

УДК: 578.833.26 : 575.113

Анализ кодирующей части генома вируса клещевого энцефалита

Демина Т. В., Злобин В. И., Верховина М. М., Очирова Л. А., Батомункуев А. С., Чхенкели В. А.

Проведен анализ кодирующих последовательностей генома вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), депонированных в международный банк данных (GenBank). При сопоставлении полипротеиновых структур 113 штаммов ВКЭ, изолированных из разных очагов Европы и Азии, выявлены генотипспецифические сочетания аминокислотных замен. Показано, что штаммы *Buzuuchuk* из Киргизии и 178—79 из России (Восточная Сибирь) имеют уникальные геномные структуры.

Ключевые слова: КЭ, ВКЭ, генотип, генетическая вариабельность, полипротеин, аминокислотные замены.

Analysis of the tick-borne encephalitis virus coding sequences

Demina T. V., Zlobin V. I., Verhozina M. M., Ochirova L. A., Batomunkuev A. S., Chxenkeli V. A.

We have conducted an analysis of tick-born encephalitis virus (TBEV) coding sequences that are available via international data bank (GenBank). Upon comparison of polyprotein structures of 113 TBEV strains from various sites from Europe and Asia we have detected genotype-specific combinations of amino acid substitutions. It was shown that strains *Buzuuchuk* from Kyrgyzstan and 178—79 from Russia (Eastern Siberia) have unique genomic structures.

Keywords: TBE, TBEV, genotype, genetic variability, polyprotein, amino acid substitutions

Введение

Вирус клещевого энцефалита, передающийся через укусы иксодовых клещей, является причиной тяжелой нейроинфекции, поражающей население более чем 25 стран северной Евразии, включая большую часть

территории России [5, 10]. С сентября 2012 года клещевой энцефалит (КЭ) включен в список заболеваний, подлежащих регистрации в Европейском Союзе [5].

Для понимания функционирования природных очагов КЭ, клинических особенностей заболевания, совершенствования средств диагностики, противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий необходим регулярный мониторинг его возбудителя, важной составляющей которого является молекулярно-генетический анализ штаммов и изолятов вирусной РНК.

В соответствии с официально принятой классификацией, признано существование вида — вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) и трех его представительных и эпидемически значимых субтипов: дальневосточного, сибирского и европейского. Эти подтипы вируса соответствуют трем одноименным генотипам [3]: 1 — (дальневосточный с прототипным штаммом *Sofjin*); 2 — (западный, штамм *Neudoerfl*) и 3 — (сибирский или урало-сибирский, штамм *Vasilchenko*). Однако есть основания полагать, что официально признанная внутривидовая классификация ВКЭ не является окончательной. Так, одни исследователи считают, что следует различать не один, а три вида ВКЭ [1], а другие предлагают понизить до уровня подвида ВКЭ некоторые официально признанные виды вирусов из комплекса КЭ [6]. Кроме того, нами установлено наличие в природе и других генетических вариантов вируса (генотипы 4 и 5) [2, 3], что само по себе, и вне зависимости от того, какую роль они играют в эпидемиологии КЭ, указывает на необходимость пересмотра классификационной схемы ВКЭ.

Таким образом, изучение генетической variability возбудителя диктуется не только напряженностью эпидемической ситуации в отношении КЭ и разнообразием его проявлений на разных территориях, но также противоречивостью предлагаемых классификационных схем и необходимостью уточнения таксономического статуса вируса КЭ.

Цель исследования

Цель представляемого исследования — оценка генетической variability и выявление генотипспецифических маркеров ВКЭ на основе анализа материалов международной базы данных (GenBank).

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили кодирующие полногеномные структуры, фрагменты генома штаммов и изолятов РНК вируса КЭ, депонированные в GenBank по состоянию на сентябрь 2014 года, а также полногеномные структуры вируса ОГЛ (*OHF*) и штамма ВКЭ *Soffin* [4].

Метод исследования: компьютерный анализ с помощью программы MEGA [7].

