



УДК 578. 832.1А:578.113.5:578.224'212.4

**ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ ДНК-КОПИИ
ГЕНА БЕЛКА NP ВИРУСА ГРИППА А/КИЕВ/59/79 (H1N1)**

**Беклешишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К.,
Головин С. Я., Кarginов В. А., Мамаев Л. В.,
Нетесов С. В., Петров Н. А., Сафронов П. Ф.**

*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
п. Кольцово Новосибирской обл.*

Определена полная первичная структура полноразмерной ДНК-копии гена белка нуклеопротеида вируса гриппа А/Киев/59/79 антигенного подтипа H1N1. Выяснено, что этот вирус является природным рекомбинантом с современными вирусами подтипа H3N2. Сравнение с другими аналогичными генами выявляет вероятную локализацию места фосфорилирования и штаммоспецифичных антигенных детерминант белка нуклеопротеида.

Белок NP — основной структурный элемент рибонуклеопротеида (РНП) вируса гриппа типа А. Этот полипептид содержит 498 аминокислотных остатков и кодируется фрагментом 5 вирусной РНК, который имеет размер 1565 нуклеотидов [1]. Помимо осуществления структурной функции NP специфически взаимодействует с матричным белком М1, а также принимает участие в процессе транскрипции вирусного генома [2]. Белки NP специфичны для определенных организмов-хозяев вируса гриппа [3], и при антигенных сдвигах появления новых генов белка NP у вирусов гриппа А человека не зарегистрировано [4].

В последнее время опубликованы данные о том, что Т-лимфоциты, генерирующиеся в организме млекопитающих в ответ на появление клеток, зараженных вирусом гриппа, распознают антигены белка NP [5]. Возможно, этот белок играет основную роль в формировании типоспецифического клеточного иммунитета к вирусу гриппа А, который выражается в заметном повышении устойчивости организма к повторному заражению вирусом того же типа [6]. Поэтому было бы интересно выявить изменения в первичной структуре белков NP различных штаммов вируса гриппа А с целью выяснения особенностей их эволюции и последующего создания универсальной вакцины против вирусов этого типа. До сих пор опубликованы структуры только двух генов белка NP штаммов 1934 [7] и 1968 гг. [8].

В настоящей работе определена полная нуклеотидная последовательность полноразмерной ДНК-копии гена NP-белка недавно циркулировавшего штамма вируса гриппа А/Киев/59/79/R, который является рекомбинантом штаммов А/Киев/59/79 и А/PR/8/34. Стратегия секвенирования показана на рис. 1. Примерно 70% последовательности установлено по двум комплементарным цепям. Расшифрованная первичная структура гена в форме позитивной цепи приведена на рис. 2 в сравнении со структурами соответствующего гена в штаммах А/PR/8/34 и А/NT/60/68. Аминокислотные последовательности белков NP этих штаммов даны на рис. 3.

При сопоставлении нуклеотидных последовательностей генов NP-белков штаммов А/Киев/59/79/R и А/PR/8/34 [10] было обнаружено 146 различий, что однозначно указывает на происхождение этого гена в рекомбинанте от штамма А/Киев/59/79. Первичная структура гена NP-белка штамма А/NT/60/68 отличается от структуры аналогичного гена штамма А/PR/8/34 по 127 нуклеотидам [7], причем 105 из них одинаковы у штаммов А/Киев/59/79 и А/NT/60/68. Это свидетельствует об эволюционной связи генов NP-белков этих штаммов, относящихся к различным подтипам.

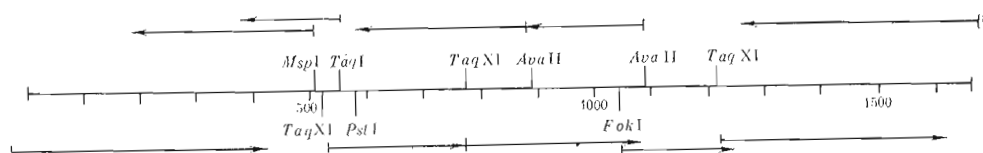


Рис. 1. Стратегия определения первичной структуры ДНК-копии гена NP-белка вируса А/Киев/59/79. Изображены только сайты расщепления тех рестриктаз, которые были использованы при секвенировании. Стрелки обозначают направление чтения последовательности нуклеотидов и размеры расшифрованной области. Стрелки, идущие вне области гена, начинаются от *MspI*-сайтов в векторе pBR 327

