



УДК 578.832.1А : 578.113.5 : 578.224'212.4

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ ДНК-КОПИИ ГЕНА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА

А/КИЕВ/59/79 (H1N1)

*Беклемишев А. Б., Близов В. М., Василенко С. К.,
Гбловин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В.,
Нетесов С. В., Петров Н. А., Сафронов П. Ф., Фролов И. В.*

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

Определена полная первичная структура полноразмерной ДНК-копии гена гемагглютинаина вируса гриппа А/Киев/59/79 подтипа H1N1. Сравнение с аналогичными генами других штаммов позволяет выявить наличие двух ветвей развития вирусов этого подтипа.

Основной проблемой вакцинопрофилактики гриппа является способность вирусов гриппа А к быстрым изменениям антигенных свойств, что в основном обусловлено мутациями в гене гемагглютинаина (НА) [1]. В настоящее время установление первичной структуры генов поверхностных белков вириона гриппа становится одним из наиболее быстрых и эффективных методов характеристики новых изолятов [2]. Такая информация даст четкий ответ на вопрос о филогенетических связях нового штамма с другими эпидемическими вариантами, а также о возможных путях распространения эпидемий.

В настоящей работе нами определена нуклеотидная последовательность полноразмерной ДНК-копии гена гемагглютинаина вируса гриппа А/Киев/59/79/R. Инактивированная вакцина на основе этого вируса разрешена к применению Минздравом СССР. Стратегия определения нуклеотидной последовательности гена показана на рис. 1. Около 80% ее было проанализировано по обеим цепям ДНК. На рис. 2 в форме позитивной цепи приведена последовательность нуклеотидов гена и выведенная из нее аминокислотная последовательность гемагглютинаина вируса гриппа А/Киев/59/79/R в сравнении с аналогичной последовательностью штамма А/Хабаровск/034457/77 (А/Хабаровск/77), определенной нами ранее в работе [4] (здесь приводится уточненное название штамма в соответствии с работой [5]).

Анализ первичной структуры однозначно подтверждает происхождение гена гемагглютинаина в рекомбинанте от штамма А/Киев/59/79. Как и

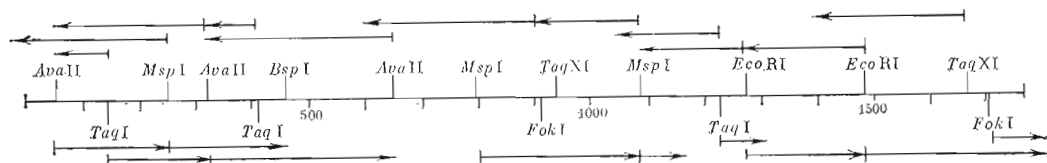


Рис. 1. Стратегия определения первичной структуры ДНК-копии гена гемагглютинаина штамма А/Киев/59/79. Изображены только сайты расщепления тех рестриктаз, которые были использованы при секвенировании. Стрелки обозначают направление чтения последовательности нуклеотидов и размеры расщипленной области. Стрелки, начинающиеся вне пределов гена, берут начало от *MspI*-сайтов в плазмидном векторе pBR 327

M K A K L L V L L

AGCAALGCGGGGAAAATAAAAACAACCAATGAAAGCAAACTACTGGTCTCTGTTAT 60

C A L S A T D A D T I C I G Y H A N N S
GTGCACTTTTCTAGCTACAGATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAA 120

T D T V D T V L E K N V T V T H S V N L
CCCACACTGTTGACACAGTACTCGAAAAGAACGTGACAGTGACACACTCTGTCTAACCTAC 180

L E D S H N G K L C R L K G I A P L Q L
TTGAGGACACTCACACGGAAAACCTATGCAGACTGAAAGGAATAGCTCCACTACAATTGG 240

A C

V

G K C S I A G W I L G N P E C E S L F S
GGAAATGCACCATTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGAAATGCCAATCACTGTTTTCTA 300

G

K K S W S Y I A E T P N S E N G T C Y P
AGAAATCATGCTCTTACATTTGCAGAAACACCAAACTCCGAGAATGGAACATGTTACCCAG 360

G Y F A D Y E E L R E Q L S S V S S F E
GATATTTTCCGCACTATGAGGAAGTGGGAGCAATTGAGTTCAGTATCATCATTCGAGA 420

T C

R F E I F P K E R S W P K H N V T R G V
GATTCGAAATATTTCCCAAGGAAAGATCATGGCCCAACACACGTAACCAGAGGAGTAA 480

C

T A S C S H K G K S S F Y R N L L W L T
CGGCATCATGCTCCCATAAAGGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGG 540