Результаты и обсуждение

Первая полногеномная структура ВКЭ была расшифрована в 1988 году (штамм *Neudoerfliz* Австрии), а депонирована в GeBank в 1996 г. По данным на сентябрь 2014 г. в международном банке (GenBank) зарегистрированы полногеномные последовательности 113 штаммов вируса КЭ, изолированных из разных частей его обширного ареала (таблица 1). Примечательно, что около половины последовательностей (56 или 48,7 %), депонированы в 2013 и 2014 годах (до октября 2014 года).

Таблица 1 — Генотипическая принадлежность штаммов ВКЭ с расшифрованными полногеномными последовательностями (на сентябрь 2014 г.)

| Страны | генотипы | | | | | всего |
|---|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Россия | 58 | 2 | 13 | 1 | 1 | 75 |
| Азия | | | | | | |
| Киргизия, Монголия, Китай, Южная Корея Япония | - - 6 - 2 | - - - 2 - | 1 1 - - - | - - - - - | - - - - - | 12 |
| Европа | | | | | | |
| Германия, Австрия, Чешская Республика, Словения, Словакия Эстония Латвия Норвегия, Швеция, Финляндия | - - - - - | 16 1 - 6 - | - 2 1 - - | - - - - - | - - - - - | 26 |
| всего | 66 | 27 | 18 | 1 | 1 | 113 |

Наибольшая часть этих штаммов (числом 66) относится к генотипу 1 ВКЭ, 27 — к генотипу 2, 18 — к генотипу 3 (рисунок 1). Места их изоляции указаны в табл. 1. Остальные 2 штамма, причем выделенные в одном и том же природном очаге на территории России - в Эхирит-Булагатском районе

Иркутской области, являются представителями генотипа 4 (штамм 178-79, выделен от клещей *I.persulcatus*) и 5 (штамм 886-84, изолированный от грызуна).

