

УДК: 043:577.214:578.81

**ЭВОЛЮЦИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ УЧАСТКА РАСЩЕПЛЕНИЯ
ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА Н9Н2
И.Л.Гисина², Н.И.Буланкина¹, Е.Э.Перский¹**

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Ветеринарный институт Кимрона (Бейт-Даган, Израиль)

Проведено сравнительное изучение кинетики адсорбции на клетках MDCK и куриных эритроцитах референтного вируса птичьего гриппа wisconsin-66 и 6 штаммов вируса птичьего гриппа Н9Н2, выделенных в Израиле во время эпизоотии 2000–2004 гг. Определена первичная структура участков расщепления в гемагглютинине этих штаммов. Показано, что в процессе эволюции вируса Н9Н2 в период с 1966 по 2004 г. его сродство к клеткам птиц уменьшилось, а к клеткам млекопитающих – увеличилось. Описаны аминокислотные замены в участке расщепления гемагглютинаина, лежащие в основе этого явления.

Ключевые слова: *вирус гриппа, Н9Н2, гемагглютинин, адсорбция, эволюция.*

Введение

В 1997 году в Гонконге были впервые обнаружены люди, инфицированные вирусом птичьего гриппа Н9Н2. С тех пор сведения о заражении людей этим штаммом вируса появляются регулярно. Таким образом, этот вирус представляет собой сегодня такую же потенциальную угрозу, как недавно вирус Н5Н1.

Первый этап заражения организма гриппом – адсорбция вируса на поверхности клеток хозяина. В этом процессе определяющую роль играет гемагглютинин – поверхностный белок, содержащий участок связывания с рецепторами клеточной поверхности. Для проявления рецепторсвязывающей способности этого участка гемагглютинин должен быть активирован – изменить свою конформацию в результате расщепления молекулы в специфическом сайте. Это расщепление осуществляют протеазы организма хозяина, обладающие тканевой и видовой специфичностью. Естественно поэтому, что и инфекционность вируса гриппа по отношению к различным организмам (а в пределах организма – к различным органам) в значительной степени определяется структурой участка расщепления гемагглютинаина.

В работе изучены эволюционные изменения первичной структуры участка расщепления гемагглютинаина вируса Н9Н2, важные для распространения его среди млекопитающих (в т.ч. и людей) и определяющие патогенность вируса.

Материал и методика

Работа проведена на вирусе гриппа Н9Н2, вызвавшем в 2000–2004 гг. эпизоотию в птицеводческих хозяйствах Израиля, и референтном штамме птичьего гриппа ty/wisconsin-66 (Н9Н2), любезно предоставленном доктором Скехелом [Dr. Skehel, World Influenza Center, National Institute for Medical Reserch, Mill Hill, London].

Для исследований были выбраны 6 штаммов, выделенных в начале, середине и конце эпизоотии – ty/90710 – 30.05.2000 г., ty/615 – 30.01.2002, ty/965 – 17.03.2002 г., ch/1373 – 14.07.2003 г., ty/1562 – 28.12. 2003 г., ch/1747 – 15.05.2004 г.

Для изоляции вирусов 9 -10-дневные куриные эмбрионы инфицировали, вводя культуру вируса (1 мл трахеальных и клоакальных смывов в глицерофосфатном буфере, рН 7,2) в амниотическую и аллантаоисную полости. Через 48–96 часов после заражения аллантаоисную жидкость отбирали, проверяли на присутствие антигена, замораживали и хранили при – 80⁰С.

О рецепторных свойствах гемагглютинаина судили по реакции гемагглютинации, которую проводили в двух вариантах – на монослойной культуре клеток почек собаки (MDCK) и на куриных эритроцитах. Клетки MDCK получали из клеточного банка АТСС и культивировали в среде MEM с 10% эмбриональной сывороткой телёнка. В случае эритроцитов использовали их 15% взвесь и аллантаоисную жидкость с титром не менее 1:128 (Douwdal et al., 1979).

