

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.852:577.2

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА  
И ВИРУСА ПОВАССАН

© 2012 г. Е. Л. Субботина<sup>1</sup>, В. Б. Локтев<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”, Кольцово,  
Новосибирская обл., 630559

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики, Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, 630090

Поступила в редакцию 15.02.2011 г.

Принята к печати 18.05.2011 г.

Проблема возникновения новых вирусов, их генетическое разнообразие и особенности эволюции в современных природных условиях привлекают все большее внимание. Мы провели филогенетический анализ и оценили скорость эволюции патогенных для человека флавивирусов – вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и вируса Повассан (ВП), которые активно циркулируют в природных очагах на территории России. Анализировали 47 нуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагмент белка Е ВКЭ, и 17 последовательностей, кодирующих белок NS5 ВП. Скорость накопления нуклеотидных замен в последовательности, кодирующей белок Е, составляет приблизительно  $1.4 \times 10^{-4}$ , а в последовательности NS5 –  $5.4 \times 10^{-5}$  замен на сайт в год. Отношения частот несинонимичных нуклеотидных замен к синонимичным (dN/dS) составляет 0.049 в гене белка Е и 0.098 – в гене белка NS5. Максимальное значение dN/dS в пределах 0.201–0.220 характерно для некоторых подкластеров российских и канадских штаммов ВП, а минимальное, 0.024, – для дальневосточного генотипа ВКЭ (кластер российских и китайских штаммов). Оценка временных интервалов эволюции этих вирусов показала, что европейский подтип ВКЭ дивергировал от общего предшественника приблизительно 2750 лет назад, а сибирский и дальневосточный подтипы возникли около 2250 лет назад. ВП попал на территорию Приморского края России всего около 70 лет назад и оказался филогенетически наиболее близко связанным с канадскими штаммами. Картина эволюции ВП на территории Северной Америки аналогична картине эволюции сибирских и дальневосточных подтипов ВКЭ на территории Азии. Совпадение времени дивергенции основных генных вариантов ВКЭ и ВП с историческими периодами потепления и похолодания позволяет высказать гипотезу, что резкие изменения климата служили важнейшим фактором эволюции флавивирусов в течение последних тысячелетий.

**Ключевые слова:** флавивирусы, вирус клещевого энцефалита, вирус Повассан, синонимичные и несинонимичные замены, филогенетический анализ, молекулярная эволюция.

MOLECULAR EVOLUTION OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS AND POWASSAN VIRUSES, by E. L. Subbotina<sup>1</sup>, V. B. Loktev<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia; <sup>2</sup>Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; \*e-mail: loktev@vector.nsc.ru). The problem of emerging viruses, their genetic diversity and viral evolution in nature are attracting more attention. The phylogenetic analysis and evolutionary rate estimation were made for pathogenic flaviviruses such as tick-borne encephalitis virus (TBEV) and Powassan (PV) circulated in natural foci in Russia. 47 nucleotide sequences of encoded protein E of the TBEV and 17 sequences of NS5 genome region of the PV have been used. It was found that the rate of accumulation of nucleotide substitutions for E genome region of TBEV was approximately  $1.4 \times 10^{-4}$  and  $5.4 \times 10^{-5}$  substitutions per site per year for NS5 genome region of PV. The ratio of non-synonymous nucleotide substitutions to synonymous substitution (dN/dS) for viral sequences were estimated of 0.049 for TBEV and 0.098 for PV. Maximum value dN/dS was 0.201–0.220 for sub-cluster of Russian and Canadian strains of PV and the minimum – 0.024 for cluster of Russian and Chinese strains of Far Eastern genotype TBEV. Evaluation of time intervals of evolutionary events associated with these viruses showed that European subtype TBEV are diverged from all-TBEV ancestor within approximately 2750 years and the Siberian and Far Eastern subtypes are emerged about 2250 years ago. The PV was introduced into natural foci of the Primorsky Krai of Russia only about 70 years ago and PV is a very close to Canadian strains of PV.

Принятые сокращения: ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; ВП – вирус Повассан; ВЗН – вирус Западного Нила; dS – синонимичные нуклеотидные замены; dN – несинонимичные нуклеотидные замены.

\* Эл. почта: loktev@vector.nsc.ru

**Evolutionary picture for PV in North America is similar to evolution of Siberian and Far Eastern subtypes TBEV in Asia. The divergence time for main genetic groups of TBEV and PV are correlated with historical periods of warming and cooling. These allow to propose a hypothesis that climate changes were essential to the evolution of the flaviviruses in the past millenniums.**

**Keywords:** flaviviruses, tick-borne encephalitis virus, Powassan virus, synonymous and non-synonymous substitutions, phylogenetic analysis, molecular evolution.

Семейство флавивирусов (*Flaviviridae*), род *Flavivirus*, объединяет в своем составе 53 различных вида РНК-содержащих вирусов (<http://www.ictvdb.org/>). Диаметр вирионов флавивирусов составляет около 50 нм, вирусные частицы окружены липидной мембраной. Геном флавивирусов представлен одноцепочечной инфекционной РНК длиной от 9500 до 12500 н. [1]. Вирусный геном кодирует один полипротеин, который подвергается процессингу вирусными и клеточными протеазами с образованием индивидуальных структурных и неструктурных вирусных белков [2, 3]. 5'- и 3'-нетранслируемые районы геномной РНК весьма вариабельны, их длина у вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и вируса Повассан (ВП) составляет около 130 и 400–700 н. соответственно.

Флавивирусы инфицируют широкий круг организмов — млекопитающих, членистоногих, птиц, рептилий — и формируют природные очаги в разных географических регионах мира [4]. Многие представители семейства способны вызывать заболевания у человека. Наиболее опасные из них связаны с вирусами денге, желтой лихорадки, японского энцефалита, с вирусами Западного Нила (ВЗН) и ВКЭ. Для клинической картины этих заболеваний характерны лихорадка, менингиты, энцефалиты, тяжелые поражения печени и других внутренних органов. Во многих районах России активно циркулирует ВКЭ [5], также обнаруживаются ВЗН и ВП, значение которых до сих пор недооценивали.