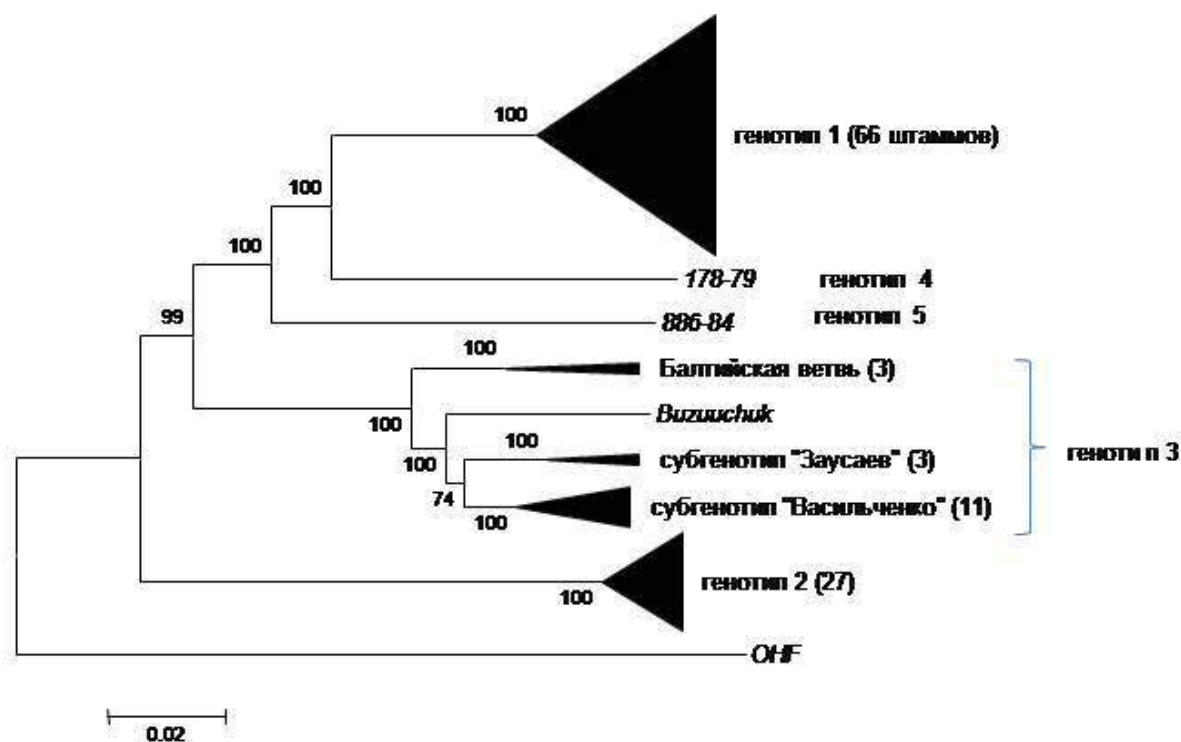


Рисунок 1 — Сопоставление 113 полногеномных структур штаммов ВКЭ с помощью компьютерной программы MEGA [7]

Большая часть полных нуклеотидных последовательностей генотипа 1 (около 40) установлена С.И. Беликовым и соавторами. Эта группа исследователей целенаправленно осуществила сравнительный анализ полных геномов штаммов ВКЭ генотипа 1, различающихся по патогенным свойствам. Ими установлено, что внутри дальневосточного генотипа (авторы именуют его субтипом) между группами штаммов различной вирулентности (выделенных из крови больных с инapparантной формой заболевания и из мозга умерших от КЭ с очаговой формой) 17 из 3414 аминокислотных остатков (около 0,5%) соотносятся с изменением патогенности в организме человека [8]. В капсидном белке длиной 112 а.о. у ряда штаммов имеется существенная замена в виде делеции аминокислоты в предпоследней позиции (111). По мнению авторов, эта делеция в совокупности с другими заменами, расположенными как в белке С, так и в неструктурных белках NS3 и NS5 может уменьшить вирулентность ВКЭ, приводя к образованию дефектных частиц. Заметим, что наличие в геноме ВКЭ такой делеции обнаружено только у штаммов генотипа 1 и все они (числом 21),

изолированы на территории Приморья. Их инвентарные номера: AY169390, GQ228395, EU816450- EU816452, EU816455, FJ997899, JQ825144-JQ825146, JQ825148, JQ825152, JQ825153 и JQ825157-JQ825164 (Genbank). При построении филогенетических деревьев на основе разных фрагментов генома эти штаммы четко группируются в единый кластер (данные не показаны).

Из представителей дальневосточного генотипа, не имеющих описанной делеции, наиболее интересен штамм *Shkotovo-94* (выделен на Дальнем Востоке в 1994 из крови человека), который меняет местоположение на разных филогенетических схемах внутри кластера своего генотипа, примыкая то к группе штаммов с той же делецией, то к другой группе. При сравнении полипротеиновых структур оказалось, что в позиции 108 белка С у штамма *Shkotovo-94* (инв. номер в GenBank JQ825147) расположен аланин (А) так же, как у штамма *Buziuchuk* (KJ626343) генотипа 3 и штамма 886-84 (EF496662) — прототипа генотипа 5. Ранее эта замена была установлена как строго специфическая для генотипа 5 [2]. С.И. Беликов и др. [8] отмечают, что штамм *Shkotovo-94* образует отдельную ветвь филогенетического древа между штаммами, выделенными от больных с энцефалитной формой заболевания (ЭФЗ), и штаммами от больных с субклинической формой заболевания (СФЗ). Этот штамм отличается от штаммов ЭФЗ наличием ключевых аминокислот в позициях 16 К (аминокислота лизин) и 45F (фенилаланин) в вирусной протеазе NS3, которые характерны для штаммов СФЗ. По мнению С.И.Беликова и др. именно эти замены - 16К и 45F в вирусной протеазе NS3 — способствуют уменьшению патогенности штаммов дальневосточного субтипа.

