

3
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Lycaena thersamon (Esper, 1784)
Червонец блестящий
Шовкун Д.Ф.



2019

УЧРЕДИТЕЛЬ
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Ю.А. Панферова, 2019

УДК 579.25:577.29

Ю.А. Панферова

АНАЛИЗ *IN SILICO* ГЕНА *VLY*, КОДИРУЮЩЕГО ЦИТОЛИЗИН ВАГИНОЛИЗИН, У ШТАММОВ *GARDNERELLA VAGINALIS* РАЗЛИЧНОГО ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург, Россия

Цель. Оценка структуры нуклеотидной последовательности гена *vly*, кодирующего фактор вирулентности вагинолизин, у штаммов *G. vaginalis* различного географического происхождения.

Материалы и методы. *In silico* анализ консервативных и полиморфных участков гена и построение филогенетического дерева с использованием пакета программ Ugene. Анализ сходства нуклеотидных последовательностей гена и аминокислотных последовательностей его продукта с помощью онлайн-инструментов NCBI.

Результаты. В структуре гена *vly* обнаружены консервативные и полиморфные участки. Проанализированы некоторые однонуклеотидные замены, характерные для разных штаммов бактерии, и более протяженные полиморфные участки, характерные для групп штаммов. На кладограмме штаммы группируются, как правило, независимо от географического источника выделения, однако штамм, выделенный в России, представляет собой отдельную ветвь по данному маркеру. Вариабельность последовательности гена составила 88,9-100%, аминокислотной последовательности вагинолизина – 94,4-100%.

Заключение. Вариабельность структуры гена *vly* может служить основой для исследования патотипов *G. vaginalis*, ассоциированных с клиническим проявления бактериального вагиноза либо с бессимптомным носительством бактерии. Функциональное изучение кодируемого геном фактора вирулентности может быть фундаментом создания новых целевых средств терапии гарднереллезной инфекции.

Ключевые слова: *Gardnerella vaginalis*, бактериальный вагиноз, патотипы, фактор вирулентности, вагинолизин, полиморфизмы.

Yu.A. Panferova

***IN SILICO* ANALYSIS OF *VLY* GENE, CODING CYTOLYSIN VAGINOLYSIN, IN *GARDNERELLA VAGINALIS* STRAINS FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL LOCATIONS**

Saint Petersburg Pasteur Institute, St-Petersburg, Russia

Objective. Analysis of nucleotide sequences of *vly* gene, coding one of virulence factors, vaginolysin, in *Gardnerella vaginalis* strains from different geographical locations.

Materials and methods. *In silico* analysis of the conservative and polymorphic gene regions and phylogenetic analysis of marker using Ugene software. Similarity analysis of *vly* gene nucleotide sequences and aminoacid sequences of their coding vaginolysin using online packages of NCBI.

Results. Both conservative and polymorphic loci were recognized in the sequences of *vly* gene. Some single nucleotide polymorphisms of the certain bacterial strains and more extensive polymorphisms of distinct groups of strains were analyzed. In most cases, strains group at cladogram regardless their geographical origin, but Russian strain forms unique genotype in distinct clade using *vly* as marker. The similarity of nucleotide sequences varies in the range 88,9-

100%, aminoacid cequence of coding protein vaginolysin – in range 94,4-100%.

Conclusions. The variability of the *vly* gene structure should be base of pathotype-specific studies of *G. vaginalis* strains, associated both with bacterial vaginosis or asymptomatic persistence. The functional analysis of vaginolysin as a virulence factor can be used in new types of target therapy development in cases of *Gardnerella* infection.

Key words: *Gardnerella vaginalis*, bacterial vaginosis, pathotypes, virulence factor, vaginolysin, polymorphisms.

Введение

Gardnerella vaginalis является условно-патогенным микроорганизмом, одним из ведущих этиологических агентов бактериального вагиноза, патологического состояния микробиоценоза слизистых генитального тракта, ведущего к проявлению ряда клинических симптомов, в том числе выделениям воспалительного характера, кольпитам и воспалительным заболеваниям выше лежащих органов женской половой системы, патологий мужской половой системы и ряда других воспалительных заболеваний; помимо случаев патологии, данный микроорганизм обнаруживается и у клинически здоровых людей [1, 2]. Это представитель рода *Gardnerella*, по современной таксономии относящегося к семейству *Bifidobacteriaceae*, многие виды которого являются симбионтами человека.

