

Генетична детермінованість феномену дисоціації поліовірусу III типу

І. Г. Костенко, О. В. Журавель, Г. В. Панасенко, В. П. Ширококов

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця
Бульвар Шевченка, 13, Київ, 01601, Україна

Показано, що варіанти $A_{\text{бент}^+}$ і $A_{\text{бент}^-}$ вакцинного штаму вірусу поліомієліту III типу, які з'являються під час репродукції у культурі клітин, мають відмінності в нуклеотидній послідовності гена VP1. Визначено, що у варіанта $A_{\text{бент}^+}$ у положенні 2900 міститься аденін, у той час як у варіанта $A_{\text{бент}^-}$ — гуанін. Відповідно в складі білка VP1 відбувається заміна аспарагіну на аспарагінову кислоту в положенні 142, що впливає на заряд і конформацію поверхневих білків віріону.

Серед відомих механізмів фено- і генотипової мінливості ентеровірусів (мутації, рекомбінації, транскапсидатії [1]) феномен дисоціації займає особливе місце. Він зумовлює появу двох генетичних варіантів ентеровірусів під час репродукції їх у культурах клітин, які істотно різняться за цілою низкою біологічних і фізико-хімічних властивостей: вірулентністю, імуногенністю, гемаглютинуючою активністю, ембріотропізмом, розмірами віріонів, стійкістю до чинників довкілля та ін. [2—6].

Один із варіантів, що найчастіше домінує у вірусних популяціях, має високий афінитет до сорбенту бентоніту і умовно одержав назву $A_{\text{бент}^+}$ («плюсовий бентонітовий варіант»). Мінорному компоненту популяції притаманний низький афінитет до бентоніту, його позначають символом $A_{\text{бент}^-}$ [2].

З використанням поліклональних імунних сироваток раніше виявлено, що обидва варіанти не відрізняються в реакції віруснейтралізації [2]. Нам вдалося одержати гібридами — продуценти моноклональних антитіл, які здатні диференціювати зазначені варіанти вакцинних штамів вірусів поліомієліту [7, 8]. Це надало певні підстави для ствердження, що феномен дисоціації ентеровірусів має генетичну природу. Але для остаточного висновку необхідні прямі генетичні дослідження.

У зв'язку з вищевикладеним мета цієї роботи полягала у порівняльному вивченні нуклеотидної

послідовності гена білка VP1 бентонітових варіантів $A_{\text{бент}^+}$ і $A_{\text{бент}^-}$ вакцинного штаму вірусу поліомієліту III типу. Вибір ділянки для секвенування пов'язаний з тим, що саме капсидний білок VP1 містить у собі віруснейтралізуючі епітопи.

У роботі використано вакцинний штам вірусу поліомієліту III типу, отриманий з Інституту поліомієліту та вірусних енцефалітів ім. М. П. Чумакова АМН РФ: родина пікорнавірусів, рід ентеровірусів, поліовірус, тип III, штам Leon12ab.

Селекційні бентонітові варіанти $A_{\text{бент}^+}$ і $A_{\text{бент}^-}$ одержували за раніше описаною методикою [9].

Екстракція геномної РНК. Поліовірусні РНК (бентонітових варіантів $A_{\text{бент}^+}$ і $A_{\text{бент}^-}$) виділяли з культуральних середовищ, які містили вірус, за допомогою комерційного набору «РибоСорб» («Амплиценс», РФ) згідно з інструкцією виробника.

Першим етапом даної процедури було руйнування мембран лізуючим розчином (гуанідин-тіоціанатний метод). Далі вільну РНК фіксували на сілікагелі методом сорбції. На наступному етапі нуклеїнову кислоту багаторазово відмивали від домішок білків та інших речовин-інгібіторів. Наостанок РНК елюювали з сорбенту [10].

Реакція зворотної транскрипції. кДНК синтезували одразу після виділення РНК (бентонітових варіантів $A_{\text{бент}^+}$ і $A_{\text{бент}^-}$). ДНК, комплекстарну вірусній геномній РНК, одержували за допомогою ферменту ревертази (M-MLV — зворотна транскриптаза) з набору «Реверта-R-100» («Амплиценс») згідно з інструкцією виробника. Реакційна суміш містила ревертазу з активністю 200 од/мкл,

суміш випадкових гексануклеотидів і дезоксинуклеотидтрифосфатів (з набору «Реверта-R-100») і вірусну РНК в буфері для ревертази. Час реакції становив 30 хв за температури 37 °С.

