

БУРЯЧЕНКО С. В.<sup>✉</sup>, СТЕГНІЙ Б. Т.ННЦ Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН України,  
Україна, 61022, м. Харків, вул. Пушкінська, 83<sup>✉</sup> [semenb837@gmail.com](mailto:semenb837@gmail.com)АМІНОКИСЛОТНІ ЗАМІНИ ПОЛІМОРФНИХ ЛОКУСІВ ГЕНІВ ГЕМАГЛЮТИНІНУ,  
НЕЙРАМІНІДАЗИ ТА НУКЛЕОПРОТЕЇНУ ШТАМІВ H1N1  
ТА H7N9 ВІРУСУ ПТАШИНОГО ГРИПУ А

**Мета.** Значна мінливість, що сприяє утворенню високовірулентних варіантів, широка поширеність у природних резервуарах, здатність долати міжвидові бар'єри і легкість повітряно-крапельного шляху передачі сприяють розвитку епідемій та пандемій респіраторних інфекцій. Визначення поліморфних ділянок та типу поліморфізму досліджуваних послідовностей генів підтипів вірусу дозволить передбачити амінокислотні заміни та встановити РНК – мішені для генотипування. **Методи.** Аналіз проводили на нуклеотидних послідовностях генів HA, NA та NP штамів H1N1 і H7N9 вірусу пташиного грипу А, одержаних із бази NCBI. Амінокислотні послідовності генів отримали шляхом трансляції нуклеотидних послідовностей генів за допомогою програми MEGA 6. Поліморфні локуси та кластерний аналіз проводили за допомогою програми MEGA 6 алгоритмом ClustalW. **Результати.** Досліджено нуклеотидні послідовності генів HA, NA та NP, а також продукти їх трансляції у штамів H1N1 і H7N9 вірусу пташиного грипу А. Визначено поліморфні ділянки та тип поліморфізму досліджуваних послідовностей. **Висновки.** Було виявлено ділянки поліморфізму на нуклеотидних послідовностях генів HA, NA та NP (штамів H1N1 та H7N9) та продуктах їх трансляцій. З'ясовано, що поліморфізм генів HA, NA та NP (штаму H1N1) вищий від поліморфізму HA, NA та NP (штаму H7N9) через наявність у перших значної кількості синонімічних триплетів.

**Ключові слова:** вірус грипу А, гемаглютинін, нейрамінідаза, нуклеопротеїн, поліморфізм.

Віруси грипу належать до сімейства вірусів *Orthomyxoviridae*, які характеризуються своїм сегментованим РНК-негативним геномом. Сегментований геном вірусу грипу зумовлює його реасортацію у клітинах господаря, що призводить до появи нових вірусів. Деякі комбіна-

ції генів можуть спричинити появу вірусів з пандемічним потенціалом [1].

Віруси грипу – одні з найпоширеніших причин респіраторних та шлунково-кишкових інфекцій. Ці віруси поділяються на три типи: А, В і С [2].

Значний ризик зоонотичної інфекції створює вірус грипу А *Influenzavirus A*. Найважливішими факторами його вірулентності є покривні білки гемаглютинін (HA), нейрамінідаза (NA), що забезпечують приєднання до клітини-господаря та фактор реплікації нуклеопротеїн (NP) [2]. Ці білки кодуються генами HA, NA та NP. Різні комбінації HA та NA зумовлюють багатоманітні підтипи вірусу грипу А. Існує вісім підтипів HA та 11 NA. Епізоотію зазвичай викликають штами H1N1 та H7N9, які є високовірулентними [3].

За результатами філогенетичного дослідження було виявлено можливість вірусів грипу А долати міжвидовий бар'єр, проте молекулярні процеси, що призводять до зміни господаря, недостатньо досліджені [4, 5]. Мутації РНК та реасортація є загальними механізмами зміни геному [6]. Виявлено панування процесів реасортації та конвергенції [7, 8]. Отже, розуміння еволюції HA має велике значення для охорони здоров'я [9].

Метою пропонованої роботи було виявити амінокислотні заміни поліморфних локусів генів HA, NA та NP штамів H1N1 і H7N9 вірусу пташиного грипу *Influenza virus A*.

**Матеріали і методи**

Дослідження проводилися на нуклеотидних послідовностях генів HA, NA та NP штамів H1N1 і H7N9 вірусу пташиного грипу *Influenza virus A*, одержаних із Національного Центру Біотехнологічної Інформації (National Centre of Biotechnology Information) [10]. Амінокислотні послідовності HA, NA та NP отримали шляхом

трансляції нуклеотидних послідовностей генів *HA*, *NA* та *NP* за допомогою програми MEGA 6 [11].

Поліморфізм *HA*, *NA* та *NP* і генів *HA*, *NA* та *NP* досліджували шляхом локального вирівнювання дібраних послідовностей за алгоритмом Сміта-Вотермана за допомогою програми VectorNTI-11 [12]. Поліморфні локуси визначали на найдовших нуклеотидних та амінокислотних послідовностях відповідних генів та білків.

