

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

Простова Мария Андреевна

Структурно-функциональная характеристика апикального  
участка домена d репликативного элемента oriL генома  
полиовируса

03.02.02 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2017

Работа выполнена в лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Научный Центр Исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН».

**Научный руководитель:**

**Гмыль Анатолий Петрович**, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией биохимии ФГБНУ «ФНЦ Исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН».

**Официальные оппоненты:**

**Морозов Сергей Юрьевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генной инженерии вирусов Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

**Грановский Игорь Эдуардович**, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией энзимологии генетических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН».

**Платонов Александр Евгеньевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией природно-очаговых инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится 30 ноября 2017 г. в 15:30 часов на заседании совета МГУ.03.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология (биологические науки); 03.02.02 – вирусология (биологические науки) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. 389. С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, отдел диссертаций), на сайте <http://www.bio.msu.ru> и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru>.

Автореферат разослан 27 октября 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

Полиовирус является представителем семейства Picornaviridae - безоболочечных вирусов с однонитевым РНК-геномом положительной полярности и небольшим икосаэдрическим капсидом. Инфицирование вирусом полиомиелита может вызывать у человека паралитический полиомиелит. Другие вирусы семейства Picornaviridae вызывают такие заболевания человека и животных, как ящур, ринит, гепатит А, серозный менингит и другие. Регуляция экспрессии и репликации генома пикорнавирусов осуществляется посредством взаимодействия его РНК-элементов с вирусными или клеточными белками. В процессе репликации генома вируса полиомиелита образуется по меньшей мере три ключевых РНК-белковых комплекса. До сих пор ни для одного из этих комплексов неизвестно, как осуществляется взаимное узнавание его элементов, и какие события следуют за его образованием.

Полимераза энтеровирусов вносит около одной случайной замены на каждый дочерний геном, что с одной стороны, позволяет вирусу быстро адаптироваться к изменяющимся условиям, а с другой стороны ставит проблему сохранения функциональности ключевых элементов генома (Acevedo, Brodsky & Andino, 2014). Исследование пределов изменчивости репликативного элемента *oriL* позволит приблизиться к пониманию механизмов, лежащих в основе помехоустойчивости вирусов с высокой скоростью изменения генома, и принципов РНК-белкового узнавания.

### **Степень разработанности темы**

Известно, что взаимодействие 3CD и репликативного элемента *oriL* является необходимым для инициации репликации вирусного генома (Andino, Rieckhof & Baltimore, 1990a; Gamarnik & Andino, 1997, 1998). Известны основные взаимодействующие элементы со стороны обоих партнеров. Узнаваемая белком 3CD тетрапетля находится в апикальном участке домена d репликативного элемента *oriL* (Trono, Andino & Baltimore, 1988; Andino *et al.*, 1990a, 1990b). Показано, что количество нуклеотидов в апикальном участке домена d играет значимую роль для взаимодействия с белком 3CD (Zell *et al.*, 2002). Со стороны белка 3CD известны две аминокислотные последовательности, вовлеченные во взаимодействие с *oriL* (<sub>154</sub>TGK<sub>156</sub> и <sub>82</sub>KFRDIR<sub>87</sub>), и ряд дополнительных аминокислот (Andino *et al.*, 1990b, 1993; Hämmerle, Molla & Wimmer, 1992). Однако, как осуществляется узнавание вирусного белка 3CD и *oriL* остается не ясным.

**Целью** работы является выявление свойств апикального участка домена d

репликативного элемента *oriL* генома вируса полиомиелита, необходимых для эффективного взаимодействия с вирусным белком 3CD. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. установить, какие нуклеотидные последовательности в апикальном участке домена d *oriL* могут поддерживать эффективную репродукцию вируса полиомиелита;
2. сконструировать варианты полиовируса, содержащие различные последовательности в апикальном участке домена d *oriL*, и охарактеризовать их эффективность репродукции и репликации;
3. создать систему экспрессии, выделения и очистки рекомбинантного вирусного белка 3CD;
4. охарактеризовать различные варианты *oriL* по их способности взаимодействовать с рекомбинантным белком 3CD.

#### **Научная новизна.** В данной работе

- продемонстрировано, что тетрапеты с разной последовательностью, но принадлежащие пространственному структурному классу UNCG, эффективно узнаются вирусным белком 3CD и поддерживают эффективную репликацию вирусного генома, тогда как тетрапеты пространственных структурных классов GNRA и gCUUGc не могут быть эффективно узнаны этим белком и не могут поддерживать эффективную репликацию
- показано, что вирусы, содержащие различные структурные нарушения апикального участка домена d *oriL*, даже значительно нарушающие функциональность этого участка, сохраняют жизнеспособность и приобретают мутации, возвращающие последовательность апикального участка домена d к консенсусам nYNHGm (но не gCUUGc) или uGNUAg, или приводящую к аминокислотной замене Thr<sub>154</sub>Ile.

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

В ходе работы было установлено, что для эффективной репликации вируса в апикальном участке домена d репликативного элемента *oriL* необходимо наличие такой пространственной структуры, которая может быть реализована большим количеством различных последовательностей. В результате, при появлении мутаций, этот ключевой элемент сохраняет свою функциональность. Таким образом, для полиовируса принцип узнавания пространственной структуры РНК-элемента, а не его последовательности, может быть дополнительным преимуществом, позволяющим сохранять функциональность генома при значительной скорости появления мутаций.

Результаты данной работы могут быть применены в рациональном дизайне потенциальных ингибиторов вирусной репликации.

## Методология и методы исследования

Для того чтобы определить множество последовательностей в апикальном участке домена d *oriL*, способных поддерживать жизнеспособность вируса полиомиелита, был осуществлен отбор инфекционных вариантов из набора вариантов со случайной последовательностью. Для этого восемь нуклеотидов апикального участка домена d были рандомизированы, и полученная полногеномная РНК была использована для трансфекции культуры клеток *Vero*. Жизнеспособные варианты образовывали зоны лизиса культуры клеток под покрытием – бляшки, материал из которых был использован для определения последовательности вирусных геномов. Анализ набора полученных таким образом жизнеспособных вариантов выявил необходимые для поддержания функциональности свойства домена d. Выводы были подтверждены в следующих экспериментах: 1) создание ряда дополнительных мутантов и их характеристика для проверки сформулированных гипотез, 2) характеристика эффективности синтеза дочерних (+) РНК у различных мутантов и 3) исследование эффективности связывания различных мутантных *oriL* с рекомбинантным белком 3CD.