После внесения вируса степень его адсорбции измеряли по изменению титра гемагглютинации в пробах, которые отбирали с интервалами 15 и 2 мин. для клеток MDCK и куриных эритроцитов соответственно. Измерения проводили при 4⁰С, т.к. при этой температуре вирус только адсорбируется на поверхности клетки, не проникая внутрь неё. По полученным данным рассчитывали степень и константу скорости адсорбции вируса на клетках.

Вирусную РНК выделяли из аллантаоисной жидкости с помощью набора mini kit Viral RNA фирмы QIAGEN, Valencia, Calif и использовали для клонирования ДНК в полимеразной цепной реакции – ПЦР (Lee et al., 2001).

Продукты реакции подвергали электрофорезу в агарозном геле, вырезали, очищали при помощи набора фирмы QIAGEN, Valencia, Calif и секвенировали с помощью автоматического лазерного флуоресцентного секвенсора ДНК (эта часть работы выполнена в институте имени Вейцмана, Израиль). Восстановление аминокислотных последовательностей по нуклеотидным и их статистический анализ провели с помощью компьютерной программы Bio Edit Package, Version 5 (Rivetz, Lipkind, 1985).

Статистическую обработку данных биохимических исследований проводили, используя критерий Стьюдента и непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (Иванов, Погорелюк, 1990).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 изображены временные зависимости степени связывания изученных штаммов вируса гриппа H9N2 (включая референтный штамм ty/wisconsin-66) на культуре клеток собаки MDCK и куриных эритроцитах, а в табл. 1 приведены рассчитанные по этим кривым константы скорости и времена адсорбции 50% вируса на клетках.

Таблица 1.

Константы скорости и время 50%-ной адсорбции штаммов вируса гриппа птиц H9N2 на клетках MDCK и куриных эритроцитах

Штамм вируса	Клетки MDCK		Эритроциты курицы	
	K, %/мин	t _{50%} , мин	K, %/мин	t _{50%} , мин
ty/wisconsin-66	1,33±0,15	43,5±3,8	39,57±4,22	1,2±0,08
ty/90710/ 30.05.2000	3,68*±0,32	15,0*±1,7	26,31*±1,98	1,8±0,20
ty/615/ 30.01.2002	2,02±0,18	35,5*±2,9	30,82±3,12	2,2*±0,24
ty/965/ 17.03.2002	2,02*±0,23	35,5±3,2	21,18*±2,32	2,4*±0,22
ch/1373/ 14.07.2003	4,12*±0,46	11,5*±0,9	21,18*±1,95	2,8*±0,21
ty/1562/ 28.12.2003	2,97*±0,25	17,0*±1,5	21,18*±2,23	2,8*±0,19
ty/1747/ 15.05.2004	2,97*±0,25	17,0*±1,6	21,18*±1,95	2,8*±0,30

* – значения, при которых $p < 0,05$ по сравнению с референтным штаммом

Как видно, для всех исследованных штаммов скорость и степень адсорбции вирусов на куриных эритроцитах намного выше, чем на клетках MDCK. К 16 минуте вирусы всех штаммов полностью связываются с первыми, в то время как на вторых степень адсорбции даже за 90 минут не достигает 100%.

Однако в обоих случаях характер адсорбции референтного и остальных исследованных штаммов существенно различаются. Скорость и степень адсорбции референтного вируса на клетках курицы достоверно выше, а на клетках собаки – ниже, чем всех остальных вирусов. Это свидетельствует о том, что в процессе эволюции вируса H9N2 в период с 1966 по 2004 г. его сродство к клеткам птиц уменьшилось, а к клеткам млекопитающих – увеличилось.

