

УДК 578.2

## АЛЬФАВИРУСЫ: МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Войков М.<sup>1</sup>, Балтабекова А.<sup>1</sup>, Жиенбай Е.<sup>2</sup>, Шустов А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Национальный центр биотехнологии*

*ул. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан*

<sup>2</sup> *Назарбаев Университет*

*пр. Кабанбай батыра, 53, Астана, 010000, Казахстан*

*shustov@biocenter.kz*

### АБСТРАКТ

Альфовирусы – род оболочечных вирусов, геном которых представляет собой молекулу РНК позитивной полярности, которые не имеют в жизненном цикле ДНК стадии и реплицируются в цитоплазме. Альфовирусы являются возбудителями природноочаговых инфекций, зоонозов и антропонозов, в которых человек является тупиковым хозяином. Альфовирусы имеют небольшой геном, демонстрируют активную репликацию, которая сопровождается синтезом большого количества вирусных белков, обладают способностью заражать множество типов клеток позвоночных и беспозвоночных. Геномные РНК альфовирусов являются инфекционными при трансфекции в клеточные культуры, что означает возможность получения вирусного потомства путём трансфекции и облегчает генно-инженерные манипуляции с альфовирусами. Высокие уровни белковой экспрессии делают альфовирусы чрезвычайно привлекательными векторами для продукции рекомбинантных белков в культивируемых клетках млекопитающих, птиц и беспозвоночных. Модельными объектами для разработки альфовирусных экспрессионных систем стали вирус Синдбис, вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей, вирус леса Семлики. Препятствием для использования альфовирусов дикого типа в качестве векторов является сильное цитопатическое действие вирусов дикого типа. Созданы многочисленные мутанты альфовирусов со сниженным цитопатическим действием.

Альфовирусные векторы превосходят другие вирусные вектора по силе индуцируемого клеточного и гуморального иммунного ответов, в связи с чем альфовирусы активно используются для конструирования живых вакцин, как против инфекционных заболеваний, так и против неинфекционных болезней (для лечения рака). Широкий клеточный и тканевый тропизм позволяет использовать альфовирусы в качестве средств доставки генов в клеточные популяции *in vivo*, для генной терапии.

Ключевые слова: альфовирус, репликация, вектор, белковая экспрессия, вакцина, цитопатическое действие.

### ALPHAVIRUSES: MOLECULAR BIOLOGY AND PRACTICAL APPLICATIONS

Voikov M.<sup>1</sup>, Baltabekova A.<sup>1</sup>, Zhienbay Ye.<sup>2</sup>, Shustov A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *National Center for Biotechnology*

*13/1, Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan*

<sup>2</sup> *Nazarbayev University*

*53, Kabanbai Batyr str, Astana, 010000, Kazakhstan*

*shustov@biocenter.kz*

### ABSTRACT

Alphaviruses are enveloped viruses with positive sense RNA genomes, which replicate in the cytoplasm and have no DNA stage in their life cycle. They are natural infection agents of wild and domestic animals, and may also cause epidemics in humans who are dead-end hosts. Alphaviruses have small genomes and show active replication accompanied by the synthesis of large amounts of viral proteins. Representatives of this genus are able to infect many vertebrate and invertebrate cells. Since the genomic RNA of alphaviruses is infectious, viral progeny can be obtained by transfecting *in vitro* synthesized RNAs into cell culture, thus facilitating genetic engineering. Alphaviruses are attractive vectors for the production of recombinant proteins in cultured cells of mammals, birds, and invertebrates due to high levels of protein expression. Model viruses used for the development of alphavirus expression systems include the Sindbis virus, Venezuelan equine encephalomyelitis virus, and Semliki Forest virus. Use of wild-type alphaviruses as vectors is avoided because of their strong cytopathic effect in cell culture. Hence, numerous mutant alphaviral genomes with reduced cytopathic effect have been developed.

Alphavirus vectors induce stronger cellular and humoral immune responses than other viral vectors, and therefore are used for the construction of live vaccines against infectious and non-infectious diseases (i.e. anti-cancer therapeutic vaccines). The wide cell and tissue tropism allows utilization of alphaviruses as agents for gene delivery under *in vivo* conditions and gene therapy.

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.  
2015, no. 2, pp. 4-18  
DOI: 10.11134/btp.2.2015.1

**Keywords:** alphavirus, replication, vector, protein expression, vaccines, cytopathic effect

## ВВЕДЕНИЕ

Альфовирусы (род *Alphavirus* из семейства *Togaviridae*) – это род оболочечных вирусов, геном которых представляет собой молекулу РНК позитивной полярности (т.е. геномная РНК может транслироваться с образованием вирусных белков), которые не имеют в жизненном цикле ДНК стадии (репликация альфовирусов является РНК-зависимой РНК-полимеразой) и воспроизводятся в цитоплазме инфицированной клетки.

В род альфовирусов входят 32 вида [1]. Все альфовирусы, для которых известен механизм передачи – арбовирусы, то есть передаются при участии кровососущих членистоногих. Обычным природным переносчиком и промежуточным хозяином для альфовирусов являются комары. Альфовирусы не имеют узкой специфичности по отношению к теплокровным хозяевам, и один вид альфовирусов может заражать разных млекопитающих и птиц. В природных очагах альфовирусы циркулируют между дефинитивными хозяевами – мелкими млекопитающими или птицами при участии комаров. У крупных млекопитающих и у людей инфекции, вызываемые альфовирусами, могут протекать с тяжёлыми клиническими проявлениями и приводить к гибели.

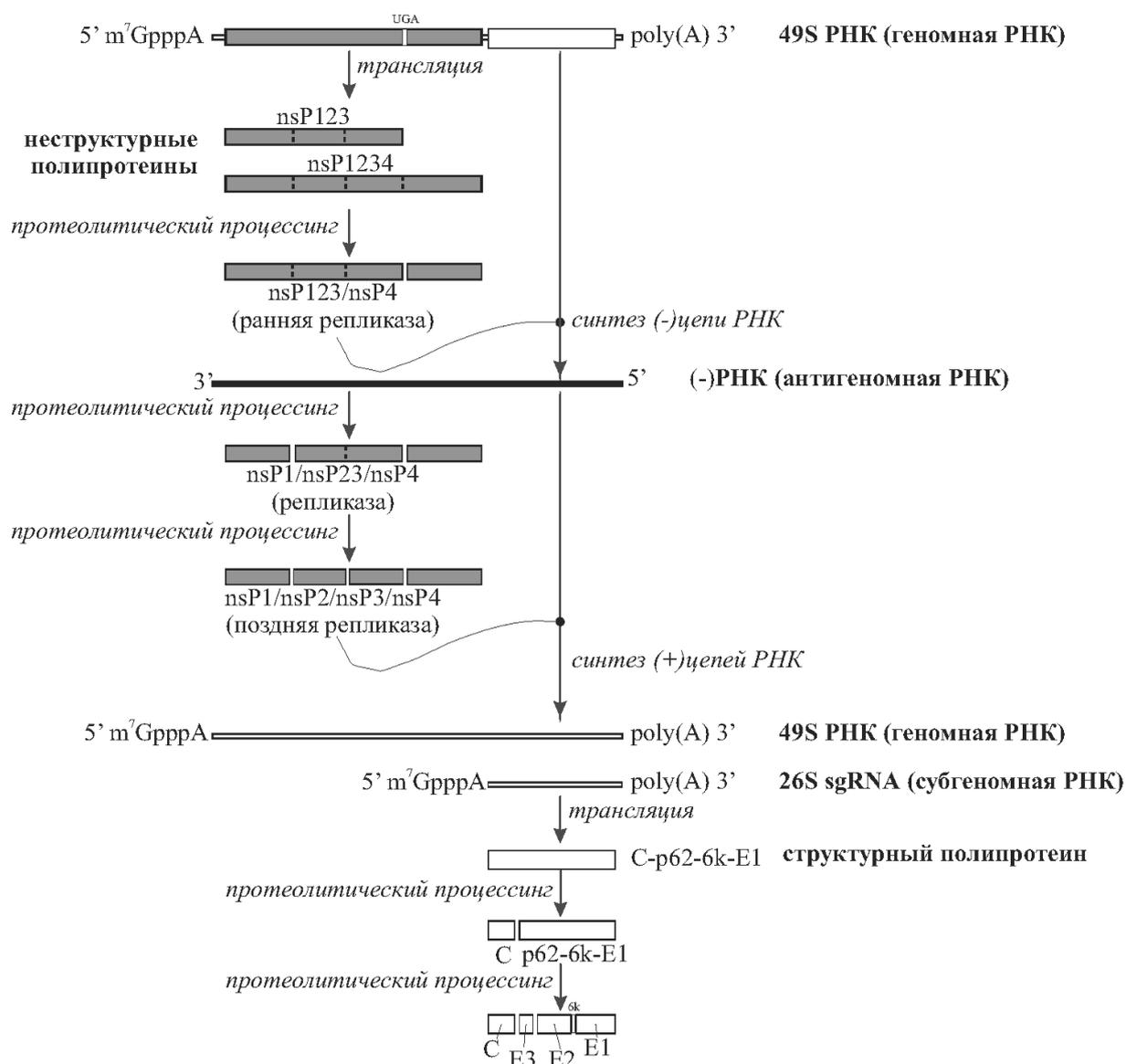
Альфовирусы найдены на всех континентах, кроме Антарктиды. В зависимости от нозоареала выделяют группы альфовирусов Старого Света и альфовирусов Нового Света, поскольку нозоареалы большинства представителей этого рода целиком расположены только в одном полушарии Земли (Восточном или Западном). Например, типичный представитель альфовирусов Старого Света – вирус Синдбис – встречается в Африке, Европе, Азии и Австралии. Типичный представитель альфовирусов Нового Света – вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей – эндемичен для Южной и Центральной Америки. Представители обеих групп являются возбудителями природноочаговых инфекций, зоонозов и антропозоонозов, в которых человек является тупиковым хозяином. В наше время человеческие популяции не имеют значения в качестве эпидемиологических резервуаров. Эпидемии инфекций, вызываемых альфовирусами, имеют причиной выход возбудителя из природного очага, однако вспышки могут быть крупными, а течение болезни – тяжёлым. В целом, альфовирусы Старого Света обычно вызывают менее тяжёлую болезнь (проявляется сыпью и артритом), с меньшей смертностью, чем характерно для альфовирусов Нового Света (вызывают изнурительную лихорадку, часто с неврологическими последствиями, а иногда энцефалит).

