

*На правах рукописи*

РОМАНОВА Елена Владимировна

**Сравнительный геномный анализ штаммов вируса клещевого  
энцефалита, обладающих разной вирулентностью**

03.01.07 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в лаборатории аналитической биоорганической химии Учреждения Российской академии наук Лимнологическом институте Сибирского отделения РАН, Иркутск.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
**Беликов Сергей Иванович**  
Лимнологический институт СО РАН,  
г. Иркутск

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор  
**Леонова Галина Николаевна**  
НИИ эпидемиологии и микробиологии  
СО РАМН, г. Владивосток

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
**Щелкунов Сергей Николаевич**  
ФГУН Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор»,  
г. Новосибирск  
кандидат биологических наук  
**Гончарова Елена Павловна**  
Институт химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН,  
г. Новосибирск

Ведущая организация: Новосибирский государственный  
университет

Защита состоится: 20 апреля 2011 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.045.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в конференц-зале института по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8.  
Тел: +7 952-916-7858. e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан «\_\_\_» марта 2011г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Е. Б. Кокоза

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) – одна из самых распространенных и опасных природно-очаговых инфекций лесной зоны Евразийского континента [Гниэль, Броекер, 2002; Погодина, 2007]. Вирус КЭ передается через укус клещей и вызывает заболевание, характеризующееся лихорадкой, интоксикацией и поражением центральной нервной системы [Аитов и др., 2007; Злобин, Горин, 1996]. Ежегодно в России регистрируется до 20–30 случаев заболевания КЭ на 100 тысяч населения [Львов, Злобин, 2007].

По международной классификации флавивирусов, принятой в 2000 г., вирус КЭ разделяют на три субтипа: дальневосточный, циркулирующий главным образом, на Дальнем Востоке России, европейский – преимущественно в Европе и Европейской части страны и сибирский – на остальной территории России [Злобин и др., 2002; Леонова и др., 2004]. Известно, что наиболее тяжелые поражения центральной нервной системы у больных КЭ и самый высокий процент смертельных исходов отмечается на Дальнем Востоке [Злобин, Горин, 1996; Леонова и др., 2004]. Наоборот, в Европейской части России это заболевание имеет легкое течение, а летальные исходы происходят крайне редко. К промежуточному варианту по тяжести клинических проявлений и проценту летальных исходов можно отнести КЭ на территории Урала и Сибири [Борисов, 2000]. Таким образом, сложилось мнение, что вирус КЭ дальневосточного субтипа вызывает более тяжелые формы заболевания, а наименее опасным является вирус европейского субтипа [Злобин, Горин, 1996; Злобин, 2005]. Однако принадлежность к определенному субтипу не позволяет сделать прогноз тяжести течения болезни, так как в результате дальнейших исследований было показано, что каждый из субтипов вируса КЭ может вызвать весь спектр клинических проявлений инфекции [Злобин и др., 2007; Кулакова и др., 2002; Леонова, 1997]. Особенно четко показано присутствие различных форм течения этого заболевания на Дальнем Востоке, где преимущественно циркулируют штаммы дальневосточного субтипа вируса КЭ [Леонова, 1997].

В данной работе проводится сравнительный анализ последовательностей геномов штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа, вызвавших бессимптомное течение заболевания (инаппарантная форма) и

последовательностей геномов штаммов, приведших к летальному исходу пациентов (очаговая форма КЭ). Объектом данного исследования послужили геномы штаммов вируса, изолированных от инфицированных пациентов на территории Приморского края сотрудниками лаборатории клещевого энцефалита во главе с проф. Леоновой Г.Н. (Институт Эпидемиологии и Микробиологии РАМН, г. Владивосток). Далее мы будем называть «высоковирулентными» штаммы вируса, выделенные от умерших от энцефалита людей, а «низковирулентными» – штаммы вируса КЭ, выделенные от людей с инаппарантной формой заболевания.

**Цель исследования:**

Сравнительный анализ последовательностей полных геномов штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа, выделенных от людей с различными клиническими формами течения заболевания на территории Приморского Края.

**Задачи исследования:**

1. Определить последовательности полных геномов 12 штаммов вируса КЭ, обладающих разной вирулентностью для человека.
2. Выявить отличия в кодирующих и некодирующих последовательностях геномов высоковирулентных и низковирулентных штаммов.
3. Сопоставить данные о мутациях, различающих последовательности геномов высоковирулентных и низковирулентных штаммов, с уже имеющимися в литературе данными о мутациях, влияющих на свойства вируса КЭ и других флавивирусов.
4. Определить возможность существования связи между вторичной структурой некодирующих областей геномов и вирулентностью исследуемых штаммов.
5. Провести филогенетический анализ на основе последовательностей геномов высоковирулентных и низковирулентных штаммов.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** В представленной работе определены полные нуклеотидные последовательности геномов 12 штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа. Данная выборка включает 6 штаммов, вызвавших бессимптомное течение заболевания у инфицированных людей (низковирулентные штаммы), и 6 штаммов, которые привели к заболеванию с тяжелой неврологической симптоматикой и окончились летальным исходом пациентов (высоковирулентные штаммы). Впервые

показано, что циркулировавшие в природной среде высоковирулентные и низковирулентные штаммы вируса КЭ имеют отличия в последовательностях геномов. Отличия заключаются в мутациях в кодирующей и некодирующей частях генома. Вирусный полипротеин имеет мутации в 17 позициях. В 16 позициях находятся замены, и в одной позиции – делеция аминокислотного остатка. 3'-нетранслируемый регион (3'НТР) имеет четыре нуклеотидные замены, отличающие высоковирулентные штаммы от низковирулентных штаммов.

