

УДК 578.832.1-51.76

DOI: 10.15587/2519-8025.2019.168500

## ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ ГЕМАГЛЮТИНИНУ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ ВІРУСІВ ГРИПУ А H1N1 ТА H7N9

С. В. Буряченко, Б. Т. Стегній

*Вірус грипу А є збудником зоонозних та антропонозних захворювань. Значною мірою вірулентні та контагіозні властивості вірусу грипу обумовлені наявністю гемаглютинину. Мембранний глікопротеїн гемаглютиніну відіграє важливу роль у адгезії та інвазії вірусу грипу у клітину, а також у формуванні до нього імунітету у організму-хазяїна. Гемаглютинін формує пандемічність штаму вірусу грипу. Систематика та характеристика штамів вірусу грипу базується зокрема й на типі гемаглютиніна. Найбільш контагіозними штамми вірусу грипу А є штами H1N1 та H7N9. Поліморфізм гемаглютиніну та його вплив на властивості штамів вірусу грипу робить актуальним дослідження його варіабельності.*

**Метадослідження.** Метою дослідження було визначити поліморфізм гена, що кодує гемаглютинін штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9, визначити його вплив на поліморфізм амінокислотних послідовностей гемаглютиніну та властивості штамів біоінформатичними методами дослідження.

**Матеріали та методи.** Були аналізовані нуклеотидні послідовності гемаглютиніни штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 та продукти його транскрипції за допомогою кластерного аналізу. Властивості гемаглютиніну визначали шляхом визначення його доменів.

**Результати та обговорення.** За результатом дослідження обраховані поліморфізм та генетичні дистанції між алелями гена, що кодує гемаглютинін вірусу грипу А, проведено його транскрипцію. Досліджено поліморфізм і амінокислотні дистанції між продуктами його транскрипції, проведено порівняльний аналіз між досліджуваними нуклеотидними та амінокислотними послідовностями. Показано роль та вплив синонімічних кодонів у нуклеотидних послідовностях алелей гена, що кодує гемаглютинін, на поліморфізм гемаглютиніну. Визначені домени досліджуваних зразків гемаглютиніну.

**Висновки.** За результатом досліджень показано відсутність впливу поліморфізму гена, що кодує гемаглютинін, на поліморфізм гемаглютиніну. Показано відсутність впливу поліморфізму амінокислотних послідовностей гемаглютиніни штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 на доменний склад і, таким чином, на властивості штамів

**Ключові слова:** поліморфізм, гемаглютинін, вірус грипу А, H1N1, H7N9, кластерний аналіз

Copyright © 2019, С. В. Буряченко, Б. Т. Стегній.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

### 1. Вступ

Грип відноситься до гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) та являє собою одну з найбільш значущих проблем, що стоять перед сучасною системою охорони здоров'я. Епідемічний характер захворюваності на грип обумовлює ряд проблем соціального економічного характеру. Найбільшу роль в епідеміології грипу відіграє вірус типу А, який є збудником зоонозних та антропонозних захворювань. Вірус грипу А викликав більшість пандемій, що пов'язано з особливою мінливістю його антигенної структури [1]. Мембранний глікопротеїн гемаглютинін (hemagglutinin, HA) є важливим фактором вірулентності збудника грипу А. Патогенез грипу на початкових стадіях обумовлюється HA, що зв'язується з сіаловою кислотою на клітинній поверхні [1, 2].

### 2. Літературний огляд

Розташовані на поверхні віріону молекули HA розщеплюються ендogenousними клітинними протеазами на молекули меншого розміру, HA1 та HA2, які обумовлюють вірулентність вірусу грипу [1]. У деяких типів клітин, що не мають відповідної протеази, продуктивне розмноження вірусу грипу й утворення бляшок можуть бути індуковані трипсином [3]. HA є однією із мішеней для антитіл до вірусу грипу. Антигенні відмінності по-

діляють вірус грипу А на 16 HA (1-16) субтипів, які утворюють дві групи: перша містить H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 та H16, друга – H3, H4, H7, H10, H14 та H15 субтипи.