### Устройство вириона и взаимодействие вируса с клеткой

Вирион альфовируса – сферическая частица диаметром ~70 нм. Вирион состоит из центральной нуклеопротеидной части (нуклеокапсида) и внешней липопротеидной оболочки. Икосаэдрический нуклеокапсид диаметром 40 нм состоит из 240 субъединиц капсидного белка вируса и одной молекулы геномной РНК (т.н. 49S РНК). Липидный бислой, покрывающий вирион, происходит из цитоплазматической мембраны инфицированной клетки. В липидный бислой встроены два мембранных гликопротеина вируса (гликопротеины E1 и E2). Мембранные гликопротеины расположены на поверхности вириона определённым образом. Гликопротеин E2 образует гомотримеры, части которых выступают над поверхностью вириона в виде шипов. Вокруг каждого гомотимера E2 расположены гомодимеры гликопротеина E1, расположенные в виде икосаэдрической решетки с триангуляционным числом T=4. Всего в вирионе 80 гомотимеров E2 и 120 димеров E1. Есть доказательства, что существует взаимодействие между капсидным белком и гликопротеином E2 через C-концевые аминокислотные остатки E2, которые экспонированы на внутренней стороне липидного бислоя. Шипы, образованные гликопротеином E2, обеспечивают взаимодействие вируса с клеточным рецептором. Проникновение альфовирусов в клетку происходит посредством рецептор-

опосредованного эндоцитоза. Альфавирусы, по-видимому, могут использовать несколько разных клеточных рецепторов, и взаимодействие с рецептором приводит к интернализации вириона в эндосомную везикулу, после чего происходит слияние липидного бислоя с мембраной эндосомной вакуоли. Механизм слияния мембран предусматривает образование поры, через которую нуклеокапсид проникает в цитоплазму [2].

Геномная РНК альфавирусов имеет 5'-кэп, 3'-полиадениловый хвост (поли-А), и две открытые рамки считывания (ORF), первая из которых кодирует неструктурные белки (компоненты вирусной репликазы), а вторая ORF кодирует структурные белки, из которых состоит вирион (рис. 1). Вирусный нуклеокапсид собирается посредством специфических взаимодействий между мономерами капсидного белка и особой вторичной структурой в 49S РНК, которая называется сигналом упаковки. Гликопротеины оболочки являются трансмембранными белками, экспрессируются на мембранах эндоплазматического ретикулума (ER), из которого перемещается через комплекс Гольджи к плазматической мембране. Почкование альфавирусов происходит на цитоплазматической мембране в результате взаимодействия между преформированными нуклеокапсидами и экспонированными в цитоплазму доменами находящихся на клеточной мембране молекул вирусных гликопротеинов. Это взаимодействие приводит к упаковке капсидов и высвобождению вирусных частиц во внеклеточную среду.



Вирусная геномная РНК в клетке транслируется с образованием белков – компонентов репликативного комплекса (nsP1234) (показаны затемнёнными прямоугольниками). Репликаза осуществляет синтез (-)цепи и двух типов (+)цепей: геномной РНК и субгеномной РНК. Трансляция субгеномной РНК приводит к синтезу структурных белков С-Е3-Е2-6к-Е1 (показаны светлыми прямоугольниками)

**Рис. 1.** Стратегия генома альфавирусов: схема синтеза вирусных РНК и процессинга вирусных белков

The viral genomic RNA is translated in the cell to produce protein components of the replicative complex (nsP1234) (depicted as dark rectangles). Replicase performs synthesis of the (-) chains and the two types of (+) chains: genomic RNA and subgenomic RNA. Translation of the subgenomic RNA leads to the synthesis of structural proteins C-E3-E2-6k-E1 (depicted as open rectangles)

**Fig. 1.** Strategy of alphaviral genome: synthesis of viral RNAs and processing of the viral proteins

### Стратегия генома альфавирусов

В ходе альфавирусной инфекции в инфицированной клетке синтезируются три типа вирусных РНК: геномная (+ полярности), антигеномная (- полярности) и субгеномная (+ полярности). Геном альфавирусов (т.н. 49S РНК) по молекулярной организации напоминает клеточные информационные РНК и представляет собой протяжённую (11-12 кб) молекулу РНК, которая кэпирована на 5'-конце и полиаденилирована на 3'-конце.

Альфовирусная геномная РНК формально является бицистронной, т.е. имеет две протяжённых рамки считывания (ORF), из которых первая ORF (ближайшая к 5'-концу) кодирует неструктурные белки (nsP), а вторая кодирует структурные белки вируса (С-Е3-Е2-6к-Е1). Благодаря наличию кэпа 49S РНК транслируется на рибосомах, но синтез белков в ходе трансляции геномной РНК происходит только с первой ORF. Структурные белки синтезируются в ходе трансляции другой вирусной РНК – субгеномной РНК (сгРНК).

Структурные белки альфовирусов (С, Е3, Е2, 6К, и Е1) синтезируются как один полипротеин. N-концевая часть капсидного белка (С) связывает геномную РНК, а С-конец капсидного белка взаимодействует с цитоплазматическим хвостом поверхностного гликопротеина Е2. Белок Е3 служит в качестве сигнальной последовательности для транслокации Е2 в люминальное пространство эндоплазматического ретикулума (ER). Последовательность Е3 отщепляется от Е2 в транс-Гольджи комплексе и у большинства видов альфовирусов Е3 не присутствует в составе зрелого вириона. Гликопротеин Е2 представляет собой трансмембранный белок, который у разных альфовирусов несёт два или три сайта N-гликозилирования, а также вируснейтрализующие эпитопы. Пептид 6К служит в качестве сигнального пептида для транслокации в ER гликопротеина Е1 [3]. Белок Е1 несёт один или два сайта N-гликозилирования, короткий цитоплазматический хвост, и консервативную последовательность из гидрофобных остатков аминокислот в N-концевой части белка, которая называется пептидом слияния. Пептид слияния играет роль в механизме слияния липидного бислоя вириона и мембраны эндосомы во время проникновения вируса в клетку. Структурный полипротеин (С-р62-6К-Е1) транслируется с субгеномной 26S РНК. Структурный полипротеин ко-трансляционно расщепляется на белок капсида (С), меньший по размеру полипротеин р62, пептид 6К и белок Е1. р62 в дальнейшем расщепляется на белки Е3 и Е2. Белки р62 и Е1 ассоциируют друг с другом с образованием гетеротримеров, которые превращаются в зрелые вирусные шипы после процессинга белка р62; процессинг р62 происходит в позднем аппарате Гольджи.

Неструктурные белки синтезируются в форме полипротеина (или двух полипротеинов разной длины). Полипротеин-предшественник первоначально транслируется с попавшей в клетку геномной РНК вируса. Способность геномной РНК к трансляции приводит к тому, что данная РНК обладает инфекционностью (вирусная инфекция может быть инициирована путём трансфекции в клетки «голой» полноразмерной 49S РНК). Полипротеин посттрансляционно расщепляется на меньшие фрагменты и, в конечном счете, в инфицированной клетке образуются четыре белка, называемые неструктурными белками nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4. Эти белки образуют репликазу/транскриптазу, которая синтезирует все вирусные РНК, включая субгеномную РНК. Один полипротеин, синтезируемый в результате трансляции 49S РНК, называется nsP123 и состоит из трёх неструктурных белков nsP1, nsP2 и nsP3 [4]. Трансляция nsP123 заканчивается на терминирующем кодоне UGA (опал кодон). Процессинг nsP123 происходит в результате протеазной активности nsP2. Второй полипротеин синтезируется в результате сквозного прочтения терминирующего кодона (т.е. отсутствия терминации на стоп-кодоне). Сквозное прочтение стоп-кодона (readthrough) – не очень частое трансляционное событие, оно происходит с вероятностью 10-20%. Сквозное прочтение стоп-кодона описано не только у альфовирусов; оно описано наилучшим образом на примере трансляции у бактериофагов (Q-beta), некоторых вирусов растений (TMV) и ретровирусов [5]. Причиной отсутствия терминации на кодоне UGA может быть роль супрессорных транспортных РНК (Sup-tRNA<sup>Trp</sup> или Sup-tRNA<sup>Ser</sup>), которые в небольшом количестве присутствуют в клетках животных, или неправильное прочтение кодона рибосомой с использованием триптофановой аминокислот-тРНК (tRNA<sup>Trp</sup>). В результате сквозного прочтения кодона UGA синтезируется полипротеин nsP1234 [4]. Описанная организация

ORF, по-видимому, имеет регуляторную роль. Она приводит к тому, что доминирующим продуктом трансляции является полипротеин nsP123, а nsP4 синтезируется в значительно меньших количествах. Впрочем, описаны альфавирусные геномы, у которых в ORF неструктурных белков нет стоп-кодона, и такие геномы производят только полипротеин nsP1234.

Оба вирусных полипротеина расщепляются на функционально активные неструктурные белки, по-видимому, при участии только одной протеазы – вирусной протеазы nsP2; соответствующая протеолитическая активность есть также у полипротеинов, включающих nsP2. Как индивидуальные белки (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), так и промежуточные интермедиаты, образующиеся в ходе протеолиза, играют роль в репликации вируса.

Белок nsP1 обладает ферментативными активностями гуанин-7-метилтрансферазы и гуанилилтрансферазы. Весьма вероятно, что nsP1 участвует в кэпировании новосинтезированных вирусных геномных и субгеномных РНК. nsP1 уникален среди неструктурных белков альфавирусов в том отношении, что в инфицированной клетке он выявляется в форме связанной с мембранами. Ассоциация nsP1 с липидным бислоем связана с пост-трансляционной модификацией – пальмитоилированием (присоединением пальмитиновой кислоты) к одному остатку Cys, а также с наличием идентифицированного мотива из положительно заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков. Таким образом, nsP1 может закоривать репликативные комплексы на клеточных мембранах.

