

Biến đổi gen và cấu trúc protein fiber của virus HAdV-3 gây bệnh đau mắt đỏ ở Việt Nam

Lê Tuấn Anh, Nguyễn Thị Uyên, Nguyễn Văn Sáng*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 19/9/2019; ngày chuyển phản biện 23/9/2019; ngày nhận phản biện 22/10/2019; ngày chấp nhận đăng 28/10/2019

Tóm tắt:

Protein fiber là một protein quan trọng cho quá trình xâm nhiễm của virus HAdVs. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu chuyên sâu nào về sự biến đổi gen và cấu trúc protein của gen này ở các chủng HAdVs nói chung và ở chủng HAdV-3 gây bệnh đau mắt đỏ ở Việt Nam nói riêng. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã giải trình tự gen mã hóa protein fiber từ các chủng virus phân lập ở Việt Nam và dự đoán biến đổi cấu trúc protein fiber thông qua phần mềm tin sinh học. Trong số 15 biến đổi nucleotide trên trình tự ADN mã hóa protein fiber có 10 biến đổi dẫn đến sự thay thế axit amin của protein. Kết quả phân tích tin sinh về cấu trúc 3 chiều của protein fiber cho thấy, trong 10 vị trí axit amin bị thay đổi thì có 4 vị trí thay thế (Q150E, S207L, H246D, M272T) có nguy cơ cao, làm thay đổi liên kết của đầu tương tác fiber với thụ thể CD46 của người.

Từ khóa: đau mắt đỏ, HAdV-3, protein fiber, thụ thể CD46.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

HAdV (human adenovirus) là một nhóm các chủng virus thuộc chi Mastadenovirus, hiện được chia làm 7 loài, mỗi loài được đặt tên bằng 1 chữ cái từ A đến G bao gồm tổng cộng gần 90 chủng khác nhau. Các chủng từ 1-51 được phân loại dựa vào các phương pháp phân loại bằng huyết thanh cổ điển, trong khi các chủng từ 52 trở đi được xác định dựa trên các kỹ thuật phân tích trình tự genome và tin sinh học tiên tiến hơn [1, 2]. Các chủng HAdVs không có lớp màng bảo vệ mà chỉ có vỏ capsid chứa ADN mạch thẳng, sợi đôi và dài khoảng 34-36 kb. Chúng gây ra một loạt các bệnh tại những bộ phận khác nhau trên cơ thể, trong đó HAdV-3 (loài B) là một trong những tác nhân gây ra các trận dịch đau mắt đỏ ở Việt Nam [3] cũng như trên thế giới [4-7]. Các loài HAdV-A, C, D, E, F đều sử dụng thụ thể Coxsackie and Adenovirus Receptor (CAR) để nhận biết tế bào vật chủ [8-10], tuy nhiên, HAdV-B nói chung và HAdV-3 nói riêng, xâm nhiễm vào tế bào nhờ sự tương tác giữa protein fiber với thụ thể CD46 của tế bào vật chủ [11-13]. Cấu trúc chung của protein fiber các loài HAdV gồm có 3 phần: đầu tương tác (fiber knob), trục (fiber shaft) và đuôi (fiber tail). Đầu tương tác chính là phần tiếp xúc với tế bào vật chủ để mở đầu cho việc xâm nhiễm, những nghiên cứu chuyên sâu về trình tự và cấu trúc đầu tương tác của protein fiber HAdV-3 là một yêu cầu rất quan trọng để giúp hiểu rõ cơ chế liên kết giữa protein này với thụ thể CD46, từ đó tìm ra những phương pháp hiệu quả trong phòng ngừa và điều trị bệnh

đau mắt đỏ. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là giải trình tự ADN mã hóa protein fiber của HAdV-3 ở Việt Nam, từ đó xác định được những sai khác ở trình tự axit amin của protein này so với protein fiber của chủng HAdV-3 ở các nơi khác trên thế giới; đồng thời đánh giá được ảnh hưởng của những biến đổi này tới khả năng tương tác của protein fiber với thụ thể CD46 của tế bào vật chủ và khả năng xâm nhập, gây bệnh của virus.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Thu mẫu bệnh phẩm chứa virus

Mẫu nước mắt của bệnh nhân đau mắt đỏ tình nguyện tham gia nghiên cứu được thu thập tại Bệnh viện Mắt Trung ương và bảo quản ở điều kiện -20°C cho đến khi được sử dụng để tách chiết ADN.

