

ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕНОМЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© 2024 г. В. А. Терновой^а, Е. П. Пономарева^{а, *}, Е. В. Протопопова^а, Н. Л. Тупота^а,
Т. П. Микрюкова^{а, †}, В. Б. Локтев^а

^аГосударственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, 630559 Россия

*e-mail: ponomareva_ep@vector.nsc.ru, ponomareva-eugenia2014@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.05.2023 г.

После доработки 19.10.2023 г.

Принята к публикации 29.10.2023 г.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) штамм С11-13 (GenBank Acc. No. OQ565596) сибирского генотипа ранее был изолирован из мозга умершего пациента. Варианты ВКЭ С11-13, полученные на 3 и 8 пассажах на клетках SPEV, использовали для проведения серии пассажей через мозг белых мышей. На всех этапах, используя технологию высокопроизводительного секвенирования, анализировали полногеномные последовательности вируса. В результате анализа выявлена 41 точечная нуклеотидная замена и 12 аминокислотных замен, которые преимущественно были локализованы в генах неструктурных белков NS3 и NS5 ВКЭ (GenBank Acc. No. MF043953, OP902894, OP902895). После трех пассажей через мозг мышей идентифицированы реверсивные нуклеотидные и аминокислотные замены, характерные для изолята вируса С11-13, выделенного от человека, но замещенные при последующих 8 пассажах на линии клеток SPEV. Также произошло увеличение длины 3'-нетранслируемой области (3'-НТО) вирусного генома на 306 нуклеотидов. В последовательности 3'-НТО, содержащей элементы Y3 и Y2, обнаружены несовершенные L- и R-повторы, которые могут участвовать в ингибировании активности клеточной РНКазы XRN1 и тем самым в формировании субгеномных флавиовирусных РНК (sfRNA). Для полученных вариантов ВКЭ зарегистрирован высокий уровень репродукции как на культуре клеток, так и в мозге белых мышей. Изменения генома ВКЭ, выявленные в ходе последовательных пассажей, скорее всего, обусловлены значительной генетической изменчивостью вируса, что обеспечивает его эффективную репродукцию в различных видах хозяев и широкое распространение в разных климатических зонах.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, вирусный геном, 3'-нетранслируемая область, нуклеотидные замены, адаптационные замены, реверсивные мутации, культура клеток, мыши

DOI: 10.31857/S0026898424020093, **EDN:** NILAFS

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) — возбудитель одноименного заболевания, которое часто приводит к тяжелым поражениям центральной нервной системы, включая летальные исходы [1, 2]. ВКЭ эндемичен во многих регионах Северной Евразии, а в последнее время наблюдается его появление в новых географических регионах, что связано, по всей вероятности, с изменением ареалов иксодовых клещей — переносчиков ВКЭ [3–5].

Вирус клещевого энцефалита (*Orthoflavivirus encephalitis*) относится к семейству *Flaviviridae*, род *Orthoflavivirus* (<https://ictv.global/taxonomy>)

[2]. Этот род включает относительно просто устроенные РНК-содержащие сферические оболочечные вирусы размером 40–60 нм. Геном ВКЭ представлен одноцепочечной (+)РНК длиной 9 200–11 500 нуклеотидов. Геномная РНК кодирует один полипротеин, который подвергается процессингу вирусными и клеточными протеазами с образованием трех структурных и семи неструктурных вирусных белков. Геномная флавиовирусная РНК фланкирована 5'- и 3'-нетранслируемыми областями (НТО), принципиально важными для инициации вирусной репликации и формирования репликативного комплекса с участием вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы [6, 7]. Принято считать, что 5'- и 3'-НТО определяют скорость репликации вируса, полярность РНК, инкапсидацию генома и устойчивость к РНКазам [8–11].

Сокращения: 3'-НТО — 3'-нетранслируемая область; ВКЭ — вирус клещевого энцефалита; ОТР — открытая рамка считывания.

ВКЭ подразделяется на три основных генотипа: европейский, дальневосточный и сибирский [12]. Недавно высказано предложение о выделении гималайского и байкальских генотипов ВКЭ [4, 13–15]. Уровень гомологии для различных генотипов ВКЭ составляет 82–85% для полногеномных нуклеотидных последовательностей и 92–96% для аминокислотных [16, 17]. Генетические различия изолятов ВКЭ существенны даже в рамках одного генотипа вируса. Так, высокопатогенный для человека штамм Глубинное/2004 дальневосточного генотипа отличается от прототипных штаммов 205 и Софьин 53–57 аминокислотными заменами [16].

Высокая генетическая изменчивость ВКЭ позволяет высказать гипотезу о том, что генетический потенциал ВКЭ позволяет ему существенно изменяться и адаптироваться к новым типам клеток и видам хозяев. Это обеспечивает ВКЭ возможность легко интродуцироваться в новые биотопы. Так, ВКЭ обнаружен более чем у 40 видов диких птиц в Томске и его пригородах [18–20].

Нами исследована генетическая вариабельность (изменчивость) высокопатогенного для человека штамма С11-13 сибирского генотипа ВКЭ в процессе его адаптации к культивированию в лабораторных условиях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусный препарат. Штамм С11-13 ВКЭ сибирского генотипа, выделенный в 2013 году из мозговой суспензии человека, умершего от клещевого энцефалита в Мошковском районе Новосибирской области, описан ранее [21]. Все эксперименты с вирусным материалом проводили с соблюдением правил биобезопасности, регламентированных в СанПиН 3.3686-21.

Клеточная линия. Культура клеток SPEV была получена из банка клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и поддерживалась на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “Gibco”, США) и 80 мкг/мл сульфата гентамицина.

Лабораторные животные. В работе использовали 2–3-дневных сосунков беспородных мышей обоего пола массой 2–3 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Все процедуры с животными проводили в соответствии с действующими документами: «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (<https://docs.cntd.ru/document/456016716>) и «Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных» [22].

Проведение серийных пассажей ВКЭ. Аутбредным мышам интрацеребрально вводили 10 мкл вирусной суспензии, полученной после 3 и 8 пассажей ВКЭ С11-13 на культуре клеток SPEV [21]. Для последующих пассажей использовали 10%-ную мозговую суспензию, полученную от мышей на 3–4 сутки после заражения, в 50 мМ боратном буфере (pH 9.0), содержащем 150 мМ хлористого натрия. Исследованные в работе варианты ВКЭ представлены в табл. 1.

Выделение и титрование ВКЭ. Вирусосодержащий образец наносили на монослой культуры клеток SPEV и оставляли на 1 ч при комнатной температуре, после чего вносили среду DMEM, содержащую 2% FBS и 80 мкг/мл сульфата гентамицина. Затем инкубировали при 37 °С в течение 7 сут. Образцы, содержащие ВКЭ, титровали на клеточной культуре SPEV, используя 96-луночные культуральные микропланшеты. Концентрацию вируса оценивали по тканевому цитопатическому действию (ТЦПД₅₀/мл) на клетках SPEV и методом иммуноферментного анализа. Вирус хранили аликвотами при –40 °С. Биологический титр вируса рассчитывали по Керберу [23].