Нуклеотидные последовательности геномов всех штаммов и соответствующие им аминокислотные последовательности полипротеинов депонированы в международный банк данных GenBank и в настоящее время являются доступными для других исследователей.

**Основное положение, выносимое на защиту:**

Отличия между высоковирулентными и низковирулентными штаммами вируса КЭ дальневосточного субтипа заключаются в мутациях, находящихся в кодирующей и некодирующей частях их геномов.

**Личный вклад соискателя.** В основу диссертации положены исследования автора в лаборатории аналитической биоорганической химии Учреждения Российской академии наук Лимнологического института СО РАН (определение нуклеотидных последовательностей геномов штаммов вируса КЭ и их анализ).

**Апробация результатов диссертации и публикации.** Материалы диссертации были представлены на Четвертой международной конференции, посвященной 85-летию Санкт-Петербургского НИИЭМ имени Пастера и 120-летию Парижского института Пастера, Санкт-Петербург, 2008; IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 2008; 10-м международном Йенском симпозиуме по клещевым болезням, Веймар, 2009 (X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Weimar, Germany, 2009); Семинаре EMBO «Вирусы и врожденный иммунитет», Дублин, 2010 (Viruses and innate immunity EMBO Workshop, Dublin, Ireland, 2010.); 5-й Научно-практической конференции «Инфекционная патология в Приморском крае», Владивосток, 2010.

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 3 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа включает следующие разделы: введение, 3 главы (литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение), выводы, список используемой литературы и приложение. Работа изложена на 170 страницах, иллюстрирована 16 рисунками и 10 таблицами. Список литературы содержит 25 отечественных и 279 зарубежных источников.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность своему руководителю д. б. н., проф. Беликову С. И. за постановку задачи и поддержку в работе. Автор глубоко признателен д. м. н., проф. Леоновой Г. Н. и к. м. н. Павленко Е. В. за предоставленные образцы РНК штаммов вируса КЭ. Также автор благодарит к. б. н. Кондратова И. Г. за техническое содействие в выполнении работы. Настоящая работа выполнена при поддержке гранта «Разработка нового подхода к технологии ранней диагностики тяжести заболевания клещевым энцефалитом» по Федеральной целевой программе «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» Министерство образования и науки Российской Федерации; Интеграционного проекта СО РАН № 63: «Обнаружение закономерных связей между строением генома и биологическими свойствами штаммов вируса клещевого энцефалита посредством секвенирования и анализа полноразмерных геномов»; а также гранта МНТЦ «Молекулярно-генетическая, биологическая и патогенетическая характеристика популяции вируса клещевого энцефалита».

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе использовали суммарную РНК, выделенную из мозга мышей, инфицированных 12 штаммами вируса КЭ в лаборатории клещевого энцефалита НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток). Штаммы вируса КЭ дальневосточного субтипа были получены в течение 1973–2008 гг. от лиц, пострадавших от укуса клеща на территории Приморского края Дальнего Востока России (табл. 1). Первую группу составили штаммы, не вызвавшие симптомов заболевания у инфицированных лиц (иннаппарантные формы КЭ), вторую – штаммы, вызвавшие заболевание с тяжелой неврологической симптоматикой и приведшие к смерти пациентов (очаговые формы КЭ) [Шаповал, 1980].

## Штаммы вируса КЭ дальневосточного субтипа, использованные в исследовании.

Название штамма	Форма течения КЭ	Место и год заражения	Номер в GenBank
Primorye-86	ОФ	Кировский р-н, 1986	EU816455
Primorye-89	ОФ	Кировский р-н, 1986	FJ906622
Primorye-90	ОФ	г. Арсеньев, 1990	FJ997899
Dalnegorsk	ОФ	Дальнегорский р-н, 1973	FJ402886
Kavalerovo	ОФ	Кавалеровский р-н, 1985	FJ402885
Svetlogorie	ОФ	п. Светлогорье, Пожарский р-н, 2008	GU121642
Primorye-212	ИФ	Пригород Владивостока, 1991	EU816450
Primorye-253	ИФ	Надежденский р-н, 1991	EU816451
Primorye-270	ИФ	п. Мирный, Надежденский р-н, 1991	EU816452
Primorye-332	ИФ	Надеждинский р-н, 1991	AY169390
Primorye-69	ИФ	Уссурийский р-н, 2000	EU816453
Primorye-18	ИФ	Владивосток, 1997	GQ228395

ОФ – очаговая форма инфекции, ИФ – инapparантная форма инфекции.

Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью набора «Реверта-L-100» («АмплиСенс», Россия). Амплификацию геномов исследуемых штаммов проводили с помощью наборов АмплиСенс-200-1 («АмплиСенс», Россия) с использованием разработанного нами набора из 20 праймеров:

1000F 5'-CTGGCTCCGGTTTATGCCTCAC-3'	6000F 5'-CACAGGGACCAGACGTGTGAC-3'
1000R 5'-ACGCATCCTCCCAGTTCAG -3'	6000R 5'-TCATCATCACACTGTCCAGAG-3'
2000F 5'-GCGTTCTCTGGGACCAAACCC-3'	7000F 5'-CGGTGTTGTGGAGTGAACATG-3'
2000R 5'-TTGGGTGTTATCAACATGGCCAC-3'	7000R 5'-TGGTGTGAACAGGGAGACCAC-3'
3000F 5'-GGACTTCAGACAGGAATCAAC-3'	8000F 5'-ATGTGGAAGAGGCGGCTGGTC-3'
3000R 5'-GGTCTGTGTGGACTGCCATGCC-3'	8000R 5'-GCTCTGAACTTGATCAGGTTC-3'
4000F 5'-GGTGTGGACTTCTGCTCATGG-3'	9000F 5'-TGAGCAGAACAGGTGGTCAAG-3'
4000R 5'-CAACATGAGGCCACGCCC-3'	9000R 5'-GTACCATATGGCCCGGCTTCC-3'
5000F 5'-GAACTGCTCCTGGACACAGGT-3'	10000F 5'-TCCGTGAAACTGCCTGCCTTTC-3'
5000R 5'-ACCACTCCCTGGGAGTTGAGG-3'	10000R 5'-GTCCTCTGTGGTCATCCAGGC-3'

