

УДК 578.833:57.063.8:575.224.234

АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ОБЛАДАЮЩИХ РАЗЛИЧНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА

С.И. Беликов¹, Г.Н. Леонова², И.Г. Кондратов¹, Е.В. Романова¹, Е.В. Павленко²¹ Лимнологический институт СО РАН (664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3),² НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1)*Ключевые слова:* вирус клещевого энцефалита, геном, секвенирование.

Штаммы вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа способны вызывать заболевание различной тяжести. Для определения связи между тяжестью заболевания и структурой генома вируса были определены полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов, выделенных как от умерших людей (высоковирулентные штаммы), так и от лиц, у которых отсутствовали симптомы заболевания (инаппарантные штаммы). Выявлено, что эти две группы штаммов вируса находятся на филогенетическом древе в разных кластерах. Кроме того, группы этих штаммов различаются по наличию 19 группоспецифичных мутантных сайтов в вирусных белках. Четыре мутации приводят к существенному изменению свойств аминокислотных остатков и, вероятно, являются ключевыми, определяющими патогенность штамма.

Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из наиболее значимых природно-очаговых вирусных инфекций, переносимых клещами в лесной зоне Евразийского континента. Заболевание регистрируют более чем в 25 странах Европы и 7 странах Азии. В Российской Федерации КЭ встречается на 46 административных территориях, в том числе на 18 территориях Сибири и Дальнего Востока. Известно, что клиническое течение заболевания существенно различается по регионам. Так, в европейской части субконтинента КЭ зачастую протекает в виде двухволновой лихорадки, в Сибири преобладают лихорадочные и менингеальные формы, а на Дальнем Востоке чаще, чем в других регионах, регистрируют очаговые формы заболевания. Летальность в разных регионах также варьирует в очень широком диапазоне – от 0,03 до 20–35 % с максимальными показателями на Дальнем Востоке. Разную степень тяжести заболевания можно объяснить различиями в субтипах вируса. Однако было показано, что прямой корреляции между субтипом вируса, его вирулентностью и тяжестью КЭ не существует. Так, некоторые варианты вируса дальневосточного субтипа могут вызывать легкие формы заболевания, а варианты сибирского субтипа – тяжелые случаи КЭ, приводящие к гибели больных [1, 2]. Определение субтипа вируса, получившее распространение в последнее время, представляет интерес в теоретическом плане для изучения эволюции вирусной популяции.

В данной работе на большой выборке проведен сравнительный анализ полногеномных последовательностей штаммов вируса КЭ, выделенных от людей с различной тяжестью заболевания, с целью по-

иска связи мутаций в геноме с вирулентностью возбудителя для человека.

Материал и методы. Исследованы 9 штаммов, изолированных от больных КЭ, заражение которых произошло на территории Приморского края. Штаммы Primorye-18, Primorye-69, Primorye-212, Primorye-253, Primorye-270 и Primorye-332 были изолированы на 2–3-й день после «укуса» клеща в лесной зоне юга Дальнего Востока из крови людей, у которых не было зарегистрировано клинически выраженного энцефалита – так называемые инаппарантные штаммы. Штаммы Primorye-94, Dalnegorsk, Kavalerovo были изолированы из мозга умерших от КЭ (высоковирулентные штаммы).

Изоляцию вируса проводили на двухсуточных неинбредных белых мышах, которых заражали внутримозговым и подкожным способами 10 %-ной суспензией мозга умерших от КЭ, а также кровью людей после укуса клеща. В работе использовали штаммы 5–8-го пассажей.

Суммарную РНК выделяли из головного мозга больных мышей-сосунков с помощью набора «РибоЗоль-А» («АмплиСенс», Россия) согласно протоколу изготовителя. Препараты суммарной РНК хранили после выделения в виде суспензии в 50 %-ном изопропанолу при –20 °С.

Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора «Реверта-L-100» («АмплиСенс», Россия) согласно протоколу изготовителя. Амплификацию фрагментов ДНК выполняли с помощью 22 пар праймеров на амплификаторе DNA Engine DYAD (MJ Research, США). Условия амплификации: плавление комплекса – 95 °С, 30 с, отжиг праймеров – 58 °С, 5 с, элонгация ДНК – 72 °С, 40 с (количество циклов – 35). Реакцию осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 65 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 10 пмоль каждого праймера, 0,5 ед. Taq-полимеразы, 0,2 mM каждого dNTP и 0,1–2 мкл препарата кДНК. Амплифицированные фрагменты ДНК визуализировали электрофорезом в геле 0,8 % агарозы с добавлением бромистого этидия в ультрафиолетовом освещении с длиной волны 360 нм. Ампликоны из геля выделяли методом вымораживания посредством нескольких циклов замораживания–оттаивания.

