

Т.И. УЛАНОВА, В.Ф. ПУЗЫРЕВ, А.Н. БУРКОВ, А.П. ОБРЯДИНА

ООО НПО «Диагностические Системы», Нижний Новгород

## **ВЛИЯНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НА ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА АНТИГЕННЫХ ЭПИТОПОВ, ЛОКАЛИЗОВАННОГО В ПРЕДЕЛАХ 1192-1456 АМИНОКИСЛОТ БЕЛКА NS3 ВИРУСА ГЕПАТИТА С**

С использованием рекомбинантных белков изучали влияние гетерогенности первичной структуры неструктурного белка NS3 вируса гепатита С (HCV) на иммунореактивность комплекса антигенных эпитопов, локализованного в пределах 1192-1456 аминокислот. Шесть генов, кодирующих указанный фрагмент NS3 на HCV разных генотипов, собирали с помощью ПЦР из синтетических олигонуклеотидов и экспрессировали в клетках *E.coli*. Процент гомологии аминокислотных последовательностей антигенов варьировал от 78,4 до 92,2. Все антигены демонстрировали более высокий коэффициент реактивности с антителами в образцах сывороток больных, инфицированных HCV соответствующего генотипа, однако строгой генотипоспецифичности в иммунореактивности не наблюдалось.

Полученные данные позволяют сделать вывод о влиянии первичной структуры на иммунореактивность антигенов. Селекция вариантов первичных структур антигенов является ключевым моментом при создании диагностического теста.

Ключевые слова: *вирус гепатита С, NS3-белок, первичная структура, иммунореактивность, диагностический тест*

Recombinant proteins were used to study the effect of heterogeneity of the primary structure of NS3 protein of hepatitis C (HCV) on the immunoreactivity of a complex of antigenic epitopes located within the amino acid sequences 1192-1456. Six genes encoding for the above fragment NS3 from different genotypes were collected from synthetic oligonucleotides and expressed in *E. coli* cells, by using the polymerase chain reaction. The homology of amino acid sequences of antigens ranged from 78.4 to 92.2%. All the antigens showed a higher coefficient of their reactivity with antibodies in the sera samples from patients infected by HCV of a respective genotype; however, there was no strong genotype-specific immunoreactivity. The findings lead to the conclusion that the primary structure of antigens has an impact on their immunoreactivity. Selection of variants of the primary structures of antigens is essential in developing a diagnostic test.

Key words: *hepatitis C virus, NS3 protein, primary structure, immunoreactivity, diagnostic test*

Единый полипротеин вируса гепатита С (HCV) в результате процессинга разделяется на 10 вирусных белков: core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a и NS5b. Антигенная структура некоторых белков HCV хорошо изучена с помощью синтетических пептидов и рекомбинантных белков [3,8,12,13]. Белок NS3 является одним из главных антигенов HCV. Сильные антигенные эпитопы были найдены в пределах 1175-1334 [7] и 1359-1449 аминокислот (АК) [2]. Антигенные эпитопы белка NS3 являются конформационно-зависимыми и эффективно моделируются лишь рекомбинантными белками длиной более 100 АК [8,11].

Геном вируса гепатита С является довольно вариабельным. Выделяют 6 основных генотипов вируса и множество его субтипов. Нуклеотидные последовательности вирусов разных генотипов имеют гомологию около 66-69%, разных субтипов одного генотипа - около 77-80%. Идентичность нуклеотидной последовательности внутри одного субтипа составляет около 91-98% [15,16].

Гетерогенность внутри полипротеина HCV распределена не равномерно. E1, E2, NS4a и NS5a являются наиболее вариабельными областями, тогда как core и NS3 являются наиболее консервативными.

**Целью** исследования явилось изучение влияния гетерогенности аминокислотной последовательности рекомбинантных антигенов на их иммунореактивность. Полученные результаты важны для создания высокочувствительных диагностических тестов новых поколений, позволяющих детектировать антитела в сыворотках с одинаковой чувствительностью, не зависимо от генотипа вируса.

