

Пономарева Наталья Вячеславовна

**Исследование мембранодестабилизирующих свойств
гликопротеина NSP4 ротавирусов**

03.01.04. – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2010

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского» и ФГУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор
Новикова Надежда Алексеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор
Корягин Александр Сергеевич

доктор медицинских наук,
Лавровский Сергей Николаевич

Ведущая организация:

Нижегородская государственная медицинская академия

Защита состоится: «___»_____2010 г. в _____ час __ мин на заседании диссертационного совета Д. 212.166.15. при Нижегородском госуниверситете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ.

Автореферат разослан: «___»_____2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

С.В. Копылова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Гликопротеин NSP4 ротавируса обладает свойствами энтеротоксина и играет ведущую роль в патогенезе ротавирусной инфекции, которая обуславливает до 70% случаев госпитализаций детей с острой кишечной инфекцией в возрасте до 5 лет и является частой причиной смертности детей в развивающихся странах [Glass R.I., 2005]. Энтеротоксин NSP4 имеет молекулярную массу 20,2 кДа и представляет продукт трансляции 10 сегмента днРНК генома ротавируса [Estes M.K., Cohen J., 1989].

Ротавирусы характеризуются широким антигенным и генетическим разнообразием. У ротавирусов группы А человека и животных установлено существование 14 G-серотипов (детерминирован гликопротеином VP7) и 27 P-генотипов (детерминирован протеазочувствительным белком VP4) [Khamrin P. et al., 2007]. Полиморфизм по гену NSP4 отражает существование 11-ти генотипов NSP4 ротавирусов человека и животных [Matthijssens J. et al., 2008]. Изучение генетического разнообразия NSP4 представляет важную и актуальную задачу – в плане расширения информации о спектре NSP4-генотипов, циркулирующих на территории России и современной классификации ротавирусов, основанной на свойствах каждого геномного сегмента.

NSP4 влияет на жизненноважные процессы, протекающие в инфицированных клетках кишечника: дезорганизует микроструктуру цитоскелета энтероцитов, ингибирует транспорт клеточных белков, аминокислот и дисахаридаз, нарушает ионный баланс в клетках кишечника посредством повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция, что приводит к нарушению ресорбции воды энтероцитами и, как следствие, к диарее. Высвобождение ионов кальция из внутриклеточных хранилищ (ЭПР) объясняется разрушением их мембран в результате мембранодестабилизирующей активности ротавирусного энтеротоксина [Tian P. et al., 1996]. Но и на сегодняшний день до конца не ясны молекулярные основы вирулентности ротавирусов, не существует четких представлений о механизме развития патогенеза ротавирусной инфекции в целом и роли в нем энтеротоксина NSP4. Исследование биологической активности функционально значимых участков белковой молекулы NSP4 ротавирусов разных генотипов в модельной бактериальной

векторной системе может внести новые аспекты в изучение влияния биологических особенностей NSP4 на выраженность проявлений ротавирусной инфекции и способствовать разработке альтернативных ротавирусных вакцин на основе NSP4. Поэтому изучению биохимических и молекулярно-биологических свойств данного белка и кодирующего гена является чрезвычайно важной и актуальной задачей.

Цель исследования: исследование мембранодестабилизирующих свойств гликопротеина NSP4 ротавирусов группы А различных антигенных типов и NSP4-генотипов.

Задачи исследования:

1. Оптимизировать метод ОТ-ПЦР для амплификации полноразмерной последовательности и открытой рамки считывания гена NSP4 ротавируса группы А.
2. Установить нуклеотидные последовательности гена NSP4 российских изолятов ротавирусов разных G[P]-типов и определить их NSP4 генотипы.
3. Изучить генетические взаимосвязи исследуемых изолятов ротавируса с ротавирусами группы А человека, выделенными на разных территориях земного шара, и ротавирусами животных.
4. Охарактеризовать мембранодестабилизирующую активность NSP4 разных генотипов в модельной бактериальной векторной системе на основе способности ротавирусного энтеротоксина лизировать мембраны клеток *Escherichia coli*.
5. Провести сравнительный анализ аминокислотной последовательности NSP4, установить наличие/отсутствие взаимосвязи аминокислотных замен в функционально-активных консервативных и переменных регионах белковой молекулы с мембранодестабилизирующей активностью NSP4 разных генотипов.

Научная новизна и практическая значимость работы:

Подобраны и апробированы праймеры для универсальной амплификации гена NSP4 ротавирусов группы А разных генотипов, что может быть использовано при разработке тест-систем на основе ПЦР для диагностики ротавирусного гастроэнтерита. Разработанная методика амплификации гена NSP4 применяется при проведении НИР по изучению штаммов ротавирусов.

Впервые установлена первичная структура гена NSP4 15-ти российских изолятов ротавируса с доминирующими антигенными типами. Нуклеотидные последовательности NSP4 данных изолятов ротавируса депонированы в GenBank под

номерами DQ270104 - DQ270118, что расширяет международную базу данных последовательностей генома ротавирусов.

Определены генотипы энтеротоксина NSP4 новых российских изолятов ротавирусов группы А: NSP4-А (Е2), -В(Е1) и С (Е3). Показано доминирование изолятов ротавируса, характеризующихся генотипом NSP4-В (Е1).

Впервые установлены филогенетические связи по гену NSP4 ротавируса G1P[8] типа со штаммами, выделенными на территории Скандинавских стран, а G3P[8] и G3P[9] типов со штаммами из стран Юго-Восточной Азии. Установлено, что ротавирусы генотипов G1, G3, G4 и P[8] типа по гену NSP4 фиогенетически родственны ротавирусам свиней; G3P[6], G3P[9] и G2P[4] типов – ротавирусам крупного рогатого скота, G3P[9] типа – ротавирусам кошек.

Эти результаты дополняют представления о распространении штаммов ротавируса на разных территориях земного шара и свидетельствуют об эволюционных связях между ротавирусами животных и человека, подчеркивая необходимость их одновременного мониторинга.

На основе вектора pET22b+ создано три авторских генетических конструкции (pET22b-G3P[9]-NSP4-С, pET22b-G1P[8]-2-NSP4-В, pET22b-G9P[6]-NSP4-А), экспрессирующие в клетках *Escherichia coli* энтеротоксин NSP4 разных генотипов.

Впервые проведен сравнительный анализ мембранодестабилизирующей активности NSP4 штаммов ротавирусов разных G[P]-типов, выделенных от детей с гастроэнтеритом (G1P[8], G3P[9]) и бессимптомной формой инфекции (G9P[6]).

Впервые в сравнительном плане охарактеризованы аминокислотные последовательности NSP4 российских изолятов ротавирусов с разной выраженностью клинических проявлений инфекции. Полученные в ходе настоящего исследования результаты имеют значение для разработки альтернативной ротавирусной вакцины.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработана методика синтеза и амплификации кДНК полноразмерной последовательности и открытой рамки считывания гена энтеротоксина NSP4, позволившая охарактеризовать NSP4-генотипы ротавирусов группы А, актуальных для территорий России. Спектр NSP4 генотипов ротавируса представлен тремя генотипами – А (Е2), В (Е1) и С (Е3).

2. Ротавирус G1P[8] типа, циркулирующий на территории Н.Новгорода, проявляет филогенетическое родство по гену NSP4 со штаммами из Скандинавских стран, а G3P[8,9] типа со штаммами из стран Юго-Восточной Азии. Ротавирусы G1, G3, G4 и P[8] типов генетически родственны ротавирусам свиней, G3P[6,9] и G2P[4] типов – ротавирусам крупного рогатого скота, G3P[9] типа – ротавирусам кошек.