Праймеры были подобраны на основе полногеномных последовательностей штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа, имеющих в базе данных GenBank. Данные праймеры амплифицировали 11 фрагментов генома длиной около 1100 н., перекрывающихся между собой. Определение нуклеотидных

последовательностей полученных ПЦР-продуктов проводили на автоматическом секвенаторе CEQ-8800 (Beckman Coulter, США) с использованием коммерческого набора Genome Lab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, США). Для корректного определения участков стыковки фрагментов был использован 21 дополнительный внутренний праймер, отстоящий от внешних приблизительно на 500 н.:

500F 5'-CCGTGTTGAAGTCTTTCTGGAA-3'	5500R 5'-GCTCCGTTGGACTCTGGGAAG-3'
500R 5'-GTGAGTCATCACACCATGATCC-3'	6500F 5'-CGTGTCTAGTGTGACAAGTCG-3'
1500F 5'-CCTGTGTCAAGGCGTCTTGTG-3'	6500R 5'-CTGCCAGGCTCCTCATGCATC-3'
1500R 5'-ACTCCAGTCTGGTCTCCAAGG-3'	7500F 5'-AAGTCTTCTTCTCGGCAATGG-3'
2500F 5'-ATGAGGAATCCGACCATGTCC-3'	7500R 5'-CACAGGCCACTGGCATCGTC-3'
2500R 5'-AGTTCCTCCTCGAAGGTCTC-3'	8500F 5'-GCGGAGGACTGGTGAGGAC-3'
3500F 5'-TGAAAGGACCATGGAAGTACTC-3'	8500R 5'-AGTACTGCCAGGTCCTGTACG-3'
3500R 5'-TTCCAGTGGCTGGCCTCCTC-3'	9500F 5'-AGGGTGAACACAAGCAACTGG-3'
4500F 5'-CATTCAGTGAACCACTGACTG-3'	9500R 5'-TCCGAGACGTTCTTCTCCATG-3'
4500R 5'-CTCAAAGGGCCTGTCACCAC-3'	10500F 5'-CAGGAAGATGATCGGACAAGA-3'
5500F 5'-GGAAGACCCACAGAGTCCTCC-3'	

Выравнивание полученных нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программ BioEdit 5.0.9 [Tippmann, 2004]. Для реконструкции вторичной структуры РНК использовали программу RNAfold (Vienna RNA Package) [Hofacker, 2003]. Картирование аминокислотных замен осуществляли на основе структур флавивирусных белков содержащихся в базе данных Protein Data Bank с помощью программы PyMol. Для поиска трансмембранных доменов в белках использовали программу SOSUI engine ver. 1.11 [Hirokawa, Boon-Chieng, Mitaku, 2003]. Филогенетические деревья строили методами объединения ближайших соседей (Neighbor joining) с помощью программы Mega 4 [Tamura et al., 2007], а также методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) [Felsenstein, 1981] с помощью программы TreeFinder [Jobb, von Haeseler, Strimmer, 2004]. Модель нуклеотидных замен определяли программой jModelTest [Posada, 2008]. Статистическая поддержка кластеризации штаммов определялась бутстреп-анализом на основе 1000 повторов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей исследуемых штаммов вируса КЭ

В результате проведенной работы получены последовательности полных геномов 12 штаммов вирусов КЭ дальневосточного субтипа, обладающих



различной вирулентностью для людей. Длины нуклеотидных последовательностей анализируемых штаммов равны: 10878 н. (Primorye-86), 10875 н. (Primorye-89), 10878 н. (Primorye-90), 10881 н. (Dalnegorsk), 10875 н. (Kavalerovo), 11102 н. (Svetlogorie), 10882 н. (Primorye-212), 10816 н. (Primorye-253), 10878 н. (Primorye-270), 10878 н. (Primorye-332) и 11099 н. (Primorye-69), 11096 н. (Primorye-18).

Для выявления связи между вирулентностью штаммов вируса КЭ и их генетическими особенностями проведено сравнение нуклеотидных последовательностей геномов и соответствующих им аминокислотных последовательностей полипротеинов высоковирулентных и низковирулентных штаммов. К полученным последовательностям высоковирулентных штаммов были добавлены последовательности штаммов дальневосточного субтипа КЭ: Sofjin-НО (AB062064) и Glubinnoe (DQ862460), взятые из базы данных GenBank, которые также были изолированы из тканей умерших от КЭ людей [Hayasaka et al., 1999; Ternovoi et al., 2007]. Остальные полногеномные последовательности штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа, находящиеся в GenBank, не вошли в анализ, так как штамм Oshima 5-10 (AB062063) был выделен из организма собаки [Hayasaka et al., 1999], штамм 205 (DQ989336) и 178-79 (EF469661) – из клещей [Верета Л.А., Воробьева, 1990; Злобин и др., 2002], а для штамма Senzhang (AY182009) отсутствует информация об источнике изоляции и тяжести вызванного ими заболевания.