В большинстве случаев флавивирусная инфекция передается комарами или клещами, имеется также группа вирусов, вектор для которых не известен [6]. Филогенетический анализ на основе последовательности, кодирующей белок NS5, подтверждает справедливость их подразделения по типу вектора. Клещевые флавивирусы, связанные с морскими птицами, широко распространены в районах массового гнездования в Северном и Южном полушариях [7]. Это позволило высказать предположение, что ареал клещевых флавивирусов расширяется из районов обитания птиц в сторону лесов Евразии, где основным их хозяином становятся иксодовые клещи, и распространяется в сторону лесных и лесостепных районов континента [8–10]. Другая гипотеза эволюции флавивирусов состоит в том, что большинство современных представителей семейства — потомки вирусов, существовавших около 10–13 тыс. лет

назад в конце последнего ледникового периода [11]. Именно его окончание изменило климатические условия и географическое распространение многих видов членистоногих, птиц и млекопитающих, что, в конечном итоге, привело к значительным изменениям географического распространения флавивирусов и создало новые условия для их эволюции.

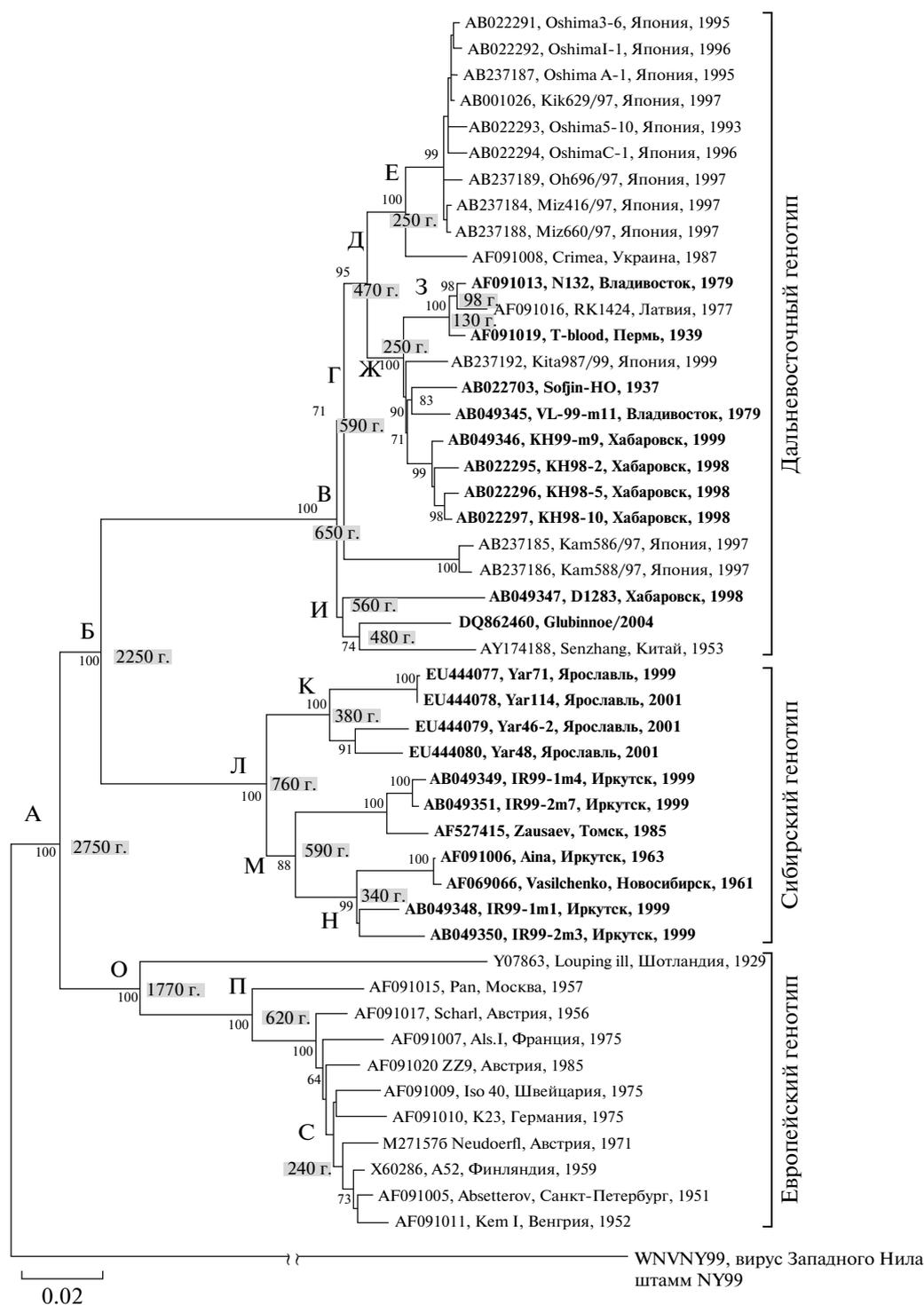
Важным фактором изменения природной среды является экономическая деятельность человека, которая и могла создать предпосылки для эволюционного расхождения некоторых групп флавивирусов, особенно в течение последних двух-трех веков. Эти соображения обуславливают особый интерес к молекулярной эволюции флавивирусов в природных очагах Евразии. Одна из гипотез распространения ВКЭ по Евразии предполагает, что этот вирус впервые появился на территории Дальнего Востока России и затем распространился в западном направлении по континенту [9]. Проникновение ВКЭ на Японские острова, по всей вероятности, произошло относительно недавно, что подтверждается при помощи анализа последовательности геномов этих изолятов ВКЭ [12].

Цель настоящего исследования — попытаться понять особенности молекулярной эволюции флавивирусов, в частности, циркулирующих на территории России. Оценка временных интервалов дивергенции флавивирусов с применением методологии молекулярных часов и филогенетического анализа позволила получить новые данные по особенностям распространения флавивирусов по территории Евразии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Нуклеотидные последовательности 47 изолятов ВКЭ и 17 изолятов ВП получены из GenBank. Для филогенетического анализа использовали участок нуклеотидной последовательности РНК ВКЭ длиной 1419 н., кодирующий поверхностный белок Е; участок нуклеотидной последовательности ВП и кодирующий белок NS5 длиной 2718 н. Номера последовательностей, названия штаммов, место и год выделения представлены на рис. 1 и рис. 2.