3. Создано три генетические конструкции (pET22b-G3P[9]-NSP4-C, pET22b-G1P[8]-2-NSP4-B, pET22b-G9P[6]-NSP4-A), экспрессирующие в клетках E.coli энтеротоксин NSP4 генотипов А, В и С. Экспрессия сопровождается торможением экспоненциального роста культуры E.coli, что свидетельствует о сходных мембранодестабилизирующих свойствах ротавирусов разных NSP4-генотипов

4. Ротавирусы, обнаруженные у детей с диареей и бессимптомной формой инфекции, не имеют значимых аминокислотных замен в важных для проявления энтеротоксических свойств доменах NSP4.

Апробация работы:

Основные положения диссертации доложены и обсуждены:

- на VII Нижегородской сессии молодых ученых (г. Н. Новгород, 2009 г.);
- на заседаниях Ученого Совета Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной и проблемных научно-практических семинарах института.
- на юбилейной Всероссийской научно-практической конференции «Научное обеспечение противозидемической защиты населения», посвященной 90-летию ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора и 20-летию Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД (г. Н. Новгород, 2009 г.);
- диссертация апробирована на заседании кафедры молекулярной биологии и иммунологии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (02 февраля 2010 г.).

Объем и структура диссертации:

Материалы диссертации изложены на 116 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и указателя литературы, включающего 152 источника литературы отечественных и зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками и 10 таблицами.

По результатам диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Работа поддержана грантом Н204 в рамках программы «Развитие научного потенциала высшей школы», 2005 г.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовали:

- ротавируссодержащие образцы фекалий детей, госпитализированных в инфекционные стационары г. Нижнего Новгорода в период 1992-2004 гг. и Городской клинический перинатальный центр г. Омска в период 2002-04 гг.; штамм ротавируса SA11. Всего исследовано 30 проб.
- нуклеотидные последовательности геномных кДНК ротавирусов, собранных в базе данных GenBank /EMBL/ DDBJ [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>]. Всего использовано 75 последовательностей.
- бактериальные штаммы: E.coli Top 10 F⁺; E.coli BL21gold (DE3); E.coli BL21gold (DE3) codon plus (любезно предоставлены Институтом Вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва).
- питательные среды: LB, 2xYT, SOC
- компьютерные программы «Oligo 4,0», 1989-91 (США); «GeneDoc, версия 2.5.000», 1997 (США), «MegAline», «ClustalW» » из набора программ MEGA v.3.1, BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>].

Экстракцию РНК ротавируса и её электрофоретипирование методом электрофореза в ПААГ осуществляли, как описано [Новикова Н.А., Епифанова Н.В., 1994]. РНК ротавирусов для постановки ОТ-ПЦР выделяли методом высокосолевого очищения (патент №2313792) и с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб» производства ФГУН ЦНИИЭ (Москва), согласно инструкции по применению. Олигонуклеотидные праймеры для постановки ОТ-ПЦР синтезировали в фирме «Литех», Москва. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-боратной буферной системе.

Филогенетический анализ и построение дендрограмм осуществляли по алгоритму Neighbor-joining в двухпараметрической модели Kimura-2 в программе

MEGA v.3.1. Достоверность топологии филограмм оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореплик [Kumar S. et al., 2004].

Экстракцию ДНК из 1%-го агарозного геля проводили с использованием набора реагентов «РИБО-сорб» производства ФГУН ЦНИИЭ (Москва), согласно инструкции производителя.

Определение нуклеотидной последовательности гена NSP4 осуществляли с использованием праймеров: NSP4R и NSP4F, набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1, в автоматическом режиме на приборе ABI Prism Avant 3130, согласно рекомендациям производителя. Работа проведена на базе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН в совместной работе с к.б.н. Д.В. Новиковым. и д.б.н. Г.А. Прилиповым.

Выделение плазмидной ДНК из клеток E.coli осуществляли с использованием набора реагентов «Miniprep Kit» (США, 1997) согласно инструкции производителя.

Компетентные клетки E.coli трансформировали в электропораторе BioRad (США) согласно инструкции производителя. Экспрессию белка индуцировали 1 мМ ИПТГ.

Детекцию NSP4, экстрагированного из культуры клеток E.coli, проводили методом электрофореза в ПААГ с использованием буферных растворов Лэммли [Laemmli U.K., 1970].

Результаты и их обсуждения

Оптимизация методики ОТ-ПЦР для амплификации полноразмерной последовательности гена NSP4 ротавируса группы А. Последовательность NSP4 кодируется 10-м геномным сегментом днРНК, имеющим у ротавирусов группы А размер 754 н.о. Синтез кДНК гена NSP4 и определение ее нуклеотидной последовательности обеспечивают базис для изучения variability гена NSP4 и энтеротоксических свойств белковой молекулы в целом и ее отдельных доменов. К началу наших исследований в научной зарубежной литературе были представлены праймеры для амплификации полноразмерной последовательности гена NSP4, подобранные более 10 лет назад [Zhang M, Zeng C.Q.-Y., Dong Y., 1998]. Расширение информации о последовательностях гена NSP4, и variability генома ротавирусов

послужили основанием для модификации праймеров с целью их адаптации к современным штаммам ротавирусов.

На первом этапе работы с использованием программы Mega 3.1. проведен сравнительный анализ 27 полных нуклеотидных последовательностей гена NSP4 разных генотипов, представленных в GenBank/EMBL/DDBJ к настоящему времени, по результатам которого сконструированы собственные версии праймеров для амплификации полноразмерной последовательности гена NSP4: NSP4-F 1-[5'-ggCTTTTAAAAGTTCTgT-3']-18 н.о., NSP4-R 729-[5'-ggTCACRYTAAgACCR TTCCTTC-3']-752 н.о. Регион 5'-конца, соответствующий области прямого праймера, предложенного Zhang M. с соавт., не имеет нуклеотидных замен, поэтому мы сократили его последовательность до 18 н.о. Регион 3'-конца, соответствующий обратному праймеру, предложенному Zhang M. с соавт., характеризуется вариабельностью нуклеотидов. С целью повышения специфичности обратного праймера мы модифицировали его путем введения вырожденных оснований (R – A/G; Y – C или T/U) и увеличением последовательности до 23 н.о. Модифицированные праймеры фланкируют участок гена NSP4 размером 752 н.о., что соответствует полноразмерной кДНК 10-го сегмента генома ротавирусов.

Для эффективной амплификации кДНК гена NSP4 были оптимизированы условия постановки ПЦР с учетом температуры плавления праймеров, установленной при помощи компьютерной программы «OLIGO 4.0» (США). На основе проведенного анализа температура отжига праймеров составила 55°C.

