованиях по гетерологичному инкапсидированию [28] показано, что ПВ может быть инкапсидирован в оболочку вируса Коксаки В3 (CBV3), риновируса человека 14 (RHV14) и вируса Менго [1].

Присутствие вирусной РНК в капсиде требуется на стадии созревания, во время которой VP0 расщепляется на VP2–VP4. Это расщепление считается аутокаталитическим и может быть результатом локальной активации молекул воды His-остатком в VP2, что приводит к нуклеофильной атаке связей и их разрушению. Созревание необходимо для образования компонентов вируса. Вероятно, расщепление VP0 требуется для последующего высвобождения вирусной РНК в цитоплазму вновь инфицированных клеток [1].

ЭМКВ — вирус с высокой литической активностью, вызывающий некроз клеток по типу равномерной мелкозернистой деструкции через 7–10 часов после инфицирования [11]. Однако что именно вызывает повышение проницаемости мембраны и что может служить сигналами для лизиса клеток и выхода вируса, достоверно не установлено. Предложено несколько гипотез: взрывной выход вследствие накопления вирусных частиц или белков в клетке; усиление проницаемости мембран за счет образования виропиринов (например, 2С ПВ) [1].

Список литературы

1. Carocci M., Bakkali-Kassimi L. The encephalomyocarditis virus. *Virulence*. 2012; 3(4): 351–367. DOI: 10.4161/viru.20573
2. Brahic M., Bureau J.F., Michiels T. The genetics of the persistent infection and demyelinating disease caused by Theiler's virus. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005; 59: 279–298. DOI: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121242
3. Roos R.P. Pathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced disease. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 2010; 1: 70–78. DOI: 10.1111/j.1759-1961.2010.00008.x
4. Knowles N.J., Hovi T., Hyypiä T., King A.M.Q., Lindberg A.M., Pallansch M.A., Palmenberg A.C., Simmonds P., Skern T., Stanway G., Yamashita T., Zell R. Picornaviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J.,