Ранее были получены данные об очень высокой степени гомологии РНК геномов вирусов типа А/USSR/90/77 и штаммов вирусов 1950–1954 гг. [11–14]. На основании этого сделано заключение о том, что эволюция современных штаммов (после 1977 г.) подтипа H1N1 в период с 1950 по 1977 г. была «заморожена». Следовало ожидать, что структуры генов NP-белков штаммов А/Киев/59/79 и А/PR/8/34 будут разли-

AGC AAAAGCAGGTTAATAATCACTCACTGAGTGACATCAAAATCATGGCGTCCCAAGGC	1	60
AG	2	
AG	3	
ACCAAACGGTCTTATGAACAGATGGAAACTGATGGGGAACGCCAGAATGCAACTGAGATC	1	120
	2	
A C G A C A	3	
AGGGCATCCGTCGGCAAGATGATTGATGGAATTGGACGATTCTACATCCAAATGTGCACT	1	180
A	2	
A A A C	3	
GAACCTAAACTCAGTGATTATGAAGGGCGATTGATCCAGAACAGCTTAACAATAGAGAGA	1	240
	2	
C G A G A	3	
ATGGTGCTCTCTGCTTTTGATGAGAGAAGGAATAGATATCTGGAAGAACATCCCAGCGCG	1	300
	2	
C A A A	3	
GGGAAAGATCCTAAGAAAACCTGGAGGGCCCATATACAAGAGAGTAGATAGAAACTGGATG	1	360
G	2	
A T G A CG	3	
AGGGAACATCATCTTTATGACAAAGAAGAAATAAGGCGAATCTGGCGCAAGCCAATAAT	1	420
G	2	
A	3	
GGTGATGATGCGACAGCTGGTCTAACTCACATGATGATCTGGCATTCCAATTTGAATGAT	1	480
A G	2	
C A G G	3	
ACAACATACCAGAGGACAAGAGCTCTTTGTTTCGCACCGGAATGGATCCCAGGATGTGCTCT	1	540
	2	
C	3	
G T T		
CTGATGCAGGGTTCGACTCTCCCTAGGAGGTCTGGAGCTGCAGGCGCCGAGTCAAAGGA	1	600
	2	
T	3	
GTCTGGGACAATGGTGATGGAGCTGATCAGAATGATCAACGGGGGATCAACGATCGGAAC	1	660
T A	2	
T T A AT G T T	3	
TTCTGGAGAGGTGAGAATCGACGAAAAACAAGGAGTGCTTATGAGAGAATGTGCAACATT	1	720
A	2	
C	3	
CTCAAAGGAAAATTTCAAACAGCTGCACAAAGAGCCTATGATGGATCAAGTGAGAGAAAGC	1	780
	2	
G T	3	
CGGAACCCAGGAAATGCTGAGATCGAAGATCTCATATTTCTGGCAGGCTGCACTAATA	1	840
	2	
C T C	3	
TTGAGAGGGTCACTTGCTCACAATCTGTCTACCTGCCTGTGTGATGGACCTGCCGTA	1	900
	2	
T G C	3	
GCCAGTGGGTACGACTTCGAAAAAGAGGGATATCTTTGGTGGGAATAGACCCTTTCAA	1	960
C	2	
T GG C A C	3	
CTGCTTCAAACAGCCAACTATACAGCCTAATCAGACCGAACGAGAATCCAGCACACAAG	1	1020
	2	
G A T	3	
AGTCAGCTGGTGTGGATGGCATGTCATTTGAACATCTAAGATTGTTAAGC	1	1080
	2	
A A G A	3	

TTCATCAGAGGGACCAAAGTATCTCCACGGGGGAACTTTCAACTAGAGGAGTACAAATT	1	1140
	2	
A G G GCTC A A G C T	3	
GCTTCAAATGAGAACATGGATACATATGGAATCAAGTACTCTGAACTGAGAAGCAGGTAC	1	1200
	2	
C A T G A	3	
TGGGCCATAAGGACCAGGAGTGGAGGAAACACTAATCAACAGAGGGCCTCCGCAGGCCAA	1	1260
	2	
A A C T A T G	3	
ATCAGTGTGCAACCTACATTTTCTGTGCAAGAAACCTCCCATTTTGACAAATCAACCGTC	1	1320
	2	
CA A G C A A G T T G A T	3	
ATGGCAGCATTCACTGGGAATACGGAGGGAAGAACCTCAGACATGAGGGCAGAAATCATA	1	1380
	2	
G A G A T A C	3	
AGGATGATGGAAGATGCAAAACCAGAAGAAGTGTCTTCGGTGGGCGGGAGTTTTCGAG	1	1440
	2	
G G A A T A G C	3	
CTCTCAGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCCTCTTTTGACATGAGTAATGAAGGA	1	1500
	2	
G G G T C	3	
TCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAAGAGTACGACAATTAAGGAAAAATACCCTTGT	1	1560
	2	
C G A T A	3	
СТАСТ	1	1565
	2	
	3	