Белок nsP2 имеет несколько ферментативных активностей. N-концевой домен nsP2 имеет активность РНК-геликазы, необходимую для раскручивания РНК дуплексов в ходе репликации и транскрипции вирусных РНК. N-концевой домен содержит также активности РНК трифосфатазы и нуклеозид трифосфатазы. С-концевой домен nsP2 обладает активностью папаин-подобной цистеиновой протеазы, а также домен метилтрансферазы. Протеолитический домен nsP2 ответственен за протеолитический процессинг неструктурных белков вируса. И индивидуальный (зрелый) белок nsP2, и последовательность nsP2 в составе полипротеина, протеолитически активны, хотя различаются по субстратной специфичности. Протеаза nsP2, когда присутствует в составе полипротеина, может расщеплять неструктурный полипротеин *in cis* (то есть в той же молекуле), только на стыке nsP3/nsP4. Расщепление неструктурного полипротеина в других потенциальных сайтах протеолиза для протеазы nsP2 (на стыках nsP1/nsP2 и nsP2/nsP3) происходит только *in trans* (то есть одна молекула воздействует на другую). Расщепление *in trans* возможно только когда в клетке накопится достаточное количество неструктурного полипротеина. Таким образом, ход протеолитического процессинга зависит от концентрации неструктурного полипротеина и от времени после инфицирования, что является механизмом временной регуляции репликации. А именно: на ранних стадиях инфекции в результате трансляции 49S РНК нарабатываются nsP123 и nsP1234. Стык nsP3/nsP4 расщепляется *in cis*, что высвобождает nsP4. Поскольку процессинг nsP123 может происходить только *in trans*, на ранних стадиях инфекции в клетке преобладают nsP123 и nsP4. Со временем концентрация nsP123 увеличивается, и молекулы nsP123 начинают взаимодействовать друг с другом, расщепляя друг друга *in trans*. Образующиеся в результате полипротеины nsP23 или nsP234 также способны расщепляться только *in trans*. Поскольку все четыре неструктурных белка являются компонентами репликативного комплекса, состав репликативных комплексов в инфицированной клетке меняется со временем: nsP123/nsP4 в начале инфекции, nsP1/nsP2/nsP3/nsP4 в конце инфекции.

До настоящего времени относительно мало известно о функциях белка nsP3. Мутационный анализ показал, что nsP3 требуется для синтеза минус-цепи РНК и субгеномной РНК, как в качестве индивидуального белка, а в контексте полипротеина

P123. N-концевой домен nsP3 подобен по третичной структуре активному центру белков с активностью ADP-рибоза-1-фосфат фосфатазы и может обладать РНК-связывающей активностью [6]. На С-конце белок nsP3 сильно фосфорилирован по остаткам Ser и Tre.

Активность РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP) представлена в белке nsP4. Белок nsP4 имеет консервативный мотив GDD (Gly-Asp-Asp), обычный для вирусных RdRP. *In vitro* nsP4 обладает активностью терминальной аденилтрансферазы (т.е. безматрично добавляет остатки аденина к 3'-концу РНК) [7]. Эта ферментативная активность может обеспечивать полиаденилирование новосинтезированных РНК и поддерживать длину поли(А)-хвоста у существующих вирусных РНК, что необходимо для предотвращения их деградации в клетке.

### **Репликация альфавирусов**

По сравнению с большинством других родов вирусов, альфавирусы отличает очень высокая репликативная активность: в инфицированных культурах клеток млекопитающих альфавирусы рутинно достигают титров  $\sim 10^{10}$  бляшкообразующих единиц в миллилитре культуральной среды (БОЕ/мл). Всего за несколько часов после заражения клетки в ней подавляется трансляция собственных РНК и трансляционный аппарат клетки превращается в «фабрику», синтезирующую вирусные белки. В результате подавления трансляции клеточных белков инфицированная клетка погибает (через 10-20 ч после инфекции альфавирусами дикого типа), в этом проявляется сильное цитопатическое действие альфавирусов. До гибели инфицированная клетка успевает произвести  $\sim 10^4$  вирусных частиц, которые отпочковываются от цитоплазматической мембраны. Выход вирионов начинается всего через 3 ч после заражения, становится максимальным через 5-7 ч после заражения и поддерживается на высоком уровне до отслаивания погибших клеток от субстрата [8]. Репликация альфавирусных геномов и синтез всех вирусных РНК происходит в цитоплазме инфицированной клетки, без вовлечения ядерного аппарата, обеспечивающего транскрипцию, процессинг и транспорт клеточных информационных РНК.

Первое событие в репликации альфавирусных геномов – это синтез полноразмерной антигеномной (–)цепи РНК с использованием геномной РНК в качестве матрицы, который происходит уже в течение первого часа после заражения. Даже в период максимального синтеза (–)цепей их массовая доля не превышает 10% от общего содержания вирусных РНК в клетке. Через 5-6 ч после заражения синтез (–)цепей прекращается, в то время как синтез (+)цепей продолжается ещё несколько часов. Есть указания на то, что переключение между преимущественным синтезом (–)цепи и преимущественным синтезом (+)цепей происходит при участии вышеописанного дифференциального протеолиза неструктурного полипротеина [4, 9]. Синтез (–)цепи происходит при участии репликативного комплекса состава nsP123/nsP4. Репликаза nsP123/nsP4 эффективно синтезирует (–)цепь РНК с использованием 49S РНК в качестве матрицы, но мало активна в отношении синтеза (+)цепей. Репликаза (+)цепей состоит из индивидуальных белков nsP1/nsP2/nsP3/nsP4. Эта форма репликазы синтезирует 49S геномную РНК и 26S субгеномную РНК. На ранних стадиях инфекции субгеномной РНК синтезируется больше, чем геномной, и наоборот – в конце инфекции, когда 49S геномная РНК преобладает среди новосинтезированных вирусных РНК. Промежуточный комплекс nsP1/nsP23/nsP4 также, возможно, существует в течение определённого времени и может осуществлять синтез какой-либо из разновидностей вирусных РНК [10]. Синтез обоих типов (+)цепей происходит за счёт транскрипции полноразмерной антигеномной РНК, но инициация синтеза 49S РНК происходит у 3'-конца (–)цепи, а инициация синтеза 26S РНК происходит далеко от концов матрицы – внутри последовательности (–)цепи, на сайте, получившем название субгеномного промотора (промотора 26S РНК). Субгеномный

промотор (SP) – последовательность длиной ~50 нт – находится за геном nsP4, и непосредственно у 5'-конца открытой рамки считывания, кодирующей структурный полипротеин. Субгеномный промотор активен только на поздних стадиях инфекции но, при этом, транскрипция с субгеномного промотора создаёт в инфицированной клетке существенно больше сгРНК, чем в ней синтезируется 49S геномной РНК.

### **Альфавирусные векторы для продукции белков**

Ряд особенностей альфавирусов делают их чрезвычайно привлекательными векторами для продукции рекомбинантных белков в эукариотических клетках, это: 1) очень широкий хозяйский и тканевый тропизм альфавирусов проявляется *in vitro* в их способности размножаться в разных типах клеток позвоночных и беспозвоночных животных; 2) активная репликация альфавирусов сопровождается синтезом большого количества белков, закодированных в вирусных РНК, что можно использовать для высокоэффективной экспрессии гетерологических белков; 3) небольшой геном альфавирусов позволяет проводить встройки генов и другие манипуляции с геномами в форме кДНК, используя рутинные генно-инженерные подходы; 4) геномные РНК альфавирусов являются инфекционными при трансфекции в клеточные культуры, что означает возможность получения вирусного потомства путём трансфекции.

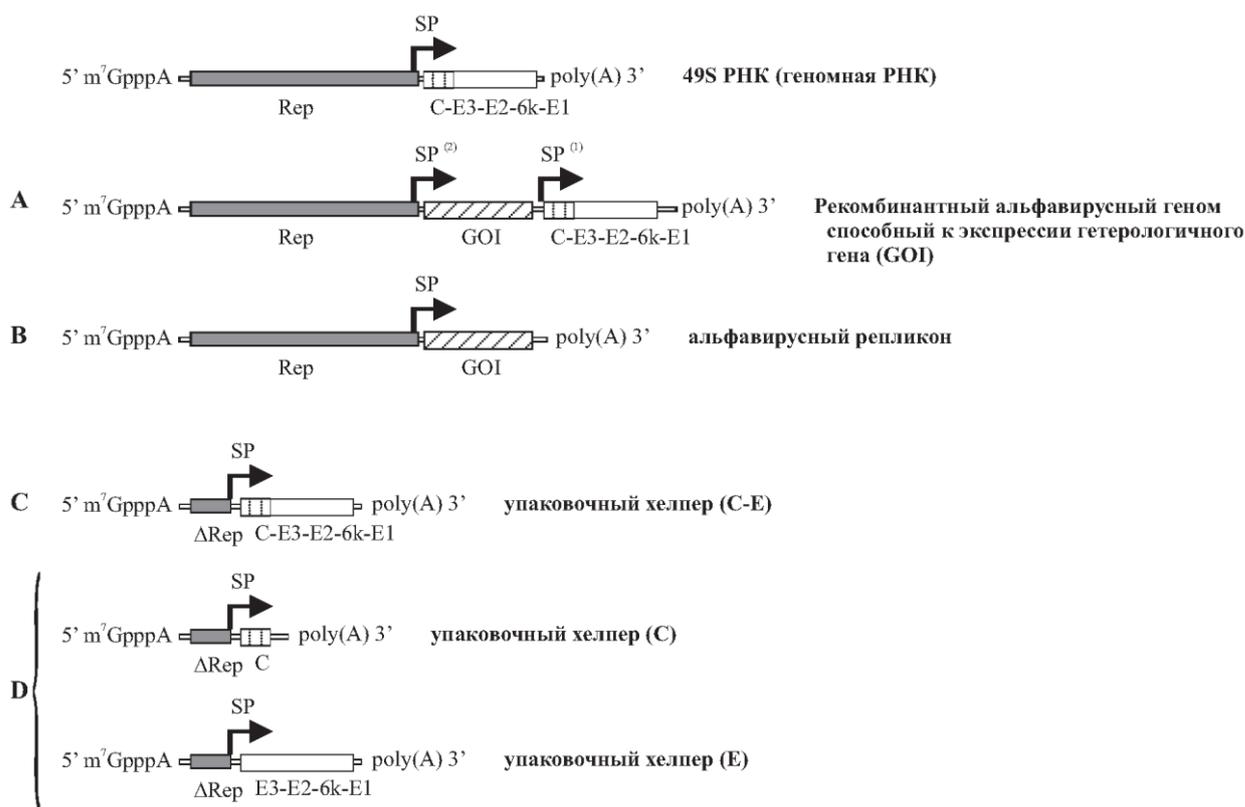
Первым шагом для создания альфавирусных экспрессионных систем была сборка полноразмерных кДНК-копий геномов для нескольких видов альфавирусов. Полноразмерные кДНК-копии были впервые получены для вируса Синдбис (SIN), вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (VEE) и вируса леса Семлики (SFV). Общая стратегия работы с геномами РНК-вирусов в форме кДНК предусматривает встраивание кДНК-копии полноразмерной последовательности вирусного генома в плазмиду под контроль промотора РНК-полимеразы SP6 или РНК-полимеразы T7. Такая встройка позволяет получать РНК, эквивалентные вирусным геномным РНК, с использованием транскрипции *in vitro*, опосредованной коммерчески доступной рекомбинантной SP6 или T7 РНК-полимеразой. Полученную в результате транскрипции *in vitro* РНК, представляющая собой синтетическую геномную РНК, используют для трансфекции клеточных культур. Трансфекция геномной РНК приводит к продуктивной инфекции культуры, такой же, как если бы клетки были инфицированы вирусом. Генетическая инженерия геномов альфавирусов в форме кДНК-клонов позволила разработать вектора для экспрессии путем введения гетерологических генов в вирусную последовательность. Первые альфавирусные вектора были разработаны для вирусов SIN, SFV и VEE. Описано два основных типа экспрессионных конструкций с использованием альфавирусных геномов: репликативно-компетентные векторы и суицидные векторы. Под репликацией в последнем термине (репликативно-компетентные векторы) понимается репликация рекомбинантного вируса в культуре инфицированных клеток, а не только внутриклеточная репликация молекулы РНК. Т.е. репликативно-компетентные векторы способны к продуктивной инфекции в культуре. В первом типе векторов в последовательность вирусного генома встроена вторая копия субгеномного промотора (SP), которую располагают сразу за ORF неструктурных белков, или же за ORF структурных белков перед 3'UTR. Под контроль второй копии SP встраивают целевой гетерологический ген [11, 12] (рис. 2А). Репликативно-компетентные векторы производят живые вирусы, в связи с чем такие векторные системы считаются потенциально опасными.