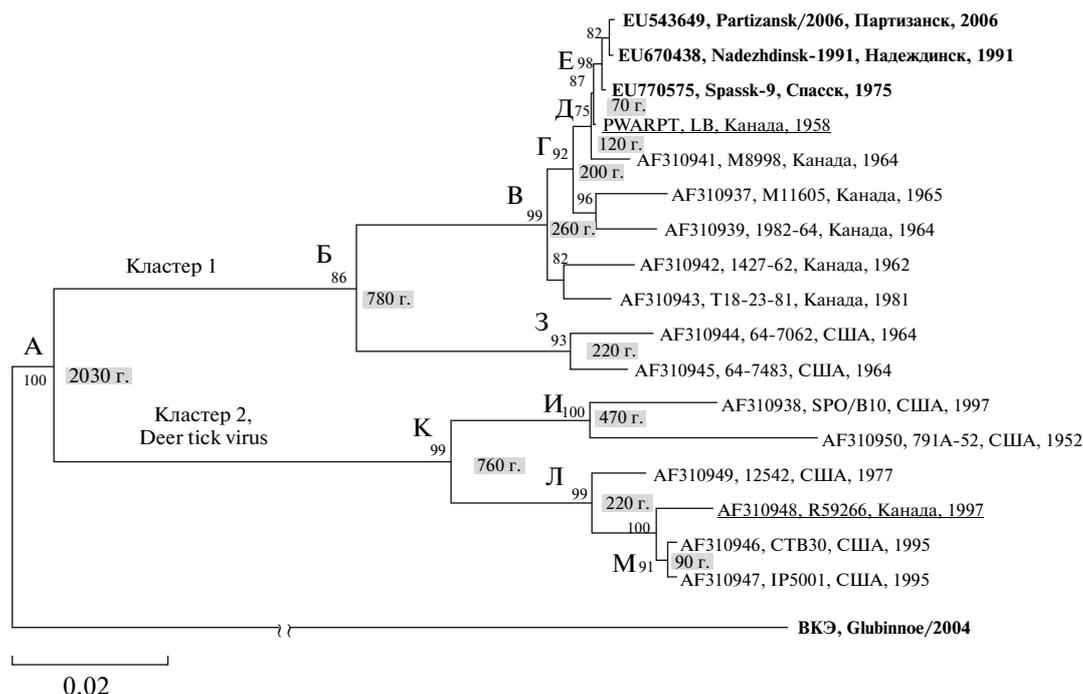
**Анализ данных.** Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили, используя приложение AlignX программного па-



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево штаммов и изолятов ВКЭ, построенное на основе частичной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Е, по методу объединения ближайших соседей. Серым цветом отгнены возрасты узлов дивергенции дерева, в годах от настоящего времени. Жирным шрифтом выделены названия последовательностей РНК, соответствующие Российским изолятам. Вирусные изоляты обозначены в следующем порядке: номер последовательности GenBank, название штамма, место и год выделения.

кета Vector NTI 10 (“Informax”, США). Филогенетический анализ штаммов и изолятов ВКЭ, ВП и ВЗН проводили при помощи программы Mega 4

[13]. Филогенетические деревья строили по методу объединения ближайших соседей на основе матриц генетических расстояний, рассчитанных



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево штаммов ВП, построенное на основе частичной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок NS5. Жирным шрифтом выделены названия последовательностей РНК, соответствующие Российским изолятам. Подчеркнуты штаммы, выделенные из мозга погибших людей. Вирусные изоляты обозначены как на рис. 1.

по модели Джукса-Кантора. Индексы поддержки ветвей определяли перестановочным тестом (bootstrap, 1000 повторов).

Расчет скорости накопления нуклеотидных замен проводили Байесовским методом при помощи программы Beast [14]. Оценивали воздействие отбора на вирусные гены (тест на селекцию), вычисляя групповые средние значения соотношений частот dN/dS на сайте с использованием метода SLAC (Single Likelihood Ancestor Counting), доступного на сервере Datamonkey (www.datamonkey.org) [15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Вирус клещевого энцефалита*

Для реконструкции филогении ВКЭ использовали участок нуклеотидной последовательности генома длиной 1419 н., кодирующий поверхностный белок Е. Выбор обусловлен наличием последовательностей РНК 47 изолятов ВКЭ, наиболее полно отражающих распространение основных геновариантов ВКЭ по территории Европы и Азии (рис. 1). Этот район генома относительно консервативен, но при этом уровень его варибельности и его размер достаточен для калибровки молекулярных часов [16–19]. На рис. 1 представлено филогенетическое дерево, ставшее основой для расчета времени дивергенции основных генотипов ВКЭ, при которой для оценки

скорости накопления замен были опробованы две эволюционные модели: модель Г–распределения и модель НКУ (SRD06), которая, как было показано ранее, наиболее достоверно описывает распределение замен в кодирующих белок последовательностях [20]. Использованы также три модели молекулярных часов: строгие, релаксированные логнормальные и релаксированные экспоненциальные в сочетаниях с указанными выше эволюционными моделями. В нашем случае, модель строгих молекулярных часов при использовании эволюционной модели НКУ (SRD06) дает наилучшие результаты. Некоторые последовательности РНК ВКЭ (штаммы 886–84, 178–79 и т.д.) исключены из анализа, так как они нарушали гипотезу молекулярных часов. Для определения скорости накопления замен проводили  $5 \times 10^6$  итераций в программе Beast с использованием указанных параметров.

