

В итальянском исследовании, как и в нашем, была выявлена высокая частота встречаемости вспомогательной мутации E137K на участке HR2 (30 образцов, 54,5%), однако вспомогательная мутация N126K не была выявлена. Как видно из представленных данных, распространение мутаций, ассоциированных с устойчивостью ВИЧ-1 к энфувиртиду, в Италии имеет сходство с данными на территории СНГ, но имеются и отличия (присутствие мутации N42D и отсутствие мутации N126K).

Исследование распространенности мутаций устойчивости к энфувиртиду среди «наивных» пациентов проводилось также в Пакистане [9] на примере 100 образцов. Мутации, ассоциированные с устойчивостью к энфувиртиду в кодонах 36–45 участка HR1, в данном исследовании выявлены не были, однако отмечена очень высокая частота встречаемости вспомогательной мутации S138A на участке HR2 (88 образцов, 88%), что, очевидно, является характерным полиморфизмом вируса из данного региона. В то же время в отличие от вариантов вируса из СНГ мутации E137K и N126K на участке HR2 отсутствуют, так же как и мутации полиморфизма Q39H и N42S.

Выводы. 1. Собственно мутации лекарственной устойчивости к энфувиртиду в проведенном нами исследовании среди образцов из России и стран СНГ выявлены не были.

2. В позициях, ассоциированных с мутациями устойчивости, с высокой частотой (35%) были обнаружены мутации природного полиморфизма, ассоциированные с повышенной чувствительностью к энфувиртиду и не являющиеся мутациями лекарственной устойчивости.

3. С высокой частотой (27,5%) выявлены вспомогательные мутации N126K и E137K на участке HR2, также являющиеся природным полиморфизмом вируса. Данные мутации могут способствовать развитию резистентности ВИЧ-1 к энфувиртиду и повышению

фитнеса в случае появления мутаций резистентности на участке HR1.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Седьмой рамочной программы Европейского Союза по проекту «Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)» N 223131.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бартлетт Дж., Галант Дж., Фам П.* Клинические аспекты ВИЧ-инфекции. 2009–2010. – М.: Р. Валент, 2010.
2. Фузеон: монография по препарату. Базель: Ф. Хоффманн Ля Рош Лтд., 2003.
3. *Хоффманн К., Рокитро Ю. К.* Лечение ВИЧ-инфекции 2009. – М.: Р. Валент, 2010.
4. *Aquaro S., D'Arrigo R., Svicher V.* et al. Specific mutations in HIV-1 gp41 are associated with immunological success in HIV-1-infected patients receiving enfuvirtide treatment // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – Vol. 58, N 4. – P. 714–722.
5. *Bobkov A., Garaev M. M., Rzhainova A.* et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in the former Soviet Union: analysis of env V3 sequences and their correlation with epidemiologic data // *AIDS.* – 1994. – Vol. 8, N 5. – P. 619–624.
6. *Cecilia C., Garcia E., Marfil S.* et al. Genotypic evolution of T-20 resistance-associated mutations in heavily treated HIV infected patients on long-term treatment with T-20 // 3rd European HIV Drug Resistance Workshop. – Athens, 2005. – P. 7.
7. *Guide to Management of HIV Drug Resistance, Antiretrovirals Pharmacokinetics and Viral Hepatitis in HIV Infected Subjects.* – 9-th Ed. – Barcelona: Fundacio de Lluita contra la SIDA, 2009.
8. *Hudelson S. E., Marlowe N., Huang W.* et al. Analysis of HIV type 1 gp41 and enfuvirtide susceptibility among men in the United States who were HIV infected prior to availability of HIV entry inhibitors // *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* – 2009. – Vol. 25, N 7. – P. 701–705.
9. *Qadir M. I., Malik S. A.* Genetic variation in the HR region of the env gene of HIV: a perspective for resistance to HIV fusion Inhibitors // *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* – 2010. – Vol. 26, N 11. – P. 1–7.
10. *Qadir M. I., Malik S. A.* HIV fusion inhibitors // *Rev. Med. Virol.* – 2010. – Vol. 20. – P. 23–33.
11. *Xu L., Pozniak A., Wildfire A.* et al. Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41 // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49, N 3. – P. 1113–1119.

Поступила 23.01.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 578.833.26:578.5

*Т. В. Демина¹, Ю. П. Джиоев², И. В. Козлова^{1,2}, М. М. Верхозина³, С. Е. Ткачев⁴, Е. К. Дорощенко²,
О. В. Лисак², А. И. Парамонов², В. И. Злобин¹*

Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования

¹Иркутский государственный медицинский университет; ²Учреждение Российской академии медицинских наук Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, Иркутск; ³ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области;

⁴Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

На основе сравнения полногеномных структур 32 штаммов и фрагментов гена *E* (160 нуклеотидных оснований, н. о.) 643 штаммов и изолятов РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) подтверждено ранее высказанное нами предположение (Злобин В. И. и др., 2001) о существовании наряду с 3 основными генотипами генотипов 4 (штамм 178-79) и 5 (штамм 886-84). Установлена «мозаичность» в структуре полипротеинов обоих штаммов. Она проявляется в частности в последовательностях 14 позиций (С-3, E-206, NS1-54, NS1-285, NS2A-100, NS2A-127, NS2A-174, NS2A-175, NS2A-225, NS3-376, NS4B-28, NS4B-96, NS5-18, NS5-671), содержащих строго консервативные для каждого из 3 основных генотипов аминокислоты, и согласуется с равномерным характером распределения нуклеотидных замен, специфичных для генотипов 1, 2 и 3. Рассмотрен возможный сценарий происхождения генотипов 4 и 5 ВКЭ.