Другой тип векторов – суицидные векторы – получают путём замены генов структурных белков на гетерологический ген (рис. 2В). Суицидные векторы способны к внутриклеточной репликации на уровне РНК, но не могут упаковываться в вирусные частицы (из-за отсутствия структурных белков) и поэтому не вызывают продуктивную

инфекцию. Другое название суицидных векторов – автономно реплицирующиеся фрагменты геномов или репликоны. Репликоны доставляют в клетки путём трансфекции. В клетках, трансфицированных репликонами, синтезируется множество копий субгеномной РНК, трансляция с которых приводит к синтезу гетерологичного рекомбинантного белка. Репликация альфавирусных геномов сопровождается негативными для клетки эффектами, и поэтому нетрансфицированные клетки имеют преимущество в скорости роста. Если не использовать селекцию для поддержания репликонов в культуре, то экспрессия гетерологического гена будет носить транзистентный характер, потому что репликоны постепенно элиминируются из клеток. Репликация альфавирусных геномов с вирусными генами дикого типа индуцирует апоптоз, что также обуславливает транзистентный характер экспрессии.

Альфавирусные вектора позволяют производить очень большое количество рекомбинантных белков. Например, уровень продукции бета-галактозидазы в ходе экспрессии с использованием репортёрного гена *LacZ*, встроенного в геномы SFV или SIN, составил 60-100 мкг на  $10^6$  клеток. Это очень высокий уровень экспрессии, и он может быть увеличен ещё в десять раз путем слияния (с сохранением рамки считывания) гена гетерологического продукта с так называемым трансляционным энхансером, который представляет собой короткий фрагмент нуклеотидной последовательности гена белка капсида. Трансляционный энхансер – шпилечная структура, образованная первыми 102 нт гена белка капсида SFV (или 226 нт гена белка капсида SIN). Трансляционный энхансер использован в альфавирусных векторах для экспрессии на высоком уровне гликопротеинов SFV, антигена ВИЧ (HIV) и различных цитокинов [13-16].

Альфавирусные экспрессионные вектора можно доставить в клетку с помощью РНК-трансфекции. В этом случае полноразмерную геномную РНК синтезируют *in vitro* и ею трансфицируют клеточные культуры. По альтернативной технологии оживления альфавирусов и их репликонов, кДНК полноразмерных геномов альфавирусов встраивают в эукариотические плазмиды под контроль эукариотического промотора (CMV или SV40). В последнем случае клеточные культуры подвергаются ДНК-трансфекции. Описанную экспрессионную систему с использованием плазмидной ДНК и автономно реплицирующейся РНК называют «многослойной» (RNA/DNA layered system). В результате трансфекции плазида попадает в ядро эукариотической клетки, где РНК-полимераза II распознаёт промотор и синтезирует РНК-транскрипт с альфавирусной кДНК. Такой транскрипт транспортируется в цитоплазму, с него транслируется вирусная репликаза, и с этого момента начинаются автономная репликация вирусной РНК и синтез закодированных в РНК белков. Многослойные ДНК/РНК системы разработаны для SIN и SFV.



В верхней части рисунка приведена схема альфавирусного генома: А – репликативно компетентный альфавирусный геном, способный к экспрессии гетерологичного гена. GOI встроен под контроль второй копии субгеномного промотора, ORF GOI (показана косой штриховкой) находится между ORF неструктурных белков и ORF структурных белков; В – альфавирусный автономно реплицирующийся фрагмент генома (репликон). В репликоне ORF структурных белков заменена на ORF GOI; С – структурная организация хелперной РНК, способной к экспрессии полноразмерного структурного полипротеина (С-Е3-Е2-6к-Е1). В хелперах большая часть генов репликазы делетирована (deltaRep); D – упаковочная система с двумя хелперами РНК: упаковочный хелпер (С) производит только белок капсида (С); упаковочный хелпер (Е) не имеет гена белка капсида, но производит полипротеин, расщепляющийся на гликопротеины оболочки (Е3-Е2-6к-Е1).

**Рис. 2.** Альфавирусные экспрессионные вектора, репликоны и упаковочные хелперы

Upper part of the figure presents a diagram of the alphaviral genome: A – replication competent alphavirus capable of expressing the heterologous gene. The gene of interest (GOI) is integrated under the control of a second copy of subgenomic promoter. The GOI ORF (shown as a cross-hatched rectangle) is placed between the ORFs for nonstructural proteins and structural proteins; B – autonomously replicating fragment of the alphaviral genome (replicon). In the replicon, the ORF for structural proteins is replaced by the GOI ORF; C – structural organization of the helper RNA capable of expressing full-length structural polyprotein (C-E3-E2-6k-E1). In the helper, most of the region encoding replicase is deleted (deltaRep); D – the packaging system with two helper RNAs: packaging helper (C) produces only the capsid protein (C); packaging helper (E) has no capsid protein gene, but produces a polyprotein which is processed into envelope glycoproteins (E3-E2-6k-E1).

**Fig. 2.** Alphaviral expression vectors, replicons and packaging helpers.

### Упаковка альфавирусных репликонов

В описанных в предыдущем разделе векторно-клеточных системах, безвирусные (т.н. «наивные») клеточные культуры трансфецируют с целью получения продуцирующих культур (культур, производящих целевой рекомбинантный белок) в один этап. Для промышленного использования более пригодны системы, в которых продуцирующие культуры получают в два этапа. На первом этапе рекомбинантные вирусные геномы