У літературі описана висока мінливість HA, обумовлена антигенним дрейфом та шифтом вірусу грипу [3, 4]. Вплив варіабельності гемаглютиніну на властивості штамів вірусу грипу А залишається дослідженим недостатньо [5].

Досі залишається не зрозумілим, поліморфізм яких ділянок гена HA обумовлює контагіозність штамів вірусу грипу А. Також у літературі відсутня інформація щодо кореляції між поліморфізмом HA та властивостями штаму вірусу, до складу яких він входить.

### 3. Мета та задачі дослідження

Метою дослідження було виявити біоінформатичними методами поліморфізм гена HA, що кодує синтез HA, його вплив на амінокислотний поліморфізм HA та доменний склад даного білку, а також на властивості найбільш контагіозних штамів вірусів грипу А H1N1 та H7N9.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

1. Дослідити поліморфізм гена HA у штамів вірусу грипу А субтипів H1N1 та H7N9;

2. Визначити трансляцію та продукти синтезу гену *HA*, дослідити поліморфізм амінокислотних послідовностей;

3. Встановити вплив поліморфізму гену гемаглютинину (*HA*) субтипу H1N1 на поліморфізм гемаглютинину (*HA*) субтипу H7N9

#### 4. Матеріали та методи

Поліморфізм *HA* досліджувався на вибірці нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9, отриманих з Національного центру біотехнологічної інформації (National Center of Biotechnology Information, NCBI) та Європейської молекулярно-біологічної лабораторії (*European Molecular Biology Laboratory, EMBL*) [6, 7]. Поліморфізм амінокислотних послідовностей *HA* виявляли на продуктах трансляції послідовностей генів *HA*, отриманих з NCBI та EMBL. Визначення трансляції проводили за

допомогою програми MEGA 6 [8]. Кластерний аналіз та обрахування генетичних і амінокислотних дистанцій послідовностей генів *HA* і продуктів його трансляції здійснювали за алгоритмом ClustalW за допомогою програми MEGA 6 [9, 10]. Побудову дендрограми проводили методом кластеризації за найбільшою подобою (Maximum composite likelihood method, MCLM), достовірність обраховували за допомогою бут-стреп аналізу при числі реплікацій рівному 500 [2]. Достовірним вважали результат, більший за 70 [6]. Властивості *HA* виявляли шляхом визначення доменів продуктів трансляції генів *HA* за допомогою програми DELTA-BLAST [4].

#### 5. Результати та обговорення

За результатом кластерного аналізу нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 побудована дендрограма (рис. 1).

