

На правах рукописи

**Гладышева Анастасия Витальевна**

**Изменчивость вирусных белков и геномной ssRNA(+) флавивирусов и  
энтеровирусов при культивировании *in vitro***

1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой 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:** **Дейнеко Елена Викторовна**  
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биоинженерии растений ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

**Бабкин Игорь Викторович**  
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»

Защита состоится «09» сентября 2022 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.1 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.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Т.С. Непомнящих

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Согласно данным Международного комитета по таксономии вирусов от 2021 года, вирусы с геномом одноцепочечной РНК положительной полярности (ssRNA(+)) относятся к 56 семействам и многие из них способны вызывать тяжелые инфекционные заболевания домашних животных и человека. Некоторые ssRNA(+) вирусы привели к возникновению крупных вспышек заболеваний или даже пандемий в современном мире, как, например, новый коронавирус SARS-CoV-2. Вирусы Западного Нила (WNV), Зика, Денге (DENV), Желтой лихорадки (YFV) и Японского энцефалита (JEV) вызвали сотни миллионов случаев заболеваний и миллионы смертей в последние годы. В то время как другие ssRNA(+) вирусы, такие как вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), Усуту или полиовирус (PV), являются эндемичными во многих странах и представляют постоянную угрозу для населения, вызывая локальные вспышки тяжелых инфекционных заболеваний. Спектр хозяев данных вирусов широк, однако до сих пор остается не понятным, как вирусы могут осуществлять свой жизненный цикл в клетках различных видов хозяев, преодолевать межвидовые барьеры и становиться патогенными для человека.

Типичная геномная ssRNA(+) вируса состоит из 5' нетранслируемого региона (5' UTR), одной или нескольких открытых рамок считывания (ORF) и 3' нетранслируемого региона (3' UTR) (Suthar M.S., et al., 2013). Подобно 5' и 3' UTR зрелой эукариотической мРНК, 5' и 3' UTR геномной ssRNA(+) вируса обладают множественными функциональными особенностями, обеспечивающими взаимодействие с белками вируса и клетки хозяина. Структурные элементы 5' и 3' UTR, связываясь с этими белками, участвуют в регуляции циклизации, репликации и трансляции вирусной геномной РНК (Bailey D., et al., 2010; Shwetha S., et al., 2015).

Механизмы согласования репликации и трансляции вирусного ssRNA(+) генома до сих пор остаются полностью невыясненными. Однако однозначно установлено, что большую роль в этих процессах играют 5' и 3' UTR (Espinosa-Hernández W., et al., 2014; Karakasiliotis I., et al., 2010). Основная проблема заключается в специфике взаимодействия вторичных структур 5' и 3' UTR вирусной РНК с вирусными и клеточными белками. Существуют особые требования к элементам последовательностей 5' и 3' UTR. От этих структур зависит компетенция формирования репликационного комплекса вируса, а именно, взаимодействие с РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp), с другими неструктурными вирусными белками, а также с клеточными белками хозяина. Однако на данный момент мало что известно о вариациях функциональных вторичных структур 5' и 3' UTR РНК, которые работают как цис-действующие

элементы во время репликации, трансляции вирусного генома и адаптации вирусов к клетке нового вида хозяина. Таким образом, изучение структуры 5' и 3' UTR и белков ssRNA(+) вирусов важно для выяснения детального механизма жизненного цикла вирусов в процессе адаптации к новому хозяину.

В ходе данной работы была исследована способность к репликации в различных типах клеток ssRNA(+) вирусов, использующих кэп-зависимый и IRES-зависимый механизмы трансляции. Экспериментальные данные по лабораторной адаптации вирусов к культурам клеток дополнены полногеномным секвенированием и моделированием пространственных структур функционально важных вирусных белков, а также вторичных структур 5' и 3' UTR геномной вирусной РНК. Эти исследования в дальнейшем будут способствовать созданию новых моделей, объясняющих высокую скорость эволюции и механизмы адаптации ssRNA(+) вирусов, которые позволяют этим вирусам реплицироваться в различных хозяевах. Понимание того, как взаимодействие вируса с хозяином формируют вирусную эволюцию, поможет выявить молекулярные факторы, которые управляют появлением новых и экспансией уже известных ssRNA(+) вирусов.

### **Цель исследования**

Целью данной работы являлось исследование вариабельности геномной вирусной ssRNA(+), а также изменчивости пространственной структуры вирусных белков и нетранслируемых регионов ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов при их адаптации к различным культурам клеток.

### **Задачи исследования**

1. Произвести адаптацию к культурам клеток, полногеномное секвенирование оригинальных нуклеотидных вирусных последовательностей и молекулярно-генетическую характеристику различных штаммов вирусов клещевого энцефалита, Зика и ECHO 3;
2. Исследовать вариабельность 3' UTR РНК и структур белков вируса клещевого энцефалита штамма C11-13 и вируса Зика штамма Faranah/18 при адаптации к различным типам клеток;
3. Оценить изменчивость 5' UTR РНК и структур белков вируса ECHO 3 штамма Sakhalin-11.293 при адаптации к различным типам клеток;
4. Определить полноразмерные нуклеотидные последовательности двух новых штаммов Kindia tick virus (KITV), произвести таксономическую идентификацию и филогенетический анализ;
5. Смоделировать и аннотировать вторичные структуры 5' и 3' UTR KITV. Сравнить организацию пространственных структур 5' и 3' UTR сегментированной ssRNA(+) KITV с 5' и 3' UTR несегментированной ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов.

## Научная новизна

### В ходе данной работы:

1. Определены полногеномные нуклеотидные последовательности, предсказаны модели пространственных структур белков NS3, NS5, вторичной структуры 3' UTR сибирского генотипа вируса клещевого энцефалита и получены новые данные об их вариабельности в процессе адаптации вируса к различным типам клеток.
2. Характеризована новая полногеномная последовательность вируса Зика африканского генотипа. Получены новые результаты о мутациях и расположении сайтов связывания белка Musashi-1 (MSI1) в 3' UTR вируса Зика.
3. На основе анализа секвенированных полногеномных последовательностей проведено исследование изменчивости региона IRES в 5' UTR и картированы множественные мутации в кодирующей части генома вируса ECHO 3 при адаптации к различным культурам клеток.
4. Выделено два новых штамма KITV/2018/1 и KITV/2018/2. Получены две полногеномные последовательности нового многокомпонентного KИTV. Впервые предсказаны вторичные структуры 5' и 3' UTR для данного вируса и проведен их анализ.
5. Впервые проведено сравнение предполагаемой пространственной топологии 5' и 3' UTR сегментированной ssRNA(+) многокомпонентного флавиподобного KИTV с ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов. Получены уникальные данные об особенностях организации регуляторных элементов 5' и 3' UTR KИTV и сформулированы гипотезы об их роли в процессе репликации многокомпонентных вирусов с новым механизмом реализации генетической информации.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В настоящей работе проведено картирование мутаций в вирусных геномах, происходящих при пассировании вирусов клещевого энцефалита, Зика и ECHO 3 на различных культурах клеток, и изучение их влияния на пространственные структуры вирусных белков и нетранслируемых регионов вирусной ssRNA(+). Впервые выполнено моделирование и функциональная аннотация вторичных структур 5' и 3' UTR нового многокомпонентного KИTV, имеющего сегментированный ssRNA(+) геном. Получены фундаментальные знания о геномных изменениях ВКЭ, вируса Зика и вируса ECHO 3, происходящих в процессе адаптации к новому хозяину, и их роли в репликации и трансляции вирусного ssRNA(+) генома. Это, в свою очередь, может дать новые возможности для изучения молекулярных факторов, определяющих патогенные свойства РНК-содержащих вирусов. А также позволит предвидеть появление новых вирусных

инфекций, которые, циркулируя в природных биотопах могут стать опасными для домашних животных и человека.

В диссертационной работе совокупно было получено и депонировано в международную базу данных GenBank 12 полногеномных нуклеотидных последовательностей современных изолятов ВКЭ, вируса Зика, вируса ЕСНО 3, КИТВ и вируса Нгари (NRIV), которые могут представлять эпидемиологическую опасность для населения. Эти данные далее могут быть использованы для разработки и совершенствования молекулярно-генетических тестов для мониторинга, диагностики и эпидемиологического анализа случаев заболевания, вызванных исследуемыми вирусами. Вне сомнения, проанализированные вирусные штаммы, их геномные последовательности, предсказанные пространственные модели принципиально важных вирусных белков и регуляторных элементов нетранслируемых областей вирусных геномов могут быть полезны для создания новых противовирусных препаратов с различным механизмом действия, направленных к функционально значимым вирусным регионам, картированным в работе.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. У природного изолята С11-13 вируса клещевого энцефалита при адаптации к культурам клеток РЕК, НЕК293 и Neuro-2а происходят замены в функционально важных регионах неструктурных вирусных белков NS3, NS5 и наблюдается изменение длины варибельного региона 3' UTR, приводящее к модификации Y-3 структуры 3' UTR.
2. Культивирование вируса Зика штамма Faranah/18 на культурах клеток Vero E6, НЕК293 и С6/36 не приводит к появлению нуклеотидных замен в кодирующей части генома. В высококонсервативной SL-2 структуре 3' UTR имеются две нуклеотидные замены. У штамма Faranah/18 в сайте гликозилирования белка Е отсутствует делеция, а 3' UTR содержит пять сайтов UAG для связывания с белком MSI1 с нетипичным расположением, что не характерно для штаммов африканского генотипа.
3. Геномная РНК вируса ЕСНО 3 обладает значительной гетерогенностью, что показано на примере адаптации вируса ЕСНО 3 штамма Sakhalin-11.293 к культурам клеток НЕК293, С33А, DU-145, RD, MCF-7 и А431. Большинство аминокислотных замен происходит в структурном белке VP1, а замена Lys<sub>267</sub>→Glu<sub>267</sub>, возможно, является ключевой генетической детерминантой адаптации вируса при смене хозяина. Варибельность нуклеотидного состава 5' UTR не влечет видоизменение глобальной топологии 5' UTR.
4. КИТВ относится к флавиподобным вирусам семейства *Flaviviridae* и кластеризуется вместе с Mogiana tick virus (MGTV) из группы Jingmen tick viruses (JMTV). Полногеномные последовательности КИТВ штаммов

KITV/2018/1 и KИTV/2018/2 характеризуются уровнем гомологии 96-99% по аминокислотной последовательности с ранее известным штаммом KИTV/2017/1.