- Carstens E. B., Lefkowitz E. J., editors. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. San Diego: Elsevier; 2012: 855–880.
- Himeda T., Ohara Y. Saffold virus, a novel human Cardiovirus with unknown pathogenicity. *J. Virol.* 2012; 86(3): 1292–1296. DOI: 10.1128/JVI.06087-11
 - Drexler J.F., Luna L.K. de S., Stöcker A., Almeida P.S., Ribeiro T.C., Petersen N., Herzog P., Pedrosa C., Huppertz H.-I., Ribeiro H., Baumgarte S., Drosten C. Circulation of 3 lineages of a novel Saffoldcardiovirus in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(9): 1398–1405. DOI: 10.3201/eid1409.080570
 - Pan M., Yang X., Zhou L., Ge X., Guo X., Liu J., Zhang D., Yang H. Duck Hepatitis A virus possesses a distinct type IV internal ribosome entry site element of picornavirus. *J. Virol.* 2012; 86(2): 1129–1144. DOI: 10.1128/JVI.00306-11
 - Loughran G., Firth A.E., Atkins J.F. Ribosomal frameshifting into an overlapping gene in the 2B-encoding region of the cardiovirus genome. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2011; 108(46): E1111–1129. DOI: 10.1073/pnas.1102932108
 - Guy M., Chilmoneczyk S., Crucière C., Eloit M., Bakkali-Kassimi L. Efficient infection of buffalo rat liver-resistant cells by encephalomyocarditis virus requires binding to cell surface sialic acids. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(1): 187–196. DOI: 10.1099/vir.0.004655-0
 - Hammoumi S., Guy M., Eloit M., Bakkali-Kassimi L. Encephalomyocarditis virus may use different pathways to initiate infection of primary human cardiomyocytes. *Arch. Virol.* 2012; 157(1): 43–52. DOI: 10.1007/s00705-011-1133-6
 - Bedard K.M., Semler B.L. Regulation of picornavirus gene expression. *Microb. Infect.* 2004; 6(7): 702–713. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.03.001
 - Balvay L., Soto Rifo R., Ricci E.P., Decimo D., Ohlmann T. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1789(9–10): 542–557. DOI: 10.1016/j.bbagr.2009.07.005
 - Schlx P.E., Zhang J., Lewis E., Planchart A., Lawson T.G. Degradation of the encephalomyocarditis virus and hepatitis A virus 3C proteases by the ubiquitin/26S proteasome system in vivo. *Virology.* 2006; 360(2): 350–363. DOI: 10.1016/j.virol.2006.10.043
 - Papon L., Oteiza A., Imaizumi T., Kato H., Brocchi E., Lawson T.G., Akira S., Mechti N. The viral RNA recognition sensor RIG-I is degraded during encephalomyocarditis virus (EMCV) infection. *Virology.* 2009; 393(2): 311–318. DOI: 10.1016/j.virol.2009.08.009
 - de Jong A.S., de Mattia F., Van Dommelen M.M., Lanke K., Melchers W.J., Willems P.H., van Kuppeveld F.J. Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *J. Virol.* 2008; 82(7): 3782–3790. DOI: 10.1128/JVI.02076-07
 - Choe S.S., Dodd D.A., Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology.* 2005; 337(1): 18–29. DOI: 10.1016/j.virol.2005.03.036
 - Wessels E., Duijsings D., Lanke K.H.W., van Dooren S.H., Jackson C.L., Melchers W.J., van Kuppeveld F.J. Effects of picornavirus 3A Proteins on Protein Transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J. Virol.* 2006; 80(23): 11852–11860. DOI: 10.1128/JVI.01225-06
 - Moffat K., Howell G., Knox C., Belsham G.J., Monaghan P., Ryan M.D., Wileman T. Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J. Virol.* 2005; 79(7): 4382–4395. DOI: 10.1128/JVI.79.7.4382-4395.2005
 - Moffat K., Knox C., Howell G., Clark S.J., Yang H., Belsham G.J., Ryan M., Wileman T. Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J. Virol.* 2007; 81(3): 1129–1139. DOI: 10.1128/JVI.00393-06
 - Zhang Y., Li Z., Xinna G., Xin G., Yang H. Autophagy promotes the replication of encephalomyocarditis virus in host cells. *Autophagy.* 2011; 7(6): 613–628. DOI: 10.4161/auto.7.6.15267
 - O'Donnell V., Pacheco J.M., LaRocco M., Burrage T., Jackson W., Rodriguez L.L., Borca M.V., Baxt B. Foot-and-mouth disease virus utilizes an autophagic pathway during viral replication. *Virology.* 2011; 410(1): 142–150. DOI: 10.1016/j.virol.2010.10.042
 - Kirkegaard K. Subversion of the cellular autophagy pathway by viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009; 335: 323–333. DOI: 10.1007/978-3-642-00302-8_16
 - Daijogo S., Semler B.L. Mechanistic intersections between picornavirus translation and RNA replication. *Adv. Virus. Res.* 2011; 80: 1–24. DOI: 10.1016/B978-0-12-385987-7.00001-4
 - Liu Y., Wang C., Mueller S., Paul A.V., Wimmer E., Jiang P. Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8): e1001066. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001066
 - Helwig F.C., Schmidt C.H. A filter-passing agent producing interstitial myocarditis in anthropoid apes and small animals. *Science.* 1945; 102(2637): 31–33. DOI: 10.1126/science.102.2637.31
 - Dick G. W.A., Smithburn K.C., Haddow A.J. Mengo encephalomyelitis virus. isolation and immunological properties. *Br. J. Exp. Pathol.* 1948; 29(6): 547–558.
 - de Jong A.S., Wessels E., Dijkman H.B.P.M., Galama J.M., Melchers W.J., Melchers W.J.G., Willems P.H., van Kuppeveld F.J.M. Determinants for membrane association and permeabilization of the coxsackievirus 2B protein and the identification of the Golgi complex as the target organelle. *J. Biol.*

Chem. 2003; 278: 1012–1021. DOI: 10.1074/jbc.M207745200

28. Porter D. C., Ansardi D. C., Morrow C. D. Encapsidation of poliovirus replicons encoding the complete

human immunodeficiency virus type 1 gag gene by using a complementation system which provides the P1 capsid protein in trans. *J. Virol.* 1995; 69(3): 1548–1555.

