

На правах рукописи

Ляпина Ольга Викторовна

СТРУКТУРА И АНАЛИЗ ГЕНОМА ВИРУСА КАРШИ

03.00.03.-молекулярная биология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**



Москва – 2006

Работа выполнена в ГУ НИИ Вирусологии имени Д.И. Ивановского
Российской Академии Медицинских наук

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук
Прилипов Алексей Геннадьевич

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор
Гараев Мансур Мухамедович

Доктор биологических наук,
Ляпустин Виктор Николаевич

Ведущая организация:

ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН

Защита состоится « 22 » мая 2006 г. в 12.00 часов на заседании
диссертационного Совета Д.001.020.01 при ГУ НИИ вирусологии им. Д. И.
Ивановского РАМН (адрес: 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ вирусологии им.
Д. И. Ивановского РАМН

Автореферат разослан « 20 » апреля 2006 г.

Учёный секретарь диссертационного Совета
Доктор медицинских наук

Н. П. Косякова

2006А
7925

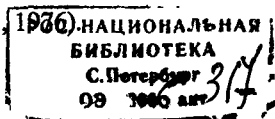
ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Род *Flavivirus* включает в себя более 80 представителей, многие из которых вызывают опасные заболевания человека. Особый интерес для практической медицины и науки представляет группа вирусов этого рода, объединённых в антигенный комплекс клещевого энцефалита (ККЭ). За последние 30-40 лет в России и ряде стран мира был отмечен рост заболеваемости людей, связанный с вирусами данной антигенной группы. Для разработки адекватной стратегии борьбы с тяжёлыми инфекциями, вызванными этими вирусами, применения наиболее эффективных методов диагностики, профилактики и лечения необходимо правильно представлять всё многообразие вирусов антигенной группы клещевого энцефалита.

Современная классификация вирусов, входящих в антигенный комплекс клещевого энцефалита, далека от совершенной. По-прежнему ведутся дискуссии о величине различий в таксономических рангах внутри данной группы. Изучение иммунологических свойств вирусных антигенов с помощью современных методов позволило более точно определить таксономическое положение вирусов в пределах семейства и рода. Для детализации этого положения необходимо учитывать иммунологические и генетические свойства вируса, однако молекулярно-генетическое изучение генома вируса даёт наиболее адекватное представление.

В результате комплексного обследования, которое провели сотрудники Института вирусологии имени Д.И. Ивановского во главе с академиком Д.К. Львовым, в конце прошлого столетия на территории СССР была определена локализация природных очагов различных арбовирусных инфекций, в том числе для ранее неизвестных флавивирусов. Так, в 1972 г., из клещей *Ornithodoros papillipes*, собранных в окрестностях Каршинской степи Узбекистана, был выделен инфекционный агент, позднее идентифицированный как новый вирус Карши (*KSIV* или *Karshi virus*), отнесённый к роду *Flavivirus* (Lvov D.K. et al., 1976).



Вирус Карши является эндемичным для стран Средней Азии и Казахстана. Он является слабопатогенным для человека и вызывает заболевание под названием лихорадка Карши. Описаны случаи заболевания лихорадкой Карши людей в Казахстане (в других странах не проводились подобные исследования). Этиология заболевания изначально была определена не верно (Каримов С.К., Кирющенко Т.В., 1980), вследствие того, что диагностика и патология этого вируса для человека исследована не достаточно.

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению представителей рода *Flavivirus*, по-прежнему отсутствуют данные о точном систематическом положении и структурных особенностях многих из них. Так, исследования вируса Карши, основанные только на биологических и иммунологических свойствах этого вируса, более 10 лет не приводили к точному установлению его положения внутри рода *Flavivirus*. С совершенствованием иммунологических методов исследования и появлением первых данных о первичной структуре небольшого участка гена *NS5* вируса Карши, его отнесли к ККЭ (Calisher CH., 1988).

Остается нерешённым вопрос и о точном таксономическом положении вируса Карши среди представителей комплекса клещевого энцефалита, вследствие отсутствия данных о структуре его полного генома. Определение же таксономического положения малоизвестного вируса представляет собой непростую задачу, так как классификация, установленная Международным комитетом по таксономии вирусов, не является завершённой, и многие её положения оспариваются исследователями.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования явилось определение первичной структуры полного генома вариантов вируса Карши (штаммы *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur*), молекулярно-генетическая характеристика его генома и

определение систематического положения этого вируса среди представителей рода *Flavivirus*.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Определить первичную структуру полного генома штамма *LEIV-2247 Uz* вируса Карши, выделенного в Узбекистане.
2. Определить первичную структуру полного генома штамма *LEIV-7192 Tur* вируса Карши, изолированного в Туркмении.
3. Провести молекулярно-генетический анализ структуры полного генома, возможных структурных и неструктурных белков исследуемых штаммов вируса Карши, а также сравнить их между собой и с ранее охарактеризованными вирусами антигенного комплекса клещевого энцефалита.
4. Провести филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *E*, *NS5* и полных геномов изолятов вируса Карши среди представителей рода *Flavivirus*.
5. Установить точное таксономическое положение штаммов *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur* вируса Карши внутри антигенного комплекса клещевого энцефалита, опираясь на данные о первичной структуре их полных геномов.
6. Разработать лабораторный вариант метода ОТ-ПЦР для избирательного выявления геномной РНК вируса Карши с использованием данных о нуклеотидных последовательностях известных штаммов.

Научная новизна и практическая значимость

1. Генетически охарактеризован, на основе определённой нами первичной структуры генома, штамм вируса Карши *LEIV-2247 Uz* (10653 н.о.), выделенный в Узбекистане. Последовательность генома этого штамма является первой полноразмерной последовательностью генома вируса

Карши, и может быть использована в качестве эталонной для данного вируса при последующих анализах филогенетических взаимоотношений.