Ключевые слова: генотипы ВКЭ, нуклеотидные и аминокислотные последовательности, молекулярная гибридизация, рекомбинация

Контактная информация:

Демина Татьяна Васильевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.; e-mail: demina2006@mail.ru

Genotypes 4 and 5 of the Tick-Borne Encephalitis Virus: Features of the Genome Structure and Possible Scenario for its Formation

T. V. Demina¹, Yu. P. Dzhioev², I. V. Kozlova^{1,2}, M. M. Verkhovina³, S. E. Tkachev⁴, E. K. Doroshchenko², O. V. Lisak², A. I. Paramonov², V. I. Zlobin¹

¹ Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia; ² Research Center of Family Health and Human Reproduction, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Irkutsk, Russia; ³ Center of Hygiene and Epidemiology in Irkutsk Region, Irkutsk, Russia; ⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

On the basis of the comparison of complete genome structures of 32 strains and gene *E* fragments (160 nnt) of 643 strains and RNA isolates of tick-borne encephalitis (TBE) virus, we confirmed our previously expressed assumption (Zlobin V.I. et al, 2001) of existence, along with the three major genotypes, of genotypes 4 (strain 178-79) and 5 (strain 886-84). "Mosaic" structure of the polyprotein in the two strains was established. It manifests itself in particular in the sequences of 14 positions (C-3, E-206, NS1-54, NS-285, NS2A-100, NS2A-127, NS2A-174, NS2A-175, NS2A-225, NS3-376, NS4B-28, NS4B-96, NS5-18, NS5-671) containing the amino acids strictly conserved for each of the three major genotypes and is consistent with a uniform pattern of distribution of nucleotide substitutions that are specific for genotypes 1, 2 and 3. Possible scenario of the origin of TBE genotypes 4 and 5 was suggested.

Key words: TBE genotypes, nucleotide and amino acid sequences, molecular hybridization, recombination

Проведенный нами 10 лет назад анализ степени гомологии небольшого участка гена *E* (160 н. о.) 29 штаммов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), изолированных в различных частях ареала [4, 5], показал, что штаммы могут быть дифференцированы на 5 генотипов. Наряду с установленными тремя основными генотипами ВКЭ (1, 2 и 3) были выделены 2 существенно отличающиеся от них штамма – 178-79 и 886-84, предположительно представляющие генотипы 4 и 5. Подтверждение существования 5 генотипов ВКЭ в очагах Восточной Сибири было получено при изучении его географической вариабельности в ходе скрининга 273 коллекционных штаммов с помощью молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) [2, 3, 8]. Использование панелей генотипспецифических зондов позволило в дальнейшем обнаружить 9 новых изолятов вируса генотипа 5, обозначенных нами также как группа 886.

Особенностями штаммов вируса генотипов 4 и 5 являются, во-первых, отличие на уровне 12% и более нуклеотидных замен при сравнении структур 160-звенного фрагмента гена белка *E* (позиции 567–727) от представителей других генотипов (критерий, который был принят для выделения генотипов ВКЭ [5]); во-вторых, "мозаичность" генома – содержание на всем его протяжении участков, специфичных для каждого из трех основных генотипов; в-третьих, обнаружение их в очагах, где одновременно циркулируют 3 основных генотипа и изолированы штаммы, вероятно, представляющие собой смеси генотипов. На этом основании мы сочли возможным выдвинуть гипотезу о формировании "мозаичных" геномов в результате рекомбинационных событий, происходящих при совместной репродукции в организме естественных хозяев вирусов, относящихся к разным генотипам [2, 3].

Высокий уровень гомологии расшифрованных фрагментов геномов вирусов из группы 886, наличие собственного ареала, участие во всех звеньях трансмиссивной цепи и изоляция на протяжении длительного времени указывают на их стабильную циркуляцию в природе.

Вопрос о происхождении генотипов 4 и 5 представляется весьма важным для понимания эволюции вируса и современных особенностей этиологии, эпидемиологии и клиники клещевого энцефалита.

Цель исследования – на основании анализа репрезентативной выборки расшифрованных нуклеотидных последовательностей установить признаки своеобразия штаммов 178-79 и 886-84 как представителей самостоятельных генотипов и рассмотреть возможный сценарий формирования их генетических структур.

