

БАБКИН ИГОРЬ ВИКТОРОВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ С РНК- И ДНК-ГЕНОМАМИ:  
АСТРОВИРУС ЧЕЛОВЕКА, БОКАПАРВОВИРУСЫ И ОРТОПОКСВИРУСЫ

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация в виде научного доклада  
на соискание учёной степени  
доктора биологических наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Научные консультанты:

доктор биологических наук, доцент Тикунова Нина Викторовна

доктор биологических наук, профессор Щелкунов Сергей Николаевич

Официальные оппоненты:

**Локтев Валерий Борисович**, д.б.н., профессор

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, заведующий отделом

**Шестопалов Александр Михайлович**, д.б.н., профессор

Научно-исследовательский институт вирусологии Федерального Исследовательского Центра Фундаментальной и трансляционной медицины, директор

**Игнатьев Георгий Михайлович**, д.б.н., профессор

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», старший научный сотрудник

Защита состоится 18 ноября 2022 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ 03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: Новосибирск 630090, пр-кт акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Диссертация в виде научного доклада разослана «17» октября 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Вирусы входят во внеклеточную группу Arphanobionta, отдельную от трех доменов биоты. Кроме них в эту группу внеклеточных агентов входят вирионы, вируссоиды и прионы. Вирусы находятся в постоянном взаимодействии со всеми представителями трех доменов жизни (эукариоты, бактерии и археи). Они выполняют множество функций в биосфере, в том числе, регулирование численности своих хозяев и обмен генетической информацией.

На сегодняшний день уже описано множество видов вирусов, однако основная масса этих агентов остается не изученной. Для подавляющего числа видов живых организмов на Земле остаются неизвестными специфические для них вирусы. Наши знания о вирусном мире все еще неполны.

Существует ограниченный набор противовирусных препаратов, способных уменьшить вирусную угрозу. Наиболее действенной защитой от вирусов является вакцинация. Однако, благодаря высокой изменчивости постоянно возникают новые штаммы, геноварианты и виды вирусов, способные преодолевать вакцинную защиту и менее чувствительные к противовирусным препаратам. В качестве примера можно привести продолжающуюся пандемию SARS-CoV2 и пандемии, вызываемые новыми штаммами вируса гриппа.

Вопросы эволюции вирусов чрезвычайно сложны, и только в последнее время появились теории, пытающиеся описать пути возникновения и развития этих внутриклеточных паразитов. Так, все еще остается на повестке дня вопрос: произошли ли различные вирусы независимо (полифилетическое происхождение) или нет (монофилетическое происхождение). Молекулярная эволюция вирусов представляет собой накопление изменений в геноме вирусной популяции. Сначала в геноме возникают мутации, к числу которых относятся нуклеотидные замены, дупликации, делеции, инсерции и рекомбинации. Далее мутации могут закрепиться в популяции под действием отбора или элиминироваться. Естественный отбор обеспечивает дифференциальное различие между вирусами, несущими мутации, с точки зрения вероятности их выживания и размножения.

Мутации генома являются маркерами, используя которые можно воссоздать пути эволюции современных форм макромолекул. Консервативность генов позволяет обнаружить отдаленное родство между видами, которые давно разошлись в ходе эволюции. Тем не менее, для проведения достоверного анализа также необходимо, чтобы геномы накопили определенный уровень изменчивости. При этом следует учитывать, что разные группы вирусов имеют разные скорости накопления замен в геноме, и для них характерны различные преобладающие механизмы эволюции.

В случае РНК-содержащих вирусов, из-за высокой скорости эволюции значимое количество мутаций накапливается в геномах за короткое время. Для этих вирусов можно определить скорость накопления замен в геноме и провести реконструкцию истории на основе анализа изолятов, собранных даже в не очень отдаленные периоды времени. Скорость накопления мутаций в геноме ДНК-содержащих вирусов в основном значительно меньше, чем у РНК-содержащих вирусов, поэтому существуют большие сложности в определении скорости молекулярной эволюции большинства ДНК-содержащих вирусов.

Различия в скорости накопления мутаций определяют и возможную временную шкалу изучения эволюции вирусов. Высокая скорость накопления замен в геноме ряда вирусов не позволяет провести изучение их молекулярной эволюции на протяжении длительного периода времени. Скорость изменчивости РНК-содержащих вирусов составляет примерно  $10^{-2} - 10^{-4}$  нуклеотидных замен на сайт в год (Jenkins et al., 2002; Duffy et al., 2008). Следовательно, при построении эволюционных деревьев на глубину нескольких десятков или сотен лет достигается насыщение генома нуклеотидными заменами, и дальнейшая аппроксимация становится невозможной. Для многих ДНК-содержащих вирусов возможны построения на глубину нескольких тысяч или даже десятков тысяч лет.

Ситуация с восстановлением древней эволюционной истории вирусов осложняется тем, что до недавнего времени для них отсутствовали палеонтологические данные. Сначала появились данные о вирусных «геномных ископаемых» – фрагментах вирусных геномов в составе генома современных клеточных хозяев. Примером таких данных явилось открытие и характеристика ретровирусных последовательностей, принадлежащих новой подгруппе лентивирусов, в геноме европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*). Эти первые

описанные эндогенные вирусы, имеющие возраст более 7 миллионов лет, свидетельствуют о древнем происхождении лентивирусов, характеризующихся чрезвычайно высокой скоростью эволюции (Katzourakis et al., 2007). Появившаяся в последнее время возможность секвенирования ДНК, полученной из древних ископаемых, позволила исследовать геномы вирусов животных и человека, циркулировавших много сотен лет назад. Данные о древних последовательностях вирусов гепатита В, кори, натуральной оспы, «испанского» гриппа, парвовируса B19 позволило существенно расширить наши представления об эволюции вирусов (Guzmán-Solís et al., 2021; Dux et al., 2020; Mühlemann et al., 2020; Xiao et al., 2013).

Изучение variability вирусных геномов важно для оценки эпидемического потенциала возникающих вариантов вируса и для решения научной проблемы – прогнозирования появления новых инфекционных агентов, которые неизбежно будут возникать в ближайшем будущем. Стратегия молекулярной эволюции вирусов, принадлежащим к разным таксонам, может значительно варьировать. Для многих вирусов рекомбинация играет важную роль в эволюционной истории, а в случае сегментированных вирусов на первый план выходит реассортация. Однако для этих механизмов определяющим фактором является заражение клетки двумя и более вирусами. Это возможно при значительном превышении количества вируса над количеством чувствительных клеток. Вирусы могут эволюционировать как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения их геномов. В ряде случаев эволюция вируса идет в направлении увеличения патогенности, например, при широком использовании противовирусных препаратов и вакцин, в других случаях эволюция приводит к аттенуации вируса, например, в случае обширных эпидемий, приводящих к значительному снижению популяции чувствительных хозяев. Стратегия эволюции вируса зависит от множества факторов – ошибочности его репликации, организации генома, размера вирусной популяции, численности популяции хозяев, копияности вируса, его специфичности, степени летальности вызываемого заболевания, контагиозности вируса, его устойчивости в окружающей среде и т.д.

На примере продолжающейся в настоящее время вспышки оспы обезьян можно судить о важности исследования эволюции ортопоксвирусов. В течение долгого времени фиксировались только случаи зоонозного заражения людей, и не отмечались факты передачи вируса между людьми, но в последние 20-30 лет были обнаружены

события передачи вируса между людьми со все более увеличивавшейся инфекционной цепочкой. Молекулярная эволюция современных вирусов оспы обезьян демонстрирует значительно возросшую скорость накопления мутаций и, как следствие, его эффективную передачу от человека к человеку (Isidro et al., 2022). Современная вспышка обусловлена западноафриканским генотипом вируса оспы обезьян, вызывающим заболевание с низкой летальностью, однако имеются данные об эволюции высоко опасного центральноафриканского вируса в сторону большей контагиозности для человека (Nolen et al., 2016).

Молекулярная эволюция вирусов с протяженными двухцепочечными ДНК-геномами в течение долгого времени оставалась мало изученной. Скорость изменчивости протяженных двухцепочечных ДНК-геномов невысока, и эволюционный анализ на основе дат сбора образцов затруднен. Для решения этой проблемы ранее было высказано предположение, что видовое разнообразие ДНК-вирусов возникло параллельно с дивергентной эволюцией их хозяев, и было предложено оценить скорость эволюции ДНК-вирусов на основе сравнения филогений вирусов и их природных хозяев. Однако данная гипотеза не подтвердилась (McGeoch et al., 1995; Bernard et al., 1994; Bowden et al., 2006).

До начала наших исследований было известно лишь 8 полногеномных последовательностей астровируса человека. Не было данных об изменчивости их геномов. Секвенирование нами еще 8 геномов позволило на основе полученных и имеющихся последовательностей провести изучение особенностей молекулярной эволюции астровируса человека. В базах данных существовало ограниченное количество информации по последовательностям бокапарвовирусов человека, не были изучены механизмы репликации этого вируса и горячие точки рекомбинации в его геноме. Также до наших работ было очень мало данных об организации генома ортопоксвирусов. Не были разработаны молекулярно-биологические методы детекции различных видов ортопоксвирусов, и не были секвенированы их полные геномы. Это затрудняло изучение эволюции ортопоксвирусов. Наши первые исследования основывались на ДПЦР-ПДРФ анализе геномов вируса натуральной оспы. В последующем с накоплением данных о последовательностях геномов ортопоксвирусов эти исследования были дополнены и пересмотрены. В последнее время появились данные о последовательностях древних вирусов, которые позволили

значительно расширить наше понимание эволюции многих вирусов, в том числе вируса натуральной оспы.

Наши знания о характере и скорости эволюции вирусов постоянно развиваются и уточняются по мере накопления новых данных о геномных последовательностях и появления новых методов расчета эволюционной хронологии.

### **Цель и задачи исследования**

Основной целью настоящей работы являлось решение научной проблемы: изучение закономерностей молекулярной эволюции вирусов с различными типами геномов на примере астровирусов (РНК-геном), бокапарвовирусов (одноцепочечный короткий ДНК-геном) и ортопоксвирусов (двухцепочечный протяженный ДНК-геном).

В ходе решения научной проблемы решались следующие задачи:

1. Изучить особенности молекулярной эволюции астровируса человека:
  - исследовать вклад рекомбинации в эволюцию астровируса человека;
  - установить скорость молекулярной эволюции астровируса человека;
  - реконструировать эволюционную хронологию современных генотипов астровируса человека.
2. Изучить особенности молекулярной эволюции бокапарвовирусов:
  - исследовать механизмы репликации бокапарвовирусов человека;
  - изучить вклад рекомбинации в эволюцию бокапарвовирусов человека;
  - изучить эволюционные взаимосвязи бокапарвовирусов человека и приматов;
  - установить скорость молекулярной эволюции бокапарвовирусов.
3. Детально исследовать молекулярную эволюцию ортопоксвирусов:
  - изучить организацию геномов ортопоксвирусов;
  - установить скорость молекулярной эволюции ортопоксвирусов;
  - реконструировать эволюционную хронологию вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов.

## **Научная новизна**

Определены полные последовательности геномов ранее не изученных субгенотипов астровируса человека 2a и 2c, трех изолятов генотипа 3, двух изолятов редкого генотипа 4 и одного изолята 6-го генотипа. На основе данных секвенирования астровируса человека, а также с использованием данных, привлеченных из современных источников, была изучена эволюционная история этих вирусов. Впервые определена скорость накопления мутаций в геноме астровируса человека. Показано широкое распространение рекомбинаций в эволюционной истории этих вирусов.

Определены полные геномы российских изолятов бокапарвовируса человека, имеющего короткий одноцепочечный ДНК геном: одного изолята HBoV1, двух изолятов HBoV2 и двух изолятов редкого генотипа HBoV4; секвенирован геном уникального изолята, возникшего в результате рекомбинации между генотипами HBoV3 и HBoV4.

Для бокапарвовирусов человека изучен механизм репликации и показано, что все генотипы бокапарвовируса человека формируют репликативные интермедиаты типа «голова-хвост», что свидетельствует о репликации по типу «катящегося кольца». Для редко встречающегося генотипа 4 это показано впервые. Такой тип репликации кардинально отличает бокапарвовирусы человека от механизма репликации других парвовирусов по типу «катящейся шпильки».

Для 2-го и 4-го генотипов бокапарвовирусов человека построены вторичные структуры концевых некодирующих районов геномов и проведено их сравнение с соответствующими структурами других генотипов этих вирусов. Впервые показано сходство вторичных структур этих районов, играющих важную роль в репликации, для всех генотипов бокапарвовирусов.

Впервые установлено, что в отличие от других парвовирусов в геноме бокапарвовирусов присутствует только одна горячая точка рекомбинации, и предложен механизм преодоления иммунной системы хозяина этим вирусом путем рекомбинации распространенных изолятов бокапарвовирусов человека с редкими изолятами 4-ого генотипа.



Изучена эволюция современных бокапарвовирусов человека, рассчитана скорость изменчивости их геномов. На основе сравнительного филогенетического исследования геномов предложена гипотеза происхождения бокапарвовирусов человека от бокапарвовирусов приматов и впервые показано, что это произошло сравнительно недавно.

Изучена организация геномов различных ортопоксвирусов. Впервые были созданы методы видоспецифичной детекции четырех опасных для человека ортопоксвирусов на основе ПЦР.