Кластерний аналіз і визначення генетичних та амінокислотних дистанцій досліджуваних послідовностей проводили за допомогою програми MEGA 6 алгоритмом ClustalW. Дендрограми будували за методом максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood Method). Для визначення достовірності розподілу дослі-

джуваних послідовностей у побудованих дендрограмах використовували бут-стреп аналіз, за якого число реплікацій дорівнювало 500 [13]. Достовірним вважали результат, більший за 70.

### Результати та обговорення

За результатом вирівнювання досліджуваних нуклеотидних та амінокислотних послідовностей визначено їх поліморфізм (табл. 1, 2). Найбільш розповсюдженими мутаціями є делеції та однонуклеотидні/одноамінокислотні заміни.

За результатом кластерного аналізу нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А *H1N1* та *H7N9* побудована дендрограма (рис. 1).

Таблиця 1. Варіабельність генів *HA*, *NA* та *NP* штамів H1N1 та H7N9 вірусу пташиного грипу

Ген	Нуклеотидна послідовність	Ділянка гену (позиція нуклеотида 3'– 5')	Тип поліморфізму
HA	U53162.1	41-43, 128-129, 191-192, 1068-1070, 1668-1670, 1718	Інсерція
		116-117, 220-223, 241, 295-297, 342-344, 399-400, 405-407, 413-416, 449-450, 459, 515, 560-563, 878-879, 912, 1612-1617, 1701, 1752-1796	Делеція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності	Однонуклеотидна заміна
NA	CY123246.1	1-20, 146-148, 161-162, 241, 791, 934, 973-974, 1022-1025, 1043-1044, 1053, 1183, 1368, 1385, 1401, 1435, 1461-1480	Делеція
		110, 183, 195-196, 210-212, 222-227, 276, 292-297, 782, 1204, 1267-1268, 1281-1284	Інсерція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності	Однонуклеотидна заміна
NP	CY100531	1-45, 1543-1565	Делеція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності <sup>3</sup>	Однонуклеотидна заміна

Таблиця 2. Варіабельність *HA*, *NA* та *NP* штамів H1N1 та H7N9 вірусу пташиного грипу

Блок	Амінокислотна послідовність	Ділянка білку	Тип поліморфізму
HA	U53162.1	14-15, 43, 64, 356-357, 556-557, 573	Інсерція
		39, 74-75, 81, 98, 114-115, 133, 135-136, 138-139, 150, 153, 172, 187-188, 293, 304, 538-539, 567, 584-599	Делеція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності <sup>1</sup>	Одноамінокислотна заміна
NA	CY123246.1	1-7, 49-50, 54, 81, 791, 264, 325, 341-342-1025, 342, 351, 395, 456, 462, 467, 479, 487-494	Делеція
		37, 61, 65, 70-71, 74-76, 92, 98-99, 261, 3612, 423, 427-428	Інсерція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності <sup>2</sup>	Одноамінокислотна заміна
NP	CY100531	1-15, 515-522	Делеція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності <sup>3</sup>	Одноамінокислотна заміна

