УДК 578.832.1-51.76
DOI: 10.15587/2519-8025.2019.168500

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ ГЕМАГЛЮТИНІНУ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ ВІРУСІВ ГРИПУ А H1N1 ТА H7N9

© С. В. Буряченко, Б. Т. Стегній14

Вірус грипу А є збудником зоонозних та антропонозних захворювань. Значною мірою вірулентні та контагіозні властивості вірусу грипу обумовленні наявністю гемаглютиніну. Мембранний глікопротеїн гемаглютиніни відіграє важливу роль у адгезії та інвазії вірусу грипу у клітину, а також у формуванні до нього імунітету у організму-хазяїна. Гемаглютинін формує пандемічність штаму вірусу грипу. Систематика та характеристика штамів вірусу грипу базується зокрема й на типі гемаглютиніна. Найбільш контагіозними штамами вірусу грипу А є штами H1N1 та H7N9. Поліморфізм гемаглютиніну та його вплив на властивості штамів вірусу грипу робить актуальним дослідження його варіабельності.

Метадослідження. *Метою дослідження було визначити поліморфізм гена, що кодує гемаглютинін штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9, визначити його вплив на поліморфізм амінокислотних послідовностей гемаглютиніну та властивості штамів біоінформатичними методами дослідження.*

Матеріали та методи. *Були аналізовані нуклеотидні послідовності гемаглютиніни штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 та продукти його трансляції за допомогою кластерного аналізу. Властивості гемаглютиніну визначали шляхом визначення його доменів.*

Результати та обговорення. *За результатом дослідження обраховані поліморфізм та генетичні дистанції між алелями гена, що кодує гемаглютинінівірусу грипута проведено його трансляцію. Досліджено поліморфізм і амінокислотні дистанції між продуктами його трансляції, проведено порівняльний аналіз між досліджуваними нуклеотидними та амінокислотними послідовностями. Показано роль та вплив синонімічних кодонів у нуклеотидних послідовностей алелей гена, що кодує гемаглютинін, на поліморфізм гемаглютиніну. Визначені домени досліджуваних зразків гемаглютиніну.*

Висновки. *За результатом досліджень показано відсутність впливу поліморфізму гена, що кодує гемаглютинін, на поліморфізм гемаглютиніну. Показано відсутність впливу поліморфізму амінокислотних послідовностей гемаглютиніни штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 надоменовий склад і, таким чином, на властивості штамів*

Ключові слова: *поліморфізм, гемаглютинін, вірус грипу А, H1N1, H7N9, кластерний аналіз*

1. Вступ

Грип відноситься до гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) та являє собою одну з найбільш значущих проблем, що стоять перед сучасною системоюохорони здоров'я. Епідемічний характер захворюваності на грип обумовлює ряд проблем соціальногоі економічного характеру. Найбільшу роль в епідеміології грипу відіграє вірус типу А, який є збудником зоонозних та антропонозних захворювань. Вірус грипу А викликав більшість пандемій, що пов'язано з особливою мінливістю його антигенної структури [1]. Мембранний глікопротеїн гемаглютинін (hemagglutinin, *HA*) є важливим фактором вірулентності збудника грипу А. Патогенез грипу на початкових стадіях обумовлюється *HA*, що зв'язуються з сіаловою кислотою на клітинній поверхні [1, 2].

2. Літературний огляд

Розташовані на поверхні віріону молекули *HA* розщеплюються ендогенними клітинними протеазами на молекули меншого розміру, *HA1* та *HA2*, які обумовлюють вірулентність вірусу грипу [1]. У деяких типів клітин, що не мають відповідної протеази, продуктивне розмноження вірусу грипу й утворення бляшок можуть бути індуковані трипсином [3]. *HA* є однією із мішеней для антитіл до вірусу грипу. Антигенні відмінності поділяють вірус грипу А на 16 *HA* (1-16) субтипів, які утворюють дві групи: перша містить H1, *H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13* та *H16*, друга – *H3, H4, H7, H10, H14* та H15 субтипи.

