Медицинская иммунология
2010, Т. 12, № 1-2, стр. 115-124
© 2010, СПб РО РААКИ

ПОЛНОРАЗМЕРНЫЙ ПЕПТИДНЫЙ АНАЛИЗ АНТИГЕННОГО ПРОФИЛЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ СИБИРСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Гражданцева А.А.[1], Сиволобова Г.Ф.[1], Major M.[2], Чуб Е.В.[1], Швалов А.Н.[1], Юдин П.В.[1], Нетесов С.В.[1, 3], Локтев В.Б.[1, 3], Кочнева Г.В.[1]

1. ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., г. Кольцово
2. Центр по оценке и исследованиям биологических препаратов, Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США, Мэриленд, г. Бетезда
3. ГОУ ВПО «Новосибирский государственный университет», г. Новосибирск

Резюме. С помощью панели перекрывающихся синтетических пептидов изучены антигенные профили поверхностных гликопротеинов вируса гепатита С (ВГС) трех генотипов 1b, 2a/2c и 3a, которые наиболее широко распространены на территории России, и в частности в г. Новосибирске. Показано, что общие для всех генотипов ВГС высокоиммуногенные пептидные эпитопы белков E1 и E2 расположены в позициях аминокислот 250-260, 315-325 (E1-белок), 390-400 (гипервариабельный район 1), 430-440 и 680-690 (E2-белок). Наибольшие межгенотиповые различия регистрируются в позициях 280-290, 410-430 и 520-540. В районе 280-290 ак белка E1 выявлена новая антигенная детерминанта, характерная только для 2a/2c генотипа ВГС. Широкое варьирование границ большинства эпитопов свидетельствует о высокой изменчивости вирусных белков E1 и E2. Однако схожесть репертуара антивирусных антител, индуцированных разными генотипами ВГС, свидетельствует о возможности создания принципиально новых универсальных вакцин против ВГС на основе картированных антигенных районов белков E1 и E2.

Ключевые слова: вирус гепатита С, генотип, пептидный анализ, антигенная детерминанта.

Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Major M., Chub E.V., Shvalov A.N., Yudin P.V., Netesov S.V., Loktev V.B., Kochneva G.V.

FULL-LENGTH PEPTIDE ASSAY OF ANTIGENIC PROFILE OF ENVELOPE PROTEINS FROM SIBERIAN ISOLATES OF HEPATITIS C VIRUS

Abstract. Antigenic profiles of envelope glycoproteins of hepatitis C virus presented by three genotypes 1b, 2a/2c and 3a, which are most widespread in the territory of Russia and, in particular, in Novosibirsk, were studied using a panel of overlapping synthetic peptides. It was shown that highly immunogenic peptide epitopes of E1 and E2 proteins common for all HCV genotypes, are located in amino acid positions 250-260, 315-325 (E1 protein), 390-400 (hypervariable region 1), 430-440, and 680-690 (E2 protein). The greatest inter-genotypic differences were recorded in positions 280-290, 410-430 and 520-540. A novel antigenic determinant was detected in the region of aa 280-290 of the E1 protein which was typical only for HCV 2a/2c genotype. A broad variation in the boundaries for the most epitopes suggests a high variability of the E1 and E2 viral proteins; however, a similar repertoire of antibodies induced by different HCV genotypes indicates to an opportunity of designing a new generation of cross-reactive HCV vaccines based on mapping of the E1 and E2 antigenic regions. ***(Med. Immunol., vol. 12, N 1-2, pp 115-124)***

Keywords: hepatitis C virus, genotype, peptide analysis, antigenic determinant.

Адрес для переписки:
Кочнева Галина Вадимовна,
ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Новосибирская обл., г. Кольцово.
Тел.: (383) 336-73-17.
Факс: (383)336-74-09.

Введение

Вирус гепатита С (ВГС) является строго антропонозным агентом и вызывает у человека тяжелый вирусный гепатит с возможным прогрессированием в цирроз или первичный рак печени. Характерной особенностью гепатита С является развитие хронических форм заболевания в 75-80% случаев и чрезвычайно высокая вариабельность вируса [6, 17]. Постоянное образование новых антигенных вариантов ВГС в организме инфицированного человека позволяет вирусу ускользать от защитного ответа иммунной системы [2]. Показано, что в организме хронически инфицированного ВГС человека образуется большое количество противовирусных антител как к структурным белкам С, Е1 и Е2, так и неструктурным NS2, NS3, NS4 и NS5 [4, 7, 9, 19]. Роль антител в патогенезе ВГС инфекции не ясна, однако ряд антител к поверхностным белкам ВГС обладает вируснейтрализующей активностью [11, 25], что свидетельствует о важности изучения иммуногенных свойств данных белков для создания средств профилактического и терапевтического контроля инфекции.

Неравнозначность участков поверхностных белков Е1 и Е2 ВГС в индукции иммунного ответа была отмечена в целом ряде работ [4, 10, 15]. Кроме того, эти белки образуют на поверхности вириона гетеродимер и формируют составные антигенные детерминанты, часть которых представлена фрагментом белка Е1, а часть – белка Е2 [14]. Наиболее антигенно значимым участком белка Е1 является район, включающий 192-211 ак N-концевой части молекулы, и участок 313-327 ак, прилегающий к гидрофобному домену на С-конце белка Е1 [8, 11]. В составе белка Е2 обнаружены два гипервариабельных района HRV1 (384-410 ак) и HRV2 (474-482 ак), антитела к которым обладают выраженной вируснейтрализующей активностью [5, 18].