5. Пространственная организация 5' и 3' UTR KИTV схожа с 5' и 3' UTR флавивирусов. Нуклеотидные последовательности 5' и 3' UTR различных сегментов KИTV имеют функциональные регионы, характерные для флавивирусов: 5' DAR - 3' DAR, пентануклеотид 5'-CACAG-3', регион связывающий белок La, сайты связывания белка MSI1. Вторичная структура 5' UTR консервативна среди различных сегментов. Наиболее вариабельным является 3' UTR сегмента 2.

### **Степень достоверности и апробация 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. Результаты работы неоднократно устно представлены автором на различных международных конференциях молодых ученых, где дополнительно прошли независимое рецензирование, и удостоены призовых мест.

Материалы диссертационной работы доложены на 9 международных и всероссийских научных конференциях: «VIII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio – 2021» (Кольцово, 2021, 1-е место)», «VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio – 2020» (Кольцово, 2020, 1-е место)», «23-я Международная школа-конференция молодых ученых «Биология-наука 21 века» (Пушино, 2019, 1-е место)», «V Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов «OpenBio-2018» (Кольцово, 2018, 1-е место)», «56-я Международная научная студенческая конференция МНСК-2018 (Новосибирск, 2018)», «II Школа молодых учёных «Компьютерное моделирование структуры и динамики биомолекул» (Новосибирск, 2018)», «IV Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов «OpenBio-2017» (Кольцово, 2017, 2-е место)», «Всероссийская конференция, посвящённая 80-летию со дня открытия вируса клещевого энцефалита «Клещевой энцефалит и другие переносимые клещами инфекции» (Москва, 2017)», «55-я Международная научная студенческая конференция МНСК-2017 (Новосибирск, 2017, 2-е место)».

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 15 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах и 12 тезисов в рецензируемых сборниках трудов научных конференций. Также опубликовано 12 полногеномных вирусных последовательностей в международной базе данных GenBank.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 143 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 12 таблицами. Список литературы включает 192 источника зарубежной литературы.

### **Личный вклад автора**

Все представленные экспериментальные данные получены автором самостоятельно, либо при его содействии. Автор принимал непосредственное участие в планировании работы, интерпретации данных, представлении результатов на конференциях, а также подготовке и публикации научных статей в рецензируемых изданиях.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В обзоре литературы представлены данные о морфологии вириона и строении генома флавириусов и энтеровирусов, в основе реализации генетической информации которых лежит ssRNA(+) геном. Результаты, полученные за последние годы, однозначно показывают, что 5' и 3' UTR РНК вирусов содержат функционально значимые районы и имеют решающее значение для репликации, трансляции, иммунной регуляции и патогенеза ssRNA(+) вирусов.

### **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Достижение поставленной цели осуществлялось путем комплексного подхода к решению задач с использованием различных современных методов исследования. Результаты были получены при помощи вирусологических (культивирование и титрование вирусов *in vitro*), молекулярно-биологических (выделение нуклеиновых кислот, обратная транскрипция, ПЦР, полногеномное секвенирование методом Сэнгера и NGS) и методов биоинформатического анализа (сборка и анализ полногеномных последовательностей, филогенетический и эволюционный анализ, моделирование пространственных структур белков и вторичной структуры РНК) совокупно.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Лабораторная адаптация ВКЭ к различным культурам клеток

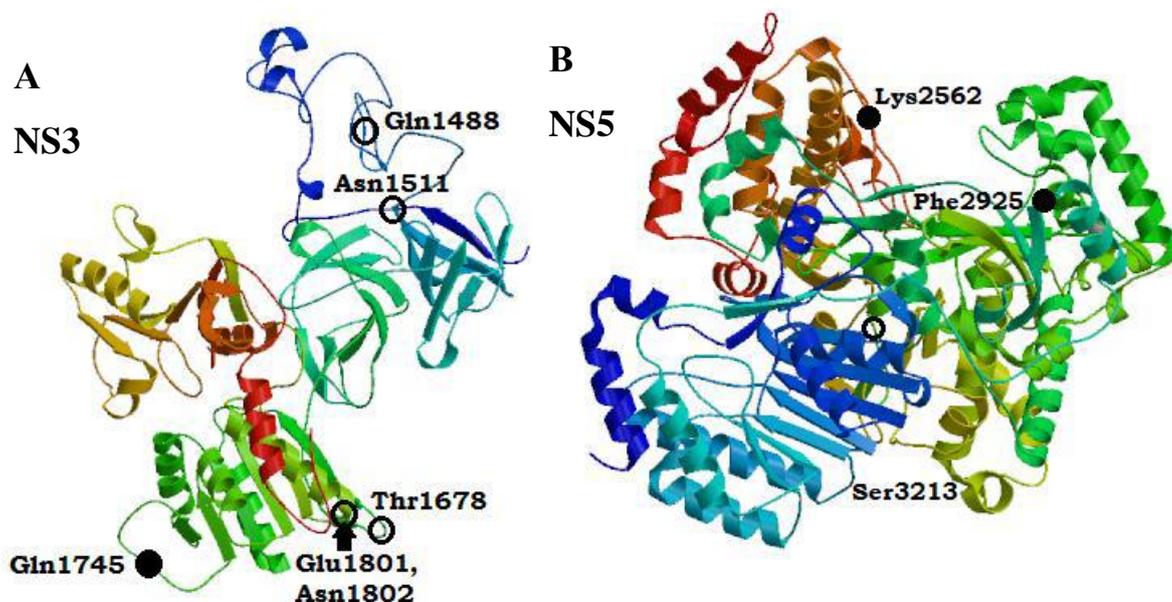
Вирус клещевого энцефалита штамм С11-13 (1-й пассаж на РЕК от изолята выделенного от человека в 2013 году, GenBank ID: KP644245) был пассирован на культурах клеток почки эмбриона свиньи (РЕК), почки эмбриона человека (НЕК293) и нейробластомы мыши (Neuro-2a). Исследование кинетики накопления вирусного титра показало, что после 5-го пассажа на всех культурах клеток вирус приобрел более высокую скорость репликации. При помощи полногеномного секвенирования было установлено, что после 6 пассажа ВКЭ приобретает множественные аминокислотные замены преимущественно в неструктурных белках.

**Таблица 1.** Ключевые аминокислотные замены в геноме ВКЭ штаммов С11-13РАК, С11-13-293 и С11-13-NEU. Фиолетовым цветом выделены замены, которые произошли при адаптации ВКЭ штамма С11-13 к различным культурам клеток.

Регион	Позиция	Название штамма ВКЭ (№ из GenBank)			
		Исходный	Шестой пассаж на культуре клеток		
		<b>С11-13</b> (KP644245)	<b>С11-13РАК</b> (MF043953)	<b>С11-13-293</b> (MF043954)	<b>С11-13-NEU</b> (MF043955)
<b>NS2a</b>	1067	Asn	<b>Asp</b>	<b>Asp</b>	<b>Asp</b>
	1168	Leu	<b>Val</b>	<b>Val</b>	<b>Val</b>
<b>NS3</b>	1745	His	<b>Gln</b>	<b>Gln</b>	<b>Gln</b>
<b>NS5</b>	2925	Ser	<b>Phe</b>	<b>Phe</b>	Ser

У ВКЭ варианта штамма С11-13РАК на культуре клеток РЕК обнаружены замены в белках E (1 замена), NS2a (2 замены), NS3 (3 замены) и NS5 (2 замены). У ВКЭ варианта штамма С11-13-293 на культуре клеток НЕК293 выявлены замены в E (1), NS1 (1), NS2a (2), NS3 (6), NS4a (1), NS4b (1) и NS5 (2), а для ВКЭ С11-13-NEU: NS2a (2), NS3 (1), NS4a (1). Выявлены замены в NS2a<sub>1067</sub> (Asn → Asp), NS2a<sub>1168</sub> (Leu → Val) и NS3<sub>1745</sub> (His → Gln), которые идентичны для всех трех типов клеток, и замена в NS5<sub>2925</sub> (Ser → Phe), которая идентична для культур клеток РЕК и НЕК293. Именно эти аминокислотные замены, мы считаем, являются ключевыми при адаптации штамма С11-13 ВКЭ (Таблица 1).