При сравнении последовательностей полипротеинов было обнаружено множество мутаций аминокислот, присутствующих в различных штаммах. Большая часть мутаций распределена по всему полипротеину и не характерна для групп штаммов. Однако мутации в 17 положениях полипротеина в большинстве случаев являются одинаковыми для каждой группы штаммов, но различаются между группами (группоспецифичные) (табл. 2).

*Таблица 2.*

Аминокислоты, различающиеся у групп штаммов (группоспецифичные)

		Высоковирулентные штаммы	Низковирулентные штаммы

Белки	№ позиции	S-НО	Glub	P-86	P-89	P-90	Dal	Kav	Svetl	P-212	P-253	P-270	P-332	P-69	P-18
С	32	Q	Q	R	Q	R	Q	Q	Q	R	R	R	R	R	R
	69	K	K	R	K	R	K	K	K	R	R	R	R	R	R
	100	D	D	N	D	N	D	D	D	N	N	N	N	D	N
	111	L	M	-	L	-	L	V	V	-	-	-	-	V	-
prM	267, (155)	A	A	V	A	V	A	A	A	V	V	V	V	V	V
E	743, (463)	V	V	A	V	A	V	V	V	A	A	A	A	A	A
NS1	917, (141)	S	S	G	S	G	S	S	S	S	G	G	G	G	G
NS2B	1466, (108)	F	F	V	F	V	F	F	F	V	V	V	V	F	V
	NS3	1505, (16)	R	R	K	R	K	R	R	R	K	K	K	K	K
NS4B	1534, (45)	S	S	F	S	F	S	S	S	F	F	F	F	F	F
	2354, (95)	M	M	V	M	V	M	M	M	V	V	V	V	M	V
	2438, (179)	V	V	A	V	A	V	V	V	A	A	A	A	V	A
	2472, (213)	A	A	V	A	V	A	A	A	V	V	V	V	V	V
NS5	3145, (634)	S	S	T	S	T	S	S	S	T	T	T	T	T	T
	3188, (677)	G	R	K	R	K	R	R	R	K	K	K	K	K	K
	3203, (692)	I	I	V	I	V	I	I	I	V	V	V	V	V	V
	3235, (724)	A	A	S	A	S	A	A	A	S	S	S	S	S	S

Названия штаммов: «P» означает Primorye, «Dal» – Dalnegorsk, «Kav» – Kavalerovo, «Svetl» – Svetlogorie, «S-НО» – Sofjin-Но, «Glub» – Glubinnoe.

Номера позиций указаны относительно положения в полипротеине. В скобках указано положение относительно начала каждого белка. Позиции с неконсервативными аминокислотными заменами выделены серым цветом, позиция с делецией – темно-серым цветом, позиции с консервативными заменами цветом не отмечены. Желтым цветом отмечены аминокислотные остатки, характерные главным образом для группы высоковирулентных штаммов, голубым – для низковирулентных штаммов.

Из таблицы видно что, в последовательностях низковирулентных штаммов есть характерные мутации, отличающие их от большинства высоковирулентных штаммов. Однако последовательности высоковирулентных штаммов Primorye-86 и Primorye-90 имеют группоспецифичные мутации, характерные для низковирулентных штаммов. Возможно, несоответствие между этими мутациями и тяжестью заболевания обусловлено тем, что данными штаммами были инфицированы пациенты со сниженным иммунным статусом либо имели место дополнительные факторы, приведшие к увеличению тяжести заболевания.

Далее на основе анализа литературных данных мы оценили значимость группоспецифичных мутаций для функций индивидуальных вирусных белков и предположили механизмы изменения вирулентности штаммов.

### **Анализ группоспецифичных замен в белках исследуемых штаммов вируса КЭ**

В белке С присутствуют четыре группоспецифичные мутации. По-видимому, в большей степени на изменение вирулентности штаммов могут повлиять неконсервативная замена  $D_{100} \rightarrow N$  и делеция в положении 111, которые локализованы в трансмембранном домене белка С. Данный участок белка С является также сигнальной последовательностью для переноса в полость ЭПР следующего белка ргМ. От аминокислотного состава сигнальной последовательности зависит эффективность процессинга белков С и ргМ, что в свою очередь является чрезвычайно важным этапом в формировании инфекционных вирусных частиц. Вероятно, обнаруженные группоспецифичные мутации в белке С могут повлиять на четко скоординированный процессинг белков С и ргМ.

В трансмембранных участках данных белков ргМ, Е и NS2В также обнаружены группоспецифичные замены. Эти участки поверхностных белков ргМ и Е важны для формирования правильной структуры внешних доменов данных белков и их димеризации – процесса, необходимого для поддержания правильной конформации оболочечного белка Е. Трансмембранные участки белка NS2В облегчают взаимодействие кофакторной части данного белка с протеазным доменом белка NS3.

Белок NS1 имеет одну неконсервативную замену  $S_{141} \rightarrow G$ . Данная замена находится близко к четвертому консервативному остатку цистеина в положении 144, который вовлечен в процесс олигомеризации данного белка. Возможно, неконсервативная замена способна повлиять на структуру и функции этого белка.

Обе группоспецифичные замены белка NS3 располагаются в последовательности, образующей каталитический домен вирусной протеазы NS2В-NS3. Данный фермент осуществляет процессинг вирусного полипротеина. Наибольший интерес представляет замена  $S_{45} \rightarrow F$ , которая находится возле консервативного участка (46–60 а. о.), окружающего остаток

гистидина, входящего в активный центр этого фермента. Возможно, эта замена способна повлиять на активность протеазы NS2B-NS3.