2. Определена полная первичная структура генома штамма *LEIV-7192 Tur* (10768 н.о.), изолированного в Туркмении и ранее отнесённого по иммунологическим свойствам к вирусу Карши.
3. Показано, что геном вируса Карши кодирует полипротеин, который впоследствии нарезается на 11 самостоятельных белков, так же как у остальных вирусов ККЭ. Предсказаны вероятные сайты *N*-гликозилирования, а также проанализированы функциональные сайты структурных белков.
4. В результате молекулярно-генетического анализа нуклеотидной и аминокислотной последовательностей белка *E* нами были предсказаны нейротропные свойства исследуемых штаммов вируса Карши.
5. На основе определённой нуклеотидной последовательности была предсказана вторичная структура 5'-концевого нетранслируемого региона.
6. Молекулярно-генетическое сравнение вируса Карши с флавивирусами, для которых известны полноразмерные последовательности генома и гена *NS5*, позволяет нам утверждать, что вирус Карши равноудалён от всех представителей ККЭ и образует отдельный кластер внутри данной группы вирусов, к которому, по-видимому, принадлежит и вирус *Royal Farm*.
7. Установлено, на основании анализа нуклеотидной последовательности полного генома, что изученные штаммы *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur* соответствуют разным генотипам одного вируса (значение дивергенции 5,5 %).
8. Создан лабораторный вариант ОТ-ПЦР, позволяющий специфично детектировать геномную РНК вируса Карши (на участке гена *NS5*) от других представителей комплекса клещевого энцефалита.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Впервые определена полная нуклеотидная последовательность генома вируса Карши штаммов *LEIV-2247 Uz* (10653 н.о.) и *LEIV-7192 Tur* (10768 н.о.).
2. Установленная полная нуклеотидная последовательность генома штаммов *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur* вируса Карши позволяет использовать их в качестве эталонных представителей двух различных генотипов этой генетической линий. Сравнительный генетический анализ этих штаммов по нуклеотидным последовательностям полных геномов показал, что они различаются друг от друга на уровне характерном для разных субтипов вируса *Tick-borne encephalitis virus*.
3. Предсказаны сайты протеолитического расщепления полипротеина вируса Карши на 11 белков и проанализированы их важные функциональные сайты, в том числе *N*-гликозилирования. Показано, что гликопротеин оболочки вириона вируса Карши наиболее похож на белок *E* вирусов, вызывающих энцефалиты, к тому же в позиции 76 находится *Thr*, что ранее описано для нейротропных вирусов.
4. В ходе сравнительного анализа предсказанной вторичной структуры 5'-концевого нетранслируемого региона вируса Карши была показана его максимальная степень гомологии с аналогичным участком вируса *Powassan*, однако большая шпильчатая структура имеет делецию протяжённостью 6 н.о.
5. Молекулярно-генетическое сравнение вируса Карши среди флавивирусов с известными полноразмерными последовательностями генома, а также генов *E* и *NS5* свидетельствует о том, что вирус Карши образует отдельный кластер внутри антигенного ККЭ, к которому, по-видимому, принадлежит вирус *Royal Farm*.
6. Сравнение результатов филогенетического анализа по нуклеотидной последовательности гена *E*, гена *NS5* и последовательности полного

генома вирусов, принадлежащих к комплексу клещевого энцефалита, показало, что эти данные хорошо коррелируют между собой. Полученные данные позволяют сделать заключение о правомерном использовании любого из этих генов для установления филогенетических взаимоотношений штаммов вируса Карши в пределах антигенного ККЭ.

7. Создан вариант метода ОТ-ПЦР для выявления вируса Карши, позволяющий специфично детектировать различные варианты этого вируса от других представителей комплекса клещевого энцефалита. С помощью данной системы обнаружены варианты вируса Карши двух основных генетических линий, известных к настоящему времени.

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на совместном заседании отдела молекулярной вирусологии и апробационного совета ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН 30 марта 2006 г.

Объем и структура диссертации.

Материалы диссертации изложены на 120 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (119 источников), содержит 9 таблиц и 22 рисунка.

По результатам работы опубликованы 3 печатные работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения нуклеотидной последовательности полного генома вируса Карши были использованы штаммы из коллекции вирусов ГУ НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского РАМН: *LEIV-2247 Uz*, выделенный из клещей *Ornithodoros papillipes*, собранных в Узбекистане, и *LEIV-7192 Tur*,

изолированного из клещей вида *Ornithodoros caniceps*, собранных в Туркмении. Эти штаммы были изолированы в период экспедиций 1969-1979 гг., когда было выделено более 500 изолятов, среди которых порядка 20 не были классифицированы.

Последовательность олигонуклеотидных праймеров подбиралась с помощью программы Primer Premier 5.00 (Premier Biosoft International, США) с использованием нуклеотидных последовательностей различных изолятов ВБН, доступных в базе данных GeneBank. Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на автоматическом секвенаторе (ABI PRISM 3100, США). Для построения алайментов использовали пакет программ DNASTAR V.3.12 (Lasergene, США). Построение филогенетических деревьев осуществляли на основе алгоритма “ближайшего соседа” в рамках 2-параметрической модели М. Кимуры с последующим 5000-кратным ресэмплингом (MEGA 3.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Определение первичной нуклеотидной последовательности генома вируса Карши (штамм *LEIV-2247 Uz*)

При амплификации первого фрагмента кДНК генома штамма *LEIV-2247 Uz* были использованы вырожденные олигонуклеотидные праймеры, подобранные для участка гена Е вируса Западного Нила. Для определения первичной структуры, ПЦР-фрагмент был клонирован в рGEM-T вектор и секвенирован с помощью универсальных праймеров M13F и M13R. В ходе филогенетического анализа по этому участку были определены ближайшие «родственники» вируса Карши (*Tick-borne encephalitis virus*, *Powassan virus*), нуклеотидные последовательности которых использовались при выборе универсальных праймеров.

Для подбора олигонуклеотидных праймеров мы также использовали данные из появившихся в момент проведения исследования работ [Купо,

1998] по структуре небольших участков генов *NS5* (AF013381) и *NS3* (AF297463) вируса Карши.