В настоящее время описано 6 основных генотипов ВГС с уровнем гомологии 65,7-68,9%, более 100 субтипов с уровнем гомологии 76,9-80,1 и миллионы постоянно образующихся внутри каждого инфицированного организма квазивидов с уровнем гомологии 90,8-99% [3, 20]. Наиболее интенсивно мутациям подвергаются поверхностные гликопротеины Е1 и Е2 [22], поэтому для создания универсальной вакцины, мониторинга инфекции, диагностики и лечения принципиально важно выявить общие закономерности антигенной структуры и уровень антигенной вариабельности основных иммуногенных доменов поверхностных гликопротеинов ВГС.

Одним из возможных подходов для анализа антигенного профиля гликопротеинов Е1-Е2 ВГС является использование библиотеки синтетических пептидов, перекрывающих аминокислотную последовательность этих белков, и различных панелей ВГС-позитивных сывороток человека. Пептиды, специфически реагирующие с ВГС-позитивными сыворотками, могут быть использованы для совершенствования диагностики инфекции и для индукции антивирусных иммуноглобулинов в качестве возможных компонентов вакцин.

Целью настоящей работы является сравнительное сканирование антигенно-значимых детерминант поверхностных белков ВГС с использованием генотип-специфической панели ВГС-позитивных сывороток, полученных от хронических больных в г. Новосибирске, и набора синтетических пептидов, перекрывающих полную последовательность гетеродимера Е1Е2 (192-809 ак) и рассчитанных на основе структуры изолята ВГС генотипа 1а.

Материалы и методы

Сыворотки крови. Образцы сывороток крови были получены от пациентов ГУЗ Государственный новосибирский областной клинический диагностический центр, г. Новосибирск, с диагнозом «хронический гепатит С». Панель сывороток включала 45 образцов, собранных в период с 1 января по 31 декабря 2008 года. Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (ред. Указ Президента РФ от 24.12.1993 N 2288, Федеральные законы от 02.03.1998 № 30-ФЗ, от 20.12.1999 № 214-ФЗ). Забор крови проводили только после получения письменного информированного согласия пациента, как описано ранее [1]. Исследование одобрено этическим комитетом ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Диагностика антител к ВГС. Наличие антител к ВГС класса G в сыворотке крови определяли с использованием коммерческих тест-систем «D-0751 РекомбиБест анти-ВГС» и «D-0756 РекомбиБест анти-ВГС подтверждающий тест» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) в соответствии с инструкцией производителя. Данные тест-системы выявляют антитела к ко́ровому и неструктурным белкам ВГС, но не детектируют антитела к поверхностным Е1- и Е2-белкам.

Количественный анализ РНК ВГС. Количественное определение РНК ВГС проводили с использованием наборов реагентов «TR-V1-M (RG, iQ, Mx) АмплиСенс HCV-Монитор-FRT» (ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии», г. Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Генотипирование изолятов ВГС. Генотип ВГС определяли на основе анализа фрагмента

5'UTR-области генома вируса. Для этого проводили амплификацию указанного района генома, как описано в работе [1], с последующим секвенированием полученного фрагмента. Секвенирование проводили по методу CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing на автоматическом секвенаторе CEQ2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter Inc., USA). Последовательности всех амплифицированных фрагментов определяли по обеим цепям синтезированной ДНК.

Полученные последовательности, а также прототипные последовательности известных генотипов, депонированные в базе данных GenBank, использовали для проведения филогенетического анализа при помощи метода UPGMA. Критерием отнесения исследуемого изолята к определенному генотипу являлось попадание последовательности этого изолята в ветвь филогенетического дерева, включающую также последовательности прототипных изолятов данного генотипа, и не включающую прототипные последовательности других генотипов. Индексы статистической поддержки узлов дерева вычисляли в тесте bootstrap с 500 репликациями.

Пептидный анализ. Набор синтетических перекрывающихся пептидов, охватывающий полную последовательность белков E1 и E2 ВГС (192-809 ак), был синтезирован в фирме Mimotopes LTD (Австралия). Структура пептидов рассчитана на основе аминокислотной последовательности штамма H77 ВГС, генотип 1a. Набор состоит из 76 пептидов. Пептиды на N-конце несут ковалентно связанный биотин для сорбции на планшете с подложкой из стрептавидина (первый пептид содержит биотин на C-конце) и последовательность SGSG, которая выступает в качестве разделительного звена при прикреплении пептида к поверхности планшета через биотин-стрептавидиновый комплекс. В таблице 1 представлена структура пептидов и позиции пептидов, начиная с первой аминокислоты белка E1, 192 ак, и заканчивая 809 ак на геномном полипротеине. Пептиды 2-75 имеют длину 20 аминокислотных остатков, первый пептид – 19 ак. Перекрывание пептидов, за исключением концевых, составляет 12 ак, благодаря чему при сканировании каждая последовательность представлена 2-3 раза.

Иммуноферментный анализ с использованием в качестве антигенов синтетических пептидов проводили в соответствии с протоколом, предоставленным фирмой Mimotopes LTD (Австралия). Кратко:

– *Сорбция стрептавидина.* Исходный раствор стрептавидина (Sigma, США, кат. № C-4762, 2 мг/мл) разводили деионизованной водой 1:400 до концентрации 5 мкг/мл, помещали по 100 мкл раствора в лунку 96-луночного планшета (SP. Lifescience, Республика Корея) и высушивали в течение 20 ч при 37 °C. Места неспецифической сорбции блокировали последующей обработкой планшета раствором 5% обезжиренного молока в фосфатно-солевым буфере pH 7,4, ФСБ (Gibco, Cat. 18912-014).