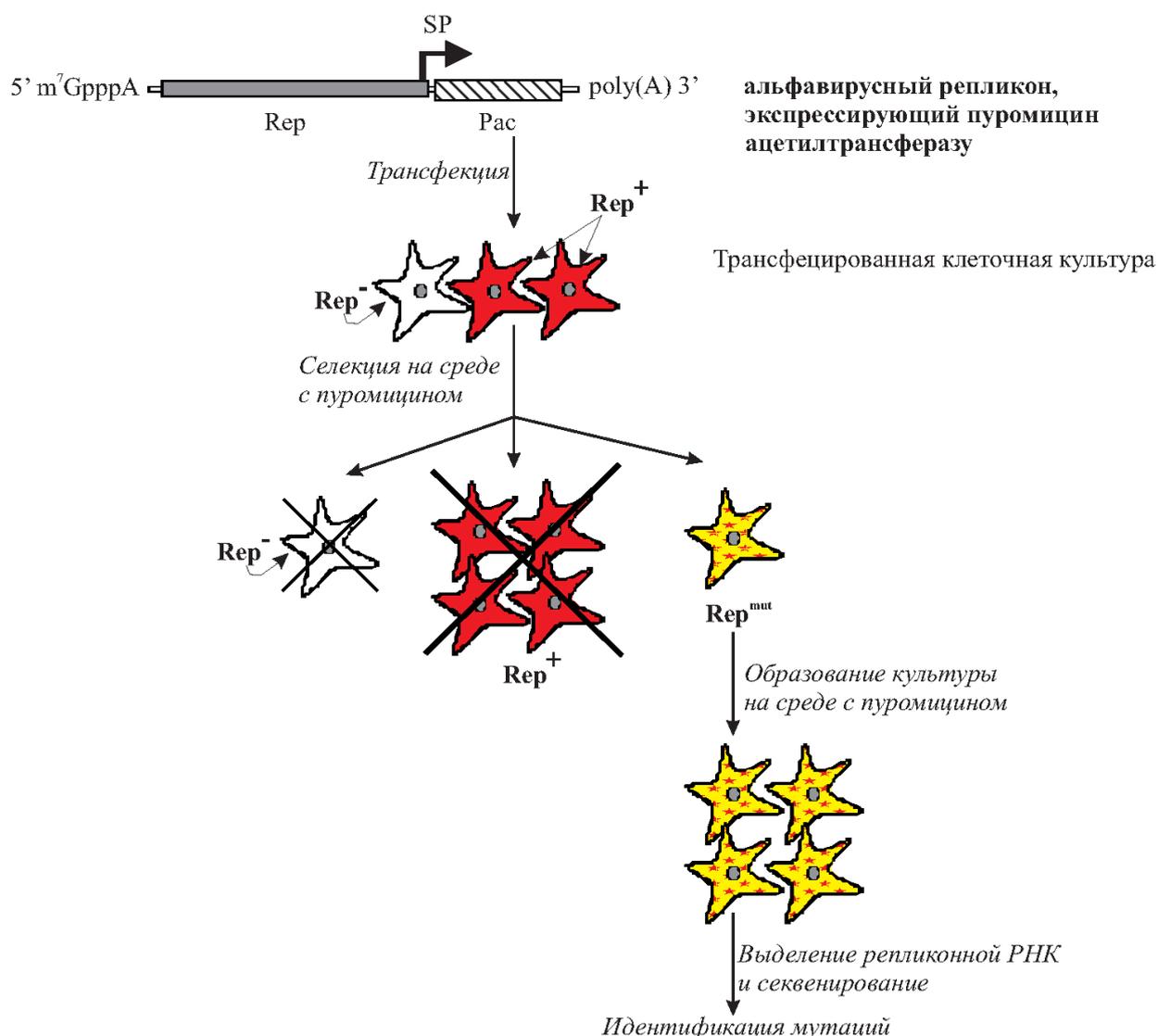
сначала упаковывают в вирусные частицы. На втором этапе полученным упакованным вирусом инфицируют наивные клетки и получают продуцирующие культуры. Дело в том, что эффективность доставки вирусной нуклеиновой кислоты в клетки существенно выше в случае вирусной инфекции, по сравнению с самыми эффективными протоколами РНК- или ДНК-трансфекции. Для наиболее безопасных в работе – суицидных – векторов, которые не могут самостоятельно производить вирусные частицы, упаковка в вирионы может быть достигнута, если поставлять структурные белки *in trans*, то есть экспрессировать их с другой генно-инженерной конструкции. Клеточные культуры, которые поставляют структурные белки *in trans*, называют упаковочными культурами. Весьма удобно поставлять структурные белки с использованием т.н. хелперных РНК. Хелперные РНК получают путём модификации геномной РНК того же альфавируса, который использован для получения репликона. Для создания хелперных РНК из генома альфавируса удаляют большую часть ORF репликазы, но сохраняют ORF, кодирующую структурные белки и 5'- и 3'-нетранслируемые области, необходимые для репликации (рис. 2С, 2D). В простой упаковочной системе для альфавирусных репликонов используется одна хелперная РНК (рис. 2С), с которой продуцируется полный структурный полипротеин (С-Е3-Е2-бк-Е1). В более сложной упаковочной системе с двумя хелперами с одной хелперной РНК-конструкции синтезируется капсидный белок, а со второй хелперной РНК синтезируются гликополипротеины оболочки (рис. 2D). Для упаковки продуцирующего репликона последний ко-трансфецируют в клеточные культуры вместе с хелперными РНК. Когда в результате трансфекции в одной клетке оказываются продуцирующий репликон и хелпер(ы), вирусная репликаза осуществляет размножение в цитоплазме обоих типов вирусных РНК и синтезирует сгРНК. Образующиеся в результате трансляции сгРНК структурные белки упаковывают репликон, потому что репликонная РНК несёт сигнал упаковки. Дизайн хелперных РНК обычно делают так, что хелперная РНК не имеет упаковочного сигнала, поэтому в данной системе не образуются вирионы, содержащие хелпер. Простая упаковочная система с одним хелпером обеспечивает получение вирусных частиц с высокими титрами ( $10^9$  фокус-образующих единиц в 1 мл культуральной среды). Однако в системе с одним хелпером достаточно часто происходит РНК-рекомбинация между продуцирующим репликоном и хелпером. В результате такой рекомбинации образуется вирусный геном, кодирующий репликазу и структурные белки. Данный рекомбинант является полноценным вирусом, способным к продуктивной инфекции и теоретически может обладать вирулентностью вируса дикого типа. При использовании двух хелперов требуются, соответственно, два разных рекомбинационных события для появления вируса дикого типа, что делает упаковочную систему с двумя хелперами более безопасной. Двуххелперная упаковка успешно использована для SIN, VEE и SFV. Кроме вышеописанных упаковочных культур, созданы клеточные линии, в которых использована геномная интеграция альфавирусных последовательностей. Фрагмент альфавирусного генома в форме кДНК, начинающийся выше субгеномного промотора и заключающий в себя ORF структурных белков, встраивают под контроль конститутивного эукариотического промотора и проводят интеграцию полученной конструкции в геном клетки. После селекции трансформированных клонов получают клеточную линию, которая конститутивно производит мРНК, являющуюся по последовательности фрагментом альфавирусного генома. Из-за того, что данная мРНК имеет в 5'-нетранслируемой области последовательность вирусного субгеномного промотора, данная РНК не транслируется с образованием структурных белков. Однако после трансфекции репликоном данная мРНК используется вирусной репликазой в качестве матрицы для синтеза сгРНК, с которых транслируется структурный полипротеин.

### **Стратегия получения мутантных альфавирусов со сниженным ЦПД**

Высокие достижимые уровни белковой экспрессии делают альфавирусы чрезвычайно привлекательными векторами. В то же время существует препятствие для такого использования альфавирусов дикого типа. Данное препятствие – сильное цитопатическое действие (ЦПД) вирусов дикого типа, которое приводит к гибели монослоя продуцирующих клеток в результате вирусной репликации. ЦПД обуславливает временный (транзистентный) характер экспрессии и снижает выход рекомбинантного продукта с площади культурального сосуда. Были выполнены исследования по поиску мутаций, снижающих ЦПД в ходе репликации альфавирусных геномов. Описаны мутации, снижающие ЦПД вирусов SIN, SFV [17, 18], VEE и EEE [19] (таблица 1).

Далее, включение генов устойчивости к эукариотическим антибиотикам в качестве селективных маркёров в альфавирусные вектора делает возможным создание персистентно инфицированных клеточных линий, в которых поддерживается репликация альфавирусов и продуцируются белки с гетерологических генов, встроенных в вирусные геномы. Большинство нецитопатогенных мутантов альфавирусов несут мутации в гене nsP2 (таблица 1). Ряд описанных мутаций в nsP2 затрагивает домен протеазы (nsP2 является вирусной протеазой, ответственной за процессинг неструктурного полипротеина) или находятся поблизости от сайтов расщепления nsP1/nsP2 или nsP2/nsP3. Такие мутации, по-видимому, влияют на скорость процессинга полипротеина, временную регуляцию компонентного состава репликасы, моменты переключения между синтезом (–)РНК и (+)РНК и начала синтеза сгРНК.

Широко используемая стратегия для выделения нецитопатических мутантов альфавирусов заключается в создании репликонов, экспрессирующих селективный маркер, например признак резистентности к эукариотическим антибиотикам (рис. 3). Такие репликоны трансфецируют в культивируемые клетки и подвергали селекции в среде, содержащей соответствующий антибиотик. Нетрансфецированные клетки или клетки, утратившие репликон, элиминируются под действием антибиотика. Репликация альфавирусных РНК может вызывать апоптоз, что также приводит к гибели большинства трансфецированных клеток. С определённой небольшой частотой в популяции трансфецированных клеток появляются такие клетки, в которых реплицирующаяся альфавирусная РНК приобрела случайные мутации. Если такие мутации приводят к нецитопатогенной репликации, то клетки-хозяева, несущие мутантные репликоны, выживают и дают колонии. Такие колонии размножают и секвенируют находящиеся в них вирусные РНК для поиска нужных мутаций.



Ген Pac (пурамицин ацетилтрансфераза – фермент, придающий устойчивость к эукариотическому антибиотику пурамицину), клонирован в альфавирусном репликоне. Культуру клеток млекопитающих трансфецируют данным репликоном и инкубируют в присутствии пурамицина. Нетрансфецированные клетки (Rep<sup>-</sup>) погибают под действием антибиотика. Большинство трансфецированных клеток (Rep<sup>+</sup>) погибают из-за ЦПД, вызванного репликацией альфавирусного генома. В небольшой части популяции трансфецированных клеток появляются мутантные альфавирусные геномы со сниженным ЦПД (Rep<sup>mut</sup>). Эти клетки дают клоны, из которых выделяют вирусную РНК для идентификации мутаций.

**Рис. 3.** Технология поиска мутаций, которые снижают ЦПД в ходе репликации альфавирусных геномов

Gene Pac (puromycin acetyltransferase, the enzyme conferring resistance to the eukaryotic antibiotic puromycin) is cloned into the alphaviral replicon. The mammalian cell cultures are transfected with the Pac-expressing replicon and incubated in the presence of puromycin. Non-transfected cells (Rep<sup>-</sup>) are killed by the antibiotic. Most of the transfected cells (Rep<sup>+</sup>) die because of CPE induced by the alphaviral replication. In a small number of transfected cells, mutant alphaviral genomes appear because of spontaneous mutations. If the mutations reduce the CPE, these cells give rise to clones containing mutant replicons (Rep<sup>mut</sup>). Viral RNA is isolated from the Rep<sup>mut</sup> clones to identify the mutations.