Скорость накопления нуклеотидных замен в последовательности, кодирующей белок Е ВКЭ, составляет в среднем  $1.4 \times 10^{-4}$  замен на сайт в год, что сравнимо со значениями скоростей накопления dS, полученными ранее с использованием других методов, а именно  $(1.62–4.9) \times 10^{-4}$  замен на сайт в год [12, 21–23]. Филогенетическое дерево (рис. 1), построенное по методу объединения ближайших соседей на основе модели Джукса-Кантора при помощи программы Mega 4, показывает отчетливое деление всех изолятов ВКЭ на три

генотипа: дальневосточный, сибирский и европейский, представители которых циркулируют на территории России. Расчет времени дивергенции основных генотипов ВКЭ показал, что европейский генотип ВКЭ возник около 2750 лет назад (рис. 1). Дивергенция сибирского и дальневосточного генотипов произошла примерно 2250 лет назад. Ранее были получены сходные значения времен дивергенции для сибирского и дальневосточного генотипов — от 1700 до 2800 лет назад [12].

Влияние селекционного отбора в природных очагах на эволюцию ВКЭ оценивали, используя последовательности генома, кодирующие белок Е. Изоляты вируса группировали в соответствии с их филогенетической близостью (рис. 1 и табл. 1). Средние групповые значения отношений частот  $dN/dS$  приведены в табл. 1, они составляют у всех штаммов ВКЭ 0.049. Поскольку эта величина существенно меньше 1.0, очевидно, что данный ген эволюционировал под действием стабилизирующего отбора, который элиминирует из вирусной популяции мутантные варианты. Установлено также, что для всех групп изолятов ВКЭ величины отношения  $dN/dS$  существенно меньше единицы. Это свидетельствует в пользу возможности использования гипотезы молекулярных часов для оценки эволюции данного участка генома РНК ВКЭ. В некоторых группах изолятов ВКЭ значения  $dN/dS$  превышали общее среднее. Так,  $dN/dS$  для подкластера японских штаммов дальневосточного генотипа составляет 0.112, а для подкластера российских штаммов дальневосточного генотипа — 0.092. Интересно отметить, что наименьшее значение  $dN/dS$  (0.024) соответствует группе, в которую вошли российские штаммы D1283, Glubin-poe/2004 и китайский штамм Senzhang. Этот факт свидетельствует о том, что указанная группа штаммов эволюционирует в более стабильных природно-климатических условиях.

### Вирус Повассан

Число депонированных в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей РНК ВП, длина которых достаточна для подсчета скорости накопления замен, на настоящий момент невелико. Недавно подробно охарактеризован один из российских штаммов ВП — штамм Партизанск/2006, выделенный от больного в Приморском крае в 2006 г. Кроме того, известны нуклеотидные последовательности РНК еще двух российских штаммов: Спасск-9 и Надеждинск-1991. Для реконструкции филогении ВП использовали участок генома длиной 2718 н., кодирующий РНК-полимеразу NS5, нуклеотидные последовательности которого наиболее широко представлены в GenBank (рис. 2).

Скорость накопления нуклеотидных замен в последовательности РНК, кодирующей белок

NS5 ВП, составляет в среднем  $5.4 \times 10^{-5}$  замен на сайт в год, что сравнимо с полученными ранее значениями скоростей накопления синонимичных замен в полногеномных последовательностях РНК ВП, которые составляют в среднем  $[1.0-2.1] \times 10^{-5}$  замен на сайт в год. Скорость накопления замен в последовательности, кодирующей поверхностный гликопротеин Е, определенная другими авторами, составляет  $[1.0-4.5] \times 10^{-5}$  [24]. На основе полученного нами значения средней скорости накопления замен рассчитывали возраст ближайшего общего предка для двух основных кластеров ВП, который составляет 2030 лет (рис. 2).

У всех штаммов ВП значение  $dN/dS$  параметра оказалось существенно меньше единицы (0.098), что свидетельствует в пользу применимости гипотезы молекулярных часов для данного участка генома (рис. 2, табл. 1). Отличия в значениях  $dN/dS$  у эволюционных групп ВП показали, что у канадских штаммов, относящихся к кластеру 1, отношение  $dN/dS$  превышает (незначительно) таковое у российских штаммов того же кластера (0.204 и 0.118 соответственно). Величины  $dN/dS$  у штаммов Канада/США, относящихся к кластеру 2, близко к  $dN/dS$  канадских штаммов кластера 1 и составляет 0.220.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВКЭ открыт в 1937 г. на Дальнем Востоке [25]. Он принадлежит к одноименному комплексу вирусов и способен вызывать тяжелую нейроинфекцию с уровнем смертности около 1–2% для европейского, 6–8% — для сибирского и 20–60% — для дальневосточного генотипов [26]. Одна из гипотез предполагает, что ВКЭ распространялся в западном направлении по евразийскому континенту [9]. Высказывается также предположение о том, что дальневосточный генотип постепенно вытесняет другие генотипы на территории России [3]. Существует и альтернативное мнение, что в настоящее время преимущественно распространяется сибирский генотип [27, 28]. Однако большинство исследователей сходится на том, что географическая зона распространения ВКЭ совпадает, в основном, с территорией обитания иксодовых клещей. В европейской части — это *Ixodes ricinus*, а в восточных районах Европы и в азиатской части — *I. persulcatus* [4, 26]. Ареал обитания клещей может существенно изменяться, как это показано при изучении ареала обитания *I. scapularis* на территории Канады: северная граница зоны обитания клещей может смещаться в пределах 200–1000 км по оси юг-север в зависимости от сдвига среднегодовой температуры всего на несколько градусов [29].