**Личный вклад автора.** Основная часть экспериментов была осуществлена автором. Эксперимент по отбору жизнеспособных вариантов и анализ полученных результатов был осуществлен сотрудником ИПВЭ им. М.П. Чумакова Бахмутовым Д. В. Автор получил 16 из 33 использованных в работе генно-инженерных конструкций с различной последовательностью в апикальном участке домена d. Эксперименты по определению кинетики синтеза дочерних копий РНК были спланированы автором и осуществлены совместно с сотрудником ИПВЭ им. М.П. Чумакова Шишовой А.А. Разработка метода получения и очистки рекомбинантного белка 3CD была осуществлена автором с использованием рекомендаций сотрудников Института белка РАН Тищенко С.А. и Гарбер М.А. Создание выборки полногеномных последовательностей из базы данных и их выравнивание было осуществлено сотрудником Института А.А. Девяткиным. Анализ выбранных из базы данных последовательностей был осуществлен автором. Получение рекомбинантного белка 3CD и мутантных *oriL* и эксперименты по определению эффективности их взаимодействия были осуществлены автором. Бляшечные фенотипы для половины исследованных мутантов были определены автором совместно с сотрудниками ИПВЭ им. М.П. Чумакова Хитриной Е.В. и Шишовой А.А. Работа с культурами клеток проводилась сотрудниками ИПВЭ им. М.П. Чумакова Хитриной Е.В. и Колесниковой М.С. Иммунизация мышей, их вскрытие, получение сыворотки крови и гипериммунной асцитной жидкости были осуществлены сотрудником ИПВЭ им. М.П. Чумакова Роговой Ю.В. совместно с автором.

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

1. эффективная репродукция вируса полиомиелита с природной последовательностью 3С поддерживается множеством тетрапетель в апикальном участке домена d *oriL*, которое можно описать консенсусами: nYNHGn (за исключением gCUUGc) и uGVUAg, где n и m – любые комплементарные нуклеотиды, Н – любой нуклеотид, кроме G, V – любой нуклеотид, кроме U.
2. тетрапетли в апикальном участке домена d, имеющие пространственную структуру класса UNCG, но разные последовательности, узнаются вирусным белком 3CD и поддерживают эффективную вирусную репликацию. Тетрапетли в апикальном участке домена d, имеющие пространственную структуру классов GNRA и gCUUGc, не узнаются вирусным белком 3CD, и не могут поддерживать эффективную вирусную репликацию. На основании этих данных может быть выдвинута гипотеза об первичном значении пространственной структуры апикального участка домена d *oriL* для взаимодействия с вирусным белком 3CD.
3. аминокислотная замена Thr<sub>154</sub>Ile в белке 3С компенсирует различные нарушения структуры апикального участка домена d и наличие тетрапетель, чья пространственная структура отличается от структуры класса UNCG.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность работы обеспечивается достижением сходных результатов с использованием различных методических подходов.

Результаты были представлены на пяти международных конференциях и опубликованы в рецензируемых изданиях (3 публикации), индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация представлена на 114 страницах и состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, описания результатов, обсуждения, заключения и списка литературы. В диссертации приведены 32 рисунка и 13 таблиц. Список литературы содержит 246 источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Результаты исследования

**Отбор жизнеспособных вариантов полиовируса из набора случайных.** Для определения множества последовательностей апикального участка домена d репликативного элемента *oriL*, способных поддерживать эффективную репликацию вируса полиомиелита, был использован следующий подход: 1) синтезирован олигонуклеотид SolD (Рисунок 1), содержащий 8 случайных нуклеотидов (с 61-го по 68-ой нуклеотид генома вируса полиомиелита) в контексте последовательности генома полиовируса дикого типа; 2) олигонуклеотид SolD был использован для получения ПЦП-фрагмента, который затем был клонирован в плазмиду pT7PV1Rib(+)-MS (содержит полногеномную ДНК копию генома вируса полиомиелита штамма Mahoney) по сайтам рестрикции *ApaI* и *SplI*; 3) полученные плазмиды (одиночные плазмидные клоны или в составе пулов) были использованы в реакции транскрипции *in vitro* для получения РНК-копий генома и трансфекции культуры клеток *Vero*; 4) если транскрипт давал жизнеспособное вирусное потомство, то после трансфекции образовывались бляшки (образование бляшек наблюдали до восьмого дня после трансфекции). Бляшки отбирали и использовали для выделения вирусов. Для полученных вирусов были определены нуклеотидные последовательности репликативного элемента *oriL* (с 1 по 110 нуклеотиды полиовирусного генома). Так была получена информация, какие последовательности из набора случайных позволяют вирусу оставаться жизнеспособным. Схема эксперимента представлена на рисунке Рисунок 1.

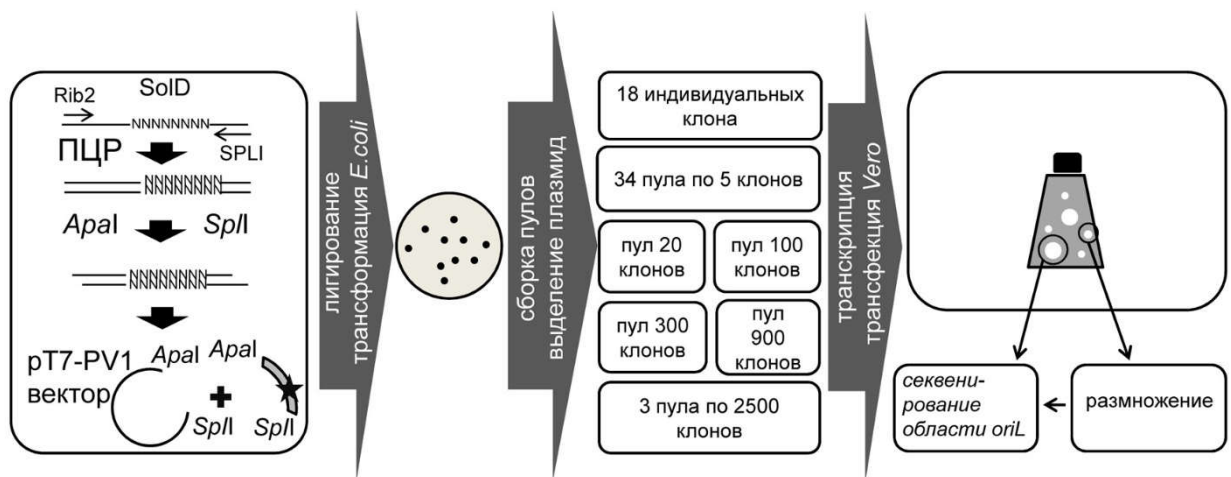


Рисунок 1. Схема эксперимента по отбору жизнеспособных вариантов полиовируса из набора случайных вариантов.