У літературі описана висока мінливість *HA*, обумовлена антигенним дрейфом та шифтом вірусу грипу [3, 4]. Вплив варіабельності гемаглютиніну на властивості штамів вірусу грипу А залишається дослідженим недостатньо [5].

Досі залишається не зрозумілим, поліморфізм яких ділянок гена *HA* обумовлює контагіозність штамів вірусу грипу А. Також у літературі відсутня інформація щодо кореляції між поліморфізмом *HA* та властивостями штаміввірусу, до складу яких він входить.

3. Мета та задачі дослідження

Метою дослідження було виявити біоінформатичними методами поліморфізм гена *HA*, що кодує синтез *HA*, його вплив на амінокислотний поліморфізм *HA* та доменовий склад даного білку, а також на властивості найбільш контагіозних штамів вірусів грипу А H1N1 та H7N9.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

1. Дослідити поліморфізм гену *HA* у штамів вірусу грипу А субтипів H1N1 та H7N9;

2. Визначити трансляцію та продукти синтезу гену *HA*, дослідити поліморфізм амінокислотних послідовностей;

3. Встановити вплив поліморфізму гену гемаглютиніну *(HA)* субтипу H1N1 на поліморфізм гемаглютиніну (*HA*) субтипуH7N9

4. Матеріали та методи

Поліморфізм *HA* досліджувався на вибірці нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9, отриманих з Національного центру біотехнологічної інформації (National Center of Biotechnology Information, NCBI) та Європейської молекулярно-біологічної лабораторії (*European Molecular Biology Laboratory, EMBL)* [6, 7]. Поліморфізм амінокислотних послідовностей *HA* виявляли на продуктах трансляції послідовностей генів *HA*, отриманих з NCBI та EMBL. Визначення трансляції проводили за допомогою програми MEGA 6 [8]. Кластерний аналіз та обрахування генетичних і амінокислотних дистанцій послідовностей генів *HA*й продуктів його трансляції здійснювали за алгоритмом ClustalW за допомогою програми MEGA 6 [9, 10]. Побудову дендрограми проводили методом кластерізації за найбільшою подобою (Maximum composite likehood method, MCLM), достовірність обраховували за допомогою бут-стреп аналізу при числі реплікацій рівному 500 [2]. Достовірним вважали результат, більший за 70 [6]. Властивості *HA* виявляли шляхом визначення доменів продуктів трансляції генів *HA*задопомогою програми DELTA-BLAST [4].

5. Результати та обговорення

За результатом кластерного аналізу нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 побудована дендрограма (рис. 1).

