

На правах рукописи



Гуськова Анна Алексеевна

**Формирование резистентности у вируса простого герпеса
к Н-фосфонату ацикловира.**

03.01.03 — молекулярная биология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва — 2012

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Медико-генетическом научном центре РАМН, в Учреждении Российской академии наук Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, в Учреждение Российской академии наук Институте молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН.

Научный руководитель: доктор химических наук,
Скоблов Юрий Самойлович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Дмитрий Владимирович Муха
(ИОГен РАН)
Кандидат биологических наук
Сергей Борисович Акопов
(ИБХ РАН)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П.Чумакова» Российской академии медицинских наук

Защита состоится 28 марта 2012 года в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН.

Автореферат разослан 24 февраля 2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А.Олейников



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Одним из самых распространенных патогенов человека является вирус простого герпеса первого типа (ВПГ-1). По данным Всемирной организации здравоохранения носителями данного вируса являются 95% населения Земли. У большинства инфицированных людей данное заболевание протекает в виде везикулярных высыпаний на слизистых оболочках. Однако при иммунодефицитном состоянии пациента, которое может быть вызвано ВИЧ-инфекцией или процедурами, необходимыми при пересадке органов, ВПГ-1 часто приводит к летальному исходу. ВПГ-1, попадая внутрь организма, остаётся там пожизненно. В настоящий момент не разработано лекарственных средств, которые полностью уничтожали бы ВПГ-1. За последние полвека было предложено много антигерпетических средств различной природы, однако, наибольшее распространение получили модифицированные нуклеозиды, в том числе ациклические нуклеозидные аналоги (ацикловир, ганцикловир и др.), некоторые из них вошли в широкую медицинскую практику для терапии герпетических инфекций.

Механизм действия таких нуклеозидных препаратов хорошо известен. Сначала при помощи вирусного фермента – тимидинкиназы - осуществляется фосфорилирование нуклеозида до нуклеозид-5'-монофосфата, затем происходят два последовательных фосфорилирования с использованием ферментов клетки-хозяина до соответствующего трифосфатного производного нуклеозида. На следующем этапе, полученный модифицированный нуклеотид включается вирусспецифической ДНК-полимеразой во вновь синтезируемую цепь ДНК, что приводит к терминации биосинтеза вирусной ДНК.

Однако длительное применение нуклеозидных антигерпетических препаратов приводит к появлению штаммов ВПГ-1, устойчивых к действию этих соединений. Резистентность ВПГ-1 к нуклеозидным препаратам обусловлена одним из следующих факторов или их сочетанием: (а) полной потерей активности, изменением субстратной специфичности или понижением экспрессии вирусной тимидинкиназы, (б) понижением активности или изменением субстратной специфичности вирусной ДНК-полимеразы. Появление таких резистентных к антигерпетическим препаратам штаммов ВПГ-1 вынуждает вести поиск новых лекарственных препаратов. Данная работа является частью этого исследовательского направления.

Цель и задачи исследования.

Целью данной работы является изучение механизма формирования резистентности к Н-фосфонату ацикловира у ВПГ-1.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Выделение и энзимологическая характеристика тимидинкиназы ВПГ-1 эталонного для России штамма L2.
2. Изучение мутаций в гене тимидинкиназы ВПГ-1, приводящих к возникновению резистентности к Н-фосфонату ацикловира.
3. Изучение мутаций в гене ДНК-полимеразы ВПГ-1, приводящих к возникновению резистентности к Н-фосфонату ацикловира.

Научная новизна полученных результатов. В данной работе впервые биохимически охарактеризована тимидинкиназа ВПГ-1 эталонного для России штамма L2. Установлены нуклеотидная и аминокислотная последовательности вирусной тимидинкиназы для штаммов ВПГ-1, резистентных к Н-фосфонату ацикловира, для лабораторного штамма L2/R, являющегося глубоко резистентным к ацикловиру и для эталонного в России штамма L2. Выявлены мутации в генах ВПГ-1 *UL23* и *UL30* (соответственно тимидинкиназы и ДНК-полимеразы), которые могут обуславливать резистентность штаммов ВПГ-1 к антигерпетическим препаратам (ацикловиру, Н-фосфонату ацикловира).

Обнаружено, что Н-фосфонат ацикловира взаимодействует с тимидинкиназой вируса и оказывает на нее ингибирующее действие. Обнаружен необычный спектр распределения мутаций у штаммов ВПГ-1, резистентных к Н-фосфонату ацикловира.

Практическая значимость результатов исследования. Данная работа является частью работ по исследованию новых антигерпетических средств. Полученные в данной работе результаты позволяют по-новому взглянуть на механизм действия противогерпетических препаратов и дают основу для получения в будущем новых более эффективных лекарственных средств.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов г. Новосибирск 2008 г.

Личный вклад автора в проведение исследования. Автором проведен биоинформатический анализ, выполнены молекулярно-генетические эксперименты по клонированию генов, проведены работы по характеристике фермента, сделан анализ, обработка и обобщение полученных результатов, написана и оформлена рукопись.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ.

Внедрение результатов работы. Полученные результаты будут использованы в доклинических испытаниях Н-фосфоната ацикловира как антигерпетического препарата.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Текст диссертации изложен на 100 страницах, содержит 15 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 135 источников отечественных и иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Н-фосфонат ацикловира (НрАСV) (рис.1) является нуклеозидным аналогом, обладающим противогерпетическими свойствами. Данный препарат известен довольно давно, и, первоначально предполагалось, что, механизм его действия основан на том, что, попадая в клетку Н-фосфонат ацикловира, превращается в ацикловир, который действует как противовирусный агент. Но в ходе дальнейших исследований выяснилось, что некоторые штаммы ВПГ-1,

резистентные к ацикловиру, являются чувствительными к НрАСV. Это указывает на то, что НрАСV не может действовать только как предшественник ацикловира и, по-видимому, возможен другой механизм его действия. В данной работе мы пытались выяснить механизм действия НрАСV как противогерпетического агента.

На первом этапе мы исследовали гены *UL23* (тимидинкиназы) ВПГ-1 эталонного ацикловира чувствительного штамма L2 и лабораторного штамма L2/R, глубоко резистентного к ацикловиру. Мы предполагали, что биохимическая характеристика тимидинкиназ этих вирусов и отношение этих ферментов к НрАСV поможет нам в дальнейших исследованиях. Сопоставляя структурные изменения в гене ТК этих штаммов и устойчивость этих вирусов к традиционным антигерпетическим агентам можно было получить информацию о «гене-мишени» для НрАСV.

Одним из традиционных подходов к изучению механизма противовирусного действия модифицированного нуклеозида является получение и изучение вирусных мутантов, устойчивых к действию изучаемого соединения. Коллеги из Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН многократным пассированием эталонного штамма L2 в присутствии НрАСV сумели получить популяцию ВПГ-1, резистентную к действию этого соединения, а также выделить из популяции мутантных вирусов несколько вирусных клонов. Для изучения возникшей резистентности необходимо было проанализировать штаммы чувствительные и резистентные к НрАСV. Анализ спектра мутаций и их распределение в потенциальных генах-кандидатах на возникновение резистентности к НрАСV позволяет определить, на каком уровне действует данный препарат.