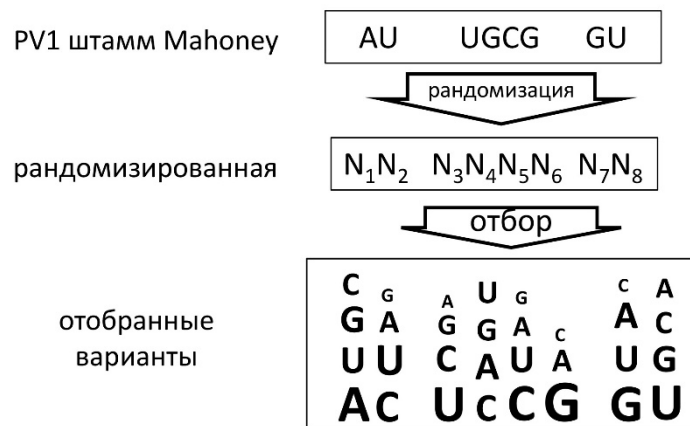
**Разнообразие последовательностей в апикальном участке домена d у экспериментально отобранных вирусов.** Всего был получен 151 жизнеспособный вирус, из них для 62-х определили последовательность генома на участке с 1 по 110 нуклеотиды. Бляшки после трансфекции появлялись на разные дни и имели разный размер. В крупных и ранних бляшках было достаточно материала для определения нуклеотидной последовательности интересующего нас участка генома. Определение последовательности генома вирусов из более мелких бляшек было затруднено из-за недостаточного количества вирусной РНК. Поэтому вирусы из более мелких и поздних бляшек были дополнительно размножены. Для двух вариантов потребовалось 2-3 раунда размножения. Из 62-х определенных последовательностей 39 были уникальны. Оказалось, что любой нуклеотид может занимать любую позицию в исследованном октануклеотиде, кроме U в четвертой позиции тетрапетли. Результаты представлены на рисунке 2 и в таблице 1.

Повышенная частота встречаемости нуклеотидных остатков аденина в первом положении, цитозина во втором, гуанина в седьмом и урацила в восьмом в экспериментально отобранных последовательностях коррелирует с частотой встречаемости соответствующих нуклеотидных остатков в этих положениях в плазмидных клонах (Таблица 1).

Поэтому наблюдаемые частоты встречаемости в перечисленных положениях октануклеотида, скорее всего, обусловлены распределением частоты встречаемости нуклеотидных остатков в плаزمидах, а не влиянием естественного отбора (Таблица 1).

Однако в вирусных последовательностях частота встречаемости нуклеотидов в ряде случаев отличается от распределения частот встречаемости нуклеотидов в плазмидных последовательностях (Таблица 1). Это может свидетельствовать о наличии положительного и отрицательного отбора в ходе эксперимента. Анализ показывает селекцию U в третьем положении рандомизированного октонуклеотида (первом положении тетрапетли) в сочетании с G в шестом положении октонуклеотида (последнем положении тетрапетли) и селекцию C в пятом положении октонуклеотида (третьем положении тетрапетли) (Таблице 1). Во втором положении тетрапетли (четвертом положении октануклеотида) не обнаруживается никаких предпочтений. Наблюдается предпочтение неоднозначной пары u-g (в англоязычной литературе wobble pair – специфические, не Уотсон-Криковские пары) в качестве фланкирующей к тетрапетле (Рисунок 2, Таблица 1).





консенсус YNMG		консенсус YNUG	другие тетрапетли	гетерогенные тетрапетли
спаренные фланкирующие пары	разрушенные фланкирующие пары			
ccUGCGgg guUGCGac uaUUCGua auUACGgu <sup>a,б</sup> uuUACGaa ccUACGgg aaCCCGuu ucCCCGgg acUCCGgu <sup>a</sup> cuUCAGgg uuUNCGaa <sup>б</sup> ccCGCGgg auUUAGgu	gcUACGgg auUGCGuu acCCCGgg gcCCCGac gcCCAGac	gcCGUGgu uuUAUGga <sup>a</sup> gcUAUGgc ccUAUGgg <sup>a,г</sup> acCCUGgu uaUCUGua cuCAUGgg agUUUGcu acUUUGgu	<b>GSYA</b> auGCUAgu uuGCUAaa aaGGCAuu auGGCAau  <b>нет консенсуса</b> auAGCAau agCUGAcu <sup>б</sup> gcUUGGgc guUUGGgc uaGCACua	aaUUNGuu aaCA(G/C)Guu uuUA(C/U)Gag

Рисунок 2. Нуклеотидная последовательность апикального участка домена d у экспериментально отобранных вирусов. <sup>a</sup> – вставка G в последовательность GGGG в положениях 14-17 генома, <sup>б</sup>– вставка C в последовательность CCC в положениях 23-25 генома, <sup>в</sup>–замена A26G, <sup>г</sup> – вставка G в положении 40 генома.

Таблица 1. Частоты встречаемости различных нуклеотидов в положениях рандомизированного участка среди уникальных 41 плазмидных и 39 вирусных последовательностей (приведен процент встречаемости). Нуклеотиды с повышенной частотой встречаемости, относительно средней, в положениях с 61 по 68 генома отмечены зеленым, с пониженной частотой встречаемости отмечены красным.

Нуклеотид	положение в рандомизированном участке плазмиды							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Спираль		Тетрапетля				Спираль	
<b>A</b>	39	20	20	24	24	29	15	24
<b>T</b>	22	22	24	32	34	22	15	39
<b>C</b>	24	41	34	20	12	24	32	20
<b>G</b>	15	17	22	24	29	24	39	17
нуклеотид	положение в рандомизированном участке вируса							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Спираль		Тетрапетля				Спираль	
<b>A</b>	44	14	3	25	11	17	17	17
<b>U</b>	19	39	56	19	31	0	17	42
<b>C</b>	17	42	28	33	50	3	5	14
<b>G</b>	19	6	14	22	8	81	61	28

Большинство отобранных вариантов можно разделить на три группы, тетрапетли в которых принадлежат соответственно трем консенсусам YNMG, YNUG и GSYA (Рисунок 2).

**Восемнадцать из 39 уникальных последовательностей** объединяются консенсусом YNMG (Y=U/C, N=любой, M=A/C) (Рисунок 2). Тетрапетли этого консенсуса широко распространены в рибосомальных РНК (Woese *et al.*, 1990). Все изученные тетрапетли этого консенсуса формируют пространственную структуру класса UNCG (Cheong, Varani & Tinoco, 1990; Varani, Cheong & Tinoco, 1991; Ennifar *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2003, 2004). Некоторые тетрапетли, принадлежащие консенсусу YNMG, встречались среди жизнеспособных вариантов несколько раз с разными вариантами фланкирующих пар, в том числе с разрушенными фланкирующими парами: UACG и CCCG с четырьмя вариантами фланкирующих пар, UGCG с тремя вариантами.