Терминирующие реакции проводили с помощью набора Genome Lab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, США) согласно протоколу производителя.

Получение продуктов терминирующих реакций осуществляли на секвенаторе CEQ-8800 (Beckman Coulter, США). Анализ полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью пакета программ BioEdit и ClustalW [5]*. Филогенетический анализ проводили методом neighbor-joining с использованием пакета программ TREECONW [5, 9]. Bootstrap-анализ выполнен для 1000 выборок.

Результаты исследования. Определены полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов вируса КЭ, которые депонированы в GenBank под номерами GQ228395, EU816453, EU816450, EU816451, EU816452 и AY169390 для штаммов Primorye-18, Primorye-69, Primorye-212, Primorye-253, Primorye-270 и Primorye-332 соответственно, выделенных из крови людей с субклиническим течением заболевания. Штаммам Primorye-94, Dalnegorsk и Kavaleroovo, изолированным из мозга умерших от энцефалита людей, присвоены номера EU816454, FJ402886 и FJ402885 соответственно. Длины геномов варьировали в пределах 10875–11099 нуклеотидов, что согласуется с длиной геномов ранее описанных штаммов Oshima 5-10, Sofjin-HO и Glubinnoe, имеющих длины 11100, 10894 и 10886 нуклеотидов соответственно. Кодированная часть геномов этих штаммов имеет высокую степень гомологии и варьирует от 94 до 100 %, гомология со штаммом Vasilchenko сибирского субтипа составляет 85 % (рис.).

Полипептиды штаммов Dalnegorsk, Kavaleroovo, Primorye-94, Primorye-69 имеют длину 3414 аминокислотных остатков, что типично для всех известных флавивирусов. Длина полипептидов инаппарантных штаммов Primorye-212, Primorye-332, Primorye-253, Primorye-18, Primorye-270 короче в связи с делецией аминокислоты в 111-й позиции полипептида. Все полипептиды имеют высокую степень гомологии, причем 3320 а.о. идентичны (97,25 %), 47 а.о. (1,38 %) являются строго подобными, 28 а.о. (0,82 %) – слабо подобные и лишь 19 аминокислот (0,56 %) являются различающимися. Большинство мутаций хаотично распределяются по всему белку и, вероятно, относятся к случайным, но 19 различающихся мутаций являются характерными для изучаемых групп штаммов. Из них четыре замены являются существенными, две мутации приводят к менее существенному и большая часть замен (13 мутаций) приводит к несущественно изменению свойств аминокислот (табл.).

Обсуждение полученных данных. В лесной зоне России и сопредельных стран заболеваемость КЭ и тяжесть течения болезни различаются по регионам. Наиболее вероятной причиной таких различий могут быть изменения в структуре вирусной популяции, однако до сих пор не выяснено, какие именно изменения в геноме возбудителя влияют на тяжесть заболевания. Основной причиной этого является отсутствие хоро-

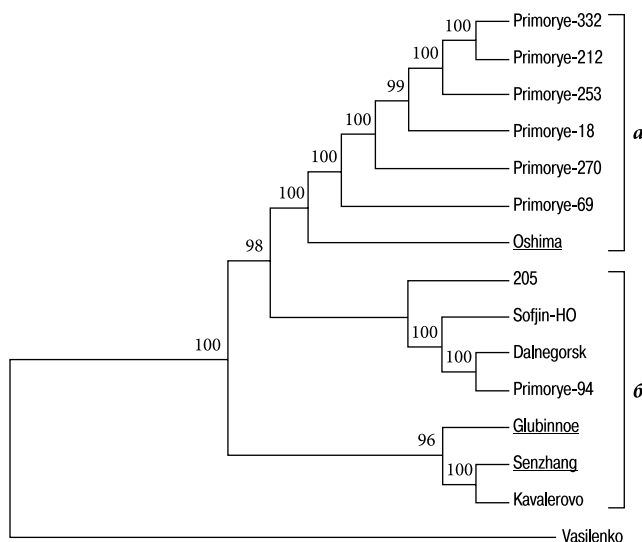


Рис. NJ-филогенетическое древо дальневосточных штаммов вируса КЭ, выделенных от людей с различной тяжестью заболевания:

а – инаппарантные штаммы; б – высоковирулентные штаммы.

