

- acid-synthesizing mononuclear leukocytes. I. Increased numbers of proliferating mononuclear leukocytes in inflammatory disease // *J. Lab. Clin. Med.* – 1970. – Vol. 76. – P. 391–402.
12. *Romeis B.* Mikroskopische Technik. – Munich, 1948.
13. *Rowlands R. J., Michaud V., Heath L.* et al. African swine fever virus isolate, Georgia // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 14, N 12. – P. 1870–1874.
14. *Simon M. W.* The atypical lymphocyte // *Int. Pediatr.* – 2003. – Vol. 18, N 1.

15. *Wardley R. C., Wilkinson P. J.* The association of African swine fever virus with blood components of infected pigs // *Arch. Virol.* – 1977. – Vol. 55. – P. 327–334.
16. *Wardley R. C., Wilkinson P. J., Hamilton F.* African swine fever virus replication in porcine lymphocytes // *J. Gen. Virol.* – 1977. – Vol. 37. – P. 425–427.

Поступила 27.01.11

© Ж. С. ТЮЛЬКО, В. В. ЯКИМЕНКО, 2012
УДК 578.833.29:578.531.083.2

Ж. С. Тюлько¹, В. В. Якименко²

Корреляция изменений, возникающих в отдельных участках сегментов генома хантавирусов

¹ГОУ ВПО Омская государственная медицинская академия; ²ФГУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора

Изучали корреляции в изменениях нуклеотидной и аминокислотной последовательностей у хантавирусов генотипа Хантаан, происходящих в разных частях М- и S-сегментов. Корреляции выявляли путем сравнения замен в массивах выровненных нуклеотидных последовательностей сегментов. Были обнаружены ранее не выявленные корреляции замен нуклеотидов, локализующихся в разных (S, М) сегментах. Наличие таких корреляций может быть результатом корреляции изменений в этих сегментах, возникающей из-за особенностей третичной структуры молекул вирусной РНК.

Ключевые слова: хантавирусы, Хантаан, нуклеотидные замены, корреляции

Coordination of the Changes in Some Sites of the Hantaviral Segments

Zh. S. Tyul'ko¹ and V. V. Yakimenko²

¹ Omsk State Medical Academy, Omsk, Russia; ² Omsk Scientific-Research Institute of Natural Focal Infections, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Omsk, Russia

Correlation in the changes of the nucleotide and amino acid sequences at the Hantaan virus occurring in different parts of S- and M-segments were studied. The correlation was analyzed using comparison of substitutions in aligned nucleic sequences of the segments. Correlations of the nucleotide substitutions between S- and M-segments were observed. Probably, this coordination of the changes in both segments reflects features of the tertiary structure of RNA.

Key words: hantavirus, Hantaan, nucleotides substitutions, correlation

Хантавирусы, получившие название от вируса Хантаан, выделенного в Корее [12], образуют род *Hantavirus* в составе семейства *Bunyaviridae*. Установлено глобальное распространение хантавирусов. Природным резервуаром и переносчиками хантавирусов являются грызуны семейств мышинных (*Muridae*) и хомяковых (*Cricetidae*). Филогения хантавирусов, как правило, соответствует филогении хозяев-грызунов [14, 16].

Известны две клинические формы хантавирусной инфекции:

– геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) в Евразии. Такое название рекомендовано ВОЗ в 1982 г. [12] для единого обозначения всех заболеваний, сходных этиологически и клинически, чтобы устранить употребление многочисленных названий – синонимов этой нозологической формы (геморрагический нефрозонефрит, эпидемическая, корейская, тульская, ярославская, уральская геморрагические лихорадки, скандинавская эпидемическая

нефропатия). Возбудителями этой формы заболевания являются хантавирусы Хантаан, Пуумала, Сеул и Добрава [14, 16].

