

# ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ КАПСИДНЫХ БЕЛКОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЭНТЕРОВИРУСНОГО МИОКАРДИТА

*К.Л. Дедюля, Н.В. Поклонская, Т.В. Амвросьева, А.А. Безручко, З.Ф. Богуш,  
О.Н.Казинец*

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат.

Ключевые слова: энтеровирусы (ЭВ), энтеровирусная инфекция сердца (ЭВИС), рекомбинантный полипептид.

Два штамма ЭВ (ЕСНО 6 и ЕСНО 30), выделенных от больных миокардитом, были использованы для идентификации уникальных нуклеотидных и аминокислотных замен, влияющих на кардиовирулентность. Последовательность капсид-кодирующего региона Р1 генома исследуемых кардиовирулентных штаммов ЭВ сравнивался с аналогичным регионом некардиовирулентных штаммов и прототипных штаммов ЕСНО 30 Bastianni и ЕСНО 6 Charles. Установлено, что ген VP1 кардиовирулентного штамма ЕСНО 30 содержал 2 уникальных нуклеотидных замены, а гены VP1 и VP3 кардиовирулентного штамма ЕСНО 6 содержали соответственно 2 и 3 уникальных нуклеотидных замен, приводящие к замене аминокислот. Данные аминокислотные замены могут лежать в основе расширения спектра рецепторных взаимодействий вирусов и повышения их кардиовирулентного потенциала.

Введение

Энтеровирусы (ЭВ) относятся к семейству Picornaviridae, роду Enterovirus, и представляют собой мелкие, безоболочечные, икосаэдральные вирусы с РНК-геномом позитивной полярности, длиной около 7500 нуклеотидных оснований (н.о.). ЭВ являются возбудителями широкого спектра заболеваний, включающих такие известные клинические формы как герпангина, энцефалит, асептический менингит, эпидемическая миалгия, а также менее распространенные и изученные инфекции, поражающие сердце (перикардиты и миокардиты) и поджелудочную железу (панкреатит, диабет) [1, 3].

Исходя из накопленных к настоящему времени литературных данных зарубежных исследователей, наиболее распространенными возбудителями энтеровирусных миокардитов признаются вирусы группы Коксаки В, реже – Коксаки А и еще реже – ЕСНО [2,3]. Чаще всего данная патология сердца регистрируется в условиях вспышечной заболеваемости, этиология которой связана с появлением нового для человеческой популяции генотипа ЭВ, обладающего выраженными вирулентными свойствами с кардиопатогенным потенциалом [4]. Именно такая ситуация в 2003 г. имела место в г. Минске, где произошла крупная вспышка энтеровирусной инфекции (ЭВИ), характерной особенностью которой был высокий уровень больных с поражением сердца. Так, среди регистрируемого многообразия клинических форм вспышечной энтеровирусной заболеваемости доля кардитов, как в изолированном, так и в сочетанном вариантах составила 10,3 % [4]. Этиологическими агентами данной вспышки были вирусы ЕСНО 30, ЕСНО 6 и Коксаки В5. Заслуживает внимания

тот факт, что, несмотря на циркуляцию в этот период вируса Коксаки В5, он не был выделен ни от одного пациента с миокардитом. Все изоляты ЭВ, полученные от таких больных, принадлежали к серотипу ЕСНО 30. Следует отметить, что крупная вспышка, вызванная вирусом ЕСНО 30, ранее (в 1997 г.) была зарегистрирована в г. Гомеле. Однако в спектре наблюдавшихся во время данной вспышки клинических форм ЭВИ, поражения сердца не наблюдались. Вирусы ЕСНО 6 достаточно часто выделялись на территории Республики Беларусь от больных различными формами ЭВИ как во время вспышек, так и на фоне sporadicческой заболеваемости и ее сезонных подъемов в 2003-2008 гг. В 2004 г. изолят этого серотипа был выделен от больного энтеровирусным миокардитом.

Проведенный нами ранее филогенетический анализ изолятов ЕСНО 30 и ЕСНО 6 показал, что вирусы ЕСНО 30, вызвавшие вспышки в 1997 и 2003 годах принадлежали к различным генетическим субтипам, тогда как вирус ЕСНО 6, выделенный от больного миокардитом в 2004 г. принадлежал к тому же генетическому субтипу, который циркулировал во время вспышки в 2003 г., а также позднее вплоть до 2007 г. [4].