шей биологической модели, при использовании которой можно предсказать тяжесть заболевания человека. общепринятые характеристики штаммов, такие как нейровирулентность для мышей и хомяков, темпы репродукции роста вируса на культурах клеток при разных температурах, плохо коррелируют с вирулентностью штаммов для человека. В связи с этим мы предложили новый подход, основанный на полногеномном секвенировании большой коллекции штаммов вируса КЭ с известной вирулентностью для человека. Для облегчения выявления ключевых мутаций, влияющих на вирулентность, в анализ были взяты штаммы с диаметрально различающейся вирулентностью, а именно высоковирулентные штаммы, выделенные из мозга умерших от энцефалита людей, и инаппарантные штаммы, выделенные из крови пациентов после укуса клеща без признаков заболевания.

Из результатов анализа нуклеотидных последовательностей видно, что все проанализированные штаммы, вне зависимости от их вирулентности, принадлежат к дальневосточному субтипу вируса КЭ. Их геномы различаются несущественно, за исключением делеций различной длины в 3'-нетранслируемой области. Но ни величина, ни позиции этих делеций не коррелируют с вирулентностью, и поэтому они далее не рассматриваются. На основании анализа нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, было построено филогенетическое древо. По этому параметру штаммы вируса КЭ четко разделяются на группы инаппарантных и высоковирулентных. Причем ближайшим родственником инаппарантных штаммов является штамм Oshima 5-10, выделенный в Японии. Высоковирулентные штаммы разделились на два кластера, в один из которых входят штаммы Sofjin и 205, а во второй – описанный ранее штамм Senzhang, выделенный в Китае, и штамм Glubinnoe, выделенный в Красноармейском районе Приморского края (рис.).

* Доступны по URL: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> и http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html

Таблица

Ключевые группоспецифичные мутации в вирусных белках штаммов, вызвавших инаппарантную и очаговые формы клещевого энцефалита в Приморском крае

Штамм	Capside protein				PrM		E	NS1	NS2B	NS3		NS4A	NS4B			NS5			
Strains	32	69	100	111	246	267	743	917	1466	1505	1534	2151	2354	2438	2472	3145	3188	3203	3235
Sofjin	Q	K	D	L	M	A	V	S	F	R	S	K	M	V	A	S	G	I	A
205	Q	K	D	I	I	A	A	S	F	R	S	K	M	V	V	S	R	I	A
Glubinnoe	Q	K	D	M	I	A	V	S	F	R	S	K	M	V	A	S	R	I	A
Senzhang	Q	K	D	V	V	A	V	S	F	R	S	K	M	V	A	S	R	I	A
Dalnégorsk	Q	K	D	L	I	A	V	S	F	R	S	K	M	V	A	S	R	I	A
Kavalerovo	Q	K	D	V	V	A	V	S	F	R	S	K	M	V	A	S	R	I	A
P-94	R	K	D	L	I	A	V	S	F	R	S	K	M	V	A	S	R	I	A
Oshima	R	K	D	V	I	V	A	S	F	R	F	K	M	V	A	T	R	V	A
P-69	R	R	D	V	I	V	A	G	F	K	F	K	M	V	V	T	K	V	S
P-18	R	R	N	del	V	V	A	G	V	K	F	R	V	A	V	T	K	V	S
P-212	R	R	N	del	V	V	A	S	V	K	F	R	V	A	V	T	K	V	S
P-253	R	R	N	del	V	V	A	G	V	K	F	R	V	A	V	T	K	V	S
P-270	R	R	N	del	V	V	A	G	V	K	F	K	V	A	V	T	K	V	S
P-332	R	R	N	del	V	V	A	G	V	K	F	R	V	A	V	T	K	V	S

Примечание. Черные блоки – с существенными различиями а.о., серые блоки – с менее выраженными различиями а.о., белые блоки – слабо различающиеся а.о.

Такое деление штаммов на группы указывает на более сложную структуру вирусной популяции, чем считали ранее, и является важным для изучения ее происхождения и эволюции.