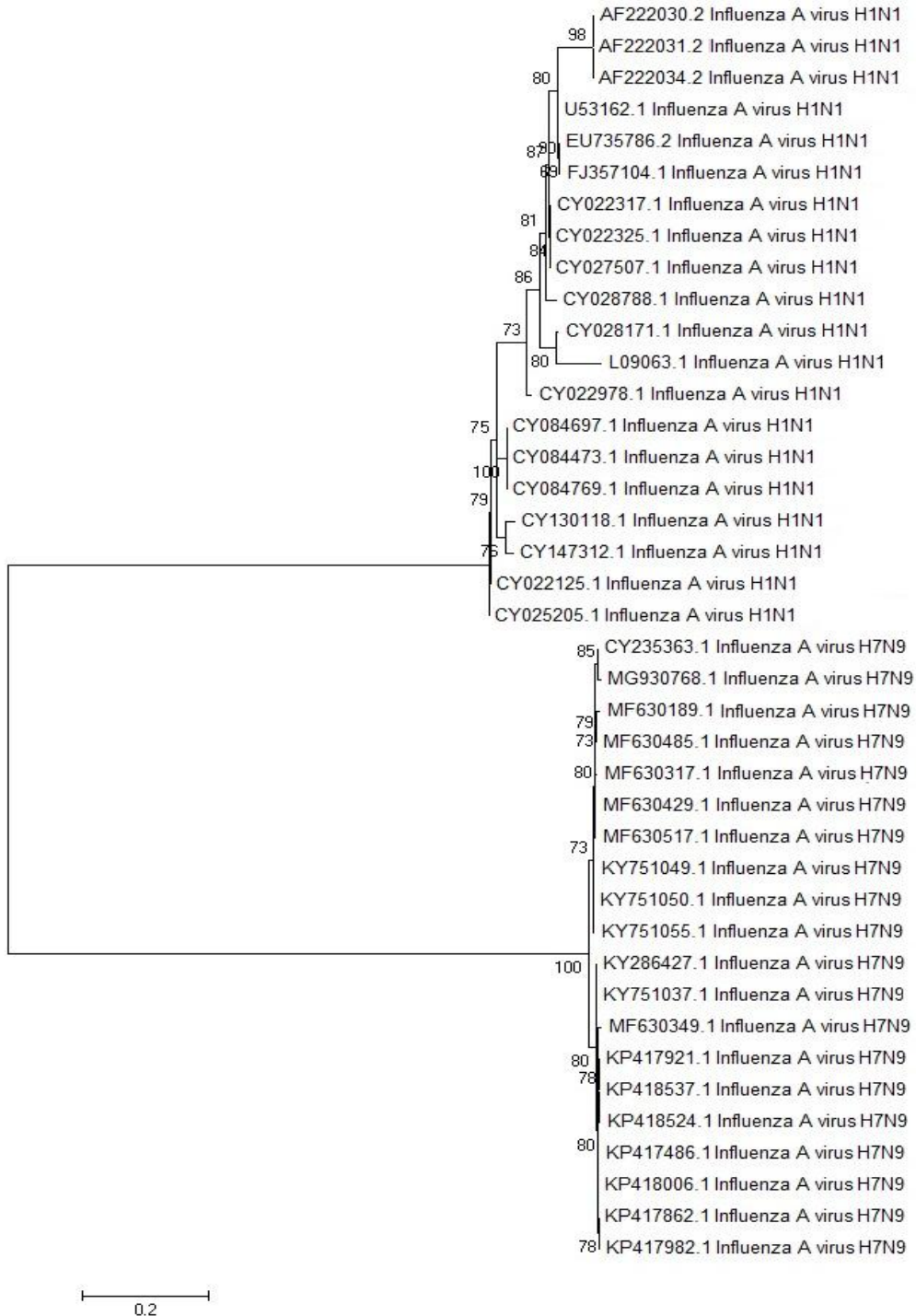


Рис. 1. Кластерний аналіз нуклеотидних послідовностей гена *HA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу.

Побудована дендрограма містить дві клади. Перша клада складається з нуклеотидних послідовностей штаму H7N9, друга – з послідовностей штаму H1N1.

За результатом кластерного аналізу нуклеотидних послідовностей гена *NA* штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 побудована дендрограма (рис. 2).