В связи с тем, что результаты проведенного филогенетического анализа не позволили выявить существенных различий между энтеровирусными изолятами, выделенными от больных миокардитом, в сравнении с вирусами тех же серотипов, выделенными от больных другими формами ЭВИ (менингитами, герпангинами, и др.), возникла необходимость в осуществлении более детального изучения их гено- и фенотипических характеристик.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы было установление различий в аминокислотном составе капсидных белков вирусов, являвшихся возбудителями энтеровирусных миокардитов, которые могли бы влиять на формирование кардиовирулентных свойств энтеровирусных агентов.

По современным представлениям в основе проявления кардиовирулентных свойств вирусов Коксаки В лежит их способность взаимодействовать с так называемым Коксаки-аденовирусным рецептором (КАР), экспрессирующимся на поверхности кардиомиоцитов [11, 15]. Известно также, что вирусы ЕСНО 30 и ЕСНО 6 используют для этих целей другой клеточный рецептор, названный «фактором, ускоряющим распад» (ФАР) [11]. Исходя из этого, логично предположить, что важным событием, детерминирующим проявление кардиовирулентных свойств у вирусов ЕСНО 30 и ЕСНО 6, является изменение структуры их рецептор-связывающих регионов, позволяющее использовать альтернативные рецепторы - молекулы, экспрессирующиеся на поверхности клеток сердца. Поэтому основным объектом в наших исследованиях был выбран капсид-кодирующий регион генома исследуемых вирусов ЕСНО 30 и ЕСНО 6. Основные усилия были направлены на обнаружение уникальных несинонимичных нуклеотидных замен в геномах возбудителей энтеровирусных миокардитов, локализованных в функционально-активных регионах структурных белков.

Материалы и методы исследования

Вирусные штаммы. В работе проанализированы четыре вирусных штамма, депонированных в музей вирусов РНПЦ «Эпидемиологии и микробиологии» МЗ

РБ: ЕСНО 30 (E30-F1260/2003), выделенный от больного миокардитом, ЕСНО 30 (E30-W19016/1997) выделенный из водопроводной воды, ЕСНО 6 E6-F3094/2004), выделенный от больного миокардитом, и ЕСНО 6 (E6-L2341/2003), выделенный от больного серозным менингитом.

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР регионов, кодирующих капсидные белки ЭВ. Выделение РНК вирусов ЕСНО 30 и ЕСНО 6 осуществляли с использованием набора «РИБО-Сорб» («АмплиСенс»). Полученная РНК была обратно транскрибирована при помощи набора «RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase» (Fermentas), а затем амплифицирована с праймерами VP2F (5'-GCCCTGAATGCGGCTAATC-3'), VP2R1 (5'-ACTGAGTCAACCTCAGCTATTTCCAT-3'), VP2R2 (5'-ACAGAATCAACTTCCGCAATCTCCAT-3'), VP4VP2F (5'-CAAAATGGGAGCACAGGTGTC-3'), VP4VP2R (5'-TCATGRYTGNAGTCCTTGGTGTCC-3'), VP3F1 (5'-TCACAGTGGCCCAATGDRYGCHGARTAYAA YGG-3'), VP3R1 (5'-ACCTGCGAGGTATGICCNNGTYTCSSCWGCWGTNA - 3'), HEVBS1695 (5'-STTGTGCTTTGTGTCGGCRTGYAAAYGAYTTYTCWG-3') и HEVBR132 (5'-GGTGCTCACTAGGAGGTCYCTRTTRTARTCYTCCCA-3'). Амплификацию проводили с температурой отжига, индивидуально подобранной для каждой пары праймеров. Результаты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле после окрашивания бромистым этидием (10мкг/мл). Фрагменты ДНК, соответствующие регионам VP4/VP2 (1440 п.о. и 1010 п.о.), VP1 (1118 п.о.), VP3 (895 п.о.) вырезали из агарозного геля и очищали при помощи набора «GenElute Gel Extraction Kit» (Sigma). Секвенирование участков ДНК проводили с использованием коммерческого набора «GenomeLab DTCS Quick Start Kit» (Beckman Coulter). Электрофорез и анализ продуктов реакции проводили на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе Beckman Coulter «SEQ 8000». Анализ результатов секвенирования проводили с использованием модуля анализа нуклеотидных последовательностей, входящих в программный продукт «SEQ 8000» (Beckman Coulter). Полученные нуклеотидные последовательности (прямую и обратную) для каждой исследуемой пробы выравнивали друг относительно друга для удаления неясных оснований и получения консенсусных последовательностей, использовавшихся для дальнейшей работы.