Впервые на основе бинарных таблиц данных ДПЦР-ПДРФ анализа полных геномов 66 штаммов вируса натуральной оспы и гипотезы простых молекулярных часов оценена скорость накопления мутаций в геноме вирусов натуральной оспы. Дальнейшее накопление в базах данных большого количества полногеномных последовательностей ортопоксвирусов, полученных, в том числе, в результате палеогеномных исследований, позволило с использованием современных компьютерных методов уточнить расчёты скорости изменчивости геномов и впервые реконструировать хронологию происхождения различных видов ортопоксвирусов.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Проведенные исследования позволили провести анализ молекулярной эволюции вирусов с различной организацией геномов: астровируса человека, бокапарвовирусов человека и различных ортопоксвирусов.

Полученные данные о нуклеотидных последовательностях астровируса человека, бокапарвовирусов человека и различных ортопоксвирусов, включая вирус натуральной оспы, являются базисом для разработки различных методов детекции этих вирусов, для разработки современных вакцин и противовирусных препаратов. Изучение распространенности различных генотипов вирусов в ряде случаев может быть полезно для прогнозирования течения инфекционных заболеваний, например, в случае бокапарвовирусов человека и ортопоксвирусов.

Все полученные нуклеотидные последовательности вирусных геномов депонированы в международной базе данных GenBank.

Понимание механизмов репликации бокапарвовирусов человека имеет как теоретическую, так и практическую значимость и может быть полезно в борьбе с

этими вирусными патогенами, например, в поиске новых противовирусных препаратов.

До сих пор остаются неразгаданными многие механизмы, ответственные за появление новых опасных патогенов. Их исследование позволяет прогнозировать новые опасности и угрозы человеческому сообществу.

В целях безопасного хранения и изучения уникального генетического материала ДНК вируса натуральной оспы созданы коллекции ампликонов, содержащих перекрывающиеся фрагменты ДНК полных геномов этого вируса из российской коллекции. Впервые разработаны ПЦР методы детекции и видоспецифичной идентификации вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов, опасных для человека.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Рекомбинация играет важную роль в эволюции 2, 3, 4, 5, 7, и 8-го генотипов астровируса человека, в отличие от 1 и 6-го генотипа.
2. Средняя скорость накопления мутаций в геноме астровируса человека составляет  $3 \times 10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год.
3. У всех генотипов бокапарвовирусов человека репликация осуществляется по типу «катящегося кольца».
4. В геноме бокапарвовирусов человека присутствует горячая точка рекомбинации, расположенная в 5' области ОРТ3, кодирующей белок оболочки VP1. Обнаружен изолят, появившийся вследствие рекомбинации в этой точке между генотипами 3 и 4.
5. Средняя скорость молекулярной эволюции бокапарвовирусов приматов составляет  $9 \times 10^{-4}$  замен/сайт/год.
6. Штаммы вируса натуральной оспы из Южной Америки и из Западной Африки формируют отдельный подтип вируса натуральной оспы.
7. Средняя скорость накопления замен в геноме вируса натуральной оспы составляет  $4,4 \times 10^{-6}$  нуклеотидных замен на сайт в год.
8. Вирус натуральной оспы, вирус оспы верблюдов и татерапоксвирус предположительно отделились от общего предшественника около 270 (13-494) г. н.э.

### **Публикации и апробация работы**

Основные результаты исследования отражены в 25 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus; получен патент на изобретение РФ. Опубликовано 18 работ в сборниках научных конференций. Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: The Fifth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (Novosibirsk 2006); Sixth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (Novosibirsk 2008); XIV International Congress of Virology (Istanbul, Turkey 2008); 17th International Poxvirus and Iridovirus Conference (Grainau, Germany 2008); International Moscow Conference on Computational Molecular Biology (Moscow, Russia, 2009); 7th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (Novosibirsk 2010); XV International Congress of Virology (Sapporo, Japan 2011); The XIX International Poxvirus, Asfarvirus and Iridovirus Conference (Salamanca, Spain, 2012); 5<sup>th</sup> European Congress of Virology (Lyon, France 2013); Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск 2013); VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная Диагностика - 2014» (Москва 2014); VI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням (Москва 2014); The 17th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (Prague, Czech Republic 2014). Результаты работы были представлены на Совещаниях Консультативного комитета ВОЗ по изучению вируса натуральной оспы (2006, 2007).

### **Личный вклад автора**

Представленные в работе результаты получены либо автором лично, либо при его участии. Все расчеты молекулярной эволюции вирусов выполнены лично автором. В приведенном списке публикаций приведены имена всех соавторов.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Молекулярная эволюция астровирусов с +РНК-геномом**

На сегодняшний день астровирус человека относится к виду *Mamastrovirus 1* рода *Mamastrovirus* семейства *Astroviridae* и является одним из этиологических агентов гастроэнтерита у людей, в основном у маленьких детей, пожилых людей и пациентов с ослабленным иммунитетом. Астровирусы представляют собой икосаэдрические безоболочечные вирусы диаметром 28-30 нм, имеющие характерную звездообразную структуру на поверхности вируса. Их геном представлен одноцепочечной +РНК длиной 6-7 тысяч нуклеотидов, содержащей 5'- и 3'- нетранслируемые области и три перекрывающиеся открытые рамки трансляции (ОРТ), которые кодируют неструктурные белки (ОРТ1а), РНК-зависимую полимеразу (ОРТ1b) и предшественник капсидного белка (ОРТ2). Выделяют восемь различных серотипов астровируса человека, им соответствуют восемь различных генотипов (Bosch et al., 2014; Mendez and Arias, 2007).

В молекулярную эволюцию астровируса человека, как и большинства других вирусов, наибольший вклад вносят рекомбинация и накопление мутаций. Генетическая рекомбинация играет важнейшую роль в возникновении новых генетических вариантов вирусов и их уходе от иммунной системы хозяев; она позволяет вирусам быстро изменить свои свойства. Вероятность рекомбинации зависит от степени гомологии между нуклеотидными последовательностями, их длины, наличия так называемых горячих точек рекомбинации, структуры генома, механизма вирусной репликации и т.д.

Изучение молекулярной эволюции вирусов основано на последовательностях известных изолятов, собранных в различное время из различных территорий. Чем больше такой информации находится в распоряжении исследователя, тем более точная реконструкция эволюционной истории возможна. Для того, чтобы выявить различные генотипы, циркулирующие в г. Новосибирске в 2003–2010 гг., нами были секвенированы геномы астровируса человека. Определены полные последовательности геномов ранее не изученных субгенотипов астровируса человека 2а и 2с, трех изолятов генотипа 3, двух изолятов редкого генотипа 4 и одного изолята 6-го генотипа.

Было показано, что геномы, изучаемых нами изолятов астровируса человека генотипов 2а, 2с, 3, и 4 возникли в результате рекомбинации. Рекомбинационные события препятствуют как филогенетическому анализу, так и реконструкции

эволюционной истории вирусов. В этом случае при анализе одна часть рекомбинантной последовательности будет показывать сходство с одной родственной последовательностью, а другая часть будет более сходна с другой последовательностью. Следовательно, рекомбинация препятствует построению хронограмм. Наличие внутри геномной последовательности достоверных точек рекомбинации может приводить к ошибкам в поиске родственных последовательностей и неправильным датировкам скоростей эволюции.

Поиск возможных сайтов рекомбинации, проведенный с помощью программы GARD, выявил четыре потенциальных сайта рекомбинации в полных геномах астровирусов человека со значимой статистической поддержкой (более 0,9) (рис. 1). Мы использовали данные о потенциальных точках рекомбинации в геноме астровирусов человека для поиска последовательностей, в которых не детектируются рекомбинационные события и, следовательно, подходящих для установления скорости эволюции астровируса человека.

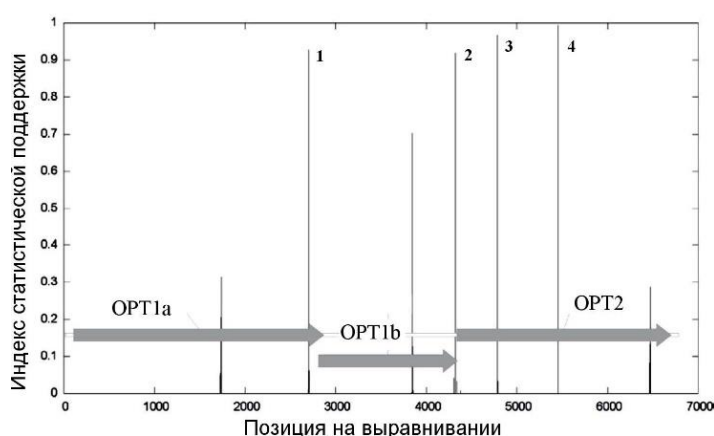


Рис. 1. График, демонстрирующий положение вероятных сайтов рекомбинации на геноме астровирусов. Серые стрелки обозначают вирусные OPT.

В наших исследованиях впервые на основе последовательности OPT1a была определена средняя скорость накопления мутаций в геноме астровирусов человека, которая была оценена величиной  $3 \times 10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год. Ошибочность репликации и скорость репродукции вируса обуславливают молекулярную эволюцию вирусов. Для РНК-содержащих вирусов средняя скорость накопления замен составляет  $10^{-3}$  нуклеотидных замен на сайт в год и варьирует от  $10^{-4}$  до  $10^{-2}$  (Jenkins et al., 2002; Duffy et al., 2008). Наше исследование показало, что

частота накопления мутаций в геноме астровируса соответствует высоко изменчивым вирусам (рис. 2).

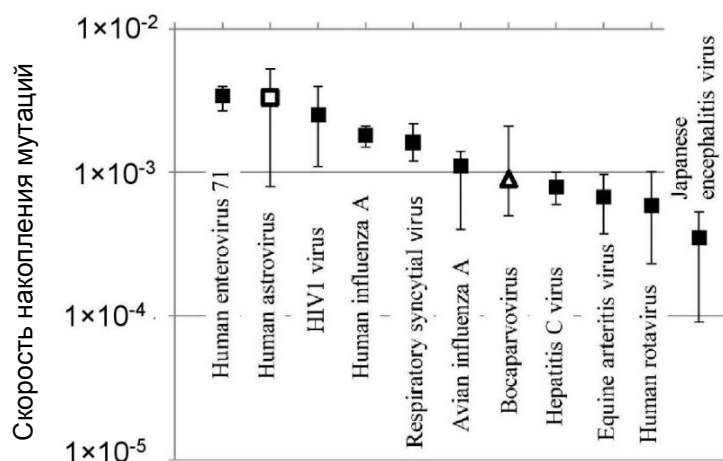


Рис. 2. Скорости эволюции вирусов. Пределы погрешностей отражают 95% доверительные интервалы. Скорость накопления мутаций (замен на сайт в год) отмечена черным квадратом, за исключением астровируса человека (не закрашенный квадрат) и бокапарвовирусов (треугольник).

Изучение эволюционной хронологии показало, что исследуемые генотипы астровируса человека разделились около 700 лет назад (рис. 3). Независимая эволюция исследованных изолятов астровируса человека 2-го и 4-го генотипов от их общего предка началась примерно 550 лет назад. Хронологический анализ показал, что остальные генотипы астровируса человека разделились около 530 лет назад на две линии: первая в дальнейшем образовала генотипы 1 и 3, а вторая - 5 и 6. Наиболее распространенный генотип, HAsTV-1, отделился от своего общего предка с HAsTV-3 примерно 420 лет назад. Современные последовательности изолятов одного генотипа сформировались за последние 20-30 лет, за исключением изолятов генотипа 2.

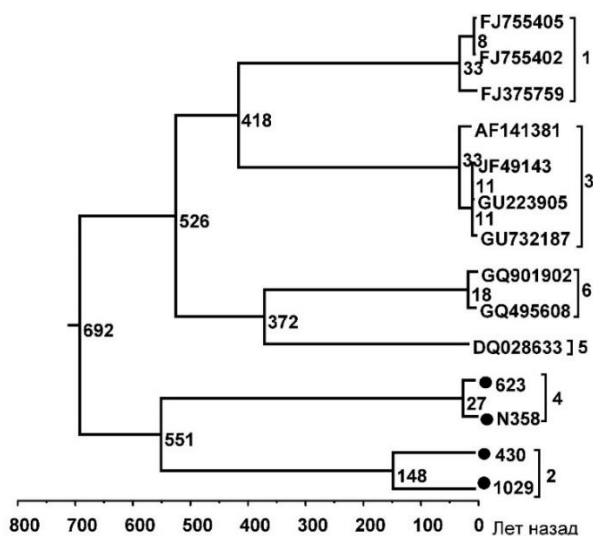


Рис. 3. Хронограмма, рассчитанная на основе последовательностей астровируса человека в программе Beast. Черными кружками обозначены изученные нами последовательности изолятов; генотипы показаны справа; времена расхождения (годы) указаны в узлах дерева; и шкала времени показана внизу.

На сегодняшний день в Genbank депонированы 95 полногеномных последовательностей астровируса человека. Поиск возможных рекомбинационных событий показывает, что все изоляты генотипов 2, 3, 4, 5, 7 и 8 с высокой вероятностью возникли в результате рекомбинации. При этом полногеномные последовательности шестого генотипа не демонстрируют достоверных признаков рекомбинации, а среди 41 изолята первого генотипа только один референсный штамм V1347 произошел в результате рекомбинации.