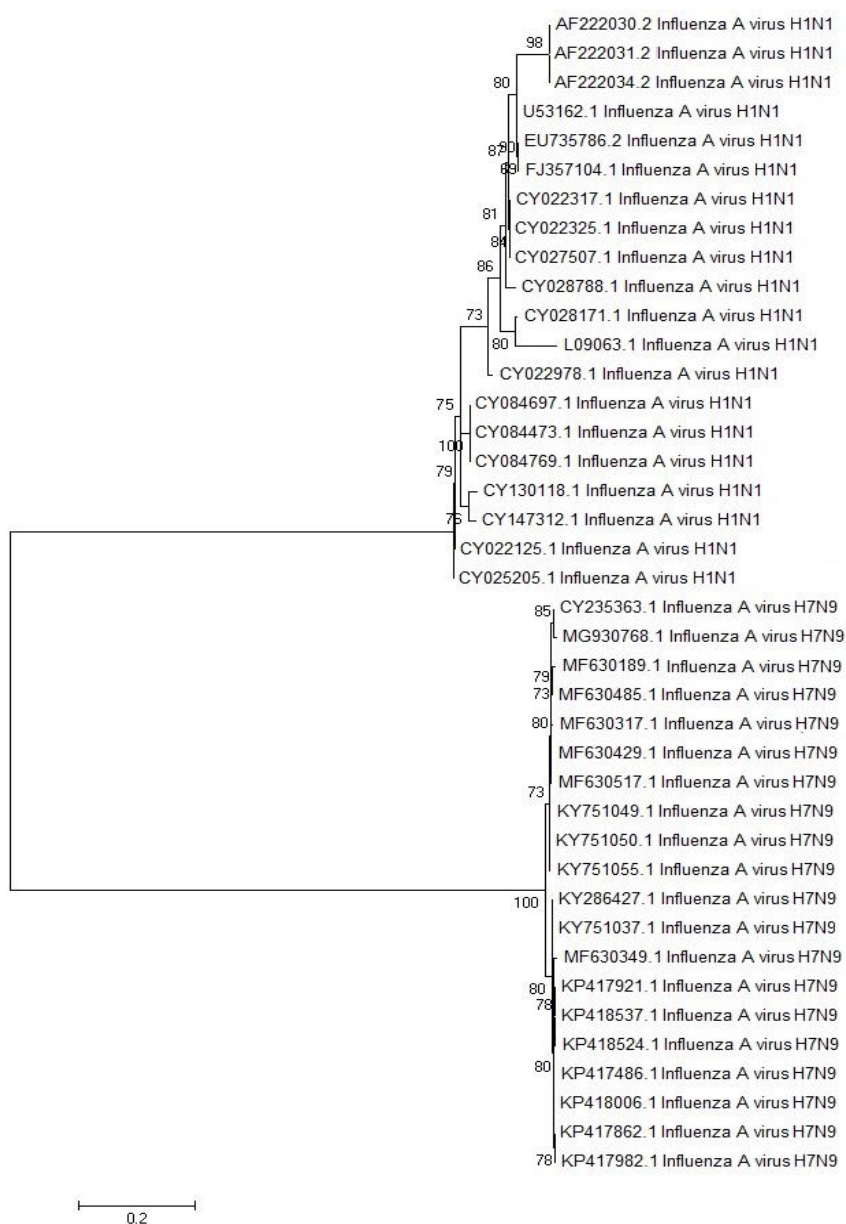


Рис. 1. UPGM – дендрограма побудована за результатами кластерного аналізу нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу при числі реплікацій рівному 500. Шкала вказує на генетичну відстань (у замінах на позицію)

Побудована дендрограма містить дві клади, одна з яких утворена нуклеотидними послідовностями гена *HA* штаму H1N1, інша – штаму H7N9. Внутрішньоштамовий поліморфізм гена *HA* вищий у штаму H1N1.

За результатом кластерного аналізу амінокислотних послідовностей *HA*, отриманих шляхом трансляції нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9, побудована дендрограма (рис. 2).

