

На правах рукописи

ПОНОМАРЕВА ЕВГЕНИЯ ПАВЛОВНА

**ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В РЕГИОНАЛЬНЫХ ПРИРОДНЫХ
ОЧАГАХ И ЕГО ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИ АДАПТАЦИИ
К НОВОМУ ХОЗЯИНУ**

1.5.10 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Научный
руководитель**

Терновой Владимир Александрович,
кандидат биологических наук, ведущий научный
сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

**Официальные
оппоненты:**

Блинов Александр Геннадьевич, кандидат
биологических наук, ведущий научный сотрудник
сектора «Молекулярно – генетических механизмов
регенерации» Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Федеральный
исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»;
Евстропов Александр Николаевич, доктор
медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой
микробиологии, вирусологии и иммунологии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Новосибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт химической биологии и
фундаментальной медицины Сибирского отделения
Российской академии наук

Защита состоится « 30 » сентября 2022 г. в 09-00 ч. на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.С. Непомнящих

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Ареал вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в основном совпадает с ареалом обитания иксодовых клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus* на значительной части северной Евразии. В последние годы заболевания клещевым энцефалитом (КЭ) регистрируются даже в не эндемичных по КЭ районах. Так, в странах Балтии и Словении наблюдаются случаи заболевания КЭ почти с такой же частотой, как и в европейской части Российской Федерации. Случаи заболевания КЭ постоянно регистрируются в новых областях в Западной Европе, тем самым демонстрируя формирование природных очагов в районах, которые ранее считались не эндемичными (Caracciolo et al., 2015). Птицы, мелкие млекопитающие и клещи обеспечивают формирование природных очагов КЭ и служат принципиальными хозяевами для ВКЭ. Биологические различия клеток клещей, птиц и млекопитающих очень существенны, как и возможные температурные факторы для обеспечения эффективности репликации ВКЭ в этих типах клеток. Это предполагает, что ВКЭ должен обеспечивать репликацию генома и получение вирусного потомства в клетках различных видов хозяев, в изменяющихся условиях среды.

В попытке объяснить репликацию ВКЭ в различных хозяевах (клещи, птицы, пресмыкающиеся и млекопитающие), была выдвинута гипотеза о том, что ВКЭ имеет механизм, позволяющий ему адаптироваться к клеткам различных хозяев. Известно, что ВКЭ может сосуществовать в естественной вирусной популяции в виде вариантов и что быстрая конверсия нейровирулентности во время адаптации вируса от клеща к млекопитающим опосредуется отбором неких вирусных вариантов из гетерогенной популяции (Русек и др., 2008).

Большинство хорошо изученных штаммов ВКЭ были получены в лабораториях с помощью многократных серийных пассажей на перевиваемых клетках или животных, чувствительных к ВКЭ. Но при этом всегда остается вопрос о том, какие геномные вариации в рамках этих адаптированных лабораторных вариантов ВКЭ произошли (Kaluzova et al., 1994; Романова и др., 2007; Helmová et al., 2020).

Хотя во многих ранних исследованиях представлена обширная информация о специфичности вектора ВКЭ, диапазоне хозяев и клинических проявлениях, причина генетического разнообразия остается, до некоторой степени, невыясненной (Bakhvalova et al., 2016; Kunze, 2016).

Эпидемические и патогенетические особенности возбудителя могут быть отражением результата его адаптации при распространении в новые экологические ниши. Обнаруживая генетические изменения ВКЭ при адаптации к новому хозяину, мы делаем важный шаг в картировании и понимании роли тех генетических детерминант, которые участвуют в эпидемических и патогенетических различиях.

Важно отметить, что уточнение ареалов распространения генотипов ВКЭ, изучение вариабельности вирусного генома и биологических свойств ВКЭ принципиально важно, как для улучшения диагностики трансмиссивных инфекций, так и для совершенствования профилактики и лечения КЭ.

Целью данной работы являлось сравнение генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита в отдаленных друг от друга природных очагах, а также выделение и характеристика генома штамма С11-13 вируса клещевого энцефалита, оценка его скорости и диапазона изменчивости при смене хозяина.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать структурное разнообразие нетранслируемой области геномной РНК у природных вариантов вируса клещевого энцефалита из очагов КЭ Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе.

2. Провести генетическую характеристику изолята С11-13 вируса клещевого энцефалита, вызвавшего особо тяжелую быстротекущую форму заболевания энцефалитом у человека, оценить скорость и диапазон изменчивости геномной РНК вируса клещевого энцефалита штамма С11-13 в результате пассажей на различных культурах клеток и картировать аминокислотные замены, которые, возможно, определяют эффективность его адаптации к новому хозяину.

3. Определить ключевые генетические детерминанты вариантов вируса клещевого энцефалита штамма С11-13 при адаптации к новому хозяину (культура клеток → мелкие млекопитающие).

4. Изучить генетическую изменчивость 3'-НТО геномной РНК вируса клещевого энцефалита при смене хозяина в модельном эксперименте на культурах клеток и животных.

Научная новизна:

1. Впервые в регионе Юго-Восточной Европы, на территории Республики Молдова, у клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.*, собранных с домашних животных и в сельскохозяйственных угодьях, обнаружен вирус клещевого энцефалита дальневосточного генотипа.

2. Получены новые данные по структурному разнообразию НТО природных вариантов ВКЭ в иксодовых клещах в некоторых природных очагах Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе.

3. Картированы наиболее значимые аминокислотные замены в вирусных белках ВКЭ С11-13 при смене хозяина.

4. Проведена оценка скорости изменчивости структурных и не структурных белков изолята С11-13 ВКЭ, при пассировании на различных культурах клеток.

5. Получены новые данные по изменчивости генетических детерминант вариантов ВКЭ в модельном эксперименте по адаптации вируса (после пассажей на различных культурах клеток) к новому хозяину – мелким млекопитающим.

Теоретическая и практическая значимость работы:

Получены новые данные о распространенности ВКЭ в природных очагах Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе. Эти данные представляют практическую ценность для развития и совершенствования дифференциальной диагностики, с учетом территориальных различий, переносимых клещами инфекций у лиц, пострадавших от укусов клещей.

В динамике получена фенотипическая и генетическая характеристика штамма С11-13 ВКЭ. Было показано, что при проведении более 2 – 3 пассажей на различных культурах клеток и на мышах, лабораторные штаммы ВКЭ приобрели генетические изменения. Полученные лабораторные штаммы существенно отличались от исходных природных изолятов ВКЭ, поскольку приобрели селективное преимущество при размножении на культурах клеток и на мышах. Данное обстоятельство необходимо учитывать при трактовке экспериментальных данных полученных на лабораторных штаммах ВКЭ и получении вакцинных штаммов.

Получены данные о том, что гетерогенность популяции ВКЭ, а также изменения соотношения различных вариантов в ней, не могут обеспечить достаточные селективные преимущества при репродукции ВКЭ в новом хозяине. В формировании вариантов ВКЭ имеющих селективное преимущество над природными изолятами, при смене хозяина, участвуют процессы отражающие, в себе сложные взаимоотношения клетки и вируса.

Положения, выносимые на защиту:

1. В восьми районах Республики Молдова у клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.*, собранных с домашних животных и в сельскохозяйственных угодьях, выявлен вирус клещевого энцефалита дальневосточного генотипа.

2. У природных изолятов ВКЭ обнаружены нуклеотидные замены, которые могут вызывать изменение вторичной структуры РНК 5'-НТО ВКЭ и иметь принципиальное значение для адаптации вируса в природных очагах к новым видам переносчиков и хозяев. Вариабельность 5'-НТО отражает особенности строения генома ВКЭ, обеспечивая эффективную репликацию вируса в клетках птиц, млекопитающих и клещей.

3. У вируса клещевого энцефалита (С11-13), выделенного из клеток мозга человека после смертельной инфекции, при смене хозяина в модельном эксперименте (человек → культура клеток → мелкие млекопитающие) произошли замены в геноме, которые привели к мутациям в структурных и не структурных белках ВКЭ.