Tách chiết ADN virus

ADN của virus HAdV-3 được tách chiết bằng bộ kit Viral Gene-Spin Virus RNA/DNA Isolation của Công ty iNtRon, Hàn Quốc. Quy trình tách chiết được thực hiện theo hướng dẫn của Hãng iNtRON. ADN tách chiết được bảo quản ở điều kiện -20°C cho phản ứng PCR.

Xác định sự có mặt của HAdV-3

Vùng siêu biến số 7 (HVR7) của gen *hexon* được giải trình tự để xác định sự có mặt của HAdV-3, phương pháp đã được thực hiện trong một nghiên cứu trước đây [3].

*Tác giả liên hệ: Email: nvsangvnu@yahoo.com

Changes in DNA sequence and fiber protein structure of HAdV-3 causing conjunctivitis in Vietnam

Tuan Anh Le, Thi Uyen Nguyen, Van Sang Nguyen*

Faculty of Biology, University of Science,
Vietnam National University, Hanoi

Received 19 September 2019; accepted 28 October 2019

Abstract:

Protein fiber is important for the infection of HAdVs. However, in Vietnam, there are no thorough researches on mutations on genes or protein structures of either HAdVs or HAdV-3 causing conjunctivitis. In this research, the authors sequenced the coding sequence of fiber protein of HAdV-3 isolated in Vietnam and used bioinformatics software to analyse amino acid changes. The results exhibited fifteen substitutions in DNA sequence, ten of which led to amino acid substitutions. Four of ten substitutions in protein fiber sequence (Q150E, S207L, H246D, M272T) potentially affected the interaction between this protein and CD46 receptor of human cells.

Keywords: CD46 receptor, conjunctivitis, fiber protein, HAdV-3.

Classification number: 1.6

Thiết kế môi phản ứng PCR

Để thiết kế cặp mồi đặc hiệu nhân trình tự fiber HAdV-3, chúng tôi đã dùng phần mềm ClustalW để so sánh các trình tự hệ gen HAdV-3 đã được công bố và tìm ra hai vùng trình tự bảo thủ nằm gần kề 2 vùng biên trái và phải của trình tự mã hóa protein fiber. Cặp mồi thứ nhất (FF1-FR1) được thiết kế trên hai vùng bảo thủ này. Trình tự ADN giải được từ hai mồi FF1 và FR1 được sử dụng để thiết kế cặp mồi FF2-FR2 nhân đoạn ADN phía trong trình tự fiber để đảm bảo độ đặc hiệu cho HAdV-3 ở Việt Nam. Các mồi được tổng hợp tại Công ty PHUSA Biochem, Cần Thơ, Việt Nam.

Phản ứng PCR

Chúng tôi sử dụng enzyme Phusion Hot Start II DNA Polymerase - Thermo Scientific để thực hiện phản ứng khuếch đại ADN. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được thực hiện với các thông tin như trong bảng 1 và 2.

Bảng 1. Thành phần phản ứng PCR.

Hóa chất	Nồng độ cuối cùng	Thể tích (μl)
Nước de-ion		Đủ 50
Buffer GC	1X	10
Mỗi mồi loại	0,3 μM	1,5
dNTPs	200 μM mỗi loại	1
DMSO	3%	1,5
Khuôn		1
Polymerase	0,02 U/μl	0,5

Bảng 2. Chu trình nhiệt phản ứng PCR.

