

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.218.083.32:616-022.854:633.878.43(476)
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-4-325-334>

Поступило в редакцию 16.04.2024
Received 16.04.2024

О. Ю. Пархомчук, Е. Г. Фомина, Е. Е. Григорьева

*Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии
и микробиологии государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЛАВНОГО АЛЛЕРГЕНА ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ BET V 1 И ХАРАКТЕРИСТИКА В- И Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ

(Представлено академиком Л. П. Титовым)

Аннотация. Исследована пыльца березы повислой, собранная в период апрель–май 2020, 2021 гг. на территории шести областей Республики Беларусь, с целью определения разнообразия эндемичных генетических вариантов главного аллергена пыльцы березы Bet v 1. Получены рекомбинантные векторные конструкции, содержащие гены, кодирующие различные изоформы изучаемого аллергена. Определена нуклеотидная последовательность клонированных фрагментов. Проведен анализ результатов исследования спектра изоформ белка Bet v 1. Полученные последовательности в той или иной степени соответствуют 11 генетическим вариантам изучаемого аллергена. В пределах одного дерева определено 7 изоформ Bet v 1. Преобладающей изоформой аллергена пыльцы березы Bet v 1 на территории Республики Беларусь является Bet v 1.0101 (Bet v 1a, X15877.1). Установленные варианты проанализированы на предмет их потенциальной аллергенности путем скрининга аминокислот, которые по данным литературы идентифицированы как влияющие на связывание IgE. Анализ аминокислотных остатков, входящих в состав IgE-связывающих конформационных эпитопов, выявил аминокислотные замены, проявляющие разнонаправленную (высокую или низкую) IgE-связывающую активность в положениях 31, 58, 113, 114, 126. Исследована структура доминантных эпитопов, распознаваемых рецептором Т-клеток. Обнаружено, что С-концевой иммунодоминантный Т-клеточный эпитоп Bet v 1_{143–157} является высококонсервативным среди различных изоформ аллергена, в отличие от эпитопа Bet v 1_{78–93}, расположенного в центральной области. Выявленные замены аминокислот изучаемых участков могут влиять на активацию Т-клеток, кросс-реактивность и существенно повышать вариативность ожидаемой IgE-опосредованной реакции.

Ключевые слова: Bet v 1, главный аллерген, пыльца березы, *Betula pendula*, PR-10, изоформы

Для цитирования. Пархомчук, О. Ю. Генетическая вариабельность главного аллергена пыльцы берёзы Bet v 1 и характеристика В- и Т-клеточных эпитопов / О. Ю. Пархомчук, Е. Г. Фомина, Е. Е. Григорьева // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 4. – С. 325–334. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-4-325-334>

Olga Yu. Parkhomchuk, Elena G. Fomina, Elena E. Grigorieva

*Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology of the State Institution
«Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health», Minsk, Republic of Belarus*

GENETIC VARIABILITY OF THE MAJOR BIRCH POLLEN ALLERGEN BET V 1 AND CHARACTERIZATION OF B- AND T-CELL EPITOPES

(Communicated by Academician Leonid P. Titov)

Abstract. The hanging birch pollen collected in the period April – May 2020, 2021 in the territory of six regions of the Republic of Belarus was studied. Recombinant plasmid DNA was obtained. A nucleotide sequence of cloned fragments was determined. The results on the spectrum of isoforms of the Bet v 1 protein were analyzed. The obtained sequences corresponded to one degree or another to 11 genetic variants of the studied allergen. There were 7 isoforms of Bet v 1 defined within one tree. The predominant isoform of the birch pollen allergen Bet v 1 in the territory of the Republic of Belarus was Bet v 1.0101 (Bet v 1a, X15877.1). The identified variants were analyzed for their potential allergenicity by screening amino acids that according to the literature data were identified as affecting IgE-binding. The analysis of amino acid residues included in the IgE-binding conformational epitopes revealed amino acid substitutions exhibiting the multidirectional (high or low) IgE-binding activity in positions 31, 58, 113, 114, 126. The structure of dominant epitopes recognized by the T-cell receptor was studied. It was found that the C-terminal immunodominant T-cell epitope Bet v 1_{143–157} is highly conserved among various isoforms of the allergen in contrast to the epitope Bet v 1_{78–93} located in the central region. The revealed amino acid substitutions of the studied sites can affect the activation of T-cells, cross-reactivity and significantly increase the variability of the expected IgE-mediated reaction.

Keywords: Bet v 1, main allergen, birch pollen, *Betula pendula*, PR-10, isoforms

For citation. Parkhomchuk O. Yu., Fomina E. G., Grigorieva E. E. Genetic variability of the major birch pollen allergen Bet v 1 and characterization of B- and T-cell epitopes. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 4, pp. 325–334 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-4-325-334>