4. У вируса клещевого энцефалита выделенного от человека, при пассировании на различных культурах клеток (клетки почки эмбриона свиньи (SPEV), нормальные клетки эмбриональных почек человека (НЕК 293) и нейронов мыши (Neuro-2a)) и мелких млекопитающих, обнаружено изменение длины нуклеотидной последовательности в вариабельной части 3'-НТО.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается комплексным подходом к их достижению с привлечением современных вирусологических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов, а также научно обоснованными выводами и наличием научных публикаций в высокорейтинговых журналах.

Публикации по теме диссертации. По результатам работы опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в российских и зарубежных журналах из перечня ВАК, а также 6 тезисов в материалах отечественных и зарубежных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 155 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, четырех глав собственных результатов и обсуждения полученных результатов с выводами и списком литературы. Список использованной литературы включает 54 отечественных и 211 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 17 рисунками, содержит 11 таблиц и 1 приложение.

Вклад автора. Автором были выполнены все запланированные виды вирусологических и молекулярно-биологических исследований, включая работу с животными и культурами клеток. Автором лично проводились работы по выделению вирусной РНК, постановке обратной транскрипции и ПЦР, определению нуклеотидных последовательностей вирусных геномов, обобщению полученных результатов и их анализу с использованием прикладных компьютерных программ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Вирусы клещевого энцефалита, используемые в работе:

Штаммы: Absettarov, Kolarovo-2008, Tomsk-PT 122, Zausaev, Vasilchenko, Lesopark-11, Buzuuchuk, Glubinnoe/2004, 4072, 205, Sofjin, Tomsk PT-12, Tomsk PT-14, Tomsk-M202, Tomsk-M83, Tomsk K6, Novosibirsk-L2008 и 886-84 получены из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Природные изоляты. В работе использовали имаго клещей *I. persulcatus* (591 особь), собранных в 2014 – 2015 гг. в Новосибирской области, в районе с. Бурмистрово, в городских биотопах Томска и Екатеринбурга, Владивостока, в южных и центральных районах Республики Коми, в Алтайском крае. Вирусная РНК обнаружена в 39 образцах клещей (6,6 %). Также были использованы 189 имаго клещей *I. ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.*, собранных в восьми районах Республики Молдова в период с 2010 по 2011 год. Вирусная РНК выявлена в 9 образцах (4,76 %). Для определения вида клеща был секвенирован фрагмент 16S рРНК, кодируемой митохондриальным геномом.

Штамм С11-13 – выделен в 2013 году из мозговой суспензии человека, умершего от клещевой инфекции в Новосибирской области. Штамм прошел серию последовательных пассажей на клетках SPEV, Neuro-2a и НЕК 293 (**рисунок 1**). В результате исследования был получен набор реплицирующихся с разной эффективностью вариантов ВКЭ (GenBank – C11-13_KP644245, C11-13_РЕК_MF043953, C11-13-293_MF043954, C11-13-NEU_MF043955). После 1, 3, 5, 6 и 8 пассажей на культурах клеток определяли титр вируса и нуклеотидную последовательность вирусной геномной РНК. При адаптации (три пассажа) к мелким млекопитающим (мышам) получены варианты ВКЭ – С11-13_3-3 и С11-13_8-3 (**рисунок 1**).

Культуры клеток – SPEV, Neuro-2a и НЕК 293 были получены из банка клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" и поддерживались на среде DMEM, содержащей 10% сыворотки плода коровы и 80 мкг/мл сульфата гентамицина.

Животные. В эксперименте использовались 2 – 3 дневные сосунки беспородных мышей обоего пола массой 2-3 г, полученные из питомника ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор".

Выделение и титрование ВКЭ. Образец, содержащий вирус добавляли к монослою культуры клеток. После одного часа адсорбции при комнатной температуре монослой заливали средой с 2% сывороткой крупного рогатого скота и инкубировали при 37°C. Результаты фиксировали через 7 суток. Репликацию вируса оценивали по цитопатическому действию (ЦПД), характерному для ВКЭ, и методом ИФА.

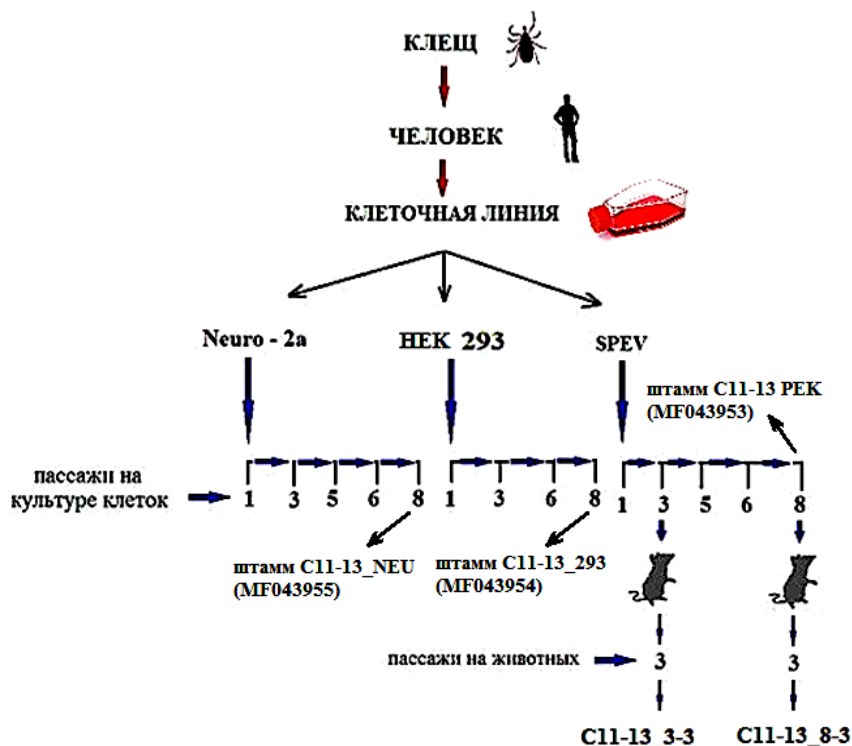


Рисунок 1. Схема последовательных пассажей (1 – 8 пассажей) ВКЭ C11-13 на культурах клеток SPEV, Neuro-2a и HEK 293, а также три пассажа на животных.

Иммуноферментный анализ. Выявление антигена ВКЭ в культуральной среде проводили с использованием мышиных моноклональных антител против ВКЭ (10H10) в качестве субстрата в соответствии с рекомендациями (Kuno et al., 1985). Связанный антиген определяли с помощью мышиных моноклональных антител (ЕВ1), меченных биотином и стрептавидинпероксидазным конъюгатом (ICN, США).

Выделение суммарной РНК и синтез кДНК (обратная транскрипция). Тотальную РНК из гомогената клещей и клеточных лизатов экстрагировали с помощью «Реагент Extract RNA» (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. Построение первой цепи ДНК проводили с использованием набора «MMLV RT kit» (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Полимеразная цепная реакция. Амплификацию проводили с использованием наборов «BioMasTer LRHS-PCR» («BioLabMix», Россия) в прилагаемом буфере, с олигонуклеотидными праймерами для выявления РНК вируса клещевого энцефалита (Chausov et al, 2010). Температурные условия амплификации для разных пар праймеров подбирали экспериментально (типичные условия: 94°C – 10 с, 58°C – 20 с, 72°C – 30 с (40 циклов), 72°C – 7 мин.

Электрофорез и выделение продукта ПЦР из агарозы. Продукты амплификации разделяли на 2% агарозном геле в однократном буфере ТАЕ (40 мм Трис, 1 мм Na₂EDTA, уксусная кислота). Для выделения продуктов амплификации из агарозного геля использовали набор «diaGene» (Диа-М, Россия).