Время дивергенции основных кластеров (подкластеров) и соотношение несинонимичных и синонимичных замен для различных геновариантов вирусов клещевого энцефалита и Повассан

Группа/подгруппа (кол-во штаммов в кластере, в группе)	Штаммы, входящие в группу	Узел дивергенции генотипов (рис. 1 и рис. 2)	Узел дивергенции (суб) кластеров (рис. 1 и рис. 2)	Время дивергенции (годы)*	Среднее значение dN/dS	
<b>Вируса клещевого энцефалита</b>						
ВКЭ (47)	ВКЭ, общий предок всех генотипов	А		2750 (2416–3179)	0.049	
Дальневосточный генотип (25)	Дальневосточный и сибирский генотипы	Б		2250 (1944–2628)	0.055	
	Все штаммы дальневосточного генотипа ВКЭ	В		650 (558–755)		
Сибирский генотип (11)	Кластер Япония 1997 (2)	Г		590 (498–689)	0.068	
	Кластер Япония (10)	Д		470(383–550)		
	Кластер Россия (10)	Е		250 (185–321)		
	Кластер Россия/Китай (3)	Штаммы кластера Япония и Россия	Ж			250 (198–304)
		Штаммы Владивосток, Латвия, Пермь	З			130 (103–171)
	Европейский генотип (11)	Штаммы Владивосток, Латвия, Пермь	И			560 (469–660)
		Все штаммы сибирского генотипа ВКЭ	Л			760 (635–882)
	Европейский генотип (11)	Кластер Сибирь (7)	М			590 (485–704)
		Кластер Ярославль (4)	К			380 (293–485)
		Субкластер Иркутских штаммов и Vasilchenko (Новосибирск)	Н			340(231–425)
	Все штаммы европейского генотипа, включая Louping ill	О		1770 (1433–2078)		

Таблица. Окончание

Группа/подгруппа (кол-во штаммов в кластере, в группе)	Штаммы, входящие в группу	Узел дивергенции генотипов (рис. 1 и рис. 2)	Узел дивергенции (суб) кластеров (рис. 1 и рис. 2)	Время дивергенции (годы)*	Среднее значение dN/dS
	<b>Европейский генотип без Louping ill</b> Абсеттаров, КерпI, А52, Neudoerfl		<b>II</b> C	<b>620 (489–737)</b> 240 (192–278)	
<b>Вирус Повассан</b>					
<b>ВП (17)</b>	<b>Все штаммы ВП</b>	<b>A</b>		<b>2030 (1792–2276)</b>	<b>0.098</b>
Кластер 1 (11)	<b>Все штаммы кластера 1</b> Partizansk/2006; Nadezhdinsk-1991; Spassk-9; LB; M8998; M11605; 1982-64; 1427-62; T18-23-81 LB; M8998; M11605; 1982-64; 1427-62; T18-23-81		<b>B</b> <b>B</b>	<b>780 (665–879)</b> 260 (221–305)	<b>0.141</b> 0.201
	Субкластер Россия (3)		<b>Г</b>	200 (159–228)	0.204
	Субкластер Канада (4/2)		<b>Д</b>	120 (88–148)	
	Субкластер Россия (3)		<b>Е</b>	70 (52–88)	0.118
	Подкластер США (2)		<b>З</b>	220 (165–265)	
<b>Кластер 2 (6)</b>	<b>Все штаммы кластера 2</b> SPO/B10; 791A-52 12542; R59266; СТВ30; IP5001 СТВ30; IP5001	<b>K</b>		<b>760 (664–877)</b> 470 (391–556) 220 (176–272)	<b>0.124</b> 0.220
	Подкластер США		<b>И</b>		
	Кластер США/Канада (4)*		<b>Л</b>		
			<b>М</b>	90 (62–119)	

\* – Указаны средние значения времен узлов дивергенции (в годах от настоящего времени) и округленные до десятков лет. В скобках – интервалы с вероятностью 95% (heist posterior density).

Современные исследования достаточно полно описывают климатические изменения на Земле на протяжении последних нескольких тысяч лет [30–36]. Самый близкий к нашему времени ледниковый период окончился около 10 тыс. лет назад. Эта дата является ключевой для понимания того, как флавивирусы осваивали новые территории на севере Евразии и Америки после таяния ледников. Описаны также дальнейшие периоды сильных похолоданий с последующими потеплениями, которые также могли существенно изменять ареалы распространения иксодовых клещей и соответственно скорость эволюции флавивирусов на северных территориях Евразии и Америки. Наиболее близкие к нам значительные похолодания датируются периодами около 2200–1900, 1550–1150, 830–655 и 400–200 лет назад, когда средняя температура ледников Гренландии, например, могла снижаться на 2–3 градуса [30, 36]. Последний период похолодания, описанный в многочисленных документах, даже получил название “Малого ледникового периода” [33]. Обращает на себя внимание совпадение времени возникновения основных узлов дивергенции клещевых флавивирусов и периодов потепления/похолодания. Так, порядка 2250 лет назад произошло разделение сибирского и дальневосточного генотипа ВКЭ (узел Б, рис. 1), что удовлетворительно соответствует времени похолодания после известного периода “Римского потепления”. Узлы дивергенции внутри генотипов тоже совпадают по времени с похолоданием после “Средневекового потепления”, с так называемым “Малым ледниковым периодом”. Скорее всего, совпадение времени дивергенции на филогенетическом древе ВКЭ и времени резких климатических изменений не случайно. Температурные изменения приводили к существенным изменениям природных ландшафтов северной Евразии, что могло быть факторами, обуславливающими дивергенцию филогенетических групп ВКЭ.

### *Европейский генотип ВКЭ*

Все известные последовательности РНК европейского генотипа ВКЭ, включая прототипный штамм европейского генотипа Neudoerfl, выделены в 50–70-х годах прошлого века. Эти штаммы формируют три основные ветви эволюции внутри этого генотипа ВКЭ. 1) Типичный штамм Absettaov, выделенный в Санкт-Петербурге в 1951 г., кластеризуется с различными европейскими изолятами, выделенными в 1952–1985 гг. 2) Штамм Rap, выделенный в Москве в 1957 г., происходит от общего для этой группы предка европейского ВКЭ (рис. 1, узел П), который существовал 620 лет назад. Штамм Rap эволюционно удален от других известных европейских изолятов ВКЭ, что может быть обусловлено независимой эволюцией

ВКЭ на территории России. 3) Другой важный узел (рис. 1, узел О) дивергенции европейского генотипа ВКЭ соотносится со временем 1770 лет назад. Эта ветвь привела к возникновению вируса Шотландского энцефаломиелита овец, циркулирующего весьма обособлено на территории Британских островов [10, 37].