В качестве генов-кандидатов для анализа мутаций мы отобрали гены *UL23* (тимидинкиназы) и *UL30* (ДНК-полимеразы) ВПГ-1. Именно мутации в данных генах, как правило, приводят к возникновению резистентности к противовирусным препаратам нуклеозидной природы. Так для ацикловира показано, что 95% случаев резистентность обусловлена мутациями в гене тимидинкиназы и только в 5% случаев мутациями в гене ДНК-полимеразы. Встречаются вирусы мутантные по обоим ферментам.

Помимо ацикловира, в литературе также описаны и другие противовирусные препараты, действие которых направлено специфически на конкретный фермент вируса. Так, например, соединение - E-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксинуридин (BVDU) (рис.1), попадая в клетку, фосфорилируется тимидинкиназой вируса до монофосфата. Затем уже клеточные ферменты проводят последовательные фосфорилирования до трифосфата. BVDU-трифосфат узнается только ДНК-полимеразой вируса и встраивается в растущую цепь, терминируя тем самым процесс репликации вируса.

Все известные на сегодняшний день штаммы, устойчивые к данному соединению, имеют мутации только в гене тимидинкиназы ВПГ-1. Таким образом, резистентность к BVDU автоматически указывает на то, что в данном штамме имеются мутации в гене тимидинкиназы.

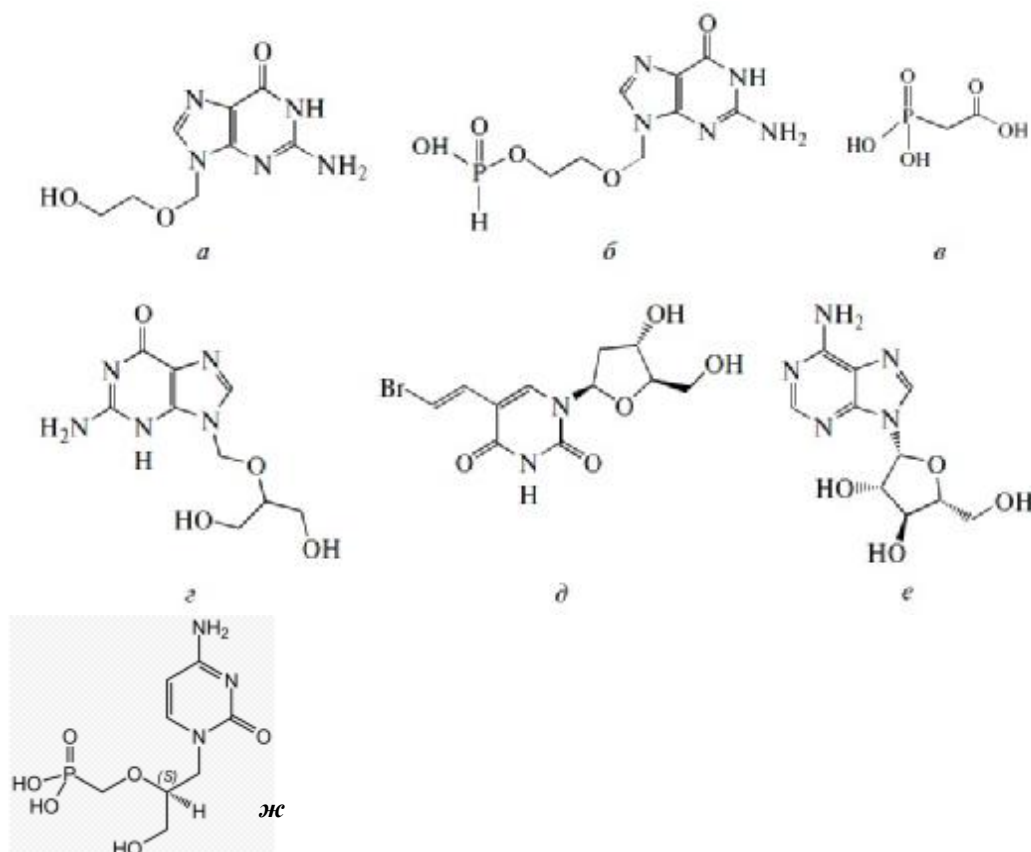


Рис. 1. Структурные формулы соединений: а – ацикловир (АСV); б – Н-фосфонат ацикловира (НрАСV); в – фосфоноацетат (РАА); г – ганцикловир (GCV); д – *E*-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксиуридин (BVDU); е – видарабин (AraA), ж – сидофовир (CDV)

Другое соединение – сидофовир (рис.1) также встраивается ДНК-полимеразой вируса и терминирует репликацию вирусной ДНК. С химической точки зрения сидофовир является синтетическим аналогом 2'-дезокицитидин-5'-монофосфата и, следовательно, ему не требуется фосфорилирование с участием тимидинкиназы вируса. Сидофовир сразу фосфорилируется ферментами клетки до трифосфатного производного. Таким образом, резистентность к данному препарату возникает только за счет мутаций в гене ДНК-полимеразы вируса.

Поэтому анализ спектра распределения мутаций и их сопоставление с изменениями чувствительности мутантных вирусов к известным нуклеозидным антигерпетическим препаратам может дать нам полезную информацию о механизме действия НрАСV.

1. Изучение генов *UL23* и *UL 30* ВПГ-1 штаммов L2 и L2/R.

1.1. Выделение и характеристика тимидинкиназы ВПГ-1 эталонного штамма L2.

Первым этапом нашей работы были клонирование, экспрессия, выделение и характеристика тимидинкиназы вируса герпеса простого тип 1 эталонного для России штамма L2. Из государственной коллекции вирусов

Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва) нам были предоставлены SDS-лизаты клеток Vero, зараженных эталонным штаммом ВПГ-1 L2. Из суммарной выделенной ДНК с помощью ПЦР был получен ген тимидинкиназы, который был клонирован в соответствующий вектор. На первом этапе было осуществлено клонирование кодирующей области гена тимидинкиназы в экспрессионную систему pET23b+ (Novagen). При этом хочется отметить, что клонирование осуществлялось таким образом, чтобы получившийся в ходе экспрессии белковый продукт не содержал в своем составе традиционный конец с несколькими остатками гистидина. Это было сделано для того, чтобы исключить возможное влияние дополнительных аминокислотных остатков на ферментативную активность получаемого белкового продукта. Очистку экспрессированной тимидинкиназы мы проводили при помощи аффинной хроматографии на колонке, содержащей аффинный сорбент, полученный на основе эпоксисефарозы с ковалентно “пришитым” 3'-аминотимидином. Экспрессию тимидинкиназы в данном случае мы наблюдали (рис. 2), но, к сожалению, фермент был крайне нестабилен и очень быстро терял свою ферментативную активность даже в присутствии стабилизаторов (глицерин и тимидин).