Бактериальный вагиноз (БВ) представляет собой комплексное состояние, в формировании которого играют роль как факторы «хозяина», так и факторы вирулентности колонизирующих бактерий, представляющих собой в большинстве случаев полимикробные ассоциации. Точные механизмы возникновения и персистенции БВ точно не установлены, однако факторы агрессии патогенных и условно-патогенных микроорганизмов по отношению к эукариотическому хозяину могут играть далеко не последнюю роль в данном процессе. Существует несколько биотипов гарднерелл, выделяемых на основании биохимического анализа штаммов, а также выделяют несколько генотипов, согласно используемым генетическим маркерам [2].

Среди факторов вирулентности гарднерелл особенно выделяются высокая адгезивная способность (высокое сродство к компонентам клеточных мембран эпителиоцитов) [3] и токсин, действующий как гемолизин [4]. Данный гемолизин, называемый также вагинолизин, относится к семейству холестерол-зависимых цитолизин [5]. Наподобие интермедиолизина *S. intermedium*, он высоко избирателен к клеткам человека, и эта специфичность связана с распознаванием комплементарной регуляторной молекулы CD59. Белок обеспечи-

вает образование пор в клетке хозяина и явление цитотоксического эффекта в монослое клеток. В целом, белки указанного семейства обнаруживаются и у грамположительных бактерий, колонизирующих слизистые поверхности.

Генетическая гетерогенность гена, кодирующего вагинолизин, в настоящее время недостаточно изучена. Имеются данные, что некоторые штаммы *G. vaginalis* не содержат в геноме данный ген, и что в целом в некоторых выборках последовательность его вариабельна [2]. В то же время изучение вариабельности гена у штаммов, выделенных в различных популяциях и у пациентов с различными проявлениями гарднереллезной инфекции, может способствовать обоснованию его роли как маркера манифестирующей инфекции и тяжести инфекционного процесса. Детальная структура гена может оказаться полезна для создания патотип-специфических тест-систем для молекулярной биологии. Кроме того, исследование структуры данного токсина даст импульс появлению высокоспецифичных вакцин и средств терапии [4, 6].

Целью работы являлся анализ *in silico* нуклеотидных последовательностей гена *vly*, кодирующего вагинолизин, у штаммов *G. vaginalis*, выделенных в различных географических источниках.

Материалы и методы

В исследование включено 25 последовательностей гена различных штаммов *G. vaginalis*, доступных в базе GenBank NCBI. Из них 10 штаммов выделены в США, 8 – в Литве, по 2 штамма – в Бельгии, Болгарии (частичные последовательности) и Кении и 1 – в России.

Последовательности генов анализировались методом множественного выравнивания по алгоритму muscle с помощью пакета программ Ugene 1.31.0 [7], на основании чего проводился анализ полиморфных и консервативных локусов. На основании данного выравнивания строили филогенетическое древо по методу Neighbor joining с параметрами bootstrap=500.

Степень сходства нуклеотидных и аминокислотных последовательностей для гена *vly* и белка вагинолизина, соответственно, определяли по алгоритму megablast и blastp по состоянию на 31.07.2019 г. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты и обсуждение

С помощью множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *vly* установлено, что он является достаточно вариабельным у штаммов *G. vaginalis*. Длина данного гена за исключением регуляторных по-

следовательностей составляет 1551 п.н., и в нем имеются участки высококонсервативные и полиморфные (в том числе высокополиморфные). Так, к консервативным участкам относятся последовательности в рамках 8-38, 358-392, 795-822 и 1347-1384 п.н., для которых процент гомологии у различных штаммов составлял 100%.

Для прочих участков характерны полиморфизмы в виде однонуклеотидных замен, характерных, как правило, для группы и в единичных случаях для единственных штаммов. Такими уникальными SNP могут служить замены 49 А>G для штамма «GV21», 221 Т>А для «GV15», 1549 С>Т для «284V» и ряд прочих. Также обнаружена варибельная замена, представленная 224 G>C у штаммов «UGent0901», «GS9838-1», «JCP7719» и 224 G>Т у «GV15» (по сравнению с референсным «14019», вариации 224G>C/Т). Похожая замена 1292 А>Т/G, наблюдаемая у четырех и двух штаммов, соответственно. Структура полиморфизма представлена на рисунке 1.