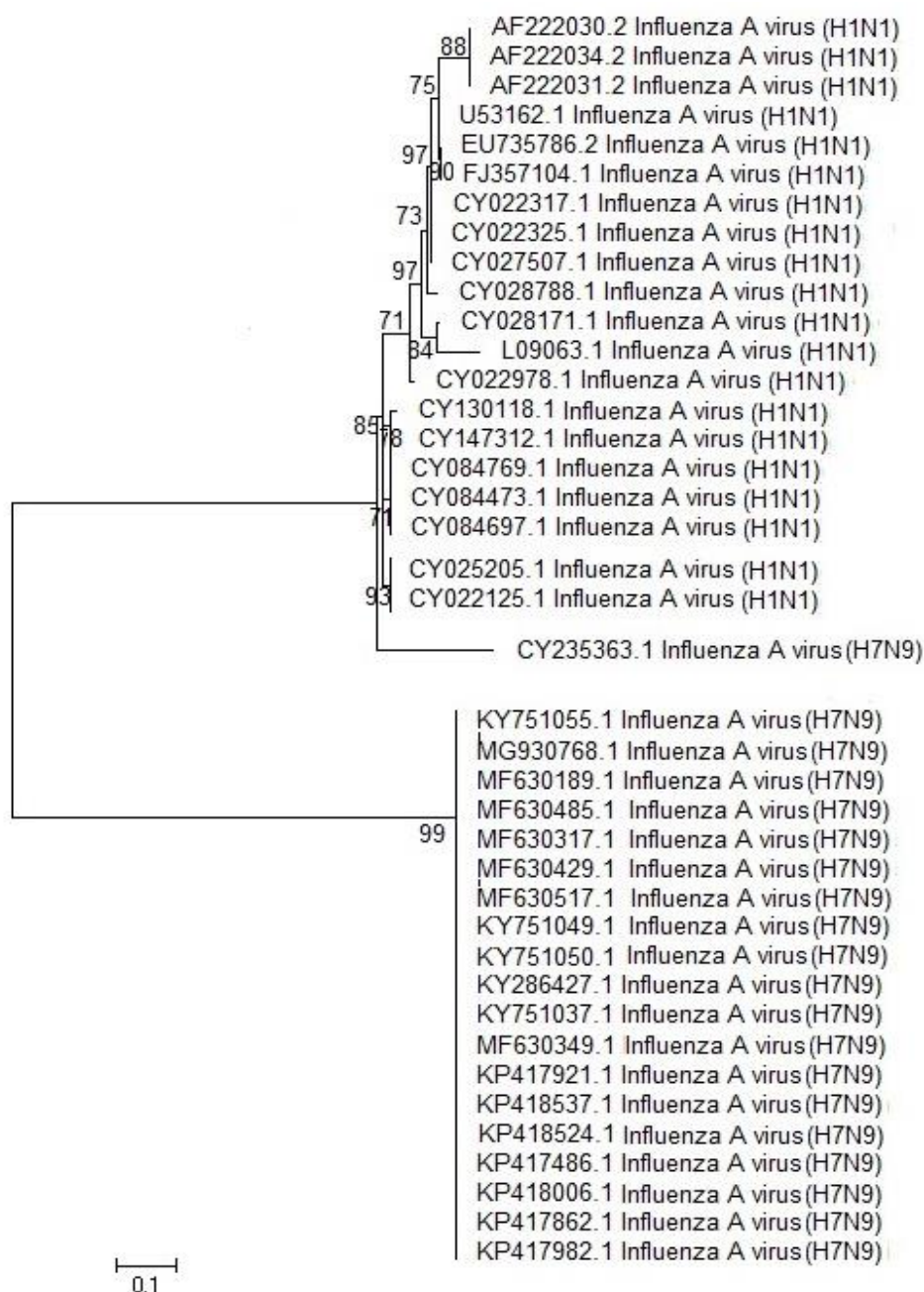


Рис. 2. UPGM – дендрограма побудована за результатами кластерного аналізу амінокислотних послідовностей *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу при числі реплікацій рівному 500. Шкала вказує на генетичну відстань (у замінах на позицію)

Побудована дендрограма містить дві клади, одна з яких утворена амінокислотними послідовностями *HA* штаму H7N9, інша – штаму H1N1 та однією послідовністю H7N9. У кладі із зразками штаму H7N9 поліморфізм *HA* відсутній. У складі з *HA* штамів H1N1 та H7N9 спостерігається незначний поліморфізм. За результатами досліджень амінокислотних послідовностей *HA* виявлено відсутність впливу на них генетичного поліморфізму більшості

зразків гена *HA* штаму H7N9. Показники бут-стреп аналізу більше за 70, що вказує на достовірність розподілу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей у отриманих дендрограмах. Розподіл нуклеотидних та амінокислотних послідовностей на отриманих дендрограмах свідчить про наявність синонімічних кодонів у гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Це підтверджується короткими амінокислотними дистанціями між послідовностями

HA та наявністю клади з послідовностями обох штамів. За результатом визначення доменів, кожен продукт трансляції генів HA утворював один домен рfam00509, який обумовлює руйнування мембрани клітини-хазяїна. Наявність загального для всіх HA домену співпадає з результатами кластерного аналізу гена HA та HA.