Таким образом, нами впервые изучена молекулярная эволюция астровируса человека и показано, что астровирус человека является высокоизменчивым вирусом с высокой скоростью накопления замен и частыми рекомбинационными событиями

## **2. Молекулярная эволюция бокапарвовирусов, характеризующихся короткими одноцепочечными ДНК-геномами**

В настоящее время в род бокапарвовирус (*Bocaparvovirus*) семейства *Parvoviridae* входят такие виды вирусов приматов, как Primate bocaparvovirus 1, Primate bocaparvovirus 2 и Primate bocaparvovirus 3. В первый вид входят бокапарвовирусы человека 1 и 3 генотипов и бокапарвовирус горилл; во второй – бокапарвовирусы человека генотипов 2a, 2b, 2c и 4; в третий – бокапарвовирус макаки-резус (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Бокапарвовирусы представляют собой небольшие вирусы без оболочки с линейной одноцепочечной смысловой или антисмысловой ДНК длиной около 5,3 тысяч нуклеотидов. Геномная ДНК упакована в икосаэдрический нуклеокапсид диаметром около 25 нм. Характерной особенностью, отличающей бокапарвовирусы от остальных парвовирусов, является экспрессия фосфорилированного неструктурного белка NP1 (массой 26 кДа). OPT2, кодирующая белок NP1, расположена в середине генома между OPT1, обуславливающей синтез многофункционального неструктурного белка NS1, и OPT3, кодирующей основные структурные белки VP1, VP2 и VP3. NP1 белок специфичен только для рода бокапарвовирус и не обнаруживается у других парвовирусов (Berns and Parrish, 2007; Sukhu et al., 2013).

Для детальной реконструкции эволюционной истории вируса важно накопить как можно больше информации о биоразнообразии существующих на сегодняшний день штаммов вируса. С целью оценки разнообразия циркулирующих изолятов бокавирусов человека в Новосибирске были секвенированы вирусные ДНК из образцов, полученных в различные годы (2010-2012). При этом, все известные генетические варианты бокавирусов человека были обнаружены, хотя и с разной встречаемостью. Были определены полные геномы одного изолята бокавируса человека генотипа 1, двух изолятов генотипа 2 и двух изолятов редкого генотипа 4. К началу исследований в Genbank содержалась только одна последовательность полного генома 4-го генотипа. Был секвенирован геном изолята, возникшего в результате рекомбинации между генотипами 3 и 4.

Механизмы функционирования и эволюции бокапарвовирусов человека могут быть всесторонне изучены только на основе полных геномов этих вирусов. Полногеномные последовательности бокапарвовирусов включают, в частности, терминальные некодирующие области, формирующие шпилечные структуры. Данные районы вирусного генома имеют решающее значение как для репликации, так и для упаковки вирусной ДНК; кроме того они важны для инициации транскрипции с помощью вирусного белка NS1. Вторичная структура шпилек гетерогенна и частично имеет структуру двухцепочечной ДНК (Chen et al., 2010; Dijkman et al., 2009; Kapoor et al., 2011).

Известно, что репликация геномов родов *Erythrovirus*, *Parvovirus* и *Dependovirus* семейства *Parvoviridae* осуществляется методом «катящейся шпильки» (rolling hairpin), при этом формируются сопряженные промежуточные структуры типа 5'-5' или 3'-3' (Chen et al., 2005; Musatov et al., 2002). Однако для представителей рода *Bocaparvovirus* поиски таких интермедиатов закончились неудачей, при этом были обнаружены кольцевые формы типа 5'-3'. В этом случае репликация вирусов, вероятно, происходит по типу «катящегося кольца» (rolling circle) (Zhao et al., 2012; Huang et al., 2012). Преимущественное обнаружение антисмысловых геномов бокапарвовирусов также может свидетельствовать о репликации этих вирусов по механизму «катящегося кольца». Формирование смысловых и антисмысловых геномов в эквимоларной пропорции обуславливается репликацией по типу



«катящейся шпильки». В настоящее время продолжаются исследования механизма репликации бокапарвовирусов человека.

На основе секвенированных нами и ранее опубликованных полных геномных последовательностей бокапарвовирусов человека нами был разработан набор праймеров для обнаружения всех возможных промежуточных продуктов репликации бокапарвовирусов. Исследование различных генотипов бокапарвовируса проводилось с помощью созданного комплекта праймеров. Структуры 5'-5' и 3'-3' не были выявлены для всех изученных генотипов бокапарвовирусов человека. Во всех случаях были обнаружены структуры типа 5'-3', которые соответствуют антисмысловой кольцевой репликативной форме вирусного генома.

Кроме того, нам удалось определить структуры концевых шпилечных последовательностей геномов бокапарвовируса человека 2-го и 4-го генотипа вида *Primate bocaparvovirus 2*. Следует отметить, что такие структуры для 4-го генотипа ранее не были известны. При секвенировании изолята RUS\_NSC\_10-N386 2-го генотипа и изолята RUS\_NSC\_11-N2657 4-го генотипа были выявлены генетические неоднородности концевых последовательностей. Впервые была показана гетерогенность некодирующих терминальных районов последовательностей генома одного образца бокапарвовируса человека, что, по-видимому, обуславливается высокой степенью ошибочности репликации этого района генома со сложноорганизованной вторичной структурой.

Вторичные структуры терминальных некодирующих областей были рассчитаны как для изучаемых новосибирских изолятов бокапарвовируса человека 2-го и 4-го генотипов, так и для других генотипов вируса (рис. 4). Среди всех изученных генотипов нам во всех случаях удалось обнаружить высококонсервативные вторичные структуры, вероятно, важные для репликации бокапарвовирусов человека. При этом все последовательности имели множественные отличия между собой. Для всех последовательностей были выявлены: терминальный 3' концевой стержень с петлей, шпилька с Y структурой, и 5' терминальный блок стержней и петель (рис. 4). Следует подчеркнуть, что длинные шпильки концевых областей бокапарвовирусных геномов демонстрируют высокие показатели свободной энергии. Наибольшие показатели свободной энергии связи шпилек были отмечены в

случае новосибирских изолятов, что свидетельствует о высокой стабильности этих структур.

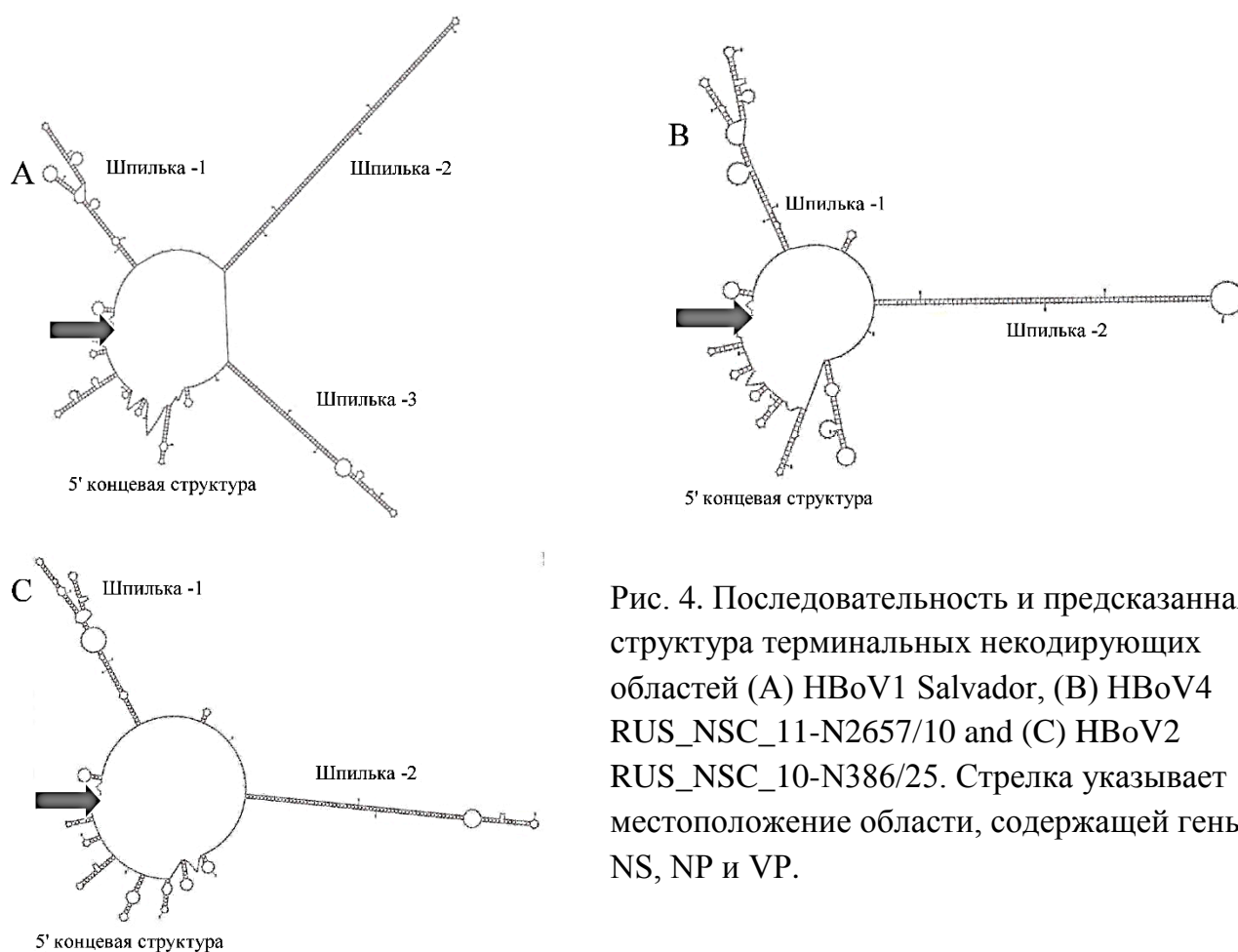


Рис. 4. Последовательность и предсказанная структура терминальных некодирующих областей (A) HBoV1 Salvador, (B) HBoV4 RUS\_NSC\_11-N2657/10 and (C) HBoV2 RUS\_NSC\_10-N386/25. Стрелка указывает местоположение области, содержащей гены NS, NP и VP.

Далее мы анализировали вклад рекомбинации в эволюцию бокапаровирусов человека. Известно, что генетическая рекомбинация способна обеспечить быструю эволюционную приспособляемость, невозможную в случае только мутационной изменчивости. Ранее было высказано предположение, что генотипы 2 и 3 бокапаровирусов человека произошли в результате рекомбинации генотипов 1 и 4, при этом картина происхождения второго генотипа осложнена дополнительной рекомбинацией внутри данного генотипа (Fu et al., 2011; Kapoor et al., 2009; Song et al., 2010). Это свидетельствует о важной роли рекомбинации в эволюции бокапаровирусов человека. В ряде работ было показано наличие смешанных бокапаровирусных инфекций, что обеспечивает потенциал для рекомбинации этих вирусов.

В процессе определения нуклеотидных последовательностей полных геномов изолятов бокапарвовирусов из г. Новосибирска нами был выявлен изолят вируса RUS\_NSC\_11-N2512, являющегося рекомбинантом 3-го и 4-го генотипов бокапарвовируса. При филогенетическом анализе последовательностей OPT1 и OPT2 геномов бокапарвовирусов было выявлено близкое родство вируса RUS\_NSC\_11-N2512 с изолятами 3-го генотипа; при этом, последовательность OPT3 этого новосибирского вируса объединялась с таковыми изолятов 4-го генотипа. В ходе углубленного анализа было установлено, что рекомбинация произошла в 5'- области OPT3, кодирующей белок VP1 (рис. 5). При анализе всех известных полногеномных последовательностей бокапарвовирусов человека мы показали, что в данном районе находится горячая точка рекомбинации. Ранее было показано, что в геномах других парвовирусов находятся две горячие точки рекомбинации. Первая расположена в конце последовательности гена белка NS1, а вторая – в начале гена VP1 белка (Lefeuvre et al., 2009). Однако, в геномах бокапарвовирусов человека сохранилась только вторая точка рекомбинации, возможно, из-за наличия между генами белков NS1 и VP1 дополнительной OPT, кодирующей белок NP1.

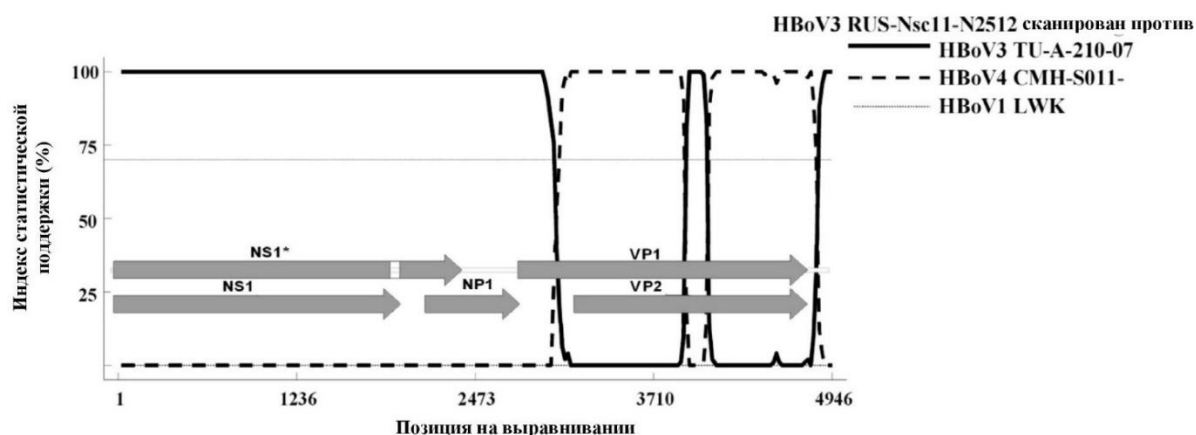


Рис. 5. Анализ последовательностей генома бокапарвовируса человека RUS\_NSC\_11-N2512 с использованием метода Bootscan. Серыми стрелками указаны OPT бокапарвовирусов.