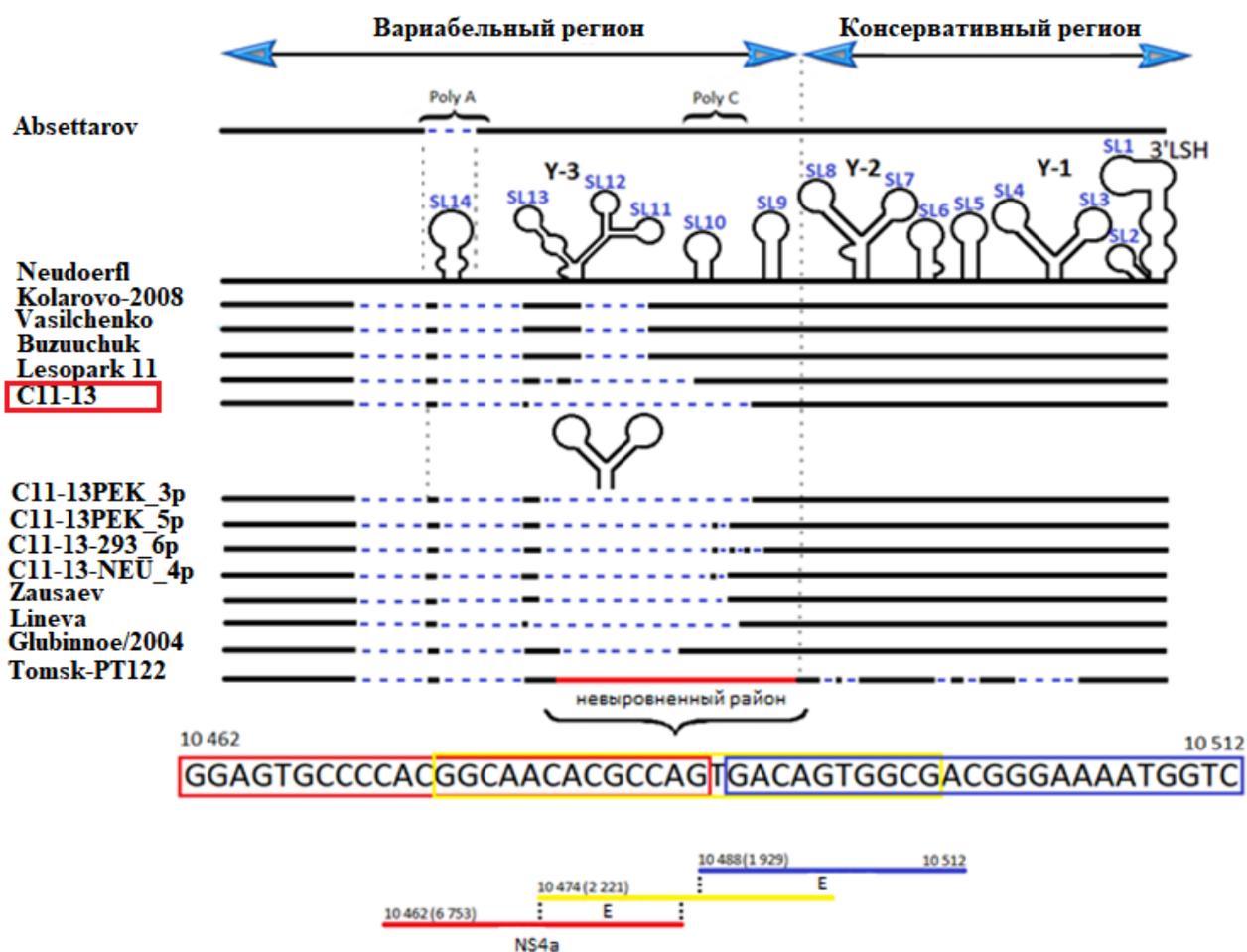
Произошедшие замены в NS3 и NS5 были картированы относительно трехмерных моделей этих белков (Рисунок 1). Моделирование пространственных структур белков NS3 и NS5 производили по гомологии с известными кристаллическими структурами из базы данных PDB (PDB ID: 2WV9 и PDB ID: 4K6M).



**Рисунок 1.** Трехмерные модели белков NS3 (А) и NS5 (В). Кружками обозначено расположение аминокислотных замен относительно трехмерных структур. Закрашенными черным цветом кружками обозначены замены, которые идентичны для различных культур клеток.

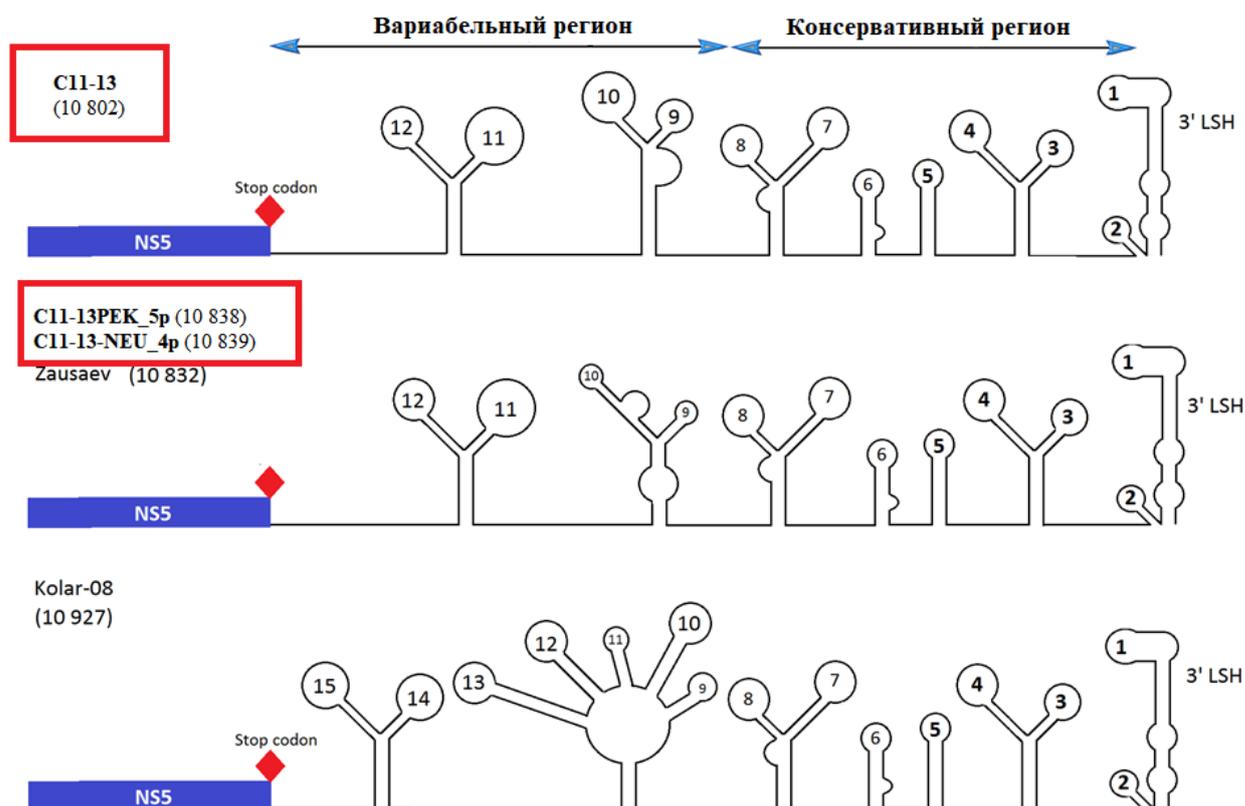
Две замены  $Asn_{1511}$  и  $Gln_{1488}$  находятся в N-концевом протеазном домене белка NS3 вблизи каталитической триады протеазы ( $His_{51}$ ,  $Asp_{75}$ ,  $Ser_{135}$ ) в области центральной щели и четыре замены  $Thr_{1678}$ ,  $Gln_{1745}$ ,  $Glu_{1801}$  и  $Asn_{1802}$  в C-концевом хеликазном домене. Замена в  $NS3_{1745}$  ( $His \rightarrow Gln$ ) была общей для всех рассмотренных вариантов. А также, замещение  $His_{1745} \rightarrow Gln_{1745}$  вызывает изменение заряда с положительного на нейтральный в NS3-хеликазе. Замещение в  $NS5_{2562}$  ( $Met \rightarrow Lys$ ) расположено в петле недалеко от  $\beta$ -листа в каталитической тетраде K-D-K-E метилтрансферазы. Замены в  $NS5_{2925}$  ( $Ser \rightarrow Phe$ ) и  $NS5_{3213}$  ( $Ser \rightarrow Pro$ ) находятся предположительно в мотивах G и D соответственно домена RdRp NS5. Мотив G представляет собой основной мотив домена RdRp NS5.

Сравнение длины полных геномов и 3' UTR РНК различных штаммов ВКЭ, ранее полученных в условиях нашей лаборатории, а также взятых из GenBank, показало, что преимущественно от европейского к дальневосточному генотипу идет уменьшение длины генома. Варьирование в длине вирусного генома связано со значительной гетерогенностью варибельной части 3' UTR (V3' UTR) ВКЭ. Размер V3' UTR европейского генотипа (ВКЭ-Евр) изменяется от 402 до 446 нуклеотидов, а у ВКЭ дальневосточного генотипа (ВКЭ-Дв) от 87 до 201 нуклеотидов. В V3' UTR ВКЭ имеются две протяженные делеции. Первая образуется за счет исчезновения региона PolyA, который характерен лишь для штаммов ВКЭ-Евр. Следующая протяженная делеция наблюдается в районе образования Y-3 структуры (Рисунок 2).