Праймери. Для ампліфікації області VP1 геному бентонітових варіантів поліовірусів використовували такі праймери («Литтех», РФ): прямий (2430F1) — 5'-CTTTAGTAATGTCCGACTGTGT-3' (частка GC-пар становила 40,9 %) і зворотний (2430R1) — 5'-AGTACACSTTATCTCTGGAG-3' (45 % GC-пар). Очікуваний розмір продукту ампліфікації складав 1057 пар нуклеотидів (п. н.).

Праймери синтезували, виходячи зі складу геному поліовірусу III типу вакцинного штаму Leon12ab (за даними GeneBank) за допомогою комп'ютерних програм Omega та Vector NTI.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). В реакції ампліфікації вірусної кДНК використовували такі реактиви: суміш № 1 — дезоксинуклеотидтрифосфати та прямий (2430F1) і зворотний (2430R1) праймери для області VP1; суміш № 2 — термостабільна ДНК-полімераза (Taq-полімераза, «Амп-лиСенс») і ПЛР-буфер.

Суміші розділяли парафіном, поверх суміші № 2 наносили суміш кДНК.

Ампліфікацію проводили на багатоканальному ампліфікаторі «Perkin Elmer» (США) протягом 40 автоматичних циклів. Перший цикл («гарячий старт»): 94 °С, 1 хв. Кожен з 40 циклів складався із денатурації при 94 °С, 10 с, відпалу при 53 °С, 5 с, елонгації при 72 °С, 2 хв. В останньому циклі елонгація відбувалася упродовж 4 хв при 72 °С [10—12].

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації здійснювали в 1,5 %-му агарозному гелі в одноразовому трис-боратному буфері, рН 8,5, який містив 0,5 мкг/мл бромистого етидію.

Маркери розмірів були комерційними («Fermentas», Литва) з відомою кількістю пар нуклеотидів. Таким чином, розмір ПЛР-продуктів складав 1057 п. н. Досліджувані фрагменти вирізали з гелю по [10, 12].

Очищення ПЛР-фрагментів. Вирізані з гелю кДНК фрагменти ПЛР-ампліфікації очищували з використанням реактивів комерційного набору («NucleoSpin», Німеччина) згідно з інструкцією виробника. Процедура зводилася до лізису гелю, фіксування фрагментів нуклеїнової кислоти на мембрані, їхнього багаторазового промивання та елюції з мембрани [12].

Для проведення реакції секвенування визначали концентрацію очищених фрагментів методом гель-електрофорезу.

Застосовували маркери («Медбіосервіс», Ук-

раїна) з відомою концентрацією (5, 10, 15, 20 нг нуклеїнової кислоти в 1 мкл). Концентрація дослідних фрагментів складала 7—10 нг/мкл.

Реакція секвенування. Для реакції секвенування використовували очищені ПЛР-фрагменти, отримані за допомогою кДНК з відомою концентрацією [12], і ті ж праймерами, що й для ампліфікації дослідного фрагмента. Компонентами реакції були такі реагенти: 10-разовий буфер, суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів, мічені дидезоксинуклеотидтрифосфати, фермент Taq-полімераза (секвеназа).

Реакцію секвенування проводили за інструкцією виробника на багатоканальному ампліфікаторі «Perkin Elmer» упродовж 30 автоматичних циклів: денатурація при 96 °С, 20 с, відпал при 50 °С, 20 с, елонгація при 60 °С, 4 хв, по обох ланцюгах з прямого та зворотного праймерів.

Для процесу зчитування сигналів реакційну суміш з матрицею необхідно «визволити» від ферменту і дидезоксинуклеотидтрифосфатів, які не прореагували, а також солей та інших інгібіторів. Матрицю очищували за інструкцією виробника «SEQ 2000» («Beckman», США). Процедура полягала у переосажденні та висушуванні продуктів реакції секвенування.

Очищену і підготовлену суміш в автоматичному режимі вносили у формаміді в секвенатор «SEQ 2000» («Beckman»). Суміш розділяли методом капілярного форезу з наступним аналізом і редагуванням отриманих послідовностей на цьому ж секвенаторі.