Определение нуклеотидной последовательности (по методу Сэнгера) Определение нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации определяли с помощью автоматического генетического анализатора ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) и набора реагентов BigDye Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Определение нуклеотидной последовательности (по методу NGS). Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием модуля NEBNext® Ultra Directional для синтеза первой цепи ДНК. Синтез второй цепи ДНК проводили с использованием UMI Second Strand Synthesis Module for QuantSeq FWD (Illumina) Lexogen. Подготовленные ДНК библиотеки анализировали на MiSeq с использованием технологии Illumina. Cutadapt (версия 1.18) и SAMtools (версия 0.1.18) использовали для удаления адаптеров Illumina и повторного чтения. Контиги были собраны *de novo* с использованием ассемблера MIRA (версия 4.9.6).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение генетической вариабельности 5'-нетранслируемой области генома вируса клещевого энцефалита в различных регионах Северной Евразии

Большинство исследованных нами образцов ВКЭ, собранных в различных регионах Северной Евразии, принадлежали к дальневосточному генотипу (прототипный штамм – 205) и только образцы из Республики Коми и Томска группировались с известными геновариантами сибирского генотипа ВКЭ (прототипный штамм – Заусаев) (**рисунок 2**).

Анализ фрагмента генома, выявил выраженную изменчивость нуклеотидной последовательности 5'-НТО ВКЭ у лабораторных штаммов и природных изолятов ВКЭ. При оценке различий в НТО у различных генотипов ВКЭ, наблюдаемые генетические отличия были крайне неравномерно распределены по основным элементам 5'-НТО ВКЭ. При анализе нуклеотидной последовательности 5'-НТО дальневосточных и сибирских изолятов было обнаружено, что В2, С1, С2 элементы Y-образной структуры 5'-НТО (**таблица 1**) содержали множественные нуклеотидные замены. В элементах В2, С1, С2 5'-НТО ВКЭ у природных вариантов было выявлено от 4 до 10 замен и от 3 до 12 замен для лабораторно культивируемых штаммов ВКЭ. Вне основных элементов 5'-НТО было обнаружено 8 замен у природных вариантов ВКЭ и 19 замен у лабораторно культивируемых штаммов. Полученные данные позволили отнести В2, С1, С2 элементы Y-образной структуры 5'-НТО и районы вне основных элементов к вариабельным элементам 5'-НТО (**таблица 1**).

В то же время, элементы А2, СS А, СS В и район стартового кодона не содержали или содержали единичные нуклеотидные замены. Элементы СS А и старт кодон АТG были наиболее консервативны и, нам не удалось выявить в их структуре нуклеотидных замен во всех секвенированных вариантах. Консерватизм элемента СS А, по всей вероятности,

связан с его ролью в эффективной инициации РНК-полимеразы и синтезом вирусной РНК у различных флавивирусов (Liu et al., 2016). Конформация этого района определяет как циклизацию генома, так и репликацию вирусной РНК, что предопределяет консерватизм нуклеотидной последовательности данных элементов 5'-НТО генома ВКЭ.

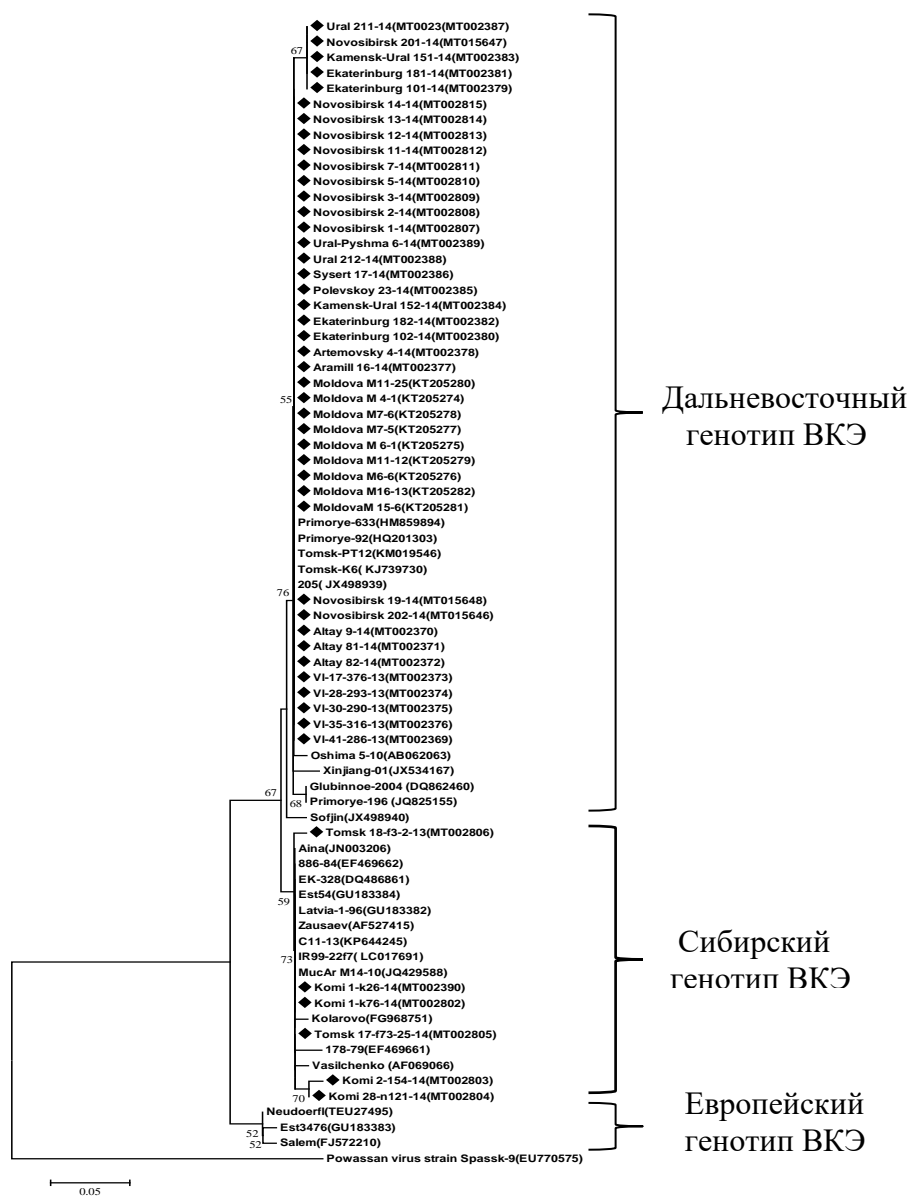


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, построенное для нуклеотидных последовательностей 5'-НТО ВКЭ, выделенных из индивидуальных иксодовых клещей. Дополнено 9 последовательностями 5'-НТО ВКЭ из клещей, собранных ранее в Республике Молдова. ◆ – секвенированные последовательности 5'-НТО ВКЭ. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-х параметрической модели Кимуры.

Обращает внимание, что вариабельный элемент С1 содержал пять строго консервативных замен для всех 39 изолятов ВКЭ, выделенных из клещей. Один паттерн был абсолютно идентичен для всех сибирских вариантов, а другой его вариант характерен для всех дальневосточных вариантов ВКЭ из клещей, собранных в

различных географических районах. Можно предположить, что данные замены обусловлены необходимостью репликации вируса в клетках клеща.

Следует отметить, что у культивируемых в лабораторных условиях штаммов ВКЭ замен в элементе С1 и вне основных доменов было выявлено в два раза больше, чем в исследованных природных изолятах. В условиях лаборатории, при культивировании штаммов ВКЭ, накапливаются адаптивные нуклеотидные замены. Это позволяет высказать предположение, что данные районы могут быть вовлечены в адаптацию ВКЭ при культивировании в лабораторных условиях на клетках млекопитающих.

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

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

Примечание. В таблице 1 указано общее количество нуклеотидных замен в изолятах и лабораторных штаммах по отношению к прототипным ВКЭ (штаммы 205 и Заусаев).