**Рисунок 2.** Схема полноразмерного выравнивания нуклеотидных последовательностей 3' UTR ВКЭ. Выравнивание представлено в следующем порядке: европейский, сибирский и дальневосточный генотипы.

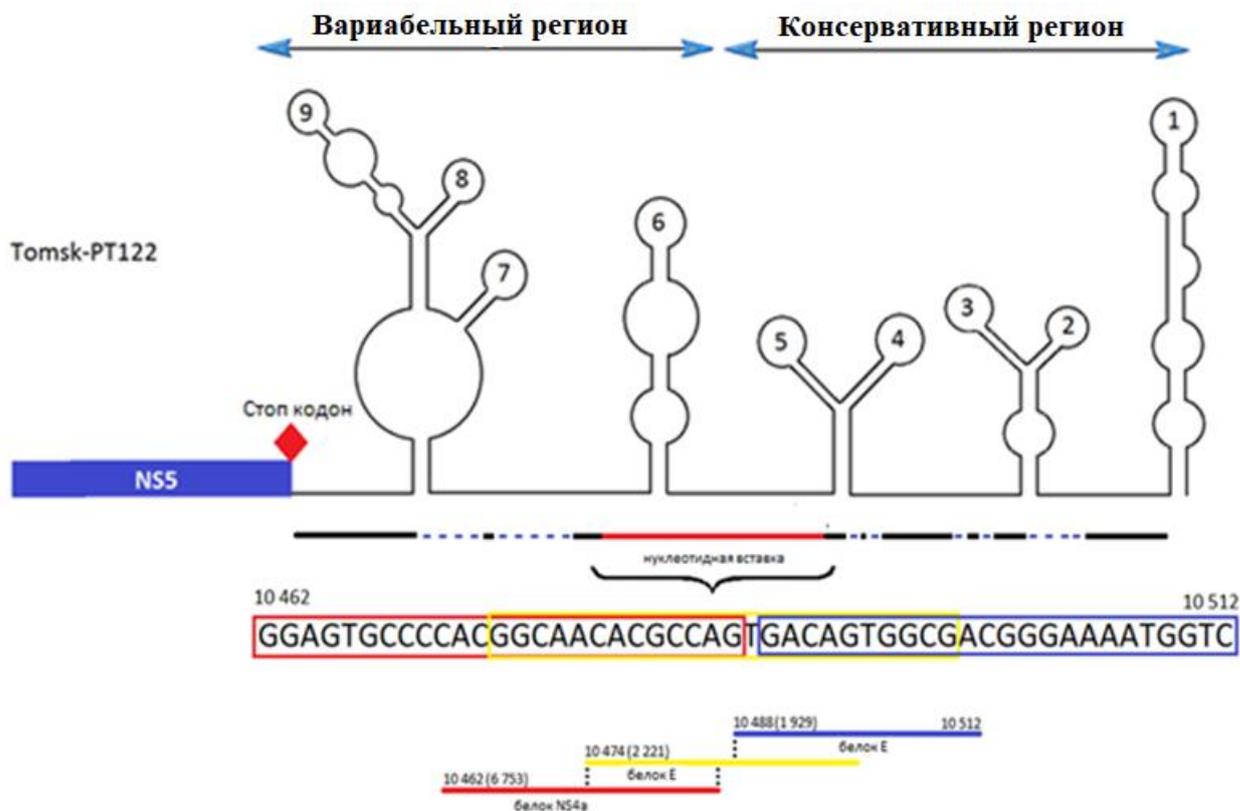
С увеличением длины генома данная Y-3 структура видоизменяется, приобретая дополнительные выпетливания и SL, но в целом ее конституция сохраняется. При пассировании ВКЭ штамма C11-13 на культурах клеток НЕК293, РЕК и Neuro-2a делеция начинает заполняться в районе образования Y-3 структуры со стороны 3' конца. Длина V3' UTR изменяется от 107 до 144 нуклеотидов, при этом гантелеобразная Y-3 структура видоизменяется до классической Y-3 структуры с двумя дополнительными выпетливаниями (Рисунок 3). Данная Y-3 структура формируется у ВКЭ штамма C11-13 на культурах клеток с разной скоростью: на Neuro-2a к 4-му пассажу, на РЕК к 5-му пассажу. А на НЕК293 к 6-му пассажу данная структура не сформировалась, однако было обнаружено удлинение V3' UTR со 107 до 129 нуклеотидов. Похожая картина наблюдается и среди других штамма сибирского генотипа (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Линейные модели вторичной структуры 3' UTR геномной РНК ВКЭ сибирского генотипа.

Исключением являлся штамм Tomsk-PT122 ВКЭ, который был изолирован из птицы *Acrocephalus dumetorum*. У данного штамма обнаружены делеции в С3' UTR, чего не наблюдалось ни у одного из рассмотренных штаммов. Структура 3' LSH у Tomsk-PT122 сильно модифицирована. SL-2 структура сопряженная с 3' LSH исчезает и видоизменяется SL-1. Пентануклеотид 5'-CACAG-3', который является базой для SL-1 и высококонсервативен среди всех флавивирусов, изменяется на пентануклеотид AACAU. У штамма Tomsk-PT122 был обнаружен невыровненный регион (NAR). Из-за дополнительной вставки в варибельной части размер 3' UTR увеличивается до 413 нуклеотидов. Установлено, что NAR в V3' UTR штамма Tomsk-PT122 полностью сформирован нуклеотидными вставками длиной 24-25 нуклеотидов из кодирующей части генома, а именно белков E и NS4a (Рисунок 4).

Таким образом, в ходе проделанной работы было установлено, что при адаптации ВКЭ-Сиб к различным культурам клеток происходят аминокислотные замены в функционально важных регионах неструктурных вирусных белков и идет удлинение V3' UTR геномной вирусной РНК в районе образования Y-3 структуры. Y-3 структура приобретает дополнительные выпетливания либо новые SL, что может указывать на значимость данного региона при репликации ВКЭ в новых типах клеток.



**Рисунок 4.** Линейная модель вторичной структуры 3' UTR геномной РНК штамма Tomsk-PT122 сибирского генотипа ВКЭ.

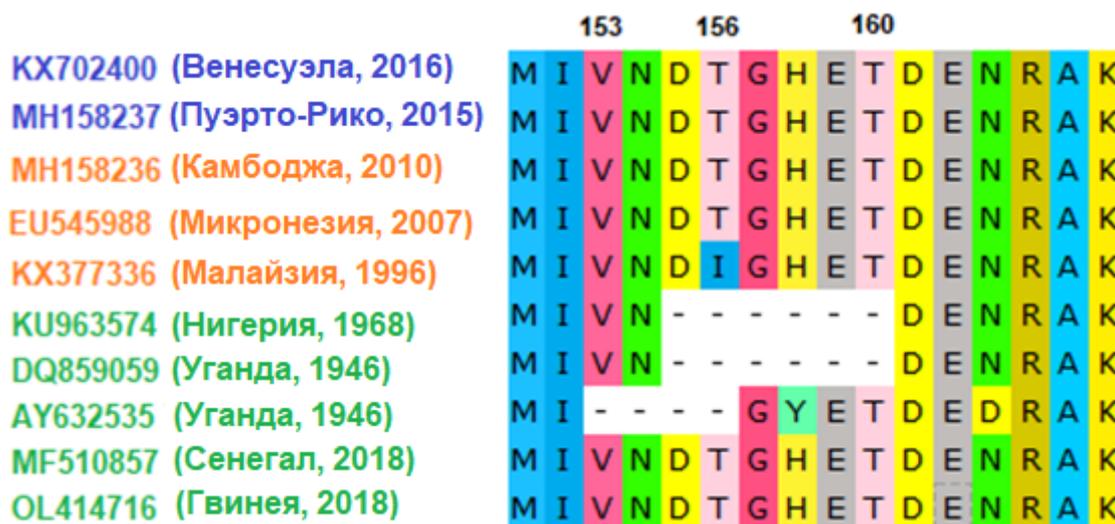
Мы предполагаем, что существует некоторый механизм редактирования 3' UTR ВКЭ, который принципиально важен при адаптации вируса к различным типам хозяев и различным природно-климатическим условиям.

### 3.2 Лабораторная адаптация вируса Зика к различным культурам клеток

Произведена лабораторная адаптация вируса Зика штамма Faranah/18 (1-й пассаж на C6/36 от изолята выделенного от человека в 2018 г., GenBank ID: MN025403) к культурам клеток комара *Aedes albopictus* (C6/36), почки африканской зеленой мартышки (Vero E6) и почки эмбриона человека (HEK293). Было показано, что вирус Зика штамм Faranah/18 активно реплицируется во всех трех культурах клеток и не приобретает нуклеотидных замен в геноме при культивировании (GenBank ID: OL414716). Аминокислотные замены по сравнению с наиболее близкородственным штаммом Senegal (GenBank ID: MF510857) располагались в неструктурной части генома, большинство в белках NS3 и NS5.