Более значимые результаты получены при анализе транслированных аминокислотных последовательностей полипротеина. В геноме вируса КЭ, также как и у других членов семейства *Flaviviridae*, имеется одна протяженная открытая рамка считывания, кодирующая белок полипротеин длиной 3414 а.о. Этот полипротеин в процессе трансляции внутри зараженной клетки образует комплекс с мембранами эндоплазматического ретикула и затем разрезается на 10 индивидуальных белков с помощью протеазы клетки-хозяина и вирусной протеазы [3]. Последовательность расположения индивидуальных белков в полипротеине является характерной для всех флавивирусов и может быть записана так: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' [4]. Три первых белка, капсидный белок С, матричный белок prM(M) и поверхностный белок Е входят в состав вирусной частицы, остальные семь белков являются неструктурными.

В транслированной аминокислотной последовательности инаппарантных штаммов, за исключением Primorye-69, нами обнаружена делеция одной аминокислоты, что впервые показано для вируса КЭ. Эта делеция находится в С-концевой части капсидного белка С, непосредственно перед концевым Gly112 в области сигнального 13-членного пептида. Такая делеция может влиять на эффективность отщепления капсидного белка сигназой клетки-хозяина и соответственно влиять на патогенность штамма вируса КЭ.

В других последовательностях полипротеинов найдено 94 мутантных сайта, которые хаотично раз-

бросаны по геному и встречаются не у всех штаммов. Исключение представляют 19 сайтов, мутации которых являются специфичными для групп инаппарантных и высоковирулентных штаммов, которые могут быть связаны с изменением патогенности вируса. В таблице показаны позиции мутаций в полипротеине относительно штамма Sofjn-НО и отмечены индивидуальные вирусные белки, мутации которых выделены разным цветом. Мутантные сайты, в которых замененные аминокислоты существенно не влияют на физико-химические свойства аминокислоты, например замена К→R (Lys→Arg), М→V (Met→Val) или А→V (Ala→Val) и др., не выделены. Мутантные сайты, в которых замененные аминокислоты различаются в большей степени, например D₁₀₀→N (Asp→Asn) или F₁₄₄₆→V (Phe→Val), выделены серым. Мутантные сайты, в которых замененные аминокислоты существенно различаются по свойствам, например S₉₁₇→G (Ser→Gly), S₁₅₃₄→F (Ser→Phe) или A₃₂₃₅→S (Ala→Ser), а также делеция, выделены черным. В этих сайтах гидрофильная гидроксилсодержащая аминокислота серин, характерная для высоковирулентных штаммов, заменена у инаппарантных штаммов на гидрофобные аминокислоты, что может приводить к изменению конформации белка и, таким образом, изменять его свойства. Можно предположить, что мутации, выделенные черным цветом, играют решающую роль в изменении патогенных свойств вируса, хотя на данном этапе исследования нельзя полностью исключать возможное влияние остальных мутаций. Часть обнаруженных мутаций может отражать эволюционную историю штамма и, вероятно, не связана с изменением вирулентности. Для решения этого вопроса требуется проанализировать большее количество

штаммов с охарактеризованной вирулентностью для человека.

Как показано выше, делеция 111-й аминокислоты в капсидном белке обнаружена нами впервые для флавивирусов, поэтому возможность влияния этой мутации на изменение патогенных свойств ранее не была показана. Хотя из анализа литературы и общепринятого механизма сборки вирусных частиц следует, что эта мутация может быть одной из ключевых, влияющих на патогенность вируса. Известно, что сборка инфекционной вирусной частицы начинается с образования комплекса между вирусной РНК и капсидным белком. Зрелый капсидный белок образуется из полипротеина под действием двух протеаз – сигнаказы клетки-хозяина, которая отщепляет капсидный белок от пре-М белка, и вирусной протеазы, которая отщепляет сигнальную последовательность с образованием зрелого капсидного белка [7]. Эти две протеазы должны работать строго согласованно, в противном случае происходит образование дефектных вирусных частиц, не содержащих вирусной РНК, и поэтому неинфекционных [6, 11]. Протеаза вируса КЭ является комплексом двух неструктурных вирусных белков – NS2B и NS3, и одна из обнаруженных нами ключевых мутаций находится в домене протеазы белка NS3. Ранее было показано, что мутации вблизи этого домена приводят к значительному снижению репликации вируса и в результате к ослаблению его нейровирулентности [8]. Исходя из этих данных, можно предположить, что сочетание мутаций в капсидном белке и неструктурном белке NS3 может действовать на процесс отщепления и созревания капсидного белка и таким образом существенно влиять на патогенность вируса КЭ.