В то же время, как видно, эти изменения сродства в период 2000–2004 гг. не имеют регулярного характера. Так, у штамма, изолированного в мае 2000 г., адсорбция на клетках собаки протекает интенсивнее, чем у штаммов, изолированных в январе 2003 г. и в мае 2004 г. Значения констант адсорбции на этих клетках у штамма, изолированного в январе 2003 г., значимо ниже, чем у штамма, изолированного в июле этого же года и т.д. (табл. 1).

Это указывает на то, что единый процесс – приближение сродства птичьего вируса H9N2 к клеткам млекопитающих – происходит в результате дифференциальной эволюции непрерывно возникающих мутантных форм.

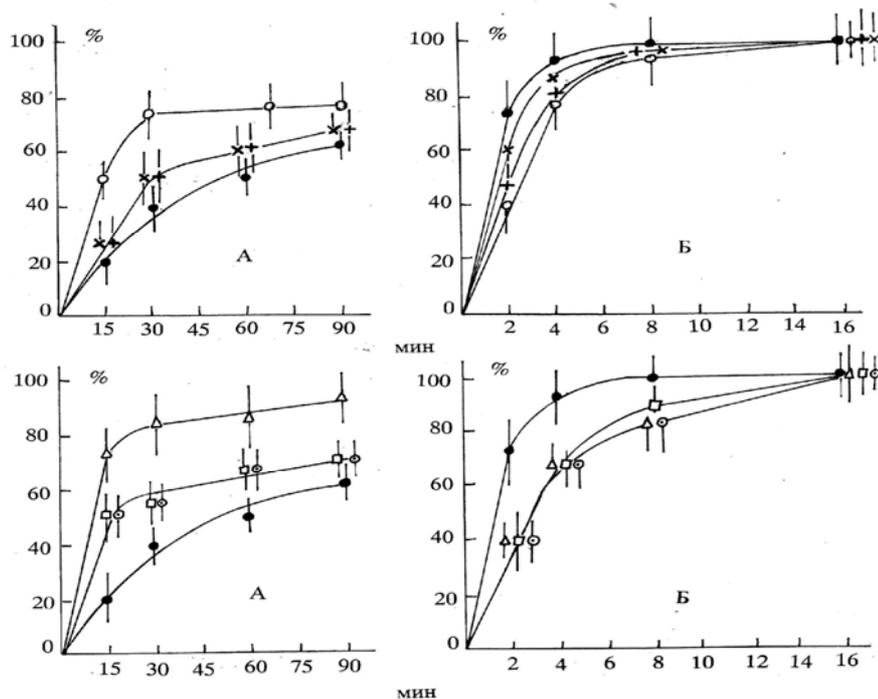


Рис. 1. Временная зависимость адсорбции штаммов вируса гриппа H9N2 на клетках MDCK (А) и эритроцитах курицы (Б)

● – ty/wiskonsin-66, ○ – ty/90710/30.05.200, + – ty/615/30.01.2002, × – ty/965/17.03.2002, Δ – ck/1373/14.07.2003, □ – ty/1562/28.12.2003, ○ – ty/1747/15.05.2004

Естественно, что в основе этого процесса лежат мутации в генах гемагглютинаина, приводящие к изменению его первичной структуры, и, соответственно, функциональных свойств.

Взаимодействие вируса гриппа с клеточным рецептором возможно только после активации гемагглютинаина – сайтспецифичного расщепления его молекулы тканевыми протеазами хозяина. Разная кинетика адсорбции, обнаруженная у исследованных штаммов, указывает на возможность структурных изменений участков белка, отвечающих за начальные этапы взаимодействия вируса и клетки хозяина, произошедшие в процессе эволюции вируса. К числу таких участков относится и сайт расщепления.

Для выявления возможных изменений первичную структуру этого участка (область молекулы гемагглютинаина от 315 по 320 аминокислотный остаток), определенную для всех 6 штаммов, изолированных на протяжении эпизоотии 2000–2004 гг., сравнили с таковой референтного вируса Wisconsin-66.