Рис. 2. Первичная структура позитивной цепи ДНК-копии гена белка нуклеопротеида вируса гриппа А/Киев/59/79 (строка 1). Ниже приведены замены в аналогичных генах штаммов А/NT/60/68 (строка 2) и А/PR/8/34, вариант СССР (строка 3)

чаться меньше, чем штаммов А/NT/60/68 и А/PR/8/34, как это имеет место в случае генов белков М и NS вируса А/USSR/90/77 [15, 16]. Однако полученные нами данные свидетельствуют об обратном. Эти результаты можно объяснить, только предположив, что вирус А/Киев/59/79 (H1N1) является естественным рекомбинантом, «позаимствовавшим» ген белка NP у современных вирусов подтипа H3N2. В пользу такого предположения косвенно говорят факты широкого распространения подобных рекомбинантов в 1978–1979 гг. [13, 14, 17].

Анализ 5'-концевой области негативной цепи гена белка NP показывает, что у всех исследованных штаммов вируса гриппа имеется открытая рамка трансляции (инициирующий кодон в положении 79–81), в которой может быть закодирован полипептид размером 83 аминокислотных остатка у штаммов А/PR/8/34 (варианты Cambridge и СССР) и А/Киев/59/79, 77 остатков у А/NT/60/68 и 124 остатка у В/Singapore/222/79 [18]. Аминокислотная последовательность этого гипотетического белка в штамме А/Киев/59/79 такова:

MSKEGTIGFVAFSSSESKTPRPRKDTSSGFASSILHLSALMSEVLPSVFPVNAAITVDL60
SNGRFLCTENAGCTLIWPAEALC

Интересной его особенностью является наличие протяженного гидрофобного кластера в центре молекулы.

Определение полной первичной структуры гена белка NP штамма А/Киев/59/79 дает возможность сравнить структуры белков NP трех достаточно удаленных по времени изолятов вирусов гриппа А и вирусов гриппа В. Такое сравнение (рис. 3) выявляет как вариабельные, так и консервативные участки аминокислотной последовательности, очевидно, необходимые для выполнения белком его функции. Одним из основных свойств белков NP в вирионе является наличие одного фосфорилированного остатка серина на молекулу [19]. В условиях подавления фосфорилирования белка NP в непермиссивных клетках *HeLa* происходит abortивная инфекция. При этом блокируется последняя стадия отпочкования, и возникающие выпячивания мембраны, содержащие РНП, не замыкаются и не отделяются в виде вирионов [20]. Успешно отпочковавшиеся вирионы содержат только фосфорилированный белок NP. Авторы работы [20] считают, что изменение заряда РНП вызывает нарушение его связывания с матриксным белком М1. В клетке белок NP также фосфорили-

С-конца молекулы, где сгруппированы замены в положениях 422, 423, 425, 430, 442, 450, 452, 455, 456, 459 (см. рис. 3). Второй участок (положения 98, 101, 102) и третий (положения 334, 343, 348, 353) расположены вблизи областей, характеризующихся повышенной гомологией с белком NP вируса типа В, что, вероятно, отражает их функциональную значимость. Возможно, эти три области как раз и представляют собой домены, выявленные в работе [14], а связывание антител с последними двумя из них может препятствовать выполнению белком NP его функций в процессе транскрипции генома. Однако для достоверной локализации как штаммоспецифичных антигенных детерминант этого белка, так и участков, отвечающих за типоспецифичные антигенные характеристики, необходимы дальнейшие исследования.

Экспериментальная часть

Использованный в работе вакцинный штамм А/Киев/59/79/Р получен путем рекомбинации между эпидемическим штаммом А/Киев/59/79 и дающим высокий урожай на куриных эмбрионах (КЭ) штаммом А/PR/8/34 (вариант СССР). Рекомбинант был получен и отобран по антигенным свойствам эпидемического штамма во ВНИИ гриппа (Ленинград). Использованы меченые [α - 32 P] дезоксинуклеозидтрифосфаты отечественного производства.

Подробные методики очистки вируса, выделения вирусной РНК, получения кДНК, клонирования и определения первичной структуры ДНК методом Максама—Гилберта [24] приведены в нашей предыдущей работе [25].