Иммуноферментный анализ. ВКЭ в культуральной среде определяли методом иммуноферментного анализа на 96-луночных планшетах (“Nunk”, Дания), сенсibilизированных мышинными моноклональными анти-ВКЭ-антителами 10Н10 (“Вектор”, Россия), как описано ранее [24]. Связавшийся с планшетом вирус детектировали с использованием меченных биотином мышинных моноклональных анти-ВКЭ-антител

Таблица 1. Исследованные варианты ВКЭ С11-13

Название штамма ВКЭ	История	Источник	GenBank Acc. No.
C11-13_1p	1 пассаж на клетках SPEV	Эта работа	OQ565596
C11-13_3p	3 пассажа на клетках SPEV	Описано ранее [21]	KP644245
C11-13_8p	8 пассажей на клетках SPEV	Эта работа	MF043953
C11-13_3/3m	C11-13_3 → 3 пассажа на мышах	Эта работа	OP902894
C11-13_8/3m	C11-13_8 → 3 пассажа на мышах	Эта работа	OP902895

ЕВ1 (“Вектор”) и стрептавидин-пероксидазного конъюгата (“ICN”, США).

Выделение РНК и ПЦР с обратной транскрипцией. Суммарную нуклеиновую кислоту выделяли из вирусосодержащего материала с использованием набора реагентов ExtractRNA (“Евроген”, Россия); для построения первой цепи ДНК использовали набор MMLV RT kit (“Евроген”) по инструкциям производителя. Для проведения ПЦР использовали набор Био-Мастер LR HS-ПЦР (“BioLabMix”, Россия) и олигонуклеотидные праймеры, специфичные к РНК ВКЭ, описанные ранее [6, 16, 24]. ПЦР проводили на амплификаторе T100 (“Bio-Rad Laboratories”, США) в следующем режиме: 5 мин при 94 °C, 40 циклов [10 с при 94 °C, 20 с при 58 °C, 30 с при 72 °C], 7 мин при 72 °C.

Определение нуклеотидных последовательностей по Сэнгеру и с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS). Секвенирование ДНК-фрагментов выполняли по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI 3130×1 (“Hitachi”, Япония). Полногеномную нуклеотидную последовательность определяли с использованием технологии NGS. Для синтеза первой цепи кДНК использовали модуль NEBNext® Ultra Directional, для синтеза второй цепи — NEBNext Ultra Directional RNA Second Strand Synthesis Module (“NEB”, США). Подготовленные ДНК-библиотеки анализировали на приборе MiSeq (“Illumina”, Великобритания). Для удаления адаптеров и повторного чтения использовали SAMtools (версия 0.1.18; <https://www.htslib.org/download>). Протяженные последовательности были собраны *de novo* с помощью ассемблера MIRA (версия 4.9.6; <https://linux-packages.com/ubuntu-impish-indri/package/mira-assembler>). Обработку результатов проводили с использованием специализированных программных пакетов MEGA 7/10 (“PSU”, США) и Lasergen 7 (“Invitrogen”, США).

Для поиска несовершенных повторов в вирусных геномах использовали диагональ матрицы локального сходства нуклеотидной последовательности Unipro UGENE:v45.1 (<https://ugene.net/ru/download-all.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетический анализ вариантов штамма C11-13 ВКЭ после пассажей in vitro — in vivo

Ранее был получен набор вариантов ВКЭ после нескольких последовательных пассажей штамма C11-13 ВКЭ на культурах перевиваемых клеток SPEV, HEK293, Neuro-2a [21]. Первые аминокислотные замены были обнаружены в не-

структурных вирусных белках после трех пассажей. После восьми пассажей количество аминокислотных замен уже не изменялось. Варианты ВКЭ при пассажах на клетках SPEV накопили 9 аминокислотных замен, на культуре клеток HEK293 — 14; наименьшее число было обнаружено на клетках Neuro-2a — всего 4 замены.

В проведенном нами исследовании штамм C11-13 ВКЭ после 3 и 8 пассажей на клетках SPEV трижды пассировали через мозг аутобредных белых мышей с последующим полногеномным секвенированием полученных изолятов: C11-13_3/3m и C11-13_8/3m соответственно (табл. 2). В последовательности вирусного генома идентифицирована 41 нуклеотидная замена, ассоциированная с адаптацией ВКЭ к клеткам SPEV с последующими пассажами через мозг мыши. Большинство нуклеотидных замен было в генах, кодирующих неструктурные белки вируса. Только 9 были картированы в генах белков капсида (С) и оболочки (Е). Наибольшее число замен (14) обнаружено в гене неструктурного белка NS5 при значении 0.12 для соотношения несинонимичных/синонимичных нуклеотидных замен (dN/dS). В генах неструктурных белков обнаружено 32 нуклеотидные замены, из которых 9 приводили к изменению кодируемой аминокислоты. Максимальное число аминокислотных замен идентифицировано в белках NS3 и NS5: 4 и 2 соответственно. Высокое значение dN/dS, равное 2.0, обнаружено в белке NS1, а минимальное (0.12) — в NS5. Соотношение dN/dS имело тенденцию к снижению при пассажах ВКЭ через мозг белых мышей в сравнении с культурами клеток.

Интересно отметить, что после трех пассажей вируса через мозг мышей у вариантов C11-13_3/3m и C11-13_8/3m обнаружено 7 реверсивных аминокислотных замен. Эти замены характерны для изолята вируса C11-13, выделенного от человека, но были замещены при последующих пассажах вируса (8 пассажей) на клетках SPEV. При адаптации от клеток SPEV к новому хозяину — мышам произошли замещения в белках: Е (Q367R), NS1 (N1067D), NS2b (R1488Q), NS3 (D1511N и F1906S) и NS5 (M2561K и S2925F).

Следует заметить, что в гене белка NS5 обнаружены реверсивные нуклеотидные замены: два блока по три синонимичных и две несинонимичные, — а также 5 новых. Кроме того, обнаружены мутации в белках Е (D347N и H699Q) и NS3 (T1890S).

