

также в ранних стадиях инфекции. Этот эффект может являться причиной перехода бессимптомной стадии ВИЧ-инфекции в манифестирующую.

Было впервые показано, что изменчивость регуляторных генов зависит от субтипа вируса. Исходя из этого факта можно предположить, что в субтипе gagA/envB, для которого выявлена большая частота мутаций в регуляторных генах, при лечении также быстрее образуются мутации и в структурных генах (gag, pol и env), ведущие к появлению вариантов, устойчивых к антиретровирусным препаратам.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ohagen A., Gabuzda D. Role of Vif in Stability of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core. *J. Virol.* 2000; 74(23): 11055–66.

2. Raymond A.D., Campbell-Sims T.C., Khan M., Lang M., Huang M.B., Bond V.C. et al. HIV type 1 Nef is released from infected cells in CD45⁺ microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 2011; 27(2): 167–78.
3. Mologni D., Citterio P., Menzaghi B., Zanone Poma B., Riva C., Brogini V. et al. Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients. *AIDS.* 2006; 20(4): 567–74.
4. Huigen M.C., Kamp W., Nottet H.S. Multiple effects of HIV-1 transactivator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection. *Eur. J. Clin. Investig.* 2004; 34: 57–66.
5. Boya P., Pauleau A.L., Poncet D., Gonzalez-Polo R.A., Zamzami N., Kroemer G. Viral proteins targeting mitochondria: Controlling cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1659 (2–3): 178–89.
6. Chase A., Zhou Y., Siliciano R.F. HIV-1-induced depletion of CD4⁺ T cells in the gut: Mechanism and therapeutic implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006; 27: 4–7.

Поступила 23.05.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 2015
УДК 578.833.26:578.56].083.2

Дзюев Ю.П.^{1,2}, Парамонов А.И.², Рева О.Н.³, Букин Ю.С.⁴, Козлова И.В.^{1,2}, Демина Т.В.⁵, Ткачев С.Е.⁶, Злобин В.И.¹

Детекция потенциальных сайтов рекомбинации вируса клещевого энцефалита методами сравнительной геномики

¹ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 664025, г. Иркутск; ²ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, 664003, г. Иркутск; ³Университет Претории, ЮАР; ⁴Лимнологический институт СО РАН, 664082, г. Иркутск; ⁵ФГБОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия», 664038, г. Иркутск; ⁶Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск

Представлены результаты биоинформационного поиска потенциальных сайтов рекомбинации в полногеномных структурах вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) с помощью ряда программных методов. Проанализировано 55 геномов штаммов ВКЭ, из которых у 21 выявлено наличие сайтов рекомбинации. Рекомбинантные штаммы относились к дальневосточному ($n = 19$) и европейскому ($n = 2$) генотипам. Выявленные 22 сайта рекомбинации отнесены к 5 типам по позиционным, штаммовым и региональным характеристикам. Определены родительские штаммы, которые по генотипическим и географическим параметрам не противоречат возможности формирования рекомбинантов. Почти $\frac{3}{5}$ сайтов расположены в области генов NS4a и NS4b штаммов ВКЭ, являющейся «горячей точкой» рекомбинации, при этом большая их часть концентрируется в гене NS4. Показано, что рекомбинационные процессы у ВКЭ происходят на уровне генотипа (европейского), определенных групп внутри генотипа (дальневосточного) и характерны для периферийных популяций ареала.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; сайты рекомбинации; методы программирования рекомбинации; родительские штаммы; «горячая точка» рекомбинации.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 44–49.

Dzhioev Yu. P.^{1,2}, Paramonov A. I.², Reva O. N.³, Bukin Yu. S.⁴, Kozlova I. V.^{1,2}, Demina T. V.⁵, Tkachev S. E.⁶, Zlobin V. I.¹

Detection of potential sites of recombination in the Tick-borne encephalitis virus by the methods of comparative genomics

¹Irkutsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 664025, Irkutsk, Russia; ²Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, 664003, Irkutsk, Russia; ³University of Pretoria, South Africa; ⁴Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 664082, Irkutsk, Russia; ⁵Irkutsk State Agricultural Academy, 664038, Irkutsk, Russia; ⁶Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia

The results of the bioinformatic search for the potential sites of the recombination in the genome-wide structures of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) through a series of software techniques were presented in this work. The genomes of the 55 TBEV strains were assayed, 21 of them showed the presence of the recombination sites. Recombinant strains belonged to the Far Eastern (19 strains) and European (2 strains) genotypes. 22 sites of the recombination attributed were identified to five types based on position, strain, and regional characteristics. The parental strains were identified based on the genotypic and geographical parameters, which do not contradict the possibility of the formation of the recombinants. Nearly two-thirds of the sites are located in the regions of NS4a and NS4b genes, which are the "hot spots" of the recombination, most of them being concentrated in the gene NS4. It was shown that the recombination processes did not occur at the level of the genotypes (European genotype) or certain groups within the genotype (Far East) and were typical of the peripheral populations.