В белке NS4B присутствуют три консервативные группоспецифичные замены, но наибольшее влияние на вирулентность штаммов, вероятно, способна оказать замена  $M_{95} \rightarrow V$ , так как ранее было показано, что замены в пределах центрального региона белка NS4B. (95–114 а. о. вируса КЭ) приводят к снижению вирулентности флавивирусов [Pletnev et al., 2002; Wang et al., 1995; Wicker et al., 2006].

Все группоспецифичные замены белка NS5 находятся в последовательности, формирующей вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу. Замена  $I_{692} \rightarrow V$  расположена близко к каталитическому центру фермента и, возможно, способна повлиять на его активность. Замена  $A_{724} \rightarrow S$  находится внутри консервативного мотива E, который участвует в формировании пространственной структуры фермента за счет гидрофобных связей с другими аминокислотными остатками. Замена гидрофобного остатка аланина на гидрофильный остаток серина, вероятно, может оказать влияние на структуру и функциональную активность вирусной РНК-полимеразы.

Таким образом, проведенный анализ показал, что многие группоспецифичные мутации находятся в функционально значимых участках вирусных белков, мутации в которых, как экспериментально показано ранее, влияют на вирулентность различных флавивирусов и в том числе вируса КЭ. Поэтому с высокой долей вероятности можно сказать, что найденные группоспецифичные мутации могут быть причиной различной вирулентности исследуемых штаммов. Возможно также, что различная вирулентность штаммов является результатом совместного влияния нескольких аминокислотных мутаций в геноме вируса КЭ.

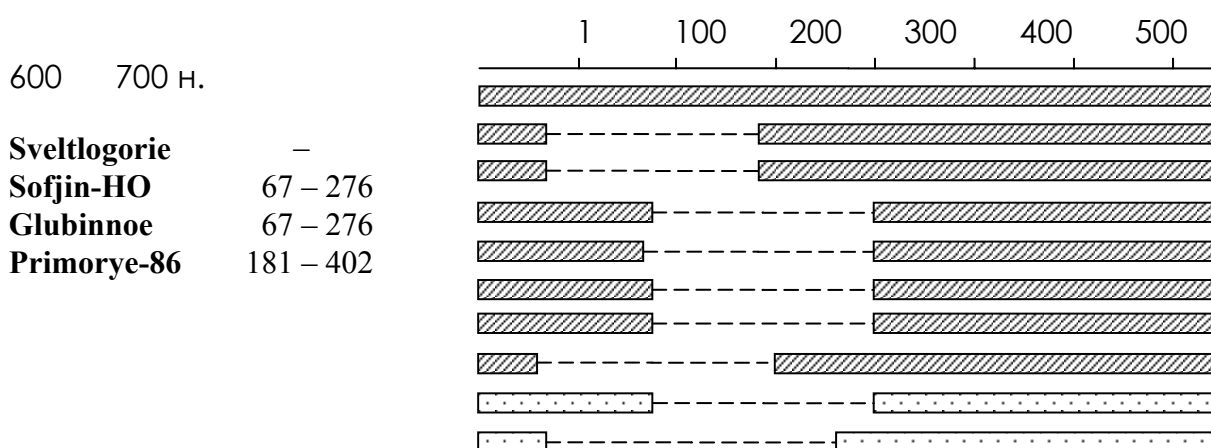
### **Анализ последовательностей и структуры нетранслируемых регионов (НТР) исследуемых штаммов вируса КЭ**

Кодирующую область генома вируса КЭ окружают 5' и 3' некодирующие (нетранслируемые) регионы (НТР), которые необходимы для репликации вирусной РНК, трансляции и формирования новых вирусных частиц [Blackwell J. L., Brinton M. A., 1995].

5'НТР геномов всех исследуемых штаммов содержит 132 н. Последовательности и вторичная структура 5'НТР геномов всех штаммов

практически идентичны, поэтому, вероятно, не существует зависимости между 5'НТР и вирулентностью изучаемых штаммов вируса КЭ.

Длина 3'НТР исследуемых штаммов варьирует и составляет 508 н. (Primorye-86), 502 н. (Primorye-89), 508 н. (Primorye-90), 507 н. (Dalnegorsk), 501 н. (Kavalerovo), 517 н. (Sofjin-НО), 517 н. (Glubinnoe), 729 н. (Svetlogorie), 512 н. (Primorye-212), 446 н. (Primorye-253), 508 н. (Primorye-270), 508 н. (Primorye-332), 726 н. (Primorye-69), 726 н. (Primorye-18). После выравнивания 3'НТР относительно самой протяженной последовательности штамма Svetlogorie, у последовательностей остальных штаммов определилась локализация делеций. (Рис. 1). Из представленного рисунка видно, что размер и положение делеций в 3'НТР не связаны с вирулентностью штаммов. По-видимому, эти делеции у исследуемых штаммов указывают лишь на расположение варибельного региона 3'НТР (с 1 по 404 н. после стоп-кодона относительно штамма Svetlogorie). Анализ вторичной структуры варибельного региона 3'НТР исследуемых штаммов показал, что она не зависит от его протяженности. В варибельном регионе также нет элементов вторичной структуры, отличающих группу низковирулентных штаммов от группы высоковирулентных штаммов. Последовательности корового элемента 3'НТР изучаемых штаммов (последние 325 н. относительно штамма Svetlogorie), напротив, очень консервативны. В них присутствуют четыре группоспецифичные нуклеотидные замены (табл. 3). В зависимости от строения вторичной структуры корового элемента все исследуемые штаммы разделились на три группы (Рис. 2). Структура корового элемента штаммов внутри каждой группы идентична, несмотря на отличия их нуклеотидных последовательностей. В первую группу вошли все низковирулентные штаммы и два высоковирулентных штамма (Primorye-86 и Primorye-90). Вторую группу составили высоковирулентные штаммы Primorye-89, Dalnegorsk и Svetlogorie. Третья группа представлена высоковирулентными штаммами Kavalerovo, Glubinnoe и Sofjin-НО (Рис. 2).