Для исследования природы горячей точки рекомбинации мы проанализировали последовательности геномов бокапарвовирусов человека всех известных генотипов и выявили, что прилежащие к горячей точке последовательности имеют уникальный состав: до нее находится район с самой высокой долей АТ в геноме, после нее расположен район с самой высокой долей GC в геноме. По-видимому, такая структура способствует рекомбинации, увеличивая вероятность отделения

полимеразы от геномной ДНК и перехода ее на другую матрицу в случае смешанной инфекции. Горячая точка рекомбинации расположена вне последовательности жизненно важных генов NS1 и NP1.

Генотипы бокапаровирусов человека 2 и 3, произошли вследствие рекомбинации генотипов 1 и 4. При этом они получили фрагменты генома 1-го генотипа содержащие гены, кодирующие белки NS1 и NP1, и фрагменты генома 4-го генотипа содержащие ген, кодирующий белок VP1. Эти рекомбинантные вирусы получили адаптационные преимущества, так как генотип 4 редко встречается у пациентов. При анализе последовательностей современных бокапаровирусов 2-го и 3-го генотипов нами была выявлена закономерность к дополнительной замене гена белка VP1 в процессе рекомбинации с 4-ым генотипом (рис. 6). Данная тенденция к приобретению гена, кодирующего белок оболочки редкого вируса, может способствовать уклонению бокапаровирусов от иммунной защиты хозяина.

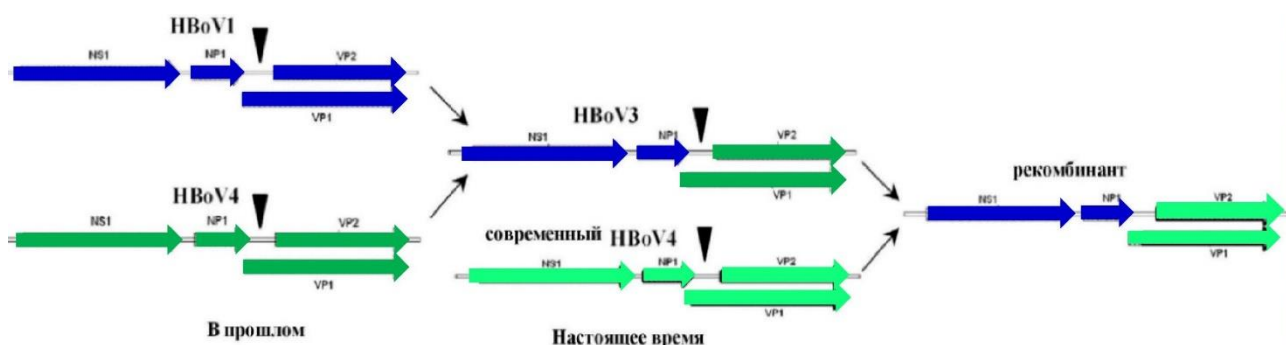


Рис. 6. Предполагаемая схема возникновения генотипа HBoV3 в результате рекомбинации между HBoV1 и HBoV4 и появление рекомбинантного новосибирского изолята в результате рекомбинации между HBoV3 и HBoV4. Жирными стрелками показаны точки рекомбинации.

С привлечением последовательностей из баз данных и секвенированных нами структур изолятов бокапаровирусов из Новосибирска нами была выведена эволюционная хронология этих вирусов человека. Была сконструирована хронограмма с использованием полных геномов бокапаровирусов 1-го, 4-го генотипа и бокапаровируса горилл (рис. 7). Генотипы 2 и 3 бокапаровирусов человека не были включены в исследование в связи с выявленными рекомбинационными событиями в их геномах. Из полученных результатов следует, что изученные современные изоляты бокапаровирусов человека генотипа 1 возникли сравнительно недавно – не более 30 лет назад. Изолят *RUS\_NSC\_10-N1117* из Новосибирска дивергировал от тунисского изолята *TUN\_2207* примерно 4 года назад. Из анализа

хронограммы следует, что наибольшая скорость эволюции определяется в узлах возникновения новых генотипов бокапарвовирусов. Средняя скорость накопления мутаций в геномах изучаемых бокапарвовирусов оказалась сравнительно высокой для вирусов с ДНК-геномами, около  $9 \times 10^{-4}$  замен на сайт в год. Этот неожиданно высокий показатель оказался близким к скорости эволюции РНК-содержащих вирусов (Duffy et al., 2008; Jenkins et al., 2002) (рис. 2). Можно заключить, что ДНК-содержащие вирусы с короткими одноцепочечными геномами демонстрируют высокую скорость накопления мутаций.

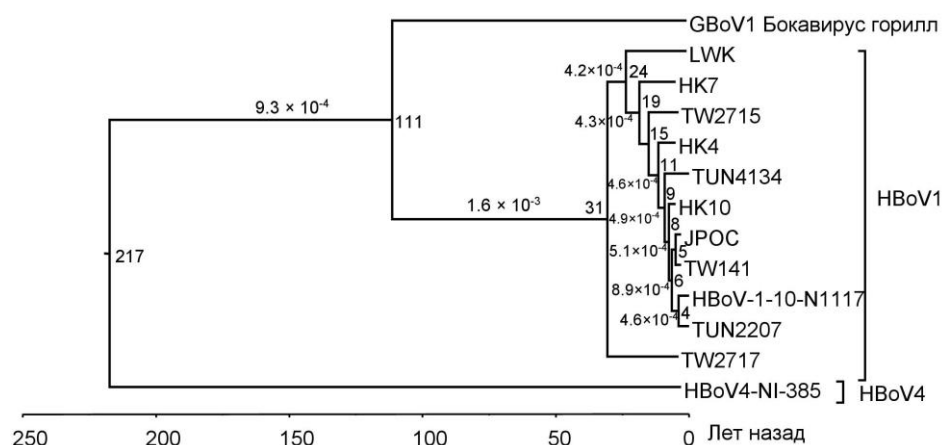


Рис. 7. Хронограмма, построенная на основе полногеномных последовательностей бокапарвовирусов с помощью программы Beast. Скорости накопления мутаций указаны над ветвями (замены/сайт/год). Числа в узлах указывают время до самого последнего общего предка клад (лет назад). Генотип вируса выделен скобками.

Затем для всех четырех генотипов бокапарвовирусов была рассчитана хронограмма с использованием участков последовательностей ОРТ1 и ОРТ3 геномов этих вирусов (рис. 8), для которых не были выявлены рекомбинационные события. Сравнительный анализ хронограмм обнаружил, что первый генотип дивергировал от общего предка с изолятом RT-BQ2392 бокапарвовируса шимпанзе около 60-80 лет назад. Ранее произошло отделение бокапарвовируса горилл, при этом можно отметить высокий уровень гомологии между изолятом, полученным в США, и изолятами из дикой природы в Камеруне. Это свидетельствует о завозе вируса в США из Африки. Изучение трех филограмм (рис. 7, 8) приводит к выводу о более раннем начале независимой эволюции бокапарвовируса 4-го генотипа, датируемом 200-300 лет назад. Можно отметить значительные генетические отличия 1-го и 4-го генотипов. Это наблюдение привело к тому, что недавно международным

таксономическим комитетом эти генотипы были отнесены к отдельным видам бокапарвовирусов.

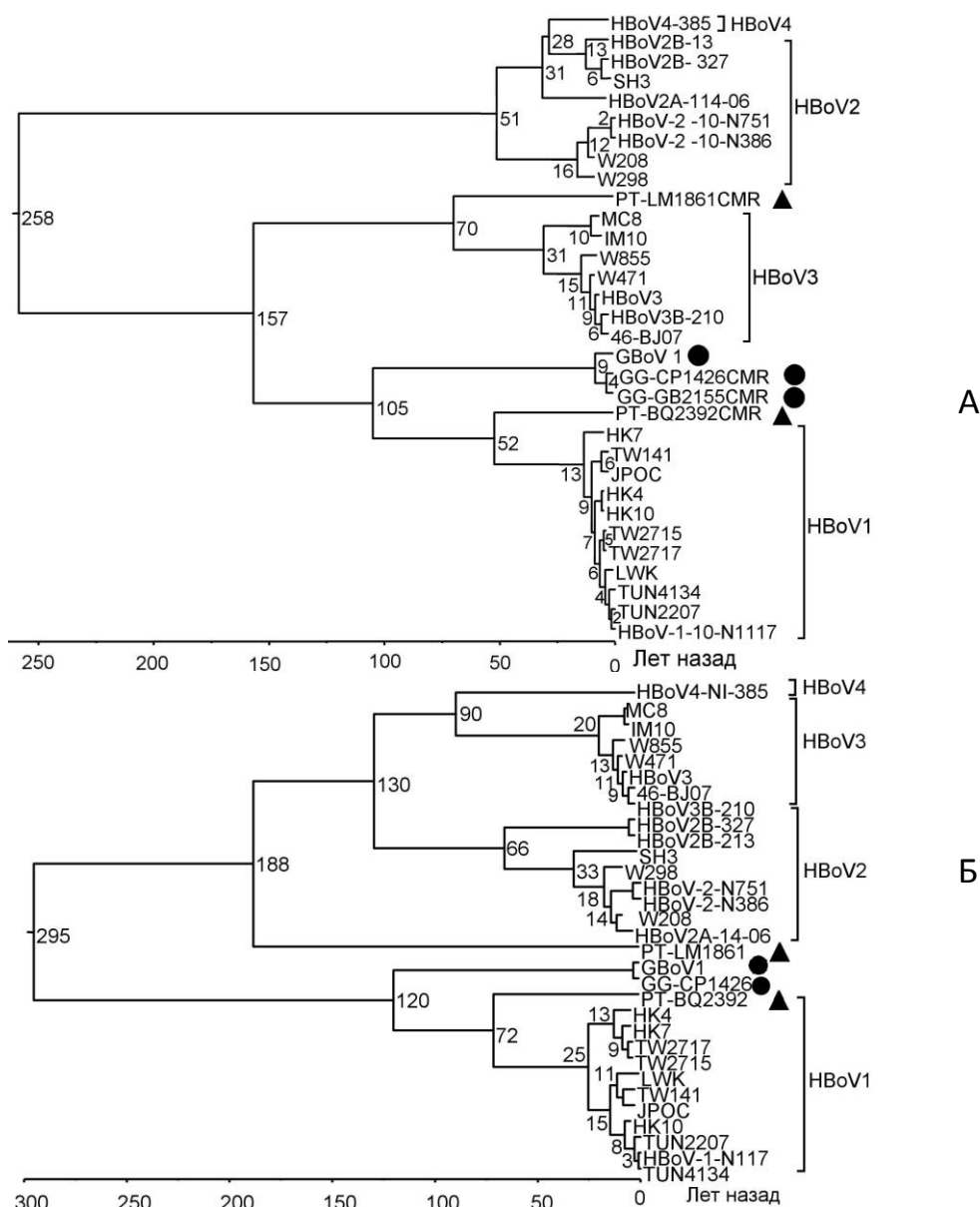


Рис. 8. Хронограмма, построенная на основе последовательности ORF1 (А) и ORF3 (Б) с помощью программы Beast. Числа в узлах указывают время до самого последнего общего предка клад (лет назад). Генотип вируса выделен квадратными скобками. Изоляты бокапарвовирусов шимпанзе отмечены треугольниками, а бокапарвовирусов горилл – кружками.

Из имеющихся на сегодняшний день данных можно сделать заключение о происхождении бокапарвовирусов человека. По-видимому, виды *Primate bocaparvovirus 1* и *Primate bocaparvovirus 2* независимо произошли от бокапарвовирусов обезьян, при этом из хронограмм следует, что современные генотипы бокапарвовирусов человека сравнительно молоды и возникли от общего с

приматами предка 100-300 лет назад. В пользу этого свидетельствует циркуляция различающихся между собой бокапарвовирусов горилл и шимпанзе в природных резервуарах, а также открытие в дикой природе Primate bocaparvovirus 3 у макаки-резус. Следовательно, бокапарвовирусы человека имеют зоонозное происхождение.

Таким образом, анализ последовательностей изолятов бокапарвовирусов человека из различных районов планеты обнаруживает высокий уровень гомологии среди изолятов, принадлежащих к одному генотипу бокапарвовирусов. Это говорит о высоком потенциале повсеместного распространения этих вирусов. Принимая во внимание высокую скорость генетической изменчивости данных вирусов, можно постулировать необходимость постоянного мониторинга этих человеческих патогенов.

### **3. Молекулярная эволюция ортопоксвирусов с протяженными двухцепочечными ДНК-геномами**

Ортопоксвирусы относятся к наиболее изученному роду семейства *Poxviridae*, включающему сложноорганизованные вирусы с протяженным ДНК геномом. Большинство этих вирусов распространены в Старом Свете. Известно только три вида ортопоксвирусов Нового Света – вирусы оспы енотов, скунсов и полевок. Эти вирусы демонстрируют значительные генетические отличия от вирусов Старого Света. Спектр изученных ортопоксвирусов постоянно расширяется. В дополнение к классическим ортопоксвирусам, представляющим опасность для человека – вирусу натуральной оспы (ВНО), вирусу оспы обезьян (ВОО), вирусу осповакцины (ВОВ) и вирусу оспы коров (ВОК), недавно были открыты ранее неизвестные Abatino, Akhmeta and Alaskapox вирусы, способные заражать человека (Shchelkunov et al., 2005; Gao et al., 2018; Springer et al., 2017; Gruber et al., 2018). При этом два последних вируса образуют обособленные от остальных ортопоксвирусов Старого Света ветви на родовой филограмме этих вирусов.