Key words: tick-borne encephalitis virus; recombination sites; parent strains; recombination hotspot.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 44–49. (In Russ.)

For correspondence: Yuriy Dzhioev, MD, PhD; e-mail: alanir07@mail.ru

Received 17.01.14

Для корреспонденции: Дзюев Юрий, канд. мед наук; e-mail: alanir07@mail.ru

Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), относящийся к семейству Flaviviridae, роду Flavivirus, вызывает у людей тяжелые нейронные инфекции, в ряде случаев, с параличами, парезами и высокой летальностью [1, 2]. Описаны 3 основных генотипа ВКЭ – дальневосточный, западный (европейский) и урало-сибирский (сибирский). Два генетических варианта (прототипные штаммы 886-84 и 178-79) рассматриваются как 4-й и 5-й генотипы [3].

Одним из ведущих факторов изменчивости и эволюции живых систем являются процессы рекомбинации, создающие новые генотипы путем объединения генетического материала из различных линий, повышая генетическое разнообразие популяции [4]. Они также являются основной движущей силой в эволюции вирусов, непосредственно влияя на их адаптацию к новым хозяевам и патогенность [5]. Рекомбинация отмечена во всех группах ДНК-содержащих и у многих РНК-содержащих вирусов, в том числе у ряда представителей рода Flavivirus [6, 7]. Однако существование рекомбинации у ВКЭ до сих пор оспаривается из-за противоречивых данных разных авторов [8, 9]. Вместе с тем в ряде работ последних лет в результате использования более эффективных биоинформационных программных методов были представлены данные о выявлении сигналов рекомбинации в геномах ВКЭ [6, 10, 11].

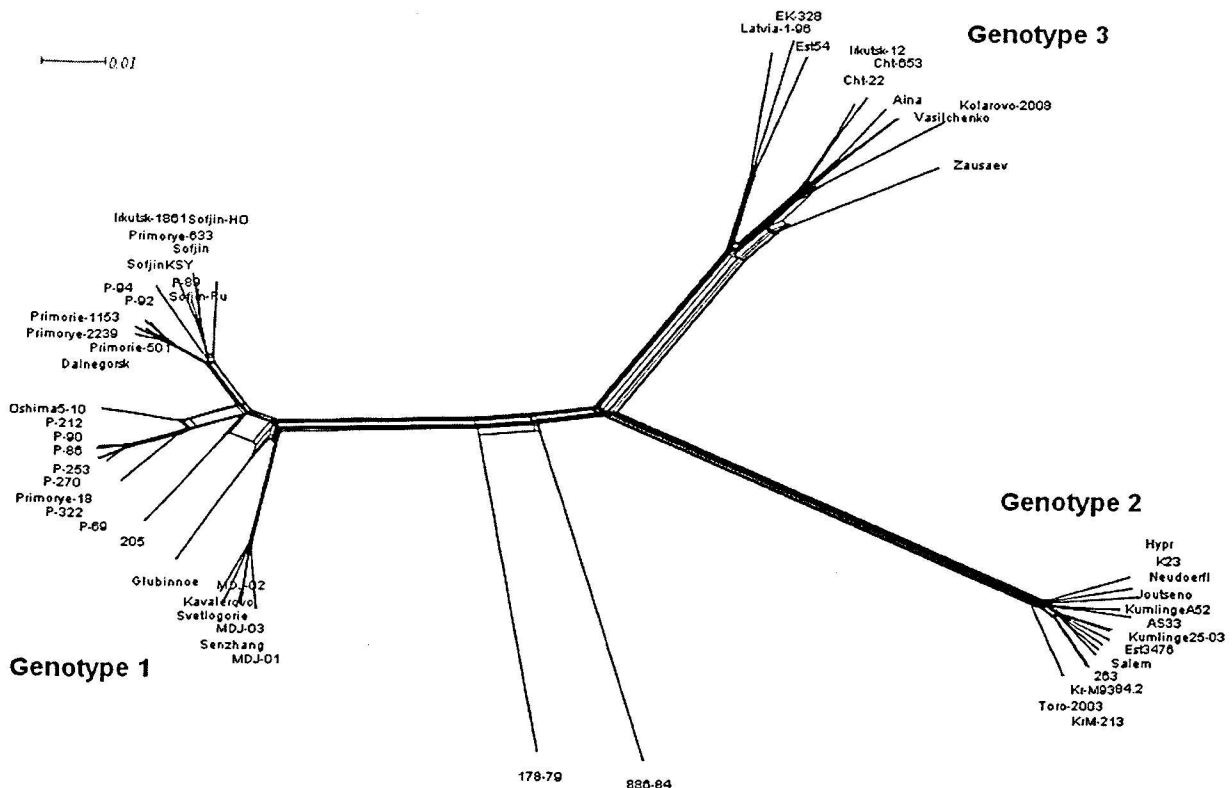
Целью данной работы было обнаружение в геномных последовательностях штаммов ВКЭ потенциальных сайтов рекомбинации, зафиксированных высокочувствительными программными методами, ориентированными на выявление рекомбинационных событий.