Материалы и методы

В работе использованы 2 набора выровненных нуклеотидных последовательностей штаммов и изолятов РНК вируса КЭ и вируса омской геморрагической лихорадки (ОГЛ), а также соответствующие им аминокислотные последовательности. Один элайнмент состоит из нуклеотидных последовательностей гена *E* длиной 160 н. о. 643 штаммов и изолятов РНК (список предоставляется по запросу), а другой включает кодирующую часть полногеномных нуклеотидных последовательностей 32 штаммов ВКЭ (FJ997899, AV062064, AV062063, DQ989336, AY182009, AY217093, DQ862460, EF469661, U27495, TEU27491, AM600965, U39292, EF469662, DQ486861, AF069066, AF527415, EU816453, EU816454, EU816451, EU816452, EU816455, EU816450, AY169390, FJ906622, FJ402885, FJ402886, FJ968751, FJ572210, GQ228395, GQ266392, DQ401140 [11] и вируса ОГЛ (NC_005062).

Построение филогенетических древ, расчет уровня гомологии сравниваемых последовательностей, поиск аминокислотных горячих точек и уникальных замен производили с помощью программы MEGA [10].

Результаты и обсуждение

Сопоставление фрагментов гена *E* длиной 160 н. о. 643 штаммов и изолятов РНК ВКЭ. В исследованиях, проведенных в 2001 г., было показано [4, 5], что при сопоставлении короткого фрагмента гена *E* (позиции 567–727) можно однозначно генотипировать ВКЭ, т. е. установить принадлежность того или иного штамма или изолята РНК вируса к одному из пяти генотипов. В последовательности из 53 аминокислот, выведенных из данной нуклеотидной последовательности, для дифференциации ВКЭ являются значимыми позиции E-206, E-232 и E-234. Аминокислотные основания в двух последних позициях входят в состав

Таблица 1

Исключительные замены в позиции 206 белка E ВКЭ

Штамм	Замена	Генотип	Год, место и источник изоляции	Инв. №
Lithuania-262	V → A	2	2001, Литва, кровь человека	AJ414703
SZ Freienbach1	V → A	2	2009, Швейцария, <i>I. ricinus</i>	NM468153
SZ Freienbach2	V → A	2	2009, Швейцария, <i>I. ricinus</i>	NM468154
ZH RuetiZH	V → A	2	2009, Швейцария, <i>I. ricinus</i>	NM468191
Pregolya-1	L → P	3	1986, Калининград, <i>D. pictus</i>	AF224664

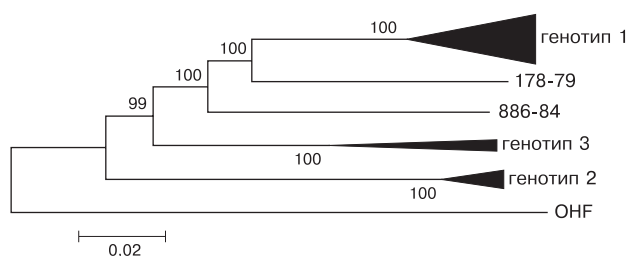
пентапептида EGAQN (230–234), который был описан ранее как консервативный для всех штаммов ВКЭ [12, 13]. В позиции E-232 у штамма 178-79 аланин (A) замещен на валин (V). В позиции E-234 штаммы генотипа 1 и все штаммы генотипа 2, кроме двух – Ljubl и OW-Alpnach, а также штаммы 178-79 и 886-84 имеют аспарагин (N), большая часть изученных штаммов генотипа 3 – гистидин (H), а остальные – глутамин (Q) или тирозин (Y). У штаммов генотипа 2 – Ljubl (AF091012), изолированного из крови человека в 1993 г., и OW-Alpnach (NM468146), изолированного от клеща *I. ricinus* в 2009 г., – аспарагин (N) замещен на треонин (T).

Как известно, в позиции 206 находятся специфические для каждого из 3 основных генотипов аминокислоты [1, 9]: серин (S) характерен для генотипа 1; валин (V) – для генотипа 2; лейцин (L) – для генотипа 3. Поэтому многие исследователи при секвенировании небольшого фрагмента генома ВКЭ отдают предпочтение той области гена E, которая перекрывает триплет, соответствующий аминокислоте № 206. Известно также, что единственный представитель генотипа 4 штамм 178-79, как и штаммы генотипа 1, имеет в

данной позиции S, а штаммы генотипа 5, как и штаммы генотипа 3, – L. Среди депонированных на сегодня во всемирной базе данных 643 расшифрованных нуклеотидных последовательностей ВКЭ, перекрывающих триплет, кодирующий аминокислоту в позиции 206 белка E (включая фрагменты генома штаммов из группы 886 (EU878281, EU878282, EU878283, NM133639)), известно 5 исключений. Они представлены в табл. 1.

