

УДК 578.833:57.063.8.575.224.234

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОМА ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ШТАММА ГЛУБИННОЕ/2004 ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Е.В. Чаусов<sup>1</sup>, В.А. Терновой<sup>2</sup>, Е.В. Протопопова<sup>2</sup>, Г.Н. Леонова<sup>1</sup>, В.Б. Локтев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

<sup>2</sup> ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (630559 Новосибирская обл., Новосибирский р-н, п. Кольцово)

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, штамм Глубинное/2004, молекулярно-генетический анализ.

Представлен молекулярно-генетический анализ последовательности генома высокопатогенного штамма Глубинное/2004 вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа. Сравнение его с геномом других штаммов дальневосточного, сибирского и европейского субтипов показало, что штамм Глубинное/2004 несет ряд мутаций в неструктурных вирусных белках, сайтах процессинга вирусного полипротеина и промоторных последовательностях генома. Эти мутации, вероятно, могут способствовать ускоренной репликации и созреванию вируса. Показано, что вторичная структура промоторной 5'-концевой области генома, а также расположение трансмембранных доменов в белке NS2A отличают штаммы дальневосточного субтипа от сибирского и европейского субтипов вируса клещевого энцефалита.

Вирус клещевого энцефалита относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. К настоящему времени известны три субтипа ВКЭ: дальневосточный, сибирский и западноевропейский [5]. Клиническая картина заболевания, вызываемого этим вирусом, в ареале каждого субтипа варьирует. При этом возбудитель с высокой степенью нейротропности для человека чаще встречается в группе штаммов дальневосточного субтипа [1, 2].

Известно, что на патогенные и нейротропные свойства вируса клещевого энцефалита оказывают влияние нуклеотидные и аминокислотные замены в различных частях генома, например в гене белка Е, неструктурных белках или в нетранслируемых областях генома [7–9, 11]. Молекулярно-генетический анализ высокопатогенных штаммов является важной задачей для установления ключевых основ их молекулярной биологии и патогенеза клещевого энцефалита.

Штамм Глубинное/2004 дальневосточного субтипа вируса клещевого энцефалита проявил высокую патогенность для человека, вызвав особо тяжелую, быстротекущую форму инфекции с летальным исходом (см. в этом номере «Тихоокеанского медицинского журнала» статью Г.Н. Леоновой). Исследования динамики накопления вирионов этого штамма в культуре клеток почки эмбриона свиньи, проведенные Е.В. Протопоповой, показали, что он имеет высокую скорость репликации [14]. На ранних сроках заражения клеток (12–24 часа) «урожай» инфекционного вируса у этого штамма в 250 раз больше, чем у штам-

ма 205. В этой связи штамм Глубинное/2004 является интересным объектом для изучения нуклеотидных и аминокислотных замен, ответственных за повышенную скорость роста и патогенность вируса клещевого энцефалита.

Нами было проведено сравнение вторичных структур РНК 5'-нетранслируемой области генома (5'-НТО) штаммов вируса клещевого энцефалита Глубинное/2004, 205 (дальневосточный субтип), Заусаев (сибирский субтип) и Neudoerfl (западноевропейский субтип). Для уточнения влияния аминокислотных замен на свойства белков вируса мы провели анализ вторичной структуры белков и оценили изменения в трансмембранных доменах, а также изучили различия в положении сайтов фосфорилирования, О- и N-гликозилирования.

**Материал и методы.** Полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов вирусного клещевого энцефалита были взяты из базы данных GenBank: Глубинное/2004 (DQ862460), 205 (DQ989336), Заусаев (AF527415), Neudoerfl (U27495). Множественное сравнение последовательностей и филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 4 [13]. Для реконструкции вторичной структуры РНК использовали программу MFold v. 3.2 (<http://www.bioinfo.rpi.edu>). Реконструкцию вторичной структуры белков осуществляли с помощью программ PSIPRED v. 2.6 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) и nnPredict (<http://www.cmpchem.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html>). Для определения сайтов О- и N-гликозилирования в белках использовали программы NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) и NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), а для поиска трансмембранных доменов в белках – программу ТМНММ Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ТМНММ-2.0>).

**Результаты исследования.** В выведенной аминокислотной последовательности штамм Глубинное/2004 в сравнении со штаммом 205 имел 53 замены (табл. 1). Так, в нуклеотидной последовательности 5'-НТО штамма Глубинное/2004 выявлены замены Т30→С и Т35→С в функционально важной области петли левого плеча Y-структуры. Штаммы дальневосточного субтипа при этом отличались от сибирского и европейского по характерному виду Y-структуры 5'-НТО (рис. 1).

