

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 57.022

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ 5'-НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ  
ГЕНОМА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА  
ИЗ РАЗНЫХ РЕГИОНОВ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ<sup>1</sup>

© 2021 г. Е. П. Пономарева<sup>а</sup>, \*, В. А. Терновой<sup>а</sup>, Т. П. Микрюкова<sup>а</sup>,  
Е. В. Протопопова<sup>а</sup>, Н. Л. Тупота<sup>а</sup>, В. Б. Локтев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”,  
Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия

\*e-mail: [ponomareva\\_ep@vector.nsc.ru](mailto:ponomareva_ep@vector.nsc.ru), [ponomareva-eugenia2014@yandex.ru](mailto:ponomareva-eugenia2014@yandex.ru)

Поступила в редакцию 22.07.2020 г.

После доработки 13.10.2020 г.

Принята к публикации 15.11.2020 г.

Проведен анализ нуклеотидных последовательностей 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) геномной РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), выделенной из 39 особей таежных клещей, собранных в различных регионах Северной Евразии. Идентичность последовательностей 5'-UTR сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ составила 89 и 95%, соответственно, в сравнении с прототипными штаммами (Заусаев и 205). Обнаруженные замены характерны для этих двух генотипов ВКЭ, что позволяет однозначно идентифицировать их. В 5'-UTR РНК выявлены вариабельные и консервативные мотивы. Наибольшей вариабельностью отличались элементы В2, С1 и С2 Y-образной структуры 5'-UTR и предполагаемый сайт связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Элементы А2, СS А, СS В и стартовый кодон были консервативными. При этом в вариабельном элементе С1 5'-UTR ВКЭ, выделенного из клещей из различных географических районов, пять замен были строго консервативными, тогда как у лабораторных вариантов ВКЭ в этом элементе выявлено 11 различных замен. Чуть менее трети нуклеотидных замен картированы вне основных элементов Y-образной структуры. Нуклеотидные замены, как правило, локализовались в петлевых структурах, не затрагивая шпильчатые области 5'-UTR ВКЭ. Полученные результаты показывают существенную вариабельность 5'-UTR геномной РНК лабораторных штаммов и полевых изолятов ВКЭ из таежных клещей, собранных в различных географических районах. Высказано предположение, что генетическая вариабельность 5'-UTR ВКЭ характерна для организации 5'-UTR генома ВКЭ и может быть структурной основой эффективной репликации ВКЭ в различных клетках птиц, млекопитающих и иксодовых клещей.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, вирусный геном, нуклеотидная последовательность, 5'-нетранслируемая область, геномная РНК

**DOI:** 10.31857/S0026898421030149

## ВВЕДЕНИЕ

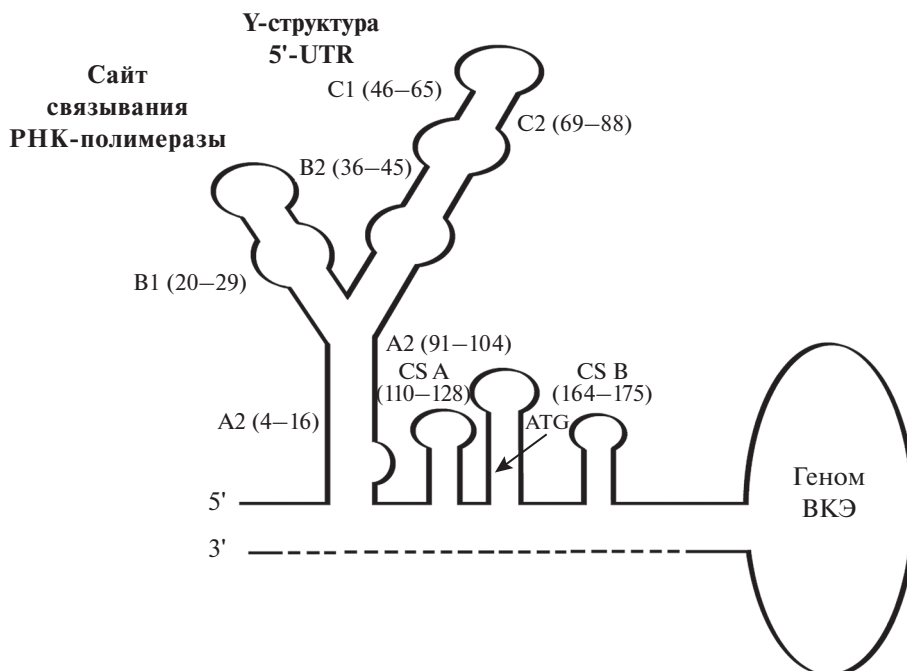
Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к семейству *Flaviviridae*, род *Flavivirus* [1]. Этот род включает относительно просто устроенные РНК-содержащие сферические оболочечные вирусы размером 40–60 нм. Геном ВКЭ представлен одноцепочечной РНК(+) длиной ~9200–11000 нуклеотидов [1]. Геномная РНК кодирует один полипротеин, который подвергается процессингу вирусными и клеточными протеазами с образованием структурных и неструктурных ви-