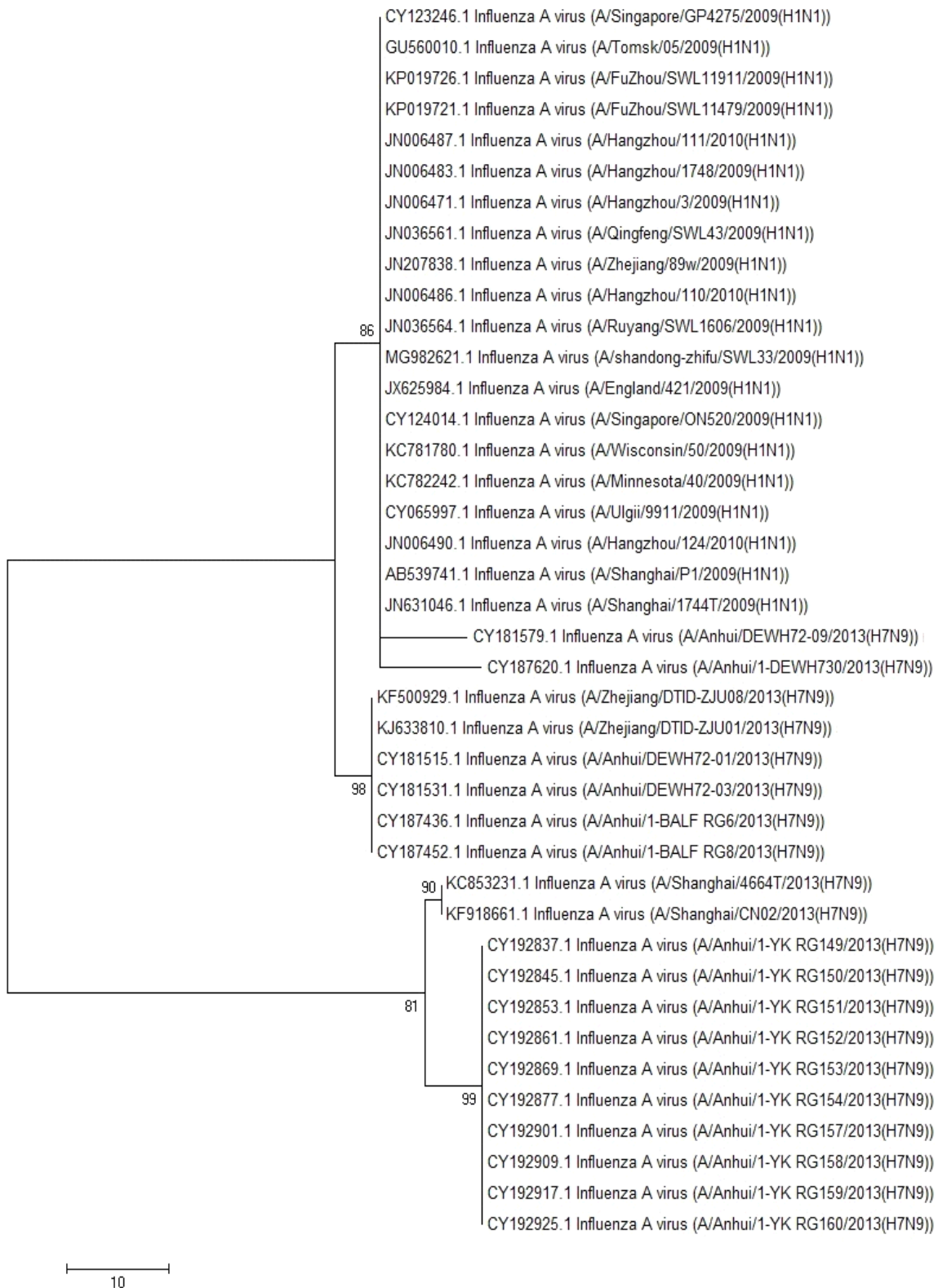


Рис. 2. Кластерний аналіз нуклеотидних послідовностей гена NA штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу.

Побудована дендрограма складається з двох клад, одна з яких містить нуклеотидні послідовності штамів *H1N1* та *H7N9*, інша – послідовності штаму *H7N9*.

За результатом кластерного аналізу нуклеотидних послідовностей гена *NP* штамів вірусу грипу А *H1N1* та *H7N9* побудована дендрограма (рис. 3).