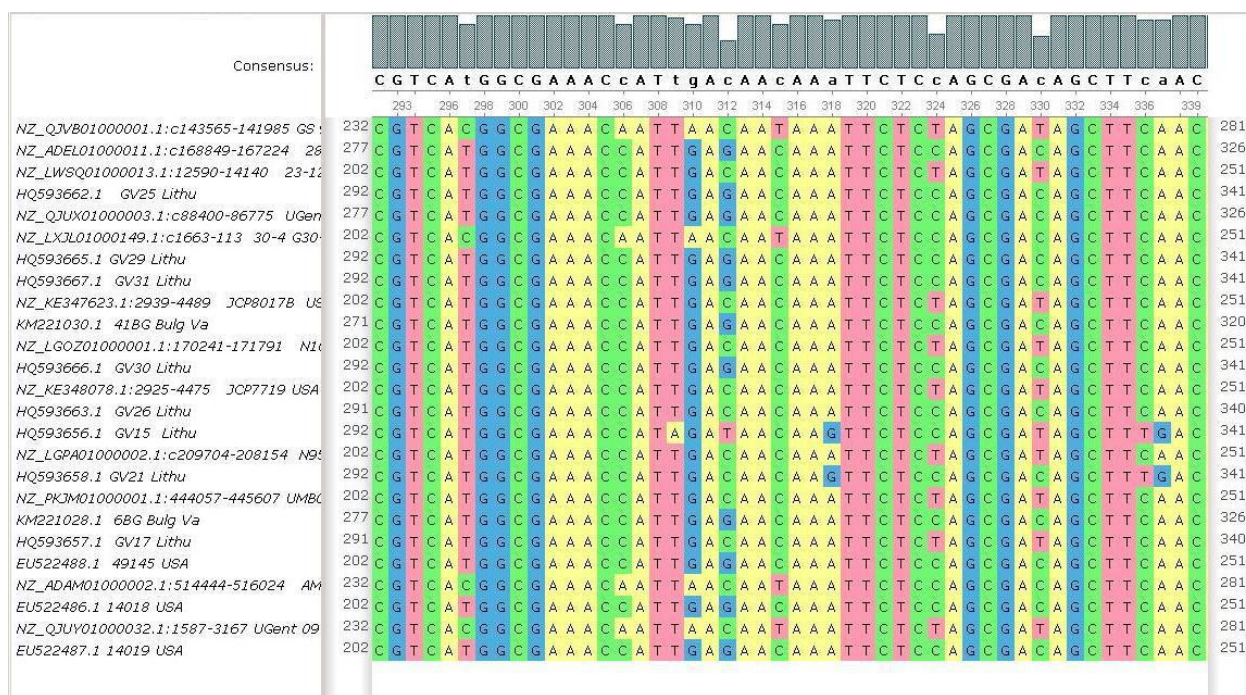


Рис. 1. Структура полиморфных локусов штаммов *G. vaginalis*.

Помимо однонуклеотидных замен, обнаружены и протяженные полиморфные участки, например, в позициях 482-486 п.н у шести штаммов, 680-686 п.н. у семи штаммов и 1167-1174 п.н. у четырех штаммов; во всех случаях не наблюдалось ассоциации с географическим источником штамма, то есть полиморфизмы наблюдались у штаммов, выделенных в различных регионах мира.

Структура филогенетического дерева для гена *vly* отражает высокую степень полиморфности гена (рис. 2).