русных белков. Геномная флавиовирусная РНК фланкирована 5'- и 3'-нетранслируемыми районами (UTR), принципиально важными для инициации вирусной репликации и формирования репликативного комплекса с участием вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы [2, 3]. Принято считать, что для репликации флавиовирусной РНК необходима циклизация генома с образованием дцРНК из последовательностей 5'- и 3'-UTR и формированием структуры типа “сковорода с ручкой” [4–6] (рис. 1). Последовательность внутри консервативной петли “А” (А1, А2) опознается вирусной РНК-полимеразой, что необходимо для начала синтеза минус-цепи вирусной РНК.

Нуклеотидные замены в элементах СS А и СS В могут блокировать репликацию, даже если эле-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898421030149 для авторизованных пользователей.

Сокращения: 5'-UTR — 5'-нетранслируемая область; ВКЭ — вирус клещевого энцефалита.



**Рис. 1.** Предполагаемая вторичная структура генома вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) с обозначением основных структурных элементов 5'-UTR. Вторичная структура 5'-UTR геномной РНК ВКЭ предсказана с помощью сервера MFOLD 3.4 [7].

менты не теряют способность образовывать стабильные комплексы с 3'-UTR [8]. Показано, что варибельная область 5'-UTR геномной РНК критична для проявления вирулентности у мышей, а различия в 5'-UTR РНК природных вариантов ВКЭ приводят к различиям в эффективности репликации вируса [9, 10]. Варибельность 5'-UTR связывают также с адаптацией вируса к новым видам хозяев. Возможно, на особенности организации 5'-UTR влияет также длительность локальной микроэволюции ВКЭ в природных экосистемах [6, 11].

В нашей работе представлены результаты изучения генетического разнообразия 5'-UTR РНК ВКЭ, выделенной непосредственно из иксодовых клещей, преимущественно *Ixodes persulcatus*, собранных в различных регионах Северной Евразии.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Исследованные образцы.** Клещей (всего 591) собирали в Новосибирской области, в районе с. Бурмистрово, в городских биотопах Томска, Екатеринбургa и Владивостока, в южных и центральных районах Республики Коми и в Алтайском крае в весенний период 2014–2015 гг. Участки для сбора выбирали в типичных местах обитания клещей: лиственные и смешанные леса с хорошо развитым травянистым покровом, вырубки с естественным возобновлением лиственных пород, луга, обочины дорог. В городской чер-

те клещей отлавливали в парковых зонах. Сбор клещей проводили методом отлова “на флаг” во второй половине дня, когда наблюдается максимальная активность иксодовых клещей. Клещей транспортировали на влажной салфетке в сумках-холодильниках при температуре 4°C и хранили при температуре минус 18–24°C. Для определения вида клеща секвенировали фрагмент 16S рРНК, кодируемой митохондриальным геномом [12].

**Пробоподготовка.** Образцы растирали в ступке с 300 мкл стерильного физраствора. Нуклеиновые кислоты выделяли из 100 мкл гомогената с использованием пяти объемов монофазного водного раствора фенола и гуанидинизотиоцианата (ExtractRNA, “Евроген”, Россия), согласно инструкции производителя. кДНК синтезировали с использованием набора “MMLVRT kit” (“Евроген”) согласно инструкции производителя. ПЦР проводили с использованием наборов “БиоМастер LRHS-ПЦР” (“BioLabMix”, Россия) в прилагаемом буфере с олигонуклеотидными праймерами, комплементарными исследуемым локусам РНК ВКЭ [6]. Температурные параметры ПЦР (амплификатор T100, “Bio-Rad”, США): 94°C, 10 с; 58°C, 20 с; 72°C, 30 с (40 циклов); 72°C – 7 мин.

**Электрофоретический анализ и выделение фрагментов ДНК из геля.** Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле в буфере 1× TAE (40 мМ Трис, 2 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, уксусная кислота, pH 8.0). Для выделе-

ния продуктов амплификации из агарозного геля использовали набор *diaGene* (“Диа-М”, Россия).

**Определение нуклеотидных последовательностей ДНК.** Нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определяли с использованием автоматического генетического анализатора *ABI 3130xl* (“Applied Biosystems”, США) и набора реактивов *BigDye Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit* (“Applied Biosystems”) согласно инструкции производителя. Нуклеотидные последовательности определяли не менее 2 раз в независимых экспериментах. Нуклеотидные последовательности выравнивали при помощи приложения *Lasergene 7 (DNASTAR)*. Последовательности сравнения получены из базы данных *GenBank*. Множественное выравнивание проводили при помощи приложения *AlignX* программного пакета *Vector NTI 11 (InforMax)*. Филогенетический анализ последовательностей штаммов и изолятов ВКЭ проводили при помощи программы *MEGA* [13]. Экспериментально определенные последовательности депонированы в *GenBank* под номерами: *MT002379–MT002390*, *MT002802–MT002815*, *MT015646–M015648*, *KT205274–KT205282*.