– хантавирусный пульмонарный синдром (ХПС) в Северной и Южной Америке, вызываемый хантавирусами Нью-Йорк, Син Номбре, Блэк Крик Кэнал, Бае, Андес, Лагуна Негра и др. [9]. В отличие от ГЛПС в клинической картине ХПС основным является поражение легких (интерстициальная пневмония), сопровождающееся тяжелым течением болезни.

При развитии болезней, вызываемых этими вирусами, отмечен высокий процент летальных исходов для ГЛПС – 5–10, для ХПС – 40 [1, 9], что делает необходимым более тщательное изучение закономерностей строения и эволюции этих вирусов.

Хантавирусный геном, как и геном других буньявирусов, представлен тремя сегментами однонитевой негативной РНК: L – большой, M – средний, S – малый, которые заключены в трех вну-

Контактная информация:

Тюлько Жанна Сергеевна, канд. биол. наук, ст. преподаватель; e-mail: tjs@omsk-osma.ru

трених нуклеокапсидах, окруженных липидной оболочкой [14].

S-сегмент генома кодирует 2 белка, считываемые с перекрывающихся рамок трансляции в комплементарной последовательности длиной около 1800 нуклеотидов (далее н.). Структурный белок нуклеокапсида (N-белок) закодирован в основной рамке считывания. Вторая рамка считывания имеется только у вирусов, хозяевами которых являются грызуны подсемейств Arvicolinae и Sigmodontinae, и кодирует неструктурный белок [15].

M-сегмент генома (≈ 3700 н.) последовательно кодирует в комплементарной последовательности структурные белки гликопротеинов G1, G2 и неструктурный белок [14].

L-сегмент (≈ 6550 н.) кодирует последовательность РНК-зависимой полимеразы вируса [11].

Последовательность белка нуклеокапсида хантавирусов включает чередующиеся консервативные и варьируемые участки с координатами, сохраняющимися у различных генотипов [2]. Такое постоянство координат консервативных участков, вероятно, объясняется одинаковыми основными функциями, которые они выполняют: взаимодействие с вирусными РНК и другими молекулами N-белков. Вариабельность других участков, возможно, связана с их адаптивной функцией к иммунной системе конкретного типа хозяев-грызунов [3].

Хотя трехмерная структура капсидного белка полностью не определена, он активно изучается с помощью различных косвенных методов. За последние 2 года появился ряд экспериментальных и теоретических работ, в которых исследуется как роль отдельных участков белка нуклеокапсида и гликопротеинов G1 и G2, так и ранее не известные функции этих белков, проявляющиеся в различных стадиях вирусного цикла. Например, есть сведения о кооперативном взаимодействии белка нуклеокапсида с РНК-полимеразой хантавирусов Син Номбре [9], его специфических взаимодействиях с рибосомальным белком S19 [7], а также об особенностях взаимодействия белка нуклеокапсида с белками гликопротеинов G1, G2 [8] при формировании поверхностной мембраны вирусной частицы. Кроме того, появились данные о взаимодействиях белка нуклеокапсида в составе вирусного рибонуклеопротеина с комплексом гликопротеинов G1, G2 [8, 10]. Установлена возможность существования сайтов связывания белка нуклеокапсида с цитоплазматическим хвостом G1. Считается, что такая схема может быть общей для всех буньявирусов [8, 13].

Эти данные позволяют сделать вывод о большой сложности и многообразии взаимодействий между вирусными белками нуклеокапсида и белками гликопротеинов, которые выявляются в сходстве их эволюционных путей и скоростей накопления нуклеотидных замен [3] и должны отражаться в статистических закономерностях, обнаруживаемых при изучении хантавирусных генетических последовательностей. Дополнительный статистический анализ генетических последовательностей хантавирусов позволяет представить результаты изучения структуры вирусных белков, полученных различными косвенными методами, в более достоверной форме, что важно в связи со сложностью эксперименталь-