В табл. 2 в хронологическом порядке приведены обнаруженные аминокислотные замены. Для выяснения связи между ними и функциональными свойствами гемагглютинаина первичные структуры участка расщепления сопоставлены соответствующим усредненным константам адсорбции.

Аминокислотные замены произошли в двух позициях – 317 и 319.

В позиции 317 произошла единственная замена – Вал → Арг, по которой референтный штамм отличается от всех остальных штаммов H9N2. В результате этой замены сродство исследованных вирусов, по сравнению с референтным, резко возросло к клеткам млекопитающего, снизившись к клеткам птицы (табл. 2).

Все остальные замены у штаммов, изолированных на протяжении эпизоотии, произошли в позиции 319, причём в хронологическом порядке они имеют практически регулярный характер: Сер → Лиз → Сер.

В период до 05.2000 в позиции 319 находился серин, затем его заменил лизин, а с 03.2002 г. и до конца эпизоотии у всех изученных штаммов в этой позиции вновь появляется серин.

Таблиця 2.

Первичная структура участка расщепления гемагглютинина и средние величины констант адсорбции штаммов вируса гриппа птиц H9N2

Штамм вируса	Номер позиции						Клетки MDCK		Эритроциты курицы	
	315	316	317	318	319	320	К, % /мин	t _{50%} , мин	К, % /мин	t _{50%} , мин
ty/wiscon-sin-66	Про	Ала	Вал	Сер	Сер	Арг	1,33	43,5	39,6	1,2
ty/90710/ 30.05.2000	Про	Ала	Арг	Сер	Лиз	Арг	2,85	25,2	28,6	2,0
ty/615/ 30.01.2002	Про	Ала	Арг	Сер	Лиз	Арг				
ty/965/ 17.03.2002	Про	Ала	Арг	Сер	Сер	Арг	3,02	20,2	21,2	2,7
ск/1373/ 14.07.2003	Про	Ала	Арг	Сер	Сер	Арг				
ty/1562/ 28.12.2003	Про	Ала	Арг	Сер	Сер	Арг				
ty/1747/ 15.05.2004	Про	Ала	Арг	Сер	Сер	Арг				

Таким образом, все исследованные штаммы можно разделить на две группы – «ранние», с различными аминокислотами в позиции 319, и «поздние», у которых в этой позиции произошёл возврат к Сер. При этом, как видно, у всех «поздних» штаммов сродство к клеткам MDCK выше, чем к эритроцитам курицы. Такое изменение функциональных свойств гемагглютинина объясняется характером произошедших замен.

Известно, что ограниченный протеолиз гемагглютинина осуществляется сериновыми протеиназами (например, фурином, широко распространенным во многих типах тканей внутриклеточным ферментом, или триптазой Clara, продуцируемой в просвет бронхов). Характерной особенностью этой группы протеиназ является их специфичность по отношению к пептидным связям, в которых СО-группа принадлежит основному аминокислотам. Естественно, что наличие хотя бы одной такой аминокислоты является совершенно необходимым для взаимодействия вируса с клеткой хозяина. У большинства слабопатогенных вирусов гриппа фрагменты HA1 и HA2, на которые гемагглютинин разделяется при активации, отделяет единичный аргинин, по которому и происходит расщепление (Skehel, Wiley, 2000). Такая ситуация наблюдалась и у референтного штамма. В то же время для осуществления атаки «уязвимой» связи небезразлично и её ближайшее окружение, определяющее электростатические и стерические свойства сайта расщепления. Так, у многих высокопатогенных для птиц и способных переходить к млекопитающим вирусам гриппа сайт расщепления содержит полиосновный участок (Lewis, 2006) (у H5N1 это арг-арг-арг-лиз-лиз-арг). Таким образом, замена валина на лизин, увеличивая число потенциально атакуемых пептидных связей (и, возможно, круг протеиназ), создает условия для повышения вероятности протеолитической активации гемагглютинина. Возникают при этом и иные стерические и электростатические условия для работы ферментов-активаторов, всё это может способствовать повышению эффективности атаки хозяйской клетки вирусом.