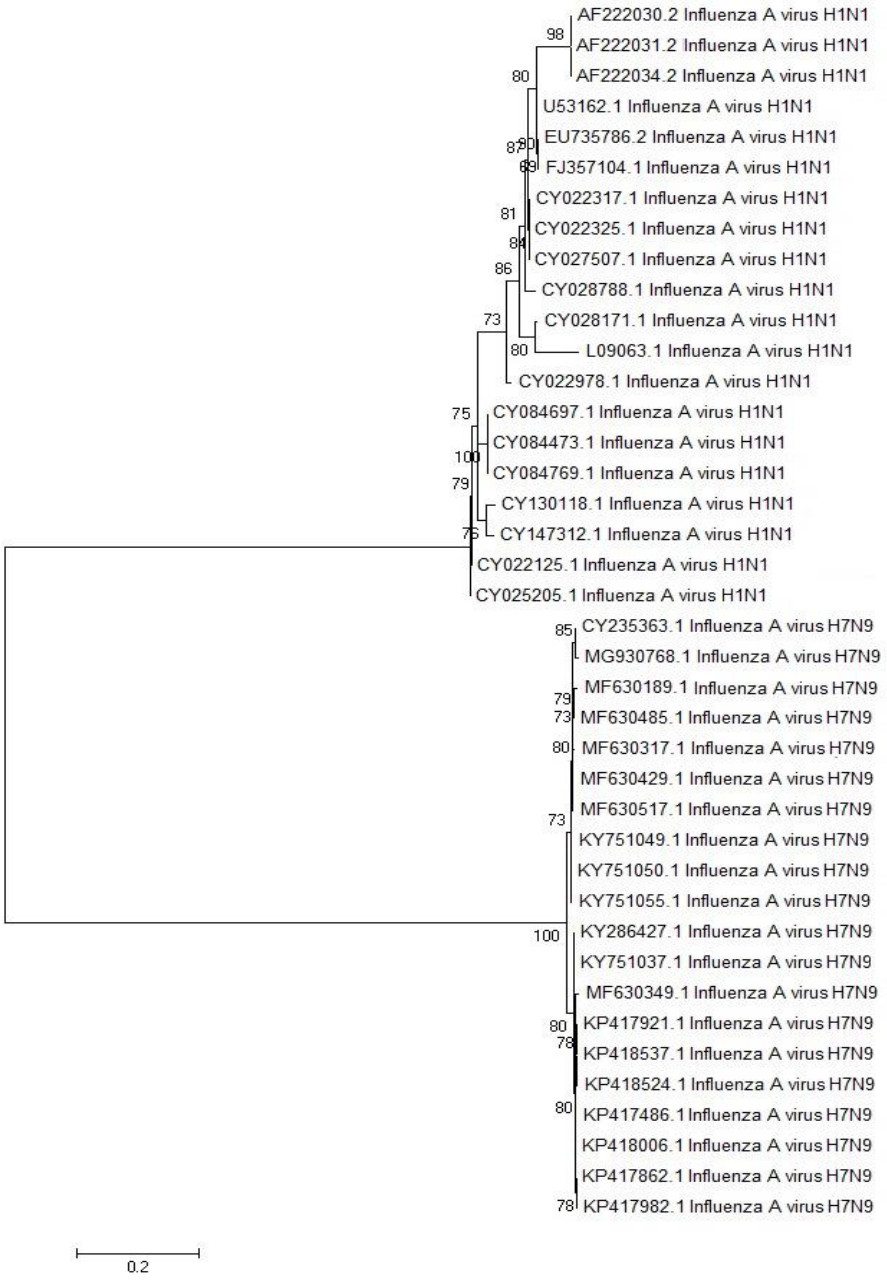

Рис. 1. UPGM – дендрограма побудована за результатами кластерного аналізу нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу при числі реплікацій рівному 500. Шкала вказує на генетичну відстань (у замінах на позицію)

Побудована дендрограма містить дві клади, одна з яких утворена нуклеотидними послідовностями гена *HA* штаму H1N1, інша – штаму H7N9. Внутрішньоштамовий поліморфізм гена *HA* вищий у штаму H1N1.

За результатом кластерного аналізу амінокислотних послідовностей *HA*, отриманих шляхом трансляції нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9, побудована дендрограма (рис. 2).