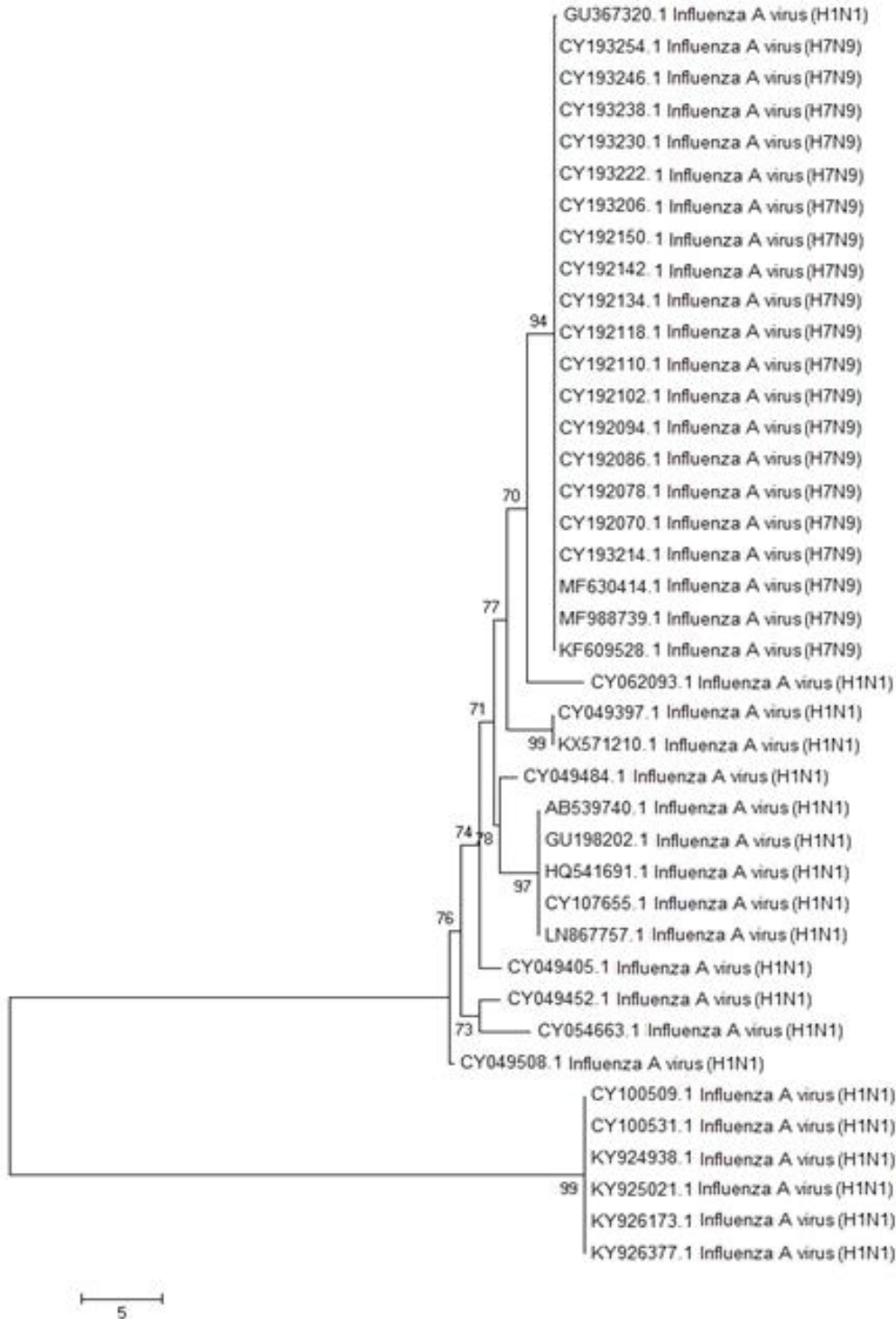


Рис. 3. Кластерний аналіз нуклеотидних послідовностей гена *NP* штамів вірусу грипу А *H1N1* та *H7N9*. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу.



Побудована дендрограма містить дві клади. Перша клада складається з нуклеотидних послідовностей штамів *H1N1* та *H7N9*, друга – з ідентичних послідовностей штаму *H1N1*.

За результатом кластерного аналізу амінокислотних послідовностей HA штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 побудована дендрограма (рис. 4).

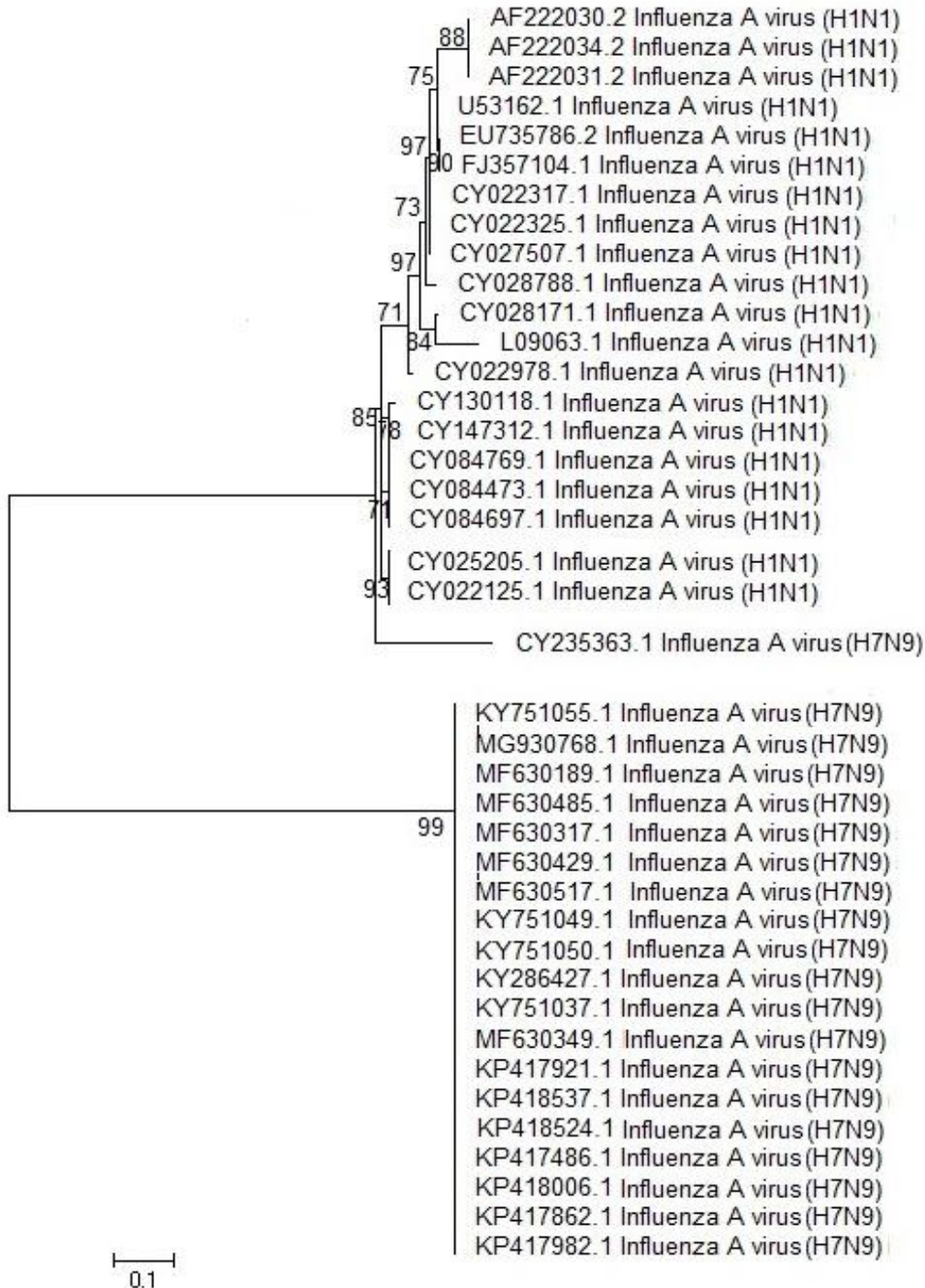


Рис. 4. Кластерний аналіз амінокислотних послідовностей HA штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу.