Материалы и методы

Последовательности нуклеотидов ВКЭ. Материал представлен выборкой данных о кодирующей части геномов 55 штаммов ВКЭ из базы данных GenBank: TEU27491, TEU27495, TEU39292, AF091010, AB062063, AB062064, AY182009, L40361, DQ989336, DQ486861, EU106868, DQ862460, EF469661, EF469662, EU816450-EU816455,

FJ402885, FJ402886, FJ906622, FJ997899, GQ228395, GQ266392, AY169390, GU121642, HM859894, HM859895, HQ201303, HM120875, HM535610, HM535611, HQ901366, HQ901367, JF316707, JF316708, FJ968751, JF819648, GU183379-GU183384, JN003205- JN003209, AF527415, AY217093, DQ401140 и штамм Софьин [12]. Последовательности выровнены программой Clustal W с использованием штрафа за открытие делеции 15 и штрафа за продолжение 6,66 [13].

Компьютерные программные методы. Положение сайтов рекомбинации определяли с помощью 7 программных методов, реализованных в пакете программ RDP v. 3.34: RDP (Recombination detection program); Geneconv (Statistical Tests for Detecting Gene Conversion); BootScan (Bootstrap-based detection of recombination breakpoints); Chimaera (Maximum mismatch chi-square); 3Seq (Method for inferring mosaic structure in sequence triplets); SiScan (Sister-scanning), MaxChi (Maximum chi-square) [14–20]. Программы выполняли статистическую оценку полученных результатов. Результат считали достоверным, когда значение p было равным или меньше 0,05. Для пакета программ RDP были установлены следующие общие настройки: «последовательности линейные, коррекция Бонефолли, не требуется филогенетического подтверждения, отшлифовывать точки рекомбинации, показывать все события». В ходе работы с программами применяли следующие настройки: «RDP – внешние и внутренние ссылки, размер окна 30; Geneconv, g-scale = 1; BootScan – длина окна 200, шаг 20, использовать UPGMA дерево, число повторов бутстрэпа 100; MaxChi – заданный размер окна, 70 переменных сайтов на окно, не использовать пропуски; Chimaera – заданный размер окна, 70 переменных сайтов на окно». Все прочие настройки выставлены по умолчанию. Для статистической поддержки полученных результатов был использован метод Phi-тестирования [21]. Филогенетическое предположение присутствия рекомбинаций было получено с использованием программы Splits Tree v. 4.1 [22], методом Neighbor-net [23]. Данный метод отображает конфликтующие филогенетические сигналы в виде циклов внутри неукорененного дре-



Филогенетические сети, построенные методом Neighbor-net для исследуемой группы штаммов вируса клещевого энцефалита.