Теоретически подобранные условия проведения ПЦР и специфичность модифицированных праймеров были экспериментально подтверждены на пробах, содержащих РНК ротавируса разных G[P] типов. ПЦР осуществляли в режиме: 94°C-3 мин; 45×(94°C-30 с, 55°C-30 с, 72°C-1 мин); 72°C – 5 мин. С использованием оптимизированной методики амплификации была синтезирована кДНК полноразмерной последовательности 10-го сегмента генома 15 природных изолятов ротавируса человека с доминирующими и необычными электрофоретипами РНК, относящихся к различным G[P] типам и SG подгруппам. Электрофоретипы РНК и субгрупповая принадлежность изолятов ротавируса были определены в совместной работе с сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных

инфекций ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. При проведении многолетних наблюдений в период 1997-05 гг. на территории Нижегородской области была установлена циркуляция ротавирусов семи G[P] типов: G1P[8], G1P[6], G2P[4], G3P[8], G3P[6], G3P[9] и G4P[8] с доминированием типа G1P[8]. В сезон 2004-05 гг. зафиксировано перераспределение генотипов ротавируса, что отразилось в доминировании типа G2P[4].

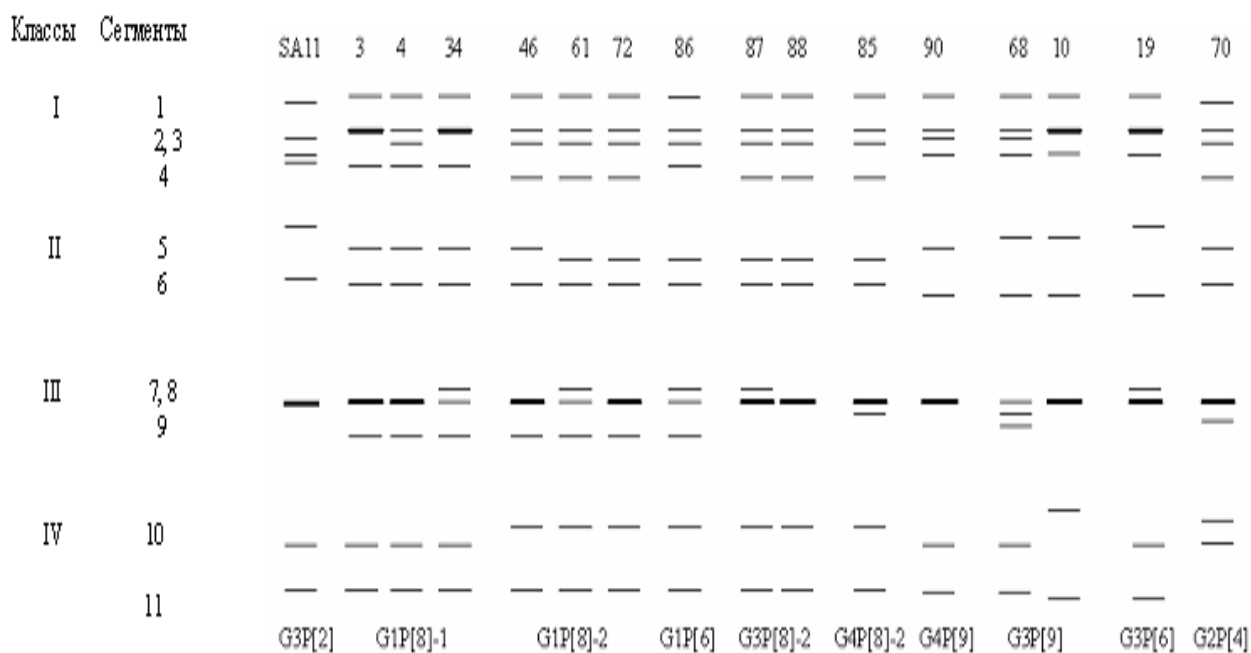


Рис. 1. Схема электрофоретипов РНК ротавирусов группы А, использованных в настоящей работе

Сверху цифрами обозначены номера ЭФ-типов РНК; внизу указаны G[P]-типы ротавирусов. SA11 – обозначение референтного штамма ротавируса обезьян

Тип G4P[8] являлся минорным на протяжении всего периода наблюдения [Новикова Н.А. и др., 2007; Федорова О.Ф., 2006]. Спектр G[P]-типов ротавирусов, исследуемых в настоящей работе, определен на основании предыдущих наблюдений и охватывает все перечисленные G[P]-типы, распространенные на территории Нижегородской области. Профили миграции сегментов РНК изучаемых вариантов ротавируса показаны на рисунке 1.

Разработанная методика явилась базой для изучения первичной структуры гена NSP4 у различных штаммов ротавируса человека, актуальных для территории России.

Синтезированные с применением данной методики полноразмерные последовательности 10-го сегмента генома ротавирусов также использовали в качестве матриц для амплификации открытой рамки считывания гена NSP4 с целью клонирования ее в экспрессирующей бактериальной векторной системе.

Изучение variability гена NSP4 ротавируса группы А разных G[P]-типов. На следующем этапе работы определена первичная структура 10-го сегмента генома исследуемых изолятов ротавируса.

Установленные последовательности гена NSP4 депонированы в GenBank/EMBL/DDBJ по номерами DQ270104 – DQ270118. Известно, что 10-й сегмент генома ротавирусов характеризуется высоким уровнем variability, что отражает существование различных NSP4 генотипов. По последним данным установлено существование 11-ти NSP4-генотипов (E-enterotoxin 1-11).

Нуклеотидные последовательности гена NSP4 15-ти российских изолятов ротавируса, установленные в настоящей работе, использовали для множественного выравнивания и филогенетического анализа с соответствующими последовательностями типовых штаммов различных NSP4-генотипов и штаммов ротавирусов человека известных G[P] типов, выделенных на территориях разных стран, и представленных в GenBank/EMBL/DDBJ. Гомологию последовательностей определяли с помощью программы BLAST. На рисунке 2 видно, что при построении филогенетического дерева нижегородские штаммы PB образовали три кластера, соответствующие NSP4-A (E2), B (E1) и C (E3) генотипам. Различия в нуклеотидных последовательностях PB разных генотипов достигали 25% и не превышали 7,9% для последовательностей одного генотипа в пределах субкластера и 13,7% - в пределах кластера.

Большинство геновариантов ротавируса, обладающих «длинным» ЭФ-типом РНК и SGII специфичностью, группировались с референтным штаммом Wa (AF200224), имеющим NSP4-B генотип. Данный генотип установлен у штаммов с доминирующими антигенными типами и электрофоретическими РНК в 73,3% и представлен в основном типом G1P[8], генотип G4 являлся минорным, что соответствовало спектру распределения геновариантов ротавируса на территории Нижегородской области в период 1997-2004 г [Новикова Н.А. и др., 2007].

Кластер Wa-подобных штаммов состоит из 3-х субкластеров (I, II и III), различия в нуклеотидных последовательностях которых по отношению к штамму Wa достигали 2,6%, 6,2% и 7,7%. Генетические варианты ротавируса серотипа G1 и субгенотипов P[8]-1 и P[8]-2, входящие в данный кластер, образовали самостоятельные группы (Ia и Ib).