* – Для анализа были использованы следующие природные изоляты: Республика Молдова – 9 изолятов ВКЭ (КТ205274 – КТ205282), Уральский регион – 13 (МТ002377 – МТ002389), Республика Коми – 4 (МТ002390, МТ002802 – МТ002804), Томск – 2 (МТ002805, МТ002806), Новосибирск – 12 (МТ002807 – МТ002815, МТ015646 – МТ015648), Алтай – 3 (МТ002370 – МТ002372), Владивосток – 5 (МТ002369, МТ002373 – МТ002376). ** – Для анализа были использованы следующие лабораторные штаммы ВКЭ: Заусаев, Васильченко, С11-13, Коларово, Латвия-1-96, ЕК-328 (все сибирского генотипа); 205, Глубинное-2004, Софьин, Томск-РТ12, Томск К6, Oshima 5-10 (дальневосточного генотипа); Neudoerf (европейского генотипа).

Также, практически у всех изолятов из Республики Молдова была обнаружена сдвоенная замена в позициях Т(30) и Т(35) на С между элементами В1 и В2 (**рисунок 3**). Эта сдвоенная замена ассоциируется с районом связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы и может быть обусловлена необходимостью оптимизации репликации вируса в клетках хозяина под воздействием необычных природных условий и/или необходимостью адаптации к новым типам хозяев. Ранее, эта сдвоенная замена была выявлена у высокопатогенного для человека ВКЭ, дальневосточного штамма Глубинное (Ternovoi et al., 2007). Данный штамм отличается высокой эффективностью синтеза вирусных белков и высокая скорость формирования инфекционных вирусных частиц. По этим показателям, он в 5 – 10 раз превышает прототипный штамм 205 дальневосточного генотипа ВКЭ.

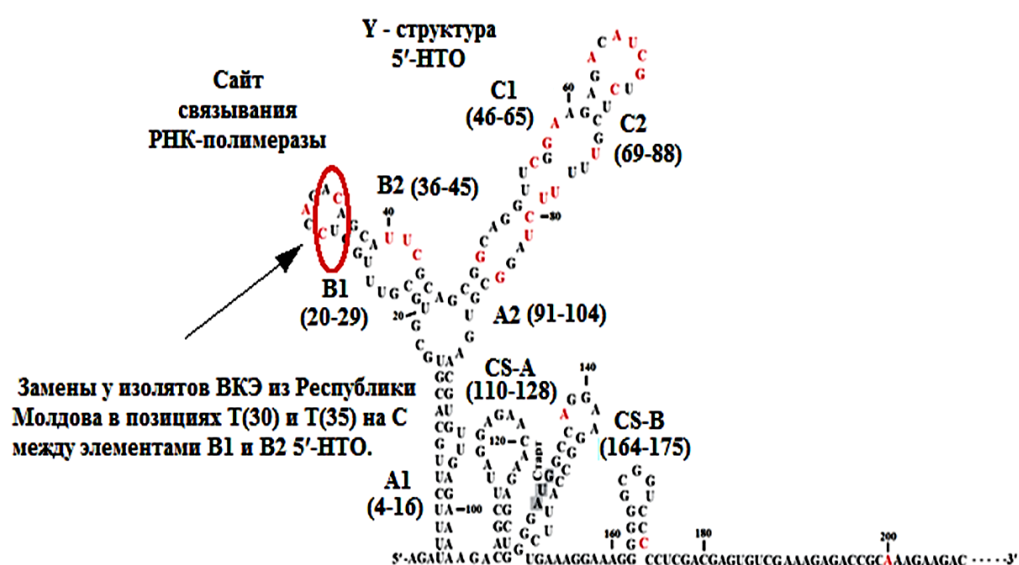


Рисунок 3. Локализация нуклеотидных замен в 5'-НТО у изолятов ВКЭ в сравнении с прототипной последовательностью генома штамма 205 (JX498939).

На **рисунке 4** представлена предполагаемая модель циклизации 5'-НТО у ВКЭ. Совершенно очевидно, что в Y-структуре 5'-НТО нуклеотидные замены у различных штаммов происходят только в петлевых структурах, не затрагивая шпилечные. Это подтверждает предположение, что обнаруженные нуклеотидные замены в петлевых районах Y-структуры могут быть вовлечены в обеспечение эффективной репликации ВКЭ в клетках клеща. Нуклеотидные замены в петлевых структурах Y-структуры являются компенсационными и не влияют критически на компетенцию репликации вируса.

Полученные нами данные подтверждают наличие консервативных и переменных районов 5'-НТО РНК ВКЭ. Наибольшей переменностью отличались элементы В2, С1 и С2 Y-образной структуры 5'-НТО и предполагаемый сайт связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Элементы А2, СS_A, СS_B и стартовый кодон были консервативными. При этом, у природных вариантов ВКЭ, в переменном элементе С1 пять замен были строго консервативными, тогда как у лабораторных вариантов ВКЭ, в этом же элементе, выявлено 12 различных замен. Чуть менее трети нуклеотидных замен

картированы вне основных элементов Y-образной структуры и, как правило, локализовались в петлевых структурах, не затрагивая шпилечные области 5'-НТО ВКЭ. Полученные результаты показывают существенную вариабельность 5'-НТО геномной РНК лабораторных штаммов и полевых изолятов ВКЭ. Возможно, генетическая вариабельность 5'-НТО ВКЭ может быть структурной основой эффективной репликации ВКЭ в различных клетках птиц, млекопитающих и клещей. Биологический смысл данной генетической изменчивости может быть связан с необходимостью обеспечения репликации вируса в различных типах клеток и различных хозяевах.

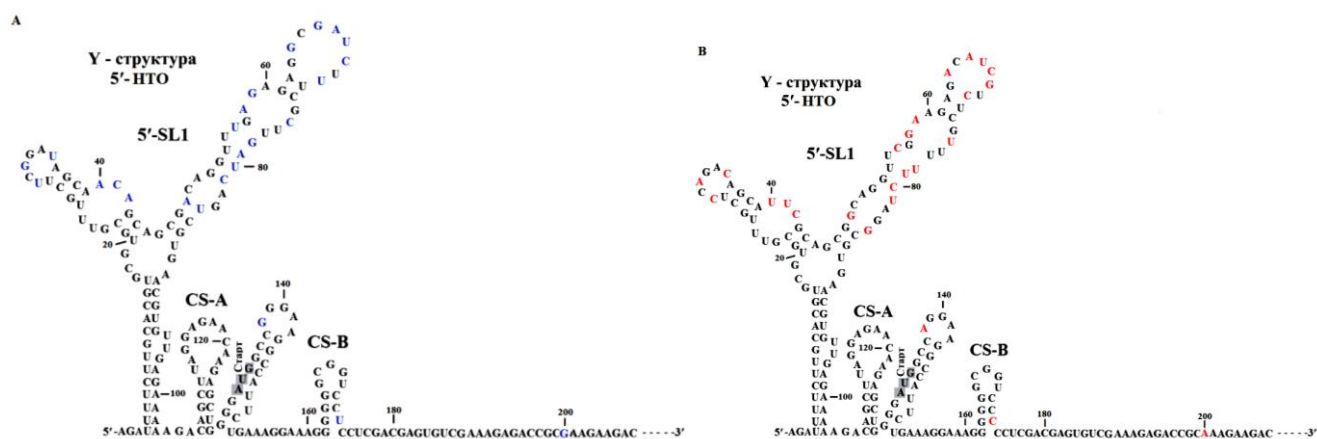


Рисунок 4. Структура РНК (А), построенная на основе прототипной последовательности генома штамма 205 (JX498939). Локализация нуклеотидных замен в 5'-НТО ВКЭ у изолятов ВКЭ, выделенных из иксодовых клещей, и их позиции по отношению к прототипной последовательности (В). Вторичная структура 5'-НТО геномной РНК ВКЭ была предсказана с помощью сервера MFOLD 3.4 (Markham, Zuker, 2008).