Виведення амінокислотних послідовностей та їхній аналіз здійснювали за допомогою пакету програм Omega та Vector NTI. Послідовності бентонітових варіантів вирівнювали до послідовності штаму з банку даних за допомогою програми Vector NTI [13].

У результаті проведення ПЛР фрагмента VP1 з використанням пари праймерів 2430F1 і 2430R1 синтезовано продукт, довжина якого складала приблизно 1057 п. н.

Нуклеотидні послідовності гена VP1 бентонітових варіантів вакцинного штаму Leon12ab поліовірусу представлено на рис. 1.

Послідовності досліджуваних дисоціантів поліовірусу порівнювали з нуклеотидною послідовністю вакцинного штаму поліовірусу Leon12alb, який проходив пасажі на культурі клітин HEp-2.

З рис. 1 видно, що в середині фрагмента VP1 (ділянка 2900 п. н.) бентонітового варіанта A_{бент} відбулася заміна аденіну на гуанін. Проаналізувавши одержані розшифровані послідовності основного поверхневого білка бентонітових варіантів,

NONAME	2801 ACATACAAAG ATACAGTGCA GTTGCGCCGT AAGTTGGAGT TTTTCACATA 2850
PV 3 A _{беніт} ⁺	2801 ACATACAAAG ATACAGTGCA GTTGCGCCGT AAGTTGGAGT TTTTCACATA 2850
PV 3 A _{беніт} ⁻	2801 ACATACAAAG ATACAGTGCA GTTGCGCCGT AAGTTGGAGT TTTTCACATA 2850
	↓
NONAME	2851 CTCTCGTTTT GACATGGAAT TCACCTTCGT GGTAACCGCC AACTTCACCA ^A 2900
PV 3 A _{беніт} ⁺	2851 CTCTCGTTTT GACATGGAAT TCACCTTCGT GGTAACCGCC AACTTCACCA ^A 2900
PV 3 A _{беніт} ⁻	2851 CTCTCGTTTT GACATGGAAT TCACCTTCGT GGTAACCGCC AACTTCACCA ^G 2900
NONAME	2901 ACGCTAATAA TGGGCATGCA CTCACCAGG TGTACCAGAT AATGTACATC 2950
PV 3 A _{беніт} ⁺	2901 ACGCTAATAA TGGGCATGCA CTCACCAGG TGTACCAGAT AATGTACATC 2950
PV 3 A _{беніт} ⁻	2901 ACGCTAATAA TGGGCATGCA CTCACCAGG TGTACCAGAT AATGTACATC 2950
NONAME	2951 CCCCCAGGGG CACCCACACC AAAGTCATGG GACGACTACA CTTGGCAAAC 3000
PV 3 A _{беніт} ⁺	2951 CCCCCAGGGG CACCCACACC AAAGTCATGG GACGACTACA CTTGGCAAAC 3000
PV 3 A _{беніт} ⁻	2951 CCCCCAGGGG CACCCACACC AAAGTCATGG GACGACTACA CTTGGCAAAC 3000
NONAME	3001 ATCTTCCAAC CCGTCCATAT TTTACACCTA TGGGGCTGCC CCGGCGCGAA 3050
PV 3 A _{беніт} ⁺	3001 ATCTTCCAAC CCGTCCATAT TTTACACCTA TGGGGCTGCC CCGGCGCGAA 3050
PV 3 A _{беніт} ⁻	3001 ATCTTCCAAC CCGTCCATAT TTTACACCTA TGGGGCTGCC CCGGCGCGAA 3050
NONAME	3051 TCTCAGTGCC ATACGTGGGG TTAGCCAATG CTTACTCGCA CTTTACGAC 3100
PV 3 A _{беніт} ⁺	3051 TCTCAGTGCC ATACGTGGGG TTAGCCAATG CTTACTCGCA CTTTACGAC 3100
PV 3 A _{беніт} ⁻	3051 TCTCAGTGCC ATACGTGGGG TTAGCCAATG CTTACTCGCA CTTTACGAC 3100

Рис. 1. Нуклеотидні послідовності кДНК фрагмента гена VP1 бентонітових варіантів поліовірусу Leon12ab: NONAME — вакцинний штам поліовірусу типу III з GenBank; PV3 A_{беніт}⁺ і PV3 A_{беніт}⁻ — вакцинний штам поліовірусу типу III, бентонітові варіанти A_{беніт}⁺ і A_{беніт}⁻ відповідно