При анализе множественного выравнивания различных штаммов вируса Зика обнаружено, что большинство африканских вариантов вируса Зика имеют делецию в белке E. Эти характерные делеции у некоторых африканских штаммов вируса Зика расположены в районе 153-162 а.о. белка E и приводят к

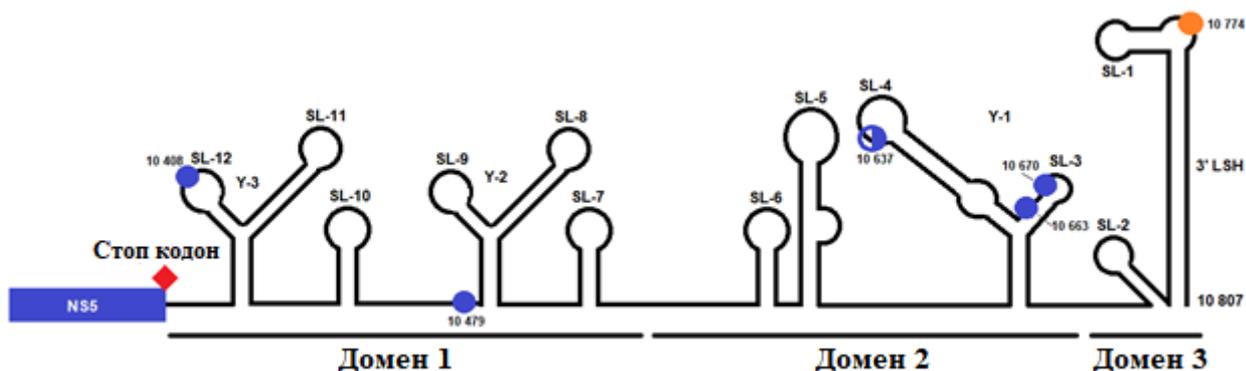
исчезновению одного из потенциальных сайтов гликозилирования белка E вируса Зика. Однако у выделенного штамма Faranah/18 вируса Зика сайт гликозилирования сохранен, что указывает на его уникальность (Рисунок 5). Интересно, что все штаммы, которые имели делецию в регионе белка E, подвергались пассированию в мозге мыши. Следовательно, обнаруженный факт может быть свидетельством существования процесса адаптации вируса Зика к новому виду хозяина (человек) и требует дальнейших исследований.



**Рисунок 5.** Выравнивание аминокислотной последовательности фрагментов белка E вируса Зика в регионе потенциального сайта гликозилирования.

Было произведено моделирование вторичной структуры 3' UTR РНК, адаптированного к клеткам С6/36 вируса Зика штамма Faranah/18. Длина 3' UTR РНК штамма Faranah/18 составила 431 нуклеотид, а вторичная структура 3' UTR оказалась консервативной для разных генотипов вируса Зика (Рисунок 6). Две нуклеотидные замены были обнаружены в SL-2 структуре 3' LSH, повлекшие увеличение свободной петли. Эта структура взаимодействует с белком NS2a, в котором также была обнаружена одна аминокислотная замена по сравнению со штаммом Senegal. Соответственно замены в SL-2 и NS2a могут оказаться критическими для взаимодействия и напрямую повлиять на свойства вируса Зика.

Кроме этого, было обнаружено, что 3' UTR содержит пять сайтов UAG для связывания с белком MSI1, который опосредствует нейротропность вируса Зика (Schneider A.V., et al., 2019). Позиции 10408, 10479, 10663 и 10670 содержат сайты UAG, характерные для всех генотипов вируса Зика. Однако в положении 10637 у штамма Faranah/18 вируса Зика и азиатско-американских штаммов отсутствует сайт связывания MSI1, который есть во всех других штаммах африканского генотипа. В противоположность этому, в позиции 10774 штамм Faranah/18 вируса Зика и азиатско-американские штаммы имеют дополнительные сайты UAG.



**Рисунок 6.** Расположение сайтов связывания MSI1 во вторичной структуре 3' UTR штамма Faranah/18 вируса Зика. Сайты MSI1 общие для азиатских и африканских линий отмечены синим кругом; сайт, относящийся к азиатской линии - оранжевым кругом.

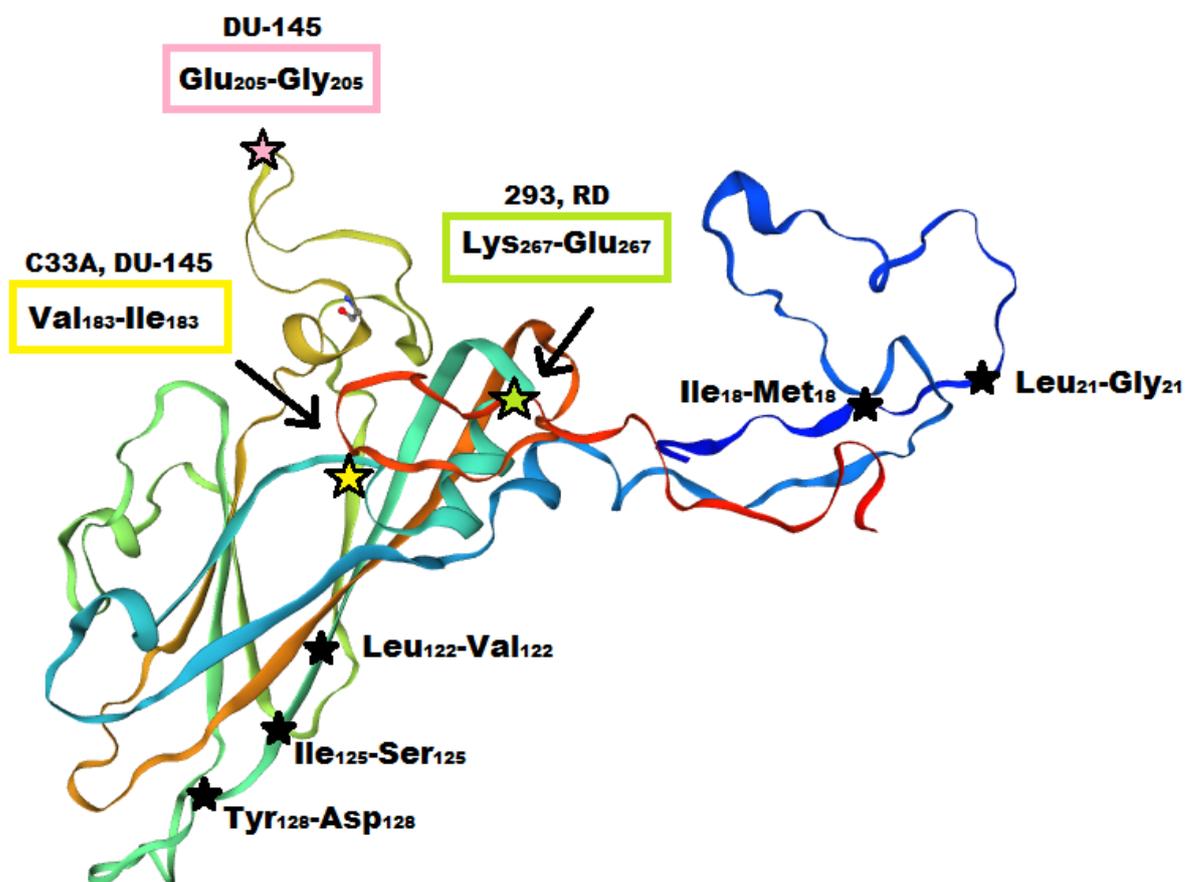
Изменение местоположения (с 10637 до 10774) сайтов MSI1 у штамма Faranah/18 вируса Зика может указывать на усиление нейротропности вируса. По этой причине требуется дальнейшее изучение данного штамма для того, чтобы определить, приводит ли модификация в MSI1 вируса Зика к нейрональному ослаблению или утяжелению течения инфекции вируса Зика. Сходство сайта MSI1 у штамма Faranah/18 с азиатскими/американскими изолятами может указывать на существование положительного отбора во время эволюции и адаптации вируса Зика.

### 3.3 Лабораторная адаптация вируса ЕСНО 3 к различным культурам клеток

Вирус ЕСНО 3 штамм Sakhalin-11.293 (1-й пассаж на НЕК293 от изолята выделенного от человека в 2010 г., MG791864) был пассирован на культурах клеток почки эмбриона человека (НЕК293), рака шейки матки человека (С33А), рака предстательной железы человека (DU-145), рабдомиосаркомы человека (RD), аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7), эпидермоидного рака человека (A431). Обнаружено, что вирус обладает ограниченной способностью к репликации в культуре клеток A431 ( $10^2$  ТЦД<sub>50</sub>/мл) и абсолютно не реплицируется в культуре клеток MCF-7. При этом характерное цитопатическое действие вируса на клетки наблюдалось только на культурах клеток НЕК293 ( $10^9$  ТЦД<sub>50</sub>/мл), С33А ( $10^8$  ТЦД<sub>50</sub>/мл), DU-145 ( $10^8$  ТЦД<sub>50</sub>/мл) и RD ( $10^7$  ТЦД<sub>50</sub>/мл).