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giây)	Chu kỳ (lần lặp)
Khởi đầu	98	30	1
Biến tính	98	20	40
Gắn mồi	*	10	
Kéo dài	72	**	
Kết thúc	72	300	1
Bảo quản	20	∞	

Chú thích: *: nhiệt độ gắn mồi cho từng cặp mồi được xác định bằng công cụ online của nhà sản xuất; **: thời gian kéo dài được xác định với tốc độ tổng hợp của enzyme là 30 giây/kb.

Điện di kết quả PCR

Sau khi PCR, 3 μl mỗi phản ứng được điện di trên gel agarose 1% rồi nhuộm bằng ethidium bromide. Các băng sản phẩm được quan sát và chụp ảnh bằng hệ thống Alphaimager MINI.

Giải trình tự ADN của protein fiber

Sản phẩm PCR đạt tiêu chuẩn về độ sáng và đặc hiệu được gửi đi giải trình tự tại Công ty 1stBASE Malaysia bằng hệ thống BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit.

Phân tích trình tự ADN và protein fiber

Trình tự ADN được xử lý bằng phần mềm Bioedit [14] để loại bỏ những đoạn trình tự không thuộc phần mã hóa protein fiber. Tiếp theo, trình tự ADN được so sánh với trình tự tham chiếu HAdV-3 trên cơ sở dữ liệu NCBI (mã trình tự NC_011203.1), từ đó tìm ra những sai khác ở mức độ ADN dẫn đến biến đổi axit amin. Trình tự ADN được dịch mã thành trình tự axit amin sử dụng công cụ Snapgene.

Phân tích cấu trúc ba chiều của protein fiber

Cấu trúc ba chiều của protein fiber được mô phỏng sử dụng phần mềm SWISS-MODEL [15] kết hợp với cơ sở dữ liệu protein PDB và trình tự axit amin fiber của HAdV-3 ở Việt Nam. Cấu trúc ba chiều sẽ được sử dụng để phân tích những vị trí biến đổi có khả năng làm thay đổi tương tác giữa fiber và thụ thể CD46 của tế bào vật chủ bằng phần mềm PyMOL.

Kết quả và thảo luận

Kết quả thiết kế môi

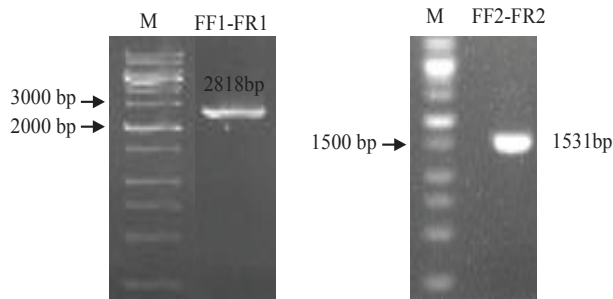
Kích thước của đoạn ADN mã hóa cho protein fiber là 960 bp, tuy nhiên khoảng cách 2 vùng biên bảo thủ bên trái và bên phải đoạn gen này được chúng tôi xác định là khoảng 2818 bp. Dựa vào 2 vùng bảo thủ này, chúng tôi đã thiết kế được cặp môi FF1-FR1 nhân đặc hiệu vùng ADN có kích thước 2818 bp này. Tuy nhiên, để giải trình tự toàn bộ vùng gen, chúng tôi thiết kế thêm cặp môi FF2-FR2 nằm ở giữa đoạn 2818 bp với kích thước là 1531 bp. Trình tự các cặp môi được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Trình tự 2 cặp môi nhân đoạn ADN mã hóa fiber của HAdV-3.

	Trình tự (5'-3')
Môi FF1	GGGTGGAATCTCCCAATG
Môi FR1	TGAAACCGAGCTTCTATGA
Môi FF2	CTTCGAGACCTCCTACCCAT
Môi FR2	TTCGGATTATGATTCCCATCG

Kết quả PCR và điện di

Hình ảnh điện di cho thấy, băng sản phẩm PCR sáng rõ và đặc hiệu, không có sản phẩm phụ và đủ điều kiện để thực hiện giải trình tự (hình 1).