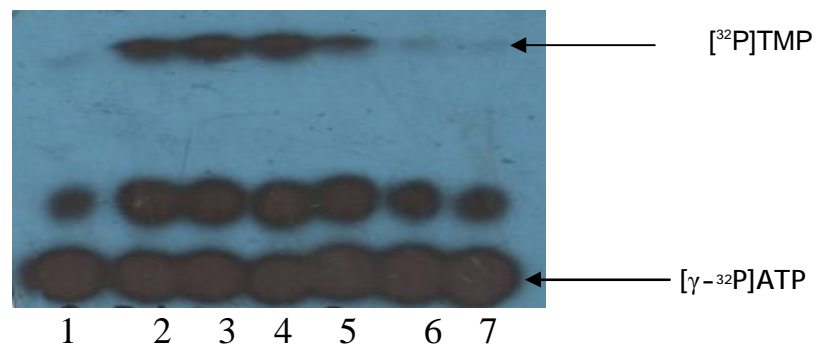


Рис.2 Радиоавтограф хроматограммы на PEI-целлюлозе хроматографического разделения продуктов ферментативной реакции тимидинкиназы ВПГ-1 штамма L2 после экспрессии в клетках *E.coli* и последующей очистки на колонке, содержащей аффинный сорбент. 1- контроль $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$; 2- 5 –элюиционная фракция; 6-7- штамм проскок

Поэтому была предпринята попытка выделить тимидинкиназу ВПГ-1 штамма L2 при использовании экспрессионной системы pQE30 (QIAGEN). В данной экспрессионной системе мы клонировали кодирующую область тимидинкиназы таким образом, что получаемый белковый продукт на своем N-конце имел последовательность из 6 остатков гистидина. Очистку полученного белка проводили при помощи аффинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA. При таком методе экспрессии нам не удалось получить достаточное количество активного фермента. Основная часть белкового продукта находилась в тельцах включения, то есть в виде нерастворимого осадка и не обладала ферментативной активностью. Изменение условий экспрессии (понижение температуры выращивания культуры) не дало желаемого результата. В результате экспрессия данного белка была осуществлена нашими коллегами из

лаборатории биотехнологий ИБХ РАН, которые клонировали кодирующую область гена тимидинкиназы в экспрессионный вектор рЕТ23b+, при этом получаемый белковый продукт содержал на своем С-конце последовательность из 6 остатков гистидина и имел молекулярную массу 42192 Да.

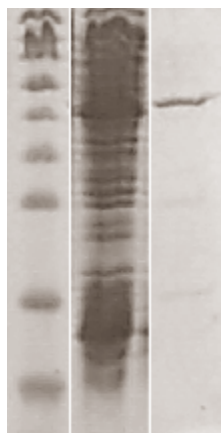


Рис. 3. Гель-электрофореграмма в 15% ПААГ в денатурирующих условиях рекомбинантной тимидинкиназы ВПГ-1 после всех стадий очистки (3) и клеточного лизата (2); 1 – стандарты молекулярных масс (Protein Ladder Fermentas).

Выделенный коллегами препарат после двух стадий хроматографической очистки (ионообменная, а затем аффинная хроматография на сорбенте Ni-NTA) имел чистоту не ниже 90% (см. рис.3) и не содержал примесей фосфатаз и неспецифических АТФ-аз, разрушающих $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ даже при длительной инкубации. Предоставленный нам препарат фермента при хранении при $+4^\circ\text{C}$ в течение недели терял примерно половину ферментативной активности, при -20°C фермент мог храниться несколько месяцев без заметного снижения активности, однако, однократное замораживание–оттаивание фермента снижало его активность примерно на 30%. По субстратной специфичности в отношении акцепторов фосфатной группы предоставленный нам фермент не отличается от описанных ранее ферментов. Кроме тимидина фермент фосфорилирует 2'-дезоксцитидин, ТМР, ацикловир, ганцикловир и BVDU (рис. 4). Кроме того данный фермент способен фосфорилировать некоторые синтетические аналоги нуклеозидов: d2Т, d2С, FLT, ЗТС, d4Т (см. рис. 4).

Оптимум рН реакции фосфорилирования тимидина и ацикловира достаточно широкий – от 7.5 до 8.5 (рис .5), что хорошо соответствует литературным данным. В то же время оптимум рН фосфорилирования ТМР значительно уже. К сожалению, мы не смогли найти в литературе данные о рН-зависимости реакции фосфорилирования ТМР для тимидинкиназ других штаммов ВПГ-1, и сравнить ферменты по этому параметру не представляется возможным. Для ферментативной активности ферменту абсолютно необходимы ионы Mg^{2+} в концентрации 2-5 мМ, а так же дитиотрейтол или β -меркаптоэтанол в концентрации 2-5 мМ.

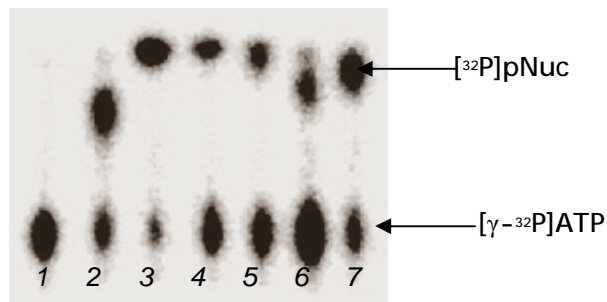


Рис. 4. Радиоавтограф хроматограммы на PEI-целлюлозе аликвот реакций фосфорилирования тимидинкиназой ВПГ-1 нуклеозидов с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ в качестве донора фосфата: BVDU (2), d2C (3), dT (4), TMP (5), ACV (6), GCV (7); 1 – контроль – $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ без акцептора фосфата. Стрелками отмечены местоположения $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и область продуктов фосфорилирования нуклеозидов – $^{32}\text{P}]\text{pNuc}$.

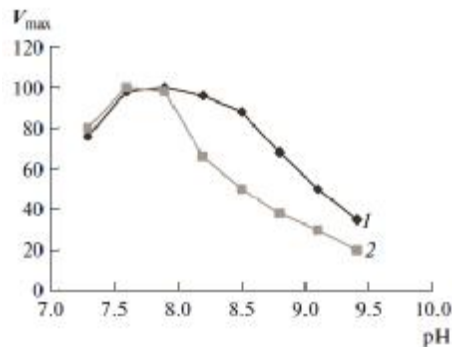


Рис. 5. Оптимум pH реакции фосфорилирования тимидинкиназой ВПГ-1 тимидина (1) и TMP (2).

Важной характеристикой фермента является его сродство к субстрату. Мы определили константы Михаэлиса тимидинкиназы для реакции фосфорилирования тимидина – 1 мкМ и ацикловира – 200 мкМ. Эти величины хорошо коррелируют с опубликованными ранее данными, однако следует учесть, что у различных штаммов ВПГ-1, с различной чувствительностью к ацикловиру, сродство ферментов к тимидину и ацикловиру существенно варьирует.

Особый интерес для нас вызывал НрАСV и его взаимодействие с тимидинкиназой вируса герпеса. Как следовало из вирусологических данных, предоставленных нам коллегами из Института вирусологии, данное соединение, по-видимому, не является субстратом для тимидинкиназы вируса. Полученные наши экспериментальные данные подтверждают это предположение, однако выяснилось, что НрАСV весьма эффективно ингибирует ферментативное фосфорилирование ацикловира (рис. 6). Обсчет хроматограмм с помощью фосфоимиджера показал, что при концентрации НрАСV 120 мкМ скорость фосфорилирования ацикловира снижается в 2 раза.

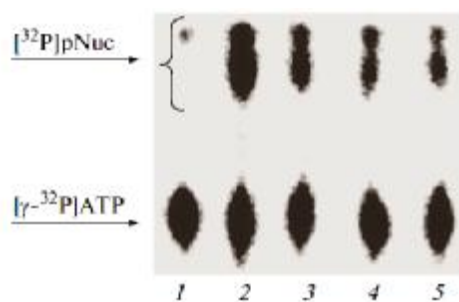


Рис. 6 Радиоавтограф хроматограммы на PEI-целлюлозе алиquot реакций фосфорилирования ацикловира тимидинкиназой ВПГ-1 с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ без ингибитора (2) и в присутствии Hr-ACV в концентрации 120 (3), 360 (4) и 720 мкМ (5); 1 – контроль – $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ без акцептора фосфата. Время реакции – 20 мин. Стрелками отмечены местоположения $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и область продуктов фосфорилирования нуклеозидов – $[\text{}^{32}\text{P}]\text{pNuc}$.