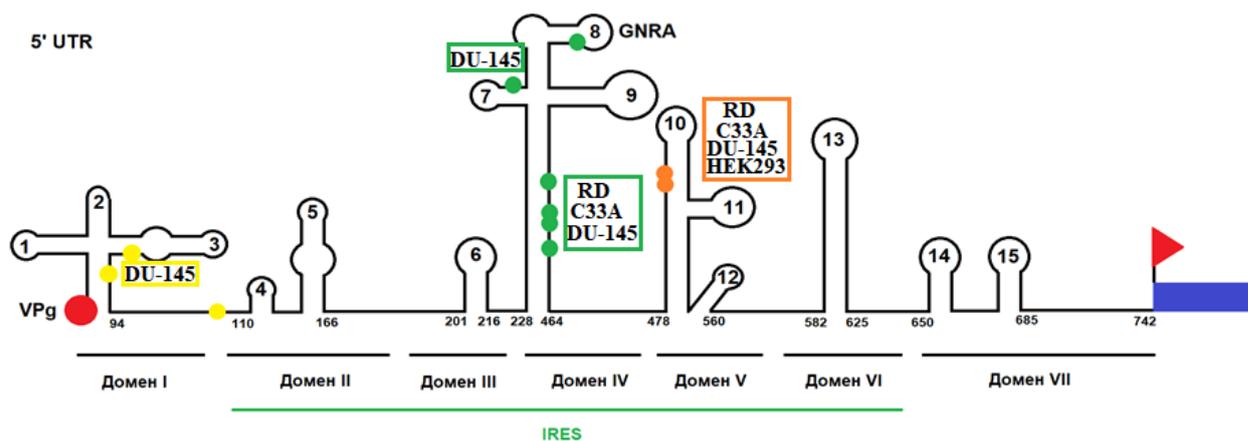
При сравнении полногеномных последовательностей с 3-го пассажа у варианта Sakhalin/10\_293 было обнаружено 12 аминокислотных и 25 нуклеотидных замен, у Sakhalin/10\_С33А 10 аминокислотных и 41 нуклеотидная, у Sakhalin/10\_RD 12 аминокислотных и 43 нуклеотидных, а у Sakhalin/10\_DU-145 13 аминокислотных и 90 нуклеотидных замен относительно исходного штамма

Sakhalin-11.293. Однако между 3-м и 8-м пассажем вируса ЕСНО 3 аминокислотных замен выявлено не было.



**Рисунок 7.** Трехмерная модель белка VP1. Звездами обозначены аминокислотные замены, произошедшие при адаптации вируса ЕСНО 3 штамма Sakhalin-11.293 к различным культурам клеток. Черными звездами обозначены аминокислотные замены, которые идентичны для всех 4-х культур клеток.

Наибольшее количество аминокислотных замен при культивировании вируса ЕСНО 3 произошло в белке VP1, который обеспечивает прикрепление вириона к клеткам-мишеням хозяина и вызывает интернализацию вириона (Рисунок 7). Выявлено 5 аминокислотных замен Ile<sub>18</sub>-Met<sub>18</sub>, Leu<sub>21</sub>-Gly<sub>21</sub>, Leu<sub>122</sub>-Val<sub>122</sub>, Ile<sub>125</sub>-Ser<sub>125</sub>, Tyr<sub>128</sub>-Asp<sub>128</sub> в VP1 и одна в 3D (RdRp), которые идентичны для всех четырех культур клеток. Замены Ile<sub>18</sub>-Met<sub>18</sub> и Leu<sub>21</sub>-Gly<sub>21</sub> происходят в N-концевом удлинении VP1, который непосредственно взаимодействуют с вирусной РНК. Замена Lys<sub>267</sub>-Glu<sub>267</sub> происходит у Sakhalin/10\_293 и Sakhalin/10\_RD в нескольких статьях было показано, замещение в этой позиции является критическим при адаптации энтеровирусов к мышинной модели (Zaini Z., et al., 2012).



**Рисунок 8.** Схематическое изображение вторичной структуры 5' UTR вируса ЕСНО 3. Цветными кружками обозначены нуклеотидные замены, происходящие при адаптации вируса к культурам клеток HEK293, C33A, RD и DU-145.

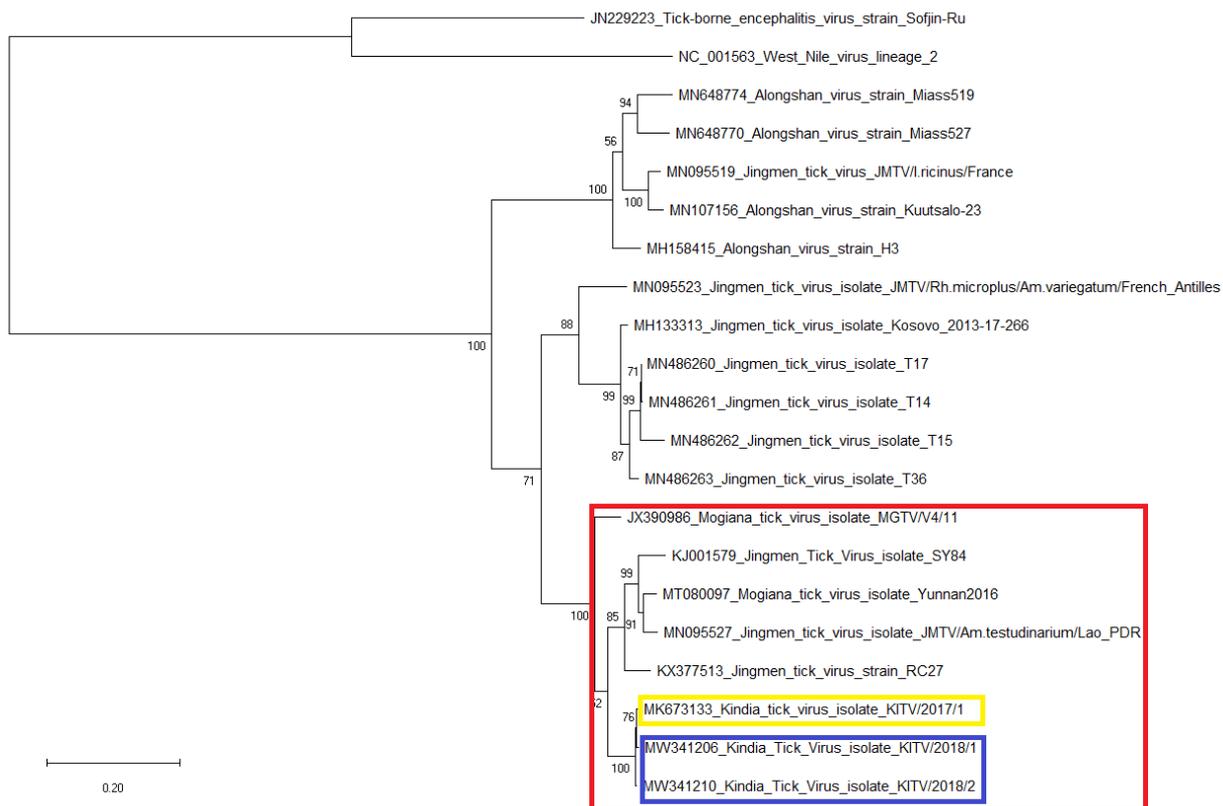
Было произведено моделирование вторичной структуры 5' UTR вируса ЕСНО 3 (Рисунок 8). Установлено, что структура представлена 7 доменами. Наибольшее количество нуклеотидных замен обнаружено в домене 4, который является частью IRES и ответственен за распознавание и связывание с белком РСВР. Две замены в позиции 314 (A-G) и 350 (C-T) у варианта Sakhalin/10\_DU-145 приводят к увеличению SL-8 (мотив GNRA). Однако генетическая изменчивость 5' UTR не приводит к глобальному изменению структуры, что может свидетельствовать о сильном селективном давлении в пользу сохранения вторичной структуры 5' UTR при адаптации вируса ЕСНО 3.

### 3.4 Лабораторная адаптация *Kindia tick virus* к культуре клеток Vero

*Kindia tick virus* (KITV) – новый многокомпонентный вирус группы *Jingmen tick viruses* (JMTV), переносимый клещами, занимает особое место среди флавиподобных вирусов, поскольку, в отличие от «классических» флавивирусов и флавиподобных вирусов, имеет многокомпонентный сегментированный ssRNA(+) геном.

В данном исследовании было проанализировано 68 клещей, снятых с крупного рогатого скота в г. Киндия, Гвинейской Республики (2018 г.). ПЦР анализом в 5 гомогенатах клещей (*Rhipicephalus spp.*) была обнаружена РНК KITV. Посредством пассирования на культуре клеток Vero было выделено два штамма KITV/2018/1 и KITV/2018/2. Общая длина генома KITV составила ~ 11 100 нуклеотидов, что согласуется с размером генома «классических» флавивирусов. Филогенетический анализ позволил таксономически отнести KITV к флавиподобным вирусам группы JMTV семейства *Flaviviridae* (Рисунок 9). Штаммы KITV/2018/1 и KITV/2018/2 образуют отдельную геногруппу с ранее обнаруженным штаммом KITV/2017/1. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей штаммов KITV/2018/1 и KITV/2018/2 со штаммом

KITV/2017/1 составил 96-99%, а по аминокислотным последовательностям – 97-99%. Наиболее близкородственными к KITV (Гвинея) оказались штаммы Mogiana tick virus (MGTV) MGTV/V4/11 (Бразилия) и MGTV Yunnan2016 (Китай) с уровнем гомологии 91-95% и 83-89% по аминокислотной последовательности.