Такое изменение структуры сайта расщепления возникло после 1966 г. и сохранилось у всех исследованных штаммов, что, очевидно, принципиально важно для вирулентности, а также может способствовать переходу вируса от птиц к млекопитающим.

Появление третьего основного остатка в сайте расщепления – лизина – в 319 положении, казалось бы, должно в еще большей степени способствовать вирулентности данного штамма и в силу этого закрепиться в ходе отбора. Но наличие небольшого незаряженного аминокислотного остатка серина в этом положении оказалось предпочтительным. Возможно, в этом случае дополнительный заряд, обусловленный третьим основным радикалом, не столь важен, как размер радикала, в результате серин вновь появляется у поздних изолятов.

Несомненно, наблюдаемые изменения в скорости и степени адсорбции вируса H9N2 по отношению к клеткам птиц и млекопитающих коррелируют с мутациями в сайте расщепления, что не исключает влияния на адсорбцию вируса и изменений в иных сайтах данного белка.

Список литературы

- Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина, 1990. – 224с.
- Douwda W.A., Kendal A., Noble G.R. Influenza virus // Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection / Eds E.N.Lennete, N.Y.Schoridt. – Washington, 1979. – P. 585–609.
- Lewis D.B. Avian flu to human // Annu. Rev. Med. – 2006. – 57. – P.139–154.
- Lee M.S, Chang P.C, Shien J.H. et al. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR // J. Virol. Methods. – 2001. – Vol.97 (1–2). – P.13–22.
- Rivet B., Lipkind M. Interaction of Newcastle Disease Virus Strains Differing in Virulence with Chicken Red Blood Cell Receptors // Archives of Virology. – 1985. – №85. – P. 231–255.
- Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin // Annu. Rev. Biochem. – 2000. – Vol.69. – P. 531–569.

ЕВОЛЮЦІЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ДІЛЯНКИ РОЗЩЕПЛЕННЯ ГЕМАГЛЮТИНІНУ ВІРУСУ ГРИПУ H9N2

І.Л.Гісіна, Н.І.Буланкіна, Є.Е.Перський

Проведено порівняльне вивчення кінетики адсорбції на клітинах MDCK та еритроцитах курей референтного вірусу пташиного грипу Wisconsin-66 та 6 штамів вірусу пташиного грипу H9N2, що були отримані в Ізраїлі під час епізоотії 2000–2004 рр. Визначено первинну структуру ділянок розщеплення в гемаглютиніні цих штамів. Показано, що в процесі еволюції вірусу H9N2 його спорідненість до клітин птахів поменшилась, а до клітин ссавців – зросла. Розглянуті амінокислотні заміни в ділянці розщеплення гемаглютиніну, що лежать в основі цього явища.

Ключові слова: *вірус грипу, H9N2, гемаглютинін, адсорбція, еволюція.*

EVOLUTION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF INFLUENZA H9N2 HEMAGGLUTININ CLEAVAGE SITE

I.L.Gisina, N.I.Bulankina, E.E.Persky

The research deals with comparative study of avian influenza H9N2 viruses: reference strain Wisconsin-66 and 6 strains obtained in Israel during epidemic 2000–2004. The sequence of their hemagglutinin cleavage site amino acid residues was determined. Cleavage site amino acid sequences of hemagglutinin have changed in this period. These changes are related with increase of virus affinity to mammal's cells and decrease affinity to avian cells.

Key words: *influenza virus, H9N2, hemagglutinin, adsorbtion, evolution.*

Матеріали наукової конференції біологічного факультету Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна, присвяченої 100-річчю з дня народження Г.І.Семененка
Рекомендовано до друку П.А.Каліманом