**Fig. 3.** Technology to search for mutations that reduce cytopathic effect CPE during alphavirus replication

### Мутантные альфавирусные геномы со сниженным цитопатическим действием

Большая практическая значимость альфавирусных экспрессионных систем вызвала огромный интерес к поиску мутаций, снижающих ЦПД [17-20] (таблица 1). Первым описанным мутантным альфавирусным геномом со сниженной цитопатогенностью был вирус SIN с одной аминокислотной заменой в положении 726 в белке nsP2 (P726S). В клетках, инфицированных мутантом P726S, содержание вирусных РНК было в ~100 раз ниже по сравнению с клетками, инфицированными вирусом SIN дикого типа (wt). Меньшая интенсивность репликации может объяснять сниженную цитопатогенность мутанта P726S. Интересно, что рекомбинантный вирус с мутацией P726S, содержащий вставку гена бета-галактозидазы, продуцировал более высокие уровни бета-галактозидазы, чем wt SIN. Путем включения гена пурамицин ацетилтрансферазы (Pac) в геном мутанта SIN P726S и добавления пурамицина в культуральную среду трансфицированных клеток можно было отобрать клеточные линии, в которых стабильно реплицируется вирусный геном. Позже были обнаружены другие мутанты SIN и SFV, содержащие аминокислотные замены в nsP2: A1E в SIN; L10T и L713P в SFV. Описанные мутанты обеспечивают эффективную экспрессию гетерологичных генов. В некоторых случаях устранение цитопатического фенотипа требовало двух или нескольких мутаций, одновременно присутствующих в репликазе. Одним из примеров является мутант SFV, несущий в nsP2 две мутации: S259P и R649D. Некоторые нецитопатические альфавирусные геномы были получены путем введения мутаций, описанных для одного вида альфавирусов в гомологичное положение другого вида альфавирусов. Одним из показательных примеров является двойной мутант SFV-S2-9, который содержит мутации P718T и R649H в nsP2 [17]. В описанном случае мутация P718T, которая эквивалентна P726T в SIN, не в состоянии произвести нецитопатический фенотип SFV сама по себе. Тем не менее, работа с одиночным мутантом P718T позволила найти вторую мутацию в геноме SFV – R649H, которая в сочетании с первой мутацией делает репликацию SFV нецитопатической. Введение гена Pac в геном SFV-S2-9 позволяет получать персистентно инфицированные клеточные линии. Продемонстрировано, что возможно получить и клеточные линии, производящие рекомбинантный белок, ген которого слит в рамке с геном Pac с помощью протеазы 2A вируса ящура в качестве линкера. С использованием описанной стратегии были получены клеточные линии, которые экспрессируют инсулиноподобный фактор роста человека I (IGF-I) или кардиотрофин 1 (CT-1) в среду инкубации культуры. Уровни продукции с 1 литра культуральной среды за 24 ч инкубации достигают 1,4 мг для IGF-I и 8,6 мг для CT-1 [20]. Хотя автономно реплицирующиеся РНК считаются склонными к спонтанному мутагенезу, стабильность экспрессии гетерологичных генов оказалась неожиданно высокой, показывающей очень низкую частоту мутаций ( $\sim 2 \times 10^{-4}$ ), которая не увеличивалась с количеством пассажей [20].

**Таблица 1.** Мутантные геномы альфавирусов со сниженной цитопатогенностью

**Table 1.** Mutant alphaviral genomes with reduced cytopathic effect

Вирус Virus	Название мутантного штамма Name of the mutant strain	Белок, в котором локализована мутация Protein in which the mutation is localized	Аминокислотная замена Amino acid substitution	Гетерологический белок или маркер <sup>1</sup> Heterologous protein or marker <sup>1</sup>	Выход <sup>2</sup> гетерологического рекомбинантного белка (мг/10 <sup>9</sup> клеток/24 ч) Yields <sup>2</sup> of the heterologous recombinant proteins (mg/10 <sup>9</sup> cells/24 hrs)
SFV	SF2A	nsP2	L10T	GFP	н.и.
SFV	SF2C	nsP2	L713P	GFP	н.и.

SFV	SFV-S2-9	nsP2	P718T + R649H	b-Gal, rCT, hCT, hIGF-I	13-18 (b-Gal); 10 (rCT); 8,6 (hCT); 1,4 (hIGF-I)
SFV	SFV (PD713P)	nsP2	S259P + R650D + L713P(ts) <sup>3</sup>	GFP	н.и.
SFV	SFV (PDTE)	nsP2 и nsP4	S259P + R650D + M780T + G153E(ts)	GFP	н.и.
SIN	SIN-1	nsP2	P726S	SEAP, b-Gal, Luc	н.и.
SIN	S1	nsP2	A1E	GFP	н.и.
SIN	S2	nsP2	P726T	GFP	н.и.
SIN	SINrep/19	nsP2	P726L	b-Gal, GFP, CD46	1,4 (b-Gal)
SIN	pCytTS <sup>4</sup>	nsP2 и nsP4	P726S + G153E(ts)	b-IFN, SEAP, EPO, GFP, (RipDD)23	7,5 (b-IFN)
VEE	5'VEErep	5'UTR <sup>5</sup>	A <sub>3</sub> G <sup>6</sup>	SEAP, GFP	1,2 (SEAP)
VEE	5'VEErep/S	5'UTR и nsP2	A <sub>3</sub> G + P773S	GFP	н.и.
VEE	5'VEErep/L	5'UTR и nsP2	A <sub>3</sub> G + Q739L	GFP	н.и.

Примечания:

<sup>1</sup>GFP – зеленый флуоресцентный белок; b-Gal – бета-галактозидаза; rCT и hCT – крысиный и человеческий кардиотрофин, соответственно; hIGF-I – человеческий инсулин-подобный фактор роста-I; SEAP – секреторная щелочная фосфатаза; b-IFN – бета-интерферон; EPO – эритропоэтин; (RipDD)23 – индуцирующий апоптоз домен белка RIP;

<sup>2</sup>Выход гетерологичного белка на культуре ВНК-21, трансфицированной соответствующим альфавирусным геномом; н.и. – не исследовали;

<sup>3</sup>ts – мутация, которая приводит к температурно-зависимой репликации;

<sup>4</sup>ДНК/РНК – многослойная система;

<sup>5</sup>Мутация в 3-ем положении 5'-UTR не приводит к аминокислотным заменам, но приводит к способности мутантного альфавируса к репликации в клетках с функционирующей системой противовирусного ответа, регулируемой альфа- и бета-интерферонами.

Notes:

<sup>1</sup>GFP – green fluorescent protein; b-Gal, beta-galactosidase; rCT and hCT – rat and human cardiotrophin, respectively; hIGF-I – human insulin-like growth factor-I; SEAP – secretory alkaline phosphatase; b-IFN – interferon-beta; EPO – erythropoietin; (RipDD)23 – apoptosis-inducing protein domain;

<sup>2</sup>Yields of the heterologous protein in ВНК-21 cell culture transfected with the designated alphaviral genome; NI – not investigated;

<sup>3</sup>ts – temperature-sensitive, i.e. the mutation which leads to a temperature-dependent replication;

<sup>4</sup>DNA/RNA – layered system;

<sup>5</sup>Mutation in the 3<sup>rd</sup> position of the 5'-UTR does not lead to amino acid substitution, but results in the ability of the mutant alphaviral genome to replicate in cells with functioning interferon-mediated system of antiviral response.

### Альфавирусные геномы для индуцибельной белковой экспрессии

Несмотря на высокую стабильность, продемонстрированную для ряда автономно реплицирующихся альфавирусных РНК, тот факт, что альфавирусная РНК-полимераза не обладает редактирующей активностью, создаёт возможность накопления нежелательных мутаций в гене целевого белка по мере роста числа пассажей. Это недостаток с точки зрения эффективности производства, или с точки зрения перспектив использования рекомбинантного продукта. Чтобы снизить накопление спонтанных мутаций были созданы клеточные линии, в которых можно регулировать уровни репликации альфавирусов. Наиболее известный тип индуцибельной репликации представляет собой температурно-чувствительную репликацию. Важной чертой альфавирусов как семейства является то, что для них описаны большое количество температурно-чувствительных (ts) мутантов, типичной характеристикой которых является неспособность расти при повышенных температурах и способность к росту при температурах ниже физиологически оптимальной для культивируемых клеток (37°C). Описана индуцибельная ДНК/РНК-система для SIN, сочетающая мутацию P726S в nsP2, которая даёт нецитопатический

фенотип, с мутацией G153E в nsP4, которая приводит к зависимости полимеразной активности nsP4 от температуры (мутантная репликаза не активна при 37°C). В этой системе используется культура клеток, в геном которых интегрирована кДНК-копия (под контролем эукариотического промотора) двойного мутанта SIN. В ходе инкубации клеточной культуры при обычной перmissive температуре 37°C конститутивно продуцируются РНК SIN и неактивная вирусная репликаза. При снижении температуры инкубации до <35°C, мутантная репликаза активируется, что приводит к началу экспрессии гетерологического гена. Клеточная линия ВНК-21, трансгенезированная с использованием описанной системы, может быть эффективно размножена и выдерживает индукцию в течение 60 дней без снижения уровней экспрессии рекомбинантного бета-интерферона, ген которого клонирован под контроль субгеномного промотора SIN. С использованием данной системы можно получить клеточные линии, экспрессирующие после индукции токсичные для клеток белки, такие как апоптоз-индуцирующий домен белка RIP (RipDD)23. Дальнейшее повышение уровней экспрессии в индуцибельных клеточных линиях может быть достигнуто с помощью улучшения транскрипции, ядерного экспорта и стабильности РНК. Одним из практически важных преимуществ температурно-индуцируемых экспрессионных систем является их пригодность для использования в уже существующих технологических схемах промышленного биофармацевтического производства.

Другой тип индуцируемых клеточных линий основан на использовании многослойной ДНК/РНК-системы, в которой последовательность вирусного кДНК-копии альфавирусного генома находится под контролем индуцибельного промотора, например, тетрациклин-регулируемого или экдизон-индуцируемого промоторов. Компания Life Technologies запатентовала использование этого типа систем для индуцибельной экспрессии в трансгенезированных клеточных линиях.

### **Выключение продукции клеточных белков, индуцированное репликацией альфавирусов, способствующих биосинтезу рекомбинантного белка**

Заражение клеток млекопитающих альфавирусами, как правило, приводит к очень быстрому и эффективному подавлению синтеза белков клетки-хозяина. Это явление, получившее название «трансляционное выключение» (shut-off), затрагивает только трансляцию белков с невирусных мРНК. Один из механизмов трансляционного выключения – вирус-индуцированное фосфорилирование эукариотического фактора инициации 2-альфа (eIF2-альфа) в инфицированных клетках. У альфавирусов Старого Света трансляционный энхансер, присутствующий на 5'-конце гена белка капсида, позволяет эффективную трансляцию вирусного структурного полипротеина в присутствии фосфорилированного eIF2-альфа [21]. Эффект трансляционного выключения широко используется для обеспечения преимущественной трансляции рекомбинантных белков, которые экспрессируются с альфавирусных векторов и даже может быть использован для получения практически чистых рекомбинантных белков из трансфицированных альфавирусом клеток. Для достижения последней цели необходимо выполнить два требования: 1) рекомбинантный белковый продукт должен секретироваться в среду инкубации культуры, 2) большинство клеток в культуре должны быть трансфицированы или инфицированы альфавирусным геномом. Этот подход может быть особенно полезным для получения белков, которые трудно очистить из-за контаминации продукта эндогенными клеточными белками. Следуя этой стратегии, компания Proyecto de Biomedicina CIMA (Испания) создала метод экспрессии и очистки человеческого глиального нейротрофного фактора (GDNF) [22]. Технология очистки GDNF из культивируемых клеток млекопитающих, трансфицированных невирусными (плазмидными) векторами, является долгой и неэффективной процедурой, в основном из-

за совместной очистки с продуктом клеточных белков, имеющих сходные с GDNF физико-химические свойства [23, 24]. Многостадийная схема очистки приводит к снижению выхода продукта, что делает эту технологию неэффективной для получения больших количеств GDNF для клинических целей. В случае использования альфавирусной экспрессионной системы, через несколько часов после трансфекции или инфицирования клеток рекомбинантным SFV, экспрессирующим GDNF, синтез белков клетки-хозяина блокируется. GDNF с высокой степенью чистоты накапливается в супернатанте. GDNF, полученный таким образом, был легко очищен из среды инкубации с помощью одного шага хроматографии.