Позиции сайтов рекомбинации, родительские штаммы и фиксирующие их программы

Штамм	Номер в GenBank	Позиции сайтов	Фиксирующие программы	Родительские штаммы, %
MDJ-02	JF316707	7951-9122	RDP	Маж. род. Senzhang, 99,8 Мин. род. MDJ-01, 99,9
MDJ-03	JF316708	7951-9122	RDP	Маж. род. Senzhang, 99,7 Мин. род. MDJ-02, 99,8
Senzhang	AY182009	7934-9122	MaxChi	Маж. род. MDJ-03, 99,7 Мин. род. неизвестен (MDJ-01)
Irkutsk-1861	JN003205	6485-7030	Chimaera	Маж. род. Primorye-332, 95,1 Мин. род. неизвестен (205)
Sofjin-Ho	AB062064	6497-7013	"	Маж. род. Primorie-332, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
Sofjin	Her	6484-7011	"	Маж. род. Primorye-332, 95,1 Мин. род. неизвестен (205)
Sofjin-KSY	JF819648	6485-7030	"	Маж. род. Primorye-332, 95,2 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-89	FJ906622	6484-7007	"	Маж. род. Primorye-322, 95,4 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-92	HQ201303	6500-7013	"	Маж. род. Primorye-332, 95,5 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-94	EU816454	6497-7013	"	Маж. род. Primorye-332, 95,4 Мин. род. неизвестен (205)
MDJ-01	AY217093	7945-9122 7951-9122	3Seq RDP, Geneconv, Chimaera	Маж. род. неизвестен (Senzhang) Мин. род. MDJ-02, 99,9
Joutseno	GU183381	7139-8558 6844-8558	Geneconv MaxChi	Маж. род. AS33, 98,7 Мин. род. Est3476, 99,9
AS33	GQ266392	942-1701 946-1701	Geneconv MaxChi	Маж. род. Joutseno, 98,7 Мин. род. неизвестен (Est3476)
Primorye-2239	HM859895	6497-7013	Chimaera	Маж. род. Primorye-332, 95,5 Мин. род. неизвестен (205)
		6488-6670	SiScan, Geneconv	Маж. род. Primorye-69, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
Sofjin-Ru	JN229223	6484-7007	Chimaera	Маж. род. Primorye-332, 95,2 Мин. род. неизвестен (205)
		6487-6734	SiScan	Маж. род. Primorye-69, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
Dalnégorsk	FJ402886	6497-7013	Chimaera	Маж. род. Primorye-332, 95,2 Мин. род. неизвестен (205)
		6488-6570	Geneconv	Маж. род. Primorye-69, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
205	DQ989336	359-1008	RDP	Маж. род. Primorye-2239, 95,7 Мин. род. Glubinnoe, 98,3
		6506-6931	RDP, MaxChi	Маж. род. неизвестен (Primorye-2239) Мин. род. P-212, 98,4
Glubinnoe	DQ862460	679-893 412-1008 359-1008	Geneconv MaxChi RDP	Маж. род. неизвестен (Primorye-2239) Мин. род. Primorye-332, 98,1 Маж. род. неизвестен (Primorye-2239) Мин. род. 205, 100
Primorye-501	HQ901367	6488-6725 6488-6570 6497-7013	SiScan Geneconv Chimaera	Маж. род. Primorye-69, 95,6 Мин. род. неизвестен (205) Маж. род. Primorye-332, 95,4 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-1153	HQ901366	6488-6725 6488-6570 6497-7013	SiScan Geneconv Chimaera	Маж. род. Primorye-69, 95,6 Мин. род. неизвестен (205) Маж. род. Primorye-332, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-633	HM859894	6444-6725 6444-6569 6458-7007	SiScan Geneconv Chimaera	Маж. род. Primorye-69, 95,3 Мин. род. неизвестен (205) Маж. род. Primorye-332, 95,5 Мин. род. неизвестен (205)

Примечание. Маж. род. – мажорный родитель; мин. род. – минорный родитель; в скобках указан предполагаемый родитель.

ва [22]. Статистический тест проводили с помощью метода Conduct Phi Test for Recombinations из программной системы Splits Tree 4 test [21]. Хотя для получения данных о филогенетических несовместимостях мы использовали расстояния Джукса-Кантора, с исключением делеции и неинформативных для парсимонии сайтов, похожие результаты получаются с использованием и других параметров [24].

Результаты

Поиск сайтов рекомбинации обычно начинают с создания филогенетической сети, построенной методом Neighbor-net по геномам исследуемых штаммов при анализе таких ретикуляционных событий, как гибридизация, горизонтальный перенос генов, рекомбинация, дупликация или потеря генов [22, 23]. Представленная на рисунке филогенетическая сеть похожа на филогенетическое древо генотипов ВКЭ, однако в ветвях имеется множество циклов и расколов, указывающих на возможность рекомбинаций, по крайней мере для некоторых последовательностей, представленных на этой модели. Для более достоверной оценки филогенетической сети, предполагающей наличие событий рекомбинации было использовано 7 программных методов из пакета программ RDP v. 3.34 [14–20]. Учитывали только те выявленные сайты, в которых достоверность фиксации сигналов рекомбинации была меньше 0,05. Разные программы выявили следующие частоты рекомбинаций: GenesconV – 30 случаев, RDP – 13, MaxChi и SiScan – по 10, менее всего – 3Seq и BootScan – по 4. По итогам детекции был выявлен 21 рекомбинантный штамм ВКЭ, а также определены его предполагаемые родительские штаммы (табл. 1). Родительские штаммы, которые устанавливали с наибольшей долей вероятности, определяли как мажорные, а с менее значимой вероятностью – как минорные.