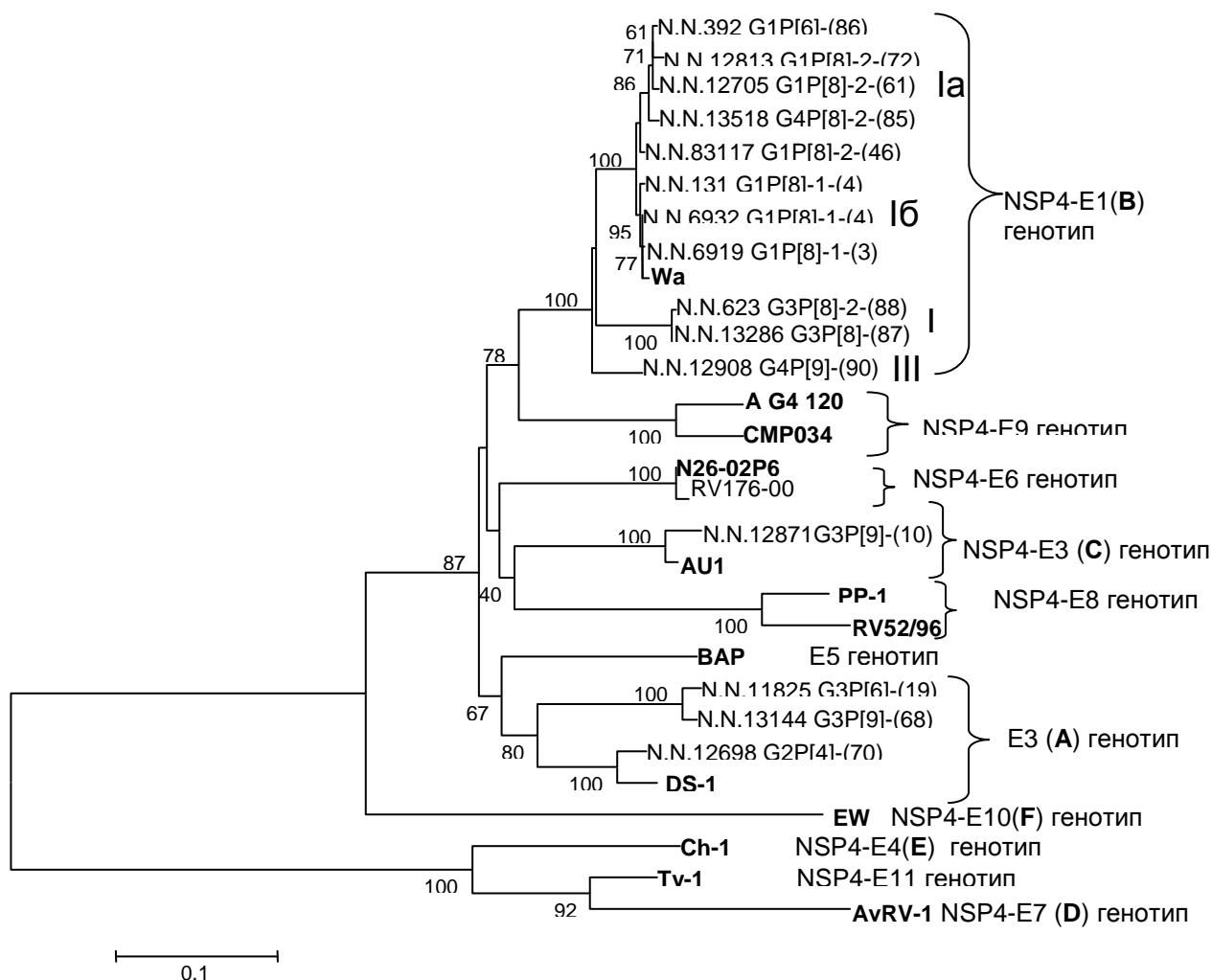


Рис. 2. Определение генотипа NSP4 изолятов ротавирусов группы А

Показаны индексы поддержки > 60; названия референтных штаммов выделены жирным шрифтом

Названия референтных штаммов выделены жирным шрифтом

Римскими цифрами I, II и III указаны субкластеры в кластере, сформированном ротавирусами, принадлежащими генотипу NSP4-B; Ia – группа, образованная субгенотипом P[8]-2; Ib – группа, образованные субгенотипом P[8]-1

Генетические варианты ротавируса с «коротким» и «широким» ЭФ-типами РНК (подгруппа SGI), составили единый кластер с референтным штаммом DS-1

(AF174305), имеющим генотип NSP4-A. Эти результаты подтверждают данные зарубежных авторов о связи NSP4-генотипа ротавируса с VP6-субгруппой, а именно, связи генотипа NSP4-A с подгруппой SGI, а генотипа NSP4-B с подгруппой SGII [Iturriza-Gomara M. et al., 2002]. Высокий уровень различий (13,7%) между нуклеотидными последовательностями гена NSP4 исследуемых изолятов ротавируса, входящих в разные субкластеры в кластере, сформированном ротавирусами генотипа NSP4-A, позволяет предположить существование новых генотипов NSP4.

Необычный вариант ротавируса N.N.12871-G3P[9]-(10)/SGI с «широким» 10-м ЭФ-типом РНК группировался с референтным штаммом Au-1 (D89873), имеющим генотип NSP4-C. Гомология нуклеотидных последовательностей составила 99,8%.

Проведен филогенетический анализ по гену NSP4, позволивший проследить родство штаммов ротавируса, циркулирующих среди населения центральной России (Н.Новгород), со штаммами, выделенными на других территориях земного шара (рис.3). Генетический вариант ротавируса G1P[8]-1-(3) типа, доминировавший на территории европейской части России в 1984-96 гг., и ассоциирующийся с тяжелой формой ротавирусного гастроэнтерита с выраженным респираторным синдромом [Новикова Н.А. и др., 1992,1998,2007], оказался генетически близкородственным штамму ротавируса G1P[8]-1, выделенному в Финляндии [Maunula L. et al., 2002]. Представляется вероятным, что российский доминирующий генетический вариант ротавируса G1P[8]-1-(3)/NSP4-B имел общее происхождение со штаммом, циркулировавшим на территории Скандинавских стран, или являлся тем же штаммом. Другие генетические варианты (4-й, 34-й ЭФ-типы РНК) ротавируса G1P[8]-1 типа циркулировали в более поздние сроки и, по всей вероятности, являются дериватами штамма G1P[8]-1-(3). В то же время генетические варианты ротавируса G1P[8]-2 (46-й, 61-й и 72-й ЭФ-типы), G4P[8]-2 (85-й ЭФ-тип), а также G1P[6] (86-й ЭФ-тип) могут иметь самостоятельное происхождение.

Варианты ротавируса генотипа NSP4-B типов G3P[8]-2 (88-й и 87-й ЭФ-типы РНК) и G4P[9]-(90), а также необычный вариант G3P[9]-(10)-NSP4-C группируются со штаммами из Тайваня и Китая. Эти данные могут свидетельствовать о заносе штаммов ротавируса на территорию России из стран Юго-Восточной Азии.

Штаммы G3P[6]-(19) и G3P[9]-(68) подгруппы SGI с ЭФ-типом РНК, характеризующимся широким разбегом 5-6 сегмента РНК в ПААГ, что характерно

для ротавирусов крупного рогатого скота, составили субкластер в кластере DS-1 подобных штаммов. Ротавирусы G2P[4]-NSP4-A типа, выделенные на территориях различных стран и континентов, в том числе и на территории России, образовали самостоятельную группу близкородственных штаммов, что свидетельствует об устойчивости данной генетической комбинации серотипа и генотипа.



Рис. 3. Филограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей гена NSP4 российских изолятов РВ-А разных G[P]-типов и NSP4-генотипов и штаммов ротавирусов человека, выделенных на территориях других стран

Показаны индексы поддержки > 60.