Компьютерное моделирование молекул вирусных белков. Для получения схематической компьютерной модели аминокислотные последовательности исследуемых белков были обработаны в онлайн-программах «The SWISS-MODEL Workspace» и «RayMOL 0.9» [9,14].

Результаты и их обсуждение

С целью поиска и локализации уникальных аминокислотных замен в функционально-значимых для определения кардиовирулентности регионах капсидных белков вирусов ЕСНО 30 и ЕСНО 6, выделенных от больных миокардитом, был осуществлен сравнительный генетический анализ по каждому из четырех генов, кодирующих капсидные белки. Для этого было проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов и прототипных штаммов вирусов (ЕСНО 30 – Bastianni, ЕСНО 6 – Charles). Затем

нуклеотидные последовательности были транслированы в аминокислотные, которые также были выровнены относительно друг друга и прототипных штаммов.

Анализ нуклеотидных последовательностей показал наличие целого ряда уникальных нуклеотидных замен, которые были свойственны только штаммам ЕСНО 30 и ЕСНО 6, выделенных от больных миокардитом. Часть нуклеотидных замен была несинонимична и приводила к замене аминокислот в белках вирусного капсида (таблица 1).

Таблица 1 – Количество синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен в белок-кодирующих генах ЭВ, выделенных от больных миокардитом

Вирусный штамм	Количество синонимичных/несинонимичных нуклеотидных замен			
	VP1	VP2	VP3	VP4
ЕСНО 30 E30-F1260/2003	141/3	103/1	108/2	34/1
ЕСНО 6 E6-F3094/2004	198/5	176/9	157/0	34/0

Так, у штамма ЕСНО 30 (E30-F1260/2003) в белке VP1 были обнаружены 3 аминокислотные замены (82Glu→82Asp, 120Ile→120Val, 287Asn→287Ser), в белке VP3 – две (97His→97Arg, 183Ala→183Val), и по одной замене – в белках VP2 (45His→45Arg) и VP4 (18Ser→18Asn). У вируса ЕСНО 6 (E6-F3094/2004) в белке VP1 было локализовано 5 аминокислотных замен (8Glu→Asp, 155His→Arg, 276Thr→Ser, 281Thr→281Ser и 288Thr→288Asn), в белке VP2 – 9 (8Gly→8Cys, 10Ser→10Arg, 45Asp→45Gly, 50Glu→50Gly, 74Glu→74Gly, 113Asn→113Asp, 136Thr→136Lys, 165Gly→165Asp и 250Ala→250Val). В белках VP3 и VP4 аминокислотных замен выявлено не было.

Для определения роли обнаруженных аминокислотных замен в формировании кардиовирулентного фенотипа вирусов ЕСНО 30 (E30-F1260/2003) и ЕСНО 6 (E6-F3094/2004), был проведено выявление уникальных аминокислотных замен в рецептор-связывающих и антигенных сайтах, а также поиск возможных совпадений их локализации уже с установленными детерминантами кардиовирулентности у других серотипов ЭВ.

Результаты анализа показали, что уникальные аминокислотные замены в белках VP2, VP3 и VP4 вируса ЕСНО 30 (E30-F1260/2003) были локализованы вне антигенных и рецептор-связывающих сайтов и не были идентифицированы ранее в качестве детерминант кардиовирулентности. Они располагались в регионах, которые пространственно были удалены от поверхности вириона, либо находились в местах, где замена не играет существенной роли в процессе взаимодействия рецептора и вируса, или существенно не влияет на конформацию белковой молекулы и антигенных эпитопов.

Как известно, основным капсидным белком ЭВ является белок VP1, который вместе с белками VP3 и VP2, формирует рецептор-связывающие сайты на поверхности вириона и содержит основные антигенные детерминанты. По данным зарубежных исследователей, замена аминокислот в этих участках VP1, может приводить к изменению кардиовирулентных свойств вируса [6,8].