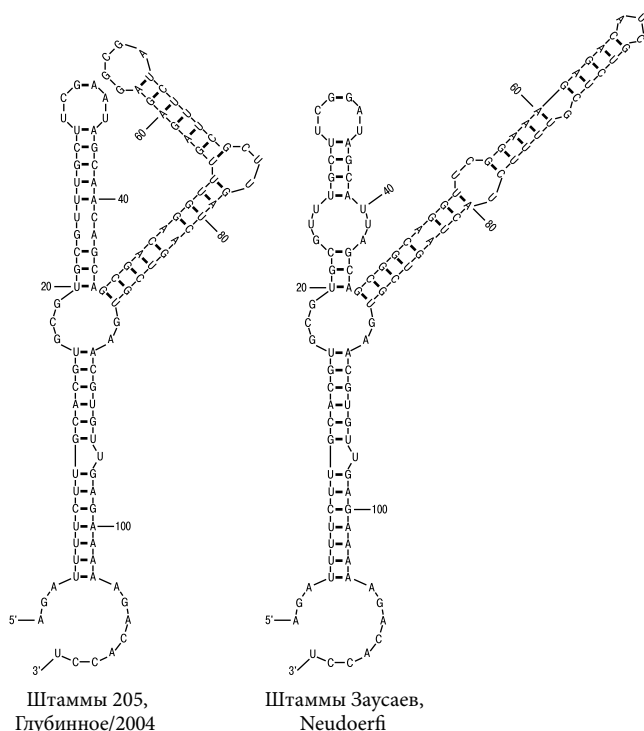


Рис. 1. Вторичные структуры 5'-НТО ВКЭ.

При анализе выведенных последовательностей вирусных белков были выявлены следующие особенности:

- 1) белок *C/CTND*: у всех штаммов сайты протеолиза *C/CTND* и *CTND/prM* различались (табл. 2). При анализе вторичных структур, трансмембранных доменов, сайтов О- и N-гликозирования характерных отличий штамма Глубинное/2004 от других штаммов выявлено не было;
- 2) белок *prM/M*: внутренний сайт протеолиза (*pr/M*), распознаваемый протеазой фурином, имел одинаковую последовательность *SRTRR/SVLIP* у штаммов 205, Заусаев и Neudoerfl, но у штамма Глубинное/2004 он отличался (*SRTRR/SVLIR*). Сайт протеолиза *prM/E* был одинаков для всех четырех штаммов (*APVYA/SRCTH*). При анализе вторичных структур, трансмембранных доменов, сайтов О- и N-гликозирования характерные различия не выявлены;
- 3) белок *E*: во вторичной структуре, положении трансмембранных доменов, сайтов О- и N-гликозирования, остатков цистеина, пептида слияния и рецептора ламининсвязывающего белка у всех штаммов характерные различия не зарегистрированы;
- 4) белок *NS1*: в сайте процессинга полипротеина *E/NS1* штамм Глубинное/2004 имел замену (*LGVGA/DVGGA*), у остальных штаммов – *LGVGA/DVCGA*. В положении сайтов О- и N-гликозирования и остатков цистеина различий между штаммами не было выявлено. Характерных изменений во вторичной структуре также не определялось;

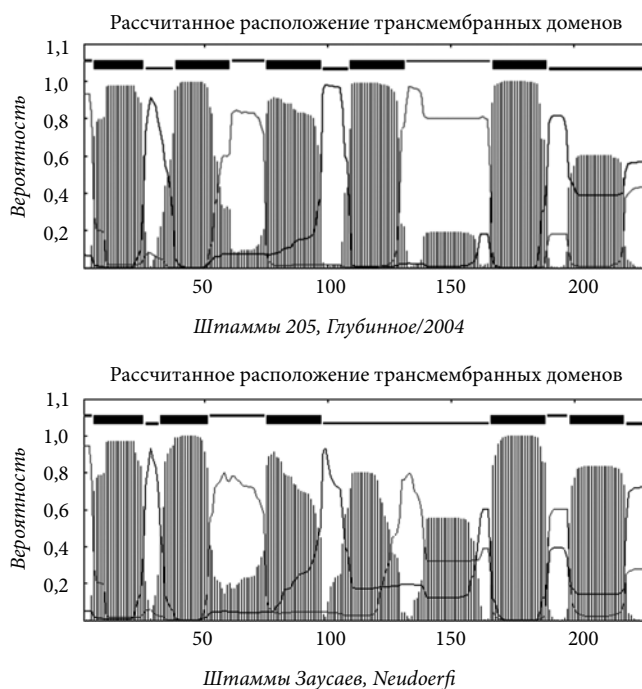


Рис. 2. Расположение трансмембранных доменов в белке NS2A.