ного изучения данных процессов у хантавирусов [1]. При этом могут обнаруживаться корреляции в изменениях нуклеотидной или аминокислотной последовательностей вирусов, происходящих в разных частях сегмента или в двух различных сегментах. Так как механизмы этих изменений не ясны, должен быть введен критерий значимости выявляемых корреляций.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись нуклеотидные последовательности малого и среднего сегментов генома хантавирусов генотипа Хантаан, полученные из банков данных (GenBank и EMBL). Коды доступа использованных последовательностей S- и M-сегментов (указаны в скобках для одних и тех же изолятов): D25530 (D25529); D25533 (D25532); U37768 (U37729); EU092220 (EU092224); AY017064 (AF345636); AF366568 (AF366569); AB027097 (AB027061); EF990915 (EF990929); EU092219 (EU092223); EF990910 (EF990924); EF990912 (EF990926); EF990913 (EF990927); EF990914 (EF990928); EU363812 (EU363815); EF990905 (EF990919); EF990906 (EF990920); EF990907 (EF990921); EF990904 (EF990918); EU092221 (EU092225); EU363810 (EU363814); EU363808 (EU363817); EU363811 (EU363816); EU363813 (EU363819); EU092218 (EU092222); EU363809 (EU363818); EF990909 (EF990923); EF990908 (EF990922); AB127998 (AB127995); AF329390 (AF035831); M14626 (M14627); AB027108 (AF143675); AF288646 (AF288645); EF595840 (GQ120966); AY839871 (EU074672).

Корреляции при изменении разных частей генетических последовательностей S- и M-сегментов выявляли путем сравнения нуклеотидных замен в массивах выровненных последовательностей [2, 4]. При сравнении символьных последовательностей в качестве меры подобия использовали значение взаимной информации – MJ [2, 4]. Удвоенное значение MJ распределено как случайная величина χ^2 , что позволяет оценить вероятность случайной взаимосвязи двух символьных последовательностей в одном испытании и выбрать значение минимального уровня взаимной информации MJ_{\min} , обеспечивающее обнаружение статистически значимой взаимосвязи последовательностей с заданной вероятностью ошибки [2, 4].

Массивы выровненных нуклеотидных последовательностей каждого вирусного генотипа проверяли на наличие связанных между собой замен в столбцах с разными координатами, отсчитываемыми от первого нуклеотида в кодирующей части последовательности, оцениваемых по уровню взаимной информации [2, 4]. В результате для каждого столбца с номером i (отсчитываемым от начала последовательности) в массиве выровненных последовательностей был получен набор значений MJ_{ij} , характеризующий возможную связь между заменами нуклеотидов этой позиции и заменами во всех других позициях последовательности (рис. 1). Полученные значения MJ_{ij} образуют двухмерную матрицу с размерностью $L \times L$, где L – длина выровненных последовательностей. Кроме теоретических расчетов, проведен эксперимент по тестированию рассчитан-