### *Сибирский генотип ВКЭ*

Известны протяженные участки геномной РНК всего нескольких изолятов сибирского генотипа ВКЭ: они выделены на территории Иркутской, Новосибирской и Ярославской областей. Сибирский генотип подразделяется на два основных кластера, которые соответствуют географическому распределению этих штаммов. Они разделились 760 лет назад (узел Л) и, по-видимому, эволюционируют независимо в силу территориальной обособленности. К сожалению, последовательности РНК штаммов ЕК-328, 178-79 и 886-84 мы были вынуждены исключить из нашего анализа. Эстонский штамм ЕК-328 выделен только из лабораторно адаптированного к белым мышам генетического варианта этого штамма [38]. Включение в анализ последовательностей РНК иркутских изолятов 178-79 и 886-84 приводит к нарушению монотонности молекулярных часов. Это может быть следствием технических ошибок, допущенных при изучении этих нуклеотидных последовательностей и/или может быть обусловлено наличием резких геномных изменений в самих этих вариантах. Таким образом, имеющиеся данные по протяженным нуклеотидным последовательностям РНК представителей сибирского генотипа весьма ограничены и, по всей вероятности, не отражают генетического разнообразия сибирского генотипа ВКЭ.

### *Дальневосточный генотип ВКЭ*

Нуклеотидные последовательности геномов штаммов дальневосточного генотипа ВКЭ изучены наиболее полно. Среди них имеется группа вирусов, филогенетически весьма обособленная от остальных представителей этого генотипа (рис. 1, узел И). Эти штаммы произошли от общего предка, существовавшего около 480 лет назад; для них характерна наименьшая величина соотношения dN/dS из исследованных последовательностей РНК клещевых флавивирусов. К этой группе относятся штаммы, выделенные в Китае (Senzhang), а также штаммы D1283 и Glubinnoe/2004, выделенные позже в Приморском и Хабаровском краях. Это позволяет полагать, что уровень dN/dS свидетельствует о стабильности природно-климатических условий в природных очагах этой группы ВКЭ.

Остальные штаммы дальневосточного генотипа составляют кластер, объединяющий российские и

японские штаммы, выделенные в различное время. Ближайший общий предок этого кластера существовал около 590 лет назад (узел Г), а приблизительно через 120 лет внутри кластера сформировался еще один узел дивергенции (узел Д), предопределивший возникновение основных генетических вариантов современных штаммов дальневосточного генотипа ВКЭ. Только одна группа, состоящая из японских штаммов Kam586/97 и Kam588/97, выделенных на о. Хоккайдо в 1997 г., обособлена, и время ее дивергенции от остальных входящих в данный кластер штаммов составляет около 590 лет. Другая ветвь (узел Ж) объединяет шесть дальневосточных штаммов и один японский, отделившийся от них 250 лет назад.

Возраст разделения двух подгрупп, содержащих японские изоляты, рассчитан ранее [12, 21] и составляет в одном случае 260–430, а в другом – 550 лет. Этот результат удовлетворительно совпадает с результатами проведенных нами расчетов, согласно которым время дивергенции для этого кластера ВКЭ составляет 465 лет. Имеющиеся данные показывают, что ВКЭ был занесен на японские острова, как минимум, трижды перелетными птицами, миграционные пути которых пролегают из Восточной Азии в Австралию [12]. Факт обнаружения иксодовых клещей на перелетных птицах в Японии и их роль в переносе боррелий косвенно подтверждают данное предположение [39].

Временная дивергенция основных подкластеров дальневосточного генотипа ВКЭ вполне однозначно свидетельствует о том, что этот генотип сформировался без влияния экономической деятельности человека в этом регионе и был обусловлен природными условиями. К дальневосточному генотипу относится украинский штамм Crimea, изолированный в 1987 г., латвийский штамм RK1424 и штамм T-blood, выделенный в Перми. Общий предок японских штаммов и крымского штамма Crimea существовал уже около 250 лет назад. Латвийские и пермские штаммы кластеризуются вместе со штаммом, выделенным во Владивостоке в 1979 г. Общий предок для этой группы существовал около 130 лет назад, вероятнее всего, – на территории Дальнего Востока. Гипотеза о распространении штаммов посредством перемещения домашних и диких животных имеет полное право на существование [40]. Однако основные перемещения диких животных происходили во времена СССР, что не соответствует рассчитанным выше временам дивергенции. Перемещение домашних животных из дальневосточных регионов в европейскую часть СССР также представляется маловероятным. Вероятнее всего, распространение этих дальневосточных штаммов обусловлено экономической и транспортной активностью человека (строительство и начало эксплуатации транссибирской магистрали, рост и развитие крупных городов)

[41, 42]. Это создало условия для продвижения ВКЭ на новые территории вместе с распространением и/или увеличением плотности обитания различных видов птиц, грызунов и сопутствующих им видам клещей вдоль дорог и населенных пунктов. Недавнее обнаружение на территории Южной Кореи штаммов ВКЭ, относящихся к Европейскому генотипу, также свидетельствует о возможности распространения ВКЭ по направлению с запада на восток на территории Евразии [43].

Величины соотношения  $dN/dS$  указывают на то, что дальневосточный генотип подвергается давлению движущего отбора в большей степени, чем сибирский и европейский генотипы, причем как на территории Японии, так и России. Очень низкое значение величины  $dN/dS$  характерно только для группы, включающей три генетически удаленных штамма ВКЭ: два российских (D1283 и Glubinnoe/2004) и китайский штамм Senzhang. Это, вероятно, указывает на факт длительной (около 651 года) циркуляции представителей данной группы в стабильных природно-климатических условиях на территориях Северного Китая и Дальнего Востока России.

Оценка временных интервалов эволюционных событий, связанных с ВКЭ, показывает, что представление о его эволюции существенно отличается от общепринятых представлений, связывающих ВКЭ только с азиатской частью России. Так, европейский генотип ВКЭ оказался эволюционно более древним по сравнению с более молодыми сибирским и дальневосточным генотипами.