Подробное изучение кинетики ингибирования реакции фосфорилирования ацикловира в присутствии различных концентраций HrACV показало, что ингибирование носит смешанный характер (рис.7).

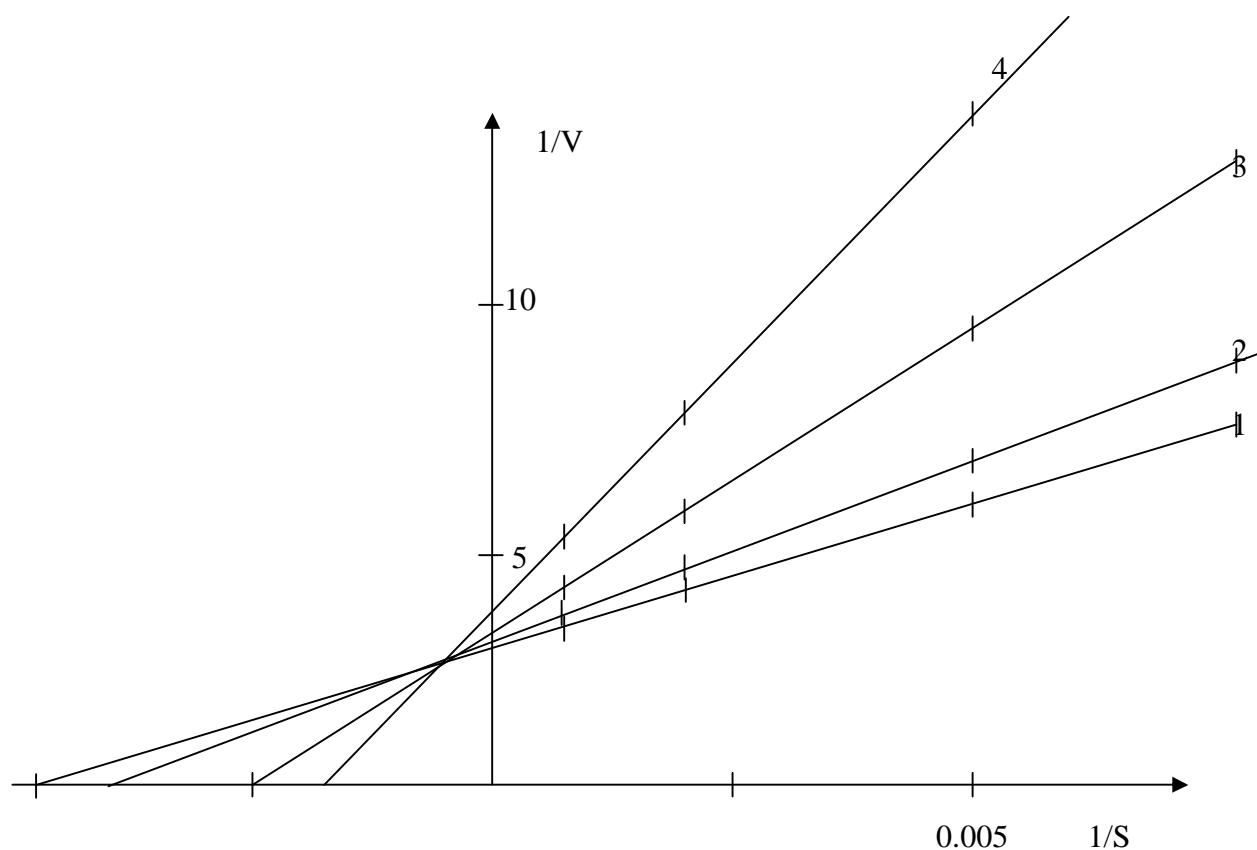


Рис. 7 Графики зависимости скорости фосфорилирования ацикловира от концентрации ацикловира тимидинкиназой ВПГ-1 в присутствии различных концентраций HrACV.

- 1- без HrACV
- 2- в присутствии 120 мкМ HrACV
- 3- в присутствии 360 мкМ HrACV
- 4- в присутствии 720 мкМ HrACV

1.2. Изучение структуры генов ТК и ДНК-полимеразы ВПГ-1 штаммов L2 и L2/R.

Из государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва) нам были предоставлены SDS-лизаты клеток Vero, зараженных эталонным штаммом ВПГ-1 L2, не имеющего устойчивости к ацикловиру и резистентным к ацикловиру штаммом ВПГ-1 L2/R, который был получен в результате серийного пассирования штамма L2 в градиенте концентраций ацикловира.

Из данных лизатов путем фенол-хлороформной экстракции мы выделили геномную ДНК полученных штаммов вируса. Гены тимидинкиназы и ген ДНК-полимеразы вируса были клонированы и затем секвенированы.

В результате проведенного исследования мы выявили мутации в функциональных доменах тимидинкиназы и ДНК-полимеразы штамма L2/R по сравнению с эталонным штаммом L2.

1.2.1. Анализ гена UL 23(тимидинкиназы).

Необходимо отметить, что тимидинкиназа вируса герпеса простого тип 1 обладает двумя наиболее важными областями, ответственными за функциональность фермента: АТФ-связывающий сайт (с51 по 63 аминокислоту) и нуклеотид-связывающий сайт (с 168 по 176 аминокислоту).

В гене тимидинкиназы ВПГ-1 штамма L2/R мы обнаружили 3 аминокислотные замены (V12A, W88R, R220H). Одна из данных замен, а именно замена валина на аланин в 12 положении, является полиморфизмом и не оказывает существенного влияния на резистентность данного штамма. Аминокислотная замена W88R находится в консервативной области гена тимидинкиназы, соответственно она может влиять на устойчивость данного штамма к ацикловиру.

Очень интересна обнаруженная нами в этом штамме аминокислотная замена аргинина на гистидин в 220 положении (R220H). Данная замена описана в нескольких работах, но ее влияние на активность фермента до конца не выяснено. По данным одних авторов она приводит к потере чувствительности вируса к ацикловиру, пенцикловиру (PCV) и ганцикловиру (GCV), т.е. к антигерпетическим препаратам, которые являются ациклическими нуклеозидными аналогами, действие которых зависит от активности тимидинкиназы. Кроме того, те же авторы в другой своей работе показали, что замена в том же положении аргинина на лизин (R220K) совместно с другими заменами вызывает изменение субстратной специфичности тимидинкиназы вируса герпеса простого тип 2. Однако в другой работе было показано, что замена аргинина на лизин никак не влияет на активность фермента. Сопоставляя литературные данные и на данные, полученные нами, мы считаем, что эта мутация оказывает влияние на чувствительность вируса к ацикловиру только в сочетании с другими заменами.