Введение. Естественный ареал березы повислой (*Betula pendula* Roth.) занимает зону умеренного климата и охватывает почти всю Европу и Северную Америку. Пыление берез, наблюдаемое в апреле–мае, зачастую является основной причиной весеннего поллиноза и значительно снижает качество жизни огромного количества людей. Главный аллерген пыльцы березы Bet v 1 провоцирует IgE-опосредованный иммунный ответ у более чем 90 % людей с данным видом аллергии. Bet v 1 принадлежит к классу белков PR-10 (pathogenesis-related proteins), включающих в себя большую группу аэроаллергенов и распространенных пищевых аллергенов [1]. Для представителей этого семейства характерен небольшой размер (154–163 аминокислоты), молекулярная масса 17 кДа и сходная вторичная структура. Известно, что белки PR-10 кодируются небольшим числом генов, которые экспрессируются изначально в корнях и в ответ на различные стрессы и повреждения тканей индуцируются во всех частях растения. Гены, экспрессируемые в пыльце березы повислой, кодируют смесь изоформ Bet v 1 с различной IgE-реактивностью. Изоформы Bet v 1 обладают высоковариабельными иммуногенными и аллергенными свойствами. Варианты с высокой и низкой IgE-реактивностью кодируются разными генами, и одно пыльцевое зерно березы имеет генетический потенциал для образования смеси изоформ [2–5].

Варианты аллергена Bet v 1 отличаются между собой чаще всего только несколькими аминокислотами, тем не менее, эти отличия могут значительно сказаться на способности связываться с IgE. Идентифицированы аминокислоты, влияющие на IgE-связывающую активность Bet v 1 [2; 4; 6]. По литературным данным по способности индуцировать иммунный ответ выделяют 9 вариантов аллергена Bet v 1 (a, b, c, d, e, f, g, j, l), сгруппированных в три класса, каждый из которых объединяет молекулы, проявляющие высокую (a, e и j), промежуточную (b, c и f) и низкую/отсутствие (d, g и l) IgE-связывающую активность [6]. Были выявлены существенные различия в составе и количестве изоформ при исследовании протеомного профиля экстрактов пыльцы березы различного происхождения или вида. Как выяснилось, Bet v 1a – первая изоформа, описанная на уровне ДНК – является наиболее распространенной изоформой (содержание в экстрактах пыльцы от 50 до 70 %). Содержание изоформы Bet v 1d составляет 20 %, Bet v 1b – от 3 до 20 %, Bet v 1f – от 2 до 8 % и Bet v 1j – ~1 % [1; 7; 8].

Установлено, что в пыльце одного дерева экспрессируется от 4 до 6 изоформ аллергена Bet v 1. Варианты Bet v 1, обнаруживаемые в пыльце, кодируются семью генами первых двух подсемейств группы PR-10 березы повислой. Известно, что изоформа Bet v 1a, проявляющая высокую IgE-связывающую активность, кодируется геном Bet v 1.01A. Изоформы Bet v 1c и f, относящиеся ко второму классу по способности индуцировать иммунный ответ, кодируются генами Bet v 1.01C и Bet v 1.02C, а изоформа Bet v 1d, характеризующаяся низкой IgE-связывающей активностью – геном Bet v 1.01B. Причины, обуславливающие развитие вариантов аллергена Bet v 1 с различной IgE-реактивностью, на данный момент не установлены [1; 9].

В настоящее время вариабельные нуклеотидные последовательности Bet v 1 объединены подкомитетом по номенклатуре аллергенов Всемирной организацией здравоохранения и Международным союзом иммунологических обществ в отдельную базу данных. Официальная номенклатура аллергенных белков основана на биномиальной номенклатуре Линнея, определяющей роды и виды всех организмов. Что касается белка Bet v 1, то основным критерием включения новой нуклеотидной последовательности в базу служит подтвержденная экспрессия гена в пыльце березы повислой, как минимум, на уровне мРНК. В соответствии с принципами, лежащими в основе формирования номенклатуры, аллергены с подобными биохимическими функциями, молекулярной массой и идентичностью последовательности более 67 % относят к изоаллергенам. В базе данных в настоящий момент зарегистрировано три изоаллергена Bet v 1: Bet v 1.01, Bet v 1.02, Bet v 1.03. Сходные последовательности группируются как варианты (изоформы) изоаллергена, если они демонстрируют идентичность более 90 %. Выделяют 27 изоформ аллергена

Bet v 1, к которым относятся 32 последовательности из GenBank, размещенного в NCBI (National Center for Biotechnology Information). В современной номенклатуре, например, изоформе Bet v 1a соответствует аллерген Bet v 1.0101, а варианту Bet v 1d – Bet v 1.0102 и т. д. Варианты с разными нуклеотидными последовательностями, но идентичными аминокислотными, индивидуальных обозначений не имеют [10; 11].

По данным литературы известно, что существуют значительные генетические различия между отдельными деревьями березы повислой даже в пределах одной среды обитания. Относительное обилие определенных вариантов Bet v 1 будет влиять на аллергенность пыльцы [9].

Целью работы являлось изучение спектра изоформ аллергена Bet v 1 в пыльце берез, произрастающих на территории Республики Беларусь, и характеристика В- и Т-клеточных эпитопов.

Объекты и методы исследования. Для исследования была использована пыльца берез (*Betula pendula*), кластеризованных по 9 группам в зависимости от места произрастания (населенный пункт), собранная в период апрель–май 2020, 2021 гг. на территории шести областей Республики Беларусь.

Выделение суммарной РНК из образцов пыльцы осуществлялось методом, основанным на применении LiCl [12].

Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью реакции обратной транскрипции с применением набора реагентов «RevertAid First cDNA Synthesis Kit» производства Thermo Scientific (США), согласно прилагаемой инструкции.