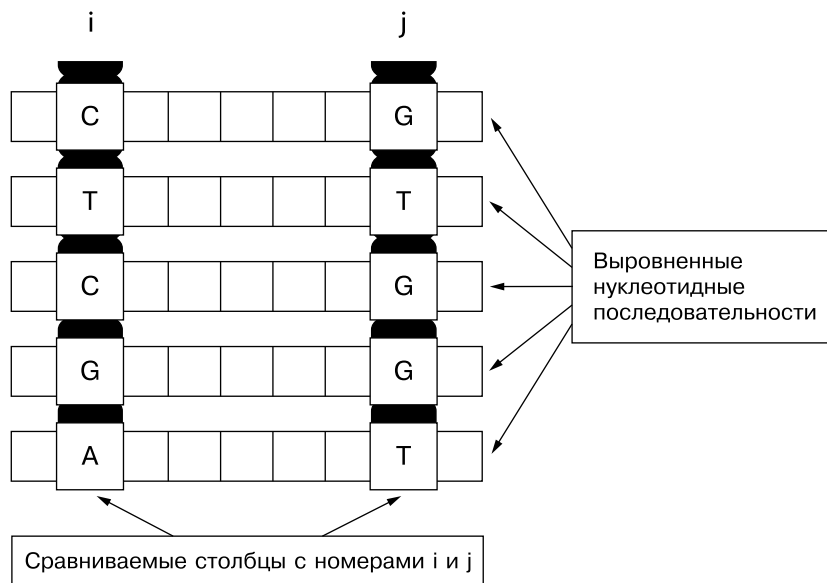


Рис. 1. Схема поиска корреляций в столбцах выровненных нуклеотидных последовательностей при анализе замен нуклеотидов.

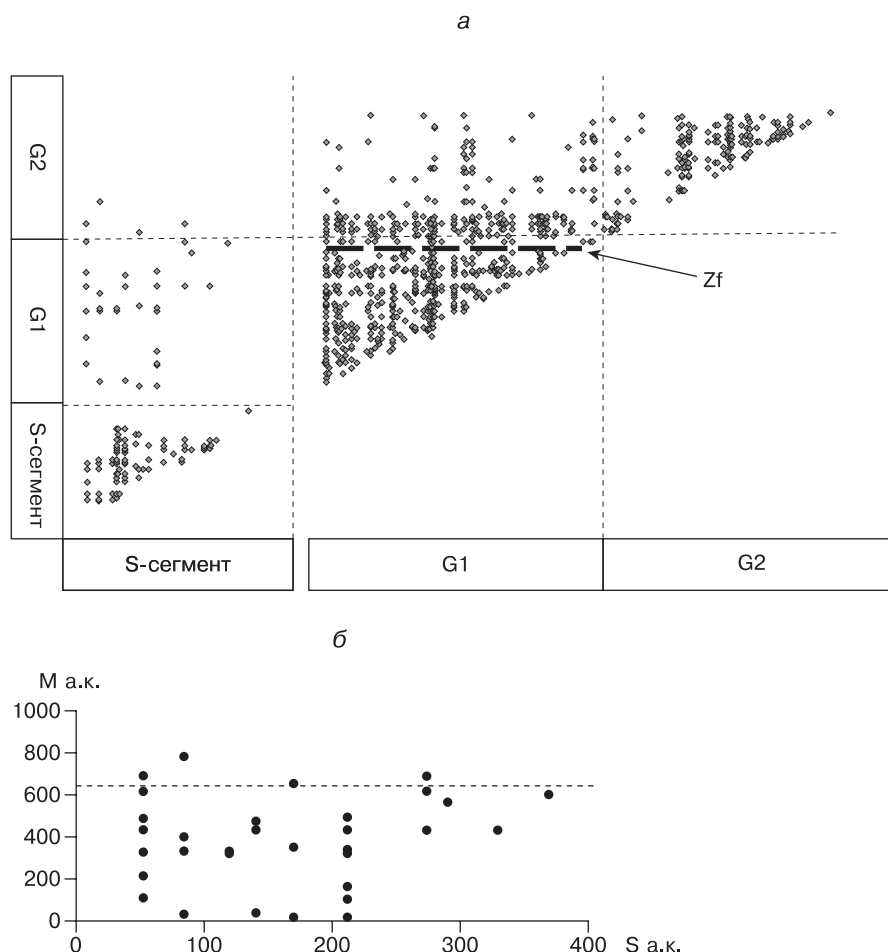


Рис. 2. Распределение обнаруженных корреляций вдоль нуклеотидных последовательностей сегментов (а).

Маркеры на схеме обозначают наличие значимых ($MJ \geq 25$) корреляций при возникновении замен в столбцах выровненных нуклеотидных последовательностей, координаты которых откладываются по горизонтальной и вертикальной оси соответственно. Прямоугольниками на осях отмечены участки, соответствующие S-сегменту, а также участки M-сегмента, кодирующие гликопротеины G1 и G2. Жирной штриховой линией отмечено положение участка M-сегмента, кодирующего последовательности домена, образованного цинковыми пальцами (Zf); распределение обнаруженных корреляций вдоль аминокислотных последовательностей S-сегмента (координаты по горизонтали) и M-сегмента (координаты по вертикали) (б). Пунктирная линия показывает границу между последовательностями гликопротеинов G1 и G2.