– *Сорбция пептидов.* Лиофилизованные пептиды тщательно, осторожно, исключая взаимную контаминацию, растворяли в свежеперегнанном диметилформамиде до концентрации 5 мг/мл. По 100 мкл раствора каждого пептида в разведении 1:500 в ФСБ помещали в лунку покрытого стрептавидином планшета, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере, затем планшеты промывали 5 раз ФСБ с добавлением 0,1% Tween 20 (Sigma, Cat. P1379) (ФСБ / Tween 20).

– *Связывание сывороток и проявление результатов.* Сыворотки пациентов в разведении 1:800 в ФСБ / Tween 20 / 5% молока вносили по 100 мкл в лунку и инкубировали в течение 20 ч при 4 °C, затем планшеты отмывали 5 раз раствором ФСБ / Tween 20. В качестве вторичных антител использовали козьи антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена (KPL, Cat. 074-1006) в рабочем разведении 1:2700 в ФСБ / Tween 20 / 5% молока и инкубировали при 20 °C в течение 1 часа на шейкере. Планшеты отмывали 5 раз ФСБ / Tween 20 и дважды только ФСБ для удаления следов детергента. Связавшиеся антитела визуализировали реакцией со свежеприготовленным раствором субстрата ТМБ (ЗАО «Вектор-Бест», г. Кольцово, Россия). Останавливали реакцию раствором 2М серной кислоты. Регистрацию результатов проводили на спектрофотометре SpectraCount, Packard BioScience Company, USA, оптическую плотность (ОП) измеряли при соотношении длин волн 450/620 нм. ИФА для каждой сыворотки проводился по крайней мере дважды. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки людей, не имеющих маркеров ВГС.

При проведении ИФА для контроля связывания пары стрептавидин-биотин использовали систему из положительного Biotin-SGSG-KPLAQ-NH2 и отрицательного Biotin-SGSG-GLAQ-NH2 контрольных пептидов и мышиных моноклональных антител (Mimotopes, LTD, Австралия, cat. IMX-BP-C-ABY) со специфичностью KPLaq, которые входили в состав пептидного набора.

Результаты и обсуждение

Характеристика обследуемой группы. Исследуемые образцы крови получены от жителей г. Новосибирска с длительной (не менее 3 лет) хронической инфекцией ВГС. Возраст участников исследования составил 18-35 лет с примерно

равным соотношением мужчин и женщин. Часть участников призналась во внутривенном употреблении наркотических препаратов. В образцах крови всех пациентов с использованием коммерческого ИФА были выявлены антитела класса IgG против белка Core и неструктурных белков NS3, NS4 и NS5. Вирусная нагрузка составила 10^4-10^6 копий РНК ВГС/мл сыворотки при определении методом количественной ОТ-ПЦР с праймерами на консервативную 5'UTR-область генома ВГС.

Определение генотипа исследуемых изолятов ВГС проводили при помощи филогенетического анализа последовательности 5'UTR-области генома ВГС (рис. 1). Данная область, несмотря на высокий уровень консервативности, является достаточно информативной для дифференциации генотипов и большинства субтипов ВГС [16, 17]. По результатам анализа в коллекцию сывороток, использованную далее в нашей работе, были отобраны образцы, содержащие ВГС трех генотипов – 1b, 2a/2c (использованный метод не позволяет дифференцировать эти два субтипа) и 3a, которые наиболее широко распространены на территории России, и в частности в г. Новосибирске. Каждая генотипическая группа сывороток включала 15 образцов.

Пептидное сканирование антигенных детерминант нативных поверхностных белков E1 и E2 ВГС. На рисунке 2 представлены результаты ИФА с набором синтетических пептидов трех ВГС-позитивных и одной контрольной (6 образцов) групп сывороток. На рисунке видно, что разброс значений оптической плотности (ОП) при анализе разных сывороток очень велик. Минимальное значение варьирует от 0,05 до 0,66 (mean±SD = 0,18±0,11), а максимальное – от 0,77 до 2,22 (1,87±0,40). Такой разброс, по-видимому, является следствием индивидуальных особенностей иммунного ответа, степенью поражения печени, нарушениями обмена веществ, сопутствующими заболеваниями и др. Уровень ОП контрольных ВГС-негативных сывороток (рис. 2) варьировал от 0,046 до 0,5 (0,19±0,073) на протяжении всей сканированной последовательности E1- и E2-белков ВГС, что свидетельствует об отсутствии специфического связывания.

Для увеличения репрезентативности антигенных профилей и нивелирования колебаний неспецифических фоновых значений ОП индивидуальных сывороток в пептидном анализе мы использовали следующий алгоритм обработки результатов (все расчеты проводили в среде программного обеспечения «LabView»):

1. На первом этапе нами было проведено нормирование данных пептидного ИФА в рамках максимального и минимального значений ОП для каждой сыворотки. При этом минимальное значение ОП каждой сыворотки рассматривали как фон и считали равным 0, а максимальное значение приравнивали к 2, т.е. как бы «растягивали» по шкале 0-2 (стандартный диапазон значений ОП в ИФА). Коэффициент нормирования для разных сывороток варьировал от 0,96 до 3,23 со средним значением 1,31±0,56.

2. Для корректного сравнения нормализованных значений ВГС-позитивных сывороток с контрольными негативными образцами все значения ОП последних были умножены на коэффициент 1,31 (средний коэффициент нормирования ВГС-позитивных сывороток, см. выше).

3. Затем для каждого пептида рассчитывали среднее значение ОП внутри группы сывороток одного генотипа ($ОП_{A1/1b}$; $ОП_{A1/2a2c}$; $ОП_{A1/3a}$ и т.д.).