Двухцепочечная геномная ДНК ортопоксвирусов характеризуется длиной около 180-240 тыс. п.н. Геномы всех ортопоксвирусов организованы сходным образом – имеется протяженная центральная консервативная область, содержащая гены, жизненно важные для вируса и концевые вариабельные области генома. Большинство белков, кодируемых генами центральной консервативной области,

участвуют в основных этапах морфогенеза вируса: репарации и репликации ДНК, транскрипции, модификации белков или формирования вирионов.

### **3.1. Детекция, секвенирование и анализ геномов патогенных для человека ортопоксвирусов**

Первый этап работы по изучению генетической структуры и эволюции ортопоксвирусов включал детекцию и секвенирование геномов различных ортопоксвирусов. В первую очередь мы сконцентрировались на патогенных для человека видах. Для дифференциации географических биовариантов вируса натуральной оспы методом ПЦР были рассчитаны праймеры для последовательности OPT O1L, расположенной в терминальной вариабельной области генома ВНО, что позволило отличить *variola minor* от других штаммов ВНО.

Исследование полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) позволило надежно дифференцировать азиатские штаммы ВНО от африканских.

Был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей опасных для человека ортопоксвирусов – BOO, BOB, ВНО и ВОК и на его основе разработан метод быстрой видоспецифичной детекции, с помощью мультиплексной ПЦР. Были сконструированы пять пар праймеров: первая пара – родоспецифичная на все ортопоксвирусы (к последовательности высококонсервативного гена F4L), остальные четыре пары – видоспецифичные на ВНО, BOO, ВОК и BOB. В эксперименте на панели 57 образцов ДНК различных изолятов ортопоксвирусов, в том числе препаратов из клинических образцов, была показана высокая чувствительность ( $10^3$  вирусных частиц на мл) и специфичность (100%) созданного метода идентификации патогенных ортопоксвирусов.

Были получены геномные фрагменты BOB штаммов ЛИВП и WR, которые картировали с использованием тринадцати эндонуклеаз рестрикции. Сравнение рестрикционных карт нуклеотидных последовательностей штаммов WR и ЛИВП показало, что ДНК штамма ЛИВП содержит 3 делеции и 2 вставки относительно штамма WR.

В целях исследования и сохранения российской коллекции ВНО нами была проведена амплификация геномов 21 штамма коллекции. Для этого были сконструированы праймеры, позволяющие получить набор из 20 перекрывающихся



ампликонов, покрывающий полный геном ВНО. Ампликоны были синтезированы в ходе длинной полимеразной цепной реакции. Был проведен сравнительный ПДРФ анализ ампликонов полных геномов штаммов ВНО российской коллекции, выделенных в разных географических регионах, и было показано, что наибольшая изменчивость наблюдается в протяженных терминальных районах ВНО. Геномные последовательности ВНО в виде коллекции ампликонов могут сохраняться в течение длительного времени в биологически безопасной форме и обеспечивать исследовательскую работу по изучению генетической организации этого уникального вируса. Созданные коллекции ампликонов были паспортизованы и заложены на долговременное хранение.

При филогенетическом анализе данных ПДРФ было показано, что штаммы ВНО, изолированные во время московской вспышки натуральной оспы 1960 г., кластеризуются с азиатскими штаммами, что согласуется с эпидемиологическими данными о завозе ВНО из Индии. Был обнаружен незначительный полиморфизм последовательностей геномов штаммов ВНО из московской вспышки оспы.

Полученные филограммы 21-го штамма ВНО российской коллекции включали три кластера – штаммы из Азии, из Африки и южноамериканские штаммы (ВНО *minor alastrim*). Был проведен расширенный ДПЦР-ПДРФ анализ полных геномов 21 штамма российской коллекции и 45 штаммов ВНО коллекции США. Сравнительный филогенетический анализ и в этом случае выявил три основные клады вируса. Азиатские штаммы формировали первую кладу; вторая кладка включала штаммы из Азии и Африки; штаммы из Южной Америки и Западной Африки образовывали третью кладу. Третья кладка была генетически наиболее удалена от штаммов двух других клад, формируя две отдельные группы штаммов – из Западной Африки и Южной Америки. Проведенное филогенетическое исследование впервые выявило, что штаммы третьей кладки формируют обособленный генотип ВНО (Р2). К генотипу Р1 были отнесены азиатские и африканские штаммы *variola major*.

Было проведено клонирование, секвенирование и анализ генетических последовательностей различных штаммов ВОВ, ВОО, ВОК и ВНО. Были секвенированы три фрагмента генома ВОВ штамм ЛИВП и изучены свойства белков, закодированных в данных последовательностях. Были локализованы короткие

прямые повторы в переменных районах генома штамма ЛИВП и показана их возможная роль в образовании делеций ДНК в процессе вирусной репликации.

В составе большой группы исследователей нами впервые был секвенирован геном ВОО, выделенный от пациента во время крупной вспышки оспы обезьян в Заире в 1996 году.

Было проведено секвенирование протяженных терминальных переменных областей генома штаммов ВНО из российской коллекции. Были определены нуклеотидные последовательности двух областей для 22 штаммов ВНО, всего было секвенировано более 540 тыс. п.н. Углубленное рассмотрение полученных данных и их сравнение с данными по коллекции ВНО США установило особенности кластеризации штаммов ВНО и генетические расстояния как между, так и внутри кластеров. Были установлены наиболее переменные районы этих областей геномов. Эти районы располагаются или в межгенных областях геномов, или на месте нарушенных последовательностей потенциальных генов. Эти переменные районы геномов могут быть использованы для идентификации различных генотипов ВНО. Поиск возможных рекомбинационных событий с привлечением различных подходов не выявил достоверных точек рекомбинации в геномах ВНО.

Были изучены потенциальные ОРТ в концевых переменных областях генома ВНО из коллекции РФ и проведено их структурно-функциональное исследование. Были найдены наиболее консервативные и переменные районы терминальных областей. Уникальная для ВНО ОРТ, гомологичная ОРТ 179 штамма М96 ВОВб, кодирующая *schlafen*-подобный белок ортопоксвирусов, была выявлена для штаммов Helder и Mary из российской коллекции. Установлен тип эволюционного отбора для всех ОРТ переменных областей генома ВНО. Показано, что большинство генов терминальных переменных областей находятся под отрицательной селекцией, кроме ОРТ С3L, которая находится под адаптивным отбором. Эти результаты свидетельствуют о том, что этот ген, кодирующий синтез белка ингибитора РНК-зависимой протеинкиназы, возможно, играет важную роль в адаптации ВНО к человеку.

### **3.2. Датирование молекулярной истории ортопоксвирусов.**

Вопрос о причинах заболевания натуральной оспой всегда интриговал людей и являлся предметом создания легенд и мифов. Проявления натуральной оспы имеют характерные признаки в виде кожных поражений, однако такие поражения не описаны в древних текстах. В настоящее время большинство исследователей считают, что первое достоверное описание натуральной оспы относится к Китайским рукописям 4-го века, в которых источником заболевания названа Индия. Достоверные упоминания об этом заболевании в Европе встречаются в источниках 6-го века нашей эры (Fenner et al., 1988; Hopkins 2002).

Таким образом, можно заключить, что ВНО появился относительно недавно. ВНО является строгим антропонозом и может приводить к заболеванию с высоким уровнем смертности. При эпидемии оспы значительное количество восприимчивых людей или умирает, или выздоравливает, приобретая иммунитет к вирусу. После пика заболеваемости масштабы эпидемии уменьшаются. Повторная вспышка эпидемии обуславливается возникновением большой прослойки неиммунного населения. Для данной модели циркуляции вируса необходима высокая плотность восприимчивого населения. Известно, что для другого специфичного только для человека патогена – вируса кори – требуется значительная плотность населения, не менее двухсот тысяч человек на сравнительно небольшой территории, для существования резервуара вируса. По-видимому, для циркуляции ВНО необходимы аналогичные условия. Такие условия возникли не ранее 10 тысяч лет назад после возникновения больших поселений людей, обусловленных появлением сельского хозяйства и животноводства (Gubser and Smith 2002; Hopkins 2002).

В пользу сравнительно недавнего происхождения ВНО говорит и высокая смертность от вызываемого им заболевания. Эта черта часто отличает вирус, недавно приспособившийся к новому хозяину. Во многих случаях дальнейшая эволюция такого вируса приводит к уменьшению показателей летальности заболевания (Domingo 2010; Wolfe et al., 2007; Woolhouse et al., 2005). Такой феномен наблюдался при использовании поксвируса миксоматоза кроликов в целях ограничения численности диких австралийских кроликов. При этом показатель смертности от миксоматоза уменьшились за сравнительно короткий период времени вследствие аттенуации вируса (Kerr et al., 2017). Другим примером аттенуации может быть эволюция ВОО. Распространенный в последний год западноафриканский генотип

ВОО вызывает значительно более легко протекающее заболевание чем подтип из Центральной Африки.

В шестнадцатом веке ВНО впервые появился в Новом Свете и привел к широкой эпидемии оспы, что повлекло гибель значительной части местного населения. С течением времени в Новом Свете возник и закрепился аттенуированный вариант ВНО – *variola minor alastrim* (Fenner et al., 1988; Hopkins 2002; Esposito et al., 2006). Основываясь на результатах ДПЦР-ПДРФ анализа, и на том, что независимая эволюция ВНО на Американском континенте началась после 16-го века, мы предположили, что *variola minor alastrim* произошел от общего предка с западноафриканскими штаммами ВНО, и впервые сделали оценку скорости эволюции ВНО. Используя бинарные таблицы данных анализа полных геномов 66 штаммов ВНО и гипотезу простых молекулярных часов, мы впервые рассчитали скорость молекулярной эволюции ортопоксвирусов, которая составила  $1 \times 10^{-6}$  замен на сайт в год.

Филогения на основе ДПЦР-ПДРФ анализа в последующем была уточнена с использованием полученных нами и опубликованных последовательностей геномов ВНО. Центральная высоко консервативная область геномов ортопоксвирусов, содержащая 102 ОРТ, была использована для расчета хронограммы штаммов ВНО методом релаксированных молекулярных часов. Наш анализ показал, что строгие молекулярные часы в большинстве случаев не применимы к анализу последовательностей ортопоксвирусов. В эволюционном анализе мы постулировали, что изоляты ВНО *variola minor alastrim* отделились от предка не более чем 400 лет назад в Новом Свете. Этот постулат предполагает, что генотип *variola minor alastrim* мог возникнуть после 16-го века. Расчет эволюционной истории ортопоксвирусов проводили в программе Multidivtime с помощью байесовского метода датирования. В результате мы оценили, что около 3 тысяч лет назад от общего предка отделились три высокоспециализированных вируса – ВНО, татерапоксвирус (ТПВ) и вирус оспы верблюдов (ВОВб). Средняя скорость накопления замен в их геномах была рассчитана величиной  $2.3 \times 10^{-6}$  замен на сайт в год. Дополнительно был изучен расширенный набор штаммов различных ортопоксвирусов с использованием программы Beast и релаксированных логнормальных молекулярных часов. Время

возникновения ВНО в этом случае было оценено как 3.3 тыс. лет назад, а средняя скорость накопления мутаций как  $2.1 \times 10^{-6}$  нуклеотидных замен на сайт в год.

В последнее время удалось выделить древние ДНК ВНО из различных археологических образцов – из образцов мумии ребенка из Латвии, датируемой между 1643 и 1665 г.; из образца, хранившегося в Национальном музее Чехии, датируемого авторами примерно 1860 г., и из захоронений четырех североевропейцев, датируемых примерно 600–1000 гг. н.э., и провести их полногеномное секвенирование (Mühlemann et al., 2020; Duggan et al., 2016; Pajer et al., 2017).

С учетом новых последовательностей ВНО из древних захоронений мы уточнили скорость молекулярной эволюции ортопоксвирусов в программе Beast2 на основе релаксированных логарифмически нормальных молекулярных часов и коалесцентной байесовской популяции. При анализе штаммов ВНО с использованием ВОВб и ТПВ в качестве внешней группы средняя скорость накопления нуклеотидных замен составила  $4,4 \times 10^{-6}$  (95% интервал наивысшей апостериорной плотности от  $3,5 \times 10^{-6}$  до  $5,3 \times 10^{-6}$ ) нуклеотидных замен на сайт в год. Разброс значений скорости в разных ветвях варьировал от  $2,3 \times 10^{-6}$  до  $9,6 \times 10^{-6}$  нуклеотидных замен на сайт в год (рис. 9). Наименьшая скорость эволюции наблюдалась у общего предшественника ВОВб и ТПВ, а наибольшая у ВНО штамма предшественника *variola minor alasrim*. Можно предположить, что ВОК-подобный предок ВОВб и ТПВ сравнительно медленно эволюционировал в дикой природе, в то время как штаммы ВНО *variola minor alasrim* появились в результате эпидемий в Новом Свете.

Группа древних североевропейских штаммов VK388, VK382, VK281 и VK470 начала независимую эволюцию от остальных штаммов ВНО около 350 г. н.э. Время отделения древнего штамма VD21 из Литвы от остальных штаммов ВНО мы оценили, как 1542 г (рис. 9).