Указаны названия штаммов, их географическое происхождение, G[P]-типы, в скобках указан номер ЭФ-типа РНК. Названия референтных штаммов выделены жирным шрифтом

Проведен филогенетический анализ ротавирусов человека и штаммов ротавирусов животных, представленных в базе данных GenBank. Установлено, что основная масса изучаемых вариантов ротавируса, образует самостоятельный геномный кластер «истинных» ротавирусов человека, включающий штаммы типов

G1P[8]-1, G1P[8]-2, G3P[8]-2 и G4P[8]-2 (Wa-геногруппа) (рис.4). Эта группа штаммов РВ человека по последовательности гена NSP4 близка к ротавирусам свиней. Идентичность нуклеотидных последовательностей составила 87,7-91%. Штаммы ротавируса человека G3P[6]/NSP4-A и G3P[9]/NSP4-A, принадлежащие геногруппе DS-1, кластеризовались со штаммами ротавируса крупного рогатого скота. Идентичность нуклеотидных последовательностей составила 90,4-90,8%. По всей вероятности данные штаммы ротавируса или их предки являются реассортантами с ротавирусами крупного рогатого скота и приобрели от них ген NSP4.

Штамм G3P[9]/NSP4-C, имеющий ЭФ-тип РНК, характерный для геногруппы Au-1, оказался в кластере, формируемом ротавирусами кошек. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей составил 97,5%. Данный вариант вируса может являться реассортантом между ротавирусами кошек и человека, возникшим вследствие трансмиссии генов.

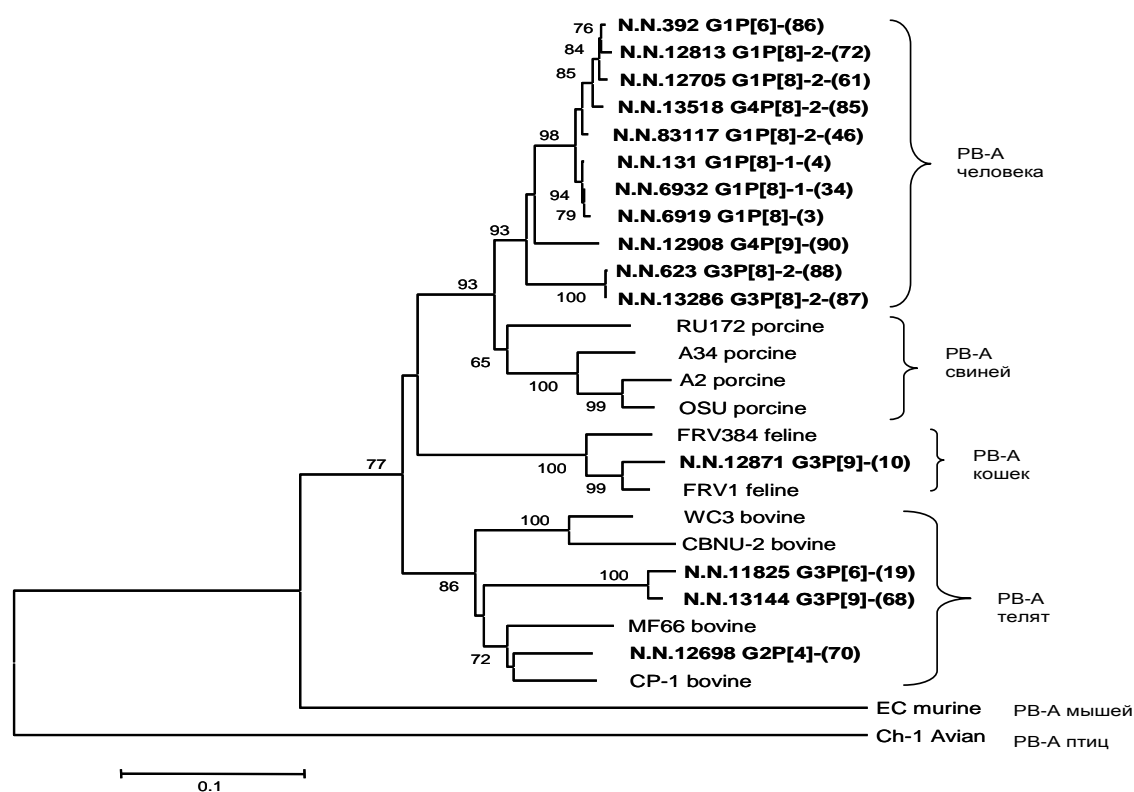


Рис. 4. Филограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей гена NSP4 нижегородских изолятов РВ-А разных G[P]-типов и штаммов ротавирусов животных

Показаны индексы поддержки > 60.

Указаны названия штаммов, их видовая принадлежность, G[P]-типы, в скобках указан номер ЭФ-типа РНК

Таким образом, в результате проведенной работы впервые установлена нуклеотидная последовательность гена NSP4 российских (Нижний Новгород) изолятов ротавирусов группы А доминирующих антигенных G[P] типов и показана вариабельность по гену NSP4. На основе проведенного анализа подобраны варианты ротавируса для изучения мембранодестабилизирующих свойств NSP4 разных генотипов. Особый интерес представляли изоляты ротавируса, выделенные от детей с симптоматической и бессимптомной формой инфекции.

Изучение энтеротоксических свойств NSP4 ротавирусов группы А разных генотипов. Выраженность диареи при инфицировании различными геновариантами ротавирусов, возможно, объясняется молекулярно-биологическими свойствами энтеротоксина NSP4. Экспрессия NSP4 в бактериальной векторной системе может служить моделью для оценки токсических свойств на основе способности NSP4 перфорировать мембраны бактериальных клеток. Возможность применения в качестве модели для изучения токсических свойств NSP4 цитоплазматической мембраны *E.coli* объясняется тем, что мембраны кишечной палочки по липидному составу идентичны мембранам эндоплазматического ретикулула [Browne E.P., 2000].

Схема эксперимента по изучению мембранодестабилизирующей активности NSP4 разных генотипов, разработанная в ходе данного исследования, включала: синтез кДНК открытой рамки считывания гена NSP4, создание экспрессирующей NSP4 генетической конструкции на основе вектора pET22b, трансформацию компетентных клеток рекомбинантными плазмидами, несущими вставку последовательности гена NSP4, и индуцируемую экспрессию энтеротоксина в культуре клеток *E.coli*. (рис. 5).

Для получения экспрессии NSP4 в клетках *E.coli* необходимо было получить кДНК открытой рамки считывания (ОРС) гена энтеротоксина. С этой целью на основе сравнительного анализа 42-х нуклеотидных последовательностей NSP4 разных генотипов, были сконструированы собственные версии праймеров для амплификации ОРС гена NSP4, удовлетворяющие условиям клонирования: NSP4-F(ОРС) 33-[5'-TGCggACATATggATAAgCTTgCCgACCTC-3']-64 н.о., NSP4-R(ОРС) 549-[5'-TCAACCTCgAgCATKgATgCAgTCACTTC-3']-577 н.о.

Так как целью работы являлось получение векторной системы для экспрессии ОРС, при конструировании праймеров в их последовательности были внесены сайты

узнавания для эндонуклеаз рестрикции NdeI (**cat atg** внесен в прямой праймер), XhoI (**ctc gag** внесен в обратный праймер), что необходимо для корректной ориентации вставки последовательности OPC NSP4 при постановке ее под экспрессию.