Впоследствии были отобраны 3 пары олигонуклеотидных праймеров, которые позволили амплифицировать практически полный геном исследуемого вируса в составе 3 перекрывающихся фрагментов ДНК размером 3-5 тыс. н.п. методом ОТ-ПЦР. Эти фрагменты ДНК были использованы для определения полной нуклеотидной последовательности генома исследуемого штамма.

2. Определение первичной нуклеотидной последовательности генома штамма *LEIV-7192 Tur*

В результате проведённых иммунологических исследований в лаборатории экологии вирусов ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского предполагалось, что штамм *LEIV-7192 Tur* является разновидностью вируса Карши. Поэтому на первом этапе работы по амплификации кДНК были использованы олигонуклеотидные праймеры, подобранные в результате анализа нуклеотидной последовательности штамма *LEIV-2247 Uz*. Географическая удалённость штаммов вируса Карши, выделенных в Узбекистане и Туркмении, предполагала различия в первичной структуре их геномной РНК. По этой причине для получения данных о полной первичной структуре штамма *LEIV-7192 Tur* использовались гетероспецифичные пары олигонуклеотидных праймеров для штаммов *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur*, с помощью которых было получено несколько перекрывающихся фрагментов.

В ходе работы была определена нуклеотидная последовательность генома штамма *LEIV-2247 Uz*, составляющая 10653 н.о. и 10768 н.о. для изолята *LEIV-7192 Tur* (за исключением участка 3'-нетранслируемых областей). Нуклеотидная последовательность генома вируса Карши 2-х штаммов *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur* была депонирована в базу данных GenBank под номерами AY863002 (NC_006947) и DQ462443 соответственно.

Определённые нами нуклеотидные последовательности двух штаммов из Узбекистана и Туркмении являются первыми полноразмерными последовательностями генома вируса Карши и могут быть использованы в качестве эталонных для данного вируса при последующих анализах филогенетических взаимоотношений.

3. Анализ структуры полного генома вируса Карши

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей полного генома (за исключением участка 3'-концевого нетранслируемого участка) этих штаммов и сопоставление с последовательностями других представителей ККЭ позволил обнаружить в их составе одну открытую рамку считывания, которая кодирует полипротеин протяжённостью 3416 а.о. В ходе исследования были предсказаны потенциальные сайты расщепления полипротеина вируса Карши на 3 структурных белка: *C*, *prM*, *E* и 8 неструктурных: *NS1*, *NS2a*, *NS2b*, *NS3*, *NS4a*, *NS4b*, *NS5* и *2K* (табл. 1). Подобное строение генома характерно для всех флавивирусов.

Таблица 1.

Структурная характеристика генома вируса Карши

Структурные элементы генома	Положение в геноме, н.о.	Положение внутри полипротеина, а.к.	Размер, а.к.	Молекулярный вес, кДа
5'НТР	1-127	-	-	-
Кодирующая область	128-10375	1-3416	3416	377,5
Прекапсидный (anchC)	128-463	1-112	112	12,5
Капсидный (C)	128-415	1-96	96	10,8
Премембранный (prM)	464-967	113-280	168	18,4
Мембранный (M)	743-967	206-280	75	8,3
Белок оболочки (E)	968-2455	281-776	496	53,7
NS1	2456-3514	777-1129	353	39,0
NS2a	3515-4204	1130-1359	230	24,9
NS2b	4205-4597	1360-1490	131	14,3
NS3	4598-6457	1491-2110	620	69,1
NS4a	6458-6834	2111-2236	125	13,5
2K	6835-6904	2237-2259	23	2,3
NS4b	6905-7666	2260-2513	254	27,4
NS5	7667-10375	2514-3416	903	102,4
3'НТР	10376-	-	-	-

	Karshi virus LEIV-7192 Tur	Karshi virus LEIV-2247 Uz
5'HTP/C *	tgggg/MAGKA	tgggg/MAGKA
C / prM	RGKRR/LCLAL	RGKRR/LCLAL
prM / E	APAYA/SRCVH	APAYA/SRCVH
E / NS1	LGVA/DQGCS	LGVA/DQGCS
NS1/NS2a	STVVA/GNVEL	STVVA/CNGEL
NS2a/NS2b	HPKRR/SIGEP	HPKRR/SIGEP
NS2b/NS3	TSARR/GELVF	TSARR/GELVF
NS3/NS4a	ASSRR/GASEL	ASCRR/GASEL
NS4a/2K	PGKQR/SADDN	PGKQR/SADDN
2K/NS4b	GTVA/NELGW	GTVA/NELGW
NS4b/NS5	SEPRR/GGGMG	SEPRR/GGGAG
NS5/3'HTP**	ESSII/taaga	ESSII/taaga

А. Координаты расположения белков в полипротеина. Отсчёт положения в геноме ведётся с 1 н.о. 5' не кодирующего основания. HTP – нетранслируемый регион

Б. Сайты протеолитического расщепления в полипротеине штаммов вируса Карши. (*) сайты инициации и (**) терминации трансляции вирусного полипротеина

3.1. Рассмотрение особенностей белков

Предшественник белка *prM* имеет лишь один потенциальный сайт N-гликозилирования в позиции 32 а.о. *Asn-Gly-Ser* и 7 цистеиновых остатков. Как и у всех представителей ККЭ, гликопротеин оболочки Е вируса Карши включает в себя 12 цистеиновых остатков (6 в домене I, 2 в домене II и 4 в остальных сегментах). Анализ аминокислотных последовательностей белка Е штаммов *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur* показал наличие трёх потенциальных сайтов N-гликозилирования: в позиции 154 а.о. (с первого а.о. белка Е) *Asn-Glu-Thr*, 361 а.о. *Asn-Pro-Thr* и 473 а.о. *Asn-Thr-Thr*. Оказалось, что в позиции 76 домена II белка Е у обоих штаммов вируса Карши присутствует *Thr*-остаток. Некоторые исследователи полагают, что подобное расположение *Thr* характерно для вирусов, вызывающих энцефалиты, в отличие от вирусов, приводящих к различным формам геморрагических лихорадок, у которых в позиции 76 находится *Ala* (Lin D. et al., 2003).