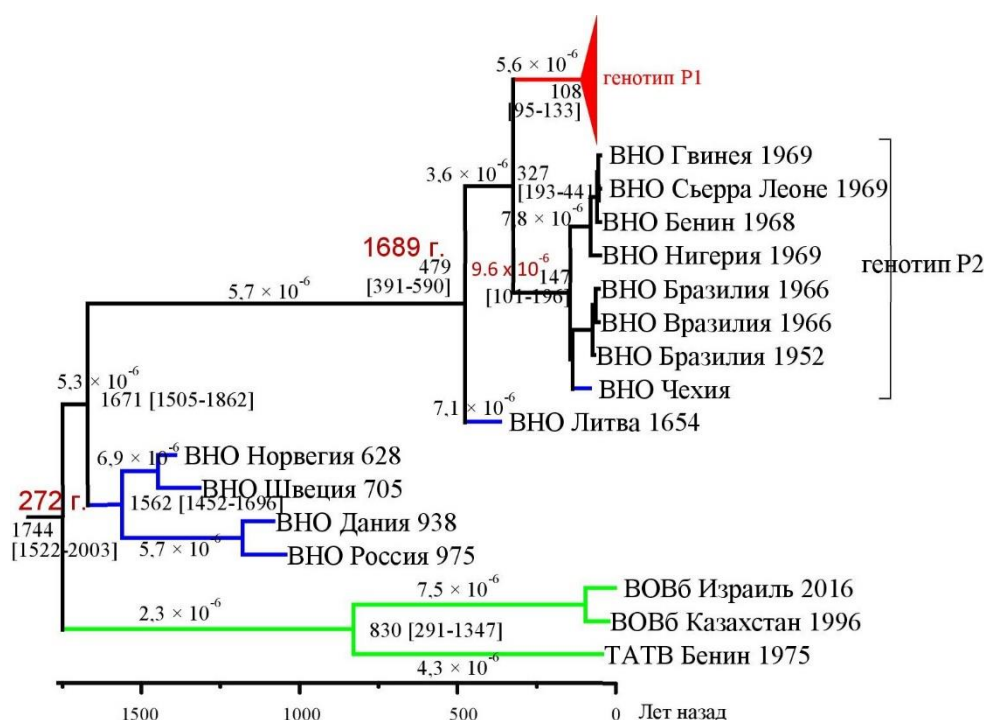


Рис. 9. Дерево максимальной достоверности, построенное на основе высококонсервативной центральной области генома ВНО, ВОВб и ТПВ с помощью программы Beast2. Числа в узлах указывают время до самого последнего общего предка кладов (годы назад) с 95% доверительным интервалом, указанным в квадратных скобках. Скорости накопления мутаций показаны рядом с ветвями (замены/сайт/год). Красным цветом выделен генотип P1 ВНО, синим – геномы ВНО, исследованные палеовирусологами, зеленым цветом выделены ВОВб и ТПВ.

Как ранее упоминалось, все штаммы ВНО 20-го века делятся на две клады P1 и P2 (рис. 9). По нашим данным их разделение произошло около 1690 г. н.э. Время происхождения наиболее недавнего общего предшественника штаммов ВНО генотипов P1 и P2 нами оценено как 1908 и 1878 гг соответственно. ВНО, относящиеся к генотипу P2, вызывают оспу, характеризующуюся значительно более низким уровнем летальности (менее 1%), чем ВНО генотипа P1 (*variola major*) с уровнем летальности 8%-12%. Можно отметить, что в генотип P2 входят штаммы *variola minor alastrim* из Южной Америки, штаммы из Западной Африки и один штамм из Европы.

При анализе группы P1 ВНО обнаруживается тенденция группирования этих штаммов XX-го века по географическому признаку, при этом штаммы ВНО из Индии присутствуют в большинстве таких групп. Это свидетельствует о большом биоразнообразии штаммов ВНО, циркулировавших в Индии в XX веке.

С появлением новейших данных о древних ДНК ВНО появилась возможность пересчитать время возникновения ВНО. Мы впервые оценили время происхождения

ВНО как примерно 272 (13-494) г. н.э. с включением в анализ геномных последовательностей древних штаммов ВНО.

По-видимому, в ранней истории ВНО существовало много различных геновариантов вируса. В процессе эволюционного отбора из пула древних ВНО был селективно отобран вариант вируса, приведший в последующем к появлению всех современных штаммов. Вакцинация, предложенная в 1796 г Эдвардом Дженнером и первоначально проводившаяся эпизодически и локально у ограниченного круга людей, постепенно начала вносить вклад в эволюцию ВНО. Байесовский график истории популяции ВНО (рис. 10), показывает изменение уровня генетической изменчивости популяции, который отражает эффективную численность популяции вирусов. Можно отметить постепенное уменьшение эффективной численности популяции вышеописанных вирусов примерно с 1800 г. С начала проведения кампании по уничтожению натуральной оспы с помощью широкомасштабной вакцинации населения, которая проводилась с 1966 по 1977 гг., наблюдается резкое падение эффективной численности популяции вирусов. Время происхождения штаммов генотипа P1 относится примерно к 1910 году (рис. 9), можно предположить, что это следствие селективного отбора, который в условиях расширяющейся вакцинации населения, привел к отбору превалирующего генетического варианта ВНО.

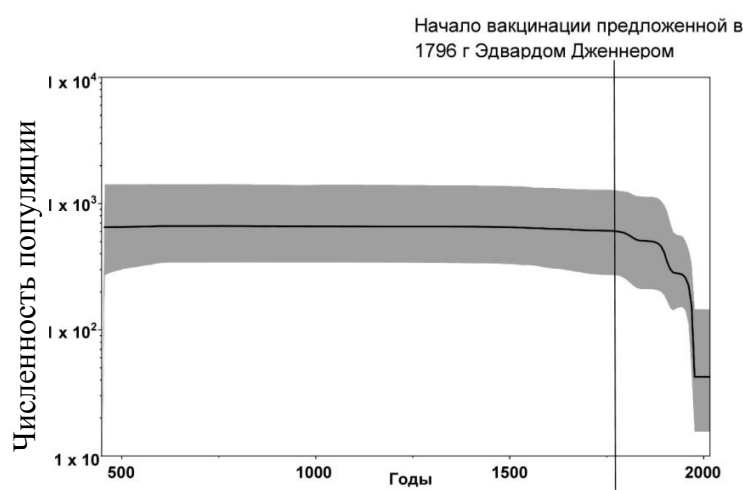


Рис. 10. Байесовский график истории популяции ВНО. На оси  $x$  — годы, ось  $y$  представляет эффективную численность популяции вирусов. Черная линия представляет среднее значение размера популяции, 95% доверительный интервал показан серой областью.

Наша реконструкция эволюционной истории ортопоксвирусов с привлечением современных данных о древних вирусных ДНК ВНО свидетельствует о сравнительно недавнем появлении ВНО. Открытие ВНО в древних захоронениях показало, что оспа существовала в начале VII века н.э. на севере Европы (штамм ВНО VK388 из Норвегии) (Mühlemann et al., 2020). По-видимому, в первые века нашей эры ВОК-подобный вирус с широким кругом хозяев стал предшественником трех узкоспециализированных вирусов – ВНО, ВОВб и ТПВ. Хозяевами двух последних вирусов являются верблюды и песчанки *Gerbilliscus kempi* соответственно. Данные песчанки обитают в саваннах и сухих лесах Африки. Пересечение ареалов обитания верблюдов и песчанок свидетельствует о вероятном происхождении этих вирусов на Ближнем Востоке в начале нашей эры (рис. 11). За относительно короткий период времени ВНО широко распространился по Европе, Африке и Азии. К 4 веку он проник из Индии в Китай, к 7 веку распространился на севере Европы. Время возникновения генотипа Р2 мы относим к 17 веку. Эти предположения подкрепляются филогеографическим анализом центрального консервативного района генома ВНО генотипов Р1 и Р2 с использованием дискретной модели в программе Beast (рис. 12). На основе полученных данных можно заключить, что генотип ВНО Р2, включающий штаммы *alastrim* и западноафриканские штаммы, возник в Новом Свете в 17 веке. Сильнейшие эпидемии оспы, особенно в Южной и Центральной Америке, где значительная часть населения после контакта с европейцами умерла по причине эпидемий, способствовали ускоренной эволюции ВНО и возникновению штаммов *minor alastrim* с низким уровнем летальности. В 19 веке генотип Р2 был завезен в Западную Африку, где независимо эволюционировал около 100 лет (рис. 9), возможно вытеснив эндемичные варианты ВНО.



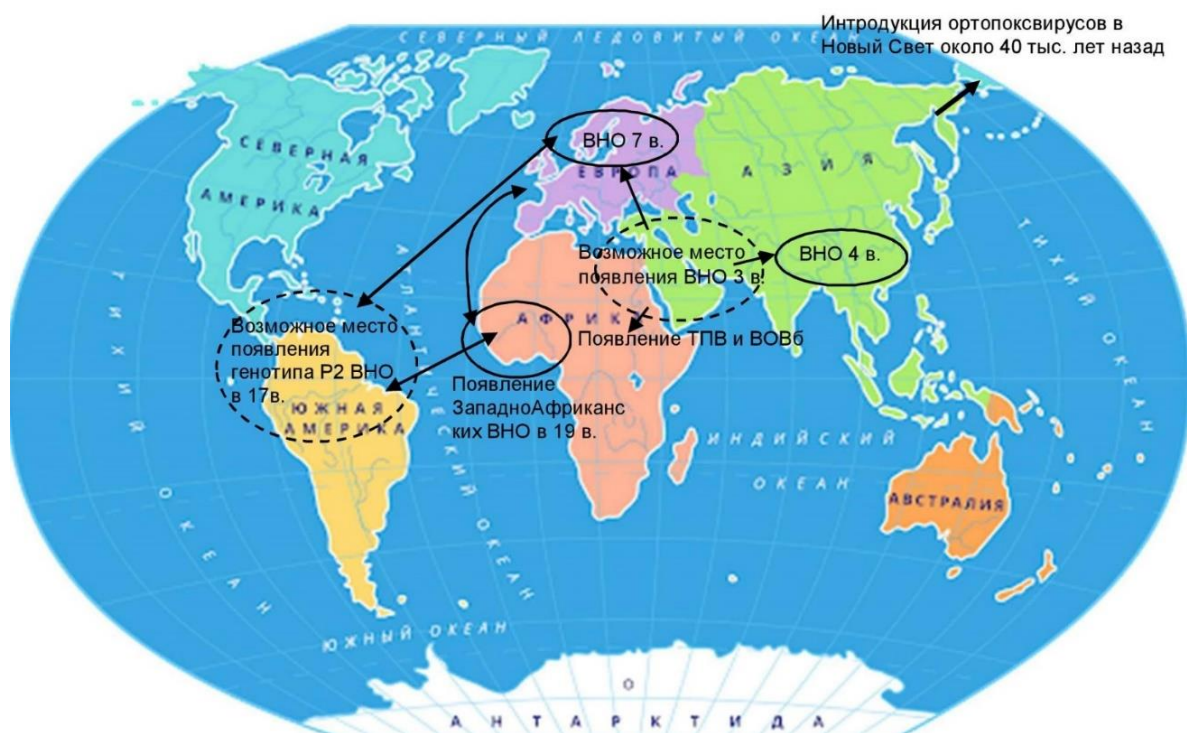


Рис. 11. Карта распространения ортопоксвирусов. Предполагаемые области возникновения ВНО и генотипа P2 ВНО выделены пунктирными овалами. Стрелками показаны пути миграции ВНО.

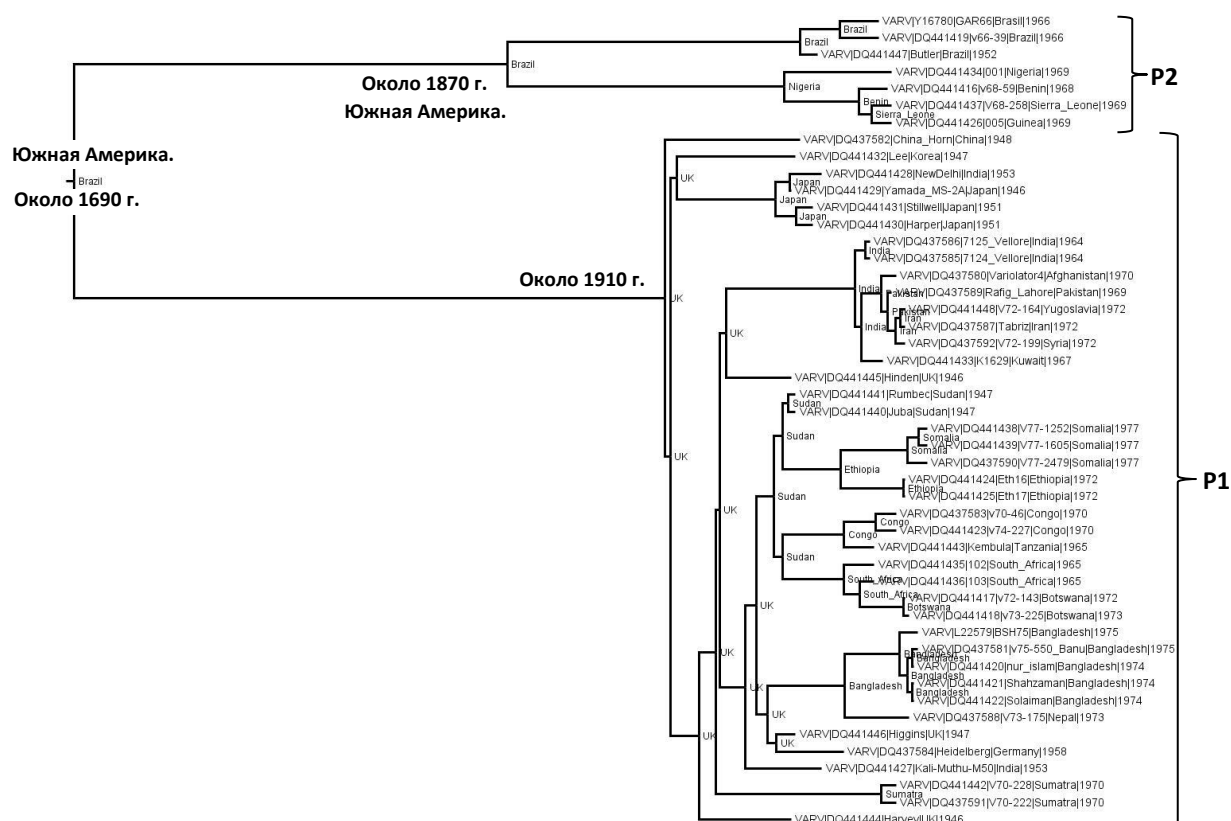


Рис. 12. Филогеографический анализ последовательностей ВНО. Дерево максимальной достоверности, построенное на основе высококонсервативной центральной области генома ВНО с помощью программы Beast2. В узлах дерева приведены районы происхождения последнего общего предка кладов.