ных MJ_{\min} в случайном образом сгенерированном тексте.

Результаты

При анализе первичной структуры S- и M-сегментов генома хантавирусов генотипа Хантаан была получена картина распределения связанных между собой нуклеотидных замен, представленная на рис. 2. При этом статистически значимые связи наблюдали при возникновении как нуклеотидных замен внутри одного и того же сегмента, так и нуклеотидных замен, расположенных в разных сегментах (см. рис. 2, а, б). Полученное распределение корреляций при возникновении нуклеотидных замен внутри S-сегмента соответствует распределению корреляций, выявленному ранее при анализе меньшего числа нуклеотидных последовательностей [4]. Внутри M-сегмента отмечены также корреляции между заменами, локализуемыми в пределах нуклеотидной последовательности, кодирующей G1, и заменами, возникающими в пределах нуклеотидной последовательности, кодирующей гликопротеин G2 (см. рис. 2, а). Корреляции между заменами нуклеотидов, расположенных в разных сегментах генома (S- и M-сегменты), обнаружены впервые и, вероятно, отражают согласованность изменений, происходящих в этих сегментах.

Обсуждение

Возможность согласованных изменений S- и M-сегментов генома хантавирусов генотипа Хантаан, выявленную в виде корреляций, наблюдаемых при возникновении нуклеотидных замен в отдельных участках первичных последовательностей этих сегментов, можно объяснить одинаковую скорость накопления нуклеотидных замен, приписываемую S- и M-сегментам генома хантавирусов [14]. Как показывают исследования, проведенные для хантавирусов генотипа Тула [8], центральная многофункциональная часть N-белка, соответствующая аминокислотам (далее а. к.) с номерами 80–248, отвечает за взаимодействие с цитоплазматической частью G1, которое необходимо для успешной самосборки вирусной частицы. В проведенном нами исследовании именно в этой части последовательности S-сегмента наблюдается наибольшее количество корреляций с последовательностью M-сегмента, кодирующей белок гликопротеина G1 (см. рис. 2, б).

Кроме того, аминокислоты N-белка с номерами 175–196 а. к. обеспечивают специфичность распознавания вирусной РНК при связывании ее с N-белком [17]. Удаление их из последовательности не позволяет N-белку эффективно связываться с вирусной РНК. Поэтому можно предположить, что выявляемые корреляции нуклеотидных замен отражают особенности третичной структуры молекул РНК, необходимые для правильного пространственного расположения структур, используемых в распознавании.

Распределение корреляций внутри М-сегмента подтверждает эту точку зрения. Наибольшее число корреляций, обнаруженных внутри М-сегмента (см. рис. 2, а, б), приходится на нуклеотидную последовательность, кодирующую G1, и начало нуклеотидной последовательности, кодирующей G2. При этом участок в нуклеотидной последовательности G1, содержащий такой компактный домен, как комплекс двух цинковых пальцев, не взаимодействующих с РНК [6, 8], оказался свободным от наличия корреляций, в то время как сайты связывания с белком нуклеокапсида, между которыми он расположен, характеризуются наличием многочисленных корреляций (см. рис. 2, б). Классические цинковые пальцы в белках представляют собой РНК- и ДНК-связывающие домены, однако у хантавирусов более вероятным считается их участие в белок-белковых взаимодействиях. Предполагается также, что хвост нуклеотидной последовательности G1, кодирующей часть белка, соответствующую цинковым пальцам, важен при взаимодействиях типа хозяин-вирус [5, 6] и при самосборке вирусных частиц [6], обеспечивая формирование рибонуклеопротеинового комплекса.