E K N G S Y P N L S K S Y V N N K E K E
AGAAAATGGCTCGTACCCAAATCTGAGCAAGTCCCTATGTGAACAACAAGAGAAAGAAG 600

V L V L W C V H H P S N I E D Q K T I Y
TCCTTTGCTATGCGGTGTTTCATCACCCTGTAACATAGAGGACCAAAAGACCATCTATC 660

R K E N A Y V S V V S S N Y N R R F T P
GGAAAGAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCAAATTATAACAGGAGATTACCCCGAG 720

E A

E I A K R P K V R G Q E G R I N Y Y W T
AAATAGCAAAAAGACCCAAAGTAAGAGGTCAAGAAGGGAGAATTAACCTACTACTGGACTC 780

G C

L L E P G D T I I F E A N G N L I A P W
TGCTGGAACCCGGGGACACAATAATATTTGAGGCAATGGAATCTAATAGCGCCATGGT 840

C

H N

Y A F A L S R G F G S G I I T S N A S M
ATGCTTTTCCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCAGGAATCATCACCTCAAACGCATCGATGG 900

A

в генах гемагглютинаина и нейраминидазы (NA) штамма А/Хабаровск/77, в некодирующей 3'-концевой части гена гемагглютинаина штамма А/Киев/59/79 обнаружен дополнительный остаток А, удлиняющий oligo(A)-область на один нуклеотид. Предполагается, что эта область участвует в терминеции транскрипции и в полиаденилировании мРНК [6]. Между этими двумя родственными штаммами имеется 18 нуклеотидных различий (15 в области NA₁), которые привели к 8 аминокислотным различиям (6 в NA₁). В гемагглютиниине вируса А/Киев/59/79 нет характерных только для него замен в антигенных детерминантах [7].

В таблице нами суммированы все имеющиеся в настоящее время данные об аминокислотных различиях в субъединице NA₁ для генов гемагглютинаина вирусов гриппа современного подтипа H1N1. Мутации по большинству перечисленных здесь аминокислотных остатков приводят к нарушению связывания с моноклональными антителами [7, 12]. Последовательность расположения штаммов в таблице определялась по принципу наименьшего числа мутаций в столбцах и почти во всех случаях совпадает с реальной последовательностью их выделения. Это соответствует тому, что возникающие летальные мутации, как правило,

D E C D T K C Q T P Q G A I N S S L P F
 ATGAATGTGACACGAAGTGTCAAACACCCAGGGAGCTATAAACAGTAGCCCTTCCTTTCC 960
 T

I
 Q N V H P V T I G E C P K Y V R S T K I
 AGAATGTACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCAAAATACGTCAGGAGTACAAAATTAA 1020
 A G G

R M V T G L R N I P S I Q S R G L F G A
 GGATGGTTACAGGACTAAGAAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTCTGTTTGGAGCCA 1080
 G

I A G F I E G G W T G M I D G W Y G Y H
 TTGCCGTTTCATTGAAGGGGATGGACTGGAATGATAGATGGATGGTATGGTTATCATC 1140

H Q N E Q G S G Y A A D Q K S T Q N A I
 ATCAGAATCTACAGGGATCTGGCTATGCTGCGGATCAAAAAGCACACAAAATGCCATTA 1200

N G I T N K V N S V I E K M N T Q F T A
 ACGGGATTACAACAAGGTGAAGTCTGTTATCGAGAAAAATGAACACTCAATTCACAGCTG 1260

D E
 V G K D F N K L E K R M E N L N K K V D
 TGGGTAAAGAATTCAACAAATTAGAAAAAGGATGGAAAACCTAAATAAAAAAGTTGATG 1320
 G G

D G F L D I W T Y N A E L L V L L E N E
 ATGGATTTCTGGACATTTGGACATATAATGCAGAATGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAA 1380

R T L D F H D S N V K N L Y E K V K S Q
 GGACTTTGGATTTTCATGACTCAAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAAT 1440

L K N N A K E I G N G C F E F Y H K C N
 TAAAGAATAATGCCAAAGAAATAGGAAACGGGTGTTTGAATTCTACCACAAGTGTACA 1500

N E C M E S V K N G T Y D Y P K Y S E E
 ATGAATGCATGGAAAGTGTAAAAATGGAACCTATGACTATCCAAAATATTCAGAGGAAT 1560

S K L N R E K I D G V K L E S M G V Y Q
 CAAAGTTAAACAGGGAAAAAATTGATGGAGTGAAGTTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGA 1620
 A