4. В связи с тем, что пептидный анализ носит ступенчатый характер (в нашем случае размер «ступени» составляет 8 ак) и не позволяет строго картировать антигенные детерминанты в соответствии с позициями определенных аминокислот на полипротеине E1E2 ВГС, нами была проведена теоретическая оценка антигенной активности каждой аминокислоты тестируемых E1- и E2-белков ВГС (ОПак) с учетом количества пептидов, в которых она участвует в пептидном анализе:

– если аминокислота, соответствующая определенной позиции в полипротеине E1E2, встречается 1 раз в пептидном анализе (первые 8 ак 192-199 и последние 6 ак 804-809, см. табл. 1), то для определения ОПак такой аминокислоты в каждой генотипической и контрольной группах сывороток использовали среднее значение ОП соответствующего пептида (соответственно A1 или D10, см. табл. 1). Например, $ОП_{192/1b} = ОП_{A1/1b}$ или $ОП_{804/2a2c} = ОП_{D10/2a2c}$;

– если аминокислота встречается 2 раза в пептидном анализе (например, позиции 200-207, 212-215, 220-223 и т.д., см. табл. 1), мы делали допущение, что ее активность реализуется одинаково в обоих пептидах и определяли ОПак как среднее значение ОП соответствующих двух пептидов в каждой генотипической и контрольной группах сывороток. Например, $ОП_{200/1b} = (ОП_{B1/1b} + ОП_{C1/1b})/2$;

– если аминокислота встречается 3 раза в пептидном анализе (например, позиции 208-211, 215-219, 224-227 и т.д., см. табл. 1), то аналогично предыдущему пункту значение ее ОПак определяли как среднее значение ОП соответствующих трех пептидов в каждой генотипической и контрольной группах сывороток. Например, $ОП_{216/1b} = (ОП_{B1/1b} + ОП_{C1/1b} + ОП_{D1/1b})/3$.

Такой подход уменьшает размер «ступеней» в перекрывающемся пептидном анализе до 4 ак и позволяет наложить профиль

Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе UPGMA-анализа последовательностей области 5'UTR генома ВГС

Примечание. Размер последовательностей составил 240 нуклеотидов. Изоляты, полученные нами, отмечены жирным шрифтом. Для прототипных последовательностей указаны субтипы и уникальные шифры базы данных GenBank. Крупными цифрами (1-6) отмечены узлы, соответствующие предполагаемым общим предкам генотипов. Приведены индексы статистической поддержки узлов, превышающие 60, а также масштаб шкалы генетических расстояний.

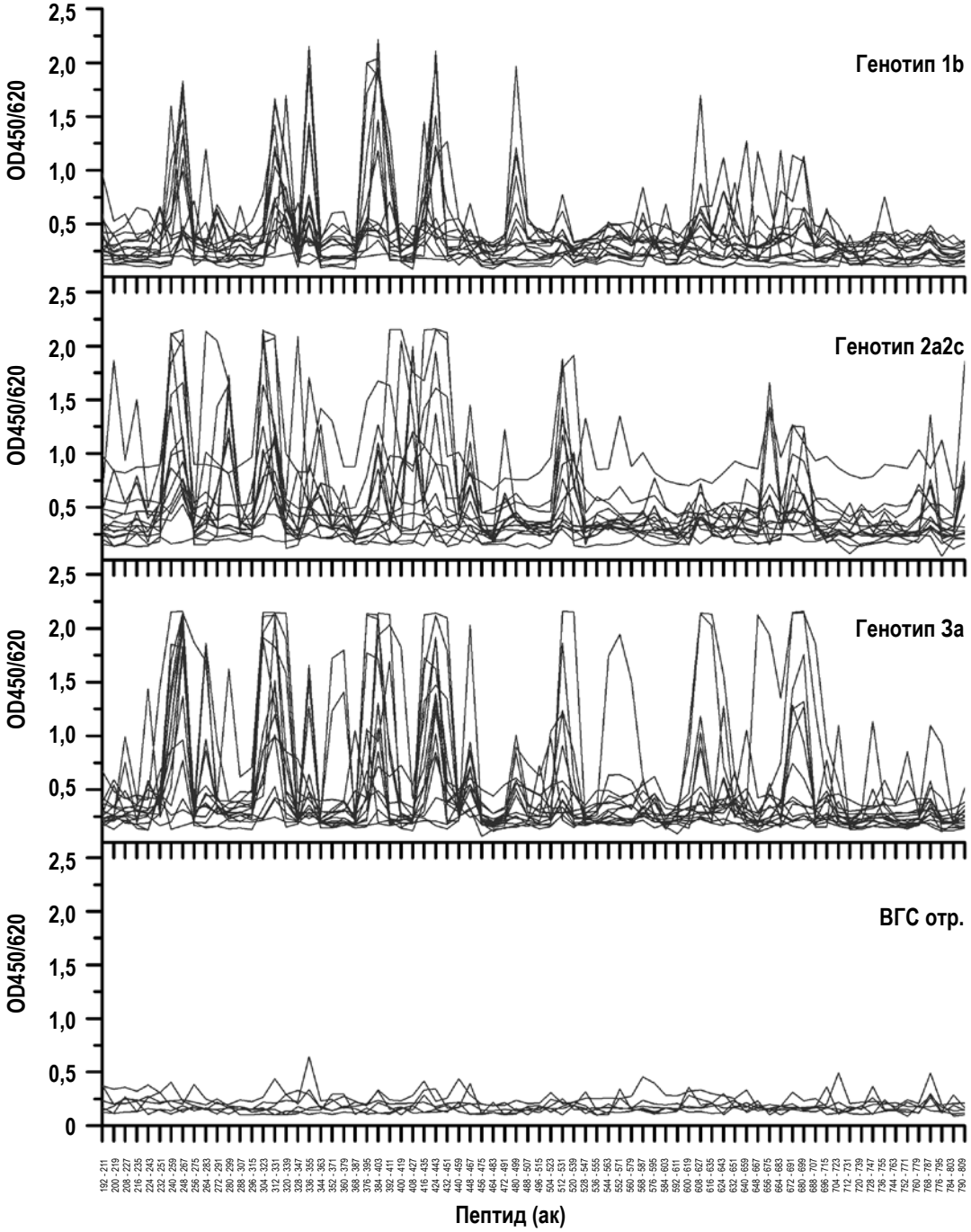

Рисунок 2. Результаты ИФА сывороток пациентов, инфицированных разными генотипами ВГС, и негативных сывороток человека с набором синтетических пептидов, перекрывающих полную последовательность белков E1 и E2 ВГС