Репликативная активность всех полученных вариантов ВКЭ (C11-13_3p, C11-13_8p, C11-13_3/3m и C11-13_8/3m) по сравнению с исходным изолятом (C11-13_1p) существенно увели-

Таблица 2. Нуклеотидные и аминокислотные замены в геноме штамма C11-13, адаптированного к клеткам SPEV, выявленные после дополнительных пассажей через мозг аутбредных белых мышей

Ген ВКЭ	Нуклеотидные/ аминокислотные замены (Nt/AA) ^a	C11-13_1p	C11-13_8p	C11-13_3/3m	C11-13_8/3m	dN/dS ^b
<i>c</i>	Nt240-AA80/K	A	A	G	G	0/1
<i>e</i>	Nt1039-AA347/D→N	G	G	G	A	3/5 (0.6)
	Nt1100-AA367/Q→R	A	G	A	A	
	Nt1704-AA568/V	A	A	G	G	
	Nt1740-AA580/K	A	G	A	A	
	Nt1743-AA581/G	C	T	C	C	
	Nt1932-AA644/I	T	T	C	T	
	Nt2097-AA699/H→Q	C	C	C	G	
	Nt2379-AA793/E	A	A	G	G	
	Nt3199-AA1067/N→D	A	G	A	A	
<i>ns1</i>	Nt3498-AA1166/G	T	A	A	A	2/1 (2)
	Nt3502-AA1168/L→V	C	G	G	G	
	Nt3810-AA1270/F	C	T	T	T	
<i>ns2a</i>	Nt4044-AA1348/F	C	T	C	C	0/3
	Nt4090-AA1364/L	C	T	T	T	
	Nt4350-AA1450/E	G	G	G	A	
<i>ns2b</i>	Nt4463-AA1488/R→Q	G	A	G	G	1/1 (1)
	Nt4863-AA1621/D	G	A	G	G	
<i>ns3</i>	Nt4531-AA1511/D→N	G	A	G	G	4/6 (0.67)
	Nt4629-AA1543/H	T	T	C	T	
	Nt4635-AA1545/T	A	A	G	G	
	Nt5235-AA1745/H→Q	T	A	A	A	
	Nt5634-AA1878/I	T	T	C	C	
	Nt5658-AA1886/E	G	G	G	A	
	Nt5668-AA1890/T→S	A	A	A	T	
	Nt5697-AA1899/F	C	T	C	C	
	Nt5717-AA1906/F→S	T	T	C	C	
	Nt7685-AA2562/M→K	T	A	T	T	
<i>ns5</i>	Nt8562-AA2854/A	C	T	C	C	2/12 (0.12)
	Nt8586-AA2862/G	A	G	A	A	
	Nt8628-AA2876/Q	G	A	G	G	
	Nt8774-AA2925/S→F	C	T	C	C	
	Nt9003-AA3001/L	C	C	T	T	
	Nt9060-AA3020/E	A	A	G	G	
	Nt9126-AA3042/F	C	C	C	T	
	Nt9456-AA3152/L	G	A	A	A	
	Nt9514-AA3172/V	G	G	A	A	
	Nt9540-AA3180/R	A	A	A	G	
	Nt9744-AA3248/G	G	A	G	G	
	Nt9750-AA3250/A	C	T	C	C	
	Nt10170-AA3390/K	A	G	A	A	
	Число реверсий к исходному изоляту			18	20	

^aТемно-серым фоном выделены несинонимичные нуклеотидные замены и соответствующие им варианты ВКЭ с аминокислотными заменами; светло-серым фоном выделены синонимичные нуклеотидные замены.

^bОтношение несинонимичных/синонимичных нуклеотидных замен, в скобках — частное от деления.

чивалась после серийных пассажей на культуре клеток и через мозг животных. Так, после третьего пассажа штамма C11-13 на клетках SPEV (C11-13_3p) с появлением первых аминокислотных замен в NS3 (H1745Q) и NS5 (S2925F), титр вируса увеличился на 2 порядка: с 10^6 до 10^8 ТЦПД₅₀/мл [21]. После восьмого пассажа вируса на клетках SPEV (C11-13_8p) и для всех вариантов вируса в 10%-ном гомогенате мозга мышей после третьего пассажа на 7 сутки после заражения (C11-13_3/3m и C11-13_8/3m) титр вируса составил 10^8 ТЦПД₅₀/мл.

Размер генома и 3'-НТО в исследованных вариантах ВКЭ

При адаптации ВКЭ C11-13 к культивированию в лабораторных условиях обнаружено увеличение длины 3'-НТО (табл. 3). Ранее показано [7], что длина варибельного участка 3'-НТО генома штамма C11-13, выделенного из мозга человека (C11-13_1p), составляет 107 н. Нами показано, что после 8 пассажей на клетках SPEV (C11-13_8) этот район увеличился на 37 н., а при пассажах на мышах — на 306 н. относительно клинического изолята. Важно заметить, что консервативный участок 3'-НТО имел протяженность 320 н. во всех полученных вариантах вируса.

Вариабельность длины 3'-НТО ВКЭ описана для ряда лабораторных штаммов, относящихся к разным генотипам ВКЭ, и она достигала максимального размера в 767 нуклеотидов для европейского генотипа (штамм Neudoerfl) [25]. На рис. 1 приведено выравнивание 3'-НТО генома ВКЭ относительно штамма Neudoerfl. Увеличение размеров 3'-НТО произошло за счет встраивания идентичных фрагментов в последовательности LRS4 и LRS3 — в область энхансера варибельного участка. В геноме флавивирусов энхансер располагается между стоп-кодоном и промотором и охватывает как консервативный, так и варибельный участки 3'-НТО. По всей

вероятности, наблюдаемая инсерция приводит к восстановлению шпилек SL10–SL14, что повышает структурированность этой области. Схожая организации этого региона 3'-НТО также обнаружена у ВКЭ штамма PT-122 сибирского генотипа ВКЭ, изолированного из печени садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*) и секвенированного нами ранее (GenBank Acc. No. KM019545).

И хотя функция энхансера может быть не критичной для жизнеспособности вируса в экспериментальных условиях, она может играть важную роль в естественной среде и в процессе адаптации вируса к новым хозяевам.

Обнаружение и картирование несовершенных повторов в 3'-НТО

В 3'-НТО геномной РНК ВКЭ, в районе энхансера, идентифицированы две нуклеотидные последовательности длиной 60 н. с гомологией 57 % (рис. 2). Эти несовершенные повторы обнаружены с помощью программы диагонали матрицы локального сходства нуклеотидной последовательности (Unipro UGENE:v45.1) В результате были найдены несовершенные повторы длиной 60 нуклеотидов с гомологией 57 %. Аналогичские повторы с гомологией 52–57 % были найдены и для других вирусов (рис. 3). По осям X и Y расположена нуклеотидная последовательность, для которой проводили поиск несовершенных повторов. В частности, на рис. 2 использована прототипная последовательность штамма Glubinnoe/2004.

Важно заметить, что наличие аналогичных несовершенных повторов в 3'-НТО геномной РНК обнаружено нами для флавивирусов Повассан, Западного Нила, Кунджин, Денге серотипов 1 и 2, желтой лихорадки и омской геморрагической лихорадки, а также для вируса леса Семлики, относящегося к альфавирусам. Выровненные последовательности указанной области геномов этих вирусов приведены на рис. 3.