Получение продуктов амплификации кодирующей части гена, кодирующего белок Bet v 1, выполнялось методом ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных последовательностей, синтезированных ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь:

BetvldH 5' – CGCGAAGCTTATGGGTGTTTCAATTACGA – 3' (прямой),

BetvlrX 5' – GCGCCTCGAGGTTGTAGGCATCGGAGTG – 3' (обратный).

Состав реакционной смеси: по 15 пмоль праймеров (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь), 2,5 мкл 10х буфера, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ, 1 мкл кДНК, 1,25 ед. АртStart-полимеразы (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь), деионизованная вода до конечного объема 25 мкл. Режим амплификации: 95 °С – 2 мин; 95 °С – 45 с, 55 °С – 45 с, 72 °С – 45 с, количество циклов – 35; 72 °С – 10 мин.

Анализ фрагментов ДНК, полученных в результате проведения ПЦР, осуществляли методом электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле. Электрофорез вели в трис-боратном буфере, рН 8,0, в течение 45 мин. ДНК визуализировали с помощью окрашивания геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ.

Для клонирования очищенного ПЦР-фрагмента в полилинкер вектора pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, США) по «тупым» концам был применен набор CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Лигирование проводили в объеме 20 мкл. В качестве лигирующего фермента использовали T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Трансформацию бактериальных клеток *Escherichia coli XLBlue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI qZAM15 Tn10 (Tet^r)])* лигазной смесью осуществляли методом теплового шока. Селекция трансформированных бактериальных клеток выполнялась на среде LB (Titan Biotech, Индия), содержащей 50 мкг/мл ампициллина.

Выделение плазмидной ДНК проводилось колоночным методом с использованием набора реагентов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Специфичность клонированного фрагмента подтверждалась секвенированием по методу Сэнгера [13]. Постановка секвенирующей реакции осуществлялась с использованием набора Brilliant Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Разделение фрагментов ДНК, полученных в результате секвенирующей реакции, проводилось методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3500xL Applied Biosystems. Последующая обработка полученных данных выполнялась при помощи программы Bioedit Sequence Alignment Editor ver. 7.2.5. Идентификация гомологичных

генов Bet v 1 была реализована с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) с использованием известных последовательностей на уровне нуклеотидов и белков [13].

Результаты и их обсуждение. В результате исследования получено 49 рекомбинантных плазмидных ДНК с клонированными генами, кодирующими единичные копии изоформ белка Bet v 1. Определено 49 нуклеотидных последовательностей, соответствующих 36 различным пептидам, которые в той или иной степени соотносятся с 11 вариантами аллергена Bet v 1. В пыльце одного дерева установленные последовательности кодировали белки, с разной степенью сходства (от 93 до 100 %) соответствующие 7 изоформам главного аллергена пыльцы березы. Не все идентифицированные генетические варианты соотносились с изоаллергенами, размещенными в базе данных аллергенных белков. Часть из них проявила максимальное сходство с депонентами GenBank, которые не включены в перечень аллергенов (рис. 1).

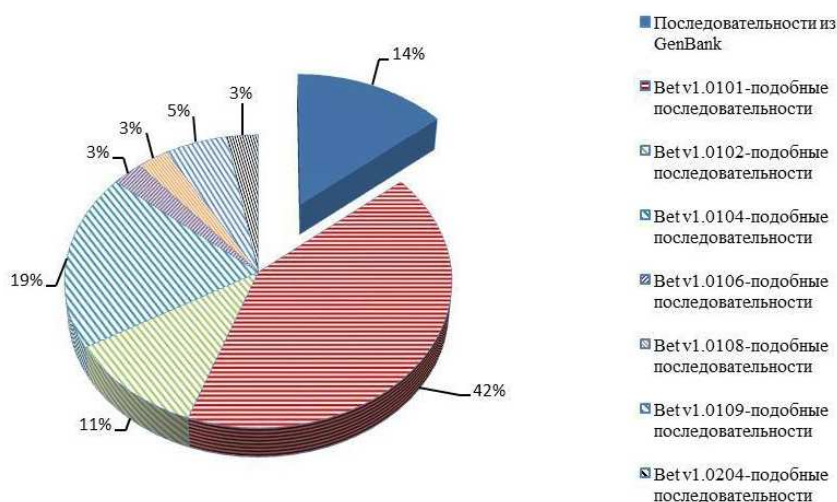


Рис. 1. Структура спектра изоформ Bet v 1. Заштрихованные участки соответствуют последовательностям, сходным с изоформами из базы данных аллергенных белков, незаштрихованный участок – последовательностям из GenBank

Fig. 1. The structure of the spectrum of Bet v 1 isoform. The shaded areas correspond to sequences similar to isoforms from the database of allergenic proteins, the unshaded area corresponds to sequences from GenBank

На диаграмме видно, что 14 % установленных последовательностей максимально сходны с задепонированными только в GenBank. Большая часть (86 %) выявленных вариантов соответствует 7 изоформам 2 изоаллергенов, размещенных в базе данных аллергенных белков, среди которых преобладают Bet v 1.0101-подобные последовательности (42 %); за ними следует группа, объединенная вариантом Bet v 1.0104 – 19 %, третье место (11 %) занимают Bet v 1.0102-подобные последовательности. Изоаллерген Bet v 1.02 представлен только одним вариантом – максимально сходным с изоформой Bet v 1.0204 – и составил минимальных 3 % от общего количества секвенированных последовательностей.