ВП также является типичным клещевым флавивирусом, принадлежащим к комплексу клещевого энцефалита. Интересно, что в Евразии его циркуляция обнаружена лишь на территории Дальнего Востока России, в то время как в других Российских регионах, а также в Китае и Японии этот вирус не найден [24]. Основной ареал ВП связан с территорией Северной Америки. При оценке генетической изменчивости показан весьма низкий уровень скорости накопления нуклеотидных замен фрагмента генома, кодирующего NS5 ВП, который составляет около  $5.4 \times 10^{-5}$  замен на сайт в год. Кроме того, геном ВП, в целом, более консервативен по сравнению с другими РНК-содержащими вирусами [23]. Для района генома, кодирующего NS5, также характерны относительно высокие значения  $dN/dS$ , достигающие 0.201–0.220. Штаммы ВП по гомологии нуклеотидных последовательностей генома делятся на два кластера (рис. 2), представители которых циркулируют на территории Северной Америки (США и Канады) [44]. Два штамма, 64-7062 и 64-7483, выделенные в Колорадо (США) в 1964 г. и принадлежащие к первому кластеру, отделились от канадских штаммов около 780 лет назад, и практически в то же время второй кластер (Deer tick virus) разделился на

два покластера (760 лет назад). Общий предок колорадских штаммов существовал на территории США около 220 лет назад. Степень различий между нуклеотидными последовательностями двух кластеров ВП составляет 16%. Представители обоих кластеров способны вызывать летальные энцефалиты у человека (штаммы LB и R59266).

Три российских штамма (Партизанск/2006, Надеждинск-1991 и Спасск-9) относятся к первому кластеру, подгруппе Канадских штаммов. Процент гомологии полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов российских штаммов по сравнению со штаммом LB очень высок и составляет 99.8% [24]. Тем не менее, разделение соответствующих им ветвей филогенетического дерева достоверно – индекс поддержки бутстреп составляет 75–98%. Российские штаммы отделились от их общего предка с ближайшим современным родственником – канадским штаммом LB – всего около 70 лет назад. Сходные значения (64–90 лет назад) получены ранее при расчете без использования Байесовского метода [24]. Это указывает на то, что ВП был занесен из Канады на Дальний Восток России в современных исторических условиях.

Данные, полученные при использовании модели молекулярных часов, показывают, что возрасты основных узлов дивергенции ВП удовлетворительно совпадают с возрастными узлами дивергенции генетических групп ВКЭ. Это дополнительно свидетельствует в пользу основной гипотезы о существенном влиянии климатических изменений на эволюцию клещевых флавивирусов в северном полушарии. Другой примечательный факт: время расхождения ВКЭ и ВП оценивается приблизительно в 2000 лет, а время отделения Азии от Америки и формирование Берингова пролива в современном виде оценивается в 10–15 тысяч лет назад [30, 45, 46]. Это позволяет говорить об относительно независимой эволюции ВКЭ в Евразии и ВП в Северной Америке в течение этого длительного периода.

Таким образом, молекулярная эволюция ВП и ВКЭ на территории Северной Америки и Евразии во многом сходна. Совпадение времени дивергенции основных геновариантов ВКЭ и ВП с временами известных исторических периодов потепления и похолодания позволяет высказать гипотезу, что резкие изменения климата служили важнейшим фактором эволюции флавивирусов в течение последних тысячелетий.

Авторы выражают благодарность И.В. Бабкину за ценные замечания и плодотворное обсуждение статьи.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-00450), программы Президента Российской Федерации (НШ-387.2008.4 и НШ-

65387.2010.4) и Министерства образования и науки (11.G34.31.0034).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 2005. *Virus Taxonomy, 8th Rep. Internat. Comm. Taxonomy of Viruses*. Eds Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. N.Y.: Academic Press.
2. Heinz F.X., Mandl C.W. 1993. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. *APMIS*. **101**, 735–745.
3. Локтев В.Б., Терновой В.А., Нетесов С.В. 2007. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита. *Вопр. вирусол.* **52**, 10–16.
4. Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., Gallian P., Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A., de Lamballerie X. 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*. **361**, 80–92.
5. Korenberg E.I., Kovalevskii Y.V. 1999. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. *Zentralbl. Bakteriол.* **289**, 525–539.
6. Gaunt M.W., Sall A.A., de Lamballerie X., Falconar A.K., Dzhivanian T.I., Gould E.A. 2001. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* **82**, 1867–1876.
7. Chastel C., Main A.J., Guiguen C., le Lay G., Quillien M.C., Mannat J.Y., Beaucournu J.C. 1985. The isolation of Meaban virus, a new avivirus from the seabird tick *Ornithodoros (Alectorobius) maritimus* in France. *Arch. Virol.* **83**, 129–140.
8. Gao G.F., Hussain M.H., Reid H.W., Gould E.A. 1993. Classification of a new member of the TBE flavivirus subgroup by its immunological, pathogenetic and molecular characteristics: identification of subgroup-specific pentapeptides. *Virus Res.* **30**, 129–144.
9. Zanolto P.M.A., Gao G.F., Gritsun T., Marin M.S., Jiang W.R., Venugopal K., Reid H.W., Gould E.A. 1995. An arbovirus cline across the northern hemisphere. *Virology*. **210**, 152–159.
10. Gould E.A., Zanolto P.M.A., Holmes E.C. 1997. The genetic evolution of the flaviviruses. In: *Factors in the emergence of arboviruses diseases*. Paris: Elsevier.
11. Zanolto P.M.A., Gould E.A., Gao G.F., Harvey P.H., Holmes E.C. 1996. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **93**, 548–553.
12. Suzuki Y. 2007. Multiple transmissions of tick-borne encephalitis virus between Japan and Russia. *Genes Genet. Syst.* **82**, 187–195.
13. Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinform.* **9**, 299–306.
14. Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* **7**, 214.
15. Pond S.L., Frost S.D.W. 2005. Datamonkey: Rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*. **21**, 2531–2533.
16. Heinz F.X., Kunz C. 1981. Homogeneity of the structural glycoprotein from European isolates of tick-borne encephalitis virus: comparison with other flaviviruses. *J. Gen. Virol.* **57**, 263–274.