Неструктурный белок вируса Карши *NS1* содержит 4 возможных сайта N-гликозилирования: *Asn-Leu-Thr* (в положении 85 а.о.), *Asn-Pro-Ser* (в позиции 94 а.о.), *Asn-Ala-Thr* (в положении 208 а.о.) и *Asn-Cys-Thr* (в

положении 224 а.о.). Кроме того, в штамме *LEIV-2247 Uz* обнаружен дополнительный вероятный сайт N-гликозилирования в позиции 271 а.о. (*Asn-Gly-Thr*). Причём этот аминокислотный мотив не найден в белке *NS1* штамма *LEIV-7192 Tur*.

Из анализа аминокислотных последовательностей геномов анализируемых штаммов длиной 3427 а.о. (начиная с АТГ, до стоп-кодона, табл. 2) видно, что максимальная степень гомологии исследуемого штамма *LEIV-2247 Uz* вируса Карши наблюдалась со штаммами *Vasilchenko* восточносибирского субтипа и *Sofjin-HO* дальневосточного

Таблица 2.

Степень гомологии по различным участкам генома штамма вируса Карши *LEIV-2247 Uz* с другими штаммами вирусов, принадлежащих к антигенному комплексу клещевого энцефалита.

Название вируса (штамма)	Степень гомологии со штаммом <i>LEIV-2247 Uz</i> вируса Карши (%) по отдельным участкам генома											
	C	preM	E	NS1	NS 2a	NS 2b	NS3	NS 4a	2K	NS 4b	NS5	Поли про теин
TBEV (Vasilchenko)	55,2	63,1	71,0	68,8	53,5	64,9	76,3	66,4	56,5	63,5	80,0	71,2
TBEV (Sofjin-HO)	58,3	63,1	70,8	67,3	54,8	65,6	76,1	65,6	56,5	61,5*	80,2	71,2
TBEV (Senzhang)	57,3	63,7	70,8	67,3	54,3	65,6	76,0	66,4	56,5	61,5*	80,0	71,0
TBEV (Oshima5-10)	57,3	63,7	71,0	67,6	54,3	65,6	76,0	66,4	56,5	61,5*	80,1	71,1
TBEV (Zausaev)	54,2	61,9	71,4	68,5	53,5	64,9	76,5	65,6	56,5	63,1	80,2	71,1
TBEV (Neudoerfl)	53,1	61,3	71,0	67,9	52,2	66,4	76,9	64,8	56,5	61,9	80,3	70,9
TBEV (263)	53,1	61,3	71,0	67,9	51,7	66,4	76,6	64,8	56,5	61,9	79,8	70,8
Powassan (LB)	52,1	55,4*	71,4	69,1	50,9	67,9	74,7	63,2	65,2	63,1	80,8	70,5
Alkhurma (1176)	55,2	62,5	67,9	68,3	44,8*	66,4	74,8	62,4	56,5	63,1	81,3	69,9
Deer tick (ctb30)	51,1	56,0	70,2	67,1*	49,1	67,9	74,0*	61,6*	65,2	63,1	80,6	69,8*
Langat (TP21)	53,1	60,7	69,6	67,3	50,4	64,9	75,8	64,8	56,5	63,5	80,3	70,3
Langat (E5)	53,1	60,7	69,4*	67,3	50,4	64,9	75,5	64,8	?	63,5	80,2	70,2
Louping ill (369/T2)	51,0*	60,7	70,6	67,9	50,4	61,8*	76,0	65,6	?	62,3	78,3*	69,8*
OHFV (Kubrin)	59,4	64,3	71,0	66,8	51,7	63,4	74,5	66,4	56,5	63,5	80,1	70,7
OHFV (Bogoluvovska)	59,4	64,3	70,8	66,8	51,7	63,4	74,5	66,4	56,5	63,5	80,1	70,7
Дивергенция (%)	49,0	44,6	30,6	32,9	55,2	38,2	26,0	38,4		38,5	21,7	30,2

OHFV – Omsk hemorrhagic fever virus

TBEV – Tick-borne encephalitis virus

* - штаммы вирусов, которые с вирусом Карши имеют максимальный процент дивергенции. Жирным шрифтом выделены максимальные значения гомологии

субтипа вируса *TBE* (71,2 %), а минимальная (69,8 %) с вирусом *Deer tick* (штамм *ctb30*) и *Louping ill* (штамм *369/T2*). Учитывая, что разница степени гомологии по полному полипротеину составила всего лишь 1,4 %, а по отдельным белкам вирус Карши гомологичен почти с каждым представителем ККЭ, можно предположить, что анализируемый вирус равноудалён от всех рассмотренных представителей комплекса. Стоит отметить, что рекомбинация для генома вируса Карши с проанализированными вирусами ККЭ не установлена вследствие незначительной разницы значений гомологии (1,6-10 %). В пользу этого свидетельствует проведённый нами анализ процента дивергенции по различным белкам и по полному полипротеину среди представителей группы клещевого энцефалита.

3.2. 5'-концевая нетранслируемая область генома

Размер 5'-нетранслируемого региона (НТР) вируса Карши составляет 127 н.о. В ходе работы была предсказана вторичная структура этого региона с применением программного обеспечения Gene Quest из пакета программ DNA STAR (рис. 1) и сопоставлена с аналогичными последовательностями других вирусов ККЭ.

Вторичная структура этого участка имеет элементы сходства со структурой нетранслируемых областей представителей ККЭ, близких к данному вирусу.

Самая маленькая шпилька содержит внутри себя консервативную последовательность. Внутри большой шпильчатой структуры находится регион (позиции 58 – 82 н.о.), нуклеотидная последовательность которого весьма отличается от аналогичных структур близкородственных вирусов. У вируса Карши этот участок имеет в своём составе делецию в 6 н.о. В ходе анализа выровненных нуклеотидных последовательностей основных представителей ККЭ оказалось, что 5'НТР генома вируса Карши

демонстрирует наибольшую степень гомологии с аналогичным участком вируса *Powassan* (83,8 %).