I L A I Y S T V A S S L C L L V S L G A
 TTCTGGCGATCTACTCAACTGTGCCAGTTCAGTGTGTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAA 1680

I S F W M C S N G S L Q C R I C I
 TCAGCTTCTGGATGTCTTCAATGGGTCTTTGCAGTGCAGAATATGCATCTGAGGCCAGA 1740
 A

ATTTTCAGAAATATAAGAAAAAACACCCCTTGTCTTCTACT 1779

Рис. 2. Последовательность нуклеотидов позитивной цепи ДНК-копия гена гемагглютинаина штамма А/Киев/59/79 и выведенная из нее аминокислотная последовательность белка. Ниже приведены отличающиеся нуклеотиды в первичной структуре гена гемагглютинаина штамма А/Хабаровск/77, а выше — отвечающие им замены аминокислот. Обозначения аминокислотных остатков даны в однобуквенном коде [3]

сохраняются у всех потомков данного вируса. На основании таблицы нами была составлена схема эволюционных взаимоотношений между различными штаммами вируса гриппа современного подтипа H1N1 (рис. 3).

Из таблицы и рис. 3 следует, что эволюционный ряд вирусов современного подтипа H1N1 разветвлен так же, как и для подтипа H3N2 [13]. Этот вывод подтверждается и нашими данными по структуре гена нейраминидазы штамма А/Киев/59/79 [14]. Одна ветвь, представленная штаммами А/USSR/90/77 и А/Хабаровск/77, отражает, по-видимому, распространение вируса из Китая на запад через территорию СССР; другую же ветвь образуют штаммы, распространяющиеся в тихоокеанском направлении. Возможно, такая временная географическая изоляция и привела к появлению двух ветвей.

В разных ветвях схемы иногда отмечаются одни и те же мутации в области антигенных детерминант, что могло быть вызвано сходными ус-

Различия в аминокислотной последовательности субъединицы HA₁ гематглютинаина вирусов гриппа подтипа H1N1

Штамм	1 56 71 74 121 128 154 160 186 187 205 216 222 224 253 258 277 295																			
	2 65 80 83 128 132 157 163 189 190 208 219 225 227 256 261 279 297																			
3	Cb Cb Sa Ca Sb Sa Sb Sb Ca Ca Ca Ca Ca Ca Ca Ca Ca Ca																			
A/PR/8/34 [8]	N	L	R	S	T	K	K	K	D	N	E	D	A	Y	S	T	I			
A/Bellamy/42 [9]	N	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Loyang/4/57 [9]	N	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/FW/1/50 [9]	N	F	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Хабаровск/77 [4]	S	V	K	R	V	K	N	E	D	N	E	G	A	H	N	T	I			
A/USSR/90/17 [10,11,12]	N	F	K	R	V	K	N	E	D	N	E	G	A	H	N	T	I			
A/Lackland/3/78 [10]	.	.	.	R	V	E	N	K	D	N	E	D	A	Y	S	T	V			
A/Киев/59/79	S	F	K	R	V	K	N	E	D	N	K	G	E	Y	S	T	V			
A/Brazil/11/78 [10]	S	V	K	R	I	E	N	E	D	N	K	G	E	Y	S	T	V			
A/England/333780 [10]	S	V	K	S	V	K	N	E	N	H	K	D	E	Y	S	A	V			
A/India/6263/80 [10]	S	V	K	S	V	K	S	E	D	H	K	G	E	Y	S	A	V			

Примечания. Аминокислотные остатки нумеруются от N-конца HA₁ (строка 1). Цифра в строке 2 обозначает положение соответствующего остатка в структуре HA подтипа H3. Строка 3 - антигенная детерминанта. Точками обозначены участки, структура которых не установлена