### **Альфавирусные системы экспрессии для идентификации редких белков**

Высокие уровни экспрессии, обеспечиваемые альфавирусными векторами, могут быть использованы в качестве инструмента для идентификации редких белков. Компания Cytos Biotechnology разработала технологию высокопроизводительной экспрессии, названную DELphi (от Discovery of Localized Proteins, обнаружение локализованных белков), которая основана на клонировании кДНК-библиотеки в репликон SIN, неспособный к самостоятельной упаковке в вирионы. Полученную клонотекку затем упаковывают в вирионы с использованием хелперной РНК, кодирующей вирусные структурные белки и содержащей упаковочный сигнал. Далее упакованную клонотекку используют для инфицирования культивируемых клеток с низкой множественностью инфицирования (MOI, multiplicity of infection). Инфекция с MOI<1 приводит к одноударной кинетике инфицирования, и в результате инфицированные клетки накапливают репликоны с только одной определённой последовательностью. Инфицированные клетки могут быть идентифицированы методами иммуноцитохимии, например, с помощью непрямой иммунофлуоресценции после окрашивания меченым лигандом для белка, который должен быть идентифицирован. Окрашенные одиночные клетки выделяются из популяции инфицированных клеток на цитосортере, после чего ген целевого белка может быть амплифицирован из отобранных клеток. Практическая полезность этой технологии была продемонстрирована на примере идентификации клеточного мембранного белка – ко-рецептора аденовируса типа В, который нужен для инфекции аденовирусом. Также данная технология позволила выделить гипермутированные высокоаффинные человеческие моноклональные антитела против вирусоподобных частиц фага Qbeta (модельный вирусный антиген) и против никотина [25].

### **Другие практические применения альфавирусных векторов**

Альфавирусные векторы превосходят другие вирусные векторы по силе индуцируемого клеточного и гуморального иммунного ответов. Транзистентная продукция и ЦПД не являются проблемами для таких приложений, где нужен высокий уровень экспрессии белка в течение короткого временного интервала. Это, прежде всего, вакцинация и генная терапия. С использованием альфавирусных векторов разработаны профилактические и терапевтические вакцины, как против инфекционных заболеваний, так и против неинфекционных болезней. Альфавирусные векторы успешно использованы в исследованиях по генной терапии рака, где альфавирус-индуцированная индукция апоптоза полезна, поскольку способствует противоопухолевому действию. Многие исследования продемонстрировали, что иммунизация с помощью вакцин, содержащих альфавирусы, экспрессирующие цитокины или опухолевые антигены, приводит к сильным противоопухолевым ответам [26].

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Ряд молекулярно-биологических особенностей альфавирусов, в частности, синтез субгеномной РНК и способность снижать синтез клеточных белков, не подавляя синтез белков, закодированных в вирусных РНК, представляют собой замечательное сочетание свойств для создания векторов для эукариотической экспрессии. Альфавирусы позволяют разрабатывать вирусно-клеточные системы для получения рекомбинантных белков и антигенов. Новые генно-инженерные системы, позволяющие получать упакованные *in trans* автономно реплицирующиеся РНК на основе альфавирусных геномов, открывают блестящие перспективы для разработки безопасных и пригодных для промышленного применения технологий использования альфавирусов.

### **Финансирование**

Работа профинансирована из средств проекта «Создание технологии производства рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в культурах клеток млекопитающих» в рамках бюджетной научно-технической программы 0.0659 «Промышленные биотехнологии» на 2014-2016 гг.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Luers A.J., Adams S.D., Smalley J.V., Campanella J.J. A phylogenomic study of the genus Alphavirus employing whole genome comparison // *Comp Funct Genomics*. – 2005. – Vol. 6, №4. – P. 217-227.
2. Vancini R., Hernandez R., Brown D. Alphavirus entry into host cells // *Prog Mol Biol Transl Sci*. – 2015. – Vol. 129. – P. 33-62.
3. Li L., Jose J., Xiang Y., Kuhn R.J., Rossmann M.G. Structural Changes of Envelope Proteins During Alphavirus Fusion. // *Nature*. – 2010. – Vol. 468, №7324. – P. 705-708.
4. Jose J., Snyder J.E., Kuhn R.J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly // *Future Microbiol*. – 2009. – Vol. 4, №7. – P. 837-856.
5. Firth A.E., Wills N.M., Gesteland R.F., Atkins J.F. Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element // *Nucleic Acids Res*. – 2011. – Vol. 39, №15. – P. 6679-6691.
6. Malet H., Coutard B., Jamal S. et al. The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket // *J Virol*. – 2009. – Vol. 83, №13. – P. 6534-6545.
7. Tomar S., Hardy R.W., Smith J.L., Kuhn R.J. Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity // *J Virol*. – 2006. – Vol. 80, №20. – P. 9962-9969.
8. Frolov I., Akhrymuk M., Akhrymuk I., Atasheva S., Frolova E.I. Early events in alphavirus replication determine the outcome of infection // *J Virol*. – 2012. – Vol. 86, №9. – P. 5055-5066.
9. Shin G., Yost S.A., Miller M.T., Elrod E.J., Grakoui A., Marcotrigiano J. Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2012. – Vol. 109, №41. – P. 16534-16539.
10. Gorchakov R., Frolova E., Sawicki S., Atasheva S., Sawicki D., Frolov I. A new role for ns polyprotein cleavage in Sindbis virus replication // *J Virol*. – 2008. – Vol. 82, №13. – P. 6218-6231.

11. Tsetsarkin K., Higgs S., McGee C.E., De Lamballerie X., Charrel R.N., Vanlandingham D.L. Infectious clones of Chikungunya virus (La Reunion isolate) for vector competence studies // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2006. – Vol. 6, №4. – P. 325-337.

12. Vanlandingham D.L., Tsetsarkin K., Hong C., et al. Development and characterization of a double subgenomic chikungunya virus infectious clone to express heterologous genes in *Aedes aegypti* mosquitoes // *Insect Biochem Mol Biol.* – 2005. – Vol. 35, №10. – P. 1162-1170.

13. Chikkanna-Gowda C.P., McNally S., Sheahan B.J., Fleeton M.N., Atkins G.J. Inhibition of murine K-BALB and CT26 tumour growth using a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-18 // *Oncol Rep.* – 2006. – Vol. 16, №4. – P. 713-719.

14. Chikkanna-Gowda C.P., Sheahan B.J., Fleeton M.N., Atkins G.J. Regression of mouse tumours and inhibition of metastases following administration of a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-12 // *Gene Ther.* – 2005. – Vol. 12, №16. – P. 1253-1263.

15. Quetglas J.I., Fioravanti J., Ardaiz N., et al. A Semliki forest virus vector engineered to express IFN $\alpha$  induces efficient elimination of established tumors // *Gene Ther.* – 2012. – Vol. 19, №3. – P. 271-278.

16. Rodriguez-Madoz J.R., Prieto J., Smerdou C. Semliki forest virus vectors engineered to express higher IL-12 levels induce efficient elimination of murine colon adenocarcinomas // *Mol Ther.* – 2005. – Vol. 12, №1. – P. 153-163.

17. Casales E., Rodriguez-Madoz J.R., Ruiz-Guillen M., et al. Development of a new noncytopathic Semliki Forest virus vector providing high expression levels and stability // *Virology.* – 2008. – Vol. 376, №1. – P. 242-251.

18. Tamm K., Merits A., Sarand I. Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus // *J Gen Virol.* // 2008. – Vol. 89, №3. – P. 676-686.

19. Petrakova O., Volkova E., Gorchakov R., Paessler S., Kinney R.M., Frolov I. Noncytopathic replication of Venezuelan equine encephalitis virus and eastern equine encephalitis virus replicons in Mammalian cells // *J Virol.* – 2005. – Vol. 79, №12. – P. 7597-7608.

20. Casales E., Aranda A., Quetglas J.I., et al. A novel system for the production of high levels of functional human therapeutic proteins in stable cells with a Semliki Forest virus noncytopathic vector // *N Biotechnol.* – 2010. – Vol. 27, №2. – P. 138-148.

21. Ventoso I., Sanz M.A., Molina S., Berlanga J.J., Carrasco L., Esteban M. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2 $\alpha$  phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR // *Genes Dev.* – 2006. – Vol. 20, №1. – P. 87-100.

22. Patent WO2011064437. Viral vectors and methods used in the preparation of GDNF / A.E. Ansorena, S.M.S. Aymerich, P.M.J. Blanco, Z.E. Casales, A.E. Garbayo, S.M.C. Molina, P.C. Smerdou. – 2011.

23. Ansorena E., Garbayo E., Lanciego J.L., Aymerich M.S., Blanco-Prieto M.J. Production of highly pure human glycosylated GDNF in a mammalian cell line // *Int J Pharm.* – 2010. – Vol. 385, №1-2. – P. 6-11.

24. Garbayo E., Ansorena E., Lanciego J.L., Aymerich M.S., Blanco-Prieto M.J. Purification of bioactive glycosylated recombinant glial cell line-derived neurotrophic factor // *Int J Pharm.* – 2007. – Vol. 344, №1-2. – P. 9-15.