Нашими коллегами из Института Вирусологии им. Ивановского РАН была определена чувствительность штамма L2/R к другим антигерпетическим препаратам (табл.1). Следует отметить, что для таких соединений как

ганцикловир (GCV) и бромвинилдезоксиуридин (BVDU), фосфорилирование которых до соответствующих монофосфатов осуществляет вирусная тимидинкиназа, чувствительность данного штамма понижена на 1–2 порядка по сравнению с вирусом L2. С другой стороны, такие соединения как фосфоноксусная кислота (PAA) и видарабин (AraA), механизм действия которых не зависит от вирусной тимидинкиназы, подавляют репликацию штамма L2/R почти также эффективно, как и эталонного штамма L2 (табл. 2). Таким образом, мы видим, что выявленная нами мутация R220H в гене тимидинкиназы меняет восприимчивость штамма L2/R к противогерпетическим препаратам, действие которых основано на взаимодействии с тимидинкиназой.

1.2.2. Анализ гена UL30(ДНК-полимеразы).

При анализе гена ДНК-полимеразы UL30 штамма L2/R мы обнаружили девять аминокислотных замен, относительно штамма L2. Четыре аминокислотных замены (D46N, A346T, S866F и G1085E) найдены в чувствительном к ацикловиру штамме 17, который мы также сравнили с эталонным штаммом L2 и использовали его как дополнительный контроль. Соответственно данные замены, по-видимому, не влияют на работу ДНК-полимеразы ВПГ-1 и, соответственно, не приводят к возникновению резистентности к ацикловиру у данного штамма. Замена D151G находится в NH₂-домене и согласно кристаллографическим данным расположена на большом удалении от активного центра фермента, что так же наводит нас на мысль о том, что она не может играть решающую роль в возникновении резистентности штамма L2/R к ацикловиру. Замены Glu11Gly, Asp741Asn, Asn871Asp, Glu1104Asp не затрагивают консервативных регионов и по-видимому не влияют на работу фермента. Кроме того, замена Glu1104Asp была описана в одной работе у штамма чувствительного к ацикловиру как природный полиморфизм.

Таким образом, по нашим данным резистентность штамма L2/R к антигерпетическим препаратам определяется в первую очередь мутациями в гене тимидинкиназы, а мутации в гене ДНК-полимеразы дают существенно меньший вклад. Необходимо отметить, что данный результат хорошо согласуется с литературными данными. Как уже отмечалось ранее у ацикловир-резистентных штаммов ВПГ-1 спектр распределения мутаций в генах тимидинкиназы и ДНК-полимеразы составляет 20:1 соответственно.

1.3. Установление ферментативной активности тимидинкиназы штамма L2/R.

Глубокая резистентность штамма L2/R к ацикловиру и наличие значимых мутаций в гене тимидинкиназы данного штамма указывают на возможное отсутствие ферментативной активности тимидинкиназы. Данный штамм уже давно используется, как референсный при проверке новых антигерпетических препаратов, являющихся нуклеозидными аналогами. Однако его тимидинкиназа не была охарактеризована ранее, хотя она играет важную роль

при формировании резистентности к антигерпетическим препаратам. Необходимо было выяснить, насколько мутации в гене тимидинкиназы штамма L2/R влияют на его активность.

Для этого при помощи тонкослойной хроматографии с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ мы проверили активность тимидинкиназы в сульфаммонийных экстрактах клеточных лизатов *E. coli* после проведения экспрессии. На радиоавтографе (см. рис. 8) видно, что тимидинкиназа штамма L2/R не обладает ферментативной активностью. В дальнейшем мы пытались выделить ТК этого штамма при помощи аффинной хроматографии, однако ферментативная активность у полученного белка также не наблюдалась.

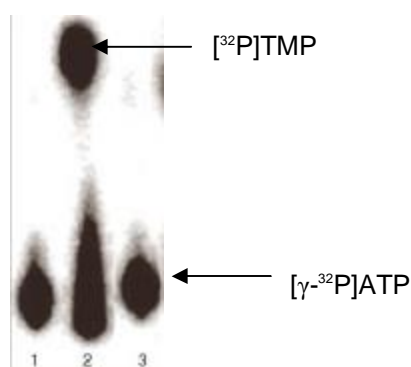


Рис.8 Радиоавтограф хроматограммы на PEI-целлюлозе хроматографического разделения продуктов ферментативной реакции тимидинкиназы ВПГ-1. 1- контроль $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$; 2- штамм L2; 3- штамм L2/R

Таким образом, на основании полученных данных мы считаем, что лабораторный штамм ВПГ-1 L2/R является штаммом ТК-.

2. Изучение генов *UL23* и *UL 30* ВПГ-1 штаммов, резистентных к Н-фосфонату ацикловира.

Как показано выше, штамм L2/R является по сути штаммом ТК⁻, т.е. тимидинкиназа в данном штамме не обладает ферментативной активности. Однако, как видно из таблицы 1, данный штамм сохраняет чувствительность к Н-фосфонату ацикловира практически на уровне ацикловир-чувствительного штамма L2. Учитывая, что НрАСV не является субстратом для тимидинкиназы ВПГ-1, мы вправе предположить, что механизм его действия реализуется через вирусную ДНК-полимеразу. Для того чтобы разобраться в этом мы проанализировали спектр мутаций в штаммах ВПГ-1, резистентных к НрАСV.

Нашими коллегами из вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва) нам были предоставлены 9 мутантных клонов ВПГ-1, которые были получены при помощи многократного пассирования штамма L2 на среде, содержащей НрАСV. Все эти клоны обладали высокой устойчивостью к НрАСV.

Таблица 1. Чувствительность вируса герпеса простого штаммов L2, L2/R и штаммов, резистентных к Н-фосфонату, к различным антигерпетическим соединениям в культуре клеток Vero E6.

Штамм	ИД50 (мкг/мл)						
	ACV	Нр-ACV	GCV	BVDU	Ara-A	РАА	CDV
L2	0.39	15.60	1.4	0.096	15.6	31.25	3,9
L2/R	>100	31.20	23	>24.7	31.25	31.25	-
1	6.25	>1000	11.25	12.35	15.6	31.25	0.49
2	6.25	1000	5.62	5.62	6.17	15.60	0.49
3	3.12	250	5.62	6.17	31.25	15.60	0.24
4	6.25	>1000	5.62	6.17	31.25	15.6	0.24
5	50	500	>45	>24.7	31.25	62.5	0.24
6	>100	1000	22.5	24.7	31.25	31.25	0.49
7	>50	1000	>45	>24.7	31.25	62.5	0.49
8	50	500	>45	>24.7	62.5	31.25	0.49
9	50	500	45	>24.7	31.25	31.25	0.24

Данные штаммы также были проверены нашими коллегами на устойчивость к уже известным антигерпетическим агентам (см.табл 1). Основываясь на этих данных полученные клоны можно разбить на две группы: глубокорезистентные к ацикловиру (5-9) и слаборезистентные к ацикловиру (1-4) клоны.

Для сравнения в качестве контрольных штаммов мы использовали эталонный ВПГ-1 L2, который не имеет устойчивости к антигерпетическим агентам и лабораторный штамм ВПГ-1 L2/R (см. выше). Из предоставленных SDS-лизатов клеток Vero, зараженных данными штаммами вируса герпеса простого тип 1, мы выделили ДНК и клонировали кодирующие области генов тимидинкиназы и ДНК-полимеразы. Затем мы определили их нуклеотидную последовательность и установили нуклеотидные и аминокислотные замены в данных штаммах, по сравнению с эталонным штаммом ВПГ-1 L2.

2.1. Анализ гена UL23 (тимидинкиназы).

У всех 9 мутантных штаммов вируса герпеса простого тип 1, резистентных к НрACV, имеется одна общая нуклеотидная замена С841Т,

которая приводит к образованию раннего стоп-кодона. В результате образуется укороченный белок тимидинкиназы, состоящий из 280 аминокислот (см.табл. 2).