Активные перестройки (перемена местоположения) при сопоставлении филогенетических схем, построенных на основе полных геномных структур (ПГС) и на основе разных генов, наблюдаются внутри кластера генотипа 2 (данные не показаны). Это указывает на их очень близкое родство. Весьма вероятно, что причина таких тесных взаимоотношений кроется в длительной эволюционной истории генотипа 2 и существовании на сравнительно более ограниченной, чем весь остальной ареал ВКЭ, территории. По нашему мнению, это также свидетельствует в пользу гипотезы о том, что рекомбинация у ВКЭ, возможно, не редкое событие [2]. Вероятно, наличием более ограниченного ареала сравнительно с генотипами 1 и 3, объясняется и тесное родство генотипа 2 ВКЭ с представителями комплекса КЭ — вирусами турецкого и испанского энцефалитов овец, а также, шотландского энцефаломиелита овец, ареалы которых перекрываются с ареалом ВКЭ. Так, шотландский энцефаломиелит регистрируется во многих европейских

странах, хотя чаще встречается в Шотландии, северной Англии и Ирландии, где отсутствуют природные очаги КЭ. В то же время, на фоне этих рассуждений неожиданным представляется следующий факт. При сопоставлении фрагментов гена E длиной 1419 н.о. (позиции с 37 по 1455) выявляется 100% гомологии между последовательностями четырех штаммов, изолированных на территории России (3) и Беларуси (1). Это алтайский штамм 84.2 (изолирован от клещей *I.persulcatus* в 2007 г. (HM120875)), два штамма из Иркутской области — *Irkutsk-118-71* и *Irkutsk-134-71* (*Citellus undulates* — суслик длиннохвостый), 1971 (FJ214154 и FJ214155) и белорусский штамм 265 (*I.ricinus*, 1940 (GU125718 и AF091014)). Как видим, очаги изоляции гомологичных последовательностей располагаются на значительном удалении друг от друга (например, от Беларуси до Алтая не менее четырех тысяч км.).

При сравнении полипротеиновых структур всех 113 исследуемых штаммов наибольшее количество строго консервативных генотипспецифических аминокислотных замен выявлено для представителей генотипа 2, а именно 63, в то время, как для штаммов генотипа 1 и 3 установлено по 22 таких замены. Это еще одно свидетельство высокой генетической однородности представителей генотипа 2.

При сравнительном анализе полногеномных структур (рис.1) и полного гена E (данные не показаны) представителей генотипа 3, все исследуемые нуклеотидные последовательности, кроме одной, четко разделились на три кластера, соответствующих Балтийской ветви и субгенотипам «Васильченко» и «Заусаев» Сибирской ветви. Исключение составил штамм *Viuziuchuk*. Этот штамм был выделен В.И.Злобиным в 1985 г. в Киргизии (хозяин: клещ *I. persulcatus*) и изучен по ряду маркеров [3]. Полная геномная структура депонирована в GenBank за номером KJ626343 Е.В. Чаусовым и др.

Балтийскую и Сибирскую ветви в пределах сибирского субтипа (или генотипа 3) можно различать благодаря позициям 175 и 313 в белке E [9]. Аспарагин (N) в позиции 175 характерен для балтийских штаммов из Эстонии, Латвии, Финляндии и европейской части России, а аланин (A) в позиции 313 — для сибирских и дальневосточных штаммов. В свою очередь Сибирскую ветвь можно подразделить на субгенотипы «Васильченко» и «Заусаев», представители которых на филогенетических деревьях образуют отдельные группы, так как в значительной мере отличаются по нуклеотидному составу. Оказалось, что у штамма из Киргизии в значимых позициях белка E 175 и 313 те же замены, что и у балтийской группы, но по

нуклеотидному составу *Vizuiichuk* ближе к сибирской ветви генотипа 3. Кроме того, при анализе полной аминокислотной последовательности штамма из Киргизии, обнаружилось 7 аминокислотных замен, не характерных для остальных штаммов генотипа 3 (таблица 2).

Таблица 2 — Аминокислотные замены у штамма *Vizuiichuk*, не характерные для генотипа 3

| замена | Генотип, для которого характерна замена | Белок (позиция) | Позиция по полипротеину |
|--------|---|-----------------|-------------------------|
| T→A | 5 | C (108) | 108 |
| T→S | 2 | E (431) | 711 |
| E→D | 1,2 | NS3 (347) | 1836 |
| R→K | 2 | NS3 (605) | 2094 |
| T→A | 2 | NS5 (112) | 2623 |
| K→R | 2,5 | NS5 (424) | 2935 |
| E→N | 2 | NS5 (527) | 3038 |