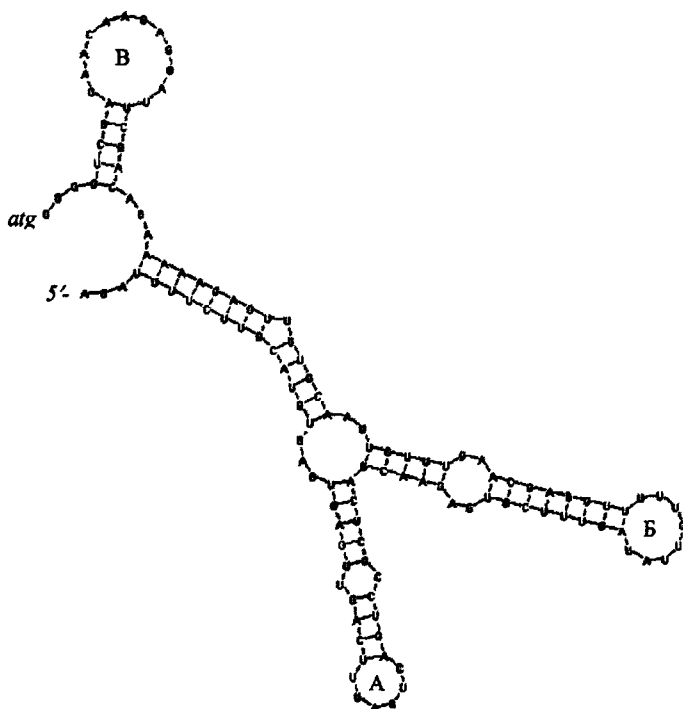


Рисунок 1 Предсказанная вторичная структура 5'НТР РНК вируса Карши (штамм *LEIV-7192 Tur*). Буквами А, Б и В отмечены основные шпильчатые структуры.

4. Филогенетические взаимоотношения вируса Карши и других представителей рода *Flavivirus*

Большинство исследователей рассматривают филогенетические взаимоотношения вирусов внутри рода *Flavivirus* по последовательности консервативного гена *NS5*, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу. Поэтому для проведения аналогичного анализа по установлению филогенетических связей вируса Карши с различными представителями рода *Flavivirus* были взяты 82 штамма, для которых известна первичная структура полного генома или нуклеотидная последовательность участка гена,

кодирующая белок NS5. В результате филогенетического анализа по участку гена NS5 (рис. 2) можно утверждать, что вирус Карши принадлежит к антигенному комплексу клещевого энцефалита (Kuno et al., 1998).

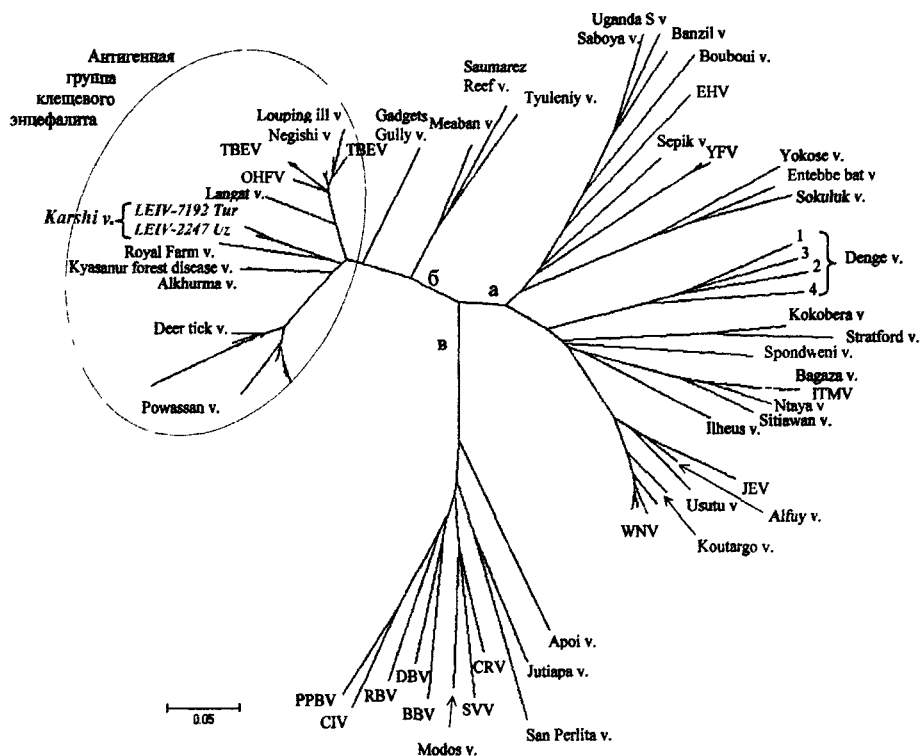


Рисунок 2. Филогенетическое древо рода *Flavivirus* по участку гена NS5.

Филогенетический анализ с использованием аминокислотных последовательностей длиной 331 ак проводили на основе алгоритма «ближайшего соседа» в рамках 2-параметрической модели М. Кимуры с последующим 5000-кратным ресэмплингом (MEGA 3.1).

PPBV – Phnom Penh bat virus, CIV – Carey Island virus, DBV – Dakar bat virus, RBV – Rio Bravo virus, BBV – Bukalasa bat virus, SVV – Sal Vieja virus, CRV – Cowbone Ridge virus, WNV – West Nile virus, TBEV – Tick-borne encephalitis virus, OHFV – Omsk hemorrhagic fever, EHV – Edge Hill virus, YFV – Yellow fever virus, ITMV – Israel turkey meningoencephalitis virus, MVEV – Murray Valley encephalitis virus, JEV – Japanese encephalitis virus

а – группа вирусов, переносимые комарами (mosquito-borne virus)

б – группа вирусов, переносимые клещами (tick-borne virus)

в – группа вирусов, для которых не известен переносчик (no known vector virus)

Оказалось, что изучаемые штаммы вируса Карши наиболее близки к малоизученному вирусу *Royal Farm*. Вероятно, вместе они образуют отдельный кластер внутри антигенного ККЭ. Основываясь на филогенетическом анализе можно предположить, что рассматриваемые вирусы генетически удалены друг от друга на расстояния, превышающие межштаммовые различия. Так, генетическое расстояние по участку гена *NS5* между вирусом *Royal Farm* и Карши составила 13,6-13,9 %, а между двумя предполагаемыми штаммами *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur* - 3,0 %.