Как видно из этой таблицы, нетипичные аминокислоты обнаружены у представителей генотипов 2 и 3, причем у наиболее консервативного генотипа 2 в разные годы – в Прибалтике и Центральной Европе. Стоит отметить при этом, что замена V на аланин (A) остается специфической для генотипа 2. Л. С. Карань и соавт. [6] упоминают еще о двух исключениях для дальневосточного генотипа: по одному штамму из Курганской и Омской областей с заменой S на пролин (P) (S → P). Отметим также, что замена у штамма Pregolya-1 сопряжена с заменой T на A (T → A) в позиции E-205, что, возможно, компенсирует изменение физико-химических свойств аминокислоты в позиции E-206.

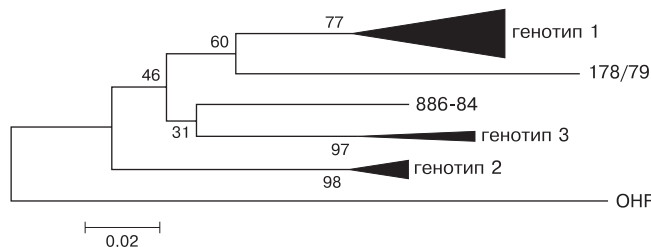
Сравнение кодирующей части полногеномных структур и короткого фрагмента гена E 32 штаммов ВКЭ. На рисунке сравниваются полногеномные структуры штаммов ВКЭ и сопоставляются короткие фрагменты гена E (160 н. о.) этих вирусов. По гомологии нуклеотидного состава при сравнении двух элайментов отмечается общая закономерность и некоторые различия. Закономерность выражается в том, что штаммы 178-79 и 886-84 не входят ни в одну из групп, соответствующих 3 основным генотипам. Различия проявляются в следующем. Анализ первого элаймента показывает, что генетические структуры штаммов 178-79 и 886-84 в большей степени гомологичны генетической структуре штаммов генотипа 1 (11,2 и 12,6% различий соответственно) и более близки между собой (уровень различий составля-



а

Различия по кодирующей области генома (10242 н.о.)

	Генотип 1	Генотип 2	Генотип 3	178-79
Генотип 1	4,2			
Генотип 2	16,5	2,6		
Генотип 3	14,2	15,5	6,2	
178-79	11,2	16,1	14,4	
886-84	12,6	15,5	13,8	11,8



б

Различия по фрагменту гена E (160 н.о. в позициях 567-727)

	Генотип 1	Генотип 2	Генотип 3	178-79
Генотип 1	5,7			
Генотип 2	16,6	2,5		
Генотип 3	15,1	14,6	5,5	
178-79	14,2	18,5	16,9	
886-84	13,7	14,1	12,0	14,4

Филогенетические схемы (NJ, Kimura-2-parameter) и уровни различий между 32 штаммами ВКЭ по кодирующей части генома (а) и 160-членному фрагменту гена E (б).

В сером поле указаны уровни замен внутри генотипов.

Таблица 2

Аминокислотные позиции, пригодные для генотипирования ВКЭ

Ген	Номера позиций (номера позиций по всему полипротеину)
С	3, 108
Е	206 (486), 317 (597)
NS1	54 (830), 141 (917), 285 (1061)
NS2A	100 (1228), 127 (1255), 174 (1302), 175 (1303), 225 (1353)
NS+	126 (1615), 258 (1747), 376 (1865)
NS4B	21 (2280), 28 (2287)
NS5	18 (2529), 297 (2808), 671 (3182), 832 (3343)

ет 11,8%), чем к генотипам 3 и 2. В то же время при анализе второго элайнмента видим, что штамм 886-84 теснее всего связан с представителями генотипа 3 (12% – минимальный уровень отличий), и при этом он более близок к штаммам генотипа 1 (13,7% различий), чем к штамму 178-79 (14,4%).

О рассмотренной закономерности мы уже сообщали [2, 3, 8] как о признаке, указывающем на своеобразия штаммов 178-79 и 886-84.

Анализ полипротеиновых структур штаммов ВКЭ, относящихся к 3 основным генотипам, в плане поиска генотипических маркеров позволил выявить 22 горячие точки (включая позицию Е-206), пригодные для генотипирования (табл. 2).

При сравнении кодирующей части полногеномных структур оказалось, что расположение генотипспецифических нуклеотидных последовательностей не всегда совпадает с местоположением аминокислотных горячих точек и генотипические различия часто проявляются на уровне мутаций в положении 3 кодона. Это становится очевидным, например, при сопоставлении структур генотипспецифических зондов, разработанных нами для панели, дифференцирующей штаммы ВКЭ [2], и комплементарных им участков генома, кодирующих соответствующие аминокислоты. Так, среди 36 специфических для генотипов 1, 2 и 3 зондов 10 зондов соответствуют участкам генома, на которых различия между генотипами заключаются в наличии различающихся нуклеотидных оснований в положении 3 кодона и не проявляются на уровне аминокислот (М-1, М-2, Е-1, Е-2, Е-3, Е-3', NS1-1, NS2B-3, NS3-2, NS4B-1).