Штаммы по количеству выявленных сайтов рекомбинаций на геном разделились на основную группу из 20 штаммов с одним сайтом рекомбинации и штамм 205 с двумя сайтами. В основной группе за исключением штамма Glubinnoe все сайты рекомбинации выявлены в неструктурной области генома, причем 3 сайта – в области гена NS5 (китайские штаммы MDJ-03, MDJ-03, Senzhang). Сайты для штаммов MDJ-02 и MDJ-03 определены методом RDP. Наиболее вероятным (мажорным) их родительским штаммом является Senzhang, но по менее вероятному (минорному) родителю они различаются: у MDJ-02 это штамм MDJ-01, а у штамма MDJ-03 – MDJ-02. Для рекомбинанта *Senzhang* мажорным родителем является штамм MDJ-03 при неизвестном, но предполагаемом минорном родителе MDJ-01 (выявлены программой MaxChi). Далее, у 7 штаммов (№ 4–10, в табл. 1) все сайты расположены в гене NS4a и на стыке генов NS4a и NS4b (табл. 2). Мажорным родителем для этих рекомбинантов является штамм Primorye-332, а в качестве минорного предполагается штамм 205.

У остальных штаммов (№ 11–21, кроме штамма 205, см. табл. 1) в геноме условно посредством разных программ выделяются по 2 или 3 сайта рекомбинации с небольшими различиями по длине фрагмента. В китайском штамме MDJ-01 разными программами показаны 2 сайта, различающихся по длине всего на 5 нуклеотидов и имеющих одинаковые родительские штаммы. Хотя мажорный штамм достоверно не определен, но предполагается штамм Senzhang. В европейских штаммах AS33 и Joutseno сайты рекомбинации различны по положению в геноме. В штамме AS33 сайт расположен в гене E, имея общих мажорного и предполагаемого минорного родителей – Joutseno и Est 3476. Сайты в штамме Joutseno расположены на стыке генов NS4b и NS5 (см. табл. 2), имея общего мажорного (AS 33) и минорного (Est 3476) родителей. В штамме Primorye-2239 оба сайта зафиксированы на стыке генов NS4a и NS4b, выявляются разными программами и имеют разных предполагаемых родителей.

Аналогичная картина наблюдается для штаммов Sofjin-Ru и Dalnegorsk, но у них варианты предполагаемых родителей совпадают. При сопоставлении Sofjin-Ru с его тремя однокорневыми вариантами (Sofjin-HO, Sofjin, Sofjin-KSY) заметны различия.

Аналогичная картина представлена у штамма Glubinnoe, в

Таблица 2

Характеристика выявленных сайтов рекомбинации штаммов ВКЭ

Позиции сайтов	Размер сайтов, н.о.	Штаммы, в которых встречаются сайты	Гены, в которых расположены сайты
359–1008	649	205, Glubinnoe	M + E
412–1008	591	Glubinnoe	M + E
679–893	214	Glubinnoc	M + E
942–1701	759	AS33	E
6444–6569	125	Primorye-633	NS4a
6444–6725	281	"	NS4a
6488–6570	82	Primorye-501, Dalnegorsk	NS4a
6488–6725	237	Primorye-1153, Primorye-501	NS4a
6488–6670	182	Primorye-2239	NS4a
6458–7007	549	Primorye-633	NS4a + NS4b
6484–7007	523	Sofjin-Ru, Primorye-89	NS4a + NS4b
6484–7011	527	Sofjin	NS4a + NS4b
6487–6734	247	Sofjin-Ru	NS4a + NS4b
6497–7013	516	Sofjin-HO, Primorye -94, Primorye-2239, Dalnegorsk, Primorye-501, Primorye-1153	NS4a + NS4b
6500–7013	513	Primorye-92	NS4a + NS4b
6485–7030	545	Sofjin-KSY, Irkutsk-1861	NS4a + NS4b
6506–6931	425	205	NS4b
6844–8558	1714	Joutseno	NS4b + NS5
7139–8558	1419	"	NS4b + NS5
7934–9122	1188	Senzhang	NS5
7945–9122	1177	MDJ-01	NS5
7951–9122	1171	MDJ-01, MDJ-02, MDJ-03	NS5

Примечание. н.о. – нуклеотидные основания.

котором все условные 3 сайта, с одной стороны, расположены на стыке структурных генов M и E, а с другой, имея общего предполагаемого мажорного родителя Primorye-2239, фиксируются тремя разными программами (см. табл. 1). Однако, у штаммов Primorye-501, Primorye-1153 и Primorye-633 сайты рекомбинации выявляются одними и теми же программами, которым соответствуют одни и те же комбинации родительских штаммов. Совпадают у них также позиции сайтов в генах NS4a и NS4b (см. табл. 2). У штамма 205 сайт 359–1008 выявляется на стыке двух структурных генов M и E и фиксируется методом RDP, имея родителей Primorye-2239 и Glubinnoc. Второй сайт 6506–6931 расположен в гене NS4b, и это единственный сайт среди всех, который определяется в этом гене (см. табл. 2). При этом программы, фиксирующие сайт, выявляют различных родителей (см. табл. 1).