Представляет интерес уточнение филогенетического положения вируса Карши внутри группы клещевого энцефалита. Стоит заметить, что вопрос об уровне различий антигенных вариантов вирусов комплекса клещевого энцефалита неоднократно дискутировался и до сих пор остаётся открытым. С этой целью мы проанализировали максимальное количество разнообразных штаммов и вирусов, известных на сегодняшний день.

Было проведено филогенетическое сравнение штаммов по полным нуклеотидным последовательностям генома представителей комплекса ККЭ, известных на сегодняшний день (17 вирусов) со штаммами вируса Карши (рис. 3).

Оказалось, что штамм *LEIV-2247 Uz* имеет максимальную степень гомологии со штаммами *Vasilchenko* восточносибирского субтипа и *Soffin-NO* дальневосточного субтипа вируса *TBE* (71,2 %) и минимальную (69,8 %) с вирусом *Deer tick* (штамм *ctb30*) и *Louping ill* (штамм 369/T2). Максимальная степень гомологии штамма *LEIV-7192 Tur* была со штаммом *Vasilchenko* вируса *TBE* (71,0 %), а минимальная с вирусом *Deer tick* (69,5 %). Можно предположить, что анализируемый вирус достаточно удалён от всех представителей своего серокомплекса и образует отдельную генетическую ветвь. К сожалению, из-за отсутствия знаний о структуре полного генома вируса *Royal Farm* мы не можем оценить его степень гомологии со штаммами вируса Карши.

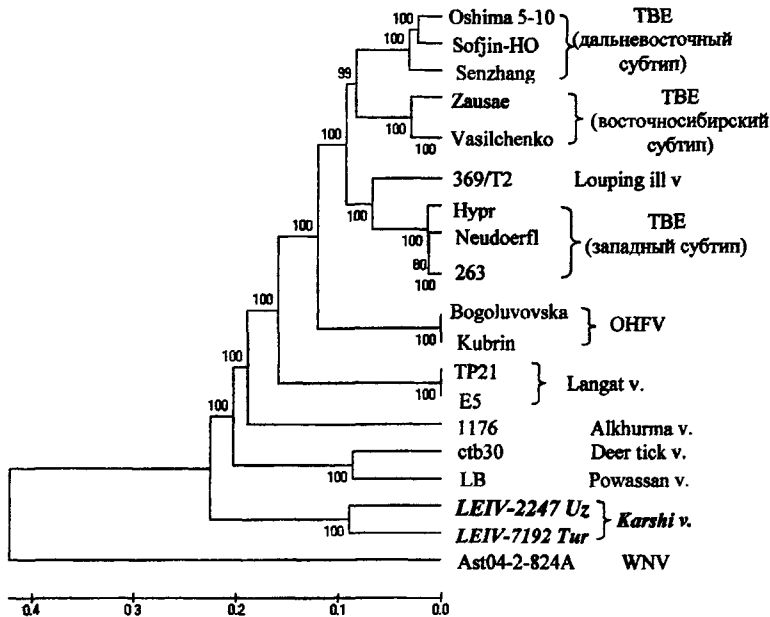


Рисунок 3. Филогенетическое древо для вирусов, принадлежащих к антигенному комплексу клещевого энцефалита с известным полным геномом.

Филогенетический анализ с использованием аминокислотных последовательностей длиной 3421 ак проводили на основе алгоритма «ближайшего соседа» в рамках 2-параметрической модели М. Кимуры с последующим 5000-кратным ресэмплингом (MEGA 3.1). В качестве аутгруппы был взят штамм вируса Западного Нила (WNV)

OHFV – Omsk hemorrhagic fever

TBEV – Tick-borne encephalitis virus

Географическая удалённость штаммов вируса Карши, выделенных в Узбекистане и Туркмении, позволила предположить о различиях в первичной структуре их геномной РНК. Учитывая противоречия, которые возникли по вопросу классификации представителей данного комплекса, важно оценить являются ли изоляты *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur* генетическими разновидностями одного вируса Карши или же разными вирусами. Генетическое расстояние, оцененное на основании полной первичной структуры генома (рис.3), между штаммами вируса Карши (дивергенция 5,5 %) сопоставимо с различиями между субтипами *TBEV*

(дивергенция 4,9–7,1 %). Следовательно, изоляты анализируемого вируса следует рассматривать как различные генотипы вируса Карши.

К сожалению, не для всех представителей анализируемой нами антигенной группы известна структура полного генома, поэтому многими исследователями для установления положения вирусов внутри антигенного комплекса клещевого энцефалита использовались аминокислотные или нуклеотидные последовательности генов *E* и *NS5* или даже их участков.

Для того чтобы ответить на вопрос о правомерности использования участка гена *E* и *NS5* для филогении, были сопоставлены данные филогенетических анализов по перечисленным генам с данными по полному геному. При сравнении дендрограмм оказалось, что они хорошо коррелируют между собой, при этом топология всех ветвей была аналогичной, менялись лишь относительные величины длин филогенетических ветвей. Следовательно, можно говорить о правомерности использования нуклеотидных последовательностей генов *E* и *NS5* для естественной классификации вирусов ККЭ.

