

МОЛЕКУЛЯРО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БОКАПАРВОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА У ДЕТЕЙ С РЕСПИРАТОРНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Сивец Наталья Валерьевна

Научный сотрудник лаборатории гриппа
и гриппоподобных заболеваний РНПЦ эпидемиологии
и микробиологии, г. Минск, Республика Беларусь
sivets_n@mail.ru

MOLECULAR GENETIC STUDIES OF HUMAN BOCAPARVOVIRUS IN CHILDREN WITH RESPIRATORY INFECTION IN THE REPUBLIC OF BELARUS

N. Sivets

Summary. The study determined the nucleotide sequences of the complete genomes of HBoV1 circulating in our country. Sequence homology of Belarusian bocaparviruses with reverence strain ST2 (NC_007455.1) for BLR/Minsk/10/14, BLR/Minsk/11/14 and BLR/Mogilev/241/14 was 99.7%, for BLR/Gomel/285/15 was 99.8%. The presence of two unique substitutions P157S and D639K in the regions of the DNA-binding and helicase domains, which can affect the rate of replication and transcription of the respiratory bocaparvirus.

Keywords: HBoV1, DNA, sequence reaction, genome, amino acid substitutions.

Аннотация. Вирусы, выявленные на территории нашей страны, принадлежат к генотипу HBoV1. Гомология последовательностей белорусских бокапарвовирусов с реверенс — штаммом ST2 (NC_007455.1) для BLR/Minsk/10/14, BLR/Minsk/11/14 и BLR/Mogilev/241/14 составила 99,7%, для вируса BLR/Gomel/285/15 составила 99,8%. Установлено наличие двух уникальных замен P157S и D639K в областях ДНК-связывающего и геликазного доменов, которые могут влиять на скорость репликации и транскрипции респираторного бокапарвовируса.

Ключевые слова: HBoV1, ДНК, сиквенсовая реакция, геном, аминокислотные замены.

Введение

Бокапарвовирус примат 1 (*Primate bocaparvovirus 1*, HBoV1), более известный как бокавирус человека (*Human bocavirus 1*, HBoV1) впервые обнаружен в Швеции в 2005 году у детей с симптомами острой респираторной инфекции [1]. Согласно современной классификации Международного комитета по таксономии вирусов бокапарвовирус человека отнесли к семейству *Parvoviridae*, роду *Bocaparvovirus* [2]. Вирионы HBoV1 представляют собой изометрические частицы с кубической симметрией диаметром 25 нм, лишенные липопротеиновой оболочки. Содержат одноцепочечную линейную отрицательную молекулу ДНК длиной около 5300 п.н. ДНК вируса кодирует два

неструктурных белка NS1, NP1 и три структурных VP1, VP2, VP3. Неструктурный белок NS1 HBoV1 занимает центральное место в жизненном цикле вируса, участвуя в транскрипции, репликации и упаковке вирусного генома. Наличие второго неструктурного белка NP1 является отличительной чертой рода. Белок играет важную роль не только в репликации вирусной ДНК, но также в процессинге вирусной пре-мРНК. Белок VP3 является главным структурным белком капсида, кодирует высококонсервативные элементы вторичной структуры, которые используются для типирования между родами парвовирусов. Вариабельные поверхностные петли придают специфический тропизм к клеткам хозяина и отвечают за формирование антигенных свойств [3]. В настоящее время известно 2 наиболее вирулентных

генотипа бокапарвовируса: HBoV1 — наиболее часто является причиной респираторных заболеваний, HBoV2 — участвует в развитии гастроэнтеритов [3]. После открытия вируса было опубликовано огромное количество клинических исследований по всему миру о случаях заболеваний, ассоциированных с HBoV1. В Южной Америке частота выявления возбудителя составила от 4,1 до 25,5%, в Северной Америке (4,1–9,8%), в Европе (1,5–29,8%) в Африке (1,0–56,8%), в Азии (1,9–18,3%), Ближнем Востоке (1,9–18,3%) и в Российской Федерации (1,2–22,6%) [4]. В Республике Беларусь частота встречаемости по данным восьмилетнего периода наблюдения (2010–2018 гг.) составила 12,1% [5].

Появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что HBoV1 человека является серьезным патогеном, который, с одной стороны, вызывает острые респираторные инфекции, иногда с опасными для жизни осложнениями, а с другой стороны, также может способствовать длительным заболеваниям дыхательных путей, приводящим к развитию хронических заболеваний легких [6]. Обсуждается участие HBoV1 в канцерогенезе. Описаны случаи выявления ДНК вируса в опухолевых клетках при раке легких, толстой кишки, а также при плоскоклеточном раке миндалин [6, 7]. Кроме того, установлено участие вируса в развитии тяжелых форм энцефалита [8, 9].

В связи с отсутствием данных о генетических особенностях HBoV1, выявленных на территории страны целью данного исследования стало получение полных геномов HBoV1 и изучение первичной структуры возбудителя.