Результати даного дослідження є актуальними для штамів H1N1 та H7N9 і можуть відрізнятися від впливу поліморфізма гена HA на поліморфізм HA та властивості інших штамів вірусу грипу А. Попри відсутності зв'язку між поліморфізмом гена HA та поліморфізмом HA, варіабельність гена HA може впливати на швидкість його трансляції. Також поліморфізм послідовностей гена HA може формувати різні сайти рестрикції та викликати зсув рамки читування. Можлива різна швидкість трансляції, поліморфізм сайтів рестрикції та

зсув рамки читування можуть впливати на різний рівень контагіозності та патогенності у різних штамів вірусу грипу А, що робить актуальним подальші молекулярно-генетичні та біоінформатичні дослідження поліморфізму гена HA.

## 6. Висновки

1. За результатами дослідження показаний поліморфізм гена HA у штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9.

2. Визначено продукти трансляції даного гена та показаний їх поліморфізм. Результати досліджень є статистично достовірними.

3. Визначено відсутність впливу поліморфізму гена HA на поліморфізм HA та його доменовий склад і, таким чином, на властивості обох досліджуваних штамів.

## Література

1. Gamblin S. J., Skehel J. J. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins // Journal of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285, Issue 37. P. 28403–28409. doi: <http://doi.org/10.1074/jbc.r110.129809>
2. Efron B. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife // The Annals of Statistics. 1979. Vol. 7, Issue 1. P. 1–26. doi: <http://doi.org/10.1214/aos/1176344552>
3. Characterization of the Sialic Acid Binding Activity of Influenza A Viruses Using Soluble Variants of the H7 and H9 Hemagglutinins / Sauer A.-K., Liang C.-H., Stech J., Peeters B., Quéré P., Schwegmann-Wessels C. et. al. // PLoS ONE. 2014. Vol. 9, Issue 2. P. e89529. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0089529>
4. Smith T. F., Waterman M. S. Identification of common molecular subsequences // Journal of Molecular Biology. 1981. Vol. 147, Issue 1. P. 195–197. doi: [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](http://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5)
5. Brockwell-Staats C., Webster R. G., Webby R. J. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1) // Influenza and Other Respiratory Viruses. 2009. Vol. 3, Issue 5. P. 207–213. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2009.00096.x>
6. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. // Molecular Biology and Evolution. 2011. Vol. 28, Issue 10. P. 2731–2739. doi: <http://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
7. Taubenberger J. K., Kash J. C. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation // Cell Host & Microbe. 2010. Vol. 7, Issue 6. P. 440–451. doi: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>
8. Evolution and ecology of influenza A viruses / Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. // Microbiological Reviews. 1992. Vol. 56, Issue 1. P. 152–179.
9. A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties / Wilks S., de Graaf M., Smith D. J., Burke D. F. // Vaccine. 2012. Vol. 30, Issue 29. P. 4369–4376. doi: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.076>
10. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. 2004. Vol. 5, Issue 2. P. 150–163. doi: <http://doi.org/10.1093/bib/5.2.150>

Received date 26.03.2019

Accepted date 12.04.2019

Published date 30.04.2019

**Буряченко Семен Васильович**, аспірант, Відділ вивчення хвороб птиці, Національний науковий центр Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН України, вул. Пушкінська 83, м. Харків, Україна, 61023  
E-mail: [semenb837@gmail.com](mailto:semenb837@gmail.com)

**Стегній Борис Тимофійович**, доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН України, завідувач лабораторії, Лабораторія вивчення вірусних хвороб птиці, Національний науковий центр Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН України, вул. Пушкінська 83, м. Харків, Україна, 61023