Детальный анализ генетического разнообразия изоформ белка Bet v 1 приведен в таблице.

Выявлено, что 7 полученных клонов (14,3 %) (Bet v 1bel.1) содержали плазмиды с фрагментом гена, кодирующим белок, идентичный по аминокислотному составу наиболее распространенной, по данным литературы, изоформе Bet v 1.0101 (Bet v 1a, X15877.1) [1]. Еще 12 последовательностей (24,5 %) (Bet v 1bel.2 – Bet v 1bel.11, Bet v 1bel.15) отличались от Bet v 1.0101 максимально на 13 нуклеотидов, приводящих к замене аминокислот в 4 позициях. В 4 случаях (8,2 %) (Bet v 1bel.16) выявленные аминокислотные последовательности полностью соответствовали варианту Bet v 1.0102 (Bet v 1 d/h, X77266.1, X77270.1). Три последовательности (6,1 %) (Bet v 1bel.17 – Bet v 1bel.19) отличались от изоформы Bet v 1.0102 предельно на три нуклеотида, что соответствовало 1–2 аминокислотным заменам. Три клон (6,1 %) (Bet v 1bel.20) содержали плазмиды со вставкой гена, кодирующего белок Bet v 1.0104 (Bet v 1 f/i, X77268.1, X77274.1). Четыре последовательности (8,2 %) (Bet v 1bel.21 – Bet v 1bel.24) отличались от варианта Bet v 1.0104 максимально на 10 мутаций на уровне нуклеиновых кислот и на 3 замены на уровне аминокислот. Один из полученных клонов

Сравнение полученных эндемичных изоформ с депонентами GenBank и базы данных аллергенных белков

Comparison of derived endemic isoforms with depositions of the GenBank and the allergenic protein database

| Наименование эндемичной изоформы Name of endemic isoform | Количество рекомбинантных плазмид, содержащих соответствующий фрагмент гена (n / %) Number of recombinants plasmids containing the corresponding gene fragment (n / %) | Наименование изоформы (варианта) Name of isoform (variant) | Максимальное количество нуклеотидных замен (n) Maximum number of nucleotide substitutions (n) | Максимальное количество аминокислотных замен (n) Maximum number of amino acid substitutions (n) |
|---|---|---|--|--|
| <i>Из базы данных аллергенных белков</i> <i>From the database of allergenic proteins</i> | | | | |
| Bet v lbel.1 | 7 / 14,3 | Bet v 1.0101 | 3 | 0 |
| Bet v lbel.2 | 1 / 2,0 | | 2 | 1 |
| Bet v lbel.3 | 1 / 2,0 | | 1 | 1 |
| Bet v lbel.4 | 1 / 2,0 | | 5 | 2 |
| Bet v lbel.5 | 1 / 2,0 | | 2 | 2 |
| Bet v lbel.6 | 1 / 2,0 | | 10 | 2 |
| Bet v lbel.7 | 2 / 4,1 | | 5 | 3 |
| Bet v lbel.8 | 1 / 2,0 | | 8 | 3 |
| Bet v lbel.9 | 1 / 2,0 | | 11 | 3 |
| Bet v lbel.10 | 1 / 2,0 | | 5 | 3 |
| Bet v lbel.11 | 1 / 2,0 | | 12 | 4 |
| Bet v lbel.12 | 1 / 2,0 | | 16 | 9 |
| Bet v lbel.13 | 2 / 4,1 | | 21 | 11 |
| Bet v lbel.14* | 1 / 2,0 | | 0 | 0 |
| Bet v lbel.15 | 1 / 2,0 | | 13 | 4 |
| Bet v lbel. 16 | 4 / 8,2 | Bet v 1.0102 | 3 | 0 |
| Bet v lbel.17 | 1 / 2,0 | | 4 | 1 |
| Bet v lbel.18 | 1 / 2,0 | | 3 | 1 |
| Bet v lbel.19 | 1 / 2,0 | | 3 | 2 |
| Bet v lbel.20 | 3 / 6,1 | Bet v 1.0104 | 0 | 0 |
| Bet v lbel.21 | 1 / 2,0 | | 6 | 1 |
| Bet v lbel.22 | 1 / 2,0 | | 1 | 1 |
| Bet v lbel.23 | 1 / 2,0 | | 9 | 2 |
| Bet v lbel.24 | 1 / 2,0 | | 10 | 3 |
| Bet v lbel.25 | 1 / 2,0 | | 13 | 5 |
| Bet v lbel.26 | 1 / 2,0 | | 13 | 8 |
| Bet v lbel.27 | 1 / 2,0 | Bet v 1.0106 | 9 | 2 |
| Bet v lbel.28 | 1 / 2,0 | Bet v 1.0108 | 4 | 1 |
| Bet v lbel.29 | 1 / 2,0 | | 13 | 7 |
| Bet v lbel.30* | 1 / 2,0 | Bet v 1.0109 | 10 | 4 |
| Bet v lbel.31 | 1 / 2,0 | Bet v 1.0204 | 3 | 1 |
| <i>Из GenBank</i> <i>From GenBank</i> | | | | |
| Bet v lbel.32 | 1 / 2,0 | EU526164.1 | 0 | 0 |
| Bet v lbel.33 | 1 / 2,0 | DQ296608.1 | 2 | 0 |
| Bet v lbel.34 | 1 / 2,0 | EU526246.1 | 1 | 1 |
| Bet v lbel.35 | 1 / 2,0 | | 4 | 2 |
| Bet v lbel.36 | 1 / 2,0 | AJ001554.1 | 4 | 2 |

Пр и м е ч а н и е: * – Последовательности с укороченной открытой рамкой считывания.