Вторичная структура 5'-UTR геномной РНК ВКЭ предсказана с помощью сервера *MFOLD 3.4* [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Обнаружение ВКЭ в клещах.** В работе использовали 591 взрослого клеща *I. persulcatus*. Соотношение самцов и самок в выборке было примерно одинаковым. Вирусная РНК обнаружена в 39 образцах, что составило в среднем 6.6%.

**Генотипирование природных изолятов ВКЭ.** Определение нуклеотидной последовательности 5'-UTR вирусного генома позволило провести генотипирование 39 природных изолятов ВКЭ. Обнаружены сибирский и дальневосточный генотипы ВКЭ (рис. 2). Средний уровень идентичности 5'-UTR ВКЭ у отдельных дальневосточных клещей составил 95, 89% – у сибирского генотипа ВКЭ в сравнении с прототипными штаммами.

**Анализ варибельности 5'-UTR ВКЭ.** Сравнение нуклеотидных последовательностей 5'-UTR ВКЭ выявило множественные замены с паттерном, характерным для сибирского и дальневосточного генотипов. Дальневосточные варианты отличались от прототипных лабораторных штаммов ВКЭ (205 и Заусаев) 17–22 заменами, а сибирские генотипы – 16–19. Паттерн нуклеотидных замен позволяет генотипировать изоляты ВКЭ на основе анализа относительно короткого фрагмента генома и показывает выраженную изменчивость нуклеотидной последовательности 5'-UTR у лабораторных и клещевых вариантов ВКЭ.

Замены располагались неравномерно, так анализ 5'-UTR дальневосточных и сибирских изоля-

тов показал, что элементы В2, С1, С2 Y-образной структуры 5'-UTR (табл. 1) содержат множественные нуклеотидные замены. В то же время элементы А2, С5 А и С5 В и стартовый кодон не содержат или содержат единичные замены. Полученные данные подтверждают существование консервативных и варибельных районов в 5'-UTR РНК ВКЭ. Причем районы вне основных структурных элементов 5'-UTR также содержали множественные замены. Следует отметить, что в штаммах ВКЭ, культивируемых в лабораторных условиях, количество замен в элементе С1 и вне основных доменов было в 2 раза больше, чем в природных изолятах ВКЭ. В штаммах ВКЭ, культивируемых в условиях лаборатории, накапливаются адаптивные нуклеотидные/аминокислотные замещения. Это позволяет предположить, что эти районы могут быть вовлечены в адаптацию ВКЭ к культивированию на клетках млекопитающих.

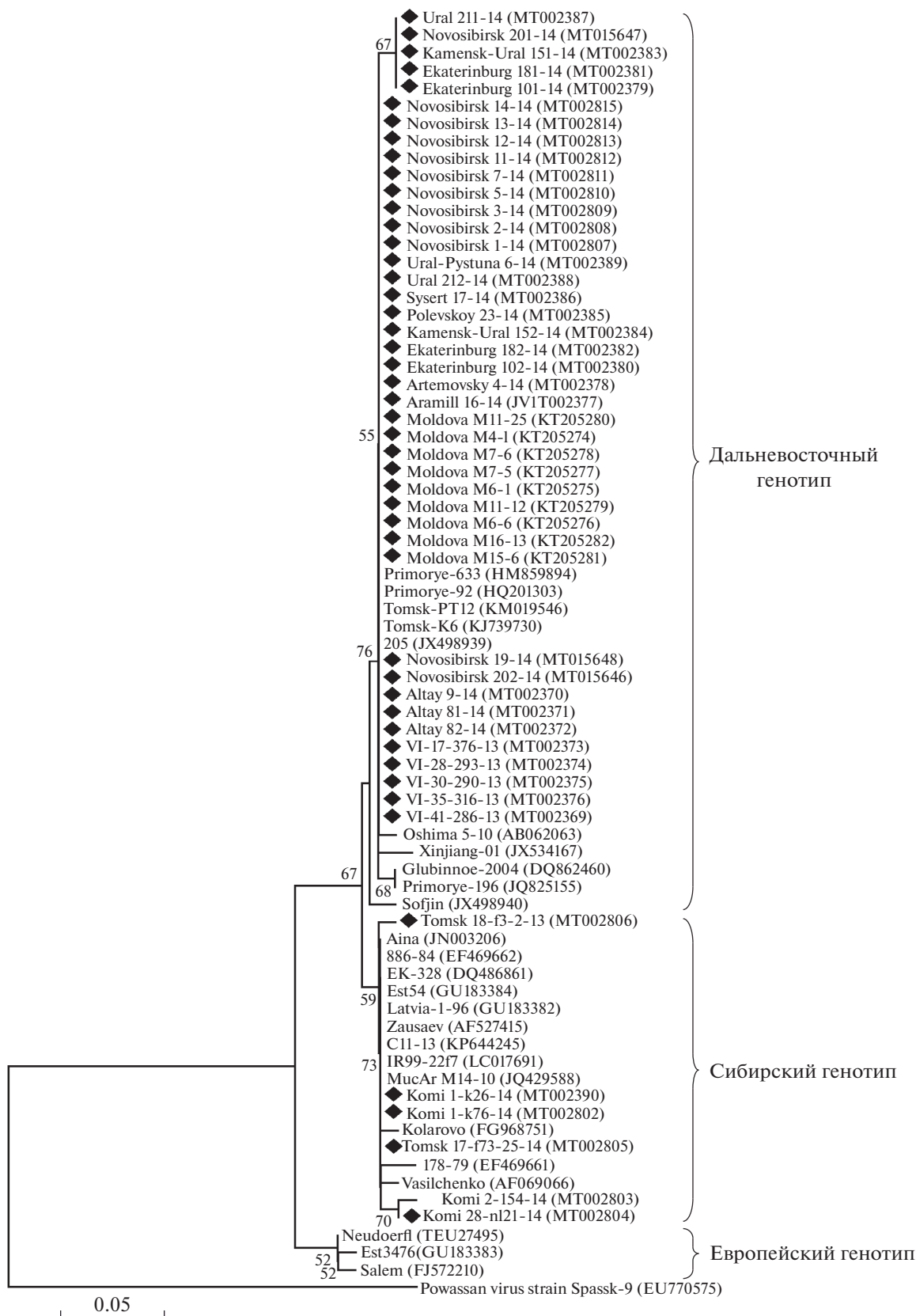
Следует отметить, что во всех 39 изолятах ВКЭ, выделенных из клещей, варибельный элемент С1 содержит пять строго консервативных замен, абсолютно идентичных во всех сибирских вариантах. Другой вариант замен в этом же элементе характерен для всех дальневосточных ВКЭ из клещей, собранных в разных географических районах. Консервативность замен в элементе С1 клещевых изолятов и более выраженная варибельность этого района у лабораторных штаммов ВКЭ говорят о возможной значимости этих замен для репликации вирусного генома в различных типах клеток.