При сопоставлении последовательностей полипротеинов 32 штаммов ВКЭ в каждом из 10 белков наряду с позициями, позволяющими дифференцировать одновременно 3 основных генотипа, мы отбирали и те позиции, в которых имеются замены, характерные только для одного или одновременно для 2 или 3 из 5 генотипов (данные не показаны). Установлено, что чередование аминокислот, уникальных как для каждого из 5 генотипов, так и характерных одновременно для 2 или 3 из 5 генотипов наблюдается на всем протяжении исследованных полипротеинов.

Среди отобранных по всему полипротеину позиций наряду с сайтами, расположенными отдельно, встречаются и следующие непосредственно друг за другом. По сочетаниям аминокислотных остатков в позициях 108-109 (белок С) или в позициях 1254–1255 (белок NS2A) можно различить одновременно 3 основных

генотипа и штаммы 178-79 и 886-84, т. е. дифференцировать все 5 генотипов.

В последовательностях полипротеинов штаммов 178-79 и 886-84 чередование уникальных аминокислот сочетается с чередованием аминокислот, характерных для 3 основных генотипов. Также выявлены 3 аминокислотных остатка, являющихся общими исключительно для них двоих: изолейцин (I) в позиции 109 (на конце белка С), лизин (K) в позиции 2074 (белок NS3) и аспарагиновая кислота (D) в позиции 2515 (начало белка NS5). Эти аминокислотные замены можно рассматривать как относительно равномерно расположенные.

В табл. 3 показаны аминокислотные замены в позициях, которые были отобраны как пригодные для дифференциации 3 основных генотипов ВКЭ, т. е. как уникальные для каждого из них. Здесь же видим сочетания аминокислот для штаммов 178-79 и 886-84, относящихся к генотипам 4 и 5. Оказалось, что в отношении генотипов 1, 2 и 3 аминокислоты в 8 позициях (С-108, Е-317, NS1-141, NS3-126, NS3-258, NS4B-21, NS5-297 и NS5-832) не всегда оказываются надежными генотипспецифическими маркерами. Вероятно, при увеличении выборки сопоставляемых полипротеинов в числе «не совсем надежных» для генотипирования позиций могли бы оказаться и другие из остальных 14. Однако не подлежит сомнению тот факт, что определенное сочетание аминокислот с незначительными вариациями в этих 22 позициях является надежным генотипспецифическим признаком. К тому же на примере горячей точки Е-206 можно констатировать (см. выше), что аминокислоты и в отдельно взятой позиции могут служить в качестве достаточно стабильного признака. При этом Е206А и Е206L для всех известных штаммов генотипов 2 и 3 соответственно являются действительно уникальными генотипспецифическими заменами (см. табл. 1).

В табл. 4 сравниваются доли замен, уникальных для каждого из 3 основных генотипов и штаммов 178-79 и 886-84. Наибольшее количество уникальных генотипспецифических замен, а именно 87, выявлено у группы штаммов генотипа 2 (особенно высокая доля замен по генам С (7,1%) и NS2A (5,2%)). Такая закономерность наблюдается по всем генам, кроме NS4A, и, вероятно, ее можно рассматривать как свидетельство в пользу версии о более древнем происхождении генотипа 2. При этом исследованные штаммы генотипа 2 по сравнению с представителями генотипов 1 и 3 имеют наиболее высокие показатели гомологии как нуклеотидного, так и аминокислотного состава, т. е. самый низкий уровень различий. Наименьшее количество уникальных замен (21) обнаружено у штамма 178-79.

Заметим, что замены, отобранные как уникальные для генотипов 4 и 5, только условно можно считать таковыми, поскольку эти генотипы представлены одиночными штаммами, и, следовательно, некоторые мутации могут быть штаммоспецифическими, т. е. случайными заменами, не характерными для данного генотипа.

Можно заключить, что штамм 178-79 относится к генотипу 4, который по сравнению с остальными известными генотипами характеризуется наименьшим количеством уникальных аминокислотных замен и по уровню гомологии нуклеотидной и аминокислотной

Аминокислотные замены в позициях, пригодных для дифференциации трех основных генотипов ВКЭ