Note: * – Sequences with a shortened open reading frame.

(2,0 %) (Bet v lbel.27) содержал плазмиду с фрагментом гена, кодирующим белок, различающийся с вариантом Bet v 1.0106 (Bet v 1j, X77271.1) двумя аминокислотными заменами. Только одной аминокислотой различались две установленные последовательности (4,1 %) (Bet v lbel.28, Bet v lbel.31) от изоформ Bet v 1.0108 (Z80100.1) и Bet v 1.0204 (Bet v 1 m/n, X81972.1, X82028.1) соответственно. Еще шесть клонов (12,2 %) (Bet v lbel.12, Bet v lbel.13, Bet v lbel.25, Bet v lbel.26, Bet v lbel.29) содержали плазмиды с фрагментами генов, кодирующих белки, которые значительно отличались по аминокислотному составу от известных изоформ: количество замен составляло от 5 до 11 (рис. 2, а).



Рис. 2. Выравнивание полученных аминокислотных последовательностей: *a* – относительно депонентов базы данных аллергенных белков; *b* – относительно депонентов GenBank. Аминокислоты, ассоциированные с высокими IgE-связывающей активностью выделены светло-серым цветом, с низкой – темно-серым цветом. Fig. 2. Alignment of the obtained amino acid sequences: *a* – relative to the depositors of the database of allergenic proteins; *b* – relative to the depositors of GenBank. Amino acids associated with isoforms with high IgE-binding activity are highlighted in light gray, with low – dark gray

В процессе исследования были обнаружены две последовательности (4,1 %) с укороченной открытой рамкой считывания. В первом случае длина составила 320 п. н. (106 аминокислот), во втором – 385 п. н. (128 аминокислот). Полученные секвенированные последовательности (Bet v 1bel.14, Bet v 1bel.30) имели наивысшую гомологию с вариантами Bet v 1.0101 и Bet v 1.0109 (Z80101.1) (рис. 2, a).

В 5 случаях (10,2 %) (Bet v 1bel.32 – Bet v 1bel.36) полученные секвенированные последовательности максимально соответствовали депонентам GenBank. В двух вариантах наблюдалось полное совпадение по аминокислотному составу с последовательностями EU526164.1 и DQ296608.1, а в трех – выявлено до 2 аминокислотных замен по сравнению с депонентами EU526246.1 и AJ001554.1 (рис. 2, b). В данных секвенированных последовательностях были обнаружены и некодирующие участки – интроны, положение которых было практически идентичным во всех анализируемых последовательностях. В двух случаях (Bet v 1bel.34 – 35) некодирующие участки отсутствовали. Тем не менее, результаты выравнивания полученных секвенированных последовательностей с известными последовательностями GenBank показали практически полное соответствие кодирующих частей с депонентом EU526246.1. Во всех остальных вариантах сайтом сплайсинга на 5'-конце являлся AG:GT, а на 3'-конце – AG:GC, что характерно для растительных организмов [9]. Размеры интронов варьировали от 84 до 104 п. н. (рис. 3). По данным литературы наличие интронных последовательностей может стимулировать инициацию транскрипции, повышать стабильность пре-мРНК в ядре или скорость экспорта мРНК в цитоплазму [14].

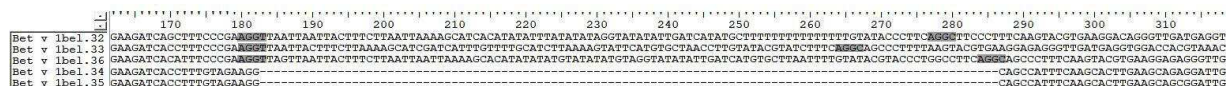


Рис. 3. Выравнивание некодирующих областей

Fig. 3. Alignment of non-coding regions

Структурное определение IgE-связывающих В-клеточных эпитопов белка Bet v 1 имеет важное значение при разработке рекомбинантных аллергенов, которые могут быть использованы для диагностики и лечения аллергии на пыльцу березы, так как замена даже нескольких аминокислот может значительно сказаться на способности связываться с IgE. Еще одной функцией В-клеточных эпитопов является их участие в перекрестных реакциях с Bet v 1-гомологичными белками. По данным литературы определены аминокислотные остатки, влияющие на аллергенность Bet v 1 и располагающиеся в последовательности на участке от 11 до 126 позиции [3; 4]. Данные аминокислоты входят в состав В-клеточных эпитопов белка, которые являются конформационными и располагаются на различных структурных элементах Bet v 1. На рис. 4 представлена трехмерная структура основного аллергена пыльцы березы, установленная с использованием методов рентгеновской кристаллографии и ядерного магнитного резонанса [15]. Аминокислотные остатки, образующие В-клеточные эпитопы, находятся на внешней поверхности антигена.