References

- Carocci M., Bakkali-Kassimi L. The encephalomyocarditis virus. *Virulence.* 2012; 3(4): 351–367. DOI: 10.4161/viru.20573
- Brahic M., Bureau J. F., Michiels T. The genetics of the persistent infection and demyelinating disease caused by Theiler's virus. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005; 59: 279–298. DOI: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121242
- Roos R. P. Pathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced disease. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 2010; 1: 70–78. DOI: 10.1111/j.1759-1961.2010.00008.x
- Knowles N. J., Hovi T., Hyypiä T., King A. M. Q., Lindberg A. M., Pallansch M. A., Palmenberg A. C., Simmonds P., Skern T., Stanway G., Yamashita T., Zell R. Picornaviridae. In: King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J., editors. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses.* San Diego: Elsevier; 2012: 855–880.
- Himeda T., Ohara Y. Saffold virus, a novel human Cardiovirus with unknown pathogenicity. *J. Virol.* 2012; 86(3): 1292–1296. DOI: 10.1128/JVI.06087-11
- Drexler J. F., Luna L. K. de S., Stöcker A., Almeida P. S., Ribeiro T. C., Petersen N., Herzog P., Pedroso C., Huppertz H.-I., Ribeiro H., Baumgarte S., Drosten C. Circulation of 3 lineages of a novel Saffoldcardiovirus in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(9): 1398–1405. DOI: 10.3201/eid1409.080570
- Pan M., Yang X., Zhou L., Ge X., Guo X., Liu J., Zhang D., Yang H. Duck Hepatitis A virus possesses a distinct type IV internal ribosome entry site element of picornavirus. *J. Virol.* 2012; 86(2): 1129–1144. DOI: 10.1128/JVI.00306-11
- Loughran G., Firth A. E., Atkins J. F. Ribosomal frameshifting into an overlapping gene in the 2B-encoding region of the cardiovirus genome. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2011; 108(46): E1111–1129. DOI: 10.1073/pnas.1102932108
- Guy M., Chilmoneczyk S., Crucière C., Eloit M., Bakkali-Kassimi L. Efficient infection of buffalo rat liver-resistant cells by encephalomyocarditis virus requires binding to cell surface sialic acids. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(1): 187–196. DOI: 10.1099/vir.0.004655-0
- Hammoumi S., Guy M., Eloit M., Bakkali-Kassimi L. Encephalomyocarditis virus may use different pathways to initiate infection of primary human cardiomyocytes. *Arch. Virol.* 2012; 157(1): 43–52. DOI: 10.1007/s00705-011-1133-6
- Bedard K. M., Semler B. L. Regulation of picornavirus gene expression. *Microb. Infect.* 2004; 6(7): 702–713. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.03.001
- Balvay L., Soto Rifo R., Ricci E. P., Decimo D., Ohlmann T. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1789(9–10): 542–557. DOI: 10.1016/j.bbagr.2009.07.005
- Schlax P. E., Zhang J., Lewis E., Planchart A., Lawson T. G. Degradation of the encephalomyocarditis virus and hepatitis A virus 3C proteases by the ubiquitin/26S proteasome system in vivo. *Virology.* 2006; 360(2): 350–363. DOI: 10.1016/j.virol.2006.10.043
- Papon L., Oteiza A., Imaizumi T., Kato H., Brocchi E., Lawson T. G., Akira S., Mechtli N. The viral RNA recognition sensor RIG-I is degraded during encephalomyocarditis virus (EMCV) infection. *Virology.* 2009; 393(2): 311–318. DOI: 10.1016/j.virol.2009.08.009
- de Jong A. S., de Mattia F., Van Dommelen M. M., Lanke K., Melchers W. J., Willems P. H., van Kuppeveld F. J. Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *J. Virol.* 2008; 82(7): 3782–3790. DOI: 10.1128/JVI.02076-07
- Choe S. S., Dodd D. A., Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology.* 2005; 337(1): 18–29. DOI: 10.1016/j.virol.2005.03.036
- Wessels E., Duijsings D., Lanke K. H. W., van Dooren S. H., Jackson C. L., Melchers W. J., van Kuppeveld F. J. Effects of picornavirus 3A Proteins on Protein Transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J. Virol.* 2006; 80(23): 11852–11860. DOI: 10.1128/JVI.01225-06
- Moffat K., Howell G., Knox C., Belsham G. J., Monaghan P., Ryan M. D., Wileman T. Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J. Virol.* 2005; 79(7): 4382–4395. DOI: 10.1128/JVI.79.7.4382-4395.2005
- Moffat K., Knox C., Howell G., Clark S. J., Yang H., Belsham G. J., Ryan M., Wileman T. Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J. Virol.* 2007; 81(3): 1129–1139. DOI: 10.1128/JVI.00393-06
- Zhang Y., Li Z., Xinna G., Xin G., Yang H. Autophagy promotes the replication of encephalomyocarditis virus in host cells. *Autophagy.* 2011; 7(6): 613–628. DOI: 10.4161/auto.7.6.15267
- O'Donnell V., Pacheco J. M., LaRocco M., Burrage T., Jackson W., Rodriguez L. L., Borca M. V., Baxt B. Foot-and-mouth disease virus utilizes an autophag-