Третьей ключевой мутацией является замена Ser₉₁₇ у высоковирулентных штаммов на Gly у инаппарантных штаммов в неструктурном белке NS1. Данная мутация не затрагивает известные функционально значимые участки белка, такие как сайты гликозилирования или остатки цистеина, образующие внутримолекулярные и межмолекулярные дисульфидные связи [10]. Поэтому в настоящее время возможный механизм действия этой мутации на патогенность остается невыясненным. Следует отметить, что аналогичная мутация обнаружена у некоторых штаммов сибирского субтипа вируса КЭ, однако влияние ее на патогенные свойства для человека не определено.

Четвертой ключевой мутацией является замена Ala₃₂₃₅ у высоковирулентных штаммов на Ser у инаппарантных штаммов в С-концевом домене неструктурного белка NS5, являющегося полимеразой. Биологическая роль этой мутации также пока неясна.

Таким образом, в геноме вируса КЭ дальневосточного субтипа выявлено несколько ключевых мутаций, которые могут быть связаны с изменением патогенных свойств его штаммов для людей. Данные мутации расположены вне гена оболочечного белка Е, по характеристике которого проводится типирование штаммов. Штаммы, обладающие различной виру-

лентностью для человека, не имеют существенных отличий в белке Е, в связи с чем необходимо разрабатывать новые подходы к их типированию с учетом найденных ключевых мутаций.

Работа выполнена при финансовой поддержке междисциплинарного интеграционного проекта № 63 СО РАН, государственного контракта № П389 Федерального агентства по образованию и гранта МНТЦ № 4006.

Литература

1. Леонова Г.Н., Беликов С.И., Кулакова Н.В. и др. Молекулярное типирование штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от людей с различной степенью тяжести инфекции на территории юга Дальнего Востока России // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 2004. № 2. С. 32–36.
2. Погодина В.В., Левина Л.С., Карань Л.С. и др. Летальные исходы клещевого энцефалита, вызванного сибирским подтипом возбудителя в европейской части России и на Урале // Мед. вирусол. 2009. Т. XXVI. С. 121–123.
3. Allison S.L., Stiasny K., Stadler C.W. et al. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E // J. Virol. 1999. Vol. 73. P. 5605–5612.
4. Chambers T.J., Hahn C.S., Galler R., Rice C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication // Ann. Rev. Microbiol. 1990. Vol. 44. P. 649–688.
5. Combet C., Blanchet C., Geourjon C., Deleage G. NPS@:Network Protein Sequence Analysis // TIBS. 2000. Vol. 25, No. 3. P. 147–150.
6. Lobigs M., Lee E. Inefficient signalase cleavage promotes efficient nucleocapsid incorporation into budding flavivirus membranes // J. Virol. 2004. Vol. 78. P. 178–186.
7. Mandl C.W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis // Virus Res. 2005. Vol. 111, No. 2. P. 161–174.
8. Rumyantsev A.A., Murphy B.R., Pletnev A.G. A tick-borne Langat virus mutant that is temperature sensitive and host range restricted in neuroblastoma cells and lacks neuroinvasiveness for immunodeficient mice // J. Virol. 2006. Vol. 80, No. 3. P. 1427–1439.
9. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees // Comput. Applic. Biosci. 1993. Vol. 9. P. 177–182.
10. Wallis T.P., Huang C.Y., Nimkar S.B. et al. Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, No. 20. P. 20729–20741.
11. Yamshchikov V.F., Compans R.W. Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study // J. Virol. 1994. Vol. 68. P. 5765–5771.

Поступила в редакцию 24.02.2010.

ANALYZING GENOMES OF TICK-BONE ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS WITH VARIOUS HUMAN VIRULENCE

S.I. Belikov¹, G.N. Leonova², I.G. Kondratov¹, E.V. Romanova¹, E.V. Pavlenko²

¹ Institute of Limnology, SB RAMS (3 Ulan-Batorskaya St. Irkutsk 664033 Russia), ² Research Institute of Epidemiology and Microbiology, SB RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia) Summary – The FE-subtype tick-bone encephalitis strains are capable of causing disease of various severities. To identify ties between the disease severity and the virus genome structure, the authors have detected full-genome nucleotide sequences of strains derived from both dead persons (high virulent strains) and persons with no evident symptoms of the disease (unapparent strains). These two groups of the virus strains were on the phylogenetic tree in different clusters. Besides, these groups varied by 19 available group-specific mutant sites in virus proteins. Four mutations caused considerable changes in the properties of amino acid residues and, were likely to be key to identify the pathogenicity of the strain.

Key words: tick-bone encephalitis virus, genome, sequencing

Pacific Medical Journal, 2010, No. 3, p. 23–26.