Далее в табл. 2 приводятся характеристики позиций и размерностей 22 вариантов сайтов рекомбинации с оценками их генной принадлежности. Здесь размерность сайтов варьирует в широком диапазоне – от 82 до 1714 н.о. Наиболее крупные сегменты выявляются на стыке генов NS4b и NS5 и в гене NS5. Чаше сайты обнаруживаются в гене NS4a и в районах стыков этого гена с геном NS4b (68,2%). Этот участок генома можно охарактеризовать как «горячую точку» рекомбинации ВКЭ. На ген NS4a приходится 80% рекомбинационных замен, и его можно считать ядром «горячей точки» рекомбинационных событий у ВКЭ. В генах C, NS1, NS2a, NS2b, NS3 не были зафиксированы сигналы рекомбинации, что можно объяснить (исключив ген C) тем, что они представляют высококонсервативный репликативный комплекс ВКЭ [12].

Как видно из табл. 2, все 22 выявленных сайта рекомбинации можно разделить на 5 типов по позиционным, штаммовым и региональным характеристикам. К первому типу можно отнести сайты под 1–3, которые расположены на стыке генов M и E. Они выявлены в двух штаммах – 205 и Glubinnoc. Второй тип характерен для гена структурного белка E, носителем которого является европейский штамм AS33

Результаты статистического анализа методом Phi-теста

№ группы	Группы штаммов, принадлежащих к разным генотипам	Число штаммов	Оценка по Phi-тесту (p-value)
1	Все исследованные штаммы	55	0,137
2	Все исследованные штаммы дальневосточного генотипа	30	0,092
3	Все исследованные штаммы европейского генотипа	13	0,008
4	Все исследованные штаммы сибирского генотипа	10	0,526
5	Все штаммы с выявленными признаками рекомбинации (дальневосточный + европейский генотипы)	21	0,137
6	Штаммы с выявленными признаками рекомбинации (дальневосточный генотип, 2 штамма европейского генотипа исключены)	19	0,0015

Примечание. В группах не учитываются штаммы 886–84 и 178–79.

восточном. В штаммах из сибирского региона, занимающих центр ареала ВКЭ, всеми используемыми программными методами не были определены достоверные сайты рекомбинации, что соответствует принципам популяционной генетики – рекомбинации более вероятны в периферийных популяциях, чем в популяциях центральной части ареала вида [24]. Предполагаемые родительские штаммы географически и генотипически связаны с конкретными рекомбинантными штаммами, что может отражать достоверность их родственных связей. Показаны различия в степени чувствительности и специфичности используемых программных методов. Все программы RDP по-разному оценивают и фиксируют как сайты рекомбинации, так и родительские штаммы рекомбинантов. Тем не менее в совокупности они предоставляют высокодостоверную информацию о наличии в геномах штаммов ВКЭ потенциальных сигналов рекомбинации и определяют границы рекомбинантных сайтов. Вместе с Phi-тестированием они фиксируют связь рекомбинационных событий у ВКЭ с определенными иерархическими уровнями: генотипическим (европейский), субгенотипическим (дальневосточный) и популяционным (рекомбинанты выявляются в популяциях на периферии ареала).

ЛИТЕРАТУРА

1. Зильбер Л.А. Весенний (весенне-летний) эпидемический клещевой энцефалит. *Архив биологических наук*. 1939; 2: 9–37.
2. Thiel H.-J., Collett M. S., Gould E. A., Heinz F. X., Houghton M., Meyers G. et al. Family Flaviviridae. In: Fauquet C.M. et al., eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier; 2005; 981–98.
3. Демина Т.В., Джюев Ю.П., Козлова И.В., Верхозина М.М., Ткачев С.Е., Дорошенко Е. К., и др. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования. *Вопросы вирусологии*. 2012; 4: 13–9.
4. Суходолец В.В. Значение генетических рекомбинаций для сохранения и прогресса видов в эволюции. *Журнал общей биологии*. 2003; 3: 215–26.
5. Цилинский Я.Я. *Популяционная структура и эволюция вирусов*. М.: Медицина; 1988.
6. Bertrand Y., Tupel M., Elvdng A., Melik W., Johansson M. First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses. *PLoS One*. 2012; (7): 1–12.
7. Carney J., Daly J.M., Nisalak A., Solomon T. Recombination and positive selection identified in complete genome sequences of Japanese encephalitis virus. *Arch. Virol*. 2012; 157: 75–3.
8. Taucher C., Berger A., Mandl C.W. A trans-complementing recombination trap demonstrates a low propensity of flaviviruses for intermolecular recombination. *J. Virol*. 2010; 84: 599–11.
9. Twiddy S.S., Holmes E.C. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J. Gen. Virol*. 2003; 84: 429–40.