**Вторая группа из 9 последовательностей** формировала консенсус YNUG (Рисунок 2). К этому консенсусу могут относиться представители двух разных структурных пространственных классов тетрапетель (UNCG и gCUUGc)(Varani *et al.*, 1991; Jucker & Pardi, 1995). В нашей выборке были обнаружены представитель класса UNCG, тетрапетля UUUG. Тетрапетля UUUG с фланкирующими парами ас...гу формирует пространственную структуру класса UNCG (Cheong *et al.*, 1990; Varani *et al.*, 1991).

**Третья группа из четырех последовательностей** - auGGCAau, aaGGCAuu, auGCUAgu, uuGCUAaa - составляла консенсус GSYA (S=G/C) (Рисунок 2). Для тетрапетли GCUA с фланкирующими парами аи...гу методом ЯМР была продемонстрирована пространственная структура класса UNCG (Melchers *et al.*, 2006).

**Остальные восемь тетрапетель** включают ucAGCAga, agCUGAcu, gcUUGGgc, guUUGGgc, uaGCACua, uuUA(C/U)Gag, aaCA(G/C)Guu, aaUUNGuu (Рисунок 2). Эти тетрапетли не объединяются в какой-либо осмысленный консенсус и, кроме тетрапетли AGCA, не имеют аналогов в литературе (Lebars *et al.*, 2001). Таким образом, три многочисленные группы последовательностей содержат тетрапетли, для которых показана пространственная структура класса UNCG. При этом представители двух других распространенных пространственных структурных классов стабильных тетрапетель GNRA и gCUUGc обнаружены не были.

На данный момент известны несколько пространственных структурных классов тетрапетель. Три из них наиболее часто встречаются в рибосомальных РНК, являются наиболее изученными и содержат тетрапетли экстремальной стабильности - это классы, названные по консенсусам представителей, UNCG (N=любой нуклеотид), GNRA (R=A/G) и gCUUGc (Woese *et al.*, 1983, 1990; Antao *et al.*, 1991; Antao & Tinoco, 1992; Proctor *et al.*,

2002; Cheong & Cheong, 2010; Bottaro & Lindorff-Larsen, 2017)(Рисунок 3).  
 Пространственная структура тетрапетель этих классов существенно различается (Рисунок 3).

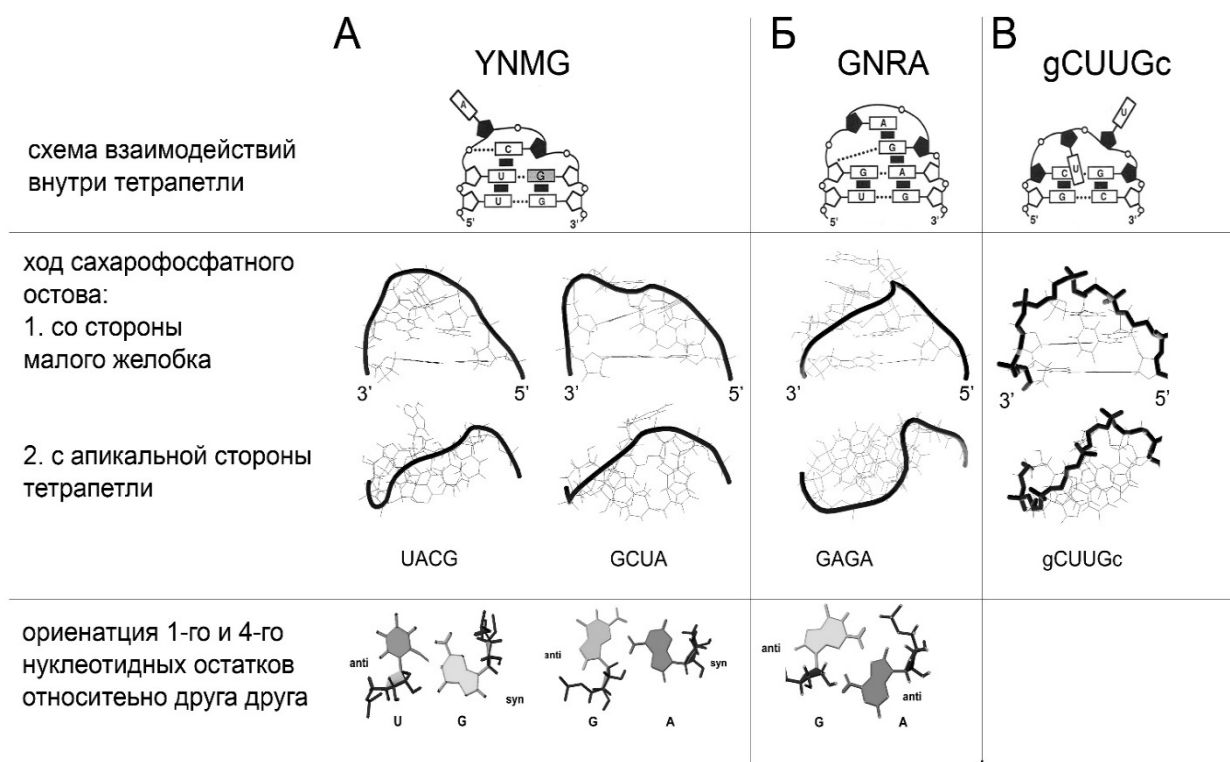


Рисунок 3. Схематическое представление взаимодействий внутри тетрапетель трех пространственных структурных классов. Условные обозначения: пунктиром отмечены водородные связи, черными прямоугольниками - стекинг взаимодействия, пятиугольниками обозначены рибозы (рибозы в конформации 2'-эндо - черные, рибозы в конформации 3'-эндо - белые), фосфаты обозначены кругами, основания в конформации *anti* обозначены белыми прямоугольниками, в конформации *syn* - серым прямоугольником) (лекция "Principles of Nucleic Acids", Prof. Dr. Robert Haener). Показан ход сахарофосфатного остова (отмечен трубкой) и взаимной ориентации первого и четвертого нуклеотидов представителей тетрапетель пространственных классов UNCG (А, идентификаторы в базе данных PDB - 1TXS, 2EVY), cGNRAg (Б, идентификатор в базе данных PDB- 1ZIG) и gCUUGc (В, идентификатор в базе данных PDB - 1RNG) (Melchers *et al.*, 2006).