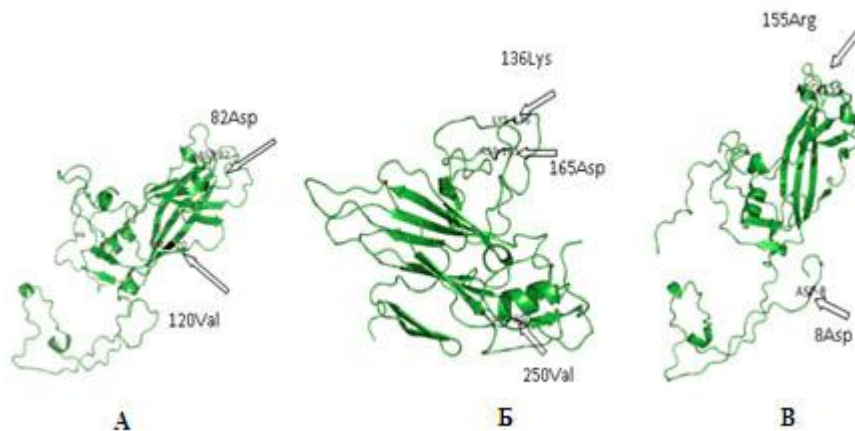
Результаты проведенного нами анализа аминокислотной последовательности белка VP1 вирусного штамма ЕСНО 30 (E30-F1260/2003), полученного от больного миокардитом, дают основания полагать, что 2 из четырех замен могут выступать в роли потенциальных кардиопатогенных детерминант. Так, аминокислотная замена 82Glu→82Asp располагается в ВС–петле, которая выходит на поверхность вирусного капсида и содержит в себе многочисленные сайты связывания антител, а также участвует в вирус-рецепторном взаимодействии (Рис. 1 А) [11]. Замена 120Ile→120Val расположена в DE–петле β-баррели VP1, которая в случае полиовируса 2 типа содержит детерминанту аттенуации и влияет на антигенность и спектр хозяев этого вируса [12]. Кроме этого, в DE–петле вируса находится иммунодоминантный конформационный эпитоп для В-клеток, аминокислотные замены в котором по литературным данным могут влиять на патогенность штаммов ЭВ, вызывающих панкреатиты и гипогликемию [5, 8].

У вируса ЕСНО 6 (E6-F3094/2004), выделенного от больного миокардитом, обнаружены 2 аминокислотные замены в белке VP1 (всего этот штамм содержал 5 уникальных замен в данном белке), которые расположены в функционально-значимых регионах капсидного белка и могут влиять на кардиовирулентность (Рис.1 Б).

Замена 8Glu→8Asp расположена в N-концевом регионе VP1 рядом с высококонсервативным участком IPALTA, который формирует кончик т.н. «внутрикапсидного крюка» [10] и является иммунодоминантным регионом ЭВ. Антитела к участку в 20 аминокислот, содержащему мотив IPALTA, обладают перекрестной реактивностью и способны взаимодействовать с широким спектром ЭВ. Согласно существующей модели взаимодействия ЭВ с клеткой, при связывании вируса с рецептором происходит экстернализация и контакт с клеточной мембраной N-концевой области пяти копий белка VP1, что приводит к формированию в мембране поры и проникновению вирусной РНК в клетку [6]. Замена аминокислот 155Gln→155Arg локализована в участке βE, в β-слое, который участвует в формировании т.н. рецептор-связывающего «каньона». Такая замена может приводить к изменению конформации белкового β-слоя на данном участке, соответственно, изменяя способность вируса к взаимодействию с рецептором.

Анализ девяти уникальных аминокислотных замен в белке VP2 вируса ЕСНО 6 (E6-F3094/2004) показал, что три из них также расположены в функционально-значимых регионах капсидного белка и могут оказывать действие на кардиовирулентность (Рис. 1 В).

Так, замены 136Thr → 136Lys и 165Gly → 165Asp расположены в EF–петле (127 – 189 аминокислоты), которая представляет собой высоковариабельный участок, выходящий на поверхность вириона [5,7].



А: модель белка VP1 штамма E30-F1260/2003; Б: модель белка VP2 штамма E6-F3094/2004; В: модель белка VP1 штамма E6-F3094/2004. Стрелками обозначена локализация аминокислотных замен.