(№ 4). Штаммы третьего типа (№ 5–17) расположены в генах *NS4a* и *NS4b* и на их стыках. Четвертая группа представлена штаммом Joutseno, сайты которого (№ 18–19) расположены на стыке генов *NS4b* и *NS5* и являются самыми длинными рекомбинантными фрагментами – 1714 и 1419 н.о. Китайские штаммы Senzhang, MDJ-01, MDJ-02, MDJ-03 формируют пятый тип, их сайты занимают позиции в гене *NS5* (№ 20–22) и специфичны только для них.

Для статистического анализа рекомбинационных событий использовали Phi-тестирование [21]. Было сформировано 6 групп (табл. 3). В первой группе, куда вошли все исследованные 55 штаммов, достоверно не выявлено наличия сигналов рекомбинации (степень критерия достоверности $p = 0,137$). В группе из всех проанализированных дальневосточных штаммов также не обнаружено сайтов рекомбинации ($p = 0,092$), но в группе штаммов европейского генотипа были зафиксированы высокодостоверные сигналы рекомбинации ($p = 0,008$). Для штаммов сибирского генотипа не было выявлено достоверных сигналов рекомбинации. При анализе выборки из 21 выявленного рекомбинантного штамма критерий достоверности – также $p = 0,137$. Однако после удаления из этой группы 2 штаммов европейского генотипа в остальных 19 штаммах дальневосточного генотипа был зафиксирован высокодостоверный сигнал рекомбинации ($p = 0,0015$). В этом случае результаты, полученные с помощью RDP-метода и Phi-теста, совпадают, фиксируя сигналы рекомбинации среди групп штаммов европейского и дальневосточного генотипов и не выявляя их в сибирском генотипе.

Обсуждение

Рекомбинации и мутации являются первичными внутренними источниками генетической изменчивости организмов (в том числе вирусов), формирующими эволюционный и адаптационный потенциалы вида. Мутации обеспечивают увеличение разнообразия генофонда популяции за счет точечной перестройки существующего генетического материала без притока генов извне, а рекомбинации в рамках существующих геномов дают начало образованию новых генотипов за счет перераспределения уже существующих генетических структур [4, 5]. Отсюда можно сделать вывод, что если определенный вид (в том числе вид вируса) имеет генотипическую структуру, то рекомбинации в таких случаях должны играть определяющую роль. Как известно, все виды живых организмов имеют определенный ареал и соответственно подразделены на популяционные иерархические структуры, а в пространстве ареала распределяются на периферийные и центральную популяции [4, 24]. В работе Э. Майра [24] отмечено, что в центральных популяциях видов в генотипах преобладают мутационные процессы, а в периферийных возрастают возможности рекомбинационных процессов. Эта концепция экстраполируется и на вирусные популяции исходя из общегенетических принципов, согласно которым вирусы в своей эволюционной и адаптационной стратегии также подчиняются им [5]. Поэтому утверждения ряда авторов о невозможности рекомбинаций у ВКЭ [8, 9] представляются недостаточно обоснованными. Их утверждения опровергаются также обнаружением рекомбинационных событий у вирусов, для которых ранее они отрицались [6, 7, 10, 11].

Таким образом, можно выделить несколько следующих особенностей, определяющих и характеризующих структуру выявленных сайтов рекомбинации у ВКЭ. Выявлена группа из 21 штамма, в геномах которых зафиксированы потенциальные участки рекомбинации с одним или двумя сайтами. Зафиксированные сайты рекомбинации можно подразделить на 5 типов по позиционным, штаммовым и региональным характеристикам. Выявлен регион (гены *NS4a* и *NS4b*), образующий «горячую точку» рекомбинации ВКЭ. Сайты рекомбинации привязаны к двум генотипам – дальневосточному и европейскому. Показано, что рекомбинационные процессы у ВКЭ происходят на уровне как генотипа (европейский генотип), так и определенных групп внутри генотипа (дальневосточный). Выявлено пространственное распределение сайтов рекомбинации: они фиксируются только в периферийных регионах (популяциях) ареала ВКЭ – европейском и дальне-

