

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕКТРА ЭНДЕМИЧНЫХ ИЗОФОРМ АЛЛЕРГЕНА Bet v 1 НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

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

Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии
ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» г. Минск, Республика Беларусь

Резюме. Береза повислая, занимающая область умеренного климата, чаще всего встречается на территории Северной Америки и Европы. Ежегодно в период с апреля по май наблюдается интенсивное пыление берез, которое очень часто является одной из главных причин весеннего поллиноза, негативно влияя на качество жизни многих людей. Пыльцевая аллергия (поллиноз) занимает одно из ведущих мест среди аллергических заболеваний. В Европейском регионе значимой является сенсибилизация к пыльце березы. Bet v 1 – главный аллерген пыльцы березы, ответственный за выработку специфических IgE у 95% пациентов, сенсибилизированных к пыльце березы. Bet v 1 принадлежит к классу белков PR-10, включающих в себя большую группу аэроаллергенов и распространенных пищевых аллергенов. В настоящее время в соответствии с номенклатурой аллергенов выделяют 27 вариантов (изоформ) белка Bet v 1, которые отличаются между собой чаще всего только несколькими аминокислотами.

Целью настоящего исследования являлось определение разнообразия генетических вариантов главного аллергена пыльцы березы Bet v 1 на территории Республики Беларусь.

Исследована пыльца березы повислой, собранная в весенний период. Получены рекомбинантные векторные конструкции, содержащие гены, кодирующие различные изоформы аллергена Bet v 1. Определена нуклеотидная последовательность клонированных фрагментов. Установлено, что в 3 сиквенсах присутствуют интронированные участки, прерывающие кодирующую часть гена. Еще в 2 последовательностях обнаружена укороченная рамка считывания.

Проведен анализ результатов исследования спектра изоформ белка Bet v 1. Полученные последовательности в той или иной степени соответствуют 11 генетическим вариантам изучаемого аллергена. 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 толь-

Адрес для переписки:

Пархомчук Ольга Юрьевна
Научно-исследовательский институт гигиены,
токсикологии, эпидемиологии, вирусологии
и микробиологии
220114, Республика Беларусь, г. Минск,
ул. Филимонова, 23.
Тел./факс: +375 (17) 374-24-41.
E-mail: olgaparhom4uk@mail.ru

Address for correspondence:

Olga Yu. Parkhomchuk
Research Institute of Hygiene, Toxicology,
Epidemiology, Virology and Microbiology
23 Filimonov St
Minsk
220114 Republic of Belarus
Phone/fax: +375 (17) 374-24-41.
E-mail: olgaparhom4uk@mail.ru

Образец цитирования:

О.Ю. Пархомчук, Е.Г. Фомина, Е.Е. Григорьева
«Определение спектра эндемичных изоформ аллергена
Bet v 1 на территории Республики Беларусь»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 2. С. 215–220.
doi: 10.46235/1028-7221-17059-EOE

© Пархомчук О.Ю. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.Yu. Parkhomchuk, E.G. Fomina, E.E. Grigorieva
“Evaluation of endemic Bet v 1 allergen spectrum at
the territory of the Republic of Belarus”, *Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2025,
Vol. 28, no. 2, pp. 215–220.
doi: 10.46235/1028-7221-17059-EOE

© Parkhomchuk O. Yu. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17059-EOE

ко одним вариантом — максимально сходным с изоформой Bet v 1.0204 — и составил минимальных 3% от общего количества сиквенсов. В пределах одного дерева определено 7 изоформ Bet v 1. Установлено, что преобладающей изоформой главного аллергена пыльцы березы Bet v 1 является Bet v 1.0101 (Bet v 1a, X15877.1).

Ключевые слова: *Betula pendula*, *Bet v 1*, изоформы, PR-10, аллерген, поллиноз

EVALUATION OF ENDEMIC Bet v 1 ALLERGEN SPECTRUM AT THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

Parkhomchuk O.Yu., Fomina E.G., Grigorieva E.E.

Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology, Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. The birch tree occupies the temperate climate region in North America and Europe. Every year between April and May, the birch trees pollinate intensively, which is a common cause of seasonal pollinosis which negatively affects the quality of life in many subjects. Pollen allergy (pollinosis) is among the leading allergic diseases. Sensitization to birch pollen is common in the European regions. Bet v 1 is the main birch pollen allergen which may induce specific IgE in 95% of patients sensitized with birch pollen. Bet v 1 belongs to the PR-10 class of proteins, which includes a large group of aeroallergens and common food allergens. Currently, according to the nomenclature of allergens, 27 variants (isoforms) of Bet v 1 proteins are discerned which may often differ in only several amino acids. The aim of this study was to determine the genetic diversity of the major birch pollen allergen Bet v 1 on the territory of the Republic of Belarus. We studied the pollen samples from birch collected in spring time. Recombinant vector constructs containing genes encoding different isoforms of Bet v 1 allergen were obtained. The nucleotide sequences of the cloned fragments have been determined. Three sequences were found to contain intronic regions interrupting the coding part of the gene. An abridged reading frame was detected in two other sequences. We evaluated the spectrum of Bet v 1 protein isoforms. The sequences obtained are related to 11 genetic variants of the studied allergen to a greater or lesser extent. The majority (86%) of the identified variants correspond to 7 isoforms of 2 isoallergens retrieved in the database of allergenic proteins, with Bet v 1.0101-like sequences being more common (42%), followed by the group with common Bet v 1.0104 variant (19%). The third position (11%) is occupied by Bet v 1.0102-like sequences. The Bet v 1.02 isoallergen is represented by a single variant which is closely similar to the Bet v 1.0204 isoform (3% of the total number of sequences under study). 7 Bet v 1 isoforms were identified within one phylogenetic tree. Bet v 1.0101 (Bet v 1a, X15877.1) was found to be the predominant isoform of the main birch pollen Bet v 1 allergen.

Keywords: *Betula pendula*, *Bet v 1*, isoforms, PR-10, allergen, hay fever

Введение

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 [5, 11, 13, 14]. В настоящее время варибельные нуклеотидные последовательности Bet v 1 объединены подкомитетом по номенклатуре аллергенов ВОЗ и Международным союзом иммунологи-

ческих обществ в отдельную базу данных. 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 после-

довательности 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 [1, 8].

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 [10].

Целью данного исследования являлось определение спектра изоформ главного аллергена пыльцы березы *Bet v 1*, встречающихся на территории Республики Беларусь (эндемичные изоформы).

Материалы и методы

Для исследования была использована пыльца берез ($n = 90$) (*Betula pendula*), кластеризованных по 9 группам в зависимости от места произрастания (населенному пункту), собранная в весенний период на территории шести областей Республики Беларусь.

Выделение суммарной РНК из образцов пыльцы осуществлялось методом, основанным на применении LiCl [3]. 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 амплификатов гена, кодирующего белок *Bet v 1*, выполнялось методом ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных последовательностей, синтезированных ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь: *Bet v 1dH* 5' – CGCGAAGCTTATGGGTGTTTCAATTACGA – 3' (прямой), *Bet v 1rX* 5' – GCGCCTCGAGGTTGTAGGCATCGGAGTG – 3' (обратный). Состав реакционной смеси: по 15 пмоль праймеров (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь), 2,5 мкл 10× 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 qZ M15 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 [9]. 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 version 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 [2].