Таблица 3. Размер геномной РНК и 3'-НТО в исследованных вариантах штамма C11-13 ВКЭ

Штамм ВКЭ	Размер генома, н.	Длина 3'-НТО, н.		
		варибельный участок	консервативный участок	весь регион
C11-13_1p	10 801	107	320	427
C11-13_3p ^a	10 838	144	320	464
C11-13_8	10 838	144	320	464
C11-13_3/3m	11 107	413	320	733
C11-13_8/3m	11 107	413	320	733

^aОписано ранее [21].

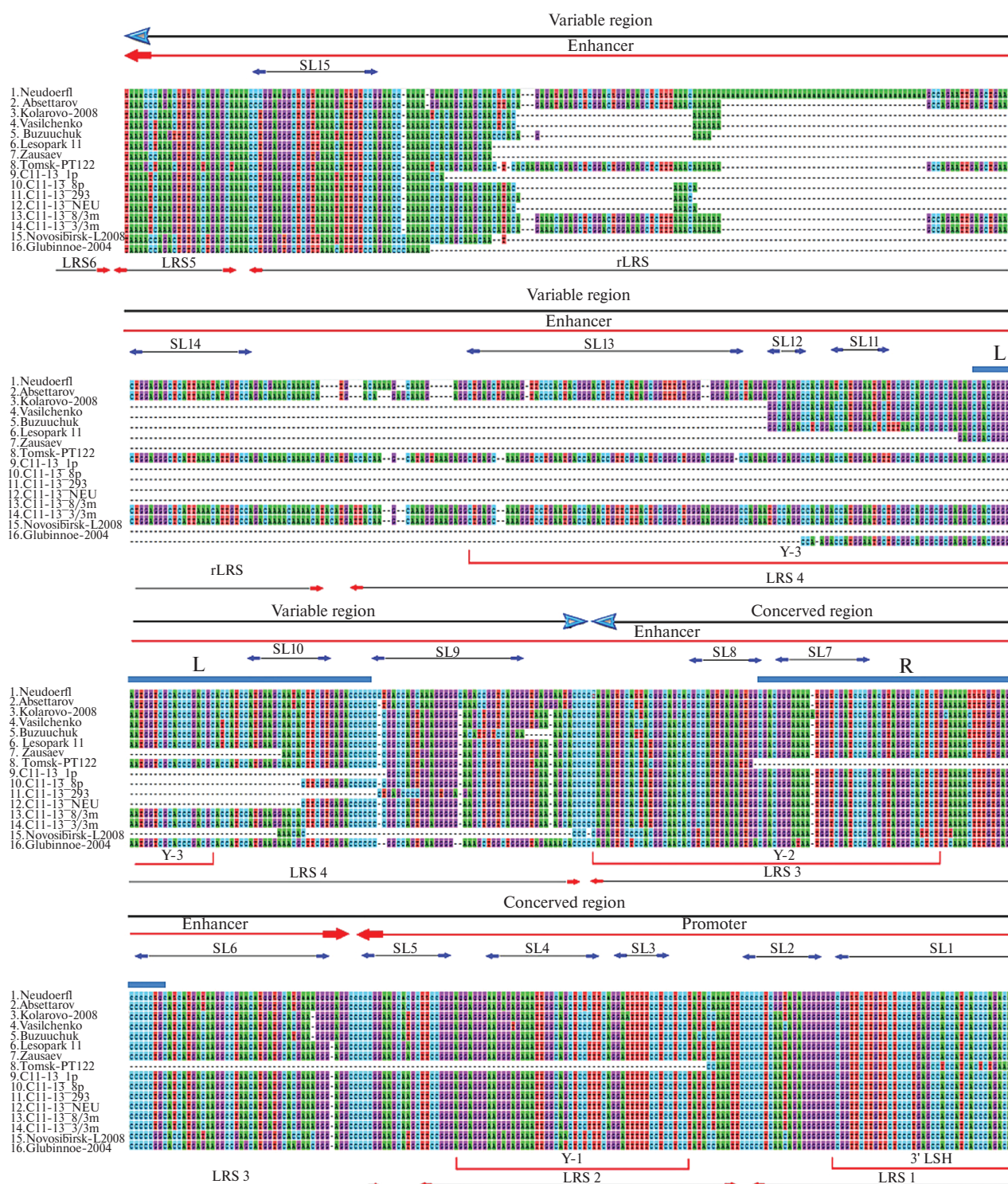


Рис. 1. Схема организации 3'-НТО ВКЭ. В качестве прототипов сравнения взяты: европейский генотип ВКЭ (1, 2), сибирский генотип (3–6) и дальневосточный генотип (7, 8, 15, 16). Под номерами 11 и 12 обозначены варианты штамма ВКЭ C11-13, полученные на нормальных клетках эмбриональных почек человека (HEK293) и нейронов мыши (Neuro-2a) соответственно (GenBank Acc. No. MF043954, MF043955 соответственно). Пунктиром обозначены делеции в 3'-НТО; L и R – несовершенные повторы геномной РНК ВКЭ (длина 60 н., идентичность 57 % относительно штамма Glubinnoe/2004 (DQ862460)); SL1–SL15 – структуры stem-loop (“петля-на-стебле”) в НТО; LRS1–LRS6 – длинные повторяющиеся последовательности (long repeat sequences); rLRS – район протяженных повторяющихся последовательностей (region of long repeat sequences); Y1–Y3 – Y-образные структуры НТО; 3'LSH – 3'-концевая длинная стабильная шпилька (long stable hairpin). Цветовая схема – общепринятая в программе MEGA 7/10 (“PSU”, США) для нуклеотидов аденин (A), тимин (T), цитозин (C) и гуанин (G): зеленый, красный, голубой и фиолетовый соответственно.

Факт наличия таких повторов в районе энхансера 3'-НТО, по-видимому, не случаен. Именно на этом участке нами зарегистрировано изменение длины геномной РНК и 3'-НТО для различных вариантов штамма С11-13 ВКЭ после последовательных пассажей на культуре клеток и через мозг белых мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Некоторые РНК-содержащие вирусы эффективно преодолевают видовой барьер, что обусловлено более высокой изменчивостью РНК-генома в сравнении с геномами ДНК-содержащих вирусов [26, 27]. Высокая частота возникновения мутаций у РНК-содержащих вирусов считается “отправной точкой”, которая облегчает репродукцию вируса в новом типе клеток или новом виде хозяина, то есть это структурная основа для их высокой трансмиссивности и широкого диапазона хозяев [28–30]. Многие флавивirusы, в том числе ВКЭ, распространены на обширных территориях и размножаются в различных видах беспозвоночных (комары и клещи) и позвоночных организмов [31]. Природные и климатические условия в природных очагах вирусных инфекций также могут существенно отличаться. Флавивirusы активно циркулируют в различных климатических зонах — от приполярных до экваториальных. Это значит, что они реплицируются в широком температурном интервале [18, 19]. Генетическая гетерогенность между генотипами ВКЭ составляет не менее 18%. В пересчете на полный геном ВКЭ это 2 000–2 200 нуклеотидов. Принято считать, что именно высокая генетическая изменчивость ВКЭ обеспечивает его циркуляцию в различных природных биотопах Северной Евразии и адаптацию к новым видам беспозво-

ночных и теплокровных хозяев при сохранении патогенного потенциала для человека [1].