Полученные нами данные по изучению аминокислотных замен показали, что в группах Bet v 1.0101- и Bet v 1.0104-подобных последовательностей в положениях 31, 58, 113, 114 наблюдались замены аминокислот, ассоциированных с вариантами с высокой IgE-связывающей активностью (Phe, Ser, Ser, Ile), на аминокислоты с соответствующей низкой активностью (Val, Asn, Cys, Val) относительно эталонной изоформы. А в группе выравнивания относительно Bet v 1.0108 в позициях 113, 114 и 126, наоборот, выявлены замены аминокислот, которые соотносят с низкой IgE-связывающей способностью белка (Cys, Val, Asn) на аминокислоты, характерные для изоформ, проявляющих высокую IgE-связывающую активность

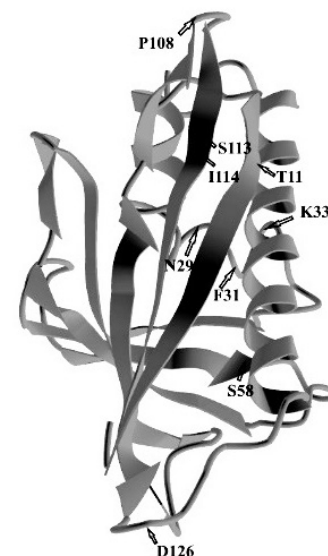


Рис. 4. Молекулярное моделирование и картирование на поверхности Bet v 1 аминокислотных остатков (отмечены стрелками), входящих в состав В-клеточных эпитопов [15]

Fig. 4. Molecular modeling and mapping on the surface of Bet v 1 amino acid residues (marked with arrows) that are part of B-cell epitopes [15]

(Ser, Ile, Asp). В этой же группе в одной из последовательностей в 58 аминокислотном положении наблюдается замена Ser (высокая IgE-связывающая активность) на Asn (низкая IgE-связывающая активность). Выявленные замены могут значительно увеличивать вариабельность предполагаемой IgE-реактивности среди исследуемых групп. От 1 до 4 аминокислотных замен наблюдалось в группах, объединенных вариантами Bet v 1.0102, Bet v 1.0106, Bet v 1.0109, Bet v 1.0204, EU526246.1 и AJ001554.1, однако эти аминокислоты не относятся к влияющим на аллергенность белка (рис. 1).

По литературным данным известны два основных Т-клеточных эпитопа, которые занимают участки, расположенные между 78 и 93 и между 143 и 157 аминокислотами. Эти пептиды вызывают клеточный иммунный ответ у более, чем 60 % пациентов с поллинозом, обусловленным главным аллергеном пыльцы березы, и участвуют в перекрестной реактивности на уровне Т-клеток между данным респираторным аллергеном и Bet v 1-гомологичными белками [16] (рис. 5).

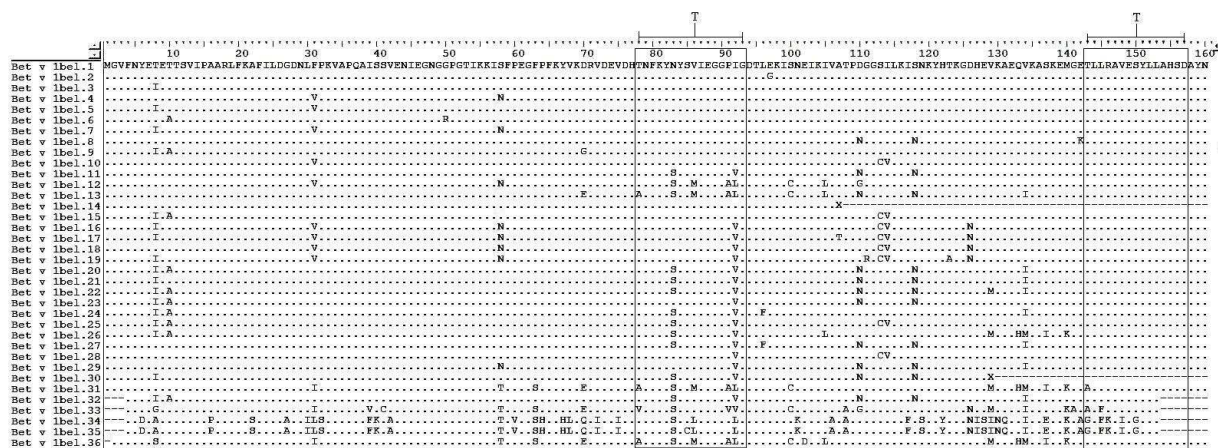


Рис. 5. Сравнение доминантных Т-клеточных эпитопов Bet v 1 в полученных последовательностях

Fig. 5. Comparison of dominant Bet v 1 T-cell epitopes in the obtained sequences

Иммунодоминантный Т-клеточный эпитоп Bet v 1_{143–157} расположен на С-конце высококонсервативной среди различных изоформ области. В ряду последовательностей, идентичных или близких депонентам из базы данных аллергенных белков, на данном участке выявлена единичная аминокислотная замена в 143 положении (Thr на Ala) в варианте Bet v 1bel.31. Что же касается пептидов, не отнесенных к аллергенам (Bet v 1bel.32 – Bet v 1bel.36), то только в одной последовательности (Bet v 1bel.36) этот участок был полноразмерным. Отличия в аминокислотном составе не обнаружены.