### **Материалы и методы.**

*Синтез и экспрессия генов, очистка рекомбинантных белков.*

Шесть вариантов аминокислотных последовательностей белка NS3 (HCV) с 1192-1456 АК, полученные из GenBank, использовали для получения нуклеотидных последовательностей и дизайна синтетических олигонуклеотидов. Рекомбинантные гены собрали с помощью ПЦР из синтетических олигонуклеотидов, клонировали в вектор pGEX4T-2 и экспрессировали в клетках *E.coli* в виде гибридных белков с глутатион-S-трансферазой. Трансформацию клеток *E.coli* штамма JM109 и экспрессию генов проводили согласно методике, описанной ранее [14]. Рекомбинантные белки чистили при помощи аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе 4B (Pharmacia) [6].

Анализ нуклеиновых последовательностей проводили с использованием автоматического сиквенатора ("373 DNA sequencer"; "Applied Biosystem", США), согласно протоколу производителя. Анализ аминокислотных последовательностей проводили с использованием программы DNASTar ("Madison, Wisconsin", США).

*Образцы сывороток*

124 образца сывороток предварительно проанализировали на наличие анти-HCV с помощью теста "RIBA-HCV 3,0 SIA" ("Chiron Corporation", США). Все сыворотки также тестировали на наличие РНК HCV ("Amplicor", "Roche Inc.", Швейцария). Дополнительно использовали панель, состоящую из 101 образца сывороток от пациентов, инфицированных HCV разных генотипов. Для подсчета уровня ОП критического «cut off» использовали 200 анти-HCV-отрицательных образцов сывороток здоровых доноров. ОП критический подсчитывали как среднее арифметическое ОП отрицательных образцов +4σ.

### **Результаты.**

Все рекомбинантные белки показали разный уровень иммунореактивности с использованными образцами сывороток доноров (Табл. 1). Самыми выраженными антигенными свойствами обладал белок С33-946, полученный на основе последовательности белка NS3 вируса 6-го генотипа. Этот белок позволял определять специфические антитела у 94,8% анти-HCV положительных образцов сывороток. Антиген С33-40, полученный на основе последовательности вируса субтипа 2с, также демонстрировал высокий уровень иммунореактивности. Остальные рекомбинантные антигены имели менее выраженные антигенные свойства. Интересно отметить, что 2 рекомбинантных антигена (С33-946 и С33-1249), полученные на основе незначительно различающихся между собой последовательностей генома вируса 6-го генотипа, демонстрировали очень разный уровень иммунореактивности с анти-HCV-положительными сыворотками. Рекомбинантные антигены С33-40 и С33-23, полученных на основе последовательностей вирусов субтипов 2с и 2b, выявляли специфические антитела к NS3-области HCV в анти-HCV-положительном образце, реагирующем только с С100- и С22- антигенами "RIBA-HCV 3,0 SIA". Как показали результаты генотипирования, эта сыворотка была получена от донора, инфицированного HCV 2-го генотипа.

Некоторые рекомбинантные антигены выявляли анти-HCV в ряде образцов сывороток, отнесенных в разряд «неопределенных» и в образцах, не имеющих антител к белкам HCV, но содержащих РНК HCV (данные "RIBA"-теста).

Наибольшую иммунореактивность с образцами сывороток пациентов, инфицированных вирусами HCV различных генотипов, также обладал С33-946 (Табл. 2). Этот белок выявлял специфические антитела в 100% образцов сывороток от больных, инфицированных HCV генотипов 1a, 2b и 6. Антиген С33-40 (субтип 2c) определял антитела в 100% позитивных образцов, содержащих РНК вируса генотипов 2a/c и 2b. Интересно отметить, что хотя для синтеза С33-23 использовали последовательность HCV субтипа 2b, этот антиген реагировал со 100% позитивных образцов от больных, инфицированных вирусом генотипа 2a/c и только с 92,3% положительных образцов сывороток, содержащих РНК вируса генотипа 2b. Другие рекомбинантные антигены, полученные на основе последовательностей вируса 6-го генотипа, демонстрировали разный уровень иммунореактивности с анти-HCV-положительными сыворотками (Табл. 2).