Авторы выражают благодарность Л. С. Сандахчиеву за постоянную поддержку в работе, а также Б. Г. Гриненкову за содействие в обеспечении вирусным материалом, Ю. С. Скоблову за обеспечение высококачественными препаратами меченых нуклеотидов, С. Х. Дегтяреву и Н. А. Нетесовой за предоставление высокоочищенных препаратов рестриктаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Desselberger U., Palese P. *Virology*, 1978, v. 88, № 2, p. 394—399.
2. Markushin S. G., Gendon Y. Z. *J. Gen. Virol.*, 1984, v. 65, № 3, p. 559—575.
3. Bean W. J. *Virology*, 1984, v. 113, № 2, p. 438—442.
4. Жданов В. М. *Вестн. АМН СССР*, 1983, № 12, с. 8—15.
5. Townsend A. R. M., Skehel J. J., Taylor P. M., Palese P. *Virology*, 1984, v. 133, № 2, p. 456—459.
6. Шварцман Я. С., Цыбульская Н. В., Исполатова А. В. *Успехи соврем. биологии*, 1982, т. 94, вып. 3(6), с. 446—457.
7. Winter G., Fields S. *Virology*, 1981, v. 114, № 2, p. 423—428.
8. Huddleston J. A., Brownlee G. G. *Nucl. Acid Res.*, 1982, v. 10, № 3, p. 1029—1038.
9. *Eur. J. Biochem.*, 1984, v. 138, № 1, p. 9—37.
10. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Нетесов С. В., Петренко В. А., Петров И. А., Фролов И. В. *Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 5, с. 636—640.
11. Nakajima K., Desselberger U., Palese P. *Nature*, 1978, v. 276, p. 334—339.
12. Kendal A. P., Noble G. R., Skehel J. J., Dowdle W. R. *Virology*, 1978, v. 89, № 2, p. 632—636.
13. Kendal A., Cox N., Nakajima S., Webster R., Bean W., Beare P. In: *Genetic variation among influenza viruses*/Ed. Nayak D. P. N. Y.: Acad. Press, 1981, p. 489—504.
14. van Wyke K. L., Bean W. J., Webster R. G. In: *Genetic variation among influenza viruses*/Ed. Nayak D. P. N. Y.: Acad. Press, 1981, p. 373—385.
15. Самохвалов Е. А., Каргинов В. А., Чижиков В. Е., Блинов В. М., Василенко С. К., Юферов В. П., Урысаяев Л. В., Жданов В. М. *Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 8, с. 1080—1086.
16. Krystal M., Buonagurio D., Young J. F., Palese P. *J. Virol.*, 1983, v. 45, № 2, p. 547—554.
17. Bean W. J., Cox N. J., Kendal A. P. In: *Structure and variation in influenza virus*/Eds Laver W., Air G. Elsevier North Holland, 1980, p. 105—114.
18. Londo D. R., Davis A. R., Nayak D. P. *J. Virol.*, 1983, v. 47, № 3, p. 642—648.
19. Privalsky M. L., Penhoet E. E. *J. Biol. Chem.*, 1981, v. 256, № 11, p. 5368—5376.
20. Schrom M., Caliguri L. A. In: *Genetic variation among influenza viruses*/Ed. Nayak D. P. N. Y.: Acad. Press, 1981, p. 273—282.
21. Kamata T., Watanabe J. *Nature*, 1977, v. 267, p. 460—462.

22. Murray K. J., El-Maghrabi M. R., Kountz P. D., Lukas T. J., Soderling T. R., Pil-kis S. J. J. *Biol. Chem.*, 1984, v. 259, № 12, p. 7673-7681.
23. Davey J., Dimmock N. J., Colman A. *Cell*, 1985, v. 40, № 3, p. 667-675.
24. Maxam A. M., Gilbert W. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.
25. Беклемисhev A. B., Блынов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Гурогов В. В., Кarginov В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Нересов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Сандахчиев Л. С. *Биооргани. химия*, 1984, т. 10, № 11, с. 1535-1543.

Поступила в редакцию
6.V.1985

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A FULL-LENGTH DNA COPY OF THE INFLUENZA VIRUS A/KIEV/59/79 (H1N1) NUCLEOPROTEIN GENE

BEKLEMISHEV A. B., BLYNOV V. M., VASSILENKO S. K.,
GOLOVIN S. Ya., KARGINOV V. A., MAMAYEV L. V.,
NETESOV S. V., PETROV N. A., SAFRONOV P. F.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,
Novosibirsk Region*

The complete nucleotide sequence of the cloned full-length DNA copy of A/Kiev/59/79 (H1N1) influenza virus nucleoprotein gene has been determined. This strain is shown to be the natural recombinant that inherited its nucleoprotein gene from contemporary H3N2-influenza strains. The comparison with other NP-genes reveals the probable localization of antigenic determinants and phosphorylation site of the NP-protein.