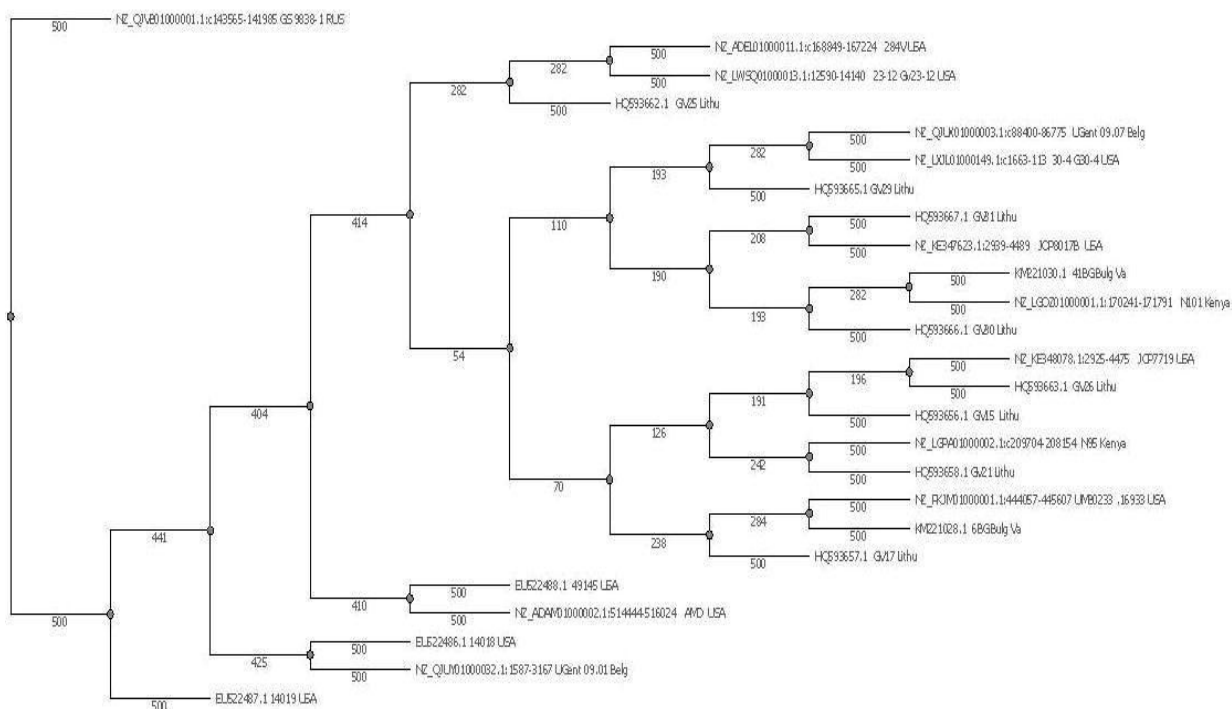


Рис. 2. Кладограмма (неукорененное древо) на основании нуклеотидных последовательностей гена *vly* для штаммов *Gardnerella vaginalis* (обозначения географического источника штаммов: USA – США, Bulg – Болгария, Kenya – Кения, Lith – Литва, Rus – Россия).

При объединении в ветви группируются штаммы, преимущественно независимо от географического источника их выделения. Так, достаточно близкими являются штаммы «JCP7719» (США) и «GV26» (Литва), «41BG» (Болгария) и «N101» (Кения), «14018» (США) и «UGent0901» (Бельгия). Вместе с тем в значительно удаленную ветвь, образующую своеобразную кладу, состоящую лишь из одного штамма, на основании полиморфизмов включается штамм «GS9838-1», выделенный в России. Несколько удаленным в генетическом отношении является референсный штамм «14019», выделенный в США, входящий в состав более крупной клады.

Вероятно, изучение большего количества штаммов, выделенных на территории Европы и России, позволит более детально изучить кластеризацию штаммов, циркулирующих в России и степень их родства с прочими штаммами, так как в данной выборке был лишь один штамм из России.

Анализ полиморфности гена *vly* с помощью алгоритма blast в международной базе данных GenBank позволил установить, что вариабельность гена в пределах вида составляет 88,9-100%. При анализе гена штамма «14019» (США, код EU522487) в качестве референса максимальный процент гомологии (100%) наблюдается со штаммами, выделенными в США и штаммом «GV24», выделенным в Литве. Процент гомологии с прочими штаммами, выделенными в Литве, варьирует в пределах 88,9-99%. Процент гомологии с прочими штаммами, выделенными в Бельгии, США и Кении, для которых геном финализирован, варьирует в пределах 88,9-90,9%.

Таким образом, наблюдается некоторая, но не абсолютная вариабельность последовательности гена у охарактеризованных в геномном плане штаммов *G. vaginalis* из различных географических регионов. Явной приуроченности генотипа по данному маркеру к географическому источнику штамма не отмечено.

При анализе аминокислотной последовательности белка вагинолизина референсного штамма «14019» (код ACD39460) было установлено, что процент гомологии варьирует в пределах 94,4-100%, что свидетельствует о том, что высокий процент полиморфных участков нуклеотидной последовательности оказывает весьма незначительное влияние на структуру белка, так как замены нуклеотидов являются синонимичными. Степень гомологии с белком интермедилизином *S. intermidius*, обладающим сходными свойствами в отношении клеток хозяина, составил 59-59,5%.