Результаты и 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 последо-

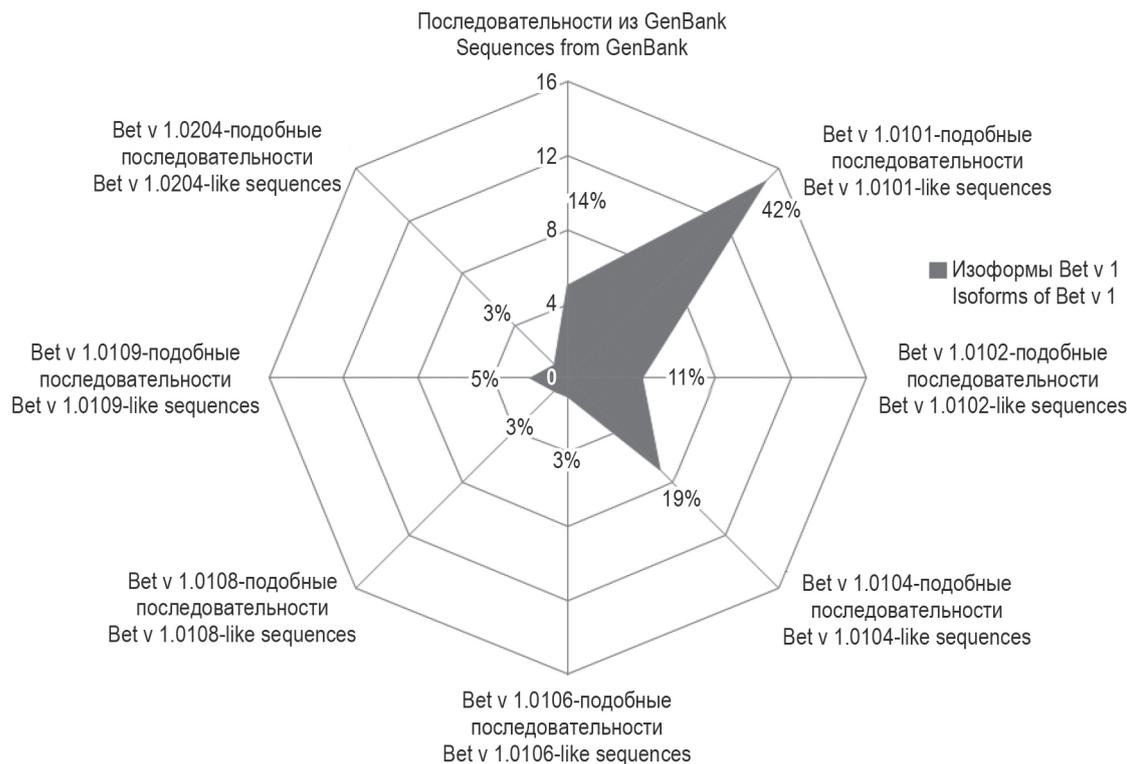


Рисунок 1. Структура спектра изоформ Bet v 1

Figure 1. Structure of the spectrum of Bet v 1 isoform

вательности 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. 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 сиквенсов (рис. 1).

В процессе исследования были обнаружены две последовательности с укороченной открытой рамкой считывания. В первом случае длина составила 320 п.н. (106 аминокислот), во втором – 385 п.н. (128 аминокислот). Полученные сиквен-

сы имели наивысшую гомологию с вариантами Bet v 1.0101 и Bet v 1.0109 (Z80101.1). В трех сиквенсах были обнаружены и не кодирующие участки – интроны, положение которых было практически идентичным во всех анализируемых последовательностях. В двух случаях не кодирующие участки отсутствовали. Тем не менее результаты выравнивания с известными последовательностями GenBank показали практически полное соответствие кодирующих частей. Во всех остальных вариантах размеры интронов варьировали от 84 п.н. до 104 п.н. По данным литературы наличие интронных последовательностей может стимулировать инициацию транскрипции, повышать стабильность пре-мРНК в ядре или скорость экспорта мРНК в цитоплазму.

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 последова-

тельностей (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 [4, 6, 10, 12]. 29 сиквенсов (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 интронированные участки, прерывающие кодирующую часть гена в 3 сиквенсах, что по данным литературы может повышать стабильность пре-мРНК в ядре, скорость экспорта мРНК в цитоплазму, а также стимулировать инициацию транскрипции [7].

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

Список литературы / References

1. Allergen Nomenclature. Available at: <http://www.allergen.org/index.php> (accessed 23 July 2024).
2. Basic Local Alignment Search. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (accessed 23 July 2024).
3. Bijli K.M., Singh B.P., Sridhara S., Arora N. Isolation of total RNA from pollens. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2001, Vol. 31, no. 2, pp. 155-162.
4. 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.
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. *J. Biol. Chem.*, 1993, Vol. 268, no. 26, pp. 19574-19580.
6. 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. *Mol. Immunol.*, 1999, vol. 36, no. 10, pp. 639-645.
7. 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.
8. 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.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, Vol. 74, no. 12, pp. 5463-5467.
10. 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 Biol.*, 2009, Vol. 9, no. 24, 24. doi: 10.1186/1471-2229-9-24.
11. 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, 168. doi: 10.1186/1471-2164-7-168.
12. Swoboda I., Jilek A., Ferreira F., Engel E., Hoffmann-Sommergruber K., Scheiner O., Kraft D., Breiteneder H., Pittenauer E., Schmid E. Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.*, 1995, Vol. 270, no. 6, pp. 2607-2613.
13. 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, e0128677. doi: 10.1371/journal.pone.0128677.
14. 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. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 121, no. 1, pp. 246-252.

Авторы:

Пархомчук О.Ю. – научный сотрудник, аспирант лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии, Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» г. Минск, Республика Беларусь

Authors:

Parkhomchuk O. Yu., Research Associate, Postgraduate Student, Laboratory of Immunology and Cellular Biotechnology, Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology, Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus

Фомина Е.Г. — д.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и клеточной биотехнологии, Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» г. Минск, Республика Беларусь

Григорьева Е.Е. — к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии, Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» г. Минск, Республика Беларусь

Fomina E.G., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Cellular Biotechnology, Laboratory of Immunology and Cellular Biotechnology, Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology, Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus

Grigorieva E.E., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Immunology and Cellular Biotechnology, Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology, Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus

Поступила 06.08.2024
Принята к печати 06.08.2024

Received 06.08.2024
Accepted 06.08.2024