В проведенном исследовании мы оценили генетическую вариабельность сибирского генотипа ВКЭ на примере высокопатогенного изолята С11-13 в процессе пассажей изолята из мозга погибшего человека на культуре клеток и через мозг аутбредных белых мышей. Для определения первичной структуры вирусного генома использовали технологию высокопроизводительного полногеномного секвенирования, что позволило проследить появление адаптационных мутаций в динамике.

Нуклеотидные замены появились в генах структурных и неструктурных белков ВКЭ уже через 3–8 пассажей вируса в культуре клеток SPEV и через 3 пассажа в мозге белых мышей. Это значит, что полевой (клинический) изолят ВКЭ быстро и эффективно адаптируется к новому хозяину; при этом большинство замен произошло в генах неструктурных белков и в кодируемых ими белках. Из идентифицированной нами 41 адаптационной мутации в геноме ВКЭ к генам структурных белков относилось только девять. Максимальное число нуклеотидных замен обнаружено в генах *ns3* и *ns5*. Аналогичная картина наблюдалась по мутациям в аминокислотных последовательностях: три замены в структурном белке Е и девять в неструктурных белках.

Ранее показано, что структурные белки флавивirusов — важные факторы вирулентности [31–33]. Считали, что белок Е играет ключевую роль в вирулентности ВКЭ [34]. Так, в ряде работ сообщалось, что изменения в структуре этого белка влияют на нейровирулентность и нейроинвазивность переносимых клещами флавивirusов [31, 35–37]. Некоторые из этих

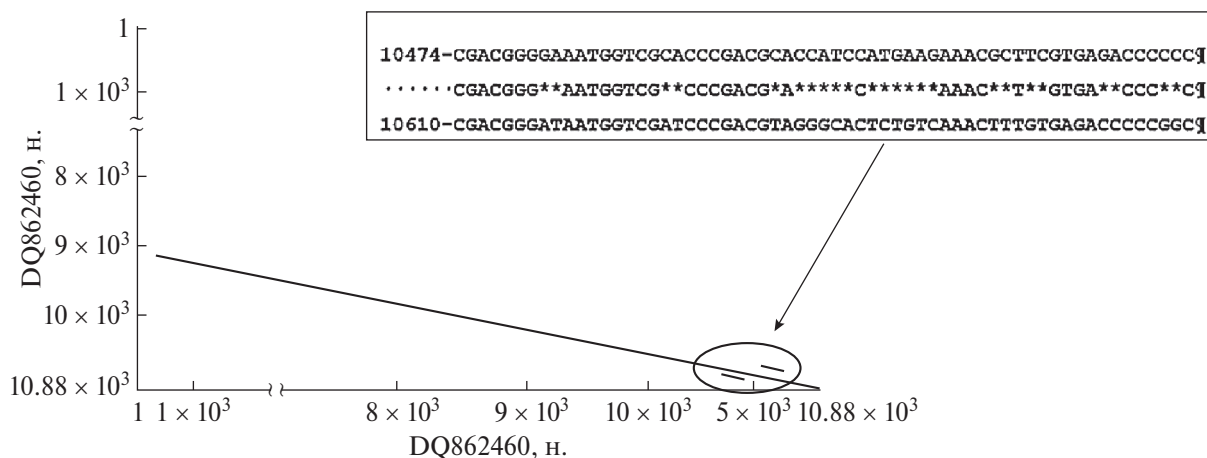


Рис. 2. Картирование несовершенных повторов в вариабельном участке 3'-НТО геномной РНК ВКЭ (прототипный штамм Glubinnoe/2004 (GenBank Acc. No. DQ862460)). Выполнено с помощью программы Unipro UGENE:v45.1 при длине сравниваемых последовательностей 60 нуклеотидов.

Рис. 3. Несовершенные повторы, выявленные для флави- и альфавирусов на переменном участке 3'-НТО геномной РНК. X и Y – координаты нуклеотидной последовательности, приведенной на диагонали матрицы в программе Unipro UGENE:v45.1 Уровень гомологии по данным Unipro UGENE:v45.1 несовершенных повторов составлял 52–57 %.

Нами выявлено значительное удлинение вариабельного участка 3'-НТО ВКЭ при пассажах через мозг белых мышей варианта, предварительно адаптированного к клеткам SPEV. Уве-

личение длины составило 306 н. для вариантов C11-13_3/3m и C11-13_8/3m. Ранее, в процессе серийных пассажей ВКЭ на клетках SPEV, Neuro-2A, HEK293, тоже были обнаружены короткие вставки в переменном районе 3'-НТО, хотя их длина была в интервале 22–37 н. [7, 21]. Известно, что 3'-НТО флавивирусов высокоструктурирована и содержит такие структуры, как петля-на-стебле, шпильки, гантелеобразные и Y-образные элементы [25, 30]. Как известно, 5'- и 3'-НТО обеспечивают взаимодействие геномной вирусной РНК с РНК-зависимой РНК-полимеразой, тем самым иницируя синтез новой вирусной РНК. Консервативный район 3'-НТО может быть ответственен за определение хозяйской специфичности флавивирусов. Недавно показано, что 3'-НТО является источником по меньшей мере двух видов некодирующих РНК, которые влияют на репликацию и/или патогенез флавивирусов: субгеномная флавивирусная РНК (sfRNA) и микроРНК (KUN-miR-1), – в формировании которых участвует экзорибонуклеаза-1 (XRN1) [39–46]. XRN1 узнает уникальную трехспиральную

кольцеобразную структуру, которая складывается из Y-структур 5'-НТО и “псевдоузла” на 3'-НТО, и образует из нее sfRNA. sfRNA противодействует реакциям врожденного иммунитета (ингибируя индукцию интерферонов), снижает активность XRN1 и Dicer и взаимодействует непосредственно с вирусным репликативным комплексом, регулируя его активность [47–50]. Структурные элементы 3'-НТО также могут блокировать активность XRN1. Предполагается, что sfRNA останавливает деградацию вирусной геномной РНК на расстоянии примерно 525 нуклеотидов от конца 3'-НТО. Это предотвращает полную деградацию вирусной геномной РНК и приводит к накоплению sfRNAs в инфицированных клетках [43, 51]. Элементы Y3 и Y2 3'-НТО расположены соответственно в конце переменного и начале консервативного участка. Они, по всей вероятности, обеспечивают формирование sfRNA1 и sfRNA2 соответственно.