PV 3 A _{беніт} ⁺	1 GIEDLISEVA QGALTLSLPK QQD ^S LPDTKA SGP ^A HSKEVP ALTAVETGAT 50
PV 3 A _{беніт} ⁻	1 GIEDLISEVA QGALTLSLPK QQD ^S LPDTKA SGP ^A HSKEVP ALTAVETGAT 50
PV 3 A _{беніт} ⁺	51 NPLAPSDTVQ TRHVVQRRSR SESTIESFFA RGACVA ^A IEV DNEQPTTRAQ 100
PV 3 A _{беніт} ⁻	51 NPLAPSDTVQ TRHVVQRRSR SESTIESFFA RGACVA ^A IEV DNEQPTTRAQ 100
	↓142
PV 3 A _{беніт} ⁺	101 KLFAMWRITY KDTVQLRRKL EFFTYSRFD ^M EFTFVV ^T TANF T ^N ANNGHALN 150
PV 3 A _{беніт} ⁻	101 KLFAMWRITY KDTVQLRRKL EFFTYSRFD ^M EFTFVV ^T TANF T ^D ANNGHALN 150
PV 3 A _{беніт} ⁺	151 QVYQIMYIPP GAPTPKSWDD YTWQTSSNPS IFYTYGAAPA RISVPYVGLA 200
PV 3 A _{беніт} ⁻	151 QVYQIMYIPP GAPTPKSWDD YTWQTSSNPS IFYTYGAAPA RISVPYVGLA 200
PV 3 A _{беніт} ⁺	201 NAYSHFYDGF AKVPLKTDAN DQIGDSL ^Y SA MTVD ^D DFGVLA VRVVNDHNPT 251
PV 3 A _{беніт} ⁻	201 NAYSHFYDGF AKVPLKTDAN DQIGDSL ^Y SA MTVD ^D DFGVLA VRVVNDHNPT 251
PV 3 A _{беніт} ⁺	251 KVT ^S SKVRIYM KPKHVRVWCP RPPRAVPYYG PGVDYRNNLD PLSEKGLTTY 300
PV 3 A _{беніт} ⁻	251 KVT ^S SKVRIYM KPKHVRVWCP RPPRAVPYYG PGVDYRNNLD PLSEKGLTTY 300
PV 3 A _{беніт} ⁺	301 GFGHQNKAVY 310
PV 3 A _{беніт} ⁻	301 GFGHQNKAVY 310

Рис. 2. Порівняння виведених амінокислотних послідовностей бентонітових варіантів вакцинного штаму Leon12ab поліовірусу III типу: N — аспарагін, D — аспарагінова кислота

з'ясувалося, що згадана заміна — єдина тонка відмінність у цій області.

Поряд з отриманими даними постало питання, чи впливає заміна аденіну на гуанін у положенні 2900 п. н. на зміни в амінокислотному складі досліджуваного білка?

За допомогою комп'ютерних програм побудовано і порівняно амінокислотні послідовності фрагмента VP1 дисоціантів вакцинного штаму Leon12ab поліовірусу (рис. 2).

Таким чином, з'ясовано, що відмінності у нуклеотидній послідовності фрагмента VP1 бентонітових варіантів поліовірусу III не компенсовані, оскільки спричинюють амінокислотні зміни, локалізовані в ділянці 142. Зокрема, такою відмінністю є заміна аспарагіну (N) на аспарагінову кислоту (D).

На нашу думку, саме такі перебудови у поверхневих структурах бентонітових варіантів поліовірусів впливають на конформаційні зміни білка або на зміну заряду на поверхні білка, що в свою чергу може призвести до електростатичного зв'язування з деякими речовинами.

Висновки. 1. При порівняльному вивченні нуклеотидних послідовностей гена, який кодує поверхневий білок VP1 селекційних бентонітових варіантів $A_{\text{бент}^+}$ і $A_{\text{бент}^-}$ вакцинного штаму вірусу поліомієліту III типу, виявлено одиночну некомпенсовану заміну. Так, у положенні 2900 п. н. у варіанта $A_{\text{бент}^+}$ знаходиться аденін, а у варіанта $A_{\text{бент}^-}$ — гуанін.