- 5) белок *NS2A*: у штаммов дальневосточного субтипа (Глубинное/2004 и 205) найден потенциальный сайт N-гликозирования в позиции 100 а.о. У штаммов Заусаев и Neudoerfl такой сайт отсутствовал. Штаммы дальневосточного субтипа вируса клещевого энцефалита отличались от сибирского и европейского и по расположению трансмембранных доменов (рис. 2), при этом характерных отличий штамма Глубинное/2004 от штамма 205 не выявлено;
- 6) белок *NS2B*: у всех штаммов в положении трансмембранных доменов, сайтов О- и N-гликозирования различий не выявлено. При анализе вторичной структуры белков у штамма Глубинное/2004 также не найдено характерных особенностей;
- 7) белок *NS3*: при анализе потенциальных сайтов гликозирования у штамма Глубинное/2004 было обнаружено отсутствие сайта N-гликозирования в положении 499 а.о. и появление сайта О-гликозирования в положении 502 а.о. При анализе вторичной структуры белков характерных особенностей у штамма Глубинное/2004 не зарегистрировано;
- 8) белок *NS4A*: у всех штаммов различий во вторичной структуре в положении трансмембранных доменов и сайтов О- и N-гликозирования выявлено не было;
- 9) белок *NS4B*: между штаммами вируса клещевого энцефалита различий во вторичной структуре, в положении трансмембранных доменов, сайтов N-гликозирования не обнаружено. У штамма Neudoerfl отсутствовал потенциальный сайт О-гликозирования в положении 108 а.о., имевшийся у других штаммов;

Таблица 1

Аминокислотные замены в полипептиде штамма Глубинное/2004 по сравнению со штаммом 205 ВКЭ

Ген	Аминокислотные замены Глубинное/2004→205	Измененные сайты процессинга	Всего замен Глубинное/2004→205
C	Нет	Нет	0
CTHD	A <sub>99</sub> *→V; I <sub>108</sub> →V; M <sub>111</sub> →I; M <sub>113</sub> *→V; F <sub>115</sub> *→L	C/CTHD (RGKRR/SAA*DW) C/prM (GM*TF*A/ATVRK)	5
prM	Нет	Нет	0
M	R <sub>210</sub> *→P	prM/M (SRTRR/SVLIR*)	1
E	K <sub>508</sub> →R; I <sub>597</sub> →T; T <sub>646</sub> →N; V <sub>743</sub> →A	Нет	4
NS1	G <sub>780</sub> *→C; K <sub>883</sub> →R; S <sub>951</sub> →P; I <sub>1053</sub> →T	E/NS1 (LGVGA/DVGG*A)	4
NS2A	R <sub>1180</sub> →K; R <sub>1227</sub> →S; G <sub>1250</sub> →S; G <sub>1277</sub> →E; C <sub>1311</sub> →Y	Нет	5
NS2B	V1423→M	Нет	1
NS3	E <sub>1563</sub> →D; G <sub>1650</sub> →E; I <sub>1673</sub> →S; I <sub>1707</sub> →T; T <sub>1828</sub> →S; A <sub>1861</sub> →V; P <sub>1948</sub> →Q; V <sub>1975</sub> →G; D <sub>1988</sub> →N; A <sub>2062</sub> →T	NS2B/NS3 (RTARR/SD*LVF)	10
NS4A	D <sub>2143</sub> →E; V <sub>2165</sub> →A	Нет	2
NS4B	M <sub>2283</sub> →L; I <sub>2314</sub> →M; A <sub>2331</sub> →V; V <sub>2349</sub> →I; A <sub>2472</sub> →V	Нет	5
NS5	K <sub>2625</sub> →R; A <sub>2757</sub> →G; G <sub>2758</sub> →D; F <sub>3013</sub> →G; S <sub>3014</sub> →F; G <sub>3033</sub> →E; K <sub>3074</sub> →R; V <sub>3080</sub> →I; S <sub>3187</sub> →G; P <sub>3251</sub> →R; V <sub>3260</sub> →I; I <sub>3297</sub> →V; V <sub>3342</sub> →I; K <sub>3389</sub> →E; Y <sub>3402</sub> →D; N <sub>3406</sub> →E	Нет	16
Всего:	53	5	53

\* Замены в сайтах процессинга полипротеина.