Побудована дендрограма містить дві клади. Перша клада складається з нуклеотидних послідовностей штамів H1N1 та H7N9, друга – з ідентичних послідовностей штаму H7N9.

За результатом кластерного аналізу амінокислотних послідовностей NA штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 побудована дендрограма (рис. 5).

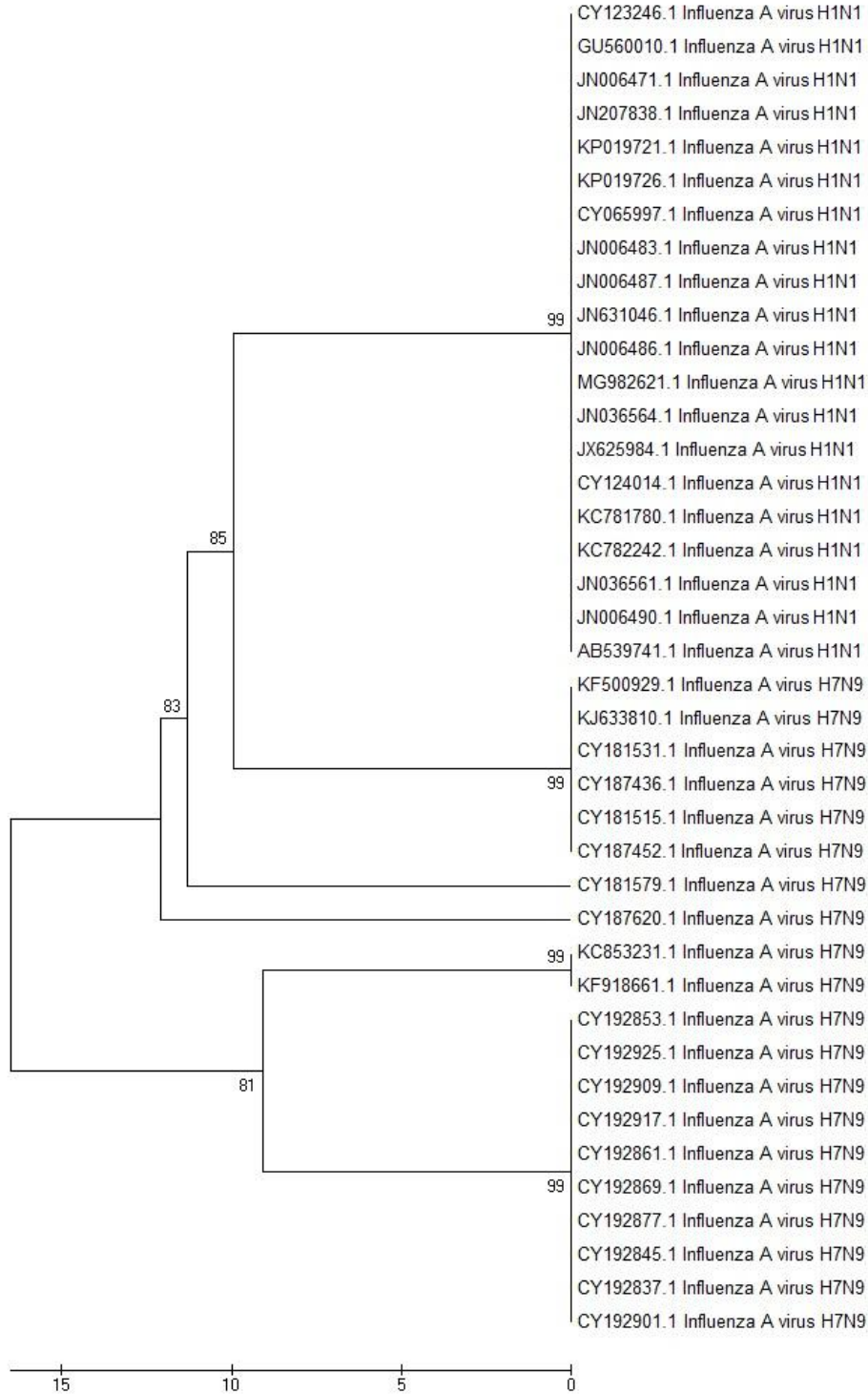


Рис. 5. Кластерний аналіз амінокислотних послідовностей NA штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу.

Побудована дендрограма містить дві клади. Перша клада складається з ідентичних послідовностей штаму H7N9 та послідовностей H1N1, друга – з послідовностей штаму H7N9.

За результатом кластерного аналізу амінокислотних послідовностей NP штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 побудована дендрограма (рис. 6).