2. При виведенні амінокислотної послідовності білка VP1 показано, що мутація в гені змінює амінокислотний склад одного з дисоціантів. У варіанта $A_{\text{бент}^+}$ у положенні 142 знаходиться аспарагін, а у варіанта $A_{\text{бент}^-}$ — аспарагінова кислота. Оскільки амінокислоти по-різному заряджені, така заміна впливає на заряд і конформацію поверхневих білків віріонів.

3. Наведено прямі докази того, що феномен дисоціації ентеровірусів під час репродукції в культурах клітин має генетичний характер.

I. G. Kostenko, E. V. Zhuravel, G. V. Panasenko, V. P. Shirobokov

Genetic determination of dissociation process of poliovirus type III

Summary

The variants of a vaccine virus strain of a poliomyelitis type III have been proved to occur in the course of reproduction in cell culture, and have differences in nucleotide sequences of a gene VP1. It has been demonstrated, that in variant $A_{\text{бент}^+}$ the nucleotide adenine occupies position 2900, and in variant $A_{\text{бент}^-}$ guanine. Accordingly, in the structure of protein VP1 an aspartic acid replaces asparagines in position 142, the former influencing the charge and conformation of virion surface proteins.

И. Г. Костенко, Е. В. Журавель, Г. В. Панасенко, В. П. Ширококов

Генетическая детерминированность феномена диссоциации полиовируса III типа

Резюме

Показано, что появляющиеся во время репродукции в культуре клеток варианты $A_{\text{бент}^+}$ и $A_{\text{бент}^-}$ вакцинного штамма вируса полиомиелита III типа отличаются по нуклеотидной последовательности гена VP1. Установлено, что у варианта $A_{\text{бент}^+}$ в положении 2900 располагается аденин, в то время как у варианта $A_{\text{бент}^-}$ — гуанин. Соответственно в составе белка VP1 происходит замена аспарагина на аспарагиновую кислоту в положении 142, влияющая на заряд и конформацию поверхностных белков вириона.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Harley A. R. Human enterovirus infections.—Washington, 1995.—95 p.
2. Корнюшенко О. М. Імунопатогенез експериментального поліомієліту з позицій гетерогенності популяцій поліовірусів: Дис. ... д-ра біол. наук.—К., 1999.—333 с.
3. Ширококов В. П. Сравнительное изучение биологических свойств вирусов Коксаки и их селекционированных вариантов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.—Киев, 1977.—36 с.
4. Мельник В. В. Гетерогенність популяцій вірусів Коксаки В за фізико-хімічними властивостями: Дис. ... канд. мед. наук.—К., 1996.—116 с.
5. Ширококов В. П., Журба Т. Б., Землянский В. В. Свойства вирусов Коксаки, выделенных из ткани поджелудочной железы больных хроническим панкреатитом // Микробиол. журн.—1988.—50, № 4.—С. 78—81.
6. Ширококов В. П. Вивчення фізіологічних особливостей вірусів Коксаки шляхом селективної адсорбції їх на бентоніті // Микробиол. журн.—1972.—34, № 1.—С. 122—123.
7. Ширококов В. П., Костенко І. Г., Ніколаско І. В. Антигенні відмінності генетичних варіантів $A_{\text{бент}^+}$ та $A_{\text{бент}^-}$ вакцинного штаму поліовірусу III типу // Микробиол. журн.—2003.—65, № 4.—С. 29—36.
8. Ширококов В. П., Костенко І. Г. Диференціація бентонітових варіантів поліовірусів за допомогою моноклональних антитіл // Журн. АМН України.—2003.—9, № 4.—С. 780—790.
9. Костенко І. Г. Обґрунтування нових методичних підходів до одержання стабільних дисоціантів поліовірусів // Молодіж. журн.—2002.—№ 1.—С. 46—49.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—425 с.
11. Облап Р. В. Дифференциация генофондов животных под воздействием факторов экологического стресса: Дис. ... канд. біол. наук.—К., 1998.—174 с.
12. Лукашев А. Н. Молекулярно-эпидемиологическое и патогенетическое изучение штаммов ECHOvirus 11 и ECHOvirus 19 — возбудителей вспышки острого энтеровирусного увеита и сепсис-подобного заболевания у детей раннего возраста: Дис. ... канд. мед. наук.—М., 2002.—175 с.
13. Морозов В. М. Структурно-функциональный анализ аминокислотных последовательностей через INTERNET // Молекуляр. биология.—1996.—30, № 2.—С. 387—393.

Надійшла до редакції 17.11.03
УДК 578.835.15:578.5