Примечание. На оси абсцисс указаны соответствующие пептидам позиции аминокислот на полипротеине ВГС. По оси ординат указана ОП каждого пептида при А450/620. Генотипы ВГС указаны в рамках в правом верхнем углу рисунка, «ВГС отр.» обозначает значения ОП негативных на присутствие маркеров ВГС сывороток человека (отрицательный контроль), «среднее» обозначает среднее значение ОП для всех генотипов ВГС

антигенности пептидов на непрерывную аминокислотную последовательность полипротеина E1E2.

Суммированные по разным генотипам ВГС результаты расчета представлены на рисунке 3.

Как следует из представленных на рисунке 3 данных, в белках E1 и E2 исследованных нами сибирских изолятов ВГС генотипов 1b, 2a/2c и 3a выявляется значительное количество общих иммуногенных районов, что согласуется с ранее опубликованными данными по изолятам ВГС из разных регионов мира [4, 12, 15, 16, 22, 24]. Важно также учесть, что пептиды синтезированы

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, ПЕРЕКРЫВАЮЩИХ ПОЛНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ Е1- И Е2-БЕЛКОВ ВГС (ШТАММ Н77, ГЕНОТИП 1а)

№	Позиция ак	Последовательность аминокислот	№	Позиция ак	Последовательность аминокислот
A1	192-211	Y*QVRNSSGLYHVTNDCPNSSGSG	G5	496-515	SGSGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVV
B1	200-219	SGSGLYHVTNDCPNSSIVYEAADA	H5	504-523	SGSGGPVYCFTPSPVVVGTTDRSG
C1	208-227	SGSGPNSSIVYEAADAILHTPGCV	A6	512-531	SGSGSPVVVGTTDRSGAPTYSWGA
D1	216-235	SGSGAADAILHTPGCVPCVREGNA	B6	520-539	SGSGDRSGAPTYSWGANDTDVFVL
E1	224-243	SGSGPGCVPCVREGNASRCWVAVT	C6	528-547	SGSGSWGANDTDVFVLNNTRPPLG
F1	232-251	SGSGEGNASRCWVAVTPTVATRDG	D6	536-555	SGSGVFVLNNTRPPLGNWFGCTWM
G1	240-259	SGSGVAVTPTVATRDGKLPTTQLR	E6	544-563	SGSGPPLGNWFGCTWMNSTGFTKV
H1	248-267	SGSGTRDGKLPTTQLRRHIDLLVG	F6	552-571	SGSGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVI
A2	256-275	SGSGTQLRRHIDLLVGSATLCSAL	G6	560-579	SGSGFTKVCGAPPCVIGGVGNNTL
B2	264-283	SGSGLLVGSATLCSALYVGDLCGS	H6	568-587	SGSGPCVIGGVGNNTLLCPTDCFR
C2	272-291	SGSGCSALYVGDLCGSVFLVGQLF	A7	576-595	SGSGNNTLLCPTDCFRKHPEATYS
D2	280-299	SGSGLCGSVFLVGQLFTFSPRRHW	B7	584-603	SGSGDCFRKHPEATYSRCGSGPWI
E2	288-307	SGSGGQLFTFSPRRHWTTQDCNCS	C7	592-611	SGSGATYSRCGSGPWITPRCMVDY
F2	296-315	SGSGRRHWTTQDCNCSIYPGHITG	D7	600-619	SGSGGPWITPRCMVDYPYRLWHYP
G2	304-323	SGSGCNCSIYPGHITGHRMAWDMM	E7	608-627	SGSGMVDYPYRLWHYPCTINYTIF
H2	312-331	SGSGHITGHRMAWDMMMNWSPTAA	F7	616-635	SGSGWHYPCTINYTIFKVRMYVGG
A3	320-339	SGSGWDMMMNWSPTAALVVAQLLR	G7	624-643	SGSGYTIFKVRMYVGGVEHRLEAA
B3	328-347	SGSGPTAALVVAQLLRIPQAIMDM	H7	632-651	SGSGYVGGVEHRLEAACNWTRGER
C3	336-355	SGSGQLLRIPQAIMDMIAGAHWGV	A8	640-659	SGSGLEAACNWTRGERCDLEDRDR
D3	344-363	SGSGIMDMIAGAHWGVLAGIAYFS	B8	648-667	SGSGRGERCDLEDRDRSELSPLLL
E3	352-371	SGSGHWGVLAGIAYFSMVGNWAKV	C8	656-675	SGSGDRDRSELSPLLLSTTQWQVL
F3	360-379	SGSGAYFSMVGNWAKVLVVLLLFA	D8	664-683	SGSGPLLLSTTQWQVLPCSFTTLP
G3	368-387	SGSGWAKVLVVLLLFAGVDAETHV	E8	672-691	SGSGWQVLPCSFTTLPALSTGLIH
H3	376-395	SGSGLLFAGVDAETHVTGGSAGRT	F8	680-699	SGSGTTLPALSTGLIHLHQNIVDV
A4	384-403	SGSGETHVTGGSAGRTTAGLVGLL	G8	688-707	SGSGGLIHLHQNIVDVQYLYGVGS
B4	392-411	SGSGAGRTTAGLVGLLTPGAKQNI	H8	696-715	SGSGIVDVQYLYGVGSSIASWAIK
C4	400-419	SGSGVGLLTPGAKQNIQLINTNGS	A9	702-723	SGSGGVGSSIASWAIKWEYVVLLF
D4	408-427	SGSGKQNIQLINTNGSWHINSTAL	B9	710-731	SGSGWAIKWEYVVLLFLLLADARV
E4	416-435	SGSGTNGSWHINSTALNCNESLNT	C9	718-739	SGSGVLLFLLLADARVCSCLWMML
F4	424-443	SGSGSTALNCNESLNTGWLAGLFY	D9	726-747	SGSGDARVCSCLWMMLLISQAEAA
G4	432-451	SGSGSLNTGWLAGLFYQHKFNSSG	E9	734-755	SGSGWMMLLISQAEAALENLVILN
H4	440-459	SGSGGLFYQHKFNSSGCPERLASC	F9	742-763	SGSGAEAALENLVILNAASLAGTH
A5	448-467	SGSGNSSGCPERLASCRRLTDFAQ	G9	750-771	SGSGVILNAASLAGTHGLVSFLVF
B5	456-475	SGSGLASCRRLTDFAQGWGPISYA	H9	758-779	SGSGAGTHGLVSFLVFFCFAWYLK
C5	464-483	SGSGDFAQGWGPISYANGSGLDER	A10	766-787	SGSGFLVFFCFAWYLKGRWVPGAV
D5	472-491	SGSGISYANGSGLDERPYCWHYPP	B10	774-795	SGSGWYLKGRWVPGAVYAFYGMWP
E5	480-499	SGSGLDERPYCWHYPPRPCGIVPA	C10	782-803	SGSGPGAVYAFYGMWPLLLLLLAL
F5	488-507	SGSGHYPPRPCGIVPAKSVCGPVY	D10	788-809	SGSGFYGMWPLLLLLLALPQRAYA