Таблица 2

Аминокислотные последовательности сайтов протеолиза C/CTHD и CTHD/prM у штаммов ВКЭ

Штамм	Сайт C/CTHD	Сайт CTHD/prM
Глубинное/2004	RGKRR/SAVDW	GMTFA/ATVRK
205	RGKRR/SAADW	GVTLA/ATVRK
Заусаев	RGKRR/STTDW	GVAFA/ATVRR
Neudoerfl	RGKRR/SATDW	GMTLA/ATVRK

10) белок NS5: отличий между штаммами в положении потенциальных сайтов O-гликозилирования не обнаружено. Анализ вторичной структуры показал в районе 88–92 а.о. у штамма Глубинное/2004 α-спирализованную структуру вместо β-складчатой, присутствовавшей у других штаммов.

**Обсуждение полученных данных.** Как было установлено ранее, штамм Глубинное/2004 вируса клещевого энцефалита по антигенным свойствам аналогичен штамму 205, но отличается от него повышенной скоростью накопления вируса в культуре клеток [14]. По всей видимости, причина повышенной патогенности штамма для человека кроется в комплексе мутаций, ускоряющих репликацию и созревание вирионов.

Основные отличия штамма Глубинное/2004 от прочих (табл. 2) заключаются в выявленных мутациях в последовательностях вирусных белков NS3 (вирусная геликаза и протеаза), NS5 (вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза) и функционально важном домене CTHD белка C (5 замен на по-

следовательность в 20 а.о.). В белке NS3 изменены потенциальные сайты гликозилирования (отсутствует сайт N-гликозилирования в положении 499 а.о., но появился сайт O-гликозилирования в положении 502 а.о.). В белке NS5 мутации привели к преобразованию β-складчатой структуры в области 88–92 а.о. в α-спирализованную. Можно предположить, что мутации в белке NS3 могут влиять на проявление его геликазной и протеолитической функций, способствуя узнаванию модифицированных сайтов процессинга вирусного полипротеина, а мутации в белке NS5 могут влиять на проявление его полимеразной активности, ускоряя репликацию вируса клещевого энцефалита. Также важны замены в районе 624–647 а.о. белка NS5, поскольку он у флавивирусов является фрагментом структуры, ответственной за подавление синтеза интерферонов в зараженной клетке [12], и даже незначительные мутации в этой области могут заметно влиять на проявление данной функции.

Кроме того, выявлены замены в сайтах процессинга вирусного полипротеина C/CTHD, CTHD/prM, prM/M, E/NS1, NS2B/NS3. Мутации в этих сайтах влияют на скорость созревания вирионов. Этим может объясняться ускоренная репликация штамма Глубинное/2004 в культуре клеток. Особо важны, вероятно, замены в белках C и CTHD, поскольку структура N-концевой области белка C флавивирусов имеет существенное значение для скорости образования вирионов [4], а последовательность CTHD играет ключевую роль в формировании вирусного капсида.

У-структура в 5'-НТО является промотором вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы флавивирусов, и, по данным литературы, ее последовательность и вторичная структура радикально отражаются на уровне репликации вируса [6]. Последовательность и вторичная структура 5'-НТО у штаммов дальневосточного субтипа вируса клещевого энцефалита отличны от штаммов сибирского и европейского субтипов. Этим, возможно, объясняется повышенная патогенность и нейровирулентность дальневосточного субтипа в целом по сравнению со штаммами сибирского и европейского субтипов вируса клещевого энцефалита.

В нуклеотидной последовательности участка Р У-структуры 5'-НТО у штамма Глубинное/2004 обнаружены замены Т30→С и Т35→С [3]. Вторичная структура при этом осталась неизменной, однако мутации именно в данной области способны существенно влиять на уровень репликации вируса в клетках [6]. Можно предположить, что данная мутация тоже оказывает влияние на скорость репликации штамма Глубинное/2004 и, как следствие, обуславливает его высокую патогенность для человека.

Еще одним фактором, способным влиять на повышенную патогенность дальневосточного субтипа вируса клещевого энцефалита, может быть различное расположение трансмембранных доменов в белке NS2A. Данный белок обеспечивает мембранную локализацию репликативного комплекса флавивирусов [10]. Можно предположить, что, пронизывая несколько раз клеточные мембраны за счет своих трансмембранных доменов, он является своеобразным фундаментом, с которым связываются прочие белки репликативного комплекса и вирусная РНК. Следовательно, можно предположить, что различия в расположении трансмембранных доменов в белке NS2A у различных субтипов вируса клещевого энцефалита (рис. 2) могут сказаться на конформации фундамента и, как следствие, на стабильности репликативных комплексов, скорости и эффективности экспрессии.