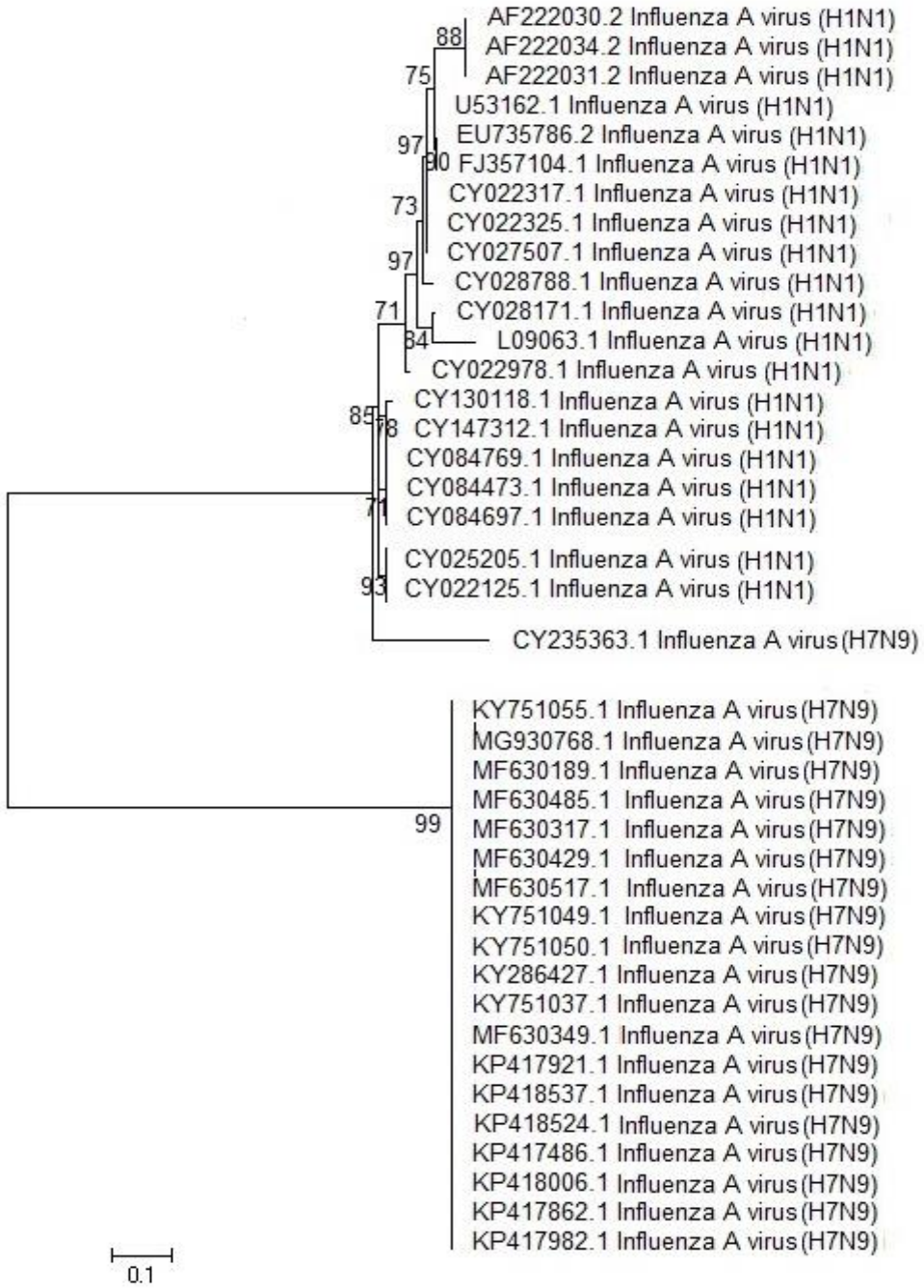

Рис. 2. UPGM – дендрограма побудована за результатами кластерного аналізу амінокислотних послідовностей *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу при числі реплікацій рівному 500. Шкала вказує на генетичну відстань (у замінах на позицію)

Побудована дендрограма містить дві клади, одна з яких утворена амінокислотними послідовностями *HA* штаму H7N9, інша – штаму H1N1 та однією послідовністю H7N9. У кладі із зразками штаму H7N9 поліморфізм *HA* відсутній. У складі з *HA* штамів H1N1 та H7N9 спостерігається незначний поліморфізм.За результатами досліджень амінокислотних послідовностей *HA* виявлено відсутність впливу на них генетичного поліморфізму більшості зразків гену *HA* штаму H7N9. Показники бут-стреп аналізу більше за 70, що вказує на достовірність розподілу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей у отриманих дендрограмах. Розподіл нуклеотидних та амінокислотних послідовностей на отриманих дендрограмах свідчить про наявність синонімічних кодонів у гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Це підтверджується короткими амінокислотними дистанціями між послідовностями

HA та наявністю клади з послідовностями обох штамів. За результатом визначення доменів, кожен продукт трансляції генів *HA* утворював один домен pfam00509, який обумовлює руйнування мембрани клітини-хазяїна. Наявність загального для всіх *HA* домену співпадає з результатами кластерного аналізу гена *HA* та *HA*.