белок	C		E		NS1			NS2A					NS3			NS4B			NS5			
	3	108	486	597	830	917	1061	1228	1255	1302	1303	1353	1615	1747	1865	2280	2287	2355	2529	2808	3182	3343
№ а.о. по полипротеину	3	108	486	597	830	917	1061	1228	1255	1302	1303	1353	1615	1747	1865	2280	2287	2355	2529	2808	3182	3343
№ а.о. по белку	3	108	206	317	54	141	285	100	127	174	175	225	126	258	376	21	28	96	18	297	671	832
Sofjin	G	V	S	I	T	S	R	N	A	M	L	V	I	V	I	H	E	R	G	R	V	A
Sofjin-HO	G	V	S	I	T	S	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	A
Oshima5-10	G	V	S	I	T	S	R	N	A	M	L	V	I	V	I	H	E	A	G	R	V	V
205	G	V	S	T	T	S	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	V
Senzhang	G	L	S	I	T	S	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	V
MDJ-01	G	L	S	I	T	S	R	N	A	M	L	I	I	V	T	H	E	A	G	R	V	V
Glubinoe	G	I	S	I	T	S	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	V
P-18	G	V	S	I	T	G	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	A
P-69	G	V	S	T	T	G	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	V
P-86	G	V	S	I	T	G	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	T
P-89	G	V	S	I	T	S	R	N	A	M	L	V	I	V	I	H	E	A	G	R	V	A
P-90	G	V	S	I	T	G	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	T
P-94	G	V	S	I	T	S	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	A
P-212	G	V	S	I	T	S	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	A
P-253	G	V	S	I	T	G	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	A
P-270	G	V	S	I	T	G	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	T
P-332	G	V	S	I	T	G	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	A
Kavalerovo	G	L	S	I	T	S	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	V
Dalnegorsk	G	V	S	I	T	S	R	N	A	M	L	I	I	V	I	H	E	A	G	R	V	A
Neudoerfl	K	I	V	A	S	Q	T	S	E	V	C	A	L	A	A	R	S	T	N	E	L	M
263	K	I	V	A	S	Q	T	S	D	V	C	A	L	A	A	R	S	T	N	E	L	M
Hypr	K	I	V	A	S	Q	T	S	D	V	C	A	L	A	A	R	S	T	N	E	L	M
K23	K	I	V	A	S	Q	T	S	D	V	C	A	I	A	A	Q	S	T	N	E	L	M
Salem	K	I	V	A	S	Q	T	S	D	V	C	A	L	A	A	Q	S	T	N	E	L	M
Toro-2003	K	I	V	A	S	Q	T	S	D	V	C	A	L	A	A	Q	S	T	N	E	L	M
AS33	K	I	V	A	S	Q	T	S	D	V	C	A	L	A	A	Q	S	T	N	E	L	M
Vasilchenko	R	T	L	T	N	G	K	G	G	I	I	T	M	M	V	Q	G	S	S	G	I	T
Zausaev	R	T	L	T	N	G	K	G	G	I	F	T	M	V	V	Q	G	S	S	R	I	T
Ek-328	R	T	L	T	N	G	K	G	G	I	F	T	M	V	V	Q	G	S	S	G	I	T
Kolarovo	R	T	L	T	N	G	K	G	G	I	I	T	T	M	V	Q	G	S	S	G	I	T
178-79	R	V	S	T	T	S	K	N	G	M	L	T	I	V	V	Q	G	A	S	G	V	A
886-84	R	A	L	I	N	S	K	S	S	M	L	A	I	G	V	Q	G	A	S	G	V	A
OHF	G	A	A	A	D	S	K	S	A	V	I	S	I	T	V	R	S	T	N	R	I	G

Примечание. Номера позиций аминокислот, оказавшихся не во всех случаях строго консервативными для каждого из трех основных генотипов, выделены курсивом. Каждый оттенок серого цвета в ячейке указывает на соответствие штамма или аминокислотного остатка одному из пяти генотипов ВКЭ. Черный цвет ячейки означает, что аминокислота характерна только для вируса ОГЛ.

Таблица 4

Количество и доля уникальных для каждого генотипа аминокислотных замен

Белок (количество а. о.)	Генотип				
	1	2	3	4 (штамм 178-79)	5 (штамм 886-84)
С (112)	<u>2 (1,8%)</u>	<u>8 (7,1%)</u>	3 (2,7%)	<u>2 (1,8%)</u>	<u>2 (1,8%)</u>
М (168)	<u>0 (0,0%)</u>	<u>5 (3,0%)</u>	1 (0,6%)	2 (1,2%)	2 (1,2%)
Е (496)	<u>1 (0,2%)</u>	<u>12 (2,4%)</u>	<u>1 (0,2%)</u>	3 (0,6%)	2 (0,4%)
NS1 (352)	<u>2 (0,6%)</u>	<u>10 (2,8%)</u>	<u>2 (0,6%)</u>	<u>2 (0,6%)</u>	3 (0,9%)
NS2A (230)	<u>6 (2,6%)</u>	<u>12 (5,2%)</u>	<u>6 (2,6%)</u>	<u>1 (0,4%)</u>	<u>6 (2,6%)</u>
NS2B (131)	<u>0 (0,0%)</u>	<u>5 (3,8%)</u>	2 (1,5%)	<u>0 (0,0%)</u>	1 (0,8%)
NS3 (621)	<u>2 (0,3%)</u>	<u>15 (2,4%)</u>	6 (1,0%)	4 (0,6%)	<u>2 (0,3%)</u>
NS4A (149)	<u>1 (0,7%)</u>	<u>1 (0,7%)</u>	<u>1 (0,7%)</u>	<u>1 (0,7%)</u>	<u>1 (0,7%)</u>
NS4B (252)	3 (1,2%)	<u>9 (3,6%)</u>	2 (0,8%)	1 (0,4%)	<u>0 (0,0%)</u>
NS5 (903)	8 (0,9%)	<u>13 (1,4%)</u>	6 (0,7%)	<u>5 (0,6%)</u>	9 (1,0%)
Всего (3414)	25 (0,7%)	<u>94 (2,5%)</u>	30 (0,9%)	<u>21 (0,6%)</u>	28 (0,8%)

Примечание. Максимальные значения по каждому гену и всему полипротеину отмечены сплошной линией, минимальные – пунктиром; максимальные значения по каждому генотипу отмечены серым полем, минимальные – курсивом.