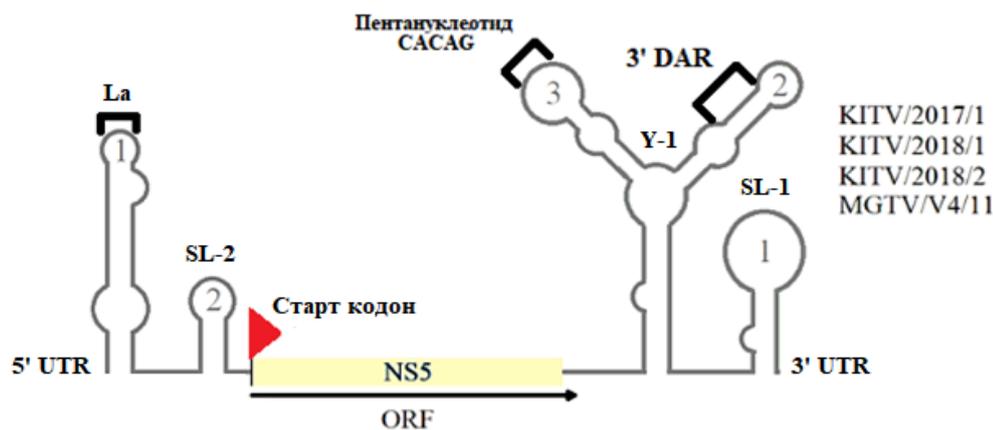


**Рисунок 9.** Филогенетический анализ вирусов группы JMTV по нуклеотидной последовательности полноразмерного сегмента 1.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей 5' и 3' UTR KITV и MGTV показало, что, в связи с наличием различных вставок, делеций и нуклеотидных замен, длины 5' и 3' UTR значительно различаются. Подобно штамму Faranah/18 вируса Зика, рассмотренному ранее, у штаммов KITV были обнаружены множественные сайты связывания белка MSI1. Однако 3' UTR KITV всех сегментов содержит PolyA хвост длиной 20 нуклеотидов, что не характерно для вирусов семейства *Flaviviridae*.

### Сегмент 1

Вторичная структура 5' UTR 1-го сегмента представлена двумя стеблевыми петлями SL-1 и SL-2, а 3' UTR - Y-1 структурой и SL-1 (Рисунок 10).



**Рисунок 10.** Схема строения геномной РНК сегмента 1 и вторичной структуры 5' и 3' UTR KITV.

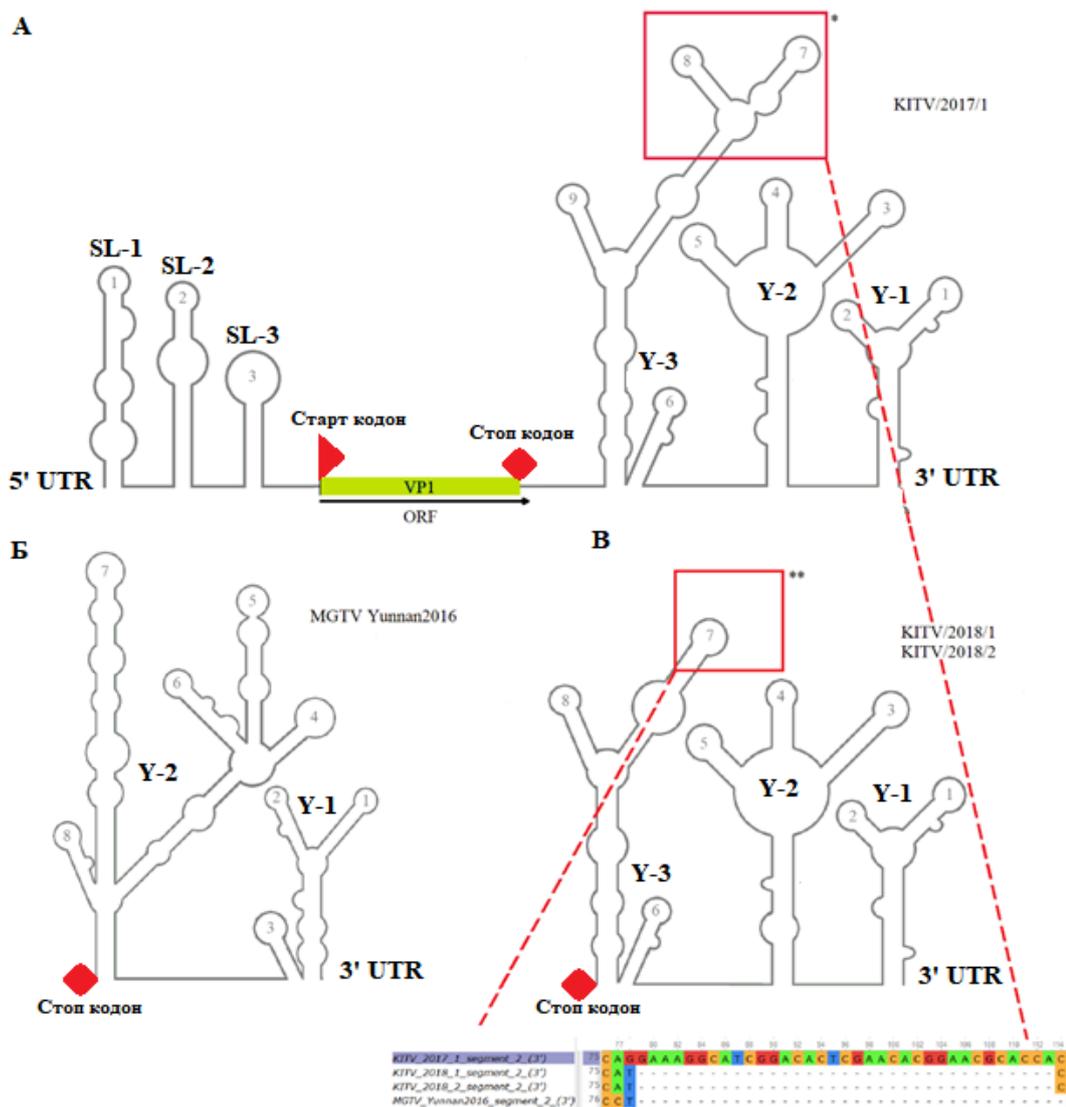
В Y-1 3' UTR обнаружен высококонсервативный флавивирусный пентануклеотид 5'-CACAG-3'. В SL-1 5' UTR содержится инвертированная последовательность GTGC, которая является сайтом связывания белка La. Через 111 нуклеотидов после старт кодона AUG располагается последовательность CCAGG (5' DAR). В 3' UTR через 50 нуклеотидов после стоп кодона обнаружена последовательность CCTGG (3' DAR). Регионы 5' DAR - 3' DAR участвуют в процессе циклизации генома. Удаленное расположение региона 5' DAR приводит к появлению трех стеблевых петель (SL-3, SL-4, SL-5) и Y-структуры. Это может указывать на существование более сложного механизма репликации генома многокомпонентных сегментированных флавиоподобных вирусов.

#### *Сегмент 2*

Вторичная структура 5' UTR 2-го сегмента представлена тремя SL, а 3' UTR – тремя Y структурами (Рисунок 11). Данный сегмент также имеет регион связывания с La и районы 5' DAR - 3' DAR. При помощи многократного выравнивания нуклеотидных последовательностей было выявлено, что в 3' UTR имеются два протяженных повтора в районе формирования Y-3, идущих друг за другом, длиной 40 нуклеотидов. Появление второго повтора наблюдается только у штамма KITV/2017/1. У штаммов KITV/2018/1 и KITV/2018/2 в 3' UTR обнаружена делеция в 35 нуклеотидов в районе второго повтора. Это приводит к исчезновению пентануклеотида 5'-CACAG-3' и видоизменению Y-3 (Рисунок 11). Также обнаружено, что 5' и 3' UTR сегмента 2 содержат три гомологичные последовательности по 10-11 нуклеотидов.

#### *Сегмент 4*

Вторичная структура 5' UTR 4-го сегмента представлена SL-1, SL-2 и SL-3, а 3' UTR Y-1 и Y-2. В 5' UTR и 3' UTR не обнаружено функциональных регионов характерных для флавивирусов.



**Рисунок 11.** Схема строения геномной РНК сегмента 2 и вторичной структуры 5' и 3' UTR KITV. А) для штамма KITV/2017/1 Б) для штамма MGTV Yunnan2016. В) для штаммов KITV/2018/1, KITV/2018/2.

Было дополнительно произведено сравнение особенностей устройства 5' и 3' UTR KITV со штаммами Tintin/Kankan/Guinea/2018 и Sabadou/Kankan/Guinea/2018 вируса Нгари (NRIV) с сегментированным ssRNA(-) геномом. Установлено, что у KITV, как и у NRIV нетранслируемые регионы РНК обладают более высокой консервативностью по сравнению с кодирующей частью генома, а 5' UTR меньше по длине, чем 3' UTR. Однако для 5' и 3' UTR штаммов Tintin/Kankan/Guinea/2018 и Sabadou/Kankan/Guinea/2018 NRIV характерно наличие концевых комплиментарных участков, приводящих к образованию структуры «Panhandle» у ортобуньявирусов, чего не обнаружено для штаммов KITV/2018/1 и KITV/2018/2. Это указывает на принципиально разный процесс реализации генетической информации у этих двух вирусов с сегментированным геномом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее в ряде исследований изучались генетические вариации, происходящие во время адаптации вирусов с ssRNA(+) геномом к позвоночным и беспозвоночным хозяевам (Coffey L.L., et al., 2013; Villordo S.M., et al., 2016). Однако на данный момент до сих пор мало что известно о вариациях функциональных вторичных структур нетранслируемых регионов РНК, которые работают как цис-действующие элементы во время репликации, трансляции вирусного генома и адаптации вирусов к клетке хозяина.