Таким образом, штамм Глубинное/2004 несет целый комплекс замен в областях, жизненно важных для репликации вируса клещевого энцефалита. Определение влияния каждой из обнаруженных мутаций или их комплекса на биологические свойства штамма требует дальнейшего углубленного изучения путем создания методами обратной генетики мутантных штаммов, несущих проверяемые замены, с последующим сравнением их биологических свойств в культурах клеток или на лабораторных животных.

#### Литература

1. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае. Владивосток: Дальнаука, 1997. 190 с.
2. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. Хронический клещевой энцефалит. Новосибирск: Наука, 1986. 232 с.
3. Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopopova E.V. et al. Variability of the Tick-Borne Encephalitis Virus Genome in the 5' Noncoding Re-

gion Derived from Ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskii* in Western Siberia // *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009. Oct 30. [Epub ahead of print].

4. Corver J., Lenches E., Smith K. et al. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization // *Journal Virol.* 2003. Vol. 77. P. 2265–2270.
5. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia // *J. Gen. Virol.* 1999. Vol. 80. P. 179–185.
6. Filomatori C.V., Lodeiro M.F., Alvarez D.E. et al. 5' RNA element promotes dengue virus synthesis on a circular genome // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20. P. 2238–2249.
7. Hayasaka D., Gritsun T.S., Yoshii K. et al. Amino acid changes responsible for attenuation of neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus // *J. Gen. Virol.* 2004. Vol. 85. P. 1007–1018.
8. Holzmann H., Stiasny K., Ecker M. et al. Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice // *J. Gen. Virol.* 1997. Vol. 78. P. 31–37.
9. Khromykh A.A., Kondratieva N., Sgro J-Y. et al. Significance in replication of the terminal nucleotides of the flavivirus genome // *J. Virol.* 2003. Vol. 77 (19). P. 10623–10629.
10. Mackenzie J.M., Khromykh A.A., Jones M.K., Westaway E.G. Subcellular localization and some biochemical properties of the Flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A // *Virology.* 1998. Vol. 245. P. 203–215.
11. Mandl C.W., Alison S.L., Holzman H. et al. Attenuation of tick-borne encephalitis by structure-based site-specific mutagenesis of putative flavivirus receptor binding site // *J. Virol.* - 2000. Vol. 74 (20). P. 9601–9609.
12. Park G.S., Morris K.L., Hallett R.G. et al. Identification of Residues Critical for the Interferon Antagonist Function of Langkat Virus NS5 Reveals a Role for the RNA-Dependent RNA Polymerase Domain // *J. Virol.* 2007. Vol. 81. P. 6936–6946.
13. Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // *Molecular Biology and Evolution.* 2007. Vol. 24. P. 1596–1599.
14. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chausov E.V. et al. Novel variant of Tick-borne encephalitis virus, Russia // *Emerg. Infect. Dis.* 2007. Vol. 13. P. 1574–1578.

Поступила в редакцию 24.02.2010.

#### MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF GENOME OF GLUBINNOE/2004 HIGH VIRULENT STRAIN OF TICK-BONE ENCEPHALITIS

E.V. Chausov<sup>1</sup>, V.A. Ternovoy<sup>2</sup>, E.V. Protopopova<sup>2</sup>, G.N. Leonova<sup>1</sup>, V.B. Loktev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Epidemiology and Microbiology, SB RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), <sup>2</sup> State Research Centre of Virology and Biotechnology 'Vector' (settl. Koltsovo, Novosibirsk District, Novosibirsk Oblast 630559 Russia)

**Summary** – The authors present molecular genetic analysis of sequencing of genome of Glubinnoe/2004 high virulent strain of tick-bone encephalitis (Far Eastern sub-type). Upon comparing this genome with the genomes of other strains of the Far Eastern, Siberian, European sub-types, the authors indicate that the Glubinnoy/2004 strain has a number of mutations in the unstructured virus proteins, virus polyprotein processing sites and promoter sequences of the genome. These mutations are likely to cause accelerated replication and maturation of the virus. As shown, the secondary structure of promoter 5'end genome domain and the position of transmembrane domains in NS2A protein distinguish the FE-subtype strains from the Siberian and European subtypes of the tick-bone encephalitis. **Key words:** tick-bone encephalitis, Glubinnoy/2004 strain, molecular genetic analysis.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 3, p. 27–30.