Практически для всех изолятов ВКЭ из Республики Молдова характерна сдвоенная замена в позициях Т(30) и Т(35) на С между элементами В1 и В2 (рис. 3).

Эта сдвоенная замена ассоциирована с участком связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы [14]. Одним из возможных объяснений наблюдаемой ситуации может быть участие данных замен в адаптации ВКЭ к различным природным условиям и/или к новым типам хозяев.

На рис. 4 представлена предполагаемая модель циклизации 5'-UTR ВКЭ. Стрелками показано расположение нуклеотидных замен, обнаруженных в различных изолятах ВКЭ. В рамках модели Y-структуры 5'-UTR ВКЭ выявленные нуклеотидные замены картируются преимущественно в петлевых структурах, не затрагивая шпильчатые. Это дополнительно подтверждает предположение, согласно которому нуклеотидные замены в петлевых районах Y-структуры могут быть вовлечены в обеспечение эффективной репликации ВКЭ в клетках таежного клеща в различных районах Северной Евразии.

Ареал ВКЭ в основном совпадает с ареалом обитания клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* на значительной части Северной Евразии. ВКЭ вызывает



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей 5'-UTR ВКЭ, выделенных из отдельных таежных клещей. Дополнено 9 последовательностями 5'-UTR ВКЭ из клещей, собранных ранее в Республике Молдова [14]. ◆ — секвенированные последовательности 5'-UTR ВКЭ. Анализ проведен методом объединения ближайших соседей с использованием двухпараметрической модели Кимуры.

клещевой энцефалит (КЭ), поражающий преимущественно центральную нервную систему человека. Максимальная заболеваемость КЭ совпадает с пиками сезонной активности иксодовых клещей, обычно весной и в начале лета. В природных очагах КЭ клещи питаются на мелких млекопитающих и птицах, многие из которых также поддерживают циркуляцию ВКЭ [15, 16]. Заболеваемость КЭ постоянно регистрируется в новых странах Западной Европы, что указывает на формирование природных очагов КЭ в районах, которые ранее считались неэндемичными по КЭ [17]. В настоящее время в странах Балтии и Словении КЭ встречается почти с такой же частотой, как и в европейской части Российской Федерации. Это предполагает, что ВКЭ должен обеспечивать репликацию собственного генома и получение вирусного потомства в различных видах хозяев. Птицы, мелкие млекопитающие и клещи обеспечивают формирование природных очагов КЭ и служат принципиальными хозяевами ВКЭ. Биологические различия клеток клещей, птиц и млекопитающих очень существенны, как и температурные факторы, необходимые для эффективной репликации ВКЭ в этих типах клеток.