Обнаруженные нуклеотидные замены, по всей вероятности, могут приводить к изменению вторичной структуры РНК 5'-НТО генома ВКЭ и имеют принципиальное значение для адаптации вируса в природных очагах к новым видам переносчиков и хозяев. Успешность адаптации ВКЭ к изменяющимся условиям может быть обеспечена определенными генетическими механизмами. Предполагается, что вариабельность нуклеотидной последовательности 5'-НТО может предопределять эффективность репликации ВКЭ в иксодовых клещах и в клетках других резервуарных хозяев в природных очагах (Casati et al., 2006). Это предположение основано на данных о локализации в 5'-НТО геномной РНК флавивирусов сайтов связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы и взаимодействии с рибосомами клетки хозяина для обеспечения синтеза вирусного полипротеина. Знание и понимание пределов вариабельности вирусного генома принципиально важно как для лучшей диагностики флавивирусных инфекций, так и для совершенствования профилактики и лечения КЭ.

Стоит также отметить, что в регионе Юго-Восточной Европы, на территории Республики Молдова, РНК ВКЭ дальневосточного генотипа была выявлена впервые. РНК ВКЭ дальневосточного генотипа была обнаружена у клещей трех разных видов – *I.*

ricinus, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.* Ранее, ВКЭ дальневосточного генотипа был выявлен только в иксодовых клещах, собранных в Республике Крым, а также в некоторых европейских странах (Chausov et al., 2009; Субботина, Локтев, 2012). В то же время, клещи *I. ricinus* – основной переносчик ВКЭ европейского генотипа – являются преобладающим видом клещей в Республике Молдова (Chausov et al., 2010; Chicu et al., 2013). Эти данные подтверждают, что распространение ВКЭ дальневосточного генотипа в Европе шире, чем предполагалось ранее (Gritsun et al., 2003a ; Iurchenko et al., 2012; Kovalev et al., 2010; Субботина, Локтев, 2012).

Напротив, у клещей *I. persulcatus*, собранных в природных биотопах Республики Коми, был подтвержден ВКЭ сибирского генотипа. Высказано предположение, что ВКЭ сибирского генотипа был относительно недавно интродуцирован в природные очаги Республики Коми из Уральского и Сибирского регионов.

Выделение и характеристика высокопатогенного штамма С11-13 вируса клещевого энцефалита

В 2013 году в Новосибирской области был зарегистрирован случай заболевания человека клещевым энцефалитом со смертельным исходом.

Из мозговой суспензии, погибшей от клещевой инфекции, нами был выделен изолят С11-13 ВКЭ. Путем последовательных пассажей на культурах клеток почки эмбриона свиньи (SPEV), нормальных клетках эмбриональных почек человека (НЕК 293) и нейронов мыши (Neuro-2a), был получен набор вариантов ВКЭ (GenBank – С11-13_КР644245, С11-13_РЕК_(MF043953), С11-13-293_MF043954, С11-13-NEU_MF043955). Филогенетический анализ показал, что штамм С11-13 относится к сибирскому генотипу ВКЭ (рисунок 5).

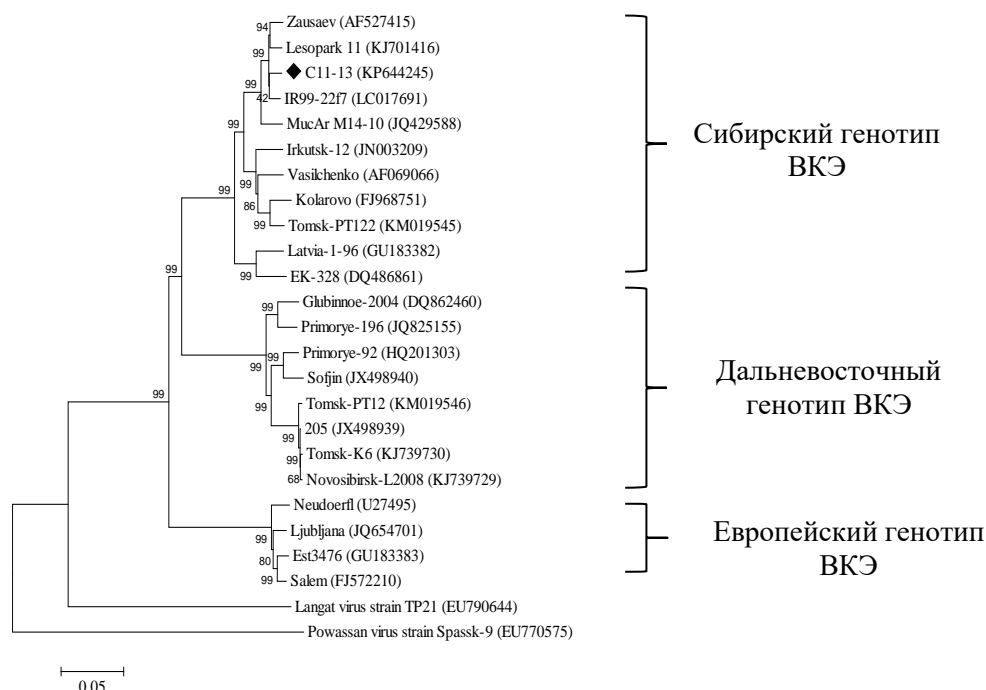


Рисунок 5. Филодендрограмма, отображающая генетическую близость исследуемого штамма С11-13 ВКЭ (◆) и известных полноразмерных нуклеотидных последовательностей ВКЭ, взятых из базы данных GenBank. Анализ проведен методом

«объединения ближайших соседей» с использованием 2-х параметрической модели Кимуры.

Уровень гомологии по нуклеотидной последовательности внутри сибирского генотипа составил от 94 до 98%, а для аминокислотной последовательности от 96 до 99%. Для дальневосточных ВКЭ уровень гомологии нуклеотидной последовательности составил 94 – 95% и для европейских штаммов 85 – 93%. При этом уровень гомологии по аминокислотной последовательности дальневосточных и европейских генотипов ВКЭ был от 94 до 98%.

Секвенирование вирусных геномов штамма С11-13 после 1, 3, 5, 6 и 8 пассажей, позволило выявить различные аминокислотные и нуклеотидные замены в лабораторно адаптированных вариантах ВКЭ. Длина геномной РНК исходного изолята С11-13 ВКЭ составила 10 801 н. (после адаптации 10838 н.).

После третьего пассажа вируса на клетках SPEV были выявлены первые изменения в вирусных белках штамма С11-13. Замены произошли в NS3 (H1745Q) и NS5 (S2925F), а к восьмому пассажиру обнаружено уже 25 нуклеотидных замен в геноме, которые привели к 8 аминокислотным заменам в белках: E (Q367R), NS1 (N1067D), NS2a (L1168V), NS3 (R1488Q, D1511N и H1745Q) и NS5 (M2562K и S2925F) (Таблица 2).

Таблица 2. Аминокислотные замены в белках ВКЭ штамма С11-13 при пассировании на культурах клеток SPEV, HEK 293 и Neuro-2a.

№	Амино кислота	Ген	Пассажи на SPEV					Пассажи на 293				Пассажи на Neuro-2a				
			1	3	5	6	8	1	3	6	8	1	3	5	6	8
1	367	E	Q	Q	Q	R	R	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
2	429	E	D	D	D	D	D	D	D	E	E	D	D	D	D	D
3	863	NS1	T	T	T	T	T	T	T	P	P	T	T	T	T	T
4	1067	NS1	N	N	D	D	D	N	N	D	D	N	N	D	D	D
5	1168	NS2a	L	L	V	V	V	L	V	V	V	L	V	V	V	V
6	1488	NS3	R	R	Q	Q	Q	R	R	Q	Q	R	R	R	R	R
7	1511	NS3	D	D	N	N	N	D	D	N	N	D	D	D	D	D
8	1678	NS3	T	T	T	T	T	T	T	A	A	T	T	T	T	T
9	1745	NS3	H	Q	Q	Q	Q	H	Q	Q	Q	H	Q	Q	Q	Q
10	1801	NS3	E	E	E	E	E	E	E	K	K	E	E	E	E	E
11	1802	NS3	N	N	N	N	N	N	N	K	K	N	N	N	N	N
12	1906	NS4a	F	F	F	F	F	F	S	S	S	F	F	F	S	S
13	2237	NS4b	S	S	S	S	S	S	S	N	N	S	S	S	S	S
14	2562	NS5	M	M	K	K	K	M	M	M	M	M	M	M	M	M
15	2925	NS5	S	F	F	F	F	S	S	F	Q	S	S	S	S	S
16	3213	NS5	S	S	S	S	S	S	S	P	P	S	S	S	S	S

Примечание: однобуквенный код – Q (глутамин), R (аргинин), D (аспарагиновая кислота), E (глутаминовая кислота), T (Треонин), P (пролин), N (аспарагин), L (лейцин),

V (валин), A (аланин), H (гистидин), K (лизин), F (фенилаланин), S (серин), M (метионин).