последовательности близко примыкает к генотипу 1; представители группы 886 относятся к генотипу 5, который в меньшей степени, чем генотип 4, примыкает к генотипу 1 и имеет больше общего с генотипами 2 и 3, чем штамм 178-79, но теснее всего связан с последним.

Приведенные факты дают представление о геномах 2 рассматриваемых штаммов как о 2 вариантах «переплетений» из последовательностей, характерных для 3 основных генотипов.

Как сформировались такие генетические структуры? Для рассмотрения возможного пути их образования учтем следующие обстоятельства.

- В ходе эволюции ВКЭ наибольшее распространение получили отдельные его варианты – генотипы 1, 2 и 3. Каждый из них развивался самостоятельно, чему, по-видимому, способствовали достаточно длительные периоды географической изоляции. Об этом, например, свидетельствует тот факт, что каждый из 3 основных генотипов обладает собственным ареалом. В настоящее время эти ареалы перекрываются.

- Генотип 4 обнаружен в единственном очаге на территории Восточной Сибири. По уровню гомологии нуклеотидной и аминокислотной последовательности он более близок к генотипу 1, чем к генотипам 2 и 3.

- Генотип 5 обладает меньшим сходством с генотипом 1 по сравнению с генотипом 4 и имеет больше общего с генотипами 2 и 3, чем с генотипом 4, но теснее всего связан с последним. Он имеет собственный ареал, охватывающий юг Восточной Сибири и Северную Монголию (один изолят недавно обнаружен в Монголии [7]).

- Представители генотипов 4 и 5 обнаружены в очагах, где одновременно присутствуют все известные генотипы ВКЭ и зафиксированы политиповые штаммы, т. е. штаммы, представляющие собой смеси генотипов.

- Структуры каждого из 3 основных генотипов, как и у штаммов генотипов 4 и 5, представляют собой последовательности, состоящие из чередований участ-

ков, одни из которых являются уникальными для каждого из генотипов, другие – общими для всех трех, а третьи – общими для 2 из 3. Однако частота чередований таких участков у штаммов 178-79 и 886-84 выражена в большей степени, чем у представителей 3 основных генотипов.

Филогенетические схемы показывают, что нуклеотидные последовательности генотипов 4 и 5 – это промежуточные варианты между генотипами 2 и 3, с одной стороны, и генотипом 1 – с другой. Согласно этим схемам, штаммы 886-84 и 178-79, возможно, являются предшественниками штаммов генотипа 1, который в таком случае следует рассматривать как самый «молодой» из известных генотипов ВКЭ. Если это так, то можно ли трактовать наличие в геноме генотипа 1 относительно равномерно расположенных участков, характерных только для генотипа 2 или только для генотипа 3, исключительно как конвергентное сходство? Логичнее предположить, что имеющее место «мозаичность» геномом является прежде всего результатом множественных рекомбинаций, и эти рекомбинации являются причиной, из-за которой сложно разобраться в родственных взаимоотношениях генотипов ВКЭ.

В этом случае можно представить следующий ход событий. На территории Восточной Сибири в силу неизвестных естественных причин имелись очаги, в значительной мере изолированные от других природных очагов на протяжении по крайней мере того периода времени, который длился с момента появления предковых форм штаммов 178-79 и 886-84. При этом изоляция, по-видимому, носила односторонний характер – в такие «наполовину» изолированные очаги заносились варианты вируса генотипов 1, 2 и 3 без возможности выноса и имелись «подходящие» условия для одновременной репродукции вирусных частиц разных генетических линий в одной клетке. Последнее обстоятельство способствовало образованию рекомбинантов. Вмешательство человека (скорее всего лесозаготовительная деятельность в 50–60-е годы прошлого столетия) нарушило сложившуюся схему циркуляции вируса.

Можно допустить, что множественная рекомбинация независимо от ее частоты вносит существенный вклад в видообразование ВКЭ. Отсюда становится понятной и возможная причина противоречивости классификационных схем переносимых клещами флавивирусов млекопитающих. Вероятно, рекомбинанты проходят очень жесткий многоуровневый отбор, первым этапом которого является соответствие четко определенной вторичной структуре геномной молекулы. На это указывает достаточно частое выявление наличия для каждого из генотипов строго определенного нуклеотидного основания в позиции 3 кодона.

Таким образом, результаты проведенного анализа полногеномных и полипротеиновых структур штаммов ВКЭ, депонированных в GenBank, указывают на существование как минимум 5 генотипов вируса. Показано, что геномы штаммов генотипов 4 и 5 можно рассматривать как представителей 2 вариантов тесных «переплетений» из последовательностей, характерных для генотипов 1, 2 и 3.