Обнаруженные нами в области энхансера геномной РНК ВКЭ несовершенные нукле-

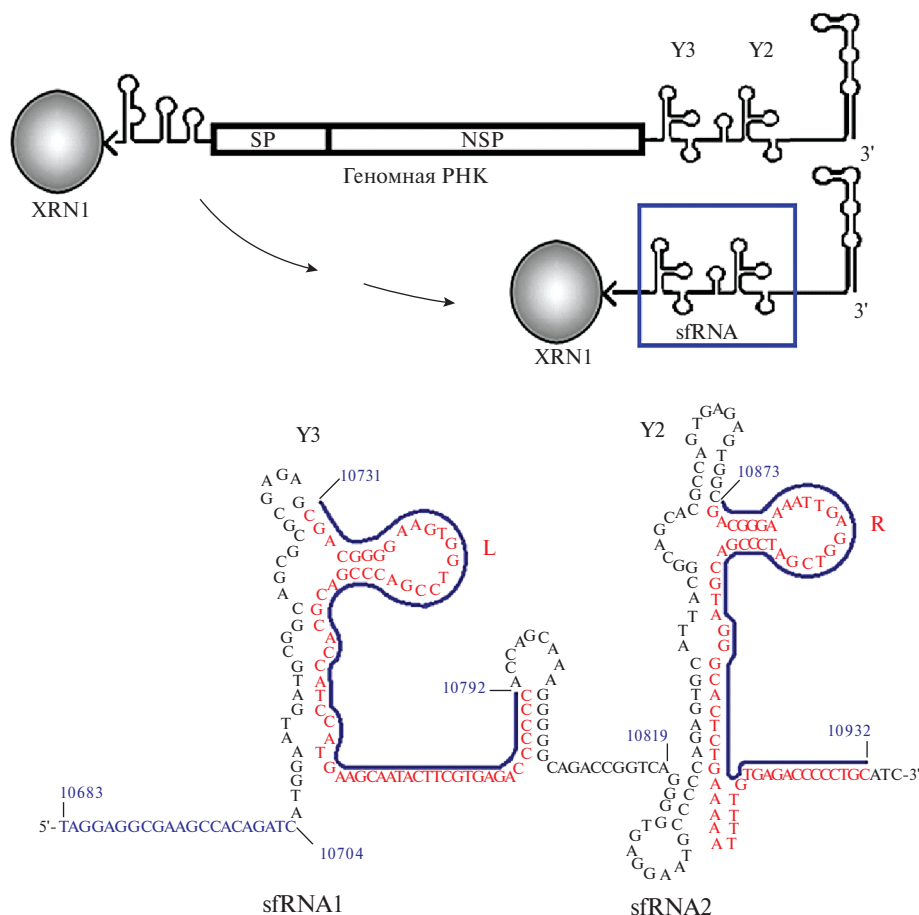


Рис. 4. Механизм расщепления вирусной РНК экзорибонуклеазой XRN1 с формированием sfRNA ВКЭ. На рисунке подчеркиванием отмечены несовершенные L- и R-повторы, которые имеют гомологию 52–57 % и образуют правую часть петель Y3 и Y2 соответственно. SP, NSP – структурные и неструктурные белки флавивирусов соответственно.

отидные повторы L и R, вероятно, участвуют в регулировании активности клеточной XRN1 через элементы Y2 и Y3 (рис. 4). Увеличение длины 3'-НТО может быть критически важно для репликации вирусного генома при адаптации ВКЭ к лабораторным условиям культивирования, что в конечном счете обеспечивает возможность эффективной репродукции ВКЭ в различных типах клеток и при пассажах через мозг мыши.

Таким образом, обнаруженные нами изменения в геноме ВКЭ, прошедшем пассажи в клеточной культуре и через мозг мышей, относятся к точечным заменам нуклеотидов, локализованным преимущественно в генах неструктурных белков и иногда приводящим к мутациям в аминокислотном составе кодируемых ими полипротеинов. При пассажах через мозг мыши наблюдалась реверсия основной части замен к исходному штамму ВКЭ, выделенному из мозга человека. Кроме того, выявлено значительное увеличение длины варибельной части 3'-НТО и высказано предположение, что это связано с ингибированием активности клеточной XRN1, участвующей в формировании sfRNA1 и sfRNA2. По всей вероятности, обнаруженные адаптационные мутации обеспечивают высокий уровень репродукции инфекционного ВКЭ как на культуре клеток, так и в мозге белых мышей.

Подобные множественные геномные изменения ВКЭ могут играть важную роль в обеспечении выживания ВКЭ в постоянно меняющихся природных условиях и при адаптации вируса к новым видам хозяев.

Авторы выражают искреннюю благодарность к. ф.-м. н. Швалову Александру Николаевичу за обсуждение результатов и помощь в обработке данных при метагеномном секвенировании.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания 9/21 и 7/21 Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора.

Все процедуры с животными проводили в соответствии с действующими документами: «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (<https://docs.cntd.ru/document/456016716>) и «Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных» (Washington, 1996), а также в соответствии с протоколом, утвержденным комиссией по биоэтике № 1 при Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора (протокол № 1-04.2021 от 30 апреля 2021 г.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süss J., Zlobin V.I., de Lamballerie X. (2014) Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**(12), 1040–1055. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01022.x>
2. Ruzek D.Z., Avšič Županc T., Borde J., Chrdle A., Eyer L., Karganova G., Kholodilov I., Knap N., Kozlovskaya L., Matveev A., Miller A.D., Osolodkin D.I., Överby A.K., Tikunova N., Tkachev S., Zajkowska J. (2019) Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res.* **164**, 23–51. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.014>
3. Khasnatinov M.A., Ustanikova K., Frolova T.V., Pogodina V.V., Bochkova N.G., Levina L.S., Slovak M., Kazimirova M., Labuda M., Klempa B., Eleckova E., Gould E.A., Gritsun T.S. (2009) Non-hemagglutinating flaviviruses: molecular mechanisms for the emergence of new strains via adaptation to European ticks. *PLoS One.* **4**, e7295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007295>
4. Deviatkin A.A., Kholodilov I.S., Vakulenko Y.A., Karganova G.G., Lukashev A.N. (2020) Tick-borne encephalitis virus: an emerging ancient zoonosis? *Viruses.* **12**, 247. <https://doi.org/10.3390/v12020247>
5. Wang S.S., Liu J.Y., Wang B.Y., Wang W.J., Cui X.M., Jiang J.F., Sun Y., Guo W.B., Pan Y.S., Zhou Y.H., Lin Z.T., Jiang B.G., Zhao L., Cao W.C. (2023) Geographical distribution of *Ixodes persulcatus* and associated pathogens: analysis of integrated data from a China field survey and global published data. *One Health.* **16**, 100508. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100508>
6. Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Kononova J.V., Konovalova S.N., Pershikova N.L., Loktev V.B., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bolshakova N.P., Moskvitina N.S. (2010) Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5' noncoding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in Western Siberia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**, 365–375. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0064>
7. 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. (2019) Variability in the 3' untranslated regions of the genomes of the different tick-borne encephalitis virus subtypes. *Virus Genes.* **55**, 448–457. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01672-0>
8. Gritsun T.S., Gould E.A. (2006a) The 3' untranslated region of tick-borne flaviviruses originated by the duplication of long repeat sequences within the open reading frame. *Virology.* **354**, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.052>