Замены в NS1 (N1067D), NS2a (L1168V) и NS3 (H1745Q) были характерны для всех использованных в эксперименте культур клеток – SPEV, HEK 293 и Neuro-2a. Это свидетельствует о том, что данные замены имеют наибольшее значение при адаптации ВКЭ и не зависят от вида клеток.

В тоже время, некоторые замены в вирусных белках штамма C11-13 были характерны только при пассировании на определенной культуре клеток (SPEV и HEK 293). Эти замены выявлены как в структурных, так и в неструктурных белках. Так, у вариантов ВКЭ C11-13, адаптированных на клетках HEK 293, обнаруженные замены локализовались в белках: E (D429E), NS1 (T863P), NS3 (T1678A, E1801K, N1802K), NS4b (S2237N), NS5 (S3213P). А у варианта ВКЭ C11-13, пассированном на клетках SPEV, специфичные аминокислотные замены обнаружены в белках E (Q367R) и NS5(M2562K). У варианта ВКЭ C11-13, адаптированного к клеткам Neuro-2a обнаружена 1 общая замена со штаммом, адаптированным к клеткам HEK 293, которая находилась в неструктурном белке NS4a (F1906S), остальные были общими для всех трех культур клеток (**таблица 2**).

Исследование динамики накопления вируса в клетках показало, что к пятому пассажу на всех культурах клеток (SPEV, HEK 293, Neuro-2a) штамм C11-13 приобрел более высокий вирусный титр. На **рисунке 6** представлен график изменения вирусного титра штамма C11-13 на культурах клеток SPEV, HEK 293, Neuro-2a на 7-й день после заражения клеток. Так, после третьего пассажа штамма C11-13 на клетках SPEV, с появлением первых аминокислотных замен в NS3 (H1745Q) и NS5 (S2925F) титр вируса увеличился с 10^6 до 10^8 ТЦПД₅₀/мл, а на клетках HEK 293 – титр увеличился с 10^3 до 10^6 ТЦПД₅₀/мл к пятому пассажу с появлением 11 замен в белках: E (1 замена), NS1 (2), NS3 (5), NS4b (1), NS5 (2). В тоже время, вариант штамма C11-13 на Neuro-2a с меньшим количеством замен, стал реплицироваться к четвертому пассажу с появлением аминокислотных замен в NS2a (L1168V) и NS3 (H1745Q) и обладал наименьшим значением вирусного титра – 10^2 ТЦПД₅₀/мл. Наибольшее накопление антигена наблюдали после третьего пассажа на клетках, как раз тогда, когда произошли первые аминокислотные замены в NS1 (N1067D), NS2a (L1168V), NS3 (H1745Q) и NS5 (S2925F).

Анализ пространственных моделей (Ponomareva et al., 2017) локализовал аминокислотные замены для NS3 в активных центрах сериновой протеазы (2 замены → H1488Q и D1511N) и геликазы (1 замена → H1745Q). Также была обнаружена одна аминокислотная замена в активном центре вирусной РНК полимеразы (NS5→S2925F).

После шестого пассажа C11-13 на клетках SPEV в белке E была выявлена аминокислотная замена Q367R. Аналогичная мутация описывалась ранее для ВКЭ европейского субтипа (Mandl et al., 2001). Эта замена приводит к увеличению положительного заряда в домене II белка E и может влиять на взаимодействие с

гликозаминогликанами, которые являются вирусными рецепторами на поверхности клетки-хозяина.

Интересно, что после 3-8 пассажей на всех клеточных линиях у вируса обнаружены замены в белке NS1 (Asn1067Asp) и NS2a (Leu1168Val). Замена в NS1 N1067D (Asn → Asp) не влияет на домен I (778-935 а.о.) и домен II (936-1013 а.о.), которые играют существенную роль в репликации вируса (Muller, Young, 2013). Выдвинута гипотеза, что из-за появления отрицательно заряженной карбоксильной группы аминокислотное замещение N1067D может повлиять на вторичную структуру и растворимость белка.

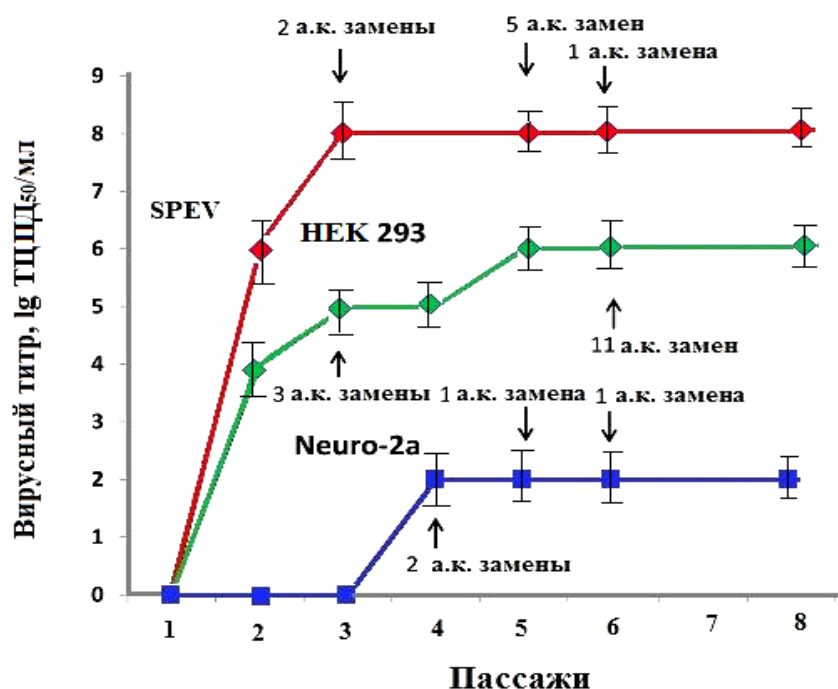


Рисунок 6. Динамика накопление титра ВКЭ штамма С11-13 на культурах клеток SPEV, HEK 293, Neuro-2a. Стандартное отклонение – 0,3-0,5 лгТЦПД₅₀/мл.

Известно, что N-конец белка NS2a вирусов японского энцефалита и желтой лихорадки участвуют в сборке вирусных инфекционных частиц и распространении вируса *in vitro* (Наруагаччи et al., 2015). А замена 1168 (Leu → Val) была обнаружена на N-конце белка NS2a и оказалась идентична для всех трех типов клеток, которая может работать как усилитель репликации.

Обнаруженные нуклеотидные и аминокислотные замены, как мы предполагаем, связаны с адаптацией природного изолята ВКЭ к новому хозяину, в данном случае к культуре клеток.

Генетическая изменчивость ВКЭ при адаптации вируса от культур клеток к мелким млекопитающим

Штамм С11-13, предварительно пассированный на клетках SPEV, после 3 и 8 пассажей был использован для интрацеребрального заражения культуральной вирусосодержащей жидкостью беспородных мышей-сосунков. Титр вируса в 10% гомогенате мозга на 3 пассаже составил $10^8 - 10^9$ ТЦПД₅₀/мл.

После третьего пассажа на животных, из мозговой суспензии мышей были выделены два изолята ВКЭ С11-13_ 3-3 и С11-13_ 8-3. Установлено, что эти изоляты, в отличие от вариантов, адаптированных к культуре клеток, приобрели ряд нуклеотидных и аминокислотных замен. Все замены локализовались в кодирующей части генома вируса. Всего было выявлено 44 нуклеотидных замены, из которых 11 были несинонимичные и располагались в неструктурных белках, за исключением двух замен в белке Е (таблица 3). Также, в пяти позициях белка NS3 был выявлен синонимичный однонуклеотидный полиморфизм.