**Разнообразие последовательностей тетрапетли домена d и фланкирующей пары у вирусов вида Enterovirus C.** В базе данных pubmed.com обнаружено всего 747 полногеномных последовательности, принадлежащих виду Enterovirus C, содержащих 13 уникальных тетрапетель и две тринуклеотидных петли в апикальном участке домена d oriL (Таблица 2). Из них 9 принадлежит консенсусу YNMG и 4 консенсусу YNUG (Таблица 2). Многочисленные близкородственные геномы, принадлежащие, например, вирусам, выделенным в ходе одной вспышки, будут влиять на оценку распространенности разных последовательностей тетрапетель. Чтобы снизить это искажение, из выборки были

исключены последовательности, отличающейся от других на 1% и менее. Фильтрация близкородственных вариантов сокращает выборку более чем в два раза, в основном, за счет последовательностей многочисленных изолятов полиовируса из Нигерии (Famulare *et al.*, 2016; Montmayeur *et al.*, 2017). При этом фильтрация близкородственных вариантов практически не влияет на распределение последовательностей тетрапетель по распространенности и на их разнообразие по фланкирующим парам (Таблица 2). Однако в результате фильтрации теряется три уникальных тетрапетли CCCG, CAUG и UGUG, что указывает на то, что даже в популяции близкородственных вирусов, например, в ходе одной вспышки, апикальная тетрапетля домена d может меняться.

Наиболее распространенными вне зависимости от того, проведена или не фильтрация по близкому родству, были тетрапетли (по убыванию встречаемости) CACG, UGCG, UACG (Таблица 2). Эти же варианты тетрапетель имеют наибольшее разнообразие по последовательности фланкирующих пар: 5 вариантов у CACG (3 u...g, 1 u...a, 1 c...g), 4 варианта у UGCG и 2 варианта у UACG (Таблица 2).

Очевидно, что широкая представленность в базе данных последовательностей, принадлежащих полиовирусу (в основном, дериватами вакцинных штаммов) оказывает влияние на результат (Таблица 2). Даже после фильтрации близкородственных вариантов, тетрапетли, принадлежащие к полиовирусам, дают значимый вклад во встречаемость тетрапетель (Таблица 2). Так, тетрапетли UGCG в значительной части (27 последовательностей из 43) принадлежат полиовирусу первого типа (Таблица 2).

При этом 25 из них являются дериватами вакцинного штамма. Тетрапетли UACG почти наполовину представлены полиовирусом второго типа (46 последовательностей из 106, одна последовательность из которых принадлежит вакцинному штамму, а остальные его дериватам) (Таблица 2). Тетрапетли CACG также почти на половину принадлежат полиовирусам (Таблица 2). Однако, хотя полиовирусы являются значимой частью выборки, их исключение оставляет в лидерах по распространенности тетрапетли CACG и UACG, так как, как оказалось, эти тетрапетли широко распространены среди вирусов коксаки А (CVA) и других энтеровирусов С (Таблица 2). В свете того, что энтеровирусы вида С свободно обмениваются 5'частями генома, это не является удивительным (Muslin *et al.*, 2015; Bessaud *et al.*, 2016). Для полиовируса нет строго консервативной последовательности апикального участка домена d: были обнаружены полиовирусы с различными последовательностями – UACG, UGCG, CACG, UCCG и CGCG (Таблица 3), практически независимо от серотипа. Тетрапетли в апикальном участке домена d oriL полиовирусов в базе данных pubmed.com можно описать консенсусом YVCG, где Y=C/U, V=все, кроме U (Таблица 3).

Таблица 2. Анализ распространенности и разнообразия фланкирующих пар тетрапетель апикального участка домена d oriL у энтеровирусов С.

N	Тетрапетля	Распространенность	Распространенность (фильтр 1%) /принадлежащие полиовирусу	Разнообразие фланкирующих пар	Разнообразие фланкирующих пар (фильтр 1%)
YNMG					
1	CACG	254	101/54	5	4
2	UGCG	232	43/31	4	4
3	UACG	226	106/64	2	2
4	CGCG	21	13/6	1	1
5	CUCG	2	2	1	1
6	CGAG	2	2	1	1
7	UCCG	1	1/1	1	1
8	CCCG	1	0	1	0
9	CAAG	1	1	1	1
YNUG					
10	CGUG	2	2	1	1
11	CAUG	1	0	1	0
12	CCUG	1	1	1	1
13	UGUG	1	0	1	0
Тринуклеотидные петли					
14	CCG	1	1	1	1
15	CAG	1	1	1	1
<b>Всего</b>		<b>747</b>	<b>274</b>	<b>23</b>	<b>19</b>

Таблица 3. Распространенность последовательности апикального участка домена d у полиовирусов после удаления близкородственных штаммов.

Последовательность нонануклеотида	PV1	PV2	PV3	Всего
<b>UGCG</b>				
uauUGCGgua	25	3	1	<b>31</b>
uacUGCGgua	2	0	0	
<b>Всего</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	
<b>UACG</b>				
uauUACGgua	10	46	1	<b>64</b>
uacUACGgua	7	0	0	
<b>Всего</b>	<b>17</b>	<b>46</b>	<b>1</b>	
<b>CACG</b>				
uauCACGgua	9	22	20	<b>54</b>
uacCACGgua	2	0	0	
uguCACGgua	0	0	1	
<b>Всего</b>	<b>11</b>	<b>22</b>	<b>21</b>	
<b>другие тетрапетли</b>				
uauUCCGgua	0	1	0	<b>1</b>
uauCGCGgua	4	2	0	<b>6</b>
<b>ВСЕГО</b>	<b>59</b>	<b>74</b>	<b>23</b>	<b>156</b>

Таким образом, спектр вариантов апикальной тетрапетли домена d, полученный в результате отбора жизнеспособных вариантов из случайных, оказался значительно шире, чем таковой у полиовируса и других природных вирусов вида Enterovirus C. С другой стороны, у природных изолятов были обнаружены тетрапетли, не найденные у вирусов, отобранных экспериментально. Это были широко распространенная у энтеровирусов тетрапетля CACG, тетрапетли CUCG, UGUG и тринуклеотидные петли CCG и CAG. При этом ни в той ни в другой выборке не были обнаружены последовательности, содержащие в апикальном участке домена d тетрапетли пространственных классов GNRA и gCUUGc.

Аминокислоты в положениях 154-156 белка 3C значительно более консервативны - почти во всех изолятах после фильтрации близкородственных вариантов находится аминокислотная последовательность TGK.

На основании этих данных, на основании присутствия в трех группах экспериментально отобранных вирусов тетрапетель, принадлежащих пространственному классу UNCG и на основании данных литературы о пространственной структуре апикального участка домена d ряда энтеровирусов мы предполагаем, что пространственная структура апикального участка домена d *oriL* важнее для связывания с вирусным белком 3CD, чем его последовательность. Следствиями из этой гипотезы будут являться 1) разные последовательности в апикальном участке домена d, формирующие структуру подходящего класса, будут с одинаковой эффективностью узнаваться вирусным белком 3CD, 2) последовательности в апикальном участке домена d, формирующие структуру не подходящего класса, не будут узнаваться вирусным белком 3CD, вне зависимости от собственно последовательности.