10. Джиоев Ю.П., Парамонов А.И., Демина Т.В., Козлова И.В., Верхожина М.М., Ткачев С.Е. и др. Обнаружение рекомбинаций у вируса клещевого энцефалита с помощью компьютерного анализа вирусных геномов. *Вопросы вирусологии*. 2012; 2: 14–8.
11. Norberg P., Roth A., Bergström T. Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains. *Virology*. 2013; 440: 105–16.
12. 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; 174: 250–63.
13. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22: 4673–80.
14. Boni M.F., Posada D., Feldman M.W. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics*. 2007; 176: 1035–47.
15. Gibbs M.J., Armstrong J.S., Gibbs A.J. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*. 2000; 16: 573–82.
16. Martin D.P., Posada D., Crandall K.A., Williamson C. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2005; 21: 98–2.
17. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuve P. Rdp3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*. 2010; 26: 2462–63.
18. Maynard S.J. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol*. 1992; 34: 126–9.
19. Padidam M., Sawyer S., Fauquet C.M. Possible emergence of new Gemini viruses by frequent recombination. *Virology*. 1999; 265: 218–25.
20. Posada D., Crandall K.A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 13757–62.
21. Bruen T. C., Philippe H., Bryant D. A quick and robust statistical test to detect the presence of recombination. *Genetics*. 2006; 172: 2665–81.
22. Huson D.H., Scornavacca C. A survey of combinatorial methods for phylogenetic networks. *Genome Biol. Evol*. 2011; 3: 23–5.
23. Bryant D., Moulton V. Neighbor-Net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol*. 2004; 21: 255–65.
24. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of Protein Molecules. In: Munvo, ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press; 1969: 21–132.
25. Майр Э. Популяция, виды и эволюция. М.: Мир; 1974.
5. Tsilinskiy Ya.Ya. *Population structure and evolution of viruses [Populyatsionnaya struktura i evolutsiya virusov]*. Moscow: Meditsina; 1988. (in Russian)
6. Bertrand Y, Töpel M, Elväng A, Melik W, Johansson M. First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses. *PLoS One*. 2012; (7): 1–12.
7. Carney J., Daly J.M., Nisalak A., Solomon T. Recombination and positive selection identified in complete genome sequences of Japanese encephalitis virus. *Arch. Virol*. 2012; 157: 75–3.
8. Taucher C., Berger A., Mandl C.W. A trans-complementing recombination trap demonstrates a low propensity of flaviviruses for intermolecular recombination. *J. Virol*. 2010; 84: 599–11.
9. Twiddy S.S., Holmes E.C. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J. Gen. Virol*. 2003; 84: 429–40.
10. Dzhioev Yu.P., Paramonov A.I., Demina T.V., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Tkachev S.E. et al. Detection of recombinations have borne encephalitis virus using computer analysis of viral genomes. *Voprosy Virusologii*. 2012; 2: 14–8. (in Russian)
11. Norberg P., Roth A., Bergström T. Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains. *Virology*. 2013; 440: 105–16.
12. 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; 174: 250–63.
13. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22: 4673–80.
14. Boni M.F., Posada D., Feldman M.W. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics*. 2007; 176: 1035–47.
15. Gibbs M.J., Armstrong J.S., Gibbs A.J. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*. 2000; 16: 573–82.
16. Martin D.P., Posada D., Crandall K.A., Williamson C. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2005; 21: 98–2.
17. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuve P. Rdp3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*. 2010; 26: 2462–63.
18. Maynard S.J. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol*. 1992; 34: 126–9.
19. Padidam M., Sawyer S., Fauquet C.M. Possible emergence of new Gemini viruses by frequent recombination. *Virology*. 1999; 265: 218–25.
20. Posada D., Crandall K.A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 13757–62.
21. Bruen T. C., Philippe H., Bryant D. A quick and robust statistical test to detect the presence of recombination. *Genetics*. 2006; 172: 2665–81.
22. Huson D.H., Scornavacca C. A survey of combinatorial methods for phylogenetic networks. *Genome Biol. Evol*. 2011; 3: 23–5.
23. Bryant D., Moulton V. Neighbor-Net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol*. 2004; 21: 255–65.
24. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of Protein Molecules. In: Munvo, ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press; 1969: 21–132.
25. Mayr E. *Population, species and evolution [Populyatsiya, vidy i evolutsiya]*. Moscow: Mir; 1974. (in Russian)

REFERENCES

1. Zil'ber L.A. Spring (spring-summer) epidemic encephalitis *Arkhiv biologicheskikh nauk*. 1939; 2: 9–37. (in Russian)
2. Thiel H.-J., Collett M. S., Gould E. A., Heinz F. X., Houghton M., Meyers G., et.al. Family Flaviviridae. In: Fauquet C.M. et al., eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier; 2005: 981–98.
3. Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Tkachev S.E., Doroshchenko E. K. et al. Genotypes 4 and 5 are borne encephalitis virus : structural features of genomes and a possible scenario for their formation. *Voprosy Virusologii*. 2012; 4: 13–9. (in Russian)
4. Sukhodolets V.V. Value for the conservation of genetic recombination and progress in the evolution of species. *Zhurnal Obshchey Biologii*. 2003; 3: 215–26. (in Russian)

Поступила 17.01.14