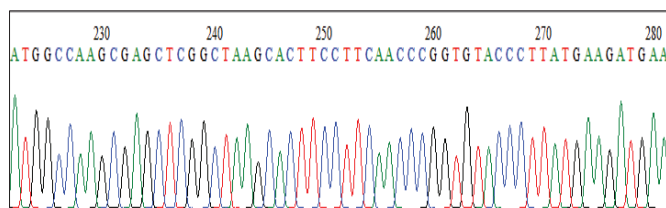


Hình 1. Kết quả PCR hai cặp môi.

Chú thích: M: Marker 1 kb, FF1-FR1 và FF2-FR2 là ký hiệu của hai cặp môi.

Kết quả giải trình tự gen

Toàn bộ đoạn ADN mã hóa cho protein fiber của HAdV-3 đã được giải trình tự thành công với hình ảnh tín hiệu đạt chất lượng tốt (hình 2).



Hình 2. Tín hiệu 60 nucleotide đầu tiên đoạn ADN mã hóa protein fiber.

Số sánh và phân tích kết quả trình tự ADN

Khi so sánh trình tự thu được với trình tự NC_011203.1, kết quả có 15 nucleotide bị biến đổi, trong đó có 10 biến đổi có nghĩa dẫn đến sự thay thế axit amin. Không phát hiện được đột biến thêm/mất nucleotide gây dịch khung (bảng 4).

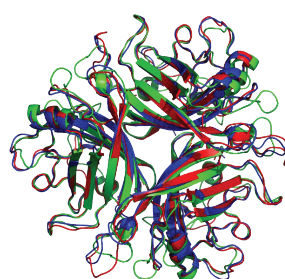
Bảng 4. Sự biến đổi ADN dẫn đến sự biến đổi axit amin.

STT	Vị trí	Nucleotide		Axit amin biến đổi
		NC_011203.1	Việt Nam	
1	31432	G	A	S22N
2	31435	C	T	S23L
3	31706	A	G	-
4	31751	G	C	-
5	31815	C	G	Q150E
6	31904	C	T	-
7	31947	C	T	-
8	31987	C	T	S207L
9	32010	G	C	E215Q
10	32031	G	A	A222T
11	32034	G	C	D223H
12	32103	C	G	H246D
13	32153	T	C	M272T
14	32182	T	C	-
15	32314	G	C	R316T

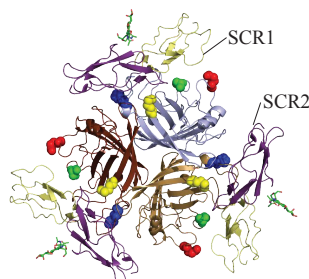
Chú thích: Ký hiệu "-" thể hiện axit amin không bị biến đổi.

Phân tích cấu trúc protein

Sử dụng phần mềm SWISS-MODEL, chúng tôi đã mô phỏng cấu trúc ba chiều của đầu tương tác fiber HAdV-3 ở Việt Nam với thụ thể của tế bào vật chủ, dựa trên mã truy cập trong cơ sở dữ liệu PDB là 1H7Z [16]. Sự tương đồng của trình tự cấu trúc protein 1H7Z với trình tự đầu tương tác của protein fiber HAdV-3 ở Việt Nam (191 axit amin) là 95,36%. Cấu trúc 3D của 1H7Z được thể hiện bằng phần mềm PyMOL cho thấy đầu tương tác của fiber HAdV-3 tồn tại ở dạng trimer gồm 3 tiểu phần giống nhau; cấu trúc này gần như trùng khớp với đầu tương tác của protein fiber HAdV-11 (2039) [17] và HAdV-21 (3L89) [18] cho dù trình tự axit amin của chúng rất khác nhau (hình 3). Do đó, cấu trúc mô phỏng ba chiều của đầu tương tác fiber HAdV-3 ở Việt Nam dựa trên 1H7Z được dùng để đại diện cho liên kết của protein fiber với thụ thể CD46 của người. Trong số 10 axit amin bị biến đổi có 4 axit amin nằm ở đầu tương tác của fiber, có khả năng tương tác với SCR1 và SCR2 của CD46 là Q150E, S207L, H246D và M272T (hình 4); bốn biến đổi E215Q, A222T, D223H, R316T cũng nằm ở đầu tương tác của fiber nhưng ở vị trí không tương tác trực tiếp với thụ thể CD46 và hai biến đổi S22N, S23L nằm ở trục của protein fiber. Những tính chất cơ bản của các biến đổi Q150E, S207L, H246D và M272T có thể ảnh hưởng tới sự tương tác giữa đầu tương tác fiber của HAdV-3 và hai vùng SCR1, SCR2 của thụ thể CD46 được thể hiện ở bảng 5.