Таблица 2. Аминокислотные замены, найденные в гене ТК у штаммов ВПГ-1, резистентных к Н-фосфонату ацикловира по сравнению с геном ТК эталонного штамма L2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
12	Val→Ala	Val→Ala	Val→Ala	Val→Ala	Val→Ala	Val→Ala	Val→Ala	Val→Ala	Val→Ala
59		Gly→Arg							
138									Val→Ala
231	Met→Val								
281	Stop	Stop	Stop	Stop	Stop	Stop	Stop	Stop	Stop

Этот факт согласуется с полученными нами ранее данными о том, что НрАСV взаимодействует с тимидинкиназой, ингибируя тем самым фосфорилирование ацикловира. То есть тимидинкиназа также является геном-мишенью при образовании штаммов вируса резистентных к НрАСV. Необходимо было понять, является ли такая укороченная форма тимидинкиназы активной. Для этого мы протестировали ферментативную активность лизатов клеток Vero, инфицированных полученными клонами ВПГ-1, резистентными к НрАСV. Анализ активности проводили при помощи тонкослойной хроматографии с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$. В качестве контроля был взят эталонный штамм L2. Как видно из приведенного рисунка (см. рис.9А), тимидинкиназы данных штаммов частично сохранили свою способность фосфорилировать тимидин, хотя их активность ниже, чем активность тимидинкиназы эталонного штамма L2. Следовательно, такой укороченный белок не теряет полностью свою функциональную активность.

Интересно, что тестирование активности этих лизатов в аналогичных условиях в отношении фосфорилирования BVDU показало, что «укороченные» мутантные ферменты теряют способность фосфорилировать BVDU (см. рис.9В). Это согласуется и с литературными данными, где было показано, что мутация Arg281 в гене тимидинкиназы, приводящая к появлению раннего стоп-кодона в штамме ВПГ-1, способствует появлению резистентности к BVDU и может приводить к возникновению устойчивости данного штамма к ацикловиру.

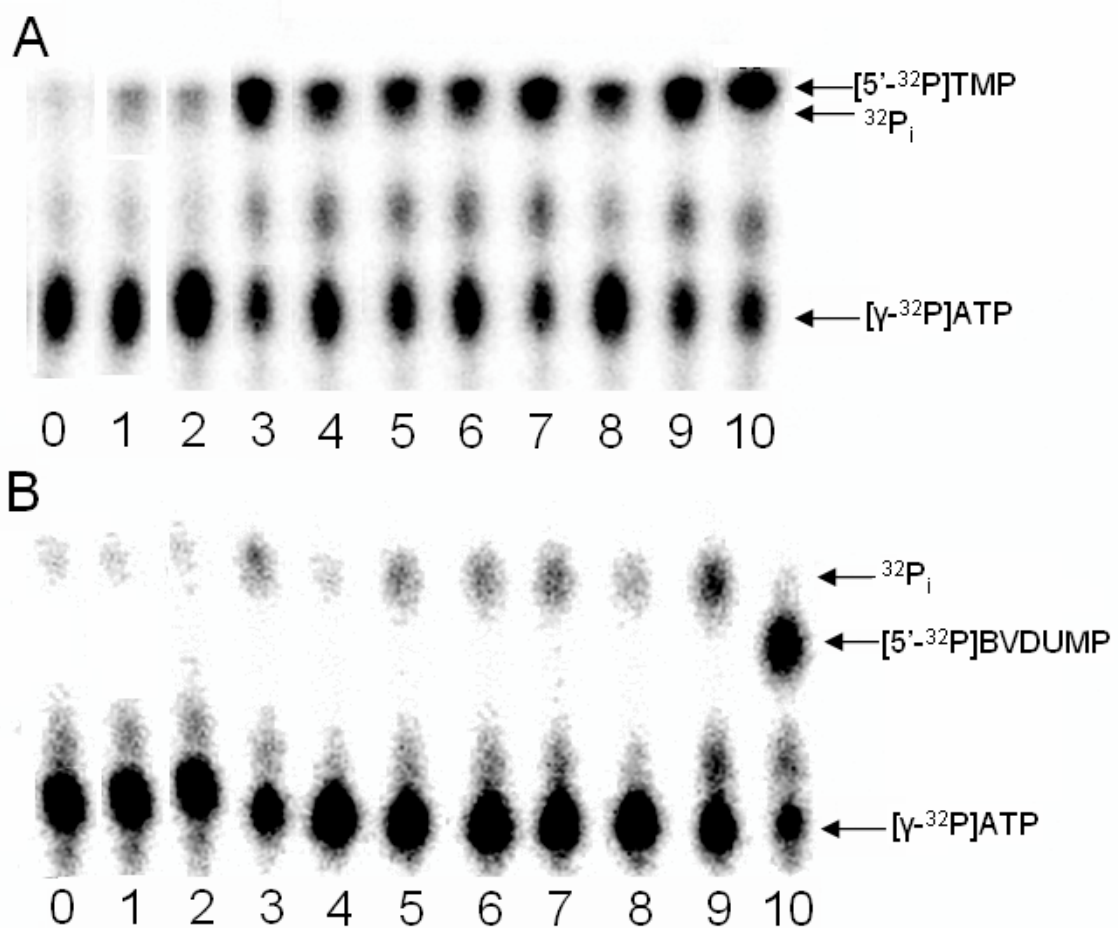


Рис. 9. Радиоавтограф хроматограммы на PEI-целлюлозе аликвот реакций фосфорилирования тимидина (*a*) и BVDU (*б*) тимидинкиназами различных штаммов HSV-1 с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$: реакция с лизатом неинфицированных клеток Vero (0), с лизатами клеток Vero, инфицированных клонами 1-9 HSV-1 (1-9) и с лизатом клеток Vero, инфицированных эталонным штаммом HSV-1/L₂ (10). Стрелочками отмечены местоположения $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и продуктов фосфорилирования нуклеозидов – $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{TMP}$ (на рис.а) и $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{BVDUMP}$ (на рис.б). $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{BVDUMP}$ - E-5-(2-бромвинил)-2'-деоксиуридин - $[5'\text{-}^{32}\text{P}]$ -монофосфат.

Однако наличие данной мутации не может полностью объяснить полученные нами результаты. Так штаммы с 1 по 4 имеют среднюю резистентность к ацикловиру, отличающуюся от эталонного штамма L2 в 8-16 раз. А штаммы с 5-9 являются высокорезистентными к ацикловиру и отличаются от эталонного штамма L2 в 128-256 раз. В тоже время аминокислотный и нуклеотидный состав идентичный у штаммов с 3 по 8. По-видимому, вирусная тимидинкиназа является не единственным фактором, определяющим резистентность к ацикловиру у данных штаммов.

Помимо данной нуклеотидной замены есть ещё и другие мутации, найденные в гене тимидинкиназы, на которые мы обратили внимание. У штамма 2 нами была обнаружена мутация (Gly59Arg), затрагивающая АТФ-

связывающий сайт тимидинкиназы. Мутации Met231Val в 1 штамме и Val138Ala в 9 штамме не затрагивают консервативные области гена тимидинкиназы ВПГ-1 и, по-видимому, не влияют на активность данного фермента.