Реконструкция эволюционной истории различных видов ортопоксвирусов (рис. 13) позволяет заключить, что ортопоксвирусы Старого и Нового Света разделились около 42 тыс. лет назад. На основе данных об уровне мирового океана в различные исторические эпохи было установлено существование перешейка между Северной Америкой и Азией в районе Берингии между 30 и 60 тыс. лет назад (Hu et al., 2010), что создавало возможность миграции животных и распространения ортопоксвирусов между континентами.

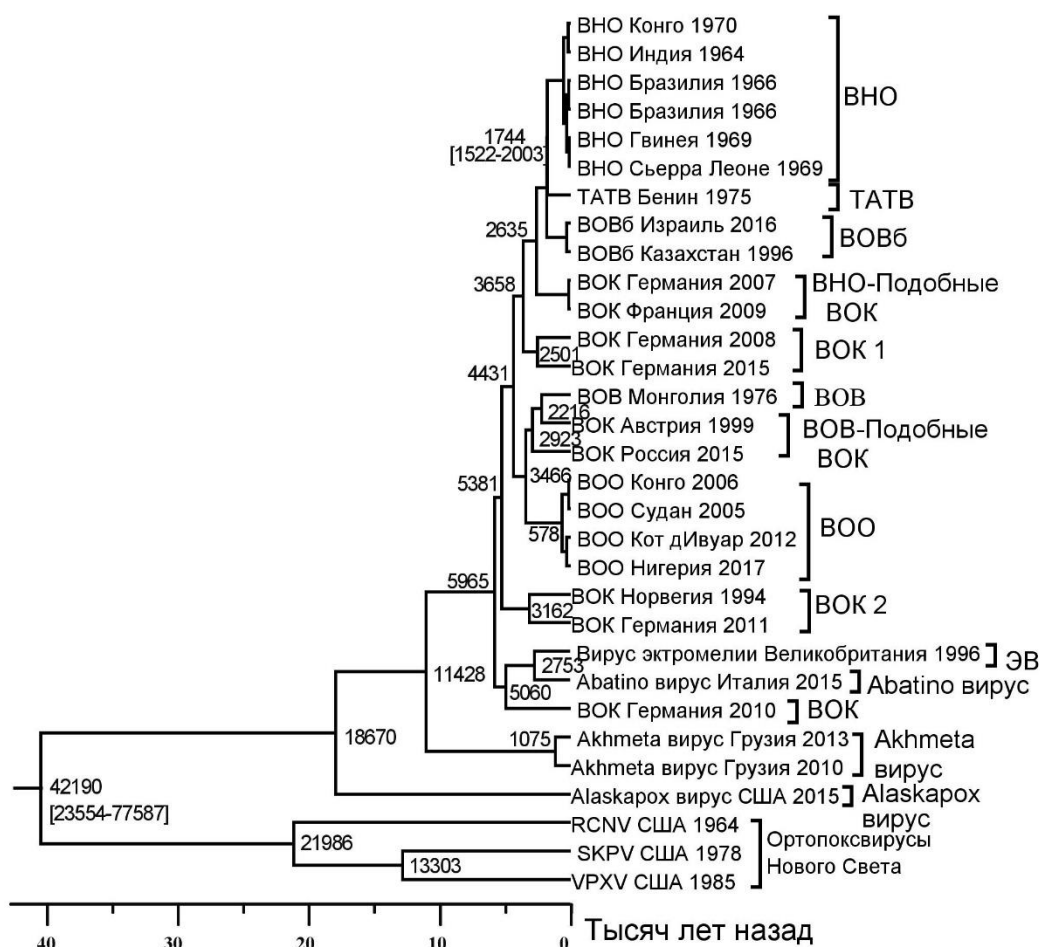


Рис. 13. Дерево максимальной достоверности, построенное на основе высококонсервативной центральной области генома ортопоксвирусов. Хронограмма была построена с помощью программы Beast2. Числа в узлах указывают время до последнего общего предка клад (годы назад) с 95% доверительным интервалом, указанным в квадратных скобках.

Наш ретроспективный анализ показал, что Alaskarox вирус отделился от ортопоксвирусного предка около 19 тыс. лет назад, а Akhmeta вирус – около 11 тыс. лет назад (рис. 13). К сожалению, природный хозяин Alaskarox вирус не известен (Springer et al., 2017). Akhmeta вирус был выявлен как у человека, так и у грызунов

(Vora et al., 2015; Gao et al., 2018; Doty et al., 2019). Серологическое исследование на ферме в Грузии, где работали зараженные пастухи, выявило наличие антиортопоксвирусных IgG у людей, коров и диких грызунов (Vora et al., 2015). Это свидетельствует о существовании природного резервуара этого вируса на территории Грузии. В том случае, если гипотеза о происхождении Alaskapox вируса, как и Akhmeta вируса, из кавказского региона верна, можно предположить, что Кавказ является родиной всех ортопоксвирусов Старого света.

Затем около 6 тыс. лет назад произошло разделение общего предка на остальные современные виды ортопоксвирусов Старого Света (рис. 13). Первой отделилась группа, объединяющая вирус экстремелии (вирус оспы мышей), ВОК штамм GerMKY и Abatino вирус. У этих вирусов различный круг восприимчивых хозяев, так ВОК имеет широкий круг хозяев, вирус экстремелии патогенен для грызунов, а Abatino вирус поражает нечеловекообразных приматов (Gruber et al., 2018). В этой группе вирусов около 5 тыс. лет назад первым выделился ВОК, затем около 2.8 тыс. лет назад разделились вирус экстремелии и Abatino вирус.

Около 5.4 тыс. лет назад выделилась клада ВОК «CPXV-like 2» (рис. 13). Далее примерно 4.4 тыс. лет назад выделилась клада, состоящая из BOO, BOB и «VACV-like» группа ВОК. Первым в этом кладе около 3.5 тыс. лет назад начал независимую эволюцию BOO. Можно отметить, что западноафриканский подтип BOO, вызывающий заболевание с низким уровнем летальности, появился сравнительно недавно – около 580 лет назад (в 15 веке). Вирус BOB отделился от ближайшего общего предка с ВОК около 2.2 тыс. лет назад. В анализе использовался один штамм BOB MNR 76, изолированный из дикой природы и считающийся родственным прародителю BOB. При этом все остальные штаммы BOB прошли длительную пассажную историю.

Около 3.7 тыс. лет назад выделилась клада ВОК «CPXV-like 1», а затем 2.6 тыс. лет назад обособилась клада ВОК «VARV-like» (рис. 13). При этом, штаммы ВОК не формируют одной общей группы на филогении. Можно предположить, что ВОК – подобные вирусы были предками современных ортопоксвирусов Старого Света, за исключением вирусов Alaskapox и Akhmeta. Это ставит вопрос о ревизии таксономии ВОК.

Филогеографический анализ 99 уникальных последовательностей центрального консервативного района генома ВОО подтвердил, что западноафриканский генотип отделился от предка в Конго в 15 веке (рис. 14). В 19 веке в Нигерии западноафриканский генотип ВОО разделился на два подтипа, демонстрирующих значительные генетические отличия: в один входят штаммы из Нигерии (Африка) и штаммы из других континентов, а в другой штаммы из остальных стран Западной Африки. Из анализа филогении можно заключить, что за период 2018-2022 гг. было несколько событий вывоза ВОО из Нигерии на другие континенты, что подтверждается эпидемиологическими данными. Средняя скорость накопления замен в геноме ВОО составила  $3,3 \times 10^{-6}$  замен на сайт в год, однако после 2018 года скорость эволюции нигерийского подтипа, вызвавшего массовые заболевания в Европе и Америке, увеличилась в 5-6 раз до  $1,8 \times 10^{-5}$  замен на сайт в год. Продолжается эволюция центральноафриканского генотипа ВОО, современные штаммы разделяются на несколько групп, и их дальнейшее развитие может привести к появлению новых гентипов ВОО.

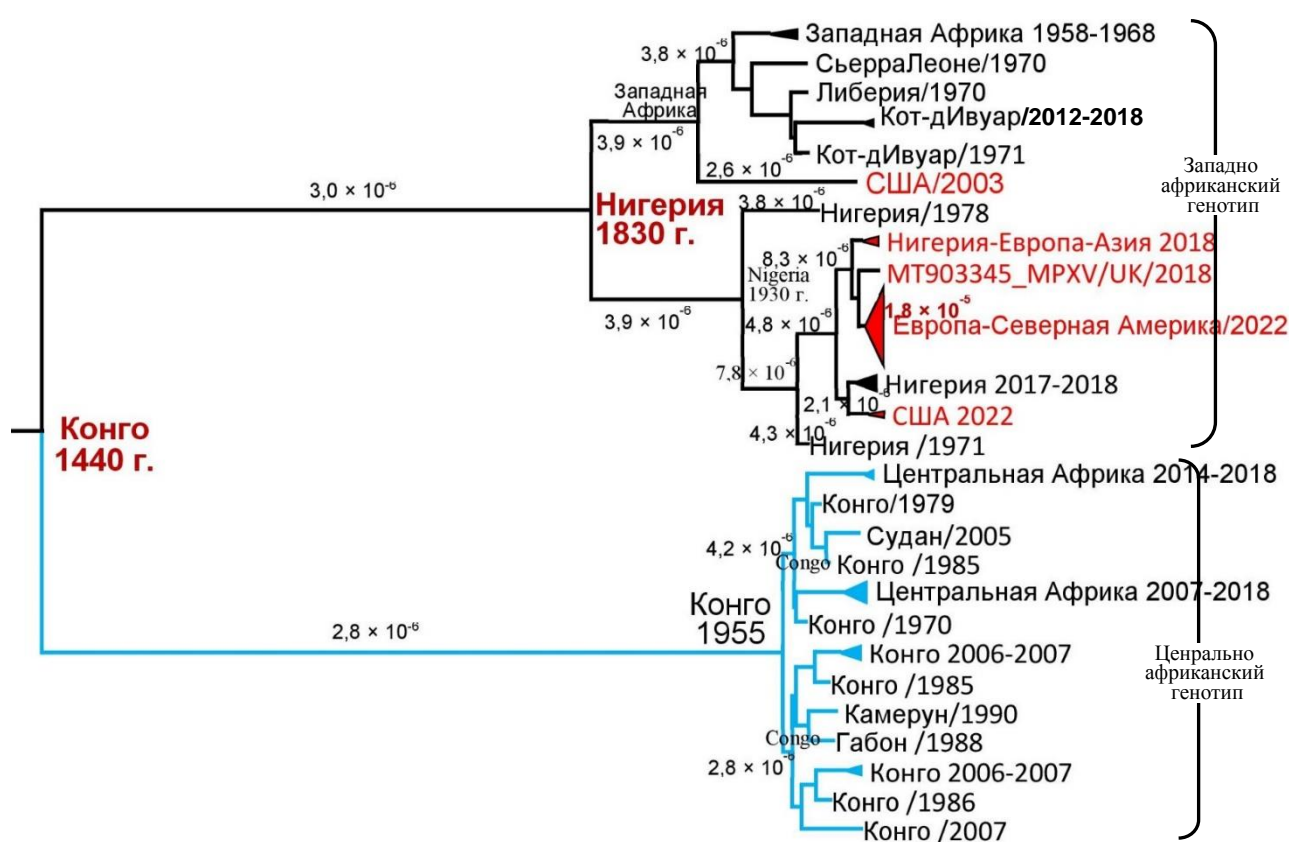


Рис. 14. Филогеографический анализ ВОО. Дерево максимальной достоверности, построенное на основе высококонсервативной центральной области генома ВОО с помощью программы Beast. В узлах дерева приведены время и район происхождения

клады. Скорости накопления мутаций показаны рядом с ветвями (замены/сайт/год). Красным цветом выделены события вывоза ВОО из Нигерии на другие континенты. Синим цветом выделены штаммы центральноафриканского подтипа ВОО.

Появление новых генетических данных отодвинуло дату возникновения ВНО от 3-4 тыс. лет назад до примерно 1.7 тыс. лет назад. Это говорит о большей скорости изменчивости и более высоком чем считалось ранее эволюционном потенциале ортопоксвирусов. Циркуляция в природе различных геновариантов ВОК и недавно открытых вирусов *Alaskapox* и *Akhmeta* создает опасность появления новых вариантов ортопоксвирусов с неизвестными свойствами. Дальнейшее изучение древних ископаемых вирусных патогенов и поиск новых циркулирующих в природе ортопоксвирусов позволит углубить наше понимание эволюционной истории этих вирусов.

### **3.3. Заключение.**

В результате проведенных исследований можно сделать вывод, что астровирус человека является типичным РНК-содержащим вирусом, характеризующимся высокой скоростью накопления мутаций и значимым вкладом рекомбинации в его эволюционную историю. В настоящее время обнаружено восемь различных генотипов астровируса человека со сравнительно недавним происхождением. Можно предположить, что в ближайшее время могут сформироваться новые генотипы этого вируса путем рекомбинации между существующими изолятами и их мутационной изменчивостью.