Примечание. * – Y^{192} – первая аминокислота гликопротеина Е1.

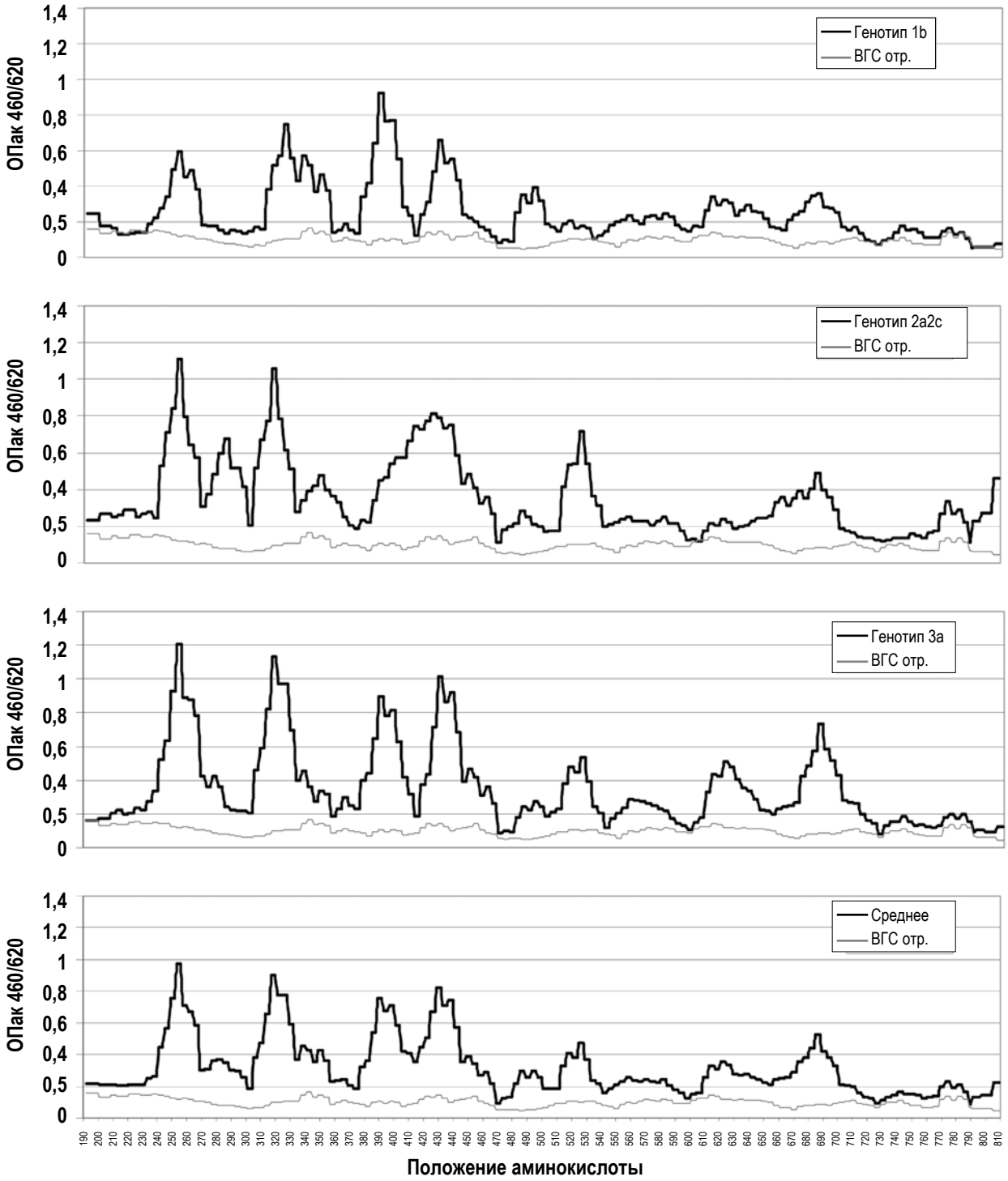

Рисунок 3. Антигенные профили поверхностных белков ВГС трех разных генотипов, построенные на основе расчета активности отдельных аминокислот E1E2 полипротеина ВГС в пептидном анализе