Важно подчеркнуть, что мутация, приводящая к возникновению стоп-кодона, обнаружена во всех 9 штаммах, резистентных к НрАСV. По-видимому, эти места в гене необходимы для формирования комплекса с НрАСV, и мы предполагаем, что существенную роль в данном комплексе играет С-конец белка тимидинкиназы, поскольку именно он отсутствует у всех 9 штаммов, резистентных к НрАСV.

2.2. Анализ гена *UL30* (ДНК-полимеразы).

Из литературных данных известно, что у ДНК-полимеразы ВПГ-1 выделяют несколько консервативных регионов. Нами были обнаружены аминокислотные замены, затрагивающие следующие консервативные регионы: II регион (с 694 по 736 аминокислоту), III регион (с 805 по 849 аминокислоту), V регион (с 953 по 963 аминокислоту), а также δ -регион (с 531 по 627 аминокислоту) (рис.10). Мутации в данных областях могут приводить к изменению активности фермента.

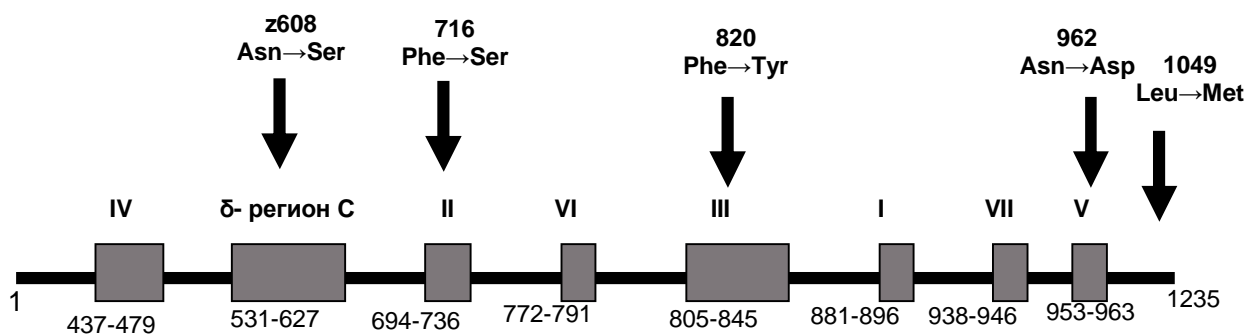


Рис. 10. Схематическое изображение расположения консервативных областей в гене *UL30* (указаны римскими цифрами). Стрелками указаны обнаруженные нами аминокислотные замены у штаммов ВПГ-1, резистентных к НрАСV, затрагивающие консервативные регионы гена ДНК-полимеразы.

При изучении гена *UL30* штаммов ВПГ-1, резистентных к НрАСV, мы обнаружили мутации, которые затрагивают консервативные регионы ДНК-полимеразы вируса (рис. 10, табл. 3). Так в штамме 1 обнаружена мутация Phe716Ser затрагивающая второй консервативный регион, а так же мутация Leu1049Met в консервативном домене. В 6 штамме обнаружена мутация Asn608Ser в консервативном δ -регионе. Обнаружено несколько мутаций расположенных вблизи от консервативных доменов: в 3 штамме замена Asn962Asp, в 4 штамме Ala987Thr, в 6 штамме Phe820Tyr и в 8 штамме Gly948Ser. Хочется также отметить нуклеотидную замену A346T, которая обнаружена во всех клонах, однако может ли она оказывать влияние на резистентность данных штаммов к Н-фосфонату ацикловира не совсем ясно.

В гене ДНК-полимеразы штамма L2/R, резистентного к ацикловиру, нами не было найдено мутаций, которые могли бы приводить к возникновению резистентности (см. выше). Мутации в HрАСV-резистентных штаммах и ацикловир-резистентном штамме L2/R частично перекрываются. Необходимо отметить, что некоторые мутации, встречающиеся в штамме L2/R, обнаружены нами как у штаммов, имеющих среднюю резистентность к ацикловиру (1-4), так и у штаммов высоко резистентных к нему (5-9). Такое совпадение мутаций можно объяснить тем, что попадая в клетку HрАСV способен частично гидролизоваться до ацикловира, то есть вирус герпеса простого находился в клетке в присутствии ацикловира и HрАСV одновременно. Соответственно, при селекции популяции ВПГ-1 отбирались мутации, приводящие к устойчивости к обоим соединениям. Следует подчеркнуть, что у каждого из 9 исследованных нами штаммов ВПГ-1, резистентных к HрАСV, обнаружены мутации в гене ДНК-полимеразы, которые мы можем классифицировать как мутации, затрагивающие специфичность фермента.

Не смотря на то, что у этих 9 штаммов ВПГ-1 мало изменилась чувствительность к фосфоацетату (РАА) и видарабину (АгаА), как видно из табл.1, у всех штаммов, резистентных к HрАСV, увеличилась чувствительность к сидофовиру (СVD). Как указывалось выше, сидофовир является антигерпетическим препаратом, действие которого направлено на ДНК-полимеразу вируса. Следовательно, можно с уверенностью сказать, что мутации в гене ДНК-полимеразы у штаммов, резистентных к HрАСV, приводят к изменению специфичности этого фермента.

Таким образом, мы видим, что распределение мутаций в генах тимидинкиназы и ДНК-полимеразы у штаммов ВПГ-1, резистентных к HрАСV, принципиально отличаются от аналогичного распределения для штаммов ВПГ-1, резистентных к ацикловиру. Мы можем заключить, что HрАСV взаимодействует с тимидинкиназой вируса герпеса простого тип 1, приводя к возникновению мутаций в гене *UL23*. Однако, механизм антигерпетического действия данного соединения, по видимому, реализуется с помощью ДНК-полимеразы вируса и, как следствие, мутации именно в гене *UL30* могут приводить к возникновению резистентности к HрАСV.

3. Анализ связи между структурой генов ТК и ДНК-полимеразы и резистентностью к АСV и HрАСV.

Таким образом, из проведенной работы мы видим, что ацикловир и HрАСV имеют принципиально разные механизмы формирования резистентности у ВПГ-1. Так глубоко резистентный к ацикловиру штамм L2/R, несущий в своем геноме неактивную тимидинкиназу, чувствителен к HрАСV. Его резистентность к ацикловиру может быть объяснена совокупностью мутаций W88R и R220H, обнаруженных в гене тимидинкиназы. Однако в гене ДНК-полимеразы значимых мутаций обнаружено не было, что видимо и объясняет его чувствительность к HрАСV.

Таблица 3. Аминокислотные замены, найденные в гене ДНК-полимеразы у штаммов ВПГ-1, резистентных к Н-фосфонату ацикловира по сравнению с геном ДНК-полимеразы эталонного штамма L2.