Скорость изменчивости одноцепочечных ДНК геномов бокапарвовирусов человека также оказалась весьма высокой. Значительный вклад в их эволюцию вносит рекомбинация, приводящая к замене гена белка оболочки у часто встречающегося генотипа бокапарвовируса человека на соответствующий ген от редкого генотипа. Это объясняется преимуществами в преодолении иммунитета хозяина вирусами, заимствовавшими ген, кодирующий структурный белок редкого генотипа. Данный процесс продолжается и в настоящее время, приводя к избеганию вирусом иммунного барьера человека. Этому механизму способствует организация геномных последовательностей вблизи горячей точки рекомбинации в геномах бокапарвовирусов человека.

Эволюционный потенциал ортопоксвирусов значительно отличается от предыдущих двух вирусов. Ортопоксвирусы обладают протяженным двухцепочечным ДНК геномом и медленно накапливают мутации в их геноме. Эволюция этих вирусов, за исключением вирусов Alaskapox и Akhmeta, основана на существовании вируса оспы коров. Данный вирус имеет наиболее протяженные и разнообразные геномы из всех ортопоксвирусов. Разнообразие геномов настолько велико, что, возможно, правильнее говорить о наличии различных видов ортопоксвирусов, объединенных в настоящее время общим названием ВОК. ВОК имеет широкий круг хозяев и его выделяют от различных видов млекопитающих. Остальные виды ортопоксвирусов, по-видимому, произошли от ВОК-подобных предшественников путем мутационных изменений и редукции их геномов. Таким образом возникли высокоспециализированные вирусы – ВНО, ВОВб, ТПВ и вирус экстремелии. В большинстве случаев для возникновения новых видов ортопоксвирусов требуются сотни лет, однако эволюция вирусов может ускоряться в случае широкомасштабной эпидемии, что произошло при эволюции ВНО в Новом Свете и привело к появлению штаммов *variola minor alastrim*.

Несмотря на то, что молекулярная изменчивость вирусов подчиняется одним законам, стратегии эволюции вирусов могут значительно различаться, даже внутри одного вида. Различные генотипы одного вируса могут с различной эффективностью использовать процесс рекомбинации, кроме того различная степень ошибочности их репликации вносит вклад в степень изменчивости вирусных геномов.

## ВЫВОДЫ

1. Изучены особенности механизмов молекулярной эволюции астровируса человека и показано, что:

а) механизмы молекулярной эволюции различных генотипов астровируса человека различны: все известные последовательности астровируса человека 2, 3, 4, 5, 7 и 8-го генотипа возникли в результате межштаммовой рекомбинации, в то время как большинство последовательностей 1-го и все последовательности 6-го генотипов не демонстрируют достоверных признаков рекомбинации;

б) впервые определена средняя скорость накопления мутаций в геноме астровируса человека, которая составила  $3 \times 10^{-3}$  замен на сайт в год;

в) современные генотипы астровируса человека разделились около 700 лет назад.

2. Изучены особенности механизмов молекулярной эволюции бокапарвовирусов и показано, что:

а) вторичные структуры концевых некодирующих районов генома бокапарвовирусов человека изолятов 2-го и 4-го генотипов сходны с таковыми у других генотипов, что свидетельствует о консерватизме структур, регулирующих репликацию и транскрипцию бокапарвовирусов человека.

б) отсутствие структур, характерных для механизма репликации по типу «катящейся шпильки», выявленных у других парвовирусов, а также обнаружение замкнутых кольцевых структур для всех генотипов бокапарвовирусов, указывает на то, что механизм репликации бокапарвовируса отличается от механизма репликации других парвовирусов и осуществляется по механизму «катящегося кольца»;

в) в геноме бокапарвовирусов человека существует горячая точка рекомбинации, расположенная между областями с аномально низким и аномально высоким содержанием GC в геноме; обнаружена тенденция к замене гена VP1 в широко распространённых генотипах путем рекомбинации с редким генотипом 4; обнаружен геном уникального изолята, возникшего в результате рекомбинации между генотипами 3 и 4;

г) анализ всех последовательностей бокапарвовирусов приматов показал, что бокапарвовирусы человека имеют зоонозное происхождение;

д) эволюционный анализ геномов бокапарвовирусов человека и человекообразных обезьян показал, что современные генотипы бокапарвовирусов человека разошлись сравнительно недавно, около 60-300 лет назад;

е) средняя скорость накопления мутаций в геноме бокапарвовирусов приматов составляет  $9 \times 10^{-4}$  нуклеотидных замен на сайт в год.

3. Изучена структурная организация геномов и молекулярная эволюция ортопоксвирусов, и впервые показано, что:

а) разработанные методы быстрой видоспецифичной идентификации четырех патогенных для человека видов ортопоксвирусов – BOO, ВНО, BOB и БОК на основе ПЦР и мультиплексной ПЦР позволяют проводить видоспецифичную детекцию данных патогенов;

б) штаммы из Южной Америки и штаммы из Западной Африки формируют отдельный подтип ВНО;

в) средняя скорость накопления замен в геноме вируса натуральной оспы составляет  $4,4 \times 10^{-6}$  нуклеотидных замен на сайт в год; разброс значений скорости в разных ветвях филограммы варьирует от  $2,3 \times 10^{-6}$  до  $9,6 \times 10^{-6}$  замен на сайт в год при использовании палеогеномных данных;

г) Вирус натуральной оспы предположительно произошел около 270 (13-494) г. н.э.; генотип Р2 ВНО, по-видимому, возник в Южной Америке в 17 веке; независимая эволюция в Западной Африке штаммов ВНО генотипа Р2 началась примерно в 19 веке;

д) Вирус оспы обезьян предположительно появился в 15 веке до н.э.; западноафриканский генотип ВОО отделился примерно в 15 веке н.э.

**Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:**

**Статьи в научных журналах:**

1. **Babkin I.V.**, Babkina I.N., Tikunova N.V. An Update of Orthopoxvirus Molecular Evolution // Viruses – 2022. – V. 14(2) – 388. DOI: 10.3390/v14020388.
2. Tyumentsev, A.I., Tikunov, A.Y., Zhirakovskaia E.V., Kurilshikov A.M., **Babkin I.V.**, Klemesheva V.V., Netesov S.V., Tikunova, N.V. Human bocavirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in Russia from 2010 to 2012 // Infect. Genet. Evol. – 2016. –V. 37 – P. 143–149. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.11.015.
3. **Babkin I.V.**, Babkina I.N. The origin of the variola virus // Viruses – 2015. – V. 7(3) – P. 1100-1112. DOI: 10.3390/v7031100.
4. **Babkin I.V.**, Tyumentsev A.I., Tikunov A.Y., Zhirakovskaia E.V., Netesov S.V., Tikunova N.V. A study of the human bocavirus replicative genome structures // Virus Research – 2015. –V. 195 – P. 196–202. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.10.019.
5. **Babkin I.V.**, Tikunov A.Y., Sedelnikova D.A., Zhirakovskaia E.V., Tikunova, N.V. Recombination analysis based on the HAsV-2 and HAsV-4 complete genomes // Infect. Genet. Evol. – 2014. –V. 22 – P. 94–102. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.01.010.



6. Tyumentsev A.I., Tikunova N.V., Tikunov A.Y., **Babkin I.V.** Recombination in the evolution of human bocavirus // *Infect. Genet. Evol.* – 2014. –V. 28 – P. 11–14. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.08.026.
7. **Babkin I.V.**, Tyumentsev A.I., Tikunov A.Y., Kurilshikov A.M., Ryabchikova E.I., Zhirakovskaia E.V., Netesov S.V., Tikunova N.V. Evolutionary time-scale of primate bocaviruses // *Infect. Genet. Evol.* – 2013. –V. 14 – P. 265–274. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.12.023.
8. **Babkin I.V.**, Babkina I.N. A retrospective study of the orthopoxvirus molecular evolution // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. –V. 12 – P. 1597-1604. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.07.011.
9. **Babkin I.V.**, Tikunov A.Y., Zhirakovskaia E.V., Netesov S.V., Tikunova N.V. High evolutionary rate of human astrovirus // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. – V.12 – P. 435-442. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.01.019.
10. **Babkin I.V.**, Babkina I.N. Molecular Dating in the Evolution of Vertebrate Poxviruses // *Intervirology.* – 2011. –V. 54 – P. 253-260. DOI: 10.1159/000320964.
11. **Бабкин И.В.**, Бабкина И.Н. Дифференциация географических биовариантов вируса натуральной оспы методом ПЦР // *Молекуляр. Генет. Микробиол. Вирусол.* – 2010. – № 1, с. 29-32.
12. **Бабкин И.В.**, Бабкина И.Н. Изучение кодирующих последовательностей переменных районов генома вируса натуральной оспы // *Вопр. Вирусол.* – 2010. – № 2, с. 17-22.
13. **Бабкин И.В.**, Щелкунов С.Н. Молекулярная эволюция поксвирусов // *Генетика.* – 2008 – Т. 44 – № 8 – С. 1029–1044.
14. **Бабкин И.В.**, Непомнящих Т.С., Максютов Р.А., Гуторов В.В., Бабкина И.Н., Щелкунов С.Н. Сравнительный анализ переменных районов генома вируса натуральной оспы // *Молекул. Биология.* – 2008 – Т. 42 – № 4 – С. 612–624.
15. Бабкина И.Н., Сафронов П.Ф., **Бабкин И.В.**, Уварова Е.А., Тотменин А.В., Голикова Л.Н., Михеев М.В., Серегина Е.В., Гуськов А.А., Сокунова Е.В., Щелкунов С.Н. Создание клонотек фрагментов ДНК полных геномов разных штаммов вируса натуральной оспы // *Вопр. Вирусол.* – 2005 – Т.50 – №2 – С.18-23.

16. Shchelkunov S.N., Gavrilova E.V., **Babkin I.V.** Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans // *Mol Cell Probes.* – 2005 – V.19 – №1 – P.1-8. doi: 10.1016/j.mcp.2004.07.004.
17. Бабкина И.Н., **Бабкин И.В.**, Ли Ю., Ропп С., Клайн Р., Дэмон И., Эспозито Дж., Сандахчиев Л.С., Щелкунов С.Н. Филогенетическое сравнение геномов различных штаммов вируса натуральной оспы // *Докл. РАН* – 2004 – Т.398 – С.316-319. doi: 10.1023/b:doi.0000046648.51758.9f.
18. Бабкина И.Н., **Бабкин И.В.**, Маренникова С.С., Сандахчиев Л.С., Щелкунов С.Н. Сравнительный рестрикционный анализ геномов штаммов вируса натуральной оспы из Российской коллекции // *Мол. Биол.* – 2004 – Т.38 - №3 – С.429-436.
19. Гаврилова, Е.В., **Бабкин, И.В.**, Щелкунов, С.Н. Мультиплексный ПЦР- анализ для видоспецифичной экспресс идентификации ортопоксвирусов // *Молекул. генетика, микробиол. и вирусол.* – 2003. – №1 – С.45-52.
20. Щелкунов С.Н., Тотменин А.В., Сафронов П.Ф., Гуторов В.В., Рязанкина О.И., Петров Н.А., **Бабкин И.В.**, Уварова Е.А., Михеев М.В., Сислер Дж., Эспозито Дж., Джарлинг П., Мосс Б., Сандахчиев Л.С. Множественные генетические различия между вирусами натуральной оспы и оспы обезьян // *Докл. РАН.* – 2002 – Т.384 – С.126-130. doi: 10.1023/a:1016016013042.
21. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Safronov P.F., Mikheev M.V., Gutorov V.V., Ryazankina O.I., Petrov N.A., **Babkin I.V.**, Uvarova E.A., Sandakhchiev L.S., Sisler J.R., Esposito J.J., Damon I.K., Jahrling P.B., Moss B. Analysis of the monkeypox virus genome // *Virology.* – 2002 – V.297 – №2 – P.172-194. doi: 10.1006/viro.2002.1446.
22. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., **Babkin I.V.**, Safronov P.F., Ryazankina O.I., Petrov N.A., Gutorov V.V., Uvarova E.A., Mikheev M.V., Sisler J.R., Esposito J.J., Jahrling P.B., Moss B., Sandakhchiev L.S. Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison // *FEBS Lett.* – 2001 – V.509 – №1 – P.66-70. doi: 10.1016/s0014-5793(01)03144-1.
23. Щелкунов С.Н., Тотменин А.В., **Бабкин И.В.**, Сафронов П.Ф., Гуторов В.В., Поздняков С.Г., Блинов В.М., Ресенчук С.М., Сандахчиев Л.С. Изучение структурно-функциональной организации генома вируса натуральной оспы. V.

Секвенирование и анализ последовательности нуклеотидов левого конца генома штамма Индия-1967 // Мол. Биол. – 1996 – Т.30 – С.595-612.

24. Приходько Г.Г., **Бабкин И.В.** 5'-вариабельная последовательность генома вируса осповакцины штамма ЛИВП. Возможная роль коротких прямых повторов в формировании делеций // Генетика. – 1991 – Т.27 – N1, С.13-26.
25. Приходько Г.Г., Нетесова Н.А., Муравлев А.И., **Бабкин И.В.** Клонирование, секвенирование и трансляционный анализ HindIII-N-фрагмента генома вируса осповакцины штамма ЛИВП // Генетика – 1991 – Т.27 – N6, С.955-963.

#### **Патенты:**

1. Патент РФ № 2230791 «Набор олигонуклеотидов-праймеров для видоспецифичной экспресс-идентификации ортопоксвирусов». Гаврилова Елена Васильевна, Бабкин Игорь Викторович, Щелкунов Сергей Николаевич.