В международной базе данных Gen Bank по гену, кодирующему гликопротеин оболочки вириона (*E*), опубликовано максимальное количество нуклеотидных и аминокислотных последовательностей различных штаммов и вирусов рассматриваемого комплекса. Филогенетический анализ с использованием нуклеотидных последовательностей всех известных представителей комплекса клещевого энцефалита (рис. 4) достоверно подтвердил ранее продемонстрированные в данной работе представления о положении внутри него вируса Карши. Топология распределения основных генетических кластеров аналогична предыдущим исследованиям. Исследуемые изоляты вируса Карши отличаются от других представителей антигенного комплекса. Минимальное значение дивергенции, определённое по участку гена *E*, штаммов вируса Карши оказалось со штаммом 1467 *TBEV* 30,4 %, отнесённого к восточносибирскому субтипу, а максимальное – со штаммом *N132* дальневосточного субтипа *TBEV* (38,9 %).

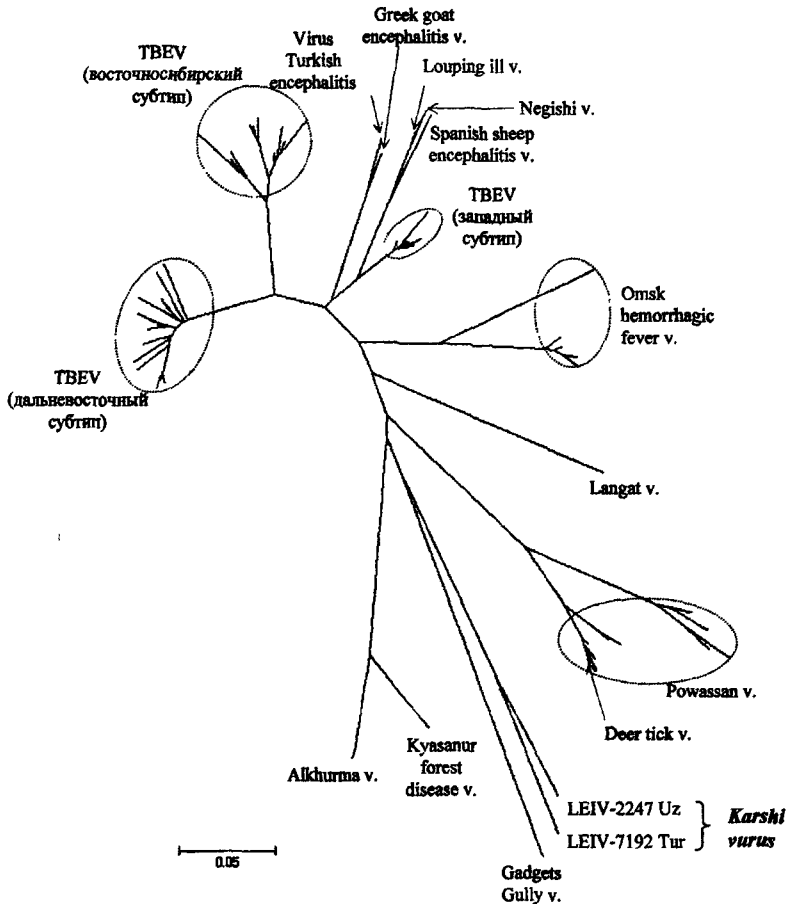


Рисунок 4. Филогенетическое древо для штаммов вирусов комплекса клещевого энцефалита по участку белка E.

Филогенетический анализ с использованием аминокислотных последовательностей длиной 126 ак проводили на основе алгоритма «ближайшего соседа» в рамках 2-параметрической модели М. Кимуры с последующим 5000-кратным ресэмплингом (MEGA 3.1).

TBEV – Tick-borne encephalitis virus

Если мы рассмотрим неоднородный кластер вируса *Powassan*, то значения дивергенции вируса Карши относительно этой группы находятся в диапазоне 31,5 – 38,6 %. Это снова подтверждает предположение о том, что он равноудалён относительно всех известных представителей ККЭ.

Не так давно вирус Карши наряду с вирусом *Gadgets Gully* был отнесён к различным субтипам вируса *Royal Farm* [Gritsun T.S., 2003]. Мы оценили генетические расстояния между этими вирусами и сопоставили их с показателями дивергенции между различными вирусами, а также между субтипами и генотипами одной генетической ветви среди представителей ККЭ. Сравнительный анализ был проведён по участку гена *NS5* (1000 н.о.), так как по нему известны последовательности всех трёх анализируемых вирусов (рис 2.).

Оказалось, что значения дивергенции между вирусами *Gadgets Gully* и Карши (14,8-16 %), *Gadgets Gully* и *Royal Farm* (16,3 %), а также между *Royal Farm* и Карши (13-13,3 %) значительно превышают показатели дивергенции между различными субтипами *TBEV* (2,7-7 %) и сопоставимы с генетическими расстояниями между различными вирусами в пределах ККЭ. Следовательно, все три вируса не являются субтипами одного вируса, каждый из них представляет собой отдельную генетическую ветвь. Тем не менее, к вирусу Карши наиболее близок вирус *Royal Farm*, выделенный в Афганистане.

5. Создание лабораторного варианта ОТ-ПЦР для специфичной детекции геномной РНК вируса Карши

С использованием данных о структуре геномов различных генотипов вирусов Карши был создан лабораторный вариант ОТ-ПЦР для выявления геномной РНК вируса Карши (рис.5). Условия данного метода были оптимизированы, а система ОТ-ПЦР проверена на специфичность с различными представителями ККЭ.

С помощью данной системы обнаружены варианты вируса Карши двух основных генетических линий, известных к настоящему времени.