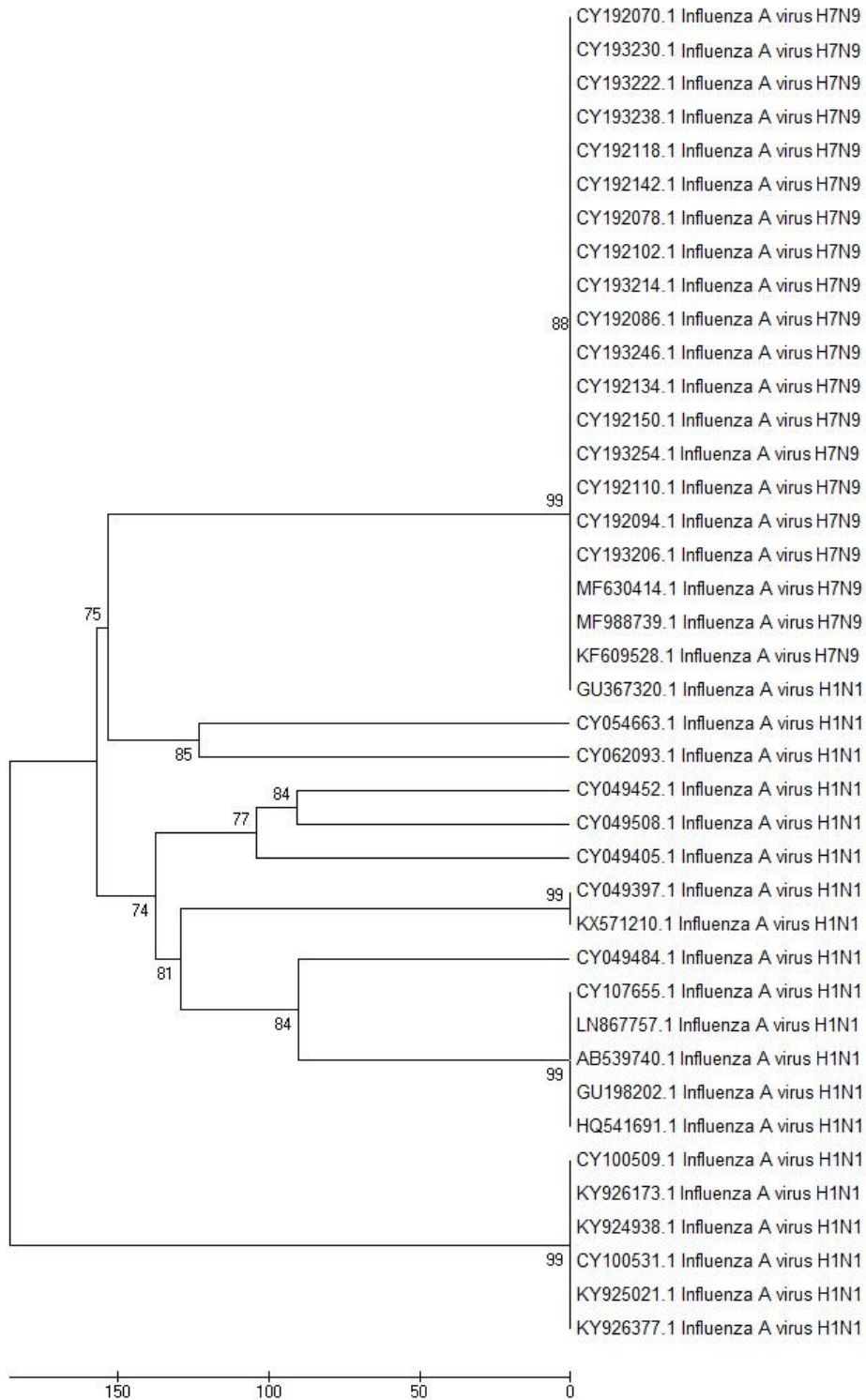


Рис. 6. Кластерний аналіз амінокислотних послідовностей NP штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9. Цифри на вузлах гілок вказують на значення бут-стреп аналізу.



Побудована дендрограма містить дві клади. Перша клада складається з ідентичних послідовностей штаму H7N9 та H1N1, друга – з послідовностей штаму H1N1.

Показники бут-стреп аналізу на побудованих дендрограмах більші від 70, що вказує на достовірність розподілу досліджуваних нуклеотидних послідовностей.

Таким чином з'ясовано, що поліморфізм генів HA, NA та NP вищий від поліморфізму HA, NA та NP. 19 послідовностей HA та NP штаму H7N9, всі послідовності NA штаму H1N1 та всі послідовності NP штаму H7N9 є ідентичними. Інші послідовності мають менший, у порівнянні з відповідними нуклеотидними послідовностями, рівень поліморфізму, що зумовлено значною кількістю синонімічних замін.

## Висновки

За результатами досліджень було виявлено ділянки поліморфізму на нуклеотидних послідовностях генів HA, NA та NP (штамів H1N1 та H7N9) та продуктах їх трансляції. З'ясовано, що поліморфізм генів HA, NA та NP (штаму H1N1) вищий від поліморфізму HA, NA та NP (штаму H7N9) через наявність у перших значної кількості синонімічних триплетів.

Результати досліджень вказують на походження різних типів HA, NA та NP і можуть бути використані під час досліджень еволюції вірусу грипу А.

