



УДК 578.835:578.233.2

ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ Arg-Gly-Asp
УЧАСТКОМ СВЯЗЫВАНИЯ ВИРУСА ЯЩУРА
С КЛЕТОЧНЫМ РЕЦЕПТОРОМ?

Суровой А. Ю., Иванов В. Т., Чепуркин А. В. *,
Иванощенков В. Н. *, Дрягалин Н. Н. *

Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва;

* Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт, г. Владимир

Адсорбция вируса на клетках хозяина — первый важный этап вирусной инфекции. При этом определенный участок на вирусной поверхности узнает специфический рецептор на клеточной мембране. Локализация таких участков и установление их структуры существенны для понимания механизмов функционирования вируса и необходимы для направленного создания противовирусных препаратов, блокирующих адсорбцию вируса. Данная работа посвящена локализации участка связывания вируса ящура с клеточным рецептором хозяина.

Вирус ящура — представитель семейства пикорнавирусов. Это безоболочечный вирус, содержащий четыре негликозилированных белка, обозначаемых как VP₁, VP₂, VP₃ и VP₄, которые формируют вирусный капсид с икосаэдрическим типом симметрии. Внутри вирусного капсида расположена моноцистронная РНК, ответственная за синтез всех структурных и неструктурных белков вируса. Серологически различают семь типов вируса ящура (А, О, С, Asia, SAT-1, SAT-2 и SAT-3), каждый из которых объединяет большое количество субтипов. Показано, что основным иммуногенным белком является полипептид VP₁, на котором расположены главные антигенные детерминанты этого вируса [1, 2]. Методом клонирования и нуклеотидного секвенирования генов была определена нуклеотидная последовательность для нескольких изолятов вируса разных серотипов [3—8]. Сравнение нуклеотидных последовательностей показало, что большинство изменений происходит в области, кодирующей белок VP₁. Район 130—170 гена белка VP₁ отличается повышенным уровнем вариаций и кодирует основной иммуногенный участок на вирусной поверхности [9]. Нуклеотидные изменения, происходящие в этом районе, приводят к появлению новых антигенных вариантов вируса. Прямое доказательство присутствия протективных эпитопов в этом районе белка было получено рядом исследователей [10, 11], а также нами в работах с использованием синтетических пептидов [12]. Антитела, образующиеся после иммунизации пептидами последовательности основного иммуногенного района, связывались с вирусными частицами и вызывали их нейтрализацию.

Кроме результатов по изучению иммуногенности VP₁ есть данные, указывающие на участие белка VP₁ в процессе адсорбции вируса на клетках [13]. Обработка вируса штамма О₁К трипсином, который расщепляет исключительно полипептидную цепь VP₁, приводит к нарушению адсорбции вируса и падению титра инфекционности [14]. Трипсин расщепляет белок VP₁ по связям Arg¹⁴⁵- и Lys¹⁶⁴- у вируса штамма О₁К. Таким образом, расщепление трипсином происходит в основном иммуногенном районе. При рассмотрении аминокислотных последовательностей этого района для нескольких штаммов разных серотипов (рисунок) возникает вопрос: почему в таком высоковариабельном районе белка существ.

O ₁ K	Tyr	Asn	Arg	Asn	Ala	Val	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Asp	Leu	Gln	Val	Leu	Ala	Gln	Lys	Val	Ala	Arg	Thr	Leu	Pro
O ₁ C	Tyr	Ser	Arg	Asn	Ala	Val	Pro	Asn	Val	Arg	Gly	Asp	Leu	Gln	Val	Leu	Ala	Gln	Lys	Val	Ala	Arg	Thr	Leu	Pro
C ₃ B	Tyr	Thr	Thr	Gly	Val	-	-	-	Arg	Arg	Gly	Asp	Leu	Ala	His	Leu	Ala	Ala	Ala	His	Ala	Arg	His	Leu	Pro
C ₁ O _{bb}	Tyr	Thr	Ala	Ser	Thr	-	-	-	-	Arg	Gly	Asp	Leu	Ala	His	Leu	Thr	Ala	Thr	Arg	Ala	Gly	His	Leu	Pro
A ₅ Ww	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gly	Pro	-	-	Arg	Arg	Gly	Asp	Met	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala	Ala	Lys	Gln	Leu	Pro
A ₂₂	Tyr	Ser	Ala	Gly	Gly	Met	Gly	-	Arg	Arg	Gly	Asp	Leu	Glu	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Val	Ala	Ala	Gln	Leu	Pro

Аминокислотная последовательность варибельного района 136—160 6 штаммов из трех серотипов вируса ящура А, О, С [3—8]. Прочерк обозначает делецию. Консервативные для всех трех серотипов аминокислоты выделены в рамку