- ic pathway during viral replication. *Virology*. 2011; 410(1): 142–150. DOI: 10.1016/j.virol.2010.10.042
22. Kirkegaard K. Subversion of the cellular autophagy pathway by viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009; 335: 323–333. DOI: 10.1007/978-3-642-00302-8_16
23. Daijogo S., Semler B. L. Mechanistic intersections between picornavirus translation and RNA replication. *Adv. Virus. Res.* 2011; 80: 1–24. DOI: 10.1016/B978-0-12-385987-7.00001-4
24. Liu Y., Wang C., Mueller S., Paul A. V., Wimmer E., Jiang P. Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8): e1001066. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001066
25. Helwig F. C., Schmidt C. H. A filter-passing agent producing interstitial myocarditis in anthropoid apes and small animals. *Science*. 1945; 102(2637): 31–33. DOI: 10.1126/science.102.2637.31
26. Dick G. W. A., Smithburn K. C., Haddow A. J. Mengo encephalomyelitis virus. isolation and immunological properties. *Br. J. Exp. Pathol.* 1948; 29(6): 547–558.
27. de Jong A. S., Wessels E., Dijkman H. B. P. M., Galama J. M., Melchers W. J., Melchers W. J. G., Willems P. H., van Kuppeveld F. J. M. Determinants for membrane association and permeabilization of the coxsackievirus 2B protein and the identification of the Golgi complex as the target organelle. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 1012–1021. DOI: 10.1074/jbc.M207745200
28. Porter D. C., Ansardi D. C., Morrow C. D. Encapsidation of poliovirus replicons encoding the complete human immunodeficiency virus type 1 gag gene by using a complementation system which provides the P1 capsid protein in trans. *J. Virol.* 1995; 69(3): 1548–1555.

Сведения об авторах / Information about the authors

Калайджян Аюп Андроникович — аспирант лаборатории молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии».

Каде Азамат Халидович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Поляков Павел Павлович* — ассистент кафедры общей и клинической патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Контактная информация: e-mail: pal.pal.p@yandex.ru, тел.: +7 (861) 262-40-31;

ул. им. Митрофана Седина, д. 4, г. Краснодар, 350063, Россия.

Гудманова Алла Игоревна — врач-терапевт Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница № 3 города Краснодара» Министерства здравоохранения Краснодарского края.

Akop A. Kalajdzhan — PhD Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Scientific-Research Institute of Medical Primatology.

Azamat Kh. Kade — Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of Department, Department of General and Clinical Pathological Physiology, Kuban State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Pavel P. Polyakov* — Research Assistant, Department of General and Clinical Pathological Physiology, Kuban State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Contact information: e-mail: pal.pal.p@yandex.ru, tel.: +7 (861) 262-40-31;

Mitrofana Sedina str., 4, Krasnodar, 350063, Russia.

Alla I. Gudmanova — Physician, Krasnodar City Clinical Hospital No. 3, Ministry of Healthcare of Krasnodar Krai.

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author