Таблица 3. Аминокислотные замены в белках ВКЭ штамма С11-13 при пассажах на клетках SPEV, Neuro-2a и на животных.

№	Амино-кислота	Ген	Пассажи на культуре клеток SPEV (количество пассажей)			Пассажи на культуре клеток Neuro-2a (количество пассажей)				Пассажи на животных	
			1	3	8	1	3	5	6	3-3	8-3
1	347	Е	D	D	D	D	D	D	D	D	N
2	367	Е	Q	Q	R	Q	Q	Q	Q	Q	Q
3	1067	NS1	N	N	D	N	N	D	D	N	N
4	1168	NS2a	L	L	V	L	V	V	V	V	V
5	1488	NS3	R	R	Q	R	R	R	R	R	R
6	1511	NS3	D	D	N	D	D	D	D	D	D
7	1745	NS3	H	Q	Q	H	Q	Q	Q	Q	Q
8	1890	NS3	T	T	T	T	T	T	T	T	S
9	1906	NS3	F	F	F	F	F	F	S	S	S
10	2562	NS5	M	M	K	M	M	M	M	M	M
11	2925	NS5	S	F	F	S	S	S	S	S	S

Примечание: D – Аспаргиновая кислота, Q – Глутамин, R – Аргинин, N – Аспарагин, L – Лейцин, V – Валин, T – Треонин, S – Серин, M – Метионин, H – Гистидин, F – Фенилаланин, K – лизин; серым цветом выделены – замены, связанные с адаптацией к новому хозяину (к.к. SPEV → мыши); зеленым – реверсные замещения а.к. от человека → SPEV, а затем → клеткам мыши. Позиции аминокислот указаны по полипротеину.

Из 11 нуклеотидных замен, которые привели к замещению аминокислоты – три произошли при адаптации к новому хозяину – мышам. Одна в белке Е (G1039A) D → N и в две в белке NS3 (A5668T и T5717C) T → S и F → S, соответственно. Интересно то, что при пассажах на мышях (три пассажа) у вируса появились 6 аминокислотных замен, характерных для изолята вируса С11-13, выделенного от человека, но замещенных при последующих пассажах (8 пассажей) на линии клеток SPEV. Замены произошли в белке Е (Q367R), в NS1 (N1067D), в NS3 (R1488Q и D1511N) и в NS5 (M2561K и S2925F). Эти замены, возникли при адаптации вируса к другому хозяину – клеткам SPEV, и при адаптации ВКЭ к мышам становятся реверсными. Реверсные аминокислотные замены в

белках ВКЭ при смене хозяина – это ответ вирусной микропопуляции на смену одних клеточных белков хозяина на другие.

В результате проведенного анализа геномной РНК ВКЭ С11-13, выделенного из мозга мышей-сосунков, нами были картированы нуклеотидные и аминокислотные замены в структурных и неструктурных белках вируса, свидетельствующие о существовании достаточно быстрого и эффективного процесса геномной изменчивости вирусной микропопуляции, связанного как с адаптацией природного изолята ВКЭ к новому хозяину, так и со сменой одного хозяина на другого.

Мы предполагаем, что эти нуклеотидные и аминокислотные изменения связаны с адаптацией (молекулярным отбором) естественной популяции ВКЭ к новому хозяину (от клеток человеческого мозга к культуре клеток мыши), и что замены в белках NS1, NS2a, NS3 и NS5, в данном случае, играют ключевую роль в адаптации к новому хозяину.

Генетическая изменчивость 3'-НТО геномной РНК ВКЭ при адаптации к различным типам клеток

При экспериментальной адаптации штамма С11-13 ВКЭ сибирского генотипа к клеткам SPEV, НЕК 293, Neuro-2a, а затем к мышам, нами выявлено увеличение длины варибельного региона 3'-НТО. Длина этого региона 3'-НТО у исходного штамма С11-13, выделенного от человека составила 107 н., после адаптации на культурах клеток SPEV и Neuro-2a – 144 нуклеотида, а на клетках НЕК 293 – 129 н. Однако, после трех пассажей на мышах было обнаружено увеличение длины варибельного региона 3'-НТО со 144 до 413 нуклеотидов (**таблица 4**). Интересно, что аналогичная длина этого региона была ранее обнаружена в 3'-НТО у штамма Tomsk-PT122(KM019545), выделенного из садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*) (Ternovoi et al., 2019), и прошедшего несколько пассажей на клетках SPEV. Предполагается, что замены в 3'-НТО для изолятов ВКЭ человеческого происхождения являются определяющими для репликации ВКЭ в клетках человека.

Область между стоп-кодоном и промотором определяется как энхансер, который не является существенным для жизнеспособности вирусов, но участвует в регуляции работы промотора. Энхансер охватывает как консервативную область 3'-НТО, так и варибельную 3'-НТО. Длина энхансера варьирует между различными штаммами, а также изменяется в процессе адаптации вируса к новым клеткам. А увеличение длины 3'-НТО штамма С11-13 происходит как раз в варибельном регионе, в области энхансера. Консервативный же район 3'-НТО, который содержит область промотора, не изменялся.

По всей вероятности, механизм изменения 3'-НТО принципиально важен для обеспечения эффективной репликации ВКЭ к клеткам различных хозяев при постоянно изменяющихся условиях среды.

Есть предположение, что эволюция 3'-НТО была связана с диверсификацией области промотора/энхансера в качестве механизма адаптации флавивирусов к различным хозяевам (Gritsun, Gould, 2006c). Хотя функция энхансера может быть не критичной для жизнеспособности вируса в экспериментальных условиях, она может сыграть

значительную роль в природной среде, где высокие уровни вирусной репликации могут иметь решающее значение для передачи вируса между хозяевами, обеспечивая тем самым их успех и стратегию выживания.

Возможность изменения последовательности варибельного района 3'-НТО ВКЭ при смене хозяина может быть отнесена к стратегии, используемой вирусом для оптимизации способности продуцировать вирусную инфекцию у разных хозяев.

Таблица 4. Характеристика размеров геномной РНК и 3'-НТО ВКЭ штамма С11-13

Штамм ВКЭ	Полный геном	Варибельный регион 3'-НТО	Консервативный регион 3'-НТО	Весь регион 3'-НТО
С11-13_1 пассаж на SPEV	10801	107	320	427
С11-13_3 пассаж на SPEV	10838	144	320	464
С11-13_8 пассаж на SPEV (MF043953)	10838	144	320	464
С11-13_Neu (MF043955)	10838	144	320	464
С11-13_293 (MF043954)	10823	129	320	449
С11-13 3- 3 (3 пассаж на SPEV → 3 пассаж на мышцах)	11107	413	320	733
С11-13 8-3 (8 пассаж на SPEV → 3 пассаж на мышцах)	11107	413	320	733
Tomsk-PT122, (KM019545)	10933	413	146	576

Примечание: синим цветом обозначен исходный изолят С11-13, выделенный от человека, после первого пассажа на культуре клеток SPEV; серым цветом – штамм С11-13 ВКЭ, прошедший ряд последовательных пассажей на культуре клеток SPEV, НЕК 293 и Neuro-2a; зеленым – штамм С11-13 адаптированный с культуры клеток SPEV на животных (мышцах).

Таким образом, в ходе проделанной работы, было установлено, что при адаптации природного изолята вируса выделенного от человека, к различным клеткам, а также при смене одного хозяина на другого, идет удлинение варибельного региона 3'-НТО. Так, в процессе пассирования штамма С11-13, изолированного из мозга человека, на клетках SPEV (клетки свиньи), Neuro-2А (нейроны мыши), 293 (клетки обезьяны) и лабораторных мышцах происходит увеличение длины варибельного региона 3'-НТО со 107 н. до 413 н. Анализ 3'-НТО у штаммов прошедших множественные пассажи на культурах клеток, свидетельствует о том, что у них уже сформировались увеличенные структуры варибельной части 3'-НТО, как результат адаптации к лабораторным условиям. При этом, изменчивость 3'-НТО может функционировать как усилитель репликации РНК флавивирусов, обеспечивая стратегию выживаемости флавивирусов у разных хозяев.