Hình 3. So sánh theo phương pháp xếp chồng cấu trúc ba chiều của đầu tương tác fiber HAdV-3 (1H7Z-màu đỏ), fiber HAdV-11 (2O39-màu xanh lục) và fiber HAdV-21 (3L89-màu xanh biển).



Hình 4. Cấu trúc đầu tương tác của fiber HAdV-3 ở Việt Nam và một số axit amin bị biến đổi. Bốn axit amin bị biến đổi ở đầu tương tác được thể hiện ở dạng tinh thể (đỏ: Q150E, xanh lá: S207L, xanh lục: H246D, vàng: M272T). Những biến đổi còn lại không được thể hiện.

Bảng 5. Chỉ số H và giá trị pK các axit amin bị biến đổi.

Vị trí biến đổi	Axit amin ban đầu	Chỉ số H*	Giá trị pK**	Axit amin thay đổi	Chỉ số H	Giá trị pK
Q150E	Q (Glutamine)	-3,5	7,0	E (Glutamic acid)	-3,5	4,2
S207L	S (Serine)	-0,8	7,0	L (Leucine)	3,8	7,0
H246D	H (Histidine)	-3,2	6,0	D (Aspartic acid)	-3,5	3,9
M272T	M (Methionine)	1,9	7,0	T (Threonine)	-0,7	7,0

Chú thích: * Chỉ số H xác định bởi J. Kyte [19], thể hiện mức độ ưa-nước của axit amin; ** Giá trị pK xác định bởi C. Pommie [20], thể hiện mức độ phân cực (axit-bazo) của axit amin.

Đột biến Q150E sẽ làm thay đổi sự tích điện tại vị trí 150 vì Q và E đều là axit amin ưa nước như nhau nhưng E có tính axit và tích điện âm, còn Q là trung tính. Đột biến S207L sẽ làm tăng tính kỵ nước vì L kỵ nước hơn rất nhiều so với S. Đột biến H246D sẽ làm thay đổi sự tích điện và cấu trúc không gian do cấu hình của D khác biệt rất lớn so với H và D có tính axit mạnh hơn. Đột biến M272T sẽ làm cho vị trí này thay đổi tính kỵ nước do M kỵ nước, còn T ưa nước.

Dựa vào những khác biệt về tính chất axit amin, bốn biến đổi Q150E, S207L, H246D và M272T có khả năng cao đã làm thay đổi sự liên kết giữa đầu tương tác fiber của HAdV-3 ở Việt Nam với thụ thể CD46. Sáu biến đổi còn lại tuy không nằm ở vị trí tương tác nhưng cũng có nguy cơ làm thay đổi cấu trúc liên kết giữa ba tiểu phần của protein fiber. Kết quả này chỉ ra rằng, khả năng tương tác của HAdV-3 ở Việt Nam với tế bào vật chủ sẽ có những thay đổi so với các chủng HAdV-3 trên thế giới. Sự thay đổi về khả năng tương tác này sẽ dẫn tới sự biến đổi về khả năng lây nhiễm và lây lan của chủng HAdV-3 trong các bệnh nhân bị nhiễm virus.