**Конструирование полиовирусов, содержащих мутации в апикальном участке домена d, и эффективность их репродукции.** Связывание белка 3CD и репликативного элемента *oriL* необходимо для инициации вирусной репликации и, значит, нарушение этого процесса будет негативно сказываться на вирусной репродукции и репликации. Таким образом, следствия из гипотезы о значении пространственной структуры апикального участка домена d для узнавания вирусным белком 3CD могут быть проверены как в серии прямых экспериментов по связыванию *oriL* с различными последовательностями в домене d вирусным белком 3CD, так и в серии косвенных экспериментов с вирусными геномами, содержащими различные последовательности в апикальном участке домена d.

Мы сконструировали набор вирусных геномов с различными последовательностями в апикальном участке домена d. Кроме того, эксперименты с конструированными геномами позволяют нам убедиться, что обнаруживаемые эффекты обусловлены именно внесенной мутацией. Для отобранных в эксперименте по рандомизации жизнеспособных вирусов это

потребовало бы дополнительных проверок. Набор плазмид, содержащих полные геномы полиовируса с заданными мутациями в апикальном участке домена d, был создан на базе плазмиды pT7PV1(Rib+)MS.

Плазмиды с внесенными мутациями были использованы для получения полногеномных транскриптов методом транскрипции *in vitro*. Транскрипты были очищены от плазмидной ДНК и примесей РНК длиннее или короче полногеномного транскрипта с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы. Реконструированные таким образом РНК-геномы были использованы для трансфекции культуры клеток *Vero*. Мы оценивали эффективность репродукции, сравнивая размер бляшек под покрытием после трансфекции культуры клеток *Vero* контрольным транскриптом и транскриптом с исследуемой мутацией. Размер бляшек является интегральным показателем эффективности цикла репродукции нескольких поколений вируса от способности инфицировать клетки до сборки и выхода вирусных частиц и, таким образом, позволяет давать первичную характеристику мутантных вирусных вариантов. В качестве контрольного транскрипта был использован транскрипт, соответствующий полногеномной последовательности вируса полиомиелита штамма Mahoney (далее контрольный транскрипт).

Бляшечный фенотип после трансфекции полученными полногеномными транскриптами представлен на рисунке 4. Появление бляшек, более мелких, чем у контрольного транскрипта, расценивалось нами, как указание на сниженную жизнеспособность соответствующего транскрипта и, соответственно на негативное влияние внесенных мутаций на жизнеспособность. Пассирование вирусов из мелких бляшек позволяет осуществиться отбору благоприятных мутаций, и, таким образом, дает дополнительную информацию о роли внесенных мутаций или механизмах их компенсации. Генетическая стабильность отобранных из бляшек вирусов приведена в таблице 4.

Мы можем сделать заключение, что тетрапетли, принадлежащие пространственному структурному классу тетрапетель UNCG, способны поддерживать эффективную репродукцию вируса полиомиелита. Тетрапетли пространственных структурных классов GNRA и gCUUGc не способны поддерживать эффективную репродукцию вируса, что и объясняет отсутствие представителей этих классов среди отобранных в эксперименте и природных вариантов полиовируса. При этом вирус полиомиелита даже при наличии не благоприятных последовательностей в апикальном участке домена d сохраняет способность к репликации и приобретает компенсаторные замены либо в самом апикальном участке домена d, либо в белке 3C (Таблица 4). Внесение аминокислотной замены T<sub>154</sub>I в белок 3C геномов вирусов с тетрапетлями классов GNRA или gCUUGc в апикальном участке домена d приводит к компенсации негативного эффекта тетрапетель

этой структуры на бляшечный фенотип вируса (не показано).