вует сильноконсервативная последовательность Arg-Gly-Asp? Это характерно для всех известных к настоящему времени штаммов вируса ящура, исключение составляет штамм А₁₀, для которого была определена последовательность этого участка: Arg-Ser-Gly-Asp [15]. Возможны два объяснения такой консервативности: 1) этот участок не расположен на поверхности вирусной частицы и, таким образом, недоступен для молекул антител; 2) этот участок принципиально важен для вируса. Он может моделировать естественный лиганд, иммунологический ответ на который запрещен в организме. Первое объяснение представляется маловероятным, поскольку антитела, полученные на пептиды, включающие эту последовательность, связываются с нативной вирусной частицей. Кроме того, работы по рентгеноструктурному анализу рино- и полиовирусов указывают на то, что гомологичный район этих вирусов является экспонированным и представляет собой выступающую над поверхностью вируса петлю [16, 17]. Второе объяснение кажется более вероятным, особенно после того, как была установлена универсальная последовательность Arg-Gly-Asp, участвующая в связывании ряда экстрацеллюлярных белков с клеточными рецепторами [18, 19] и играющая ключевую роль в адгезии клеток.

Для доказательства того, что вирус ящура использует последовательность Arg-Gly-Asp для прикрепления к клеточному рецептору, мы использовали синтетические пептиды, несущие указанную последовательность, в прямой реакции нейтрализации с целью подавления роста вируса в культуре ткани (таблица). Как видно из таблицы, пептиды, содержащие последовательность Arg-Gly-Asp, полностью ингибируют адсорбцию вируса на клетках при конечных концентрациях 30 мкг/мл и выше. При этом пептиды последовательности VP₁ штамма O₁K одинаково ингибировали адсорбцию как гомологичного вируса O₁K, так и

Ингибирование ящурной инфекции *in vitro* синтетическими пептидами *

Синтетические пептиды (номера последовательности)	Защита клеточного монослоя (минимальная эффективная концентрация, мкг/мл) **
Val-Pro-Asn-Leu-Arg-Gly-Asp-Leu-Gln-Val-Leu-Ala (141—152 O ₁ K)	+ (31,5)
Arg-Gly-Asp-Leu-Gln-Val-Leu-Ala (145—152 O ₁ K)	+ (62)
Tyr-Ser-Ala-Gly-Gly-Met-Gly-Arg-Arg-Gly-Asp-Leu- Glu-Pro (136—149 A ₂₂)	+ (31,5)
Leu-Leu-Val-Arg-Met-Lys-Arg-Ala-Glu-Leu (175—184 A ₂₂)	—
Pro-Asn-Gly-Ala-Pro-Glu-Ala-Ala-Leu (90—99 A ₂₂)	—

* (4—6) · 10⁵ первичных клеток почки свиньи в объеме 2 мл 0,5% гидролизата лактальбумина с 10% сывороткой крупного рогатого скота выращивали 3 сут в пенициллиновых флаконах. Клетки отмывали от сыворотки 0,5% гидролизатом лактальбумина и оставляли в нем на 24 ч, затем его сливали и добавляли раствор пептида в объеме 2 мл в 0,5% гидролизате лактальбумина (двукратные разведения, начиная с концентрации 1 мг/мл). Выдерживали 2 ч при 37° С. Затем, не отмывая, добавляли по 100—200 ТЦД₅₀ (ТЦД — тканевая цитопатическая доза) вируса в объеме 1 мл. Реакцию учитывали через 48 ч по гибели монослоя.

** (+) — полное отсутствие гибели монослоя; (—) — гибель монослоя через 48 ч.

вируса другого серотипа — А₂₂. То же справедливо и для пептида с последовательностью VP₁ белка штамма А₂₂. Контрольные пептиды последовательности 175—184 и 90—99 из консервативной области VP₁ белка не вызывали ингибирования адсорбции вируса во всем исследуемом диапазоне концентраций.

Вирус полиомиелита не содержит последовательности Arg-Gly-Asp, поэтому для контроля неспецифического подавления роста вирусов были проведены аналогичные эксперименты с вирусом полиомиелита. В этом случае рост вируса не подавлялся — цитопатическое действие вируса сохранялось при всех апробированных концентрациях (30—1000 мкг/мл).