Kết luận

Chúng tôi đã phát hiện được 15 đột biến nucleotide trên trình tự mã hóa protein fiber HAdV-3 ở Việt Nam, trong đó có 10 đột biến dẫn đến biến đổi 10 axit amin của protein này. Dựa trên những tính chất bị thay đổi của các axit amin cho thấy, 4 axit amin bị thay

thể có nguy cơ cao làm thay đổi liên kết của đầu tương tác của protein fiber với thụ thể CD46 của tế bào vật chủ. Sáu axit amin thay thế khác cũng có khả năng làm thay đổi cấu trúc trục và đầu fiber nhưng ở mức độ thấp hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua đề tài mã số QG.17.19. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Seto, J. Chodosh, et al. (2011), "Using the whole-genome sequence to characterize and name human adenoviruses", *J. Virol.*, **85**(11), pp.5701-5702.
- [2] Human-Adenovirus-Working-Group (2018), <http://hadwvng.gmu.edu> [cited 2018 Dec. 4th].
- [3] N.V. Ha, N.T.T. Huyen, et al. (2016), "Method development for detection and classification of conjunctivitis-causing adenoviruses in human", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **32**(1S), pp.213-219
- [4] K. Aoki, Y. Tagawa (2002), "A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan", *Int. Ophthalmol. Clin.*, **42**(1), pp.49-54.
- [5] Centers for Disease Control, Prevention (2013), "Adenovirus-associated epidemic keratoconjunctivitis outbreaks-four states, 2008-2010", *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **62**(32), pp.637-641.
- [6] S. Darougar, P. Walpita, et al. (1983), "Adenovirus serotypes isolated from ocular infections in London", *Br. J. Ophthalmol.*, **67**(2), pp.111-114.
- [7] L. James, M.O. Vernon, et al. (2007), "Outbreak of human adenovirus type 3 infection in a pediatric long-term care facility-Illinois, 2005", *Clin. Infect. Dis.*, **45**(4), pp.416-420.
- [8] J.M. Bergelson, J.A. Cunningham, et al. (1997), "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5", *Science*, **275**(5304), pp.1320-1323.
- [9] P.W. Roelvink, A. Lizanova, et al. (1998), "The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F", *J. Virol.*, **72**(10), pp.7909-7915.
- [10] R.P. Tomko, R. Xu, et al. (1997), "HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(7), pp.3352-3356.
- [11] A. Gaggar, D.M. Shayakhmetov, et al. (2003), "CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses", *Nat. Med.*, **9**(11), pp.1408-1412.
- [12] A. Segerman, J.P. Atkinson, et al. (2003), "Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor", *J. Virol.*, **77**(17), pp.9183-9191.
- [13] D. Sirena, B. Lilienfeld, et al. (2004), "The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3", *J. Virol.*, **78**(9), pp.4454-4462.
- [14] T.A. Hall (1999), "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT", *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, pp.95-98.
- [15] A. Waterhouse, M. Bertoni, et al. (2018), "SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes", *Nucleic Acids Res.*, **46**(W1), pp.W296-W303.
- [16] C. Dumort, C. Stehlin, et al. (2001), "Structure of the fiber head of Ad3, a non-CAR-binding serotype of adenovirus", *Virology*, **285**(2), pp.302-312.
- [17] B.D. Persson, D.M. Reiter, et al. (2007), "Adenovirus type 11 binding alters the conformation of its receptor CD46", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**(2), pp.164-166.
- [18] K. Cupelli, S. Muller, et al. (2010), "Structure of adenovirus type 21 knob in complex with CD46 reveals key differences in receptor contacts among species B adenoviruses", *J. Virol.*, **84**(7), pp.3189-3200.
- [19] J. Kyte, R.F. Doolittle (1982), "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein", *J. Mol. Biol.*, **157**(1), pp.105-132.
- [20] C. Pommie, S. Levadoux, et al. (2004), "IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties", *J. Mol. Recognit.*, **17**(1), pp.17-32.