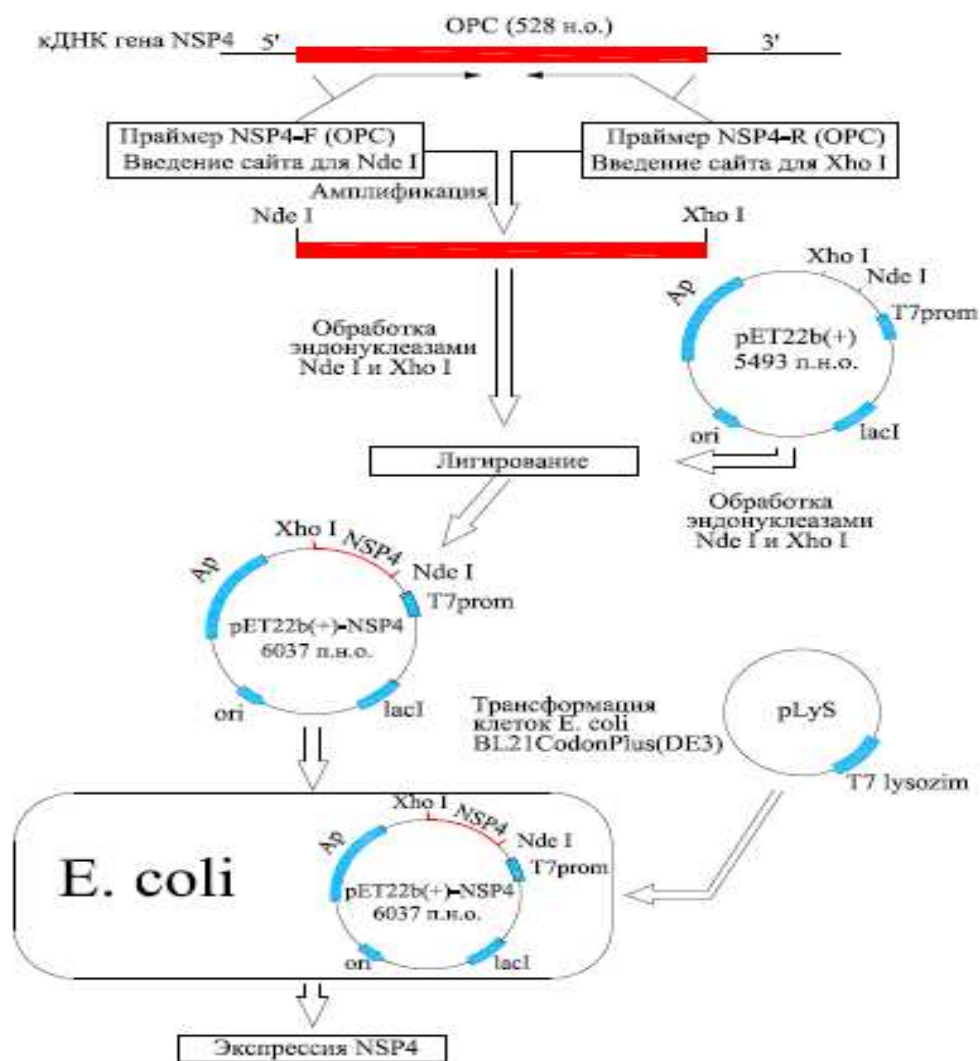


Рис. 5. Схема проведения эксперимента по экспрессии NSP4 в E.coli

Регион 5'-концевого участка последовательности, соответствующего области прямого праймера, представляет собой консервативный участок, что и определило выбор праймера. Нуклеотидные замены в регионе 3'-концевого участка последовательности, соответствующего области обратного праймера, определили необходимость введения вырожденных оснований (K – G/T). Сконструированные нами праймеры, NSP4-F (OPC) и NSP4-R (OPC), фланкируют фрагмент гена NSP4 размером 544 н.о., расположенный с 33 по 577 н.о. Температура отжига праймеров, выбранная с использованием программы «OLIGO 4.0» (США), составила 55°C.

Теоретически подобранные условия проведения ПЦР и специфичность сконструированных праймеров экспериментально апробованы в реакции, где в качестве матрицы для амплификации открытой рамки считывания гена NSP4 служила полноразмерная кДНК энтеротоксина ротавирусов человека. ПЦР осуществляли в режиме: 94 °С-3 мин; (94 °С-10 с, 55 °С-10 с, 72 °С-10 с)×42; 72 °С - 5 мин.

С использованием разработанной нами методики синтезированы последовательности OPC гена NSP4 ротавируса геновариантов G1P[8]-2-NSP4-B, G3P[9]-NSP4-C, вызывающих симптоматическую инфекции, и G9P[6]-NSP4-A типа, выделенного от новорожденного с бессимптомной формой инфекции. Для экспрессии OPC гена NSP4 перечисленных изолятов ротавируса в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3) codon plus выбран вектор pET22b+, обладающий сильным промотором гена 10 фага T7, подходящей для вставки емкостью и простотой селекции. В результате генетических манипуляций получена кольцевая форма рекомбинантной ДНК, содержащая вставку последовательности OPC гена NSP4, и пригодная для трансформации: pET22b-NSP4-G1P[8]-2, pET22b-NSP4-G3P[9], pET22b-NSP4-G9P[6] (рис.6).

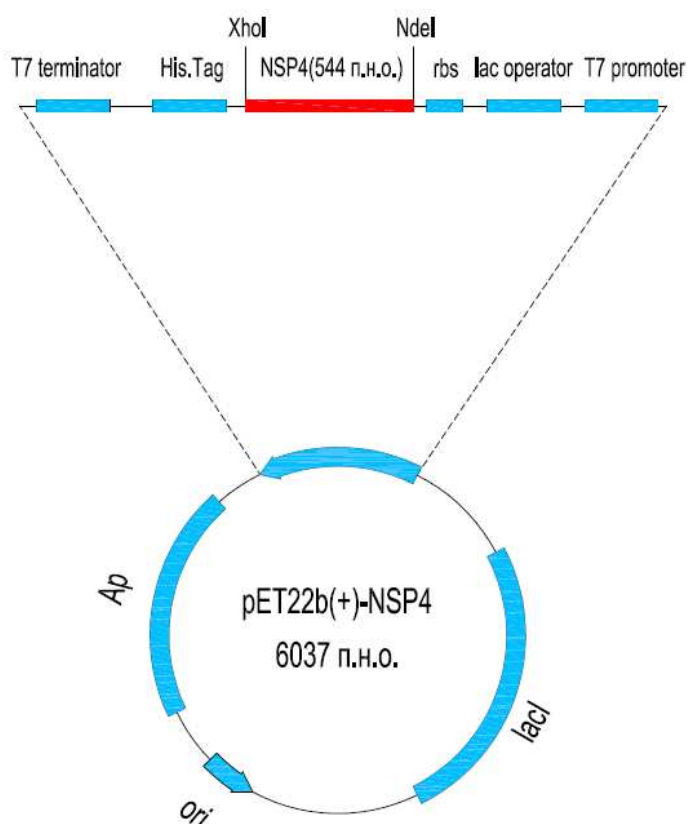


Рис. 6. Схема генетической конструкции pET22b-NSP4(OPC)

Компетентные клетки *E.coli* BL21(DE3) codon plus трансформировали полученными рекомбинантными плазмидами и индуцировали ИПТГ. В качестве контроля использовали клетки, трансформированные плазмидой рЕТ22b без вставки гена NSP4.

Контроль экспрессии NSP4 проведен методом электрофореза в полиакриламидном геле, где показано присутствие искомого белка в бактериальной культуре после индукции экспрессии (рис.7).