Известно также, что конец последовательности G1 подвергается деградации, происходящей при связывании убикитина и протеолитическом расщеплении в случае хантавирусов, вызывающих патологию, что позволяет регулировать их активность в организме хозяина, в то время как у непатогенных вирусов он сохраняется и стабилен [6]. Именно на эту часть G1 приходится большинство корреляций, связывающих S- и М-сегменты, поэтому можно предположить, что механизмом такой регуляции является нарушение имеющейся схемы корреляций, которое приводит к менее эффективной продукции вирусных частиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Слонова Р. А. и др. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. – Владивосток, 2006.
2. Тюлько Ж. С., Якименко В. В. Изучение филогенетических отношений хантавирусов с применением метода вычисления взаимной информации (на примере Хантаан-подобных вирусов // Хантавирусы и хантавирусные инфекции. – Владивосток, 2003. – С. 173–181.
3. Тюлько Ж. С., Якименко В. В. К вопросу о темпах эволюции хантавирусов генотипа Пуумала // Тихоокеан. мед. журн. – 2008. – № 2. – С. 28–32.
4. Тюлько Ж. С., Якименко В. В. Связанные замены в малом сегменте генома хантавирусов Старого света // Вопр. вирусол. – 2008. – № 3. – С. 28–34.
5. Alff P. J. et al. The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation // J. Virol. – 2008. – Vol. 82. – P. 9115–9122.
6. Estrada D. F. et al. The hantavirus glycoprotein G1 tail contains dual CCHC-type classical zinc fingers // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 8654–8660.
7. Haque A., Mir M. A. Interaction of hantavirus nucleocapsid protein (N) with ribosomal protein S19 // J. Virol. – 2010. – Vol. 84, N 23. – P. 12450–12453.
8. Hepojoki J. et al. Cytoplasmic tails of hantavirus glycoproteins interact with the nucleocapsid protein // J. Gen. Virol. – 2010. – Vol. 91. – P. 2341–2350.
9. Hjelle B., Torres-Pérez F. Hantaviruses in the Americas and their role as emerging pathogens // Viruses. – 2010. – Vol. 2. – P. 2559–2586.
10. Huiskonen J. T. et al. Electron cryo-tomography of Tula hantavirus suggests a unique assembly paradigm for enveloped viruses // J. Virol. – 2010. – Vol. 84. – P. 4889–4897.
11. Kukkonen S. K. J., Vaehri A., Plyusnin A. Completion of the Tula hantavirus genome sequence: properties of the L segment and heterogeneity found in the 3' termini of S and L genome RNAs // J. Gen. Virol. – 1998. – Vol. 78. – P. 2615–2622.
12. Lee H. W., Lee P. W., Johnson K. M. Isolation of the Hantaan virus, etiological agent of Korean hemorrhagic fever // J. Infect. Dis. – 1978. – Vol. 137. – P. 298–308.
13. Overby A. K., Pettersson R. F., Neve E. P. A. The glycoprotein cytoplasmic tail of uukuniemi virus (Bunyaviridae) interacts with ribonucleoproteins and is critical for genome packaging // J. Virol. – 2007. – Vol. 81. – P. 3198–3205.
14. Plyusnin A. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. Brief review // Arch. Virol. – 2002. – Vol. 147. – P. 665–682.
15. Plyusnin A. et al. Transfection-mediated generation of functionally competent Tula hantavirus with recombinant S RNA segment // EMBO J. – 2002. – Vol. 21, N 6. – P. 1479–1503.
16. Sironen T., Vaehri A., Plyusnin A. Molecular evolution of puumala hantavirus // J. Virol. – 2001. – Vol. 75, N 23. – P. 11803–11810.
17. Xu X. et al. The RNA binding domain of the hantaan virus N protein maps to a central, conserved region // J. Virol. – 2002. – Vol. 76, N 7. – P. 3301–3308.

Поступила 08.06.11