В ходе данной работы были исследованы механизмы изменчивости геномной РНК при культивировании *in vitro* нескольких ssRNA(+) вирусов, в частности, основной упор сделан на вариабельность 5' и 3' UTR. Для анализа были выбраны флавивирусы (вирус клещевого энцефалита и вирус Зика) и энтеровирус ЕСНО 3. Все выбранные вирусы в устройстве своего генома имеют одноцепочечную РНК положительной полярности. Однако реализация генетической информации происходит по-разному, что интересно при изучении механизмов адаптации вирусов. Дополнительно в данной работе были получены, депонированы и охарактеризованы две полногеномные последовательности штаммов KITV/2018/1 и KITV/2018/2 нового многокомпонентного флавиподобного Kindia tick virus. Впервые произведено моделирование вторичных структур 5' и 3' UTR РНК этого вируса. На основе полученных данных для вируса клещевого энцефалита и вируса Зика была произведена первичная аннотация функциональных регионов 5' и 3' UTR KITV. Дальнейшее изучение каждого в отдельности компонента 5' и 3' UTR позволит выстроить картину того, как реализуется генетическая информация новых многокомпонентных флавиподобных вирусов.

Таким образом результаты диссертационного исследования показывают, что при адаптации к хозяину вирусы способны редактировать свой геном. Происходит это, в частности, за счет появления мутаций в функционально важных районах вирусных белков и в 5' и 3' UTR геномной РНК вирусов. Гетерогенность геномной РНК напрямую сказывается на конформации пространственных структур 5' и 3' UTR, что может повлечь за собой изменение аффинности РНК-РНК и РНК-белковых взаимодействий важных для жизненного цикла вирусов.

## ВЫВОДЫ

1. При адаптации ВКЭ штамма С11-13 к культурам клеток РЕК, НЕК293, Neuro-2a происходят аминокислотные замены в неструктурных белках. Замена NS3<sub>1745</sub> (His → Gln) располагается в NS3 хеликазе и вызывает изменение заряда с положительного на нейтральный; замена NS5<sub>2925</sub> (Ser → Phe) в мотиве G RdRP NS5. Наблюдается увеличение длины V3' UTR со 107 до 144 нуклеотидов и модификация Y-3 структуры. У ВКЭ штамма Tomsk-PT122 в

- районе формирования Y-3 структуры обнаружена вставка из фрагментов вирусных белков E и NS4a и модифицированная 3' LSH без пентануклеотида 5'-CACAG-3'.
2. В геноме вируса Зика штамма Faranah/18 не обнаружено нуклеотидных замен в кодирующей части генома при культивировании на Vero E6, HEK293, C6/36. У исходного штамма Faranah/18 и его адаптированных вариантов отсутствует делеция в сайте гликозилирования белка E характерная для изолятов африканского генотипа. В структуре SL-2 3' UTR имеются две нуклеотидные замены. Обнаружено пять сайтов связывания с белком MSI1 с нетипичным для африканского генотипа расположением.
  3. Культивирование вируса ECHO 3 штамма Sakhalin-11.293 на культурах клеток HEK293, C33A, DU-145, RD, MCF-7, A431 индуцирует изменчивость геномной РНК (25-90 нуклеотидных замен). Наиболее вариабельным является белок VP1. Замена Lys<sub>267</sub>-Glu<sub>267</sub>, происходящая у вариантов Sakhalin/10\_293 и Sakhalin/10\_RD, возможно является ключевой генетической детерминантой адаптации вируса к новым типам клеток. Две замены в позиции 314 (A-G) и 350 (C-T) у варианта Sakhalin/10\_DU-145 приводят к расширению SL-8 мотива GNRA.
  4. Анализ полногеномных последовательностей штаммов KITV/2018/1 и KITV/2018/2 показал, что уровень гомологии составляет 96-99% с KITV/2017/1 по аминокислотной последовательности. Штаммы KITV филогенетически кластеризуются вместе с MGTV из группы JMTV и таксономически KITV может быть отнесен к неклассифицированным флавиподобным вирусам семейства *Flaviviridae*.
  5. Впервые произведено моделирование вторичной структуры 5' и 3' UTR РНК KITV. В 5' и 3' UTR различных сегментов KITV обнаружены характерные для флавивирусов регионы: 5' DAR и 3' DAR, высококонсервативный пентануклеотид 5'-CACAG-3', регион связывающий белок La, сайты UAG (от 2 до 6 у каждого сегмента) для связывания с белком MSI1. 3' UTR всех сегментов KITV полиаденилирован. Нуклеотидные последовательности 5' и 3' UTR сегмента 2 содержат три гомологичных последовательности по 10-11 нуклеотидов. 3' UTR сегмента 2 штамма KITV/2017/1 содержит два последовательных повтора по 40 нуклеотидов, образующих Y-3 структуру. Делеция в 35 нуклеотидов во втором повторе 3' UTR 2-го сегмента штаммов KITV/2018/1 и KITV/2018/2 приводит к модификации Y-3 структуры.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Список статей в рецензируемых научных журналах**

1. Makenov M.T., Toure A.H., Bayandin R.B., Gladysheva A.V., Shipovalov A.V., Boumbaly S., Sacko N., Korneev M.G., Yakovlev S.A., Zhurenkova O.B., Grigoreva Y.E., Fyodorova M.V., Radyuk E.V., Morozkin E.S., Boiro M.Y., Matsvay A.,

- Khafizov K., Karan L.S. Ngari virus (Orthobunyavirus, Peribunyaviridae) in ixodid ticks collected from cattle in Guinea // *Acta Trop.* – 2021. – V. 214. – P. 105790. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105790
2. 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. – V. 55. – №. 4. – P. 448-457. DOI: 10.1007/s11262-019-01672-0
  3. 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 // *Arch Virol.* – 2017. – V. 162. – №. 10. – P. 3151-3156. DOI: 10.1007/s00705-017-3442-x

### Препринт

1. **Gladysheva A.V.**, Svyatchenko V.A., Bayandin R.B., Shvalov A.N., Boumbaly S., Boiro M.Y., Karan L.S., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Complete Genome Sequence of Unusual Strain of Zika Virus From West Africa // PREPRINT available at Research Square. – 2022. DOI: 10.21203/rs.3.rs-1203528/v1

### Список тезисов в рецензируемых сборниках научных конференций

1. **Гладышева А.В.**, Баяндин Р.Б., Легостаев С.С., Швалов А.Н., Протопопова Е.В., Терновой В.А., Локтев В.Б. Обнаружение и генетическая характеристика нового многокомпонентного вируса Kindia Tick Virus в клещах на территории Гвинеи // XIII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы». — 2021. — С. 42.
2. Баяндин Р.Б., **Гладышева А.В.**, Протопопова Е.В., Макенов М.Т., Карань Л.С., Святченко В.А., Швалов А.Н., Терновой В.А., Локтев В.Б. Изоляция и генетическая характеристика двух штаммов вируса Нгари выявленных в Гвинеи // XIII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы». — 2021. — С. 31-32.
3. Гладышева А.А., **Гладышева А.В.**, Терновой В.А., Локтев В.Б. Характеризация полногеномных последовательностей, моделирование и анализ вторичных структур 5'-3' UTRs нового многокомпонентного вируса Kindia tick virus // VIII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio – 2021»: Вирусология. — 2021. — С. 197-199.
4. **Гладышева А.В.**, Баяндин Р.Б., Протопопова Е.В., Святченко В.А. Изоляция, характеристика и филогенетический анализ двух новых штаммов вируса Нгари, обнаруженных в иксодовых клещах в Гвинеи // VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio – 2020»: Молекулярная биология. — 2020. — С. 287-289.

5. **Гладышева А.В.**, Протопопова Е.В., Терновой В.А. Изучение свойств вируса ЕСНО 3 при его адаптации к различным культурам клеток // 6-я Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов «OpenBio-2019»: Вирусология. – 2019. – С. 335-338.
6. **Гладышева А.В.**, Баяндин Р.Б., Святченко В.А. Генетическая характеристика штамма вируса Зика, изолированного на территории Гвинейской Республики // 6-я Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов «OpenBio-2019»: Вирусология. – 2019. – С. 339-342.
7. **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 // 23-я Международная школа-конференция молодых ученых «Биология-наука 21 века»: Микробиология и вирусология. – 2019. – С. 207.
8. **Гладышева А.В.**, Терновой В.А., Пономарева Е.П., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Швалов А.Н., Коновалова С.Н., Чаусов Е.В., Локтев В.Б. Изучения механизмов адаптации ВКЭ к различным типам клеток // V Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов «OpenBio-2018»: Молекулярная биология. – 2018. – С. 262-265.
9. **Гладышева А.В.**, Терновой В.А., Пономарева Е.П., Микрюкова Т.П., Протопопова Е.В., Швалов А.Н., Коновалова С.Н., Чаусов Е.В., Локтев В.Б. Вариабельность 3' UTR геномной РНК вируса клещевого энцефалита и изменчивость 3' UTR при культивировании в различных типах клеток // МНСК-2018: Физические методы в естественных науках. – 2018. – С. 6.
10. **Гладышева А.В.**, Пономарева Е.В., 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 // Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов «OpenBio-2017»: Вирусология. – 2017. – С. 136.
11. **Гладышева А.В.** Картирование адаптивных замен относительно трехмерной структуры белков вируса клещевого энцефалита при пассировании на различных культурах клеток // МНСК-2017: Физические методы в естественных науках. – 2017. – С. 77.
12. 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 // IX Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням. – 2017. – С. 222.