*Автор щиро дякує за всебічну допомогу у проведенні досліджень доктору ветеринарних наук, академіку Національної академії аграрних наук України, професору Борису Тимофійовичу Стегнію (ННЦ Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини НААН України) та кандидату біологічних наук Олені Володимирівні Білінській (В. Я. Юр'євський науково-дослідний інститут НААН України).*

## References

- Allison A.B., Ballard J.R., Tesh R.B., Brown J.D., Ruder M.G., Keel M.K., Munk B.A., Mickley R.M., Gibbs S.E.J., Travassos da Rosa A.P.A., Ellis J.C., Ip H.S., Shearn-Bochsler V.I., Rogers M.B., Ghedin E., Holmes E.C., Parrish C.R., Dwyerj C. Cyclic Avian Mass Mortality in the Northeastern United States Is Associated with a Novel Orthomyxovirus. *J Virol*. 2015. № 89 (2). P. 1389–1403.
- Wu C., Lin C., Tsai T., Lee C., Chuang H., Chen J., Tsai M., Chen B., Lo P., Liu C., Shivatare V., Wong C. Influenza A surface glycosylation and vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017. № 114 (2). P. 280–285.
- Tada T., Suzuki K., Sakurai Y., Kubo M., Okada H., Itoh T., Tsukamoto K. Emergence of Avian Influenza Viruses with Enhanced Transcription Activity by a Single Amino Acid Substitution in the Nucleoprotein during Replication in Chicken Brains. *J Virol*. 2011. № 85, (19). P. 10354–10363.
- Ozawa M., Kawaoka Y. Crosstalk between animal and human influenza viruses. *Annu Rev Anim Biosci*. 2013. № 1. P. 21–42.
- Staats C.B., Webster R.G., Webby R.J. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1). *Influenza Other Respir Viruses*. 2009. № 3 (5). P. 207–213.
- Dukhovlinov I., Al-Shekhadat R., Fedorova E., Stepanova L., Potapchuk M., Repko I., Rusova O., Orlov A., Tsybalova L., Kiselev O. Study of immunogenicity of recombinant proteins based on hemagglutinin and neuraminidase conservative epitopes of Influenza A virus. *Med Sci Monit Basic Res*. 2013. № 19. P. 221–227.
- Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation and Pandemic Formation. *Cell Host Microbe*. 2010. № 7 (6). P. 440–451.
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. 1992. № 56 (1). P. 152–179.
- Duvvuri V.R., Cuff W.R., Wu G.E., Wu J. Role of positive selection pressure on the evolution of H5N1 hemagglutinin. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2009. № 7 (1–2). P. 47–56.
- National Center for Biotechnology Information Search database. URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (дата звернення: 1.03.2020).
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol*. 2011. № 28 (10). P. 2731–2739.
- Smith S., Waterman M. Identification of Common Molecular Subsequences. *Journal of Molecular Biology*. 1981. № 147. P. 195–197.
- Efron B. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Ann. Statist*. 1979. № 7 (1). P. 1–26.

**BURIACHENKO S.V., STEGNIY B.T.**

*NSC Institute experimental and clinical veterinary medicine, NAAS of Ukraine,  
Ukraine, 61023, Kharkiv, Pushkinska str., 83, e-mail: semenb837@gmail.com*

### **AMINO ACID REPLACEMENTS OF THE POLYMORPHIC LOCUSES OF THE HEMAGGLUTININ, NEURAMINIDASA AND NUCLEOPROTEIN GENES OF THE INFLUENZA VIRUS A STRAINS H1N1 AND H7N9**

**Aim.** Significant variability contributing to the formation of highly virulent variants, widespread distribution in natural reservoirs, the ability to overcome interspecific barriers and the ease of the airborne pathway contribute to the development of epidemics and pandemics of respiratory infections. Determination of polymorphic sites and type of polymorphism of the investigated virus subtype gene sequences will allow to determine amino acid substitutions and to establish RNA targets for genotyping. **Methods.** The analysis was performed on the nucleotide sequences of genes HA, NA and NP of strains H1N1 and H7N9 of avian influenza A virus obtained from the NCBI base. Amino acid sequences of genes were obtained by translation of nucleotide gene sequences using MEGA 6. Polymorphic loci and cluster analysis were performed using MEGA 6 using the ClustalW algorithm. **Results.** The nucleotide sequences of HA, NA and NP genes were investigated, as well as their translation products inavian influenza A strains H1N1 and H7N9. The polymorphic regions and type of polymorphism of the sequences were determined. **Conclusions.** Polymorphism regions were detected on the nucleotide sequences of the HA, NA, and NP genes (H1N1 and H7N9 strains) and their translation products. The polymorphism of the HA, NA, and NP genes (strain H1N1) is shown to be higher than the polymorphism of HA, NA, and NP (strain H7N9) due to the presence in the first significant number of synonymous triplets.  
**Keywords:** influenza A virus, hemagglutinin, neuraminidase, nucleoprotein, polymorphism.