Успешность адаптации ВКЭ к изменяющимся условиям может быть обеспечена определенными

генетическими механизмами. Предполагается, что вариабельность нуклеотидной последовательности 5'-UTR может предопределять эффективность репликации ВКЭ в иксодовых клещах и в клетках других резервуарных хозяев в природных очагах [11]. Это предположение основано на данных о локализации в 5'-UTR геномной РНК флавивирусов сайтов связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы и взаимодействии с рибосомами клетки хозяина для обеспечения синтеза вирусного полипротеина.

Проведенный ранее анализ нуклеотидной последовательности 5'-UTR геномной РНК ВКЭ, выделенной из таежных клещей, показал, что этот район вирусного генома весьма вариабелен и содержит как консервативные, так и вариабельные структурные элементы [6, 18]. В нашей работе география сбора клещей была расширена. Вирусная РНК обнаружена в 6.6% тестированных таежных клещей. Большинство изолятов ВКЭ принадлежали к дальневосточному генотипу, и только образцы из Республики Коми и Томска группировались с известными геновариантами сибирского генотипа ВКЭ. Выраженное доминирование дальневосточного генотипа ВКЭ у иксодовых клещей свидетельствует в пользу того, что в исследованных природных и городских очагах

**Таблица 1.** Распределение количества нуклеотидных замен в основных элементах 5'-UTR ВКЭ

Элемент 5'-UTR ВКЭ	Общее количество нуклеотидных замен в изолятах и лабораторных штаммах в сравнении с прототипными штаммами ВКЭ			
	штамм Заусаев/последовательности клещевых изолятов ВКЭ*	штамм 205/последовательности клещевых изолятов ВКЭ*	штамм Заусаев/лабораторные штаммы ВКЭ**	штамм 205/лабораторные штаммы ВКЭ**
Консервативные элементы 5'-UTR ВКЭ				
A2	0	0	1	1
CS A	0	0	0	0
ATG	0	0	0	0
CS B	1	1	2	2
Вариабельные элементы 5'-UTR ВКЭ				
B2	4	4	3	3
C1	5	5	11	11
C2	8	10	10	12
Замены вне основных элементов	8	8	19	19

Примечание. Указано общее количество нуклеотидных замен в изолятах и в лабораторных штаммах по отношению к прототипным ВКЭ (штаммы 205 и Заусаев).

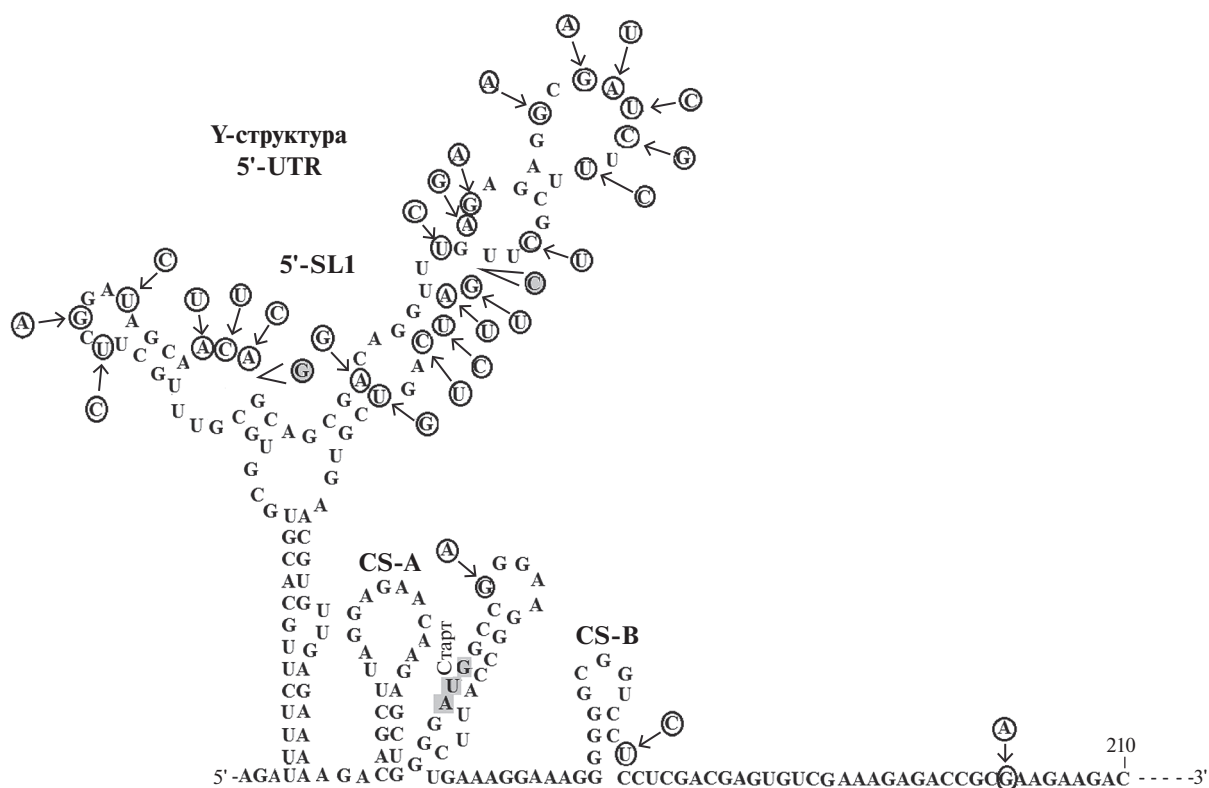
\* Используются природные изоляты: Республика Молдова – 9 изолятов ВКЭ (КТ205274–КТ205282), Уральский регион – 13 (МТ002377–МТ002389), Республика Коми – 4 (МТ002390, МТ002802–МТ002804), Томск – 2 (МТ002805, МТ002806), Новосибирск – 12 (МТ002807–МТ002815, МТ015646–МТ015648), Алтай – 3 (МТ002370–МТ002372), Владивосток – 5 (МТ002369, МТ002373–МТ002376).