<b>Primorye-89</b>	175 – 402
<b>Primorye-90</b>	181 – 402
<b>Dalnegorsk</b>	180 – 402
<b>Kavalerovo</b>	58 – 285
<b>Primorye-212</b>	184 – 401
<b>Primorye-253</b>	61 – 344
<b>Primorye-270</b>	181 – 402
<b>Primorye-332</b>	181 – 402
<b>Primorye-69</b>	187 – 189
<b>Primorye-18</b>	187 – 189

Рис. 1. Схема 3'НТР геномов исследуемых штаммов вируса КЭ.

Прямоугольники, заштрихованные диагональными линиями, означают последовательности высоковирулентных штаммов, а прямоугольники, заполненные точками – последовательности низковирулентных штаммов. Пунктирные линии означают делеции. Названия штаммов и районы делеций (нумерация от начала 3'НТР) показаны слева.

Таблица 3.

Нуклеотиды 3'НТР, различающиеся у групп штаммов.

№ поз., н.	Высоковирулентные штаммы								Низковирулентные штаммы					
	S-НО	Glub	P-86	P-89	P-90	Dal	Kav	Svetl	P-212	P-253	P-270	P-332	P-69	P-18
428	A	A	G	A	G	A	A	A	G	G	G	G	G	G
477	C	C	C	C	C	C	C	C	U	U	C	U	U	U
485	C	C	U	C	U	C	A	A	U	U	U	U	U	U
534	G	G	C	G	C	G	G	G	A	A	C	A	A	A

Названия штаммов: «P» означает Primorye, «Dal» – Dalnegorsk, «Kav» – Kavalerovo, «Svetl» – Svetlogorie, «S-НО» – Sofjin-НО, «Glub» – Glubinnoe.

Номера позиций указаны относительно начала 3'НТР штамма Svetlogorie. Желтым цветом отмечены нуклеотиды, характерные главным образом для группы высоковирулентных штаммов, голубым – для низковирулентных штаммов.