Материалы и методы

На основе реферес — последовательности ST2 (номер депонента NC_007455.1) разработали восемь пар праймеров для получения необходимого количества матрицы и проведения последующего секвенирования бокапарвовирусов, выявленных на территории нашей страны. Праймеры для амплификации полного генома HBoV1 разрабатывали с учетом наличия перекрывающихся участков:

- F1 — GCCGGCAGACATATTGGATTCAA;
- R1 — CCTCAGGTTCAAAAGGACGTGTA;
- F2 — AGTTGGGGGAGAAGGACTAA;
- R2 — GCATGCCCAAGACTTGTCT;
- F3 — TGAAGTACTCCTTATGCTTGAAGGT;
- R3 — AGAAGAGCTGCAATCTCAGTAGCA;
- F4 — ATGTTACGCGGCTCCATTAAG;
- R4 — TGAGCCCGAGCCTCTCTC;
- F5 — GACATCGCAAGTGGACTATTGT;
- R5 — TGATCATGTAATTGAGCAGCGC;

- F6 — TGGGATGATGTGTACCGTAGACACTT;
- R6 — GTCCATGGAGTTGTGACGCAGC
- F7 — CACCTCTACAAAACAGAGGC
- R7 — TGCACTGAGCAGGCCAGGTCC
- F8 — TAAGACAAAACGGAAGCACAG
- R8 — TGTACAACAACAACACATTAAGAT

Олигонуклеотиды синтезировали в ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь). Выделение ДНК вируса проводили с использованием набора реагентов «НуклеСорб» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь. Материалом для исследования служили назофарингеальные мазки госпитализированных детей с симптомами острой респираторной инфекцией, у которых методом ПЦР была выявлена ДНК HBoV1. Назофарингеальные мазки получали в рамках дозорного надзора за гриппом и другими ОРВИ в соответствии с Санитарными нормами, правилами и гигиеническими нормативами «Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь» № 132 от 12.10.2010 года. При проведении исследования отбирали образцы с низкими значениями порогового цикла (Ct), основываясь на закономерностях вычислительной математики: тем меньше значение Ct, тем больше в исследуемом образце целевой молекулы ДНК.

Визуализацию продуктов амплификации осуществляли посредством гель-электрофореза в камере для горизонтального электрофореза multiSub Midi (Clever Scientific, Великобритания) в буферном растворе (200 мМ Трис, 100 мМ уксусная кислота, 50 мМ ЭДТА, pH 8,4) и 1,5% агарозном геле. Накопление матриц ДНК вируса проводили методом ПЦР на амплификаторе MJ mini («Bio-Rad, США) с применением набора реагентов «Genome Lab DTCS Quick Start Kit» (Beckman Coulter, США). Эмпирическим путём определили состав реакционной смеси: 10х ПЦР буфер (750 мМ Трис-HCl, 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Твин 20, pH 8,8) – 2,5 мкл, 10мМ DNTPs — 0,5 мкл, праймер (F, R) — 800нМ, 50мМ MgCl₂–1,5 мкл, ДНК-полимераза HF — 0,5 мкл, ДНК матрицы — 10 мкл и вода для ПЦР — 2 мкл. Режим амплификации состоял из следующих циклов: денатурация при 95 °С — 5 мин., 95 °С — 40 сек., отжиг праймеров от 52 °С до 66 °С – 60 сек. (для каждой пары праймеров своя температура отжига), элонгация при 72 °С — 3 мин. Режим ПЦР повторяли 40 циклов, конечная элонгация 72 °С — 3 мин., хранение при плюс 4°С. Анализ продуктов сиквенсой реакции выполняли на автоматическом капиллярном ДНК — анализаторе Beckman Coulter «CEQ 8000» (Beckman Coulter, США). Сборка последовательностей и их обработку осуществляли в программном пакете Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США). В статье использовали международный код аминокислот: А — аланин, С — цистеин, D — аспарагиновая кислота, Е —

глутаминовая кислота, F — фенилаланин, G — глицин, H — гистидин, I — изолейцин, K — лизин, L — лейцин, M — метионин, N — аспарагин, P — пролин, Q — глутамин, R — аргинин, S — серин, T — треонин, V — валин, W — триптофан, Y — тирозин.

Результат исследований и их обсуждение

Полные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих белки NS1, NP1, VP удалось определить для четырёх образцов: BLR/Minsk/11/14, BLR/Minsk/10/14, BLR/Gomel/285/15, BLR/Mogilev/241/14. Последовательности данных бокапарвовирусов депонированы в Международную базу данных (GenBank, NCBI) с кодом доступа MF376167.1, MF376168.1, MF376169.1, MF376170.1.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей бокапарвовирусов, циркулирующих в нашей стране и нуклеотидных последовательностей референс-вируса, представителей рода *Bocaparvovirus* показал принадлежность исследованных вирусов к генотипу HBoV1. Гомология бокапарвовирусов, выявленных на территории страны с реверенс — штаммом ST2 (NC_007455.1) составила для BLR/Minsk/10/14, BLR/Minsk/11/14 и BLR/Mogilev/241/14—99,7%, для вируса BLR/Gomel/285/15—99,8%. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой консервативности среди бокапарвовирусов генотипа HBoV1, не смотря на географическую удаленность изолятов.