### **Обсуждение.**

Известно, что при использовании иммуноферментных тестов для определения антител HCV разных производителей могут наблюдаться серьезные расхождения в полученных результатах (4,5). Чувствительность и специфичность диагностических тестов во многом зависят от используемых антигенов. Так коммерческие тесты, использующие в качестве антигенов рекомбинантные белки или синтетические пептиды, созданные на основе аминокислотной последовательности HCV 1-го генотипа, могут быть недостаточно эффективными для надежной детекции антител при инфицировании вирусом другого генотипа [10,13].

Процент гомологии аминокислотных последовательностей антигенов, проанализированных в нашей работе, варьировал от 92,2 до 78,4; иммунореактивность белков – от 94,8 до 36,2% (Табл.1). Интересно, что в некоторых случаях антигены, близкие по первичной структуре и принадлежащие к одному генотипу вируса (высокий процент гомологии), достоверно различались по выраженности антигенных свойств. Согласно данным литературы, примерно 10% сывороток, исследуемых на наличие специфических анти-HCV, имеют «неопределенный результат при исследовании в иммуноблоте (“RIBA”-тесте) и около половины из них содержат РНК HCV [11]. Использование более информативных антигенов позволяет уменьшить количество «неопределенных» результатов тестирования и перевести их в разряд положительных. Кроме того, наиболее иммунореактивные антигены позволяли выявлять специфические анти-NS3 в образцах, содержащих вирусную РНК, и не содержащих антител по данным иммуноблота (Табл.1). Ограниченная реактивность антител с антигенами из core или NS3-области полипротеина HCV характерна для ранней стадии сероконверсии [1,4,9].

Анализ иммунореактивности рекомбинантных антигенов с образцами сывороток от пациентов, инфицированных разными генотипами HCV, показал отсутствие строгой генотипоспецифичности. Напротив, наиболее иммунореактивный антиген С33-946 давал одинаковый коэффициент позитивности с образцами сывороток, содержащими вирусную РНК разных генотипов (Табл. 2). Очевидно, что использование подобной конструкции позволяет создать надежный диагностический тест для определения специфических анти-HCV независимо от генотипа вируса.

Анализ аминокислотной последовательности использованных антигенов показал, что существуют как консервативные области, имеющие 100% гомологию у всех исследованных белков, так и переменные участки, в пределах которых располагаются аминокислотные композиции, уникальные для каждого белка. Основная причина различий в иммунореактивности антигенов, на наш взгляд, связана с первичной структурой антигена.

В заключение мы можем сказать, что тщательный анализ и подбор первичных структур антигенов являются важным моментом в процессе создания высокочувствительного диагностического теста.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Barrera, J.M., Francis, B., Ercilla, G, et al. 1995. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion

- hepatitis by a third-generation ELISA // *Vox Sang.* – 1995. – Vol.68. – P.15-18.
2. *Chang, J.C., Seidel, C., Ofenloch, B., Jue, D.L., Fields H.A., and Khudyakov, Y.E.*. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS4 protein as Modeled with synthetic peptides // *Virology.* – 1999 - Vol. 257. – P.177-190.
  3. *Claeys, H., Volckaerts, A., Mertens, W., Liang, Z., Fiten, P., Opdenakker, G.* Localization and reactivity of an immunodominant domain in the NS3 region of the hepatitis C virus // *J. Med. Virol.* - 1995. – Vol. 45.- P. 273-281.
  4. *Courouce, A.M., Barin, F., Botte, C.* et al. A comparative evaluation of the sensitivity of seven anti-hepatitis C virus screening tests. // *Vox Sang.* -1995. – Vol.69, N3.- P. 213-216.
  5. *Courouce, A.M., Noel, L., Barin, F.* A comparative evaluation of the sensitivity of the five anti-hepatitis C virus immunoblot assays. // *Vox Sang.* - 1998. -Vol. 74, N4. - P. 217-224.
  6. *Frangioni JV, Neel BG.* Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins // *Anal Biochem.* – 1993. - Vol. 210, N1. – P. 179-187.
  7. *Hwang, L., Yang, P.L.M., Chiang, B.* et al. Identification of humoral antigenic determinants in the hepatitis C virus NS3 protein. // *J. Infect. Dis.* - 1996.- Vol.174. – P. 173-176.
  8. *Khudyakov, Y.E., Khudyakova, N.S., Jue, D.L. et al.* Linear B-cell epitopes of the NS3-NS4-NS5 proteins of the hepatitis C virus as modeled with synthetic peptides. // *Virology.* - 1995. – Vol. 206. – P. 666-672.
  9. *Lefrere, J.J., Guiramand, S., Lefrere, F.* et al. Full or partial seroconversion in patients infected by hepatitis C virys. // *J. Infect. Dis.* - 1997. – Vol.175. –P. 316-322.
  10. *McOmish, F., Chan, S.W., Dow, B.C.* Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. // *Transfusion.* – 1993. - Vol.33, N1.- P. 7-13
  11. *Pawlotsky, J.M., Roudot-Thoraval, F., Pellet, C.* et al. Influence of hepatitis C virus (HCV) genotypes on HCV recombinant immunoblot assay patterns.// *J. Clin. Microbiol.* - 1995. – Vol.33. – P.1357-1359.
  12. *Pereboeva, L.A., Pereboev, A.V., and Morris G.E.* Identification of antigenic sites on three hepatitis C virus proteins using phage-displaed peptide libraries. // *J. Med. Virol.* - 1998. – Vol.56.- P.105-111.
  13. *Rodriguez-Lopez, M., Riezu-Boj, J.I., Ruiz et al.* Immunogenicity of variable regions of hepatitis C virus proteins: selection and modification of pepetide epitopes to assess hepatitis C virus genotypes by ELISA. // *J. Gen. Virol.* - 1999. Vol.80. – P. 727-738.
  14. *Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T.* *Molecular Cloning.* - New York, 1989.
  15. *Simmonds, P., Alberti, A., Alter, H.J.* et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. // *Hepatology.* - 1994. – Vol.19. – P. 1321-1334.
  16. *Smith, D.B., Pathirana, S., Davidson, F.* et al. P. 1997. The origin of hepatitis C virus genotypes. // *J. Gen. Virol.* – Vol. 78. - P.321-328.

*Опубликовано: Вопросы вирусологии. -2006 - №1.- С.28-30*

Таблица 1

**Иммунореактивность рекомбинантных антигенов, содержащих комплекс антигенных эпитопов, локализованных в пределах 1192-1456 АК NS3 белка HCV с образцами сывороток доноров**

RIBA-HCV 3.0 SIA	Сыворотки						
	Анти-HCV позитивные (n=59)		Неопределенные (n=16)				Анти-HCV негативные (n=49)
	NS3+(58)	NS3- (1)	NS3+ (2)		NS3- (14)		PCR+ (2)
			PCR+(1)	PCR-(1)	PCR+(3)	PCR-(11)	
антиген:							
C33-23-2b	41	1	1	0	1	0	1
C33-40-2c	53	1	1	1	1	1	2
C33-94-1c	46	0	1	1	1	1	2
C33-946	55	0	1	1	1	0	2
C33-1249-6a	21	0	0	0	0	0	0
C33-121-5a	36	0	0	0	0		

Таблица 2

**Иммунореактивность рекомбинантных антигенов, содержащих комплекс антигенных эпитопов, локализованных в пределах 1192-1456 АК NS3 HCV с образцами сывороток больных, инфицированных HCV разных генотипов.**

антиген	C33-946 6a	C33-40 2c	C33-23 2b	C33-94 1c	C33-1221 5a	C33-1249 6a
Сыворотки						
генотип 1b (16*)	14*/7.5**	12/6.5	9/4.5	13/11.6	9/3.7	8/5.3
генотип 1a (17)	17/6.9	15/6.6	13/3.6	16/11.9	13/4.8	12/6.0
генотип 2a/c (6)	5/7.7	6/12.1	6/5.7	3/10	3/3.7	2/7.4
генотип 2b (13)	13/7.5	13/11.7	13/7.2	8/9.2	7/4.0	9/4.9
генотип 3a (11)	10/7.0	10/10.1	9/5.6	9/10.5	5/4.2	7/6.4
генотип 4 (18)	10/7.5	7/4.4	4/3.0	10/5.1	12/6.6	2/3.7
генотип 6 (20)	20/9.0	18/10.5	16/4.8	18/7.2	15/6.0	19/10.0

Примечание. \* - число позитивных образцов; \*\* - коэффициент позитивности