Отдельного внимания заслуживает западносибирский штамм 1528 генотипа 3 (изолирован от клеща *I.persulcatus* в Новосибирской области (в Академгородке г.Новосибирска) в 1999 г. С.Е.Ткачевым и В.Н.Бахваловой (EF469758 (2007) и JN542645 (2011)), у которого в позиции E175 располагается аспарагин, как у всех известных штаммов Балтийской ветви. По нуклеотидному составу штамм является типичным представителем Балтийской ветви генотипа 3 и пока единственным, обнаруженным на территории Сибири. Про аминокислоту в позиции 313 по белку E ничего неизвестно, т.к. депонированная последовательность фрагмента гена E (EF469758) короткая (542 н.о.) и не перекрывает триплет, соответствующий этому аминокислотному сайту.

В 2012 году при сравнительном анализе полных аминокислотных последовательностей 32 штаммов вируса, относящихся к разным генотипам, было установлено, что определенное сочетание аминокислот в 22 позициях, расположенных по всему полипротеину, является генотипспецифическим маркером ВКЭ [2]. Анализ полипротеинов 113 штаммов подтвердил правомочность этого вывода и показал, что аминокислоты в 9 из этих 22 сайтов являются строго консервативными для трех основных генотипов (таблица 3).

Таблица 3 — Отличия между генотипами ВКЭ, выявленные при сравнении 113 полипротеиновых структур

| Белок | C | E | NS1 | NS2A | NS3 | NS4B | NS5 |
|-------|---|---|-----|------|-----|------|-----|
|-------|---|---|-----|------|-----|------|-----|

| | | | | | | | | | |
|------------------------|---|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| № а.о. по полипротеину | 3 | 486 | 830 | 1255 | 1303 | 1865 | 2287 | 2355 | 2529 |
| № а.о. по белку | 3 | 206 | 54 | 127 | 175 | 376 | 28 | 96 | 18 |
| генотип 1 (66 штаммов) | G | S | T | A | L | I | E | A/R | G |
| генотип 2 (27) | K | V | S | D/E | C | A | S | T | N |
| генотип 3 (18) | R | L | N | G | I/F | V | G | S | S |
| генотип 4 (1) | R | S | T | G | L | V | G | A | S |
| генотип 5 (2) | R | L | N | S | L | V | G | A | S |

Примечание: Цвет ячейки с аминокислотным остатком указывает на соответствие штаммов ВКЭ одному из 5 генотипов, обозначенных в первом столбце

Для штаммов 178-79 и 886-84, представляющих генотипы 4 и 5, сочетания аминокислот в указанных позициях отличаются от наборов, характерных для трех основных генотипов. Кроме геномной структуры штамма 178-79 во всемирном банке данных нет ни одной последовательности, относящейся к генотипу 4. Что касается генотипа 5, то он постоянно пополняется новыми представителями. Кроме полной геномной структуры прототипного штамма 886-84, на сегодня зарегистрированы гомологичные ей последовательности фрагментов генома 10 штаммов ВКЭ, выделенных от клещей и грызунов, на территориях Забайкальского Края (JN936350, JN936353, JN936355, KF956068, KF956069 и KF956071) и Республики Бурятия (JN936341, JN936347 и EU878283, JN936349 и EU878281, JN936354 и EU878282). Депонирован также фрагмент последовательности вирусной РНК, изолированный из посмертного образца ткани мозга человека, умершего в 2008 г. от КЭ в Монголии (HM133639).

Выводы

Имеющиеся в международном банке данных GenBank нуклеотидные последовательности ВКЭ относятся к одному из 5 известных генотипов. Три генотипа являются основными, т.к. признаны официально и имеют широкое распространение. В 9 позициях, распределенных по всему полипротеину, для каждого из трех основных генотипов выявлены специфические сочетания консервативных аминокислотных замен.

В природных очагах КЭ, расположенных на территории России, выявляется наибольшее генетическое разнообразие ВКЭ. Здесь обнаружены представители почти всех известных генетических вариантов возбудителя.

Штамм *Vuziushuk* из Киргизии оказался «нетипичным» представителем генотипа 3, так как не вписывается в схему дифференциации на три

субкластера — Балтийскую ветвь и субгенотипы «Васильченко» и «Заусаев» Сибирской ветви.