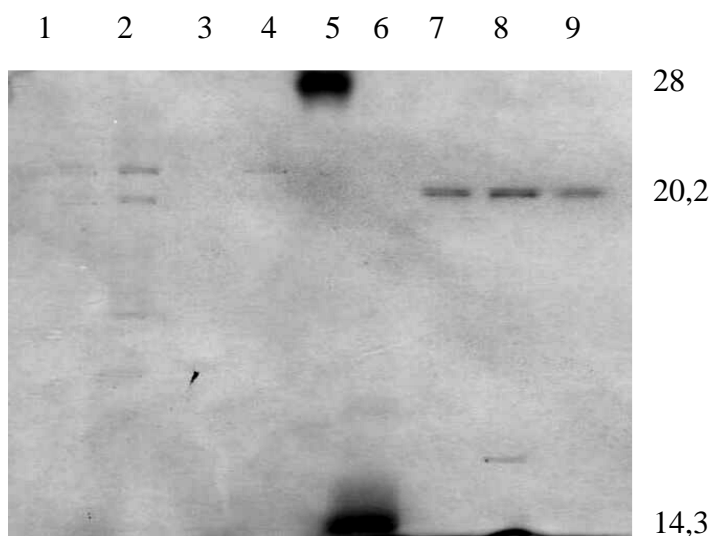


Рис. 7. Электрофореграмма белков, полученных из клеточного дебриса культуры *E.coli*, индуцированной для экспрессии NSP4

- 1, 7 – NSP4, экспрессированный в составе рекомбинантной плазмиды рЕТ22b-G1P[8]-2-NSP4-B;
 2, 8 – NSP4, экспрессированный в составе рекомбинантной плазмиды рЕТ22b-G3P[9]-NSP4-C;
 3, 9 – NSP4, экспрессированный в составе рекомбинантной плазмиды рЕТ22b-G9P[6]-NSP4-A;
 1,2,3 – NSP4, экстрагированный из жидкой культуры *E.coli*;
 7,8,9 – NSP4, экстрагированный из клеточного дебриса *E.coli*;
 5 – протеинкиназа К – 14,3 кДт;
 6 – лизоцим – 28 кДт

После индукции экспрессии NSP4 была проведена серия замеров оптической плотности трансформированных бактериальных культур, результаты которой показали статистически значимое по сравнению с контролем ($p < 0.05$) нарушение способности *E.coli* к наращиванию биомассы (рис. 8).

NSP4-C геноварианта ротавируса G3P[9] типа, близкородственного ротавирусам кошек, при экспрессии в модельной системе *E.coli* вызывал угнетение

роста бактериальной культуры. Приобретение генов ротавируса кошек не снизило вирулентность исследуемого изолята для человека.

NSP4-B эпидемически значимого варианта ротавируса G1P[8]-2 типа, вызывающего гастроэнтерит, характеризующийся интенсивным диарейным синдромом и высокой частотой госпитализаций, проявил одинаковую способность нарушать рост бактериальной культуры наряду с NSP4 генотипов А и С.

NSP4-A ротавируса генотипа G9P[6], выделенного от новорожденного с бессимптомной формой инфекции, при экспрессии в клетках *E.coli* вызывал угнетение роста бактериальной культуры, подобно ротавирусам генотипов G1P[8]-2-NSP4-B и G3P[9]-NSP4-C ротавирусов, выделенных от детей с гастроэнтеритом.

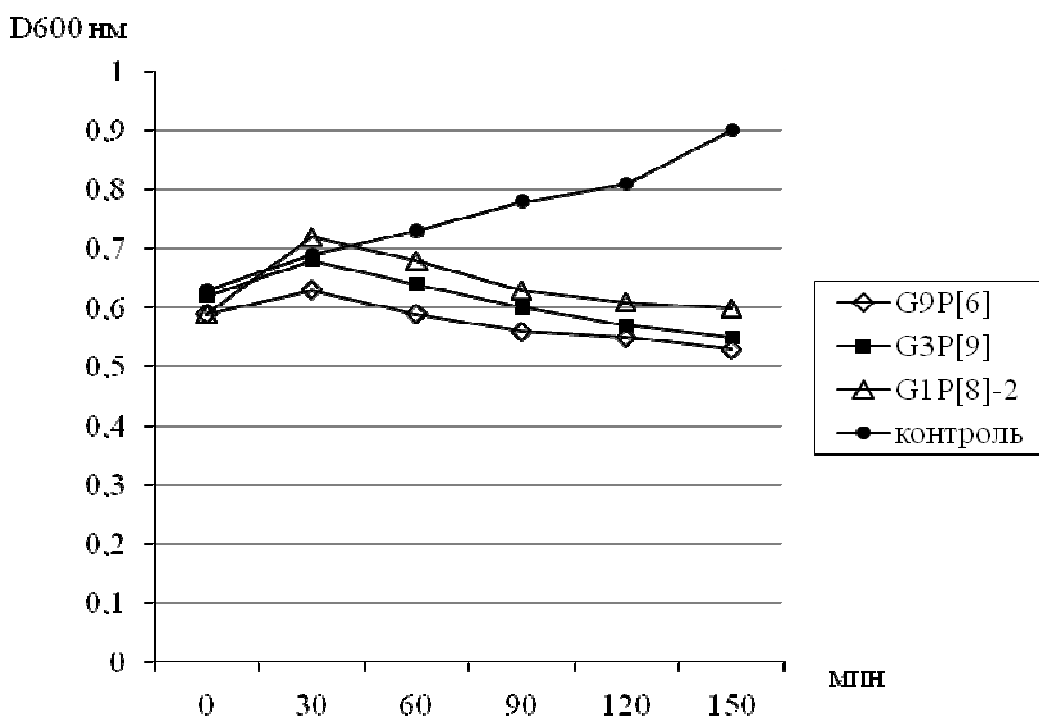


Рис. 8. Изменение оптической плотности культур-продуцентов *E.coli* после индукции экспрессии NSP4

Таким образом, установлено, что NSP4 разных генотипов ротавирусов, обнаруженных у детей с симптоматической и бессимптомной формой инфекции, при экспрессии в клетках *E.coli* характеризуются эффектом торможения роста бактериальной культуры, что свидетельствует об их сходных мембранодестабилизирующих свойствах. Эти результаты могут свидетельствовать, что бессимптомное течение ротавирусной инфекции, вероятно, обусловлено не

молекулярно-биологическими свойствами вирусного энтеротоксина NSP4, а иными факторами вирусной природы, либо факторами организма хозяина.