Таким образом, мы предполагаем, что район Arg-Gly-Asp является специфическим участком на поверхности вируса ящура, ответственным за адсорбцию вируса на клетках хозяина. Этот участок, находясь в гипервариабельном районе, консервативен у нескольких известных серотипов вируса ящура. Это согласуется с данными по конкурентной адсорбции разных серотипов ящура. Показано, что по крайней мере шесть из семи серотипов используют общий клеточный рецептор [20], который отличается от рецепторов для вирусов полиомиелита и энцефаломиокардита. Пока непонятно, является ли указанная последовательность единственным участком связывания вируса с клеточным рецептором, или при адсорбции вируса осуществляются множественные контакты. При рентгеноструктурном анализе полио- и риновирусов было удивительным обнаружение системы глубоких каньонов (25 Å), окружающих все 12 вершин вирусного икосаэдра. Это позволило авторам постулировать, что дно каньона служит участком связывания вируса с клеточным рецептором [18]. Прямых доказательств этому пока нет. Тем не менее не исключено, что последовательность Arg-Gly-Asp у вируса ящура участвует лишь в первичном узнавании вирусом клетки-мишени. Возможно, вирус ящура использует один из большого числа клеточных рецепторов, известных под названием интегринов [21]. Это целое семейство гликопротеидов, распознающих ряд экстрацеллюлярных белков и участвующих в клеточном распознавании. Такая универсальность этого участка, возможно, объясняет тот факт, что вирус ящура легко адаптируется на разных типах клеток. Вопрос о специфичности рецептора, используемого вирусом ящура, неясен. Специфичность рецепторов-интегринов, несмотря на то что они распознают одинаковую первичную структуру, различна [18]. Вероятно, это связано с различной вторичной структурой участка Arg-Gly-Asp у разных белков. Эти вопросы, а также данные по связыванию синтетических пептидов с солюбилизованными препаратами клеточных мембран и результаты титрования вируса ящура после его инкубации с клетками в среде с синтетическими пептидами будут рассмотрены отдельно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Laporte J., Grosclaude J., Wantyghem J., Bernard S., Rouze P. // C. r. Acad. sci. 1973. V. 276. P. 3399—3401.
2. Bachrach H. L., Moore D. M., McKercher P. D., Polatnick J. // J. Immunol. 1975. V. 115. № 6. P. 1636—1641.
3. Kurz C., Forss S., Kupper H., Strohmaier K., Schaller H. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 8. P. 1919—1931.
4. Cheung A., DeLamarter J., Weiss S., Kupper H. // J. Virol. 1983. V. 48. № 2. P. 451—459.
5. Beck E., Strohmaier K. // J. Virol. 1987. V. 61. № 5. P. 1621—1629.
6. Robertson B. H., Grubman M. J., Weddell G. N., Moore D. M., Welsh D., Fischer T., Dowbenko D. J., Jansura D. G., Small B., Kleid D. C. // J. Virol. 1985. V. 54. № 3. P. 651—660.
7. Beck E., Forss S., Strebel K., Cattaneo R., Feil G. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 22. P. 7873—7885.
8. Онищенко А. М., Петров Н. А., Блинов В. М., Василенко С. К., Сандахицев Л. С., Бурдов А. Н., Ивановцев В. Н., Перевозчикова Н. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 416—419.
9. Bachrach H. L., Morgan D. O., McKercher P. D., Moore D. M., Robertson B. H. // Vet. Microbiol. 1982. V. 7. P. 85—96.
10. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnic T. M., Sutcliffe J. C., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. // Nature. 1982. V. 298. № 5869. P. 30—33.

11. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. O., Schulz G. E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869—874.
12. Суровой А. Ю., Волпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1132—1135.
13. Cavanach D., Sangar D. V., Rowlands D. J., Brown F. // J. Gen. Virol. 1977. V. 35. № 1. P. 149—158.
14. Wild T. F., Brown F. // J. Gen. Virol. 1967. V. 1. P. 247—250.
15. Carroll A. R., Rowlands D. J., Clarke B. E. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 5. P. 2461—2472.
16. Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 19. P. 5985—5988.
17. Ruoslahti E., Pierschbacher M. D. // Cell. 1986. V. 44. № 4. P. 517—518.
18. Rossman M. G., Arnold E., Erickson J. W., Frankenberger E. A., Griffith J. P., Hecht H. J., Johnson J. E., Kamer G., Luo M., Mosser A. G., Rueckert R. R., Sherry B., Vriend G. // Nature. 1985. V. 317. № 6033. P. 145—153.
19. Hogle J. M., Chow M., Filman D. J. // Science. 1985. V. 229. № 4719. P. 1358—1365.
20. Sekiguchi K., Franke A. J., Baxt B. // Arch. Virol. 1982. V. 74. P. 53—64.
21. Hynes R. O. // Cell. 1987. V. 48. № 4. P. 549—554.

Поступило в редакцию
5.II.1988

IS THE Arg-Gly-Asp SEQUENCE INVOLVED IN BINDING OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS WITH CELL RECEPTOR?

SUROVOY A. Yu., IVANOV V. T., CHEPURKIN A. V.*,
IVANYUSHCHENKOV V. N.*, DRYAGALIN N. N.*.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow; * All-Union
Foot-and-Mouth Disease Research Institute, Vladimir*

The Arg-Gly-Asp sequence is being found in an increasing wide range of proteins with «adhesive» function. Studying a series of synthetic peptide fragments of VP₁ protein of FMDV, we showed that peptides containing the Arg-Gly-Asp sequence, but not control peptides, inhibited FMDV binding to pig kidney cells in vitro, thus indicating participation of that sequence in FMDV binding to host cells.