Рисунок 1 – Компьютерные модели белков VP1 и VP2 вирусов ЕСНО 30 и ЕСНО 6, выделенных от больных миокардитом

Именно эта область взаимодействует с основным рецептором для вирусов ЕСНО – молекулой ФУР. Таким образом, изменения в структуре этого региона могут непосредственно влиять на спектр рецепторных взаимодействий и тропизм вируса. Влияние этого региона на кардиовирулентные свойства ЭВ ранее было установлено для вируса Коксаки В3: аминокислотные замены аспарагина на аспарат в положении 165, и лизина на аргинин в положении 158, приводили к снижению способность вируса индуцировать миокардиты у мышей [7, 9]. Еще одна уникальная замена (250Ala → 250Val), обнаруженная у исследуемого кардиовирулентного штамма ЕСНО 6, расположена в консервативной для всех ЭВ С-терминальной части VP2. Этот регион играет важную роль в расщеплении белка-предшественника VP0, состоящего из VP2 и VP4. Можно предположить, что замены аминокислот в этом регионе могут приводить к усилению или ослаблению кардиовирулентных свойств ЭВ.

**Заключение.**

В ходе проведенных исследований установлено, что штаммы вирусов ЕСНО 30 и ЕСНО 6, выделенные от больных миокардитом, имели уникальные несинонимичные замены в капсид-кодирующих генах. Оба штамма характеризовались наличием уникальных замен в рецептор-связывающем регионе основного капсидного белка VP1 (82Glu→82Asp – у штамма ЕСНО 30 и 155G1 →155Arg – у штамма ЕСНО 6). Кроме того, штамм ЕСНО 6 обладал 2-мя (136Thr → 136Lys, 165Gly → 165Asp) аминокислотными заменами в рецептор-связывающем регионе белка VP2, для которого ранее уже было доказано участие в формировании кардиовирулентного фенотипа [5, 7].

Полученные данные дают основания полагать, что обнаруженные изменения в аминокислотной структуре возбудителей энтеровирусных миокардитов могут лежать в основе расширения спектра рецепторных взаимодействий вирусов и повышения их кардиовирулентного потенциала.

**Литература**

1. Амвросьева, Т. В., Поклонская, Н. В. // В сб.: Теория и практика медицины. Выпуск 2. Минск, 2000. С. 10.
2. Бочаров, Е. Ф. // Вопросы ревматологии. 1980. № 3. С. 59–60.
3. Букринская, А. Г. Вирусология / А. Г. Букринская. М.: Медицина, 1986. С. 316–320.
4. Поклонская, Н. В. Индикация и генетические характеристики энтеровирусов у больных кардитами и кадиомиопатиями: диссертация на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.00.06 / Н. В. Поклонская. Минск, 2005. 126 с.
5. Knowlton, K. U. [et al.] // J. Virol. 1996. Vol. 70, № 11. P. 7811–7818.
6. Airaksinen, A., Roivanen, M., Hovi, T. // J. Virol. 2001. Vol. 75, № 2. P. 952–960.
7. Stadnick, E. [et al.] // J. Virol. 2004. Vol. 78, № 24. P. 13987–14002.
8. Caggana, M., Chan, P., Ramsingh, A. // J. Virol. 1993. Vol. 67, № 8. P. 4797–4803.
9. Gueh, N., Peitsch, M.C. // Electrophoresis. 1997. Vol. 18. P. 2714–2723.
10. Samuelson, A. [et al.] // Clinical and diagnostic laboratory immunology. 1994. Vol. 1, № 3. P. 336–341.
11. Orthopoulos, G., Triantafilou, K., Triantafilou, M. // J. Med. Virol. 2004. Vol. 74. P. 291–99.
12. Tam, P. E., Weber-Sanders, M. L. // J. Virol. 2003. Vol. 77, № 21. P. 11849–11854.
13. Tam, P. E. // J. Vir. Immunol. 2006. V. 19, № 2. P. 133–146.
14. Arnold, K. [et al.] // Bioinformatics. 2006. Vol. 22. P. 195–201.
15. Selinka, H. C. [et al.] // Med. Microbiol. Immunol. 2004. Vol. 193. P. 127–131.