Т-клеточный эпитоп Bet v 1_{78–93}, расположенный в центральной области, оказался более вариабельным и содержал аминокислотные замены в большинстве вариантов, что, по литературным данным, может влиять на активацию Т-клеток и клеточную перекрестную реактивность [16].

Заключение. Определен спектр изоформ Bet v 1 березы повислой, произрастающей на территории Республики Беларусь. Показано высокое генетическое разнообразие клонированных последовательностей. Несмотря на то что все полученные варианты экспрессируются в виде РНК в пыльце, часть выявленных последовательностей (14 %) не входит в состав базы данных аллергенов. Как и ожидалось, большинство полученных последовательностей (36,7 %) идентичны или максимально подобны (от 97,5 до 99,4 %) по аминокислотному составу аллергену Bet v 1.0101, что соответствует результатам исследований, проведенных в других европейских странах: Австрии, Швеции, Нидерландах [6–8; 17]. 29 секвенированных последовательностей (59,2 %) с разной степенью сходства (от 93,1 до 100 %) гомологичны еще 10 вариантам Bet v 1, часть из которых ($n = 6$) задепонирована в базе данных аллергенных белков. Укороченная рамка считывания была обнаружена в 2 случаях. Установлено, что в пыльце одного дерева экспрессируются белки, соответствующие 7 изоформам главного аллергена пыльцы березы.

Выявлены интронируемые участки, прерывающие кодирующую часть гена в 3 секвенированных последовательностях, что по данным литературы может повышать стабильность пре-

мРНК в ядре, скорость экспорта мРНК в цитоплазму, а также стимулировать инициацию транскрипции [14].

В процессе исследования были проанализированы аминокислотные остатки, входящие в состав IgE-связывающих конформационных эпитопов и влияющие на аллергенность Bet v 1. В пяти из рассмотренных позиций были обнаружены аминокислотные замены (в 31, 58, 113, 114, 126 положениях), которые ассоциированы с изоформами, проявляющими разнонаправленную (высокую или низкую) IgE-связывающую активность.

Во всех установленных вариантах проведен анализ состава и структуры линейных Т-клеточных эпитопов. Интересно отметить, что С-концевой иммунодоминантный Т-клеточный эпитоп Bet v 1_{143–157} оказался высококонсервативным среди различных изоформ аллергена, в отличие от эпитопа Bet v 1_{78–93}, расположенного в центральной области и содержащего аминокислотные замены в большинстве вариантов. Аминокислотные замены наблюдались в следующих позициях: 78, 83, 86, 91 и 92. Выявленная вариабельность данного участка, по литературным данным, может влиять на активацию Т-клеток и клеточную перекрестную реактивность [16].

Последовательности с установленными аминокислотными заменами представлены в GenBank (коды доступа PP639721, PP663111–PP6663140).

Список использованных источников

1. Breiteneder, H. The History and Science of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 / H. Breiteneder, D. Kraft // *Biomolecules*. – 2023. – Vol. 13, N 7. – Art. 1151. <https://doi.org/10.3390/biom13071151>
2. Ligand recognition of the major birch pollen allergen Bet v 1 is isoform dependent / C. Seutter von Loetzen [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, N 6. – Art. e0128677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128677>
3. Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen / M. Schenk [et al.] // *BMC Genomics*. – 2006. – Vol. 7. – Art. 168. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-168>
4. Naturally occurring hypoallergenic Bet v 1 isoforms fail to induce IgE responses in individuals with birch pollen allergy / S. Wagner [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 121, N 1. – P. 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.08.006>
5. Purification and characterization of recombinant Bet v I, the major birch pollen allergen. Immunological equivalence to natural Bet v I / F. D. Ferreira [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, N 26. – P. 19574–19580. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)36554-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)36554-8)
6. Proteomic profiling of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts from different origins / A. Erler [et al.] // *Proteomics*. – 2011. – Vol. 11, N 8. – P. 1486–1498. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000624>
7. Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning / I. Swoboda [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270, N 6. – P. 2607–2613. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2607>
8. Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen / M. Schenk [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2009. – Vol. 9. – Art. 24. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-24>
9. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences / C. Radauer [et al.] // *Allergy*. – 2014. – Vol. 69, N 4. – P. 413–419. <https://doi.org/10.1111/all.12348>
10. Allergen Nomenclature [Electronic resource] – Mode of access: <http://www.allergen.org/index.php>. – Date of access: 01.04.2024.
11. Isolation of total RNA from pollens / K. Bijli [et al.] // *Preparat. Biochem. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 31, N 2. – P. 155–162. <https://doi.org/10.1081/PB-100103381>
12. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1977. – Vol. 74, N 12. – P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
13. Basic Local Alignment Search Tool [Electronic resource] – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Date of access: 01.04.2024.
14. Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions / K. Hoffmann-Sommergruber [et al.] // *Gene*. – 1997. – Vol. 197, N 1–2. – P. 91–100. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00246-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00246-1)
15. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy / M. Gajhede [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 3, N 12. – P. 1040–1045. <https://doi.org/10.1038/nsb1296-1040>
16. T cells specific to multiple Bet v 1 peptides are highly cross-reactive toward the corresponding peptides from the homologous group of tree pollens / G. Lund [et al.] // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1291666>
17. New Bet v 1 isoforms including a naturally occurring truncated form of the protein derived from Austrian birch pollen / R. Friedl-Hajek [et al.] // *Mol. Immunol.* – 1999. – Vol. 36, N 10. – P. 639–645. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(99\)00078-4](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(99)00078-4)