Штамм 178-79 является единственным известным представителем генотипа 4. Вероятно, оригинальность структуры его генома заключается в комбинировании локусов, характерных для трех основных генотипов ВКЭ.

Выявление типичного представителя Балтийской ветви (штамма 1528) на не характерной для него территории — в Сибири, свидетельствует о недостаточности наших знаний о географическом распространении генетических вариантов вируса КЭ.

Литература

1. Вотяков В. И., Злобин В. И., Мишаева Н. П. Кleshchevye энцефалиты Евразии. Новосибирск : Наука, 2002. 438 с.
2. Демина Т. В. Вопросы генотипирования и анализ генетической вариабельности вируса клещевого энцефалита : дис. ... д-ра биол. наук. М., 2013. 248 с.
3. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита / В. И. Злобин, С. И. Беликов, Ю. П. Джигоев [и др.]. Иркутск : РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. 271 с.
4. Плетнев А. Г., Ямщиков В. Ф., Блинов В. М. Нуклеотидная последовательность генома и полная аминокислотная последовательность полипротеина вируса клещевого энцефалита // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15, № 11. С. 1504—1521.
5. Amato-Gauci A. J., Zeller H. Tick-borne encephalitis joins the diseases under surveillance in the European Union // Euro Surveill. 2012. 17(42):pii=20299. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20299>, accessed 15.10.2014.
6. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy / G. Grard, G. Moureau, R.N. Charrel R.N. [et al.] // Virology. 2007. Vol. 361. P. 80—92.
7. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar // Mol. Biol. Evol. 2007. Vol. 24. P. 1596—1599.
8. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Strains and Their Pathogenic Properties / S. I. Belikov, I. G. Kondratov, U. V. Potapova, G. N. Leonova // PLoS ONE. 2014. Vol. 9, issue 4: e94946. doi:10.1371/journal.pone.0094946

9. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype / I. Golovljova, O. Katargina, J. Geller [et al.] // *Int. J. Med. Microbiol.* 2008. Vol. 298. P. 108—120.
10. World Health Organization (WHO). Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2011; 86:241—56; PMID:21661276.

Literature

1. Votyakov V. I., Zlobin V. I., Mishaeva N. P. *Kleshhevyee'ncefalityEvrazii.* Novosibirsk : Nauka, 2002. 438 s.
2. Demina T. V. *Voprosy genotipirovaniya i analiz geneticheskoy variabel'nosty virusa kleshhevogo'ncefalita* : dis. ... d-ra biol. nauk. M., 2013. 248 s.
3. *Molekulyarnaya epidemiologiya kleshhevogo'ncefalita* / V. I. Zlobin, S. I. Belikov, Yu. P. Dzhioev [i dr.]. Irkutsk : RIO VSNC SO RAMN, 2003. 271 s.
4. Pletnev A. G., Yamshnikov V. F., Blinov V. M. *Nukleotidnaya posledovatel'nost' genoma i polnaya aminokislota posledovatel'nost' poliproteina virusa kleshhevogo'ncefalita* // *Bioorgan. khimiya.* 1989. T. 15, № 11. S. 1504—1521.
5. Amato-Gauci A. J., Zeller H. Tick-borne encephalitis joins the diseases under surveillance in the European Union // *Euro Surveill.* 2012. 17(42):pii=20299. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20299>, accessed 15.10.2014.
6. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy / G. Grard, G. Moureau, R.N. Charrel R.N. [et al.] // *Virology.* 2007. Vol. 361. P. 80—92.
7. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* 2007. Vol. 24. P. 1596—1599.
8. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Strains and Their Pathogenic Properties / S. I. Belikov, I. G. Kondratov, U. V. Potapova, G. N. Leonova // *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9, issue 4: e94946. doi:10.1371/journal.pone.0094946
9. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype / I. Golovljova, O. Katargina, J. Geller [et al.] // *Int. J. Med. Microbiol.* 2008. Vol. 298. P. 108—120.

10. World Health Organization (WHO). Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2011; 86:241—56; PMID:21661276.