Выводы

1. Впервые, в регионе юго-восточной Европы на территории Республики Молдова, был обнаружен вирус клещевого энцефалита дальневосточного генотипа у клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.*, собранных с домашних животных и в сельскохозяйственных угодьях.

2. При сравнении генетического разнообразия природных изолятов вируса клещевого энцефалита в Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе, нуклеотидные замены локализовались в петлевых структурах, не затрагивая шпилечные области 5'-НТО вируса клещевого энцефалита. Наибольшей вариабельностью отличались элементы В2, С1 и С2 Y-образной структуры 5'-НТО. Элементы А2, СS_A, СS_B и стартовый кодон были консервативными.

3. В процессе адаптации вируса клещевого энцефалита штамма С11-13, выделенного от человека, к новому хозяину (клещ → человек → культура клеток → мышь) в лабораторных вариантах уже после третьего пассажа на клетках выявлены аминокислотные замены в структурных (Е) и неструктурных вирусных белках (NS1, NS2a, NS3 и NS5). Замены в NS1 (N1067D), NS2a (L1168V) и NS3 (H1745Q) были общими для всех использованных в эксперименте культур клеток (SPEV, НЕК 293 и Neuro-2a).

4. В процессе адаптации ВКЭ с культуры клеток на мышах (три пассажа) у вируса появились 6 аминокислотных замен характерных для изолята вируса С11-13, выделенного от человека, но замещенных при последующих пассажах (8 пассажей) на линии клеток почки эмбриона свиньи (SPEV). При адаптации от SPEV к новому хозяину – мышам произошли замещения в белках: Е (Q367R), NS1 (N1067D), NS3 (R1488Q и D1511N) и NS5 (M2561K и S2925F).

5. При пассажах вируса клещевого энцефалита штамма С11-13 на клетках SPEV и Neuro 2a к третьему пассажиру 3'-НТО увеличилась на 37 нуклеотидов, а на клетка НЕК-293 – на 22 нуклеотида. При адаптации штамма С11-13 ВКЭ с культуры клеток SPEV к мышам длина вариабельного региона 3'-НТО увеличилась на 269 нуклеотидов. Возможность изменения последовательности вариабельного региона 3'-НТО вируса клещевого энцефалита при смене хозяина может быть отнесена к стратегии, используемой вирусом для оптимизации способности продуцировать вирусную инфекцию у разных хозяев.

Список работ по теме диссертации

1. **Ponomareva E.P.**, Mikryukova T.P., Kartashov M.Y., Protopopova E.V., Chausov E.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Ternovoi V.A., Loktev V.B., Gori A.V., Gheorghita S.D., Burlacu V.I. Detection of Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis viral RNA in ticks collected in the Republic of Moldova // Journal of Vector Borne Diseases. – 2015. – Т. 52. – № 4. – С. 334-336.

2. **Ponomareva E.P.**, Ternovoi V.A., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Gladysheva A.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chausov E.V., Loktev V.B. Adaptation of tick-borne

encephalitis virus from human brain to different cell cultures induces multiple genomic substitutions //Archives of Virology. – 2017. – Т. 162. – № 10. – С. 3151-3156.

3. Ternovoi V.A., Gladysheva A.V., **Ponomareva E.P.**, Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chausov E.V., Loktev V.B. Variability in the 3' untranslated regions of the genomes of the different tick-borne encephalitis virus subtypes // Virus Genes. – 2019. – Т. 55. – № 4. – С. 448-457. doi: 10.1007/s11262-019-01672-0.

4. **Пономарева Е. П.**, Терновой В. А., Микрюкова Т. П., Протопопова Е. В., Тупота Н. Л., Локтев В. Б. Генетическая вариабельность 5'-нетранслируемой области генома вируса клещевого энцефалита из разных регионов Северной Евразии // Мол.биология. – 2021. – Т.55. – №3. – С. 431-440. doi: 10.31857/S0026898421030149

Доклады и тезисы конференций

1. **Пономарева Е.П.**, Терновой В.А., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Гладышева А.В., Чаусов Е.В., Локтев В.Б. Обнаружение множественных аминокислотных замен в белках вируса клещевого энцефалита при адаптации высокопатогенного для человека изолята к культурам клеток / Материалы IX Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. Москва, 27–29 марта 2017 г. // Инфекционные Болезни. – 2017. – Т. 15. Приложение 1. – С. 222

2. Гладышева А.В., **Пономарева Е.П.**, Терновой В.А., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Швалов А.Н., Коновалова С.Н., Чаусов Е.В., Локтев В.Б. Адаптация вируса клещевого энцефалита, выделенного из человеческого мозга, к различным клеточным культурам./ В книге: Сборник тезисов IV Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов Сборник тезисов. – 2017. – С. 136-140

3. Гладышева А.В., Терновой В.А., **Пономарева Е.П.**, Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Чаусов Е.В., Швалов А.Н., Локтев В.Б. Вариабельность 3'-UTR геномной РНК вируса клещевого энцефалита и изменчивость 3'-UTR при культивировании в различных типах клеток / В книге: МНСК-2018: Физические методы в естественных науках Материалы 56-й Международной научной студенческой конференции. – 2018. – С. 6

4. Гладышева А.В., Терновой В.А., **Пономарева Е.П.**, Протопопова Е.В., Локтев В.Б. Множественные аминокислотные замены в кодирующей части и изменение 3'-UTR вируса клещевого энцефалита при адаптации к различным типам клеток / В книге: Биология – наука XXI века. Сборник тезисов 23-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – 2019. – С. 207

5. **Пономарева Е.П.**, Терновой В.А., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Тупота Н.Л., Локтев В.Б. Генетические варианты 5'-нетранслируемой области РНК вируса клещевого энцефалата / В книге: Сборник тезисов VI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания». – 2019. – С. 169- 170

6. **Пономарева Е.П.**, Терновой В.А., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Швалов А.Н., Тупота Н.Л., Трегубчак Т.В., Локтев В.Б, Агафонов А.П. Оценка популяционной

гетерогенности вирусов клещевого энцефалита и лихорадки западного нила при ассоциированной инфекции. / В книге: Сборник тезисов VII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания». – 2020. – С. 159-160.

Благодарности:

Автор выражает благодарность своим коллегам: к.б.н. Микрюковой Т.П., к.б.н.Тупота Н.Л., к.ф.-м.н. Швалову А.Н., Гладышевой А.В. за обучение методам молекулярной диагностики, участие в проведении экспериментов, а также за терпение, понимание и всестороннюю поддержку. Отдельную благодарность автор выражает к.б.н. Протопоповой Е.В. за помощь в части культивирования ВКЭ.

Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю, заведующему лабораторией молекулярной эпидемиологии ООИ, к.б.н. Терновому В.А. за помощь в выборе темы, направления исследований, всестороннюю поддержку и заведующему отделом молекулярной вирусологии флавивирозов и вирусных гепатитов, профессору, д.б.н. Локтеву В.Б. за помощь в обсуждении полученных результатов и в публикации научных работ.

Автор искренне признателен всем коллегам за ценные критические замечания по тексту этой работы и без участия которых выполнение настоящей работы было бы невозможно.

Список сокращений:

а.к. – аминокислота;

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита;

ИФА – иммуноферментный анализ;

КЭ – клещевой энцефалит;

НТО/НТР – нетранслируемая область/регион;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ЦПД – цитопатическое действие;

SPEV (PEK) – перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи;

НЕК 293 (293) (англ. Human Embryonic Kidney 293) – культура клеток эмбриональных почек человека;

Neuro-2a – культура клеток нейробластомы мыши;

NGS (англ. Next-Generation Sequencing) – секвенирование нового поколения высокопроизводительное секвенирование.