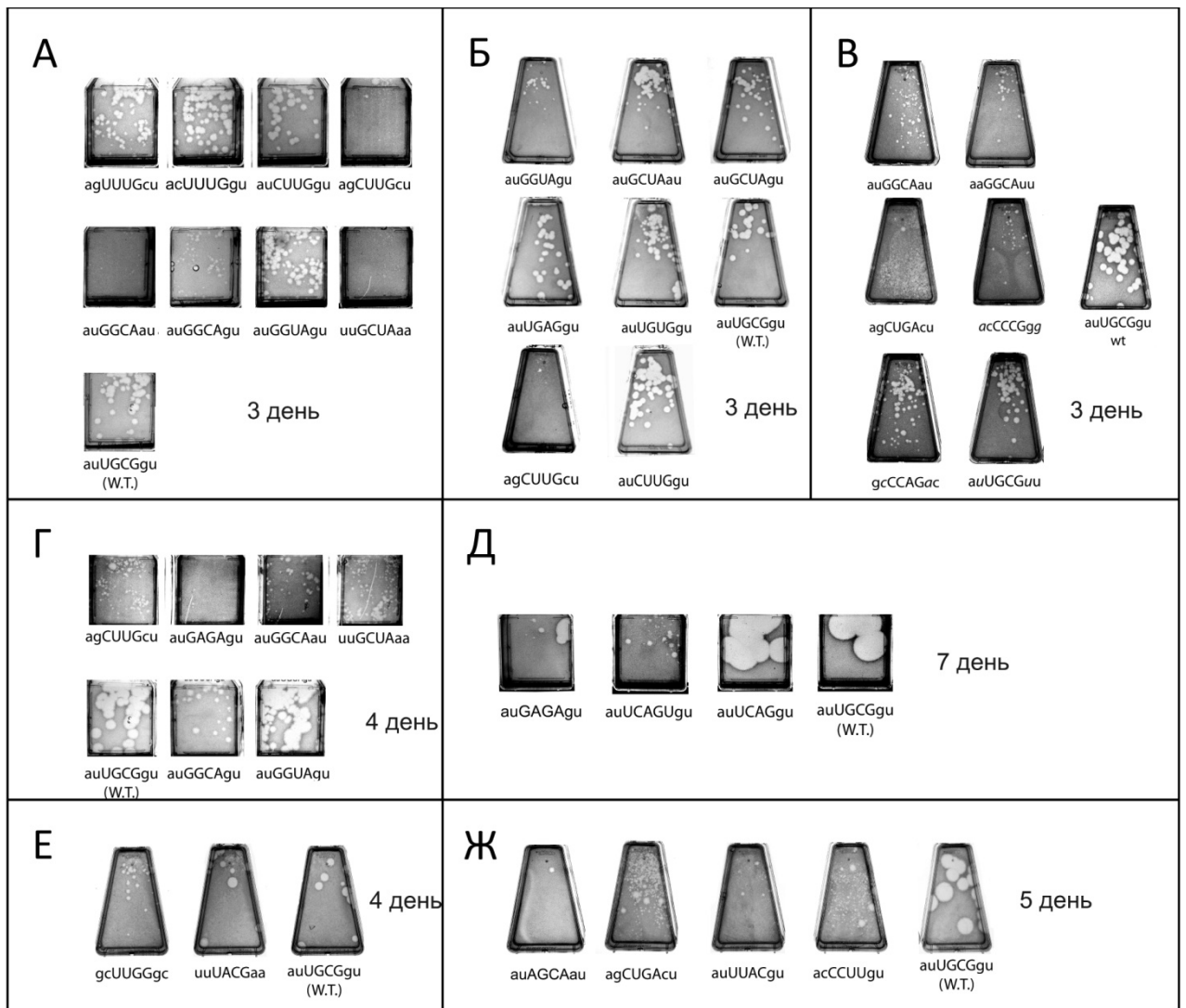


Рисунок 4 Бляшечный фенотип после трансфекции полногеномными транскриптами, содержащие различные замены в апикальном участке домена d oriL. Указан день после трансфекции.



Таблица 4 Бляшечный фенотип, удельная инфекционность и генетическая стабильность сконструированных геномов

N	Последовательность тетрапеты и фланкирующих пар	Размер бляшек <sup>а</sup>	Относительная удельная инфекционность <sup>б</sup>	Изменения после пассажей		Структура
				в домене d	в 3С	
<b>Консенсус YNMG, спаренные фланкирующие пары</b>						
1	auUGCGgu (w.t.)	крупные	1	нет		UNCG
2	agUGCGcu	крупные	нет данных	нет данных		неизвестно
3	uuUACGaa	крупные	нет данных	нет данных		неизвестно
4	auUCAGgu	крупные	0.2	нет данных		неизвестно
5	auUGAGgu	крупные	1	нет данных		неизвестно
<b>Консенсус YNMG, разрушенная фланкирующая пара</b>						
6	auUGCGuu	крупные	нет данных	aaUGCGuu <sup>в</sup>	нет	неизвестно
7	acCCCGgg	маленькие	нет данных	acCCCGgu	нет	неизвестно
8	gcCCAGac	средние	нет данных	gcCCAGgc	нет	неизвестно
<b>Консенсус YNUG</b>						
9	auUGUGgu	крупные	1	нет данных		неизвестно
10	acUUUGgu	крупные	0.3	нет	нет данных	UNCG
11	agUUUGcu	средние	0.3	нет	нет данных	неизвестно
12	auCUUGgu	крупные	0.8	нет	нет	неизвестно
13	agCUUGcu	heterogeneous	0.2	agUUUGcu или agCUCGcu	нет	gCUUGc
<b>Консенсус GSYA</b>						
14	auGGCAau	точечные	0.3	нет	T154I	неизвестно
15	aaGGCAuu	маленькие	нет данных	нет	T154I	неизвестно
16	auGGCAgu	маленькие	0.5	нет	нет данных	неизвестно
17	auGGUAgu	средние	0.7	нет	нет данных	неизвестно
18	auGCUAgu	крупные	0.2	нет	нет	UNCG
19	uuGCUAaa	точечные	1.1	нет	T154I или K156R	неизвестно
20	auGCUAau	крупные	0.1	нет	нет данных	неизвестно
<b>Структурный класс GNRA и его ревертант</b>						
21	auGAGAggu	<u>точечные</u> на 4-6 день п.т.	0.005	auGAUAgu	нет	GNRA
22	auGAUAgu	средние	0.7	нет	нет	неизвестно
<b>Другие тетрапеты</b>						
23	agCUGA <u>cu</u>	гетерогенные	не определяли	agCUCGcu или T154I		unknown
24	auUUAC <u>gu</u>	гетерогенные	не определяли	auUUAGgu	нет данных	неизвестно
25	gcUUUG <u>gc</u>	маленькие	не определяли	gcUUUGgc	нет данных	неизвестно
26	auGCAC <u>au</u>	маленькие	не определяли	нет	T154I	неизвестно
<b>Пентапета UCAGU</b>						
27	auUCAG <u>ugu</u>	<u>точечные</u> на 4-6 день п.т.	0.04	нет	T154I, P89S +T154I, P89T, P2S, N34H	UNCG- подобная с выплетным основанием 5го нуклеотида

а - размер бляшек на третий день после трансфекции, если не указано иное

б - удельная инфекционность, нормализованная на удельную инфекционность полногеномного транскрипта полиовируса штамма Mahoney

в – жирным шрифтом выделены измененные нуклеотиды

### Эффективность синтеза дочерних копий РНК у сконструированных вариантов.

Мы предполагали, что наблюдаемые фенотипы исследованных вариантов обусловлены эффективностью взаимодействия *oriL* с вирусным белком 3CD, и, соответственно, эффективностью репликации. Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали кинетику накопления вирусной РНК для различных вирусных вариантов (Рисунок 5). Для этого

транскрипты, содержащие соответствующие мутации, были использованы для трансфекции культуры клеток *Vero*. Количество копий вирусной (+)РНК определяли в тотальной РНК, выделенной из трансфицированной культуры клеток на 0, 10, 12, 16, 20 и 24 часа после трансфекции.

Эффективность репликации исследуемых вариантов коррелировала с их бляшечным фенотипом, что позволяет нам сделать заключение, что эффективность репродукции мутантов обусловлена именно этим этапом вирусного цикла. Так, варианты, имеющие крупнобляшечный фенотип (uGCUAg, uUGAGg, uUGUGg, uGGUAg, uCUUGg), демонстрируют высокую эффективность накопления дочерних копий РНК, сравнимую с таковой для контрольного транскрипта (Рисунок 5, А, Б, В).

Представители пространственных структурных классов тетрапетель GNRA (GAGA) и gCUUGc, напротив, не могли поддерживать эффективную репликацию (Рисунок 5 Б, В). Вариант, содержащий тетрапетлю GAUA – тетрапетля псевдоревертанта полиовируса с тетрапетлей GAGA, – реплицировался значительно эффективнее, чем полиовирус с тетрапетлей GAGA (Рисунок 5 В). Геном, содержащий тетрапетлю CUUG с прилегающей спиралью дикого типа au-gu, в отличие от генома с октануклеотидом agCUUGcu, реплицировался на уровне контрольного транскрипта (Рисунок 5 Б).