\*\* Используются лабораторные штаммы ВКЭ: Заусаев, Васильченко, С11-13, Коларово, Латвия-1-96, ЕК-328 (все сибирский генотип), 205, Глубинное-2004, Софьин, Томск-РТ12, Томск К6, Oshima 5-10 (дальневосточный генотип), Neudoerf (европейский генотип).



Novosibirsk 1-14 (MT002807)	A	C	G							T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											17	
Novosibirsk 2-14 (MT002808)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											17	
Novosibirsk 3-14 (MT002809)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											17	
Novosibirsk 5-14 (MT002810)		A	C	G						T	A	G			G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	
Novosibirsk 7-14 (MT002811)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											17	
Novosibirsk 11-14 (MT002812)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											17	
Novosibirsk 12-14 (MT002813)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											14	
Novosibirsk 13-14 (MT002814)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											14	
Novosibirsk 14-14 (MT002815)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											14	
Novosibirsk 19-14 (MT015648)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											14	
Novosibirsk 20-14 (MT015647)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											14	
Novosibirsk 202-14 (MT015646)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											17	
Altay 9-14 (MT002370)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											16	
Altay 81-14 (MT002371)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											17	
Altay 82-14 (MT002372)		A	C	G						T	A	G			G	A	T	C			C			G	T	C											17	
VI-17-376-13 (MT002373)		A	C							T	A	G			G	T	A	T	C				C		-	G	T	C									17	
VI-28-293-13 (MT002374)		A	C	-						T	A	G			G	G	A	T	C				C		-	G	T	C									16	
VI-30-290-13 (MT002375)		A	C	-						T	A	G			G	T	A	T	C				C		-	G	T	C									16	
VI-35-316-13 (MT002376)		A	C	-						T	A	G			G	G	A	T	C				C		-	G	T	C									16	
VI-41-286-13 (MT002369)		A	C	-						T	A	G			G	G	A	T	C				C		-	G	T	C									16	
Выделенные изоляты (Сибирский генотип)																																						
Komi 1-k26-14 (MT002390)																																						1
Komi 1-k76-14 (MT002802)																																						1
Komi 2-154-14 (MT002803)																																						0
Komi 28-n121-14 (MT002804)																																						2
Tomsk I7-473-25-14 (MT002805)																																						3
Tomsk 18-43-2-13 (MT002806)		A																																				3

Рис. 3. Окончание.



**Рис. 4.** Локализация нуклеотидных замещений в 5'-UTR ВКЭ таежных клещей. Стрелками показаны замещения и их позиции в 5'-UTR различных изолятов ВКЭ. Структура РНК построена на основе последовательности генома штамма 205. Вторичная структура 5'-UTR геномной РНК ВКЭ предсказана с помощью сервера MFOLD 3.4 [7].

КЭ доминирует именно дальневосточный генотип ВКЭ. Эпидемиологическая значимость широкого распространения дальневосточного генотипа ВКЭ связана с его более высокой патогенностью для человека. Так, летальность от КЭ, вызываемого вариантами ВКЭ, циркулирующими в Приморском крае, может достигать 30% и более. Европейские и сибирские геноварианты ВКЭ вызывают более легкую форму заболевания с низким уровнем летальности (1–2%) [19].

Сравнение нуклеотидных последовательностей 5'-UTR сибирских и дальневосточных клещевых вариантов ВКЭ выявило множественные нуклеотидные замены даже в относительно короткой последовательности из 181 нуклеотида. Варианты дальневосточного генотипа ВКЭ отличаются 17–22 нуклеотидными заменами от последовательности штамма Заусаев сибирского генотипа. В исследованных вариантах сибирского генотипа картированы 16–19 замен, отличающие их от штамма 205 ВКЭ. Столь выраженные генетические различия в 5'-UTR ВКЭ позволяют на основе анализа последовательности короткого фрагмента генома однозначно генотипировать различные изоляты ВКЭ в пределах сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ. С другой стороны, это дополнительно подтверждает суще-

ствование выраженных генетических различий в 5'-UTR генома ВКЭ, изолированных из таежных клещей и собранных в различных географических регионах.