Примечание. Вдоль оси абсцисс указаны позиции аминокислот в полипротеине E1E2 ВГС, вдоль оси ординат указаны рассчитанные для каждой аминокислоты значения ОПак. Остальные обозначения – как на рисунке 2.

на основе аминокислотной последовательности американского штамма H77 с генотипом 1a, поэтому картированные нами сайты иммуногенности имеют гомологию также и с этим генотипом ВГС. Общие высокоиммуногенные пептидные эпитопы выявлены в следующих позициях: 250-260, 315-325 (E1-белок), 390-400 (гипервариабельный район 1 белка E2), 430-440, 680-690 (E2 белок) (здесь и далее указаны центральные участки пиков из рисунке 3). В позициях 340-350, 490-500 и 560-580 ак также регистрируются общие, но существенно слабее реагирующие эпитопы. Широкое варьирование

границ большинства эпитопов свидетельствует о высокой изменчивости белков Е1 и Е2, однако способность антител, индуцированных разными генотипами ВГС, реагировать с одинаковыми пептидами свидетельствует о возможности создания на их основе универсальных иммуногенных конструкций для разработки вакцин против ВГС.

Наибольшие межгенотиповые различия регистрируются в позициях 280-290, 410-430 и 520-540. Так, в частности, в районе 280-290 ак белка Е1 нами выявлена ранее не описанная в литературе антигенная детерминанта, характерная только для 2а/2с субтипа ВГС выделенных нами сибирских изолятов. Интересно отметить, что детерминанта 412-426 ак, проявляющая межгенотиповые вируснейтрализующие свойства *in vitro* [21, 25], и эпитопы конформационной детерминаты 412-423+528-535 ак белка Е2, описанные в [13], выявлены нами также только в случае 2а/2с субтипа ВГС. Однако расположенная рядом блокирующая вируснейтрализацию детерминанта 434-446 ак [25] является высокоиммуногенной во всех исследованных генотипах ВГС. Это согласуется с данными, представленными в [26], где из 9 тестированных ВГС-позитивных сывороток человека антитела к блокирующему эпитопу 434-446 ак были выявлены в четырех образцах, а к нейтрализующему 412-426 ак только в двух, причем в существенно более низком титре. В статье [23] было также показано, что антитела к узнающему эпитопу 412-423 ак вируснейтрализующего моноклонального антитела AP33 выявляются лишь в 2,5% случаев природной инфекции ВГС. Авторы высказали предположение, что низкая иммуногенность данного района связана с присутствующим в позиции 417 ак сайтом гликозилирования белка Е2.

В ряде работ было показано, что в N-концевой (192-202 ак) области белка Е1 расположен высокоиммуногенный эпитоп, обладающий вируснейтрализующей активностью [7, 8]. Нам не удалось выявить в этом районе значимых иммуногенных эпитопов ни для одного из исследованных генотипов ВГС. В опубликованных работах не приведены генотипы тестированных изолятов ВГС, поэтому различия, возможно, связаны с присутствием антигенных детерминант в структуре N-концевой части Е1-белка других, отличных от наших субтипов ВГС.

В исследуемой группе сывороток нам не удалось выявить антитела ко второму гипервариабельному району Е2-белка в позиции 470-480 ак, хотя в литературе показано наличие иммуногенных эпитопов в данном районе Е2-белка 1а и 1b субтипов ВГС [4]. Возможно, это объясняется наиболее высокой вариабельностью изолятов 1 генотипа ВГС по сравнению с другими генотипами и, соответственно, отличием группы изолятов, исследованных в нашей работе, от изученных в работе [4].

Выявленные нами межгенотиповые различия антигенного профиля поверхностных белков ВГС свидетельствуют о необходимости генотипирования изолятов при изучении свойств поверхностных белков Е1 и Е2 и некорректности в ряде случаев распространения данных, полученных для отдельного генотипа, на вирус гепатита С в целом (как следует из рис. 3, среднее).

Благодарности

Работа выполнена при поддержке грантом Международного научно-технического центра (МНТЦ) №3255-п и грантом «Научная школа» НШ-387.2008.4.

Список литературы

1. Шустов А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Гаврилова И.В., Нестеров А.Е., Стрельцова М.А., Пальцев А.И., Локтев А.В., Максютов А.З., Акинфеева Л.А., Торшин В.П., West T.E., Ryder R.W., Онищенко Г.Г. Частота встречаемости маркеров гепатита С и факторы риска у персонала больниц Новосибирской области // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиологии (ЖМЭИ). – 2002. – Т. 2. – С. 26-32.

2. Bowen D.G., Walker C.M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection // Nature. – 2005. – Vol. 436. – P. 946-952.

3. Bukh J., Miller R.H., Purcell R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes // Semin Liver Dis. – 1995. – Vol. 15. – P. 41-63.

4. Carlos M.P., Yamamura Y., Vu Q., Conzen K., Anderson D.E., Torres J.V. Humoral immunity to immunodominant epitopes of Hepatitis C virus in individuals infected with genotypes 1a or 1b // Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 111. – P. 22-27.