9. Gritsun T.S., Gould E.A. (2006b) Direct repeats in the 3' untranslated regions of mosquito-borne flaviviruses: possible implications for virus transmission. *J. Gen. Virol.* **87**(Pt. 11), 3297–3305. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82235-0>
10. Gritsun T.S., Gould E.A. (2007b) Origin and evolution of flavivirus 5' UTRs and panhandles: trans-terminal duplications? *Virology*. **366**, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.011>
11. Alvarez D.E., Filomatori C.V., Gamarnik A.V. (2008) Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3' UTRs. *Virology*. **375**, 223–235.
12. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. (1999) Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* **80**(Pt. 1), 179–185. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-179>
13. Demina T.V., Dzhioev Y.P., Verkhozina M.M., Kozlova I.V., Tkachev S.E., Plyusnin A., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Zlobin V.I. (2010) Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J. Med. Virol.* **82**, 965–976. <https://doi.org/10.1002/jmv>
14. Kozlova I.V., Demina T.V., Tkachev S.E., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Verkhozina M.M., Karan L.S., Dzhioev Y.P., Paramonov A.I., Suntsova O.V., Savinova Y.S., Chernoiwanova O.O., Ruzek D., Tikunova N.V., Zlobin V.I. (2018) Characteristics of the Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in Eastern Siberia. *Acta Biomedica Scientifica*. **3**(4), 53–60. <https://doi.org/10.29413/ABS.2018-3.4.9>
15. Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. (2018) A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, 74. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0081-6>
16. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chaurov E.V., Novikov D.V., Leonova G.N., Netesov S.V., Loktev V.B. (2007) Novel variant of tickborne encephalitis virus, Russia. *Emer. Infect. Dis.* **13**, 1574–1578. <https://doi.org/10.3201/eid1310.070158>
17. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Тупота Н.Л., Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Иванова Н.В., Большакова Н.П., Леонова Г.Н., Локтев В.Б. (2011) Молекулярно-генетический анализ полного генома вируса клещевого энцефалита сибирского субтипа на примере современного изолята Коларово-2008. *Проблемы особо опасных инфекций*. **4**(110), 44–48. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-4\(110\)-44-48](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-4(110)-44-48)
18. Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Kononova Y.V., Korobitsyn I.G., Kartashov M.Y., Tyutenkov O.Y., Protopopova E.V., Romanenko V.N., Chaurov E.V., Gashkov S.I., Konovalova S.N., Moskvitin S.S., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. (2014) Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia). *Ticks Tick Borne Dis.* **5**(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.10.004>
19. Микрюкова Т.П., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Терновой В.А., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Локтев В.Б. (2014) Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита в клещах *Ixodes persulcatus* в северо-восточном регионе европейской части России. *Паразитология*. **48**(2), 131–149.
20. Korobitsyn I.G., Moskvitina N.S., Tyutenkov O.Y., Gashkov S.I., Kononova Y.V., Moskvitin S.S., Romanenko V.N., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Kartashov M.Y., Chaurov E.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. (2021) Detection of tick-borne pathogens in wild birds and their ticks in Western Siberia and high level of their mismatch. *Folia Parasitol. (Praha)*. **68**, 2021–2024. <https://doi.org/10.14411/fp.2021.024>
21. Ponomareva E.P., Ternovoi V.A., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Gladysheva A.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chaurov E.V., Loktev V.B. (2017) Adaptation of tick-borne encephalitis virus from human brain to different cell cultures induces multiple genomic substitutions. *Arch. Virol.* **162**, 3151–3156. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3442-x>
22. National Research Council. (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/5140>
23. Сюрин В.Н. (1970) *Практическая вирусология*. Москва: Колос, 352 с.
24. Kuno G., Gubler D.J., Santiago de Weil N.S. (1985) Antigen capture ELISA for the identification of dengue viruses. *J. Virol. Methods*. **12**(1–2), 93–103. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(85\)90011-4](https://doi.org/10.1016/0166-0934(85)90011-4)
25. Ternovoi V.A., Kurzhuikov G.P., Sokolov Y.V., Ivanov G.Y., Ivanisenko V.A., Loktev A.V., Ryder R.W., Netesov S.V., Loktev V.B. (2003) Tick-borne encephalitis with hemorrhagic syndrome, Novosibirsk region, Russia, 1999. *Emer. Infect. Dis.* **9**, 743–746. <https://doi.org/10.3201/eid0906.030007>
26. Ternovoi V.A., Gladysheva A.V., Ponomareva E.P., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chaurov E.V., Loktev V.B. (2019) Variability in the 3' untranslated regions of the genomes of the different tick-borne encephalitis virus subtypes. *Virus Genes*. **55**, 448–457. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01672-0>
27. Davies T.J., Pedersen A.B. (2008) Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans. *Proc. Biol. Sci.* **275**, 1695–1701. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0284>
28. Woolhouse M.E.J., Haydon D.T., Antia R. (2005) Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends Ecol. Evol.* **20**, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.009>
29. Loverdo C., Lloyd-Smith J.O. (2013) Evolutionary invasion and escape in the presence of deleterious