При сравнении полученных консенсусных последовательностей неструктурных полипептидов NS1 референс-вируса ST2 (NC_007455.1) и бокапарвовирусов, выявленных в Республике Беларусь найдено семь аминокислотных замен. Две замены P157S и D639K установлены у все четырех бокапарвовирусов. Замена P157S (на) у вирусов BLR/Minsk/11/14, BLR/Minsk/10/14, BLR/Gomel/285/15, BLR/Mogilev/241/14) отличалась значительной радикальностью, так как гидрофобный аминокислотный остаток пролина уступал место полярному незаряженному остатку серина. Замена P157S располагается в ДНК-связывающем домене, обладающим эндонуклеазной активностью, что позволяет предположить, что данная замена может влиять на скорость процесса репликации исследуемых вирусов. Вторая замена D639K (аспарагиновой кислоты на лизин) способствовала изменению заряда аминокислотного остатка

с отрицательного на положительный и также является радикальной. Данная замена установлена в геликазном домене, что возможно влияет на этап транскрипции возбудителя в организме хозяина. У вирусов BLR/Minsk/10/14 и BLR/Mogilev/241/14 выявлены дополнительные замены, расположенные также в ДНК-связывающем домене: N184T, F218L. Аминокислотные замены C430G, Q438P, W465G, D598E установлены в геликазном домене у вирусов BLR/Minsk/11/14 и BLR/Minsk/10/14.

Неструктурный полипептид NP1 играет важную роль в репликации вирусной ДНК, поэтому появление мутаций может значительно изменить функцию протеина. Как показали наши исследования белок NP1 является консервативным, замены найдены только у вируса BLR/Gomel/285/15: S59N, S89N. Однако они тоже являются консервативными так как наблюдается замена близких по своим биохимическим функциям аминокислот.

Анализ аминокислотных остатков структурного полипептиде VP показал наличие консервативных замен у следующих вирусов: BLR/Minsk/11/14 — H572K, BLR/Mogilev/241/14 — Y616F, Y643D BLR/Gomel/285/15 — A638P, L639P, а также установлена замена аспарагина на серин в положении 474, характерная для все четырех вирусов. В перечисленных позициях произошли замены одних аминокислот на другие с аналогичными биохимическими свойствами. Таким образом данные замены не должны сильно изменить пространственное положение полипептидной цепи, и следовательно, функции белка. Помимо консервативных замен в последовательностях VP протеина установлены радикальные замены для вирусов BLR/Minsk/10/14 — R199G, BLR/Minsk/11/14 — G439R, BLR/Mogilev/241/14 — R199G, Y643D.

Заключение

Вирусы, выявленные на территории нашей страны, принадлежали к генотипу HBoV1. Гомология последовательностей бокапарвовирусов с реверенс — штаммом ST2 (NC_007455.1) для BLR/Minsk/10/14, BLR/Minsk/11/14 и BLR/Mogilev/241/14 составила 99,7%, для вируса BLR/Gomel/285/15—99,8%. Установлено наличие двух уникальных замен P157S и D639K в областях ДНК-связывающего и геликазного доменов. Выявленные мутации могут оказывать влияние на скорость репликации и транскрипции респираторного бокапарвовируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples / T. Allander [et al.] // Proc Natl Acad Sci. — 2005. — Vol. 102. — P. 12891–12896.
2. Cotmore, S.F. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae / S.F. Cotmore [et al.] // J. Gen. Vir. — 2019. — Vol.100 — P. 367–368.
3. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges / M. Guido [et al.] // World J. Gastr. — 2016. — Vol.22. — P. 8684–8697.

4. Антипова, А.Ю. Вирусы семейства Parvoviridae: Молекулярно-генетические аспекты репродукции и медицинская значимость / А.Ю. Антипова, И.Н. Лаврентьева // Инфекция и иммунитет. — 2017. — № 1. — С. 7–20.
5. Сивец, Н.В. Бокапарвовирусная инфекция у детей в Республике Беларусь: молекулярно-эпидемиологические аспекты / Н.В. Сивец, Н.П. Шмельёва, Т.П. Лапо // Журнал инфектология. — 2019. — Том.11, № 4. — С. 113–121.
6. The human bocavirus is associated with some lung and colorectal cancers and persists in solid tumors / V. Schildgen [et al.] // Plos one. — 2013. — Vol.22. — Режим доступа: www.plosone.org. — Дата доступа: 27.07.2013.
7. Association of the human bocavirus with tonsil squamous cell carcinomas / M. Höpken [et al.] // Front. Microbiol. — 2018. — Vol.9. — Mode of access: www.frontiersin.org. — Date of access: 16.10.2018.
8. Detection of human bocavirus in the cerebrospinal fluid of children with encephalitis / M.T. Mitui [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 54., № 7. — P. 964–967.
9. Human bocavirus in patients with encephalitis Sri Lanka, 2009–2010 / Mori D. [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2013. — Vol. 19., № 11. — P. 1859–1862.

© Сивец Наталья Валерьевна (sivets_n@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



г. Минск