Ранее было установлено, что ген *vly* детектируется у большинства штаммов *G. vaginalis*, выделенных как от пациентов с БВ, так и людей без патологических проявлений [8], что позволяет предположить, что не присутствие данного маркера, а именно структура гена и продуцируемого белка может быть в определенной мере связана с формой вызываемой патологии слизистых обочек. Стоит отметить, что в настоящее время в общедоступных базах данных имеется информация лишь о весьма ограниченной выборке изолятов *G. vaginalis*, выделенных в Европе, и практически нет данных о штаммах, циркулирующих на Азиатском континенте. Кроме того, в базах нуклеотидных последовательностей, как правило, не указана тяжесть патологии (выделен штамм от пациентов с БВ либо при бессимптомном носительстве), что ограничивает возможности функционального анализа.

Заключение

Анализ нуклеотидных последовательностей гена *vly*, кодирующего вагинолизин, один из основных факторов вирулентности *G. vaginalis*, выявил высокую степень полиморфности гена. В структуре гена присутствуют консервативные и полиморфные участки. Вариабельным (более 5%) является и аминокислотная последовательность продукта данного гена у штаммов *G. vaginalis*, выделенных в различных географических регионах.

Достаточно интересным является тот факт, что не отмечено четкой дистанционированности штаммов из Европы, Северной Америки и Африки; в большинстве случаев указанные штаммы кластрируются по данному генетическому маркеру вместе. В то же время несколько выделяется из данной выборки единственный присутствующий на данный момент в базе данных штамм *G. vaginalis* из России, формируя отдельную ветвь на кладограмме. Является ли эта тенденция общей для штаммов, циркулирующих в России, судить сложно, поскольку необходимо исследование структуры гена большего количества бактериальных изолятов.

Участие продукта гена *vly* в патологических процессах, вызываемых патогеном *G. vaginalis*, свидетельствует о важности дальнейшего изучения разнообразия данного генетического маркера с учетом географии штамма и клинической картине инфекции (БВ или бессимптомное носительство, а также вызываемые *G. vaginalis* в ряде случаев септические поражения).

Учитывая достаточно широкую распространенность БВ и его осложнений, влияющих на репродуктивный потенциал макроорганизма, функциональный анализ гена *vly* и его белкового продукта, вероятно, может служить фундаментом для разработки новых таргетных методов лечения заболеваний, вызываемых гарднереллами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kairys N., Garg M. Gardnerella. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing, 2019. 5p.
2. Pleckaityte M., Janulaitiene M., Lasickiene R., Zvirbliene A. Genetic and biochemical diversity of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012. 65(1): 69-77. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00940.x.
3. LaRocca T.J., Stivison E.A., Hod E.A. et al. Human-specific bacterial pore-forming toxins induce programmed necrosis in erythrocytes. MBio. 2014. 5(5): e01251-14. doi: 10.1128/mBio.01251-14.
4. Gelber S.E., Aguilar J.L., Lewis K.L., Ratner A.J. Functional and phylogenetic characterization of Vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. J Bacteriol. 2008. 190(11): 3896-903. doi: 10.1128/JB.01965-07.
5. Randis T.M., Zaklama J., LaRocca T.J., Los M. et al. Vaginolysin drives epithelial

- ultrastructural responses to *Gardnerella vaginalis*. Infect Immun. 2013. 81(12): 4544-50. doi: 10.1128/IAI.00627-13.
6. Pleckaityte M., Mistiniene E., Lasickiene R. et al. Generation of recombinant single-chain antibodies neutralizing the cytolytic activity of vaginolysin, the main virulence factor of *Gardnerella vaginalis*. BMC Biotechnol. 2011. 11: 100. doi: 10.1186/1472-6750-11-100.
 7. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics. 2012. 28(8): 1166-7. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
 8. Knupp de Souza D.M., Diniz C.G., Filho D.S. et al. Antimicrobial susceptibility and vaginolysin in *Gardnerella vaginalis* from healthy and bacterial vaginosis diagnosed women. J Infect Dev Ctries. 2016. 10(9): 913-919. doi: 10.3855/jidc.7161.

Поступила 21 августа 2019 г.

(Контактная информация: **Панферова Юлия Александровна** – магистр биологии, научный сотрудник ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора; адрес: 197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, 14; тел/факс 8(812) 2322136; e-mail: ersvart@inbox.ru)

Образец ссылки на статью:

Панферова Ю.А. Анализ *in silico* гена *vly*, кодирующего цитолизин вагинолизин, у штаммов *Gardnerella vaginalis* различного географического происхождения. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2019. № 3. 8с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2019-3/Articles/PYuA-2019-3.pdf>).

DOI: 10.24411/2304-9081-2019-13010