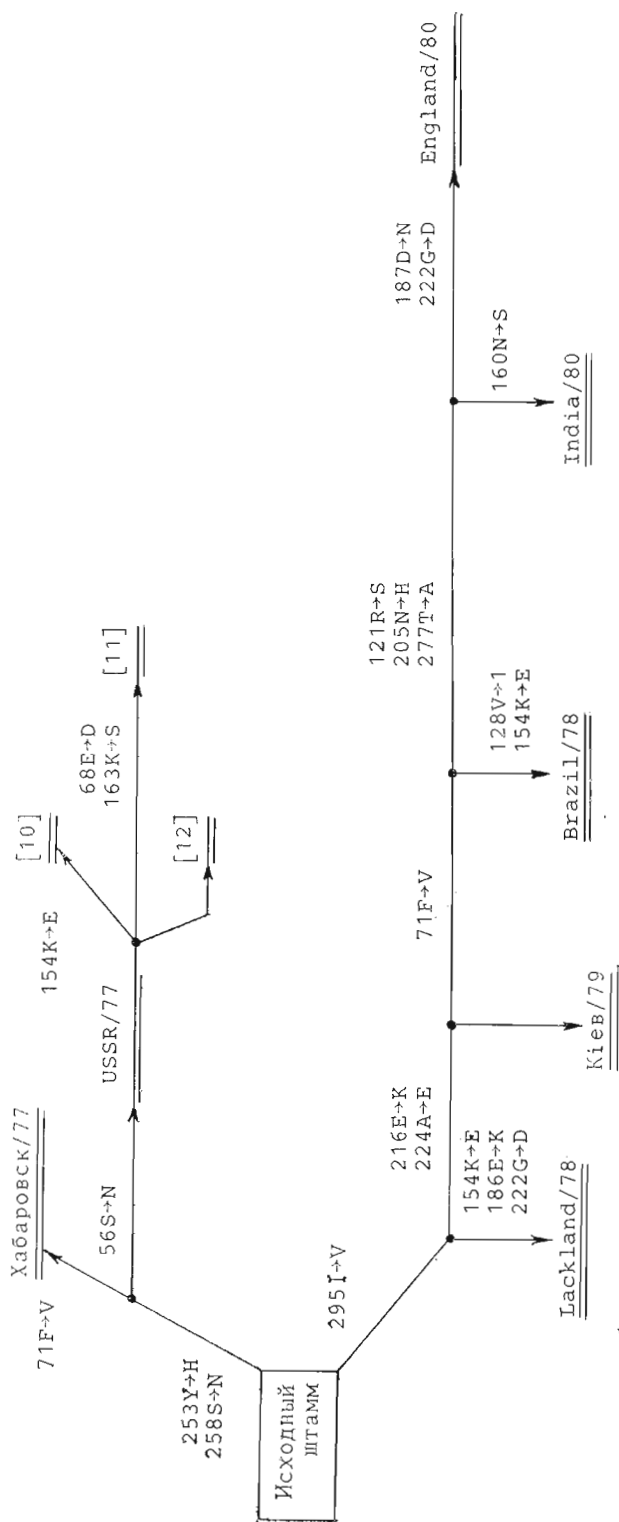


Рис. 3. Схема филогенетических взаимоотношений различных изолятов вирусов гриппа подтипа H1N1. Цифры и буквы около стрелок обозначают положение аминокислотных замещений, имеющих у всех последующих штаммов, расположенных вдоль этой линии. Для обозначения аминокислотных остатков использована общепринятая кодировка [3]. Нумерация аминокислот дана с N-конца зрелой субъединицы HA₁. Термином «исходный штамм» обозначен исходный штамм эпидемии 1977 г., которая началась в начале 1977 г. в Китае

ловиями «частично иммунной среды», к которой адаптировался вирус.

Необычно положение в таблице штамма A/FW/1/50, что отражает уникальность «возвращения» вирусов этого подтипа в 1977 г. Положение гемагглютинаина штамма A/Киев/59/79 в таблице и рис. 3 также необычно. Он, хотя и выделен в 1979 г., в последовательном ряду располагается между двумя изолятами 1978 г. Аналогичная особенность имеет место и для второго его поверхностного антигена — нейраминидазы [14], которая имеет меньше отличий от нейраминидазы штамма A/PR/8/34, чем ген более раннего изолята A/Хабаровск/77. Конечно, разница в один-два года не так уж и велика, однако складывается впечатление, что антигенный дрейф этого вируса в силу каких-то причин был замедлен. В то же время вирус A/Киев/59/79 в отличие от всех остальных штаммов, представленных в таблице, по всей видимости, является естественным рекомбинантом с вирусами подтипа H3N2, что следует из структуры его гена белка NP [15]. Исследованные природные рекомбинанты подтипа H1N1 характеризовались повышенной вирулентностью и содержали гены белков полимеразного комплекса — PA, PB1, PB2 и NP, «заимствованные» у современных вирусов типа Техас/77 (H3N2) [16]. Впервые они были обнаружены после совместной эпидемии вирусов подтипов H1N1 и H3N2 в США, где в конце 1978 г. являлись основными возбудителями заболевания [17]. Эпидемия весной 1979 г. началась из Киева как эндогенная [18], однако принадлежность штамма A/Киев/59/79 к естественным рекомбинантам, с одной стороны, и к ветви вирусов, распространявшихся не по территории СССР — с другой, позволяет высказать предположение, что возбудитель ее возник за пределами территории СССР.

