

ВЫЯВЛЕНИЕ СТЕПЕНИ КОНСЕРВАТИВНОСТИ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА SPIKE-ГЛИКОПРОТЕИНА SARS-COV-2 МЕТОДОМ МНОЖЕСТВЕННОГО ВЫРАВНИВАНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Логвин Ф.И. (Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины)

Научный руководитель - доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, к.в.н. Приходько Е.И. (Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины)

Аннотация. Одной из проблем в борьбе с SARS-CoV-2 является его высокая мутационная способность. В данной работе рассматривается метод множественного выравнивания аминокислотных последовательностей RBD коронавируса как способ подтверждения и определения степени его консервативности.

Введение. В начале 2020 года произошло событие, полностью перевернувшее жизнь каждого человека, изменившее весь мир, с которым мы продолжаем бороться - глобальная пандемия, вызванная появлением нового вируса SARS-CoV-2 семейства Coronaviridae, возбудителя заболевания covid-19.

Вирус SARS-CoV-2 имеет ss(+)РНК геном, является оболочечным, то есть имеет оболочку из билипидного слоя, в которую интегрированы E, M и S белки. В геноме выделяют большую открытую рамку считывания 1, состоящую из двух перекрывающихся областей (ORF1ab), несколько небольших открытых рамок считывания (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF10) и гены S, E, M и N. Известно, что все РНК-содержащие вирусы, в том числе и геном SARS-CoV-2 значительно подвержены мутациям при репликации.

Для проникновения вирусной частицы в клетку вирус использует Spike-гликопротеин (S белок). Он имеет вид шипообразной структуры с головкой и состоит из трех идентичных по химической и пространственной организации полипептидных нитей, расположенных вдоль общей оси симметрии. Каждая нить состоит из 1281 аминокислотного остатка. На ней различают S1 и S2 субъединицы. S1 субъединица (составляет головку) несет NTD (N-terminal domain) и RBD (receptor-binding domain, рецептор-связывающий домен). При контакте вирусной частицы с клеткой-хозяина RBD связывается с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ2, англ. ACE2) и использует его как точку входа.

В связи с высокой изменчивостью генома SARS-CoV-2, при разработке эффективных компонентов реакций для ИХА, ИФА, праймеров для ПЦР необходимо знать, какие вирусные структуры являются консервативными, т.е. не подвержены изменчивости.

Считается, что аминокислотная последовательность S1 субъединицы Spike-гликопротеина (а, соответственно, и нуклеотидная последовательность участка гена S белка) - RBD высоко консервативна, поскольку изменения в ней зачастую могут приводить к неспособности вируса проникать в клетку. Кроме того, к Spike-гликопротеину образуется самый высокий уровень IgA и IgG-антител. Следовательно, RBD является подходящим кандидатом для участия в разработке диагностических наборов для SARS-CoV-2.

Цель работы - определить степень консервативности RBD Spike-гликопротеина SARS-CoV-2 и наиболее консервативные его участки методом множественного выравнивания аминокислотных последовательностей.

Задачи, которые нам пришлось решить:

- 1) определение объема выборки и отбор образцов;
- 2) выбор инструмента для анализа;
- 3) интерпретация результатов;

4) предложение для использования полученных результатов в диагностических реакциях.

Материалы и методы. В качестве базы данных, из которой был проведен отбор исследуемых образцов, был использован National Center for Biotechnology Information (NCBI). На момент проведения работы в базе данных находилось 34164 образца. Было отобрано 380 образцов во временном интервале регистрации с 26.05.2020 по 30.10.2020.

В качестве инструмента для проведения множественного выравнивания был выбран T-Coffee, представленный на European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Матрица сравнения - BLOSUM62.

Результаты. Было показано, что общая идентичность всех образцов Spike-гликопротеина крайне высока (>99%), присутствующие замены незначительны. Если рассматривать RBD участок, то в его аминокислотной структуре наиболее консервативными фрагментами являются Арг338 - Гли495 и Тре542 - Фен560 (0 замен аминокислотных остатков в выборке). Наиболее значимой (в соответствии с матрицей сравнения) на участке RBD является замена Аспарагина на Тирозин в позиции 520 (обнаружена в 6 образцах).

Выводы и обсуждения. Согласно результатам исследования, RBD участок действительно весьма консервативен, хотя в одном его фрагменте имеет место быть аминокислотный полиморфизм. Вероятно, это связано с не первостепенной ролью этого фрагмента во взаимодействии RBD с рецепторами ACE2.

Фрагменты, не имеющие замен, могут послужить основой для разработки новых диагностических эффективных тест систем - ИХА, ИФА.

Поскольку выявленные фрагменты не подвержены изменениям, то антитела, полученные к антиген-детерминантам, расположенным на них, будут высоко специфичны к вирусным частицам независимо от штамма и генотипа вируса. Этот факт делает возможным получение к данным фрагментам моноклональных антител, которые могут быть широко использованы не только в диагностических, но и в терапевтических целях.

Также результаты нашего исследования могут быть интерпретированы для использования при синтезе праймеров для ПЦР.