Наблюдаемые генетические отличия крайне неравномерно распределены по основным элементам 5'-UTR ВКЭ. Элементы CS A и старт-кодон ATG абсолютно консервативны, и нам не удалось выявить замен во всех секвенированных вариантах этих элементов. Консервативность элемента CS A, по всей вероятности, связана с его участием в эффективной инициации РНК-полимеразы и синтезом РНК различных флавивирусов [20]. Конформация этого района определяет как циклизацию генома, так и репликацию вирусной РНК, что предопределяет консервативность нуклеотидной последовательности данных элементов 5'-UTR генома ВКЭ.

В элементах B2, C1, C2 клещевых вариантов 5'-UTR ВКЭ выявлено от 4 до 10 замен, а в культивируемых в лаборатории штаммах ВКЭ — от 3 до 11 замен. Вне основных элементов 5'-UTR в клещевых вариантах ВКЭ обнаружено восемь замен, а в культивируемых штаммах найдено 19 замен, что позволило отнести эти районы к вариabельным последовательностям 5'-UTR. Биологический смысл подобной генетической изменчивости



может быть связан с необходимостью обеспечить репликацию вируса в различных типах клеток и в различных хозяевах. Клетки клещей существенно отличаются от клеток птиц и млекопитающих. Температура клеща фактически не отличается от температуры окружающей среды, поэтому для синтеза вирусной РНК и вирусных белков ферментные системы должны сохранять активность при пониженных температурах.

Показано, что во всех 39 изолятах ВКЭ, выделенных из клещей, вариабельный элемент С1 несет пять замен, абсолютно идентичных во всех сибирских вариантах, для дальневосточных вариантов ВКЭ характерны другие замены.

В последовательности между элементами В1 и В2 выявлены две замены в позициях Т(30) и Т(35) на С, характерные только для клещевых вариантов ВКЭ из Республики Молдова [14] и ассоциированные с участком связывания 5'-UTR с вирусной РНК-полимеразой. Ранее эту сдвоенную замену выявили в высокопатогенном для человека дальневосточном штамме Глубинное ВКЭ [21], который отличается высокой эффективностью синтеза вирусных белков и формирования инфекционных частиц. По этим показателям штамм Глубинное в 5–10 раз превышает прототипный штамм 205 дальневосточного генотипа ВКЭ.

Полученные данные подтверждают идею о том, что вариабельность 5'-UTR ВКЭ отражает особенности строения генома флавивирусов, обеспечивающие максимальную эффективность репликации в клетках птиц, млекопитающих и клещей. Обнаруженные множественные нуклеотидные замены, по всей вероятности, могут приводить к изменению вторичной структуры РНК 5'-UTR генома ВКЭ и имеют принципиальное значение для адаптации вируса в природных очагах к новым видам переносчиков и хозяев. Знание и понимание пределов вариабельности вирусного генома принципиально важно как для лучшей диагностики флавивирусных инфекций, так и для совершенствования профилактики и лечения КЭ.

Статья поддержана Отраслевой научно-исследовательской программой Роспотребнадзора № 141-00080-20-02.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simmonds P., Becher B., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D.B., Stapleton J.T., ICTV Report Consortium. (2017) ICTV virus taxonomy profile: flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2–3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
2. Markoff L. (2003) 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv. Virus Res.* **59**, 177–228. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59006-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59006-6)
3. Khromykh A.A., Sedlak P.L., Westaway E.G. (2000) Cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *J. Virol.* **74**, 3253–3263. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3253-3263.2000>
4. Alvarez D.E., Lodeiro M.F., Luduena, J., Pietrasanta L.I., Gamarnik A.V. (2005) Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* **79**, 6631–6643. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11>
5. Filomatori C.V., Lodeiro M.F., Alvarez D.E., Samsa M.M., Pietrasanta L., Gamarnik A.V. (2006) A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* **20**, 2238–2249. <https://doi.org/10.1101/gad.1444206>
6. Chausov E.M., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Kononova J.V., Konovalova S.N., Pershikova N.L., Loktev V.B., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bolshakova N.P., Moskvitina N.S. (2010) Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5' noncoding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskiyi* in Western Siberia. *Vector-Borne Zoonotic Diseases.* **10**, 365–375. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0064>
7. Markham N.R., Zuker M. (2008) *UNAFold*. *Bioinformatics*. Humana Press. 3–31.
8. Alvarez D.E., Filomatori C.V., Gamarnik A.V. (2008) Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3' UTRs. *Virology.* **375**, 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.014>
9. Sakai M., Yoshii K., Sunden Y., Yokozawa K., Hirano M., Kariwa H. (2014) Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. *J. Gen. Virol.* **95**, 823–835. <https://doi.org/10.1099/vir.0.060046-0>
10. Sakai M., Muto M., Hirano M., Kariwa H., Yoshii K. (2015) Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR. *Virus Res.* **203**, 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.006>
11. Casati S., Gern L., Pifaretti J.-C. (2006) Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern). *J. Gen. Virol.* **87**, 2235–2241. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81783-0>
12. Kartashov M.Y., Glushkova L.I., Mikryukova T.P., Korabelnikov I.V., Egorova Y.I., Tupota N.L., Protopopova E.V., Konovalova, S.N., Ternovoi V.A., Loktev V.B. (2017) Detection of *Rickettsia helvetica* and candidate *R. tarasevichiae* DNA in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Northeastern European Russia (Komi Republic). *Ticks Tick-Borne Diseases.* **8**, 588–592. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.001>
13. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary ge-