С целью подтверждения отсутствия связи молекулярно-биологических свойств NSP4 разных генотипов с выраженностью диарейного синдрома у инфицированных ротавирусами детей проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей NSP4 исследуемых изолятов ротавируса в регионах трансмембранного и цитоплазматического доменов белковой молекулы (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение аминокислотных последовательностей NSP4 разных генотипов в
регионе цитоплазматического домена белковой молекулы

		140 	150 	160 	170 	
обобщенная последовательность		HDNLIVRPVD	VIDMSKEFNQ	KNIKTLDEWE	SGKNPYEPKE	VTASM
G[P]-тип	NSP4-генотип					
G1P[8]-1	B	-----T-----	-----	-----	-----S_	-----
G1P[8]-2	B	-----K-----	-----	-----	-----S_	-----
G3P[8]-2	B	Y-----	T__T_____	-----	N_____I_	-----
G4P[8]-2	B	-----AK-----	-----	-----	-----S_	-----
G4P[9]	B	__K_____A_	-----	-----	-----S_	-----
G1P[6]-2	B	-----K-----	-----	-----	-----S_	-----
G2P[4]	A	Y_K_____ST_	E__T__I__	__VR__E__	-----	__A_
G3P[6]	A	__K_M_____T_	D__T__I__	__V__E__	-----T__	__A_
G9P[6]	A	__K_M_____T_	E__T__I__	__V__E__	-----	__A_
G3P[9]	C	__M__IK_____	K__TQ_I__	RQF__N__T	E_E_____	__L

Обобщенная последовательность, составлена из наиболее часто встречающихся аминокислотных оснований

Известно, что регион, соответствующий цитоплазматической части белковой молекулы NSP4, обладает выраженной функциональной активностью, характеризуется высокой вариабельностью и отвечает за проявление энтеротоксических свойств NSP4, а аминокислотные замены в нем могут изменять (снижать) способность энтеротоксина индуцировать диарею и обуславливать различные клинические проявления ротавирусной инфекции [Huang H. et al., 2004; Деера R.,2007]. Обнаружено, что и в цитоплазматической части, и в

трансмембранном регионе молекулы NSP4 имеются специфичные, свойственные определенному NSP4-генотипу, а также уникальные замены аминокислот. Однако обнаруженные замены не влияли на мембранодестабилизирующую активность энтеротоксина.

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что разработанная нами методика ПЦР с использованием сконструированных праймеров явилась методической базой для изучения первичной структуры гена NSP4 у различных штаммов ротавируса человека, актуальных для территории России. С использованием оптимизированной методики синтезированы кДНК полноразмерного гена NSP4 и его открытой рамки считывания ротавирусов группы А человека. Впервые показана принадлежность российских изолятов ротавирусов к трем из 11-ти известных NSP4-генотипов – А (Е2), В (Е1), С (Е3), с доминированием штаммов, относящихся к генотипу NSP4-В. Проведенный на основе последовательности гена NSP4 сравнительный анализ, выявил филогенетическое родство ротавирусов типа G1P[8] со штаммами из Скандинавских стран, а G3 серотипа – со штаммами из стран Юго-Восточной Азии. Установлено, что изоляты ротавируса G1-, G3-, G4- и P[8] типов являются близкородственными ротавирусам свиней, G3P[6]-, G3P[9]- и G2P[4] типов – ротавирусам крупного рогатого скота и G3P[9] типа – ротавирусам кошек. Эти данные свидетельствуют об эволюционных связях между ротавирусами человека и животных. Созданы генетические конструкции на основе вектора pET22b, содержащие открытую рамку считывания гена NSP4 разных генотипов. Получена экспрессия NSP4 в составе рекомбинантных плазмид в бактериальной культуре *E.coli* шт. BL21(DE3)codon plus. Присутствие NSP4 в культуре *E.coli* после индукции экспрессии подтверждено методом элетрофореза в полиакриламидном геле. Установлено, что экспрессия NSP4 исследуемых изолятов ротавируса, выделенных от детей с симптоматической и бессимптомной формой инфекции, характеризовалась эффектом торможения роста бактериальной культуры, что свидетельствует о сходных мембранодестабилизирующих свойствах NSP4 разных генотипов ротавируса. Обнаруженные замены аминокислот в трансмембранном и цитоплазматическом доменах белковой молекулы NSP4 исследуемых изолятов ротавируса были генотипспецифическими и не влияли на способность энтеротоксина перфорировать мембраны клеток *E.coli*.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны оригинальные версии праймеров для универсальной амплификации кДНК полноразмерного гена энтеротоксина NSP4 ротавирусов группы А и его открытой рамки считывания.
2. Впервые установлены NSP4-А (Е2), -В (Е1) и С (Е3) генотипы российских изолятов ротавирусов группы А разных G[P]-типов. Изоляты ротавируса, характеризующиеся генотипом NSP4-В (Е1), доминировали.
3. Установлены филогенетические связи по гену NSP4 российских изолятов ротавируса G1P[8] типа со штаммами ротавируса из Скандинавских стран, а G3 серотипа со штаммами из стран Юго-Восточной Азии.
4. Впервые установлено родство по гену NSP4 российских изолятов ротавирусов G1, G3, G4 генотипов и P[8] типа с ротавирусами свиней, G3P[6], G3P[9] и G2P[4] типов – с ротавирусами крупного рогатого скота и G3P[9] типа – с ротавирусами кошек.
5. Созданы генетические конструкции pET22b-NSP4-G1P[8]-2, pET22b-NSP4-G3P[9], pET22b-NSP4-G9P[6], экспрессирующие NSP4 в культуре E.coli, штамм BL21(DE3) codon plus. Экспрессия сопровождалась торможением экспоненциального роста культуры E.coli независимо от типа NSP4.
6. Установлено, что замены аминокислот в варибельных регионах белковой молекулы NSP4 не влияют на способность ротавирусного энтеротоксина дестабилизировать мембраны клеток E.coli.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. **Пономарева Н.В.** Синтез полноразмерной кДНК гена NSP4 ротавируса группы А / Пономарева Н.В., Новиков Д.В., Савельев Р.С., Новикова Н.А. // Вестник ННГУ. 2006. № 11. С. 139-141.
2. **Пономарева Н.В.** Изучение связи клинических проявлений ротавирусной инфекции с аминокислотными заменами в последовательности энтеротоксина NSP4 / Пономарева Н.В., Новиков Д.В., Новикова Н.А. // Вестник военно-медицинской академии. Санкт-Петербург. 2008. № 22. С. 546-547.

3. **Новикова Н.А.** Анализ нуклеотидных последовательностей гена NSP4 ротавирусов группы А, изолированных в Нижнем Новгороде / Новикова Н.А., Пономарева Н.В., Новиков Д.В., Прилипов Г.А., Епифанова Н.В., Голицына Л.Н. // Вопросы Вирусологии. 2008. №6. С. 35-39.

II. Статьи, доклады, тезисы докладов региональных и всероссийских конференций:

1. **Пономарева Н.В.** Анализ последовательностей гена энтеротоксина NSP4 штаммов ротавируса человека / Пономарева Н.В., Новиков Д.В., Новикова Н.А. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины». СПб. 2006. С. 254-254.

2. **Пономарева Н.В.** Вариабельность гена энтеротоксина NSP4 ротавирусов человека // Докл. XI нижегородской сессии молодых ученых (Естественнонаучные дисциплины). Нижний Новгород. 2006. С. 196-197.

3. **Пономарева Н.В.** Генетические взаимосвязи ротавирусов человека и животных // Материалы Всероссийской медико-биологической научной конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (X Всероссийская конференция «Человек и его здоровье»). СПб. 2007. С. 355-356.

4. **Пономарева Н.В.** Генетические взаимоотношения между ротавирусами человека, выделенными в России и других регионах мира // Докл. XII нижегородской сессии молодых ученых (Естественнонаучные дисциплины). Нижний Новгород. 2007. С. 24-25.

5. **Пономарева Н.В.** Энтеротоксин и его роль в патогенезе ротавирусной инфекции / Пономарева Н.В., Новикова Н.А. // Материалы юбилейной Всероссийской научно-практической конференции «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения». Нижний Новгород. 2009. С. 158-162.