Эволюционная история ВКЭ не ясна, сложны филогенетические взаимоотношения между генотипами: если генотип 1 самый “молодой”, а генотип 2 наиболее древний, то почему в ряде позиций они имеют общие аминокислоты, не характерные для остальных генотипов. Почему при этом последовательности генотипа 1 более консервативны (стабильны), а у генотипа 1 имеются общие замены с вирусами комплекса КЭ? Вероятнее всего, ярко выраженная “мозаичность” в строении геномов генотипов 4 и 5, как и обозначенные противоречия, есть следствие рекомбинационных событий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демина Т. В. Характеристика генетической variability штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии участков вирусного генома: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 1999.
2. Демина Т. В., Джисоев Ю. П., Верхозина М. М. и др. Генетическая variability и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксирибонуклеотидных зондов // Вопр. вирусол. – 2009. – Т. 54, № 3. – С. 33–42.
3. Демина Т. В., Джисоев Ю. П., Верхозина М. М. и др. Молекулярная эпидемиология вируса клещевого энцефалита: географическая variability, определяемая методом молекулярной гибридизации // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2009. – № 3. – С. 27–39.
4. Злобин В. И., Демина Т. В., Беликов С. И. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента гена белка оболочки // Вопр. вирусол. – 2001. – № 1. – С. 16–21.
5. Злобин В. И., Демина Т. В., Мамаев Л. В. и др. Анализ генетической variability штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки Е // Вопр. вирусол. – 2001. – № 1. – С. 12–16.
6. Карань Л. С., Браславская С. И., Мязин А. Е. Развитие методов детекции и генотипирования вируса клещевого энцефалита на основе амплификационных технологий // Вопр. вирусол. – 2007. – № 6. – С. 17–22.
7. Хаснашинов М. А., Данчинова Г. А., Кулакова Н. В. и др. Генетическая характеристика возбудителя клещевого энцефалита в Монголии // Вопр. вирусол. – 2010. – № 3. – С. 27–32.
8. Demina T. V., Dzhiyev Yu. P., Verkhovina M. M. et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes // J. Med. Virol. – 2010. – Vol. 82, N 6. – P. 965–976.
9. 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.
10. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment // Briefings Bioinform. – 2004. – N 5. – P. 150–163.
11. Pletnev A. G., Yamshchikov V. F., Blinov V. M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus // Virology. – 1990. – Vol. 174. – P. 250–263.
12. Shiu S. Y. W., Aires M. D., Gould F. A. Genomic sequence of the structural proteins of Louping ill virus: comparative analysis with tick-borne encephalitis virus // Virology. – 1991. – Vol. 180. – P. 411.
13. Venugopal K., Shiu S. Y. W., Gritsun T., Gould E. A. Nucleotide sequence comparisons of the viral envelope gene of geographically separate tick-borne flaviviruses // Abstracts book 2nd International symposium on tick-borne encephalitis, 6–7 June, 1991. – Baden near Vienna, 1991. – P. 54.

Поступила 06.12.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 578.831.3:578.233.41.083.2

Е. И. Исаева, И. С. Козулина, Р. Я. Подчерняева, О. М. Гринкевич

Репродукция метапневмовируса в различных клеточных линиях

ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва

Проведено сравнительное изучение репродукции метапневмовируса человека в 19 перевиваемых клеточных линиях человека и животных. Показано, что наиболее чувствительными являются клетки конъюнктивы человека Chang Conjunctiva (клон 1-5C4) и почки кошек CRFK.

Ключевые слова: метапневмовирус, репродукция, культура клеток

Reproduction of the Metapneumovirus in Different Cell Lines

E. I. Isaeva, I. S. Kozulina, R. Y. Podchernyaeva, and O. M. Grinkevich

Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia

The reproduction of the metapneumovirus was comparatively studied in 19 human and animal cell lines. The most sensitive transplanted cell lines were found to be human Chang Conjunctiva (clone 1-5C4) and animal cell lines of feline kidney CRFK.

Key words: metapneumovirus, cell lines, reproduction

С момента открытия в 2001 г. метапневмовирус (human metapneumovirus – HMPV) был выделен у людей разных возрастов и идентифицирован на всех континентах [1–3, 5, 9, 11, 15].

Установлено, что HMPV циркулирует на протяжении всех календарных месяцев и имеет выраженное сезонное распространение, перекрывающее цирку-

ляцию респираторно-синцитиального вируса (human respiratory syncytial virus – HRSV) [1–4, 10].

HMPV очень слабо реплицируется в обычных клеточных культурах, используемых для диагностики респираторных вирусов, его выделение возможно в лимитированном ряду клеточных линий и требует добавления трипсина [13]. Это, вероятно, и явилось

Контактная информация:

Исаева Елена Ивановна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: immunol.lab@mail.ru