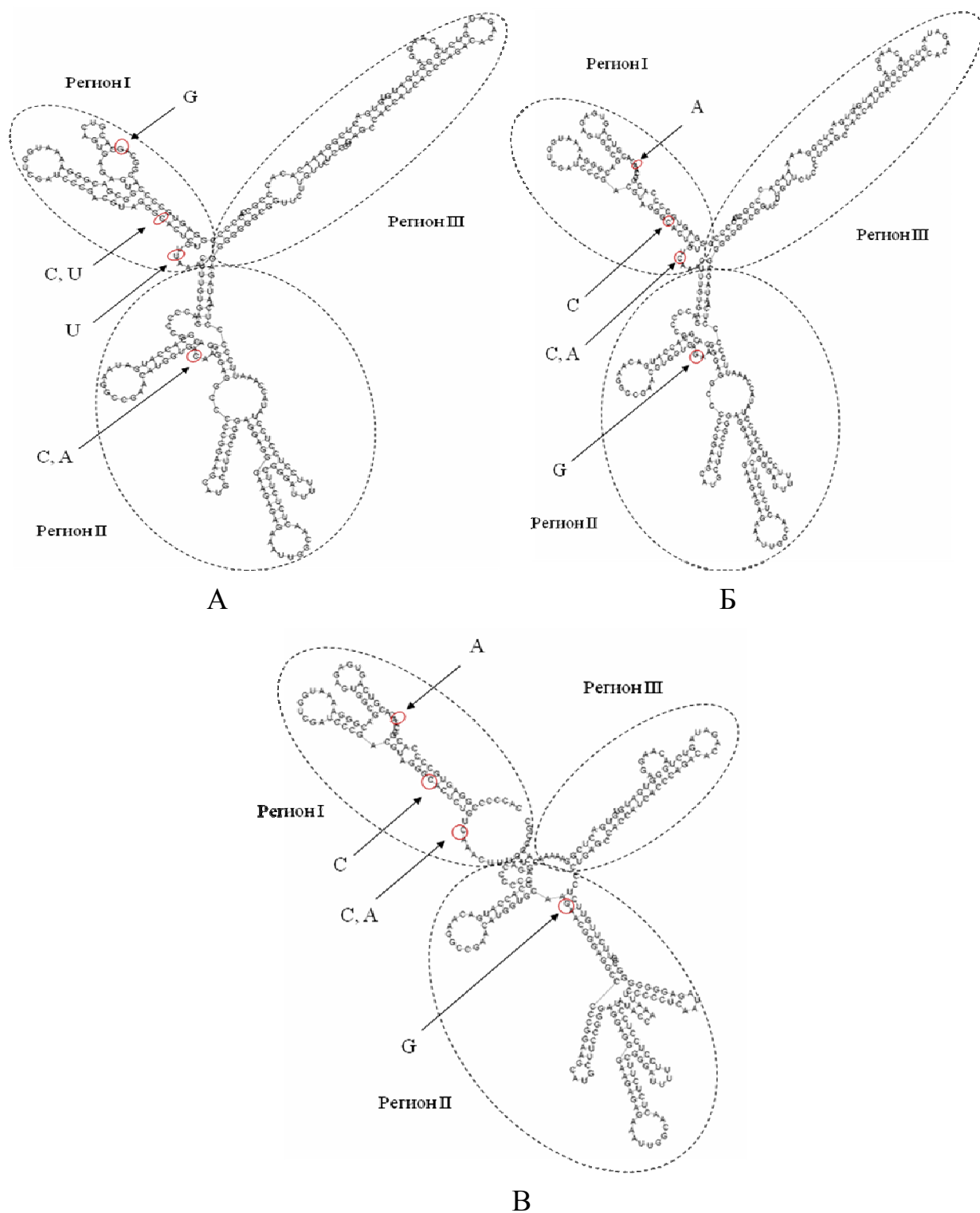


Рис. 2. Модели вторичной структуры корового элемента 3'НТР исследуемых штаммов. А – структура, сформированная последовательностями штаммов Primorye-86, Primorye-90, Primorye-212, Primorye-270, Primorye-253 и Primorye-332 и Primorye-18; Б – структура, сформированная последовательностями штаммов Kavalerovo, Glubinnoe и Sofjin-NO; В – структура, сформированная последовательностями штаммов Primorye-89, Dalnegorsk и Svetlogorie. Стрелками показаны группоспецифичные нуклеотидные замены. Пунктирными линиями выделены участки структуры, формирующие Регионы I, II и III корового элемента 3'НТР.

Из рисунка 2 видно, что первая группоспецифичная замена ( $A_{428} \rightarrow G$ ) приводит небольшому изменению строения шпильки региона I корового элемента. Вторая, третья и четвертая группоспецифичные замены не оказывают влияния на форму элементов вторичной структуры. Так как вторичные структуры, формируемые последовательностями коровых элементов 3'НТР высоко- и низковирулентных штаммов отличаются незначительно, можно предположить, что на вирулентность штаммов они не оказывают влияния.

### **Филогенетический анализ кодирующих последовательностей геномов штаммов вируса клещевого энцефалита**

На основе нуклеотидных последовательностей кодирующих областей геномов штаммов, определенных в данной работе и последовательностей других штаммов вируса КЭ, находящихся в базе данных GenBank, были построены филогенетические деревья. Деревя, построенные методом объединения ближайших соседей и методом максимального правдоподобия (Рис. 3) имеют идентичную топологию.

Из представленного рисунка видно, что штаммы дальневосточного и европейского субтипов с высокой степенью достоверности формируют отдельные монофилетические группы (клады), а штаммы сибирского субтипа представляют полифилетическую группу.

Штаммы, последовательности которых анализируются в данной работе, а также другие штаммы дальневосточного субтипа, образуют единую кладу. Топология филогенетического дерева указывает на то, что все штаммы дальневосточного субтипа имеют общего предка, причем высокая вирулентность является предковым состоянием признака по отношению к низкой вирулентности. В пределах группы дальневосточного субтипа большинство высоковирулентных штаммов в отличие от низковирулентных штаммов образуют две клады. Вероятно, большая генетическая гетерогенность группы высоковирулентных штаммов обусловлена их циркуляцией на географически более удаленных территориях Приморского края, чем низковирулентных штаммов [Леонова и др., 2007]. Нахождение высоковирулентных штаммов Primorye-86 и Primorye-90 внутри группы, образуемой низковирулентными штаммами, вероятно, можно объяснить тем, что данными штаммами были инфицированы пациенты со сниженным



иммунным статусом либо имели место дополнительные факторы, приведшие к увеличению тяжести заболевания.