References

1. Breiteneder H., Kraft D. The History and Science of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1. *Biomolecules*, 2023, vol. 13, no. 7, art. 1151. <https://doi.org/10.3390/biom13071151>

2. von Loetzen C. S., Jacob T., Hartl-Spiegelhauer O., Vogel L., Schiller D., Spörlein-Güttler C., Schobert R., Vieths S., Hartl M. J., Rösch P. Ligand recognition of the major birch pollen allergen Bet v 1 is isoform dependent. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 6, art. e0128677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128677>
3. Schenk M. F., Gilissen L. J., Esselink G. D., Smulders M. J. Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen. *BMC Genomics*, 2006, vol. 7, art. 168. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-168>
4. Wagner S., Radauer C., Bublin M., Hoffmann-Sommergruber K., Kopp T., Greisenegger E. K., Vogel L., Vieths S., Scheiner O., Breiteneder H. Naturally occurring hypoallergenic Bet v 1 isoforms fail to induce IgE responses in individuals with birch pollen allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, vol. 121, no. 1, pp. 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.08.006>
5. Ferreira F. D., Hoffmann-Sommergruber K., Breiteneder H., Pettenburger K., Ebner C., Sommergruber W., Steiner R., Bohle B., Sperr W. R., Valent P. Purification and characterization of recombinant Bet v I, the major birch pollen allergen. Immunological equivalence to natural Bet v I. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268, no. 26, pp. 19574–19580. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)36554-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)36554-8)
6. Erler A., Hawranek T., Krückemeier L., Asam C., Egger M., Ferreira F., Briza P. Proteomic profiling of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts from different origins. *Proteomics*, 2011, vol. 11, no. 8, pp. 1486–1498. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000624>
7. Swoboda I., Jilek A., Ferreira F., Engel E., Hoffmann-Sommergruber K., Scheiner O., Kraft D., Breiteneder H., Pittenauer E., Schmid E., Vicente O., Heberle-Bors E., Ahorn H., Breitenbach M. Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270, no. 6, pp. 2607–2613. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2607>
8. Schenk M. F., Cordewener J. H., America A. H., van't Westende W. P., Smulders M. J., Gilissen L. J. Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen. *BMC Plant Biology*, 2009, vol. 9, art. 24. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-24>
9. Radauer C., Nandy A., Ferreira F., Goodman R. E., Larsen J. N., Lidholm J., Pomés A., Raulf-Heimsoth M., Rozynek P., Thomas W. R., Breiteneder H. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy*, 2014, vol. 69, no. 4, pp. 413–419. <https://doi.org/10.1111/all.12348>
10. *Allergen Nomenclature*. Available at: <http://www.allergen.org/index.php> (accessed 1 April 2024).
11. Bijli K. M., Singh B. P., Sridhara S., Arora N. Isolation of total RNA from pollens. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2001, vol. 31, no. 2, pp. 155–162. <https://doi.org/10.1081/PB-100103381>
12. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
13. *Basic Local Alignment Search*. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (accessed 1 April 2024)
14. Hoffmann-Sommergruber K., Vanek-Krebitz M., Radauer C., Wen J., Ferreira F., Scheiner O., Breiteneder H. Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions. *Gene*, 1997, vol. 197, no. 1–2, pp. 91–100. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00246-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00246-1)
15. Gajhede M., Osmark P., Poulsen F. M., Ipsen H., Larsen J. N., Joost van Neerven R. J., Schou C., Löwenstein H., Spangfort M. D. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Structural and Molecular Biology*, 1996, vol. 3, pp. 1040–1045. <https://doi.org/10.1038/nsb1296-1040>
16. Lund G., Christensen L. H., Ihlemann J., Andersen P. S., Wambre E., Würtzen P. A., Gupta S. T cells specific to multiple Bet v 1 peptides are highly cross-reactive toward the corresponding peptides from the homologous group of tree pollens. *Frontiers in Immunology*, 2023, vol. 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1291666>
17. Friedl-Hajek R., Radauer C., O'Riordain G., Hoffmann-Sommergruber K., Leberl K., Scheiner O., Breiteneder H. New Bet v 1 isoforms including a naturally occurring truncated form of the protein derived from Austrian birch pollen. *Molecular Immunology*, 1999, vol. 36, no. 10, pp. 639–645. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(99\)00078-4](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(99)00078-4)

Информация об авторах

Пархомчук Ольга Юрьевна – науч. сотрудник, аспирант. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olgaparhom4uk@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3984-393X.

Фомина Елена Георгиевна – д-р биол. наук, заведующий лабораторией. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: fegl@tut.by. ORCID: 0000-0003-3028-1176.

Григорьева Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, доцент. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: grigus@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3919-0625.

Information about the authors

Parkhomchuk Olga Yu. – Researcher, Postgraduate Student. Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olgaparhom4uk@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3984-393X.

Fomina Elena G. – D. Sc. (Biology), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: fegl@tut.by. ORCID: 0000-0003-3028-1176.

Grigorieva Elena E. – Ph. D. (Biology), Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grigus@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3919-0625.