- mutations. *PloS One*. **8**, e61879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068179>
30. Sanjuan R., Nebot M.R., Chirico N., Mansky L.M., Belshaw R. (2010) Viral mutation rates. *J. Virol.* **84**, 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
31. Lalic J., Cuevas J.M., Elena S.F. (2011) Effect of host species on the distribution of mutational fitness effects for an RNA virus. *PLoS Genet.* **7**, e1002378. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002378>
32. Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Shevtsova A.S., Romanova L.Iu., Rogova Y.V., Dzhivanian T.I., Lyapustin V.N., Pivanova G.P., Gmyl A.P., Palyulin V.A., Karganova G.G. (2010) GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. **398**, 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.12.012>
33. Kopecky J., Grubhoffer L., Kovar V., Jindrak L., Vokurkova D. (1999) A putative host cell receptor for tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affinity blotting. *Intervirology*. **42**, 9–16. <https://doi.org/10.1159/000024954>
34. Navarro-Sanchez E., Altmeyer R., Amara A., Schwartz O., Fieschi F., Virelizier J.L., Arenzana-Seisdedos F., Despres P. (2003) Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* **4**, 723–728. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor866>
35. Mandl C.W. (2005) Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.* **111**, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.007>
36. Goto A., Hayasaka D., Yoshii K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. (2003) A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness. *Vaccine*. **21**, 4043–4051. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00269-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00269-x)
37. Mandl C.W., Kroschewski H., Allison S.L., Kofler R., Holzmann H., Meixner T., Heinz F.X. (2001) Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation *in vivo*. *J. Virol.* **75**, 5627–5637. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5627-5637.2001>
38. Rummyantsev A.A., Murphy B.R., Pletnev A.G. (2006) A tick-borne Langat virus mutant that is temperature sensitive and host range restricted in neuroblastoma cells and lacks neuroinvasiveness for immunodeficient mice. *J. Virol.* **80**, 1427–1439. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1427-1439.2006>
39. Sakai M., Yoshii K., Sunden Y., Yokozawa K., Hirano M., Kariwa Y. (2014) Variable region of the 3'UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. *J. Gen. Virol.* **95**, 823–835. <https://doi.org/10.1099/vir.0.060046-0>
40. Roby J.A., Pijlman G.P., Wilusz J., Khromykh A.A. (2014) Noncoding subgenomic flavivirus RNA: multiple functions in West Nile virus pathogenesis and modulation of host responses. *Viruses*. **6**, 404–427. <https://doi.org/10.3390/v6020404>
41. Bidet K., Garcia-Blanco M.A. (2014) Flaviviral RNAs: weapons and targets in the war between virus and host. *Biochem. J.* **462**, 215–230. <https://doi.org/10.1042/BJ20140456>
42. Hussain M., Asgari S. (2014) MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 2746–2751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320123111>
43. Hussain M., Torres S., Schnettler E., Funk A., Grundhoff A., Pijlman G.P., Khromykh A.A., Asgari S. (2012) West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3'untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res.* **40**, 2210–2223. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr848>
44. Pijlman G.P., Funk A., Kondratieva N., Leung J., Torres S., van der Aa L., Liu W.J., Palmenberg A.C., Shi P.-Y., Hall R.A., Khromykh A.A. (2008) A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe*. **4**, 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.007>
45. Chapman E.G., Costantino D.A., Rabe J.L., Moon S.L., Wilusz J., Nix J.C., Kieft J.S. (2014) The structural basis of pathogenic subgenomic flavivirus RNA (sfRNA) production. *Science*. **344**, 307–310. <https://doi.org/10.1126/science.1250897>
46. Chapman E.G., Moon S.L., Wilusz J., Kieft J.S. (2014) RNA structures that resist degradation by Xrn1 produce a pathogenic Dengue virus RNA. *Elife*. **3**, e01892. <https://doi.org/10.7554/eLife.01892>
47. Funk A., Truong K., Nagasaki T., Torres S., Floden N., Balmori Melian E., Edmonds J., Dong H., Shi P.Y., Khromykh A.A. (2010) RNA structures required for production of subgenomic flavivirus RNA. *J. Virol.* **84**, 11407–11417. <https://doi.org/10.1128/JVI.01159-10>
48. Chang R.Y., Hsu T.W., Chen Y.L., Liu S.F., Tsai Y.J., Lin Y.T., Chen Y.S., Fan Y.H. (2013) Japanese encephalitis virus non-coding RNA inhibits activation of interferon by blocking nuclear translocation of interferon regulatory factor 3. *Vet. Microbiol.* **166**, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.026>
49. Schuessler A., Funk A., Lazear H.M., Cooper D.A., Torres S., Daffis S., Jha B.K., Kumagai Y., Takeuchi O., Hertzog P., Silverman R., Akira S., Barton D.J., Diamond M.S., Khromykh A.A. (2012) West Nile virus noncoding subgenomic RNA contributes to viral evasion of the type I interferon-mediated antiviral response. *J. Virol.* **86**, 5708–5718. <https://doi.org/10.1128/JVI.00207-12>
50. Moon S.L., Anderson J.R., Kumagai Y., Wilusz C.J., Akira S., Khromykh A.A., Wilusz J. (2012) A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability. *RNA*. **18**, 2029–2040. <https://doi.org/10.1261/rna.034330.112>

51. Fan Y.H., Nadar M., Chen C.C., Weng C.C., Lin Y.T., Chang R.Y. (2011) Small non-coding RNA modulates Japanese encephalitis virus replication and translation in trans. *Viol. J.* **8**, 492. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-492>
52. Kieft J.S., Rabe J.L., Chapman E.G. (2015) New hypotheses derived from the structure of a flaviviral Xrn1-resistant RNA: conservation, folding, and host adaptation. *RNA Biol.* **12**, 1169–1177. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1094599>

Changes in the Genome of Tick-Borne Encephalitis Virus during Cultivation

V. A. Ternovoi¹, E. P. Ponomareva^{1, *}, E. V. Protopopova¹,
N. L. Tupota¹, T. P. Mikryukova^{1, †}, V. B. Loktev¹

¹Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

*e-mail: ponomareva_ep@vector.nsc.ru, ponomareva-eugenia2014@yandex.ru

The tick-borne encephalitis virus (TBEV) of the Siberian genotype was previously isolated from the brain of a deceased person. TBEV variants obtained at passages 3 and 8 on SPEV cells were inoculated into the brains of white mice for subsequent passages. Full-genome sequences of all virus variants were analyzed by high-throughput sequencing. The analysis showed the presence of 41 point nucleotide substitutions, which were mainly localized in the genes of non-structural proteins NS3 and NS5 of TBEV. In the deduced virus protein sequences, 12 amino acid substitutions were identified. After three passages through mouse brains, reverse nucleotide and amino acid substitutions were detected. Most of them were mapped in the NS5 protein gene, where 5 new nucleotide substitutions also appeared. At the same time, there was an increase in the length of the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the viral genome by 306 nucleotides. The Y3 and Y2 3'-UTR elements were found to contain imperfect L and R repeats, which probably associated with inhibition of the activity of cellular XRN1 RNase and thus involved in the formation of sfRNA1 and sfRNA2. For all TBEV variants, high levels of infectious virus were detected both in cell culture and in the brain of white mice. The revealed changes in the genome that occur during successive passages of TBEV are most likely due to the significant genetic variability of the virus, which ensures its efficient reproduction in different hosts and active circulation in nature.

Keywords: tick-borne encephalitis virus, viral genome, 3'-UTR, nucleotide substitutions, adaptation, reverse mutation, cell culture, mouse