17. Heinz F.X., Kunz C. 1982. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: peptide mapping of large non-structural proteins of European isolates and comparison with other flaviviruses. *J. Gen. Virol.* **62**, 271–285.
18. Guirakhoo F., Radda A.C., Heinz F.X., Kunz C. 1987. Evidence for antigenic stability of tick-borne encephalitis virus by the analysis of natural isolates. *J. Gen. Virol.* **68**, 859–864.
19. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* **80**, 179–185.
20. Shapiro B., Rambaut A., Drummond A.J. 2006. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 7–9.
21. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H., Ivanov L., Volkov V., Demenev V., Mizutani T., Gojobori T., Takashima I. 1999. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia. *J. Gen. Virol.* **80**, 3127–3135.
22. Jenkins G.M., Rambaut A., Pybus O.G., Holmes E.C. 2002. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J. Mol. Evol.* **54**, 156–165.
23. Hanada K., Suzuki Y., Gojobori T. 2004. A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1074–1080.
24. Leonova G.N., Kondratov I.G., Ternovoi V.A., Romanova E.V., Protopopova E.V., Chausov E.V., Pavlenko E.V., Ryabchikova E.I., Belikov S.I., Loktev V.B. 2009. The characterization of Powassan viruses from far eastern Russia. *Arch. Virol.* **154**, 811–820.
25. Погодина В.В. 1999. *Воспоминания о М.П. Чумакове*. Москва.
26. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral. Res.* **57**, 129–146.
27. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Левина Л.С., Маленко Г.В., Платонов А.Е., Дружинина Т.А., Карань Л.С., Дулькейт О.Ф., Лукашенко З.С., Трухина А.Г. 2004. Сибирский и дальневосточный подтипы вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России, генетическая и антигенная характеристика штаммов. *Вопр. вирусол.* **49**, 20–25.
28. Погодина В.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М., и др. 2007. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя. *Вопр. вирусол.* **52**, 16–21.
29. Ogdan N.H., Maarouf A., Barker I.K., Bigras-Poulin M., Lindsay L.R., Morshed M.G., O'Callaghan C.J., Ramay F., Waltner-Toews D., Charron D.F. 2006. Climate change and the potential for range expansion of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in Canada. *Int. J. Parasitol.* **36**, 63–70.
30. Alley R.B. 2000. The Younger Dryas cold interval as viewed from central Greenland, *Quat. Sci. Rev.* **19**, 213–226.
31. Jones P.D., Osborn T.J., Briffa K.R. 2001. The evolution of climate over the last millennium. *Science*. **292**, 662–667.
32. Licciardi J.M., Schaefer J.M., Taggart J.R., Lund D.C. 2009. Holocene Glacier Fluctuations in the peruvian andes indicate northern climate linkages. *Science*. **325**, 1677–1679.
33. Mann M.E., Zhang Z., Rutherford S., Bradley R.S., Hughes M.K., Shindell D., Ammann C., Faluvegi G., Ni F. 2009. Global signatures and dynamical origins of the little ice age and medieval climate anomaly. *Science*. **326**, 1256–1260.
34. Kaufman D.S., Schneider D.P., McKay N.P., Ammann C.M., Bradley R.S., Briffa K.R., Miller G.H., Otto-Bliesner B.L., Overpeck J.T., Vinther B.M. 2009. Arctic Lakes 2k project members. Recent warming reverses long-term arctic cooling. *Science*. **325**, 1236–1239.
35. Trouet V., Esper J., Graham N.E., Baker A., Scourse J.D., Frank D.C. 2009. Persistent positive North Atlantic oscillation mode dominated the Medieval Climate Anomaly. *Science*. **324**, 78–80.
36. Alley R.B., Brigham-Grette J.T.A.J., Clarke G.K.C., et al. 2010. History of the Greenland Ice Sheet: paleoclimatic insights. *Quart. Sci. Rev.* **29**, 1728–1756.
37. McGuire K., Holmes E.C., Gao G.F., Reid H.W., Gould E.A. 1998. Tracing the origins of louping ill virus by molecular phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* **79**, 981–988.
38. Romanova L.Iu., Gmyl A.P., Dzhivaniyan T.I., Bakhmutov D.V., Lukashov A.N., Gmyl L.V., Rummyantsev A.A., Burenkova L.A., Lashkevich V.A., Karganova G.G. 2007. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology*. **362**, 75–84.
39. Miyamoto K., Sato Y., Okada K., Fukunaga M., Sato F. 1997. Competence of a migratory bird, red-bellied thrush (*Turdus chrysolaus*), as an avian reservoir for the Lyme disease spirochetes in Japan. *Acta Trop.* **65**, 43–51.
40. Kovalev S.Y., Kokorev V.S., Belyaeva I.V. 2010. Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union. *J. Gen. Virol.* **91**, 2941–2946.
41. Kovalev S.Y., Chernykh D.N., Kokorev V.S., Snitkovskaya T.E., Romanenko V.V. 2009. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the northwest of Russia and the Baltic countries. *J. Gen. Virol.* **90**, 2884–2892.
42. Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Kononova J.V., Konovalova S.N., Pershikova N.L., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bolshakova N.P., Moskvitina N.S., Loktev V.B. 2010. Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5' non-coding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes Pavlovsky* in Western Siberia. *Vector-Borne Zoonot. Dis.* **154**, 365–375.
43. Kim S.Y., Yun S.M., Han M.G., Lee I.Y., Lee N.Y., Jeong Y.E., Lee B.C., Ju Y.R. 2008. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea. *Vector-Borne Zoonot. Dis.* **8**, 7–13.
44. Kuno G., Artsob H., Karabatsos N., Tsuchiya K.R., Chang G.J. 2001. Genomic sequencing of deer tick virus and phylogeny of Powassan-related viruses of North America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**, 671–676.
45. Overpeck J.T., Otto-Bliesner B.L., Miller G.H., Muhs D.R., Alley R.B., Kiehl J.T. 2006. Paleoclimatic evidence for future ice-sheet instability and rapid sea-level rise. *Science*. **311**, 1747–1750.
46. Alley R.B., Clark P.U., Huybrechts P., Joughin I. 2005. Ice-sheet and sea-level changes. *Science*. **310**, 456–460.