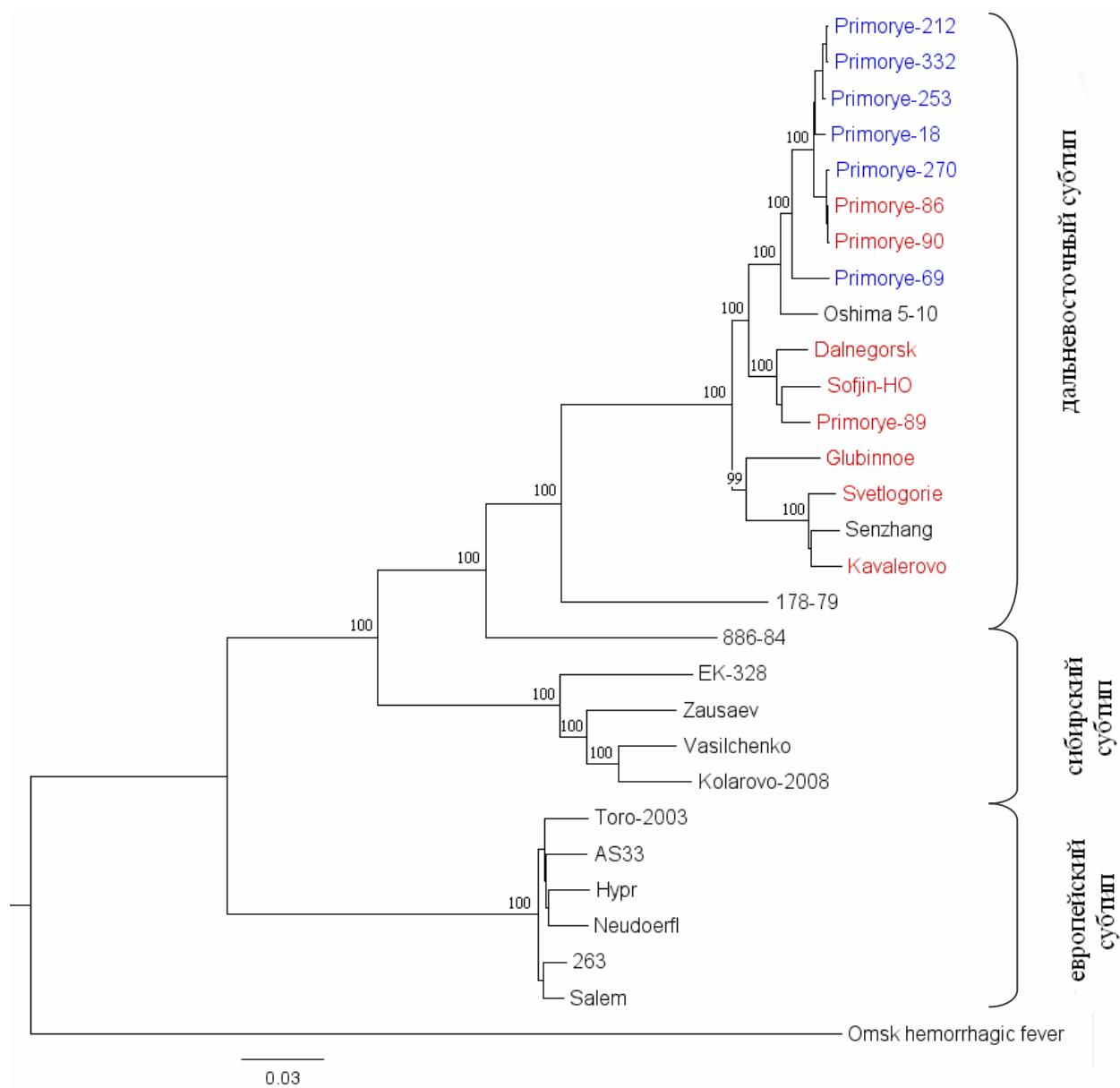


Рис. 16. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) на основе анализа нуклеотидных последовательностей кодирующих областей геномов штаммов вируса КЭ. В качестве аутгруппы был взят вирус Омской геморрагической лихорадки (AY438626). Красным цветом выделены штаммы, изолированные от людей, умерших от КЭ, синим – штаммы, выделенные от лиц с инаппарантной инфекцией. Масштабная линия отражает генетическую дистанцию, которая соответствует трем заменам на 100 н.

## **ВЫВОДЫ**

1. Определены последовательности полных геномов 6 высоковирулентных и 6 низковирулентных для людей штаммов вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа, которые выделены от пациентов, инфицированных на территории Приморского края России.
2. Аминокислотная последовательность исследованных низковирулентных штаммов отличается от последовательности большинства высоковирулентных штаммов наличием мутаций в 17-и позициях полипротеина (группоспецифичные мутации). В последовательности 3'-нетранслируемого региона найдено четыре группоспецифичные нуклеотидные замены.
3. Большая часть группоспецифичных аминокислотных мутаций находится в участках вирусных белков, имеющих большое значение для жизнеспособности и свойств флавивирусов, и поэтому, данные мутации могут явиться причиной различной вирулентности исследуемых штаммов.
4. Между вирулентностью исследованных штаммов и структурой нетранслируемых регионов их геномов четкой взаимосвязи не выявлено.
5. Филогенетический анализ показал, что низковирулентные штаммы и большинство высоковирулентных штаммов образуют отдельные клады внутри группы дальневосточного субтипа. Высокая вирулентность является предковым состоянием признака по отношению к низкой вирулентности.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Беликов С. И., Леонова Г. Н., Кондратов И. Г., Романова Е. В., Павленко Е. В. Анализ полногеномных последовательностей штаммов дальневосточного субтипа вируса клещевого энцефалита, обладающих различной нейровирулентностью для человека // Бюллетень СО РАМН. 2007. № 4 (126). С. 22–28.
2. Беликов С. И., Леонова Г. Н., Кондратов И. Г., Романова Е. В. Павленко Е. В. Анализ геномов штаммов вируса клещевого энцефалита различной патогенности // Четвертая международная конференция, посвященная 85-летию Санкт-Петербургского НИИЭМ имени Пастера и 120-летию Парижского института Пастера: тез. докл. Санкт-Петербург. 2–4 июня 2008. С. 88.
3. Беликов С. И., Леонова Г. Н., Кондратов И. Г., Романова Е. В. Павленко Е. В. Сравнение геномов штаммов вируса клещевого энцефалита, вызвавших различную тяжесть заболевания // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов: тез. докл. Новосибирск. 11–15 мая 2008. С. 483.
4. Romanova E. V., Belikov S. I., Kondratov I. G., Pavlenko E. V., Leonova G. N. Whole genome analysis of Tick-Borne Encephalitis viruses isolated from people with different clinical outcomes // X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases: abstracts. Weimar, Germany. 19–21 March 2009. P.56.
5. Беликов С. И., Леонова Г. Н., Кондратов И. Г., Романова Е. В. Павленко Е. В. Кодированные нуклеотидные последовательности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированные из крови людей без клинических проявлений инфекции // Генетика. 2010. № 46(3). С. 356–363.
6. Romanova E. V., Belikov S. I., Kondratov I. G., Pavlenko E. V., Leonova G. N. Dependence of clinical outcome on genome content of tick-borne encephalitis virus // Viruses and innate immunity workshop: abstracts. Dublin. Ireland. 5–7 May 2010. P. 106.
7. Беликов С. И., Леонова Г. Н., Кондратов И. Г., Романова Е. В. Павленко Е. В. Анализ геномов штаммов вируса клещевого энцефалита, обладающих различной вирулентностью для человека // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 3. С. 23–26.