В результате отмеченной выше «замедленности» антигенного дрейфа обоих поверхностных антигенов вируса A/Киев/59/79 выбор именно этого штамма для получения вакцины представляется не вполне удачным. Вероятно, в дальнейшем данные о первичной структуре генов эпидемических вариантов могут оказать существенную помощь при выборе наиболее перспективного кандидата для получения вакцины.

Экспериментальная часть

Использованный в работе вакцинный штамм A/Киев/59/79/R получен путем рекомбинации между эпидемическим штаммом A/Киев/59/79 и дающим высокий урожай на куриных эмбрионах (КЭ) штаммом A/PR/8/34 (вариант СССР). Рекомбинант был отобран по антигенным свойствам штамма A/Киев/59/79 во ВНИИ гриппа (Ленинград). Меченые [α - 32 P]дезоксинуклеозидтрифосфаты — отечественного производства. Подробные методики очистки вируса, выделения вирусной РНК, получения кДНК, клонирования и определение первичной структуры приведены в нашей предыдущей работе [4].

Авторы выражают благодарность Л. С. Сандахчиеву за постоянную поддержку при проведении работы, а также Б. Г. Гриненкову за содействие в обеспечении вирусным материалом, Ю. С. Скоблову за поставки высокоочищенных препаратов меченых нуклеотидов высокой удельной активности, С. Х. Дегтяреву и Н. А. Нетесовой за предоставление высокоочищенных препаратов рестриктаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вебстер Р. Г., Лейвер У. Г. В кн.: Вирусы гриппа и грипп. М.: Медицина, 1978, с. 309—354.
2. Скехель Д. Д., Даниэльс Р. С., Дуглас А. Р., Вилей Д. К. Бюл. ВОЗ, 1983, т. 61, № 4, с. 64—67.
3. Eur. J. Biochem., 1984, v. 138, № 1, p. 9—37.
4. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Гуторов В. В., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Нетесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Сандахчиев Л. С. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 11, с. 1535—1543.
5. Язю М. А., Псаченко В. А., Молибог Е. В., Ямникова С. С., Воркунова Г. К., Березина О. Н., Иванова В. Т., Клицунова Н. В., Хохлова Г. Г., Антонова И. В., Зикстельская Л. Я., Жданов В. М. Вopr. вирусологии, 1978, № 2, с. 146—151.

6. Robertson J. S., Schubert M., Lazzarini R. A. J. Virol., 1981, v. 38, № 1, p. 157-163.
7. Caton A. J., Brownlee G. G., Yewdell J. W., Gerhard W. Cell, 1982, v. 31, № 2, p. 417-427.
8. Winter G., Fields S., Brownlee G. G. Nature, 1981, v. 292, p. 72-75.
9. Air G. M., Blok J., Hall R. M. In: The replication of negative strand viruses/Eds Bishop D., Compans R. Elsevier North Holland, 1981, p. 225-239.
10. Raymond F. L., Caton A. J., Cox N. J., Kendal A. P., Brownlee G. G. Nucl. Acid Res., 1983, v. 11, № 20, p. 7191-7203.
11. Concannon P., Cummings J. W., Salser W. A. J. Virol., 1984, v. 49, № 1, p. 276-278.
12. Nakajima S., Nakajima K., Kendal A. P. Virology, 1983, v. 131, № 1, p. 116-127.
13. Both G. W., Sleight M. J., Cox N. J., Kendal A. P. J. Virol., 1983, v. 48, № 1, p. 52-60.
14. Беклемышев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Нересов С. В., Петров Н. А., Сафронов П. Ф. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1423-1426.
15. Беклемышев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Нересов С. В., Петров Н. А., Сафронов П. Ф. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 3, с. 369-374.
16. Bean W. J., Cox N. J., Kendal A. P. In: Structure and variation in influenza in influenza virus/Eds Laver W. G., Air G. M. Elsevier North Holland, 1980, p. 105-114.
17. 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.
18. Сморodinцев А. А. В кн.: Грипп и его профилактика. Л.: Медицина, 1984, с. 97.

Поступила в редакцию
6.V.1985

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A FULL-LENGTH DNA COPY OF THE INFLUENZA VIRUS A/KIEV/59/79 (H1N1) HEMAGGLUTININ 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., FROLOV I. V.

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 hemagglutinin gene has been determined. The comparison with the other hemagglutinin structures reveals the divarication of evolutionary pathway of the H1N1-influenza viruses.