Результати даного дослідження є актуальними для штамів H1N1 та H7N9 і можуть відрізнятися від впливу поліморфізма гена *HA* на поліморфізм *HA* та властивості інших штамів вірусу грипу А. Попри відсутності зв'язку між поліморфізмом гена *HA* та поліморфізмом *HA*, варіабельність гена *HA* може впливати на швидкість його трансляції. Також поліморфізм послідовностей гена *HA* може формувати різні сайти рестрикції та викликати зсув рамки зчитування. Можлива різна швидкість трансляції, поліморфізм сайтів рестрикції та зсув рамки зчитування можуть впливати на різний рівень контагіозності та патогенності у різних штамів вірусу грипу А, що робить актуальним подальші молекулярно-генетичні та біоінформатичні дослідження поліморфізму гена *HA*.

6. Висновки

1. За результатами дослідження показаний поліморфізм гена *HA* у штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9.

2. Визначено продукти трансляції даного гена та показаний їх поліморфізм. Результати досліджень є статистично достовірними.

3. Визначено відсутність впливу поліморфізму гена *HA* на поліморфізм *HA* та його доменовий склад і, таким чином, на властивості обох досліджуваних штамів.

Література

1. Gamblin S. J., Skehel J. J. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins // Journal of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285, Issue 37. P. 28403–28409. doi: http://doi.org/10.1074/jbc.r110.129809

2. Efron B. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife // The Annals of Statistics. 1979. Vol. 7, Issue 1. P. 1–26. doi: http://doi.org/10.1214/aos/1176344552

3. Characterization of the Sialic Acid Binding Activity of Influenza A Viruses Using Soluble Variants of the H7 and H9 Hemagglutinins / Sauer A.-K., Liang C.-H., Stech J., Peeters B., Quéré P., Schwegmann-Wessels C. et. al. // PLoS ONE. 2014. Vol. 9, Issue 2. P. e89529. doi: http://doi.org/10.1371/journal.pone.0089529

4. Smith T. F., Waterman M. S. Identification of common molecular subsequences // Journal of Molecular Biology. 1981. Vol. 147, Issue 1. P. 195–197. doi: http://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5

5. Brockwell-Staats C., Webster R. G., Webby R. J. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1) // Influenza and Other Respiratory Viruses. 2009. Vol. 3, Issue 5. P. 207–213. doi: http://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2009.00096.x

6. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. // Molecular Biology and Evolution. 2011. Vol. 28, Issue 10. P. 2731–2739. doi: http://doi.org/10.1093/molbev/msr121

7. Taubenberger J. K., Kash J. C. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation // Cell Host & Microbe. 2010. Vol. 7, Issue 6. P. 440–451. doi: http://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009

8. Evolution and ecology of influenza A viruses / Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. // Microbiological Reviews. 1992. Vol. 56, Issue 1. P. 152–179.

9. A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties / Wilks S., de Graaf M., Smith D. J., Burke D. F. // Vaccine. 2012. Vol. 30, Issue 29. P. 4369–4376. doi: http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.076

10. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. 2004. Vol. 5, Issue 2. P. 150–163. doi: http://doi.org/10.1093/bib/5.2.150

Дата надходження рукопису 26.03.2019

Буряченко Семен Васильович, аспірант, Відділ вивчення хвороб птиці,Національний науковий центр Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН України, вул. Пушкінська 83, м. Харків, Україна, 61023
E-mail: semenb837@gmail.com

Стегній Борис Тимофійович, доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН України, завідувач лабораторії, Лабораторія вивчення вірусних хвороб птиці, Національний науковий центр Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН України, вул. Пушкінська 83, м. Харків, Україна, 61023