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	L2/R
- 46	Asp→Asn		Asp→Asn		Asp→Asn		Asp→Asn	Asp→Asn	Asp→Asn	Asp→Asn
? 111										Glu→Gly
? 140								Phe→Ser		
- 151					Asp→Gly					Asp→Gly
? 238						Ala→Val				
? 251			Gln→Pro							
? 285									Asn→Ser	
? 315				Trp→Arg						
- 346	Ala→Trp	Ala→Trp	Ala→Trp		Ala→Trp	Ala→Trp	Ala→Trp	Ala→Trp	Ala→Trp	Ala→Trp
? 484						Lys→Met				
? 494						Asn→Asp				
? 505	Gly→Asp									
? 567									Gly→Glu	
+ 608						Asn→Ser				
+ 716	Phe→Ser									
- 741		Asp→Asn	Asp→Asn							Asp→Asn
? 808									Ala→Thr	
+ 820						Phe→Tyr				
- 866				Ser→Phe						Ser→Phe
- 871		Asn→Asp	Asn→Asp	Asn→Asp						Asn→Asp
+/- 948								Gly→Ser		
+ 962			Asn→Asp							
? 987				Ala→Thr						
+1049	Leu→Met									
?1071				Arg→Trp						
-1085		Gly→Glu		Gly→Glu	Gly→Glu	Gly→Glu	Gly→Glu	Gly→Glu	Gly→Glu	Gly→Glu
-1104										Glu→Asp
?1121		Thr→Ala	Thr→Ala							
?1188									Leu→Arg	

+ – Мутации, затрагивающие консервативные регионы ДНК-полимеразы ВПГ-1, и приводящие к изменению работы данного фермента.

- – Полиморфизм ДНК-полимеразы ВПГ-1.

+/- – Мутации, находящиеся вблизи консервативных регионов ВПГ-1, могут приводить к изменению активности данного фермента.

? – Мутации, не затрагивающие консервативные регионы ДНК-полимеразы ВПГ-1, и не описанные ранее в литературе.

Анализ 9 штаммов, резистентных к НрАСV и имеющих различную чувствительность к ацикловиру, выявил несколько особенностей.

Во-первых, во всех 9 клонах обнаружена одинаковая мутация С841Т, приводящая к возникновению укороченного белка (280 а.к.). Однако, как нами было показано, данный белок частично сохраняет свою ферментативную

активность. Наличие этой мутации у всех 9 клонов, резистентных к НрАСV указывает на то, что данный С-конец белка важен для формирования комплекса тимидинкиназа-НрАСV. Как нами было показано, тимидинкиназа не фосфорилирует НрАСV, но он в свою очередь ингибирует ее активность.

Во-вторых, нами были во всех 9 штаммах обнаружены мутации в гене ДНК-полимеразы. Так у штаммов 1, 3, 4, 6, 8 данные мутации затрагивали консервативные регионы гена и, соответственно, могли влиять на резистентность данных штаммов к антигерпетическим препаратам.

Однако полученные нами данные не могут полностью объяснить результаты, полученные нашими коллегами из Института вирусологии им. Ивановского РАМН. Как видно из табл.1 штаммы с 1-4 имеют среднюю резистентность к ацикловиру, а штаммы с 5-9 являются высоко резистентными к ацикловиру. Но у штаммов с 3-8 аминокислотный и нуклеотидный состав гена тимидинкиназы идентичный. По-видимому, найденные нами, в гене ДНК-полимеразы мутации и являются основным фактором в различии устойчивости данных штаммов к ацикловиру.

Таким образом, мы видим, что у НрАСV резистентных клонов спектр распределения мутаций отличается от штаммов, резистентных к ацикловиру. Это указывает на различие в механизмах формирования резистентности к данным антигерпетическим препаратам.

Выводы.

1. Получена и охарактеризована тимидинкиназа ВПГ-1 из эталонного для России штамма L2. Определены K_m : для тимидина -1 мкМ и ацикловира – 200 мкМ. Установлено, что Н-фосфонат ацикловира ингибирует ферментативную активность тимидинкиназы ВПГ-1 штамма L2 по смешанному механизму.
2. Для эталонного штамма ВПГ-1 L2 установлена нуклеотидная и аминокислотная последовательности генов UL23 и UL30 (тимидинкиназы и ДНК-полимеразы).
3. Установлена нуклеотидная и аминокислотная последовательности генов ТК и ДНК-полимеразы ВПГ-1 лабораторного штамма L2/R, глубоко резистентного к ацикловиру. Выявлены мутации в гене *UL23* (ТК) данного штамма, обуславливающие его резистентность: W88R, R220H.
4. Установлена нуклеотидная и аминокислотная последовательности генов ТК и ДНК-полимеразы ВПГ-1 9 штаммов, резистентных к Н-фосфонату ацикловира. Выявлена общая для всех штаммов мутация в гене ТК- С841Т, приводящая к получению укороченного белка, частично сохраняющего свою активность. Установлен необычный спектр мутаций в генах ТК и ДНК-полимеразы у штаммов, резистентных к Н фосфонату ацикловира.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **А. А. Гуськова**, А.В. Загурный, М. Ю. Скоблов, А.В. Баранова, В. Л. Андропова, Н.К. Янковский, Г. А. Галегов, Ю. С. Скоблов. Молекулярно-генетический анализ тимидинкиназы вируса герпеса простого тип 1.// Молекулярная биология, 2005, том 39, № 1, с. 155–158.
2. **Гуськова А.А.**, Скоблов М.Ю., Андропова В.Л., Галегов Г.А., Скоблов А.Ю., Скоблов Ю.С. Тимидинкиназа вируса герпеса простого тип 1: структура гена мутантных штаммов, резистентных к ацикловиру. Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов.// г.Новосибирск 2008, (80) 61.
3. **Anna A. Gus'kova**, Mikhail Yu. Skoblov, Anna N. Korovina, Maxim V. Yasko, Inna L. Karpenko, Marina K. Kukhanova, Valeria L. Andronova, George A. Galegov and Yuri S. Skoblov. Antitherpetic Properties of Acyclovir 5Hydrogenphosphonate and the Mutation Analysis of Herpes Virus Resistant Strains.//Chem Biol Drug Des 2009; 74: 382–389.
4. А. Н. Коровина, **А. А. Гуськова**, М. Ю. Скоблов, В. Л. Андропова, Г. А. Галегов, С. Н. Кочетков, М. К. Куханова, Ю. С. Скоблов. Анализ мутаций в генах ДНК-полимераз и тимидинкиназ клинических изолятов вируса простого герпеса, резистентных к антигерпетическим препаратам.//Молекулярная биология, 2010, том 44, № 3, с. 488–496
5. В. Н. Степаненко, Р. С. Есипов, А. И. Мирошников, В. Л. Андропова, Г. А. Галегов, М. В. Ясько, **А. А. Гуськова**, А. Ю. Скоблов, Ю. С. Скоблов. Клонирование, экспрессия, выделение и свойства тимидинкиназы вируса герпеса простого, штамм L2.// Биоорганическая химия, 2011, том 37, № 4, с. 1–6
6. **А. А. Гуськова**, М. Ю. Скоблов, В. Л. Андропова, Г. А. Галегов, С. Н. Кочетков, Ю. С. Скоблов. Ферментативная активность тимидинкиназы штаммов вируса простого герпеса, резистентных к Н-фосфонату ацикловира.// Биоорганическая химия, 2011, том 37, № 5, с. 1–4

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПГ-1— вирус герпеса простого тип 1
ТК—тимидинкиназа;
АСV— ацикловир
НрАСV— Н-фосфонат ацикловира;
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;
ПЦР — полимеразная цепная реакция;
т. п. н. — тысяча пар нуклеотидов;
п. н. — пара нуклеотидов;
SDS — додецилсульфат натрия
АТФ (АТФ) — аденозинтрифосфат
ТМР — тимидинмонофосфат
ПААГ — полиакриламидный гель
d2C – 2',3'-дидезоксицитидин
d2T – 3'-дезокситимидин
d4T – 3'-дезокси-2',3'-дидегидротимидин
FLT – 3'-фтор-3'-дезокситимидин
ЗТС – β -L-2',3'-дезокси-3'-тиацитидин