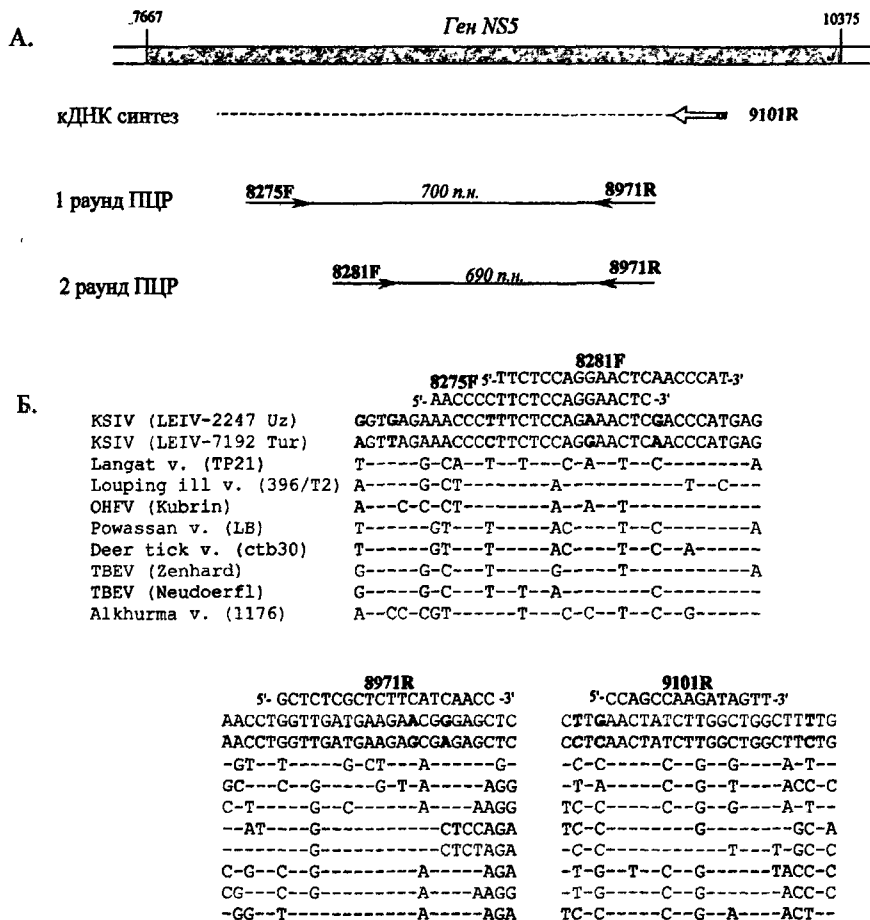


Рисунок 5. Схематическое изображение ОТ-ПЦР тест-системы для детекции вируса Карши (А.). Стрелками обозначены направления олигонуклеотидных праймеров. Цифровые обозначения праймеров не точно соответствуют их координатам на вирусном геноме. В 1-м и 2-м раундах ПЦР указывалась длина получаемого ампликона. Б. Алаймент нуклеотидных последовательностей вирусов ККЭ участка отжига олигонуклеотидных праймеров.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлена первичная структура практически полного генома вируса Карши штамма *LEIV-2247 Uz* (10653 н.о.), выделенного в Узбекистане, и штамма *LEIV-7192 Tur* (10768 н.о.), изолированного в Туркмении. Проведено сравнительное изучение функциональных сайтов структурных и неструктурных белков и сайтов нарезания полипротеина между двумя штаммами вируса Карши и другими представителями комплекса клещевого энцефалита.
2. Определена первичная и предсказана вторичная структуры 5'-нетранслируемого региона вируса Карши. Сравнительный анализ этого участка генома вирусов комплекса клещевого энцефалита показал, что последовательность, образующая большую шпильчатую структуру является вариабельной и несёт в своём составе делецию протяженностью 6 н.о.
3. Показано, что у изученных штаммов вируса Карши гликопротеин оболочки вириона *E* имеет максимальное сходство с белками вирусов, вызывающих энцефалиты. Установлено, что оба штамма в позиции 76 белка *E* имеют замену с *Ala* на *Thr*, что характерно для нейротропных вирусов комплекса клещевого энцефалита.
4. На основе полученных данных филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей генов *E* и *NS5*, которые хорошо коррелируют с результатами филогенетического анализа полного генома, установлено, что вирус Карши равноудалён от всех представителей комплекса клещевого энцефалита и образует отдельный генетический кластер, к которому, по-видимому, принадлежит и вирус *Royal Farm*.
5. Сравнительный генетический анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов штаммов *LEIV-2247 Uz* и *LEIV-7192 Tur* относительно других представителей комплекса клещевого

энцефалита позволил установить, что они принадлежат к разным генотипам вируса Карши.

6. На основе гена *NS5* разработан лабораторный вариант ОТ-ПЦР для детекции геномной РНК вируса Карши, позволяющий специфично выявлять этот вирус среди других представителей комплекса клещевого энцефалита.

Список работ опубликованных по теме диссертации.

1. **Ляпина О.В.,**Prilipov A.G.,Gromashevsky V.L.Analysis of the complete genome sequence of Karshi virus. // Poster on the 2nd. European Congress of Virology (EuroVirology-2004). - Madrid, September 5-9.
2. **Ляпина О.В.,** Громашевский В.Л., Прилипов А.Г. Организация генома вируса Карши (штамм LEIV-2247 Uz) и его филогенетические взаимоотношения с представителями рода *Flavivirus*. // Мол. Ген. Микробиол. Вирусол. – 2006. - № 4. - стр. 28-32. (в печати)
3. **Ляпина О.В.** Структура и анализ генома вируса Карши. // Тезисы на 9-ую Международную Пушинскую школу-конференцию молодых ученых "Биология - наука XXI века". - 18-22 апреля 2005.
4. **Ляпина О.В.,** Прилипов А.Г., Громашевский В.Л. Полная нуклеотидная последовательность генома штамма LEIV-2247 Uz, депонированная в международную базу данных GenBank - AY863002 (NC_006947).
5. **Ляпина О.В.,** Прилипов А.Г., Громашевский В.Л. Полная нуклеотидная последовательность генома штамма LEIV-7192 Tur, депонированная в международную базу данных GenBank - DQ462443.

2006A
7925

Р-7925

3

317

Заказ №638. Объем 1 п.л. Тираж 100 экз.

Отпечатано в ООО «Петроруш».

г. Москва, ул. Палиха-2а, тел. 250-92-06

www.postator.ru