- netics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
14. Ponomareva E.P., Mikryukova T.P., Kartashov M.Y., Protopopova E.V., Chausov E.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Gheorghita S.D., Burlacu V.I., Ternovoi V.A., Loktev V.B. (2015) Detection of Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis viral RNA in ticks collected in the Republic of Moldova. *J. Vector Borne Diseases.* **52**, 334–336.
  15. Achazi K., Ruzek D., Donoso-Mantke D., Schlegel M., Ali H.S., Wenk M., Schmidt-Chanasit J., Ohlmeyer L., Ruhe F., Vor T., Kiffner T., Kallies R., Ulrich R.G., Niedrig M. (2011) Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector-Borne Zoonotic Diseases.* **11**, 641–647.  
<https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0236>
  16. Knap N., Korva M., Dolinsek V., Sekirnik M., Trilar T., Avsic-Zupanc T. (2012) Patterns of tick-borne encephalitis virus infection in rodents in Slovenia. *Vector-Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* **12**, 236–242.  
<https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0728>
  17. Caracciolo I., Bassetti M., Paladini G., Luzzati R., Santon D., Merelli M., Sabbata G.D., Carletti T., Marcell A., D'Agaro P. (2015) Persistent viremia and urine shedding of tick-borne encephalitis virus in an infected immunosuppressed patient from a new epidemic cluster in north-eastern Italy. *J. Clin. Virol.* **69**, 48–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.05.019>
  18. Микрюкова Т.П., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Терновой В.А., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Локтев В.Б. (2014) Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита в клещах *Ixodes persulcatus* в Северо-Восточном регионе европейской части России. *Паразитология.* **48**, 131–149.
  19. Gritsun T.S., Nuttall P.A., Gould E.A. (2003) Tick-borne flaviviruses. *Adv. Virus Res.* **61**, 317–371.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)61008-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)61008-0)
  20. Liu Z.-Y., Li X.-F., Jiang T., Deng Y.-Q., Ye Q., Zhao H., Yu J.-Y., Qin C.-F. (2016) Viral RNA switch mediates the dynamic control of flavivirus replicase recruitment by genome cyclization. *eLife.* **5**, e17636.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.17636>
  21. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chausov E.V., Novikov D.V., Leonova G.N., Netesov S.V., Loktev V.B. (2007) Novel variant of tickborne encephalitis virus, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1574–1578.  
<https://doi.org/10.3201/eid1310.070158>

## GENETIC VARIABILITY OF 5'-UNTRANSLATED REGION OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS GENOME IN VARIOUS REGIONS OF NORTHERN EURASIA

E. P. Ponomareva<sup>1,\*</sup>, V. A. Ternovoi<sup>1</sup>, T. P. Mikryukova<sup>1</sup>, E. V. Protopopova<sup>1</sup>,  
 N. L. Tupota<sup>1</sup>, and V. B. Loktev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

\*e-mail: [ponomareva\\_ep@vector.nsc.ru](mailto:ponomareva_ep@vector.nsc.ru)

The analysis of nucleotide sequences of 5'-noncoding region (5'-UTR) of tick-borne encephalitis virus (TBEV) genomic RNA isolated from 39 of taiga ticks collected in various geographical regions of Northern Eurasia was performed. The sequences of the 5'-UTR were 89 and 95% similar to that of the prototype strains of Siberian and Far Eastern TBEV genotypes, respectively (Zausaev and 205). Detected substitutions allowed unequivocal differentiation of the genotypes of TBEV. In 5'-UTR variable and conserved motifs of RNA were identifiable. Structural elements B2, C1 and C2 of the Y-shaped structure of 5'-UTR and the putative binding site for the viral RNA dependent RNA polymerase were the most variable. Elements A2, CS A and CS B as well as the start codon were conserved. Within the variable element C1, five nucleotide substitutions were strictly conserved in various geographical areas, while the laboratory TBE strain had 11 substitutions. Nearly a third of identified nucleotide substitutions were mapped outside of the main elements of the Y-shaped structure. Typically, nucleotide substitutions were located in loop structures, without affecting TBE 5'-UTR hairpins. This study points at the genetic variability of the TBE virus 5'-UTR as a common feature which may aid in effective replication of TBEV in various cell types of birds, mammals and ticks.

**Keywords:** encephalitis virus, genome virus, nucleotide sequences, of 5'-noncoding region, genomic RNA