25. Beerli R.R., Bauer M., Buser R.B., et al. Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105, №38. – P. 14336-14341.

26. Quetglas J.I., Ruiz-Guillen M., Aranda A., Casales E., Bezunartea J., Smerdou C. Alphavirus vectors for cancer therapy // *Virus Res.* – 2010. – Vol. 153, №2. – P. 179-196.

## REFERENCES

1. Luers A.J., Adams S.D., Smalley J.V., Campanella J.J. A phylogenomic study of the genus Alphavirus employing whole genome comparison. *Comp Funct Genomics*, 2005, vol. 6, no. 4, pp. 217-227. doi: 10.1002/cfg.478. PMID:18629194.

2. Vancini R., Hernandez R., Brown D. Alphavirus entry into host cells. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 2015, vol. 129, pp. 33-62. doi: 10.1016/bs.pmbts.2014.10.002. PMID:25595800.

3. Li L., Jose J., Xiang Y., Kuhn R.J., Rossmann M.G. Structural Changes of Envelope Proteins During Alphavirus Fusion. *Nature*. 2010, vol. 468, no. 7324, pp. 705-708. doi: 10.1038/nature09546. PMID:21124457.

4. Jose J., Snyder J.E., Kuhn R.J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.*, 2009, vol. 4, no. 7, pp. 837-856. doi: 10.2217/fmb.09.59. PMID:19722838.

5. Firth A.E., Wills N.M., Gesteland R.F., Atkins J.F. Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element. *Nucleic Acids Res.*, 2011, vol. 39, no. 15, pp. 6679-6691. doi: 10.1093/nar/gkr224. PMID:21525127.

6. Malet H., Coutard B., Jamal S., et al. The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *J Virol.*, 2009, vol. 83, no. 13, pp. 6534-6545. doi: 10.1128/JVI.00189-09. PMID:19386706.

7. Tomar S., Hardy R.W., Smith J.L., Kuhn R.J. Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. *J Virol.*, 2006, vol. 80, no. 20, pp. 9962-9969. PMID:17005674.

8. Frolov I., Akhrymuk M., Akhrymuk I., Atasheva S., Frolova E.I. Early events in alphavirus replication determine the outcome of infection. *J Virol.*, 2012, vol. 86, no. 9, pp. 5055-5066. doi: 10.1128/JVI.07223-11. PMID:22345447.

9. Shin G., Yost S.A., Miller M.T., Elrod E.J., Grakoui A., Marcotrigiano J. Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, vol. 109, no. 41, pp. 16534-16539. doi: 10.1073/pnas.1210418109. PMID:23010928.

10. Gorchakov R., Frolova E., Sawicki S., Atasheva S., Sawicki D., Frolov I. A new role for ns polyprotein cleavage in Sindbis virus replication. *J Virol.*, 2008, vol. 82, no. 13, pp. 6218-6231. doi: 10.1128/JVI.02624-07. PMID:18417571.

11. Tsetsarkin K., Higgs S., McGee C.E., De Lamballerie X., Charrel R.N., Vanlandingham D.L. Infectious clones of Chikungunya virus (La Reunion isolate) for vector competence studies. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2006, vol. 6, no. 4, pp. 325-337. PMID:17187566.

12. Vanlandingham D.L., Tsetsarkin K., Hong C., et al. Development and characterization of a double subgenomic chikungunya virus infectious clone to express heterologous genes in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.*, 2005, vol. 35, no. 10, pp. 1162-1170. PMID:16102421.

13. Chikkanna-Gowda C.P., McNally S., Sheahan B.J., Fleeton M.N., Atkins G.J. Inhibition of murine K-BALB and CT26 tumour growth using a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-18. *Oncol Rep.*, 2006, vol. 16, no. 4, pp. 713-719. PMID:16969484.

14. Chikkanna-Gowda C.P., Sheahan B.J., Fleeton M.N., Atkins G.J. Regression of mouse tumours and inhibition of metastases following administration of a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-12. *Gene Ther.*, 2005, vol. 12, no. 16, pp. 1253-1263. PMID:15944731.

15. Quetglas J.I., Fioravanti J., Ardaiz N., et al. A Semliki forest virus vector engineered to express IFNalpha induces efficient elimination of established tumors. *Gene Ther.*, 2012, vol. 19, no. 3, pp. 271-278. doi: 10.1038/gt.2011.99. PMID:21734727.

16. Rodriguez-Madoz J.R., Prieto J., Smerdou C. Semliki forest virus vectors engineered to express higher IL-12 levels induce efficient elimination of murine colon adenocarcinomas. *Mol Ther.*, 2005, vol. 12, no. 1, pp. 153-163. PMID:15963931.

17. Casales E., Rodriguez-Madoz J.R., Ruiz-Guillen M., et al. Development of a new noncytopathic Semliki Forest virus vector providing high expression levels and stability. *Virology*, 2008, vol. 376, no. 1, pp. 242-251. doi: 10.1016/j.virol.2008.03.016. PMID:18442838.

18. Tamm K., Merits A., Sarand I. Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus. *J Gen Virol.*, 2008, vol. 89, no. 3, pp. 676-686. doi: 10.1099/vir.0.83320-0. PMID:18272758.

19. Petrakova O., Volkova E., Gorchakov R., Paessler S., Kinney R.M., Frolov I. Noncytopathic replication of Venezuelan equine encephalitis virus and eastern equine encephalitis virus replicons in Mammalian cells. *J Virol.*, 2005, vol. 79, no. 12, pp. 7597-7608. PMID:15919912.

20. Casales E., Aranda A., Quetglas J.I., et al. A novel system for the production of high levels of functional human therapeutic proteins in stable cells with a Semliki Forest virus noncytopathic vector. *N Biotechnol.*, 2010, vol. 27, no. 2, pp. 138-148. doi: 10.1016/j.nbt.2010.02.005. PMID:20188220.

21. Ventoso I., Sanz M.A., Molina S., Berlanga J.J., Carrasco L., Esteban M. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.*, 2006, vol. 20, no. 1, pp. 87-100. PMID:16391235.

22. Ansorena A.E., Aymerich S.M.S., Blanco P.M.J., Casales Z.E., Garbayo A.E., Molina S.M.C., Smerdou P.C. Viral vectors and methods used in the preparation of GDNF. Patent WO2011064437, 2011.

23. Ansorena E., Garbayo E., Lanciego J.L., Aymerich M.S., Blanco-Prieto M.J. Production of highly pure human glycosylated GDNF in a mammalian cell line. *Int J Pharm.*, 2010, vol. 385, no. 1-2, pp. 6-11. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.015. PMID:19825405.

24. Garbayo E., Ansorena E., Lanciego J.L., Aymerich M.S., Blanco-Prieto M.J. Purification of bioactive glycosylated recombinant glial cell line-derived neurotrophic factor. *Int J Pharm.*, 2007, vol. 344, no. 1-2, pp. 9-15. PMID:17499462.

25. Beerli R.R., Bauer M., Buser R.B., et al. Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, vol. 105, no. 38, pp. 14336-14341. doi: 10.1073/pnas.0805942105.

26. Quetglas J.I., Ruiz-Guillen M., Aranda A., Casales E., Bezunartea J., Smerdou C. Alphavirus vectors for cancer therapy. *Virus Res.*, 2010, vol. 153, no. 2, pp. 179-196. doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.027. PMID:20692305.

## АЛЬФАВИРУСТАР: МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯСЫ ЖӘНЕ ПРАКТИКАЛЫҚ ҚОЛДАНЫЛУЫ

Войков М.<sup>1</sup>, Балтабекова А.<sup>1</sup>, Жиенбай Е.<sup>2</sup>, Шустов А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ұлттық биотехнология орталығы

Уәлиханов к-сі, 13/1, Астана, 010000, Қазақстан

<sup>2</sup> Назарбаев Университеті

Қабанбай батыр д-лы, 53, Астана, 010000, Қазақстан

shustov@biocenter.kz

ТҮЙІН

Альфавирустар – геномы оң полюсты РНҚ молекуласы болып табылатын, тіршілік циклінде ДНҚ кезеңі болмайтын және цитоплазмада репликацияланатын қабықты вирустардың түрі. Альфавирустар тұйыққа тірелген иесі адам болып табылатын табиғи-ошақтық инфекциялардың, зооноздар мен антропозооноздардың қоздырғыштары болып табылады. Альфавирустар шағын геномға ие, вирусты ақуыздардың көп мөлшерлі синтезімен қоса жүретін белсенді репликацияны көрсетеді, омыртқалылар және омыртқасыздар клеткаларының көптеген типтерін жұқтыру қабілетіне ие. Альфавирустардың геномды РНҚ-дары клеткалық дақылдарға трансфекциялау кезінде жұқпалы болып табылады, бұл вирусты ұрпақтарды трансфекция жолымен алу мүмкіндігін білдіреді және альфавирустармен генді-инженерлік амалдарды жеңілдетеді. Ақуызды экспрессияның жоғары деңгейлері альфавирустарды сүтқоректілер, құстар және омыртқасыздардың дақылданатын клеткаларында рекомбинантты ақуыздарды өндіру үшін аса қызықтыратын векторлар етеді. Альфавирусты экспрессиялаушы жүйелерді әзірлеу үшін модельді объектілері Синдбис вирусы, жылқының венесуэла энцефалитінің вирусы, Семлика орманының вирусы болды. Жабайы типті альфавирустарды векторлар ретінде пайдалану үшін жабайы типті вирустардың күшті цитопатикалық әсері кедергі болып табылады. Цитопатикалық әсері төмендетілген альфавирустардың көптеген мутанттары жасалды.

Альфавирусты векторлар басқа вирусты векторлардан индукциялайтын клеткалық және гуморальды иммунды жауаптардың күші бойынша асып түседі, соған байланысты альфавирустар жұқпалы ауруларға да, жұқпалы емес ауруларға да (қатерлі ісікті емдеу үшін) қарсы тірі вакциналарды құрастыру үшін белсенді қолданылады. Кең клеткалық және ұлпалық тропизм альфавирустарды генді терапия үшін гендерді клеткалық популяцияларға *in vivo* жеткізу құралдары ретінде пайдалануға мүмкіндік береді.

**Негізгі сөздер:** альфавирус, репликация, вектор, ақуыздық экспрессия, вакцина, цитопатикалық әсер.