5. Farci P., Shimoda A., Wong D., Cabezon T., De Gioannis D., Strazzera A., Shimizu Y., Shapiro M., Alter H., Purcell R. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93. – P. 15394-15399.

6. Gotto J., Dusheiko G.M. Hepatitis C and treatment with pegylated interferon and ribavirin // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2004. – Vol. 36, N 10. – P. 1874-1877.

7. Ishida C., Matsumoto K., Fukada K., Matsushita K., Shiraki H., Maeda Y. Detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV) structural proteins in anti-HCV-positive sera by an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic peptides

as antigens // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 936-940.

8. Keck Z-Y., Sung V.M.H., Perkins S., Rowe J., Paul S., Liang T.J., Lai M.M.C., Foung S.K.H. Human monoclonal antibody to hepatitis C Virus E1 glycoprotein that blocks virus attachment and viral infectivity // J. Virol. – 2004. – Vol. 78, N 13. – P. 7257-7263.

9. Lecnmann M., Ihlenfeldt H.G., Braunschweiger I., Gierls G., Jung G., Matz B., Kaiser R., Sauberbruch T., Spengler U. T and B Cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus-positive blood donors without viremia // Hepatology. – 1996. – Vol. 24, N 4. – P. 790-795.

10. Martinez-Donato G., Duenas-Carrera S., Alvarez-Lajonchere L., Morales J., Acosta-Rivero N., Martínez E., Viña A., Guerra I., Pérez A., Musacchio A., García J., Reyes O., Garay H.E., González L.J., Alvarez J.C., Soria Y. Antigenicity and immunogenecity of the hepatitis C virus envelope E2 protein // Biotecnologia Aplicada. – 2006. – Vol. 23, N 1. – P. 60-63.

11. Meunier J.C., Russell R.S., Goossens V., Priem S., Walter H., Depla E., Union A., Faulk K.N., Bukh J., Emerson S.U., Purcell R.H. Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the E1 glycoprotein of hepatitis C virus // J. Virol. – 2008. – Vol. 82, N 2. – P. 966-973.

12. Olenina L.V., Nikolaeva L.I., Sobolev B.N., Blokhina N.P., Archakov A.I., Kolesanova E.F. Mapping and characterization of B cell linear epitopes in the conservative regions of hepatitis C virus envelope glycoproteins // J. Viral. Hepat. – 2002. – Vol. 9. – P. 174-182.

13. Perotti M., Mancini N., Diotti R.A., Tarr A.W., Ball J.K., Owsianka A., Adair R., Patel A.H., Clementi M., Burioni R. Identification of a broadly cross-reacting and neutralizing human monoclonal antibody directed against the hepatitis C virus E2 protein // J. Virol. – 2008. – Vol. 82, N 2. – P. 1047-1052.

14. Petit M.-A., Jolivet-Reynaud C., Peronnet E., Michal Y., Tre'po C. Mapping of a conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, N 45. – P. 44385-44392.

15. Petrik J., Alexander G.J.M., Pearson G., Allain J.P. Reactivity of synthetic peptides representing selected sections of hepatitis C virus Core and envelope proteins with a panel of hepatitis C virus-seropositive human plasma // J. Med. Virol. – 1997. – Vol. 51. – P. 67-79.

16. Sallberg M., Ruden U., Wahren B., Magnius L.O. Antigenic regions within the hepatitis C virus envelope 1 and structural proteins: identification of an IgG3-restricted recognition site within the envelope 1 protein // Clin. Exp. Imunol. – 1993. – Vol. 91. – P. 489-494.

17. Seeff L.B. Natural history of chronic hepatitis C // Hepatology. – 2002. – Vol. 36, N 5. – P. 35-46.

18. Shimizu Y.K., Igarashi H., Kiyohara T. A hyperimmune constructs against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures // Virol. – 1996. – Vol. 223. – P. 409-412.

19. Simmonds P., Rose K.A., Graham S., Chan S.W., McOmish F., Dow B.C., Follet E.A., Yap P.L., Marsden H. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3 // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 1493-1503.

20. Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans // J. Gen. Virol. – 2001. – Vol. 82. – P. 693-712.

21. Tarr A.W., Owsianka A.M., Timms J.M., Patrick McClure C., Brown R.J.P., Hickling T.P., Pietschmann T., Bartenschlager R., Patel A.H., Ball J.K. Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33 // Hepatology. – 2006. – Vol. 43, N 3. – P. 592-601.

22. Tarr A.W., Owsianka A.M., Szwejk A., Ball J.K., Patel A.H. Cloning, expression and functional analysis of patient-derived hepatitis C virus glycoproteins // Methods Mol. Biol. – 2007. – Vol. 379. – P. 177-197.

23. Tarr A.W., Owsianka A.M., Jayaraj D., Brown R.J.P., Hickling T.P., Irving W.L., Patel A.H., Ball J.K. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33 // J. Gen. Virol. – 2007. – Vol. 88. – P. 2991-3001.

24. Zhang Z.-X., Sonnerborg A., Sallberg M. Antigenic structure of the hepatitis C virus envelope 2 protein // Clin. Exp. Immunol. – 1994. – Vol. 98. – P. 382-387.

25. Zang P., Wu C.G., Mihalik K., Virata-Theimer M.L., Yu M.W., Alter H.J., Feinstone S.M. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, N 20. – P. 8449-8454.

26. Zhang P., Zhong L., Struble E. B., Watanabe H., Kachko A., Mihalik K., Virata-Theimer M.L., Alter H.J., Feinstone S., Major M. Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, N 18. – P. 537-541.

поступила в редакцию 20.10.2009
принята к печати 09.11.2009