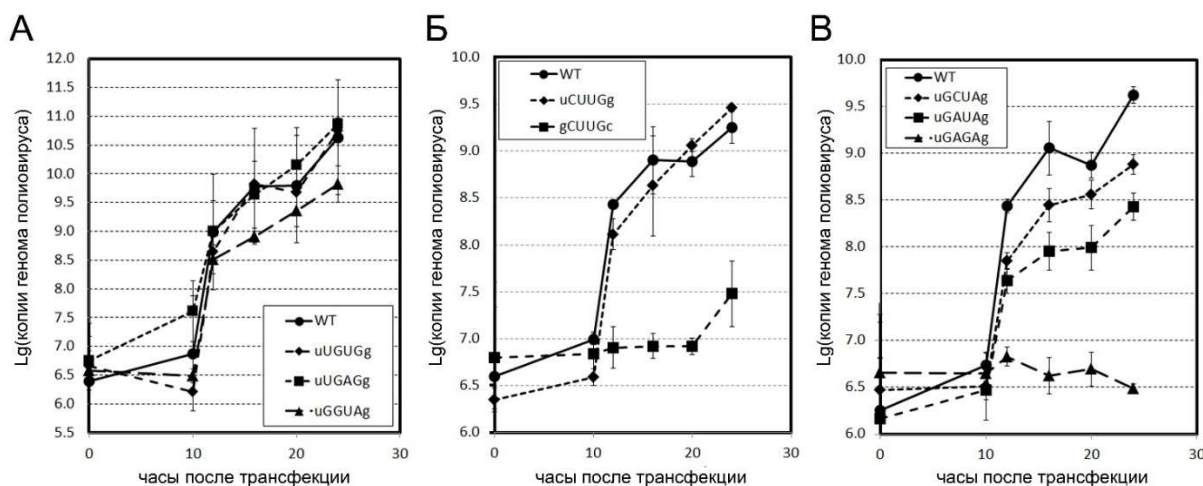


Рисунок 5. Кинетика накопления дочерних вирусных геномов. В каждой точке указано среднее квадратичное отклонение. А – эффективность репликации вариантов с последовательностями uUGUGg, uUGAGg и uGGUAg; Б – эффективность репликации вариантов с последовательностями gCUUGc и uCUUGg; В – эффективность репликации вариантов с пространственными структурами GNRA (GAGA) и UNCG (GCUA) в апикальном участке домена d.

**Влияние пространственной структуры апикального участка домена d *oriL* на эффективность его взаимодействия с рекомбинантным белком ЗСД.** Для оценки эффективности взаимодействия различных мутантных *oriL* с очищенным методом Ни-хелатной хроматографии рекомбинантным белком ЗСД использовали РНК-транскрипты, соответствующие первым 113 положениям генома полиовируса с внесенными мутациями. Визуализацию комплексов после ЭФ в не денатурирующем 6%-ном ПААГ осуществляли двумя методами: 1) окраска РНК бромистым этидием и 2) окраска белка ЗСД методом Western-blot с использованием антител к препарату рекомбинантного ЗСД, полученных в мышах. Мы наблюдали образование двух комплексов с различной электрофоретической подвижностью (Рисунок 6). Чтобы выяснить, не является ли какой-либо из наблюдаемых комплексов неспецифическим комплексом с белками *E.coli*, был поставлен аналогичный эксперимент с лизатом *E.coli*, трансформированным пустым вектором pQE60. Приготовление лизата и стадии очистки, соответствовали таковым при выделении рекомбинантного ЗСД. В экспериментах с таким лизатом наблюдалось эффективное формирование нижнего комплекса без формирования верхнего комплекса. Таким образом, нижний комплекс является неспецифическим комплексом с соочищающимся белком *E.coli*. Чтобы подтвердить, что верхний комплекс является специфическим, были поставлены дополнительные эксперименты. Верхний и нижний комплексы были вырезаны и полученные куски геля были помещены в лунки денатурирующего ПААГ для электрофореза по Лэммли. По окончании электрофореза методом Вестерн-блот с сывороткой мыши, полученной после серии иммунизаций препаратом рекомбинантного ЗСД, в соответствующих дорожках был обнаружен белок, подвижность которого соответствовала белку ЗСД (Рисунок 6). В аналогичных условиях в экспериментах с *oriL*, содержащим в апикальном участке домена d тетрапетлю GAGA, ЗСД обнаружено не было (Рисунок 7).

Наличие ЗСД в вырезанном из геля комплексе было дополнительно подтверждено методом MALDI—MS (масс-спектрометрия выполнена Серебряковой М.В. в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ).

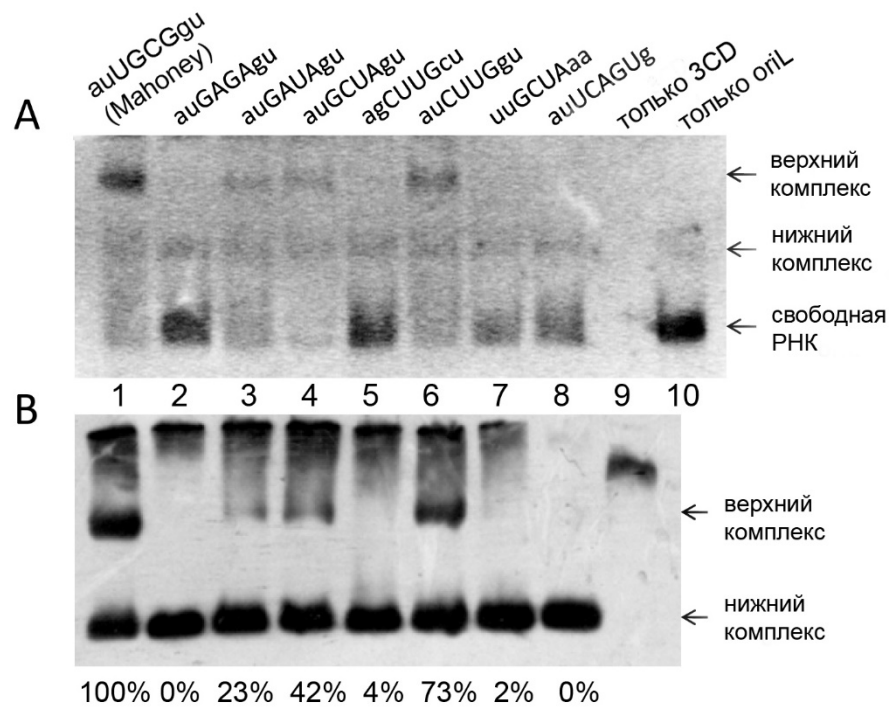


Рисунок 6. Электрофореграмма эксперимента EMSA (Electrophoretical mobility shift assay). А - окраска бромистым этидием. В – EMSA и последующим Western-blot с сывороткой, полученной в мышцах к препарату рекомбинантного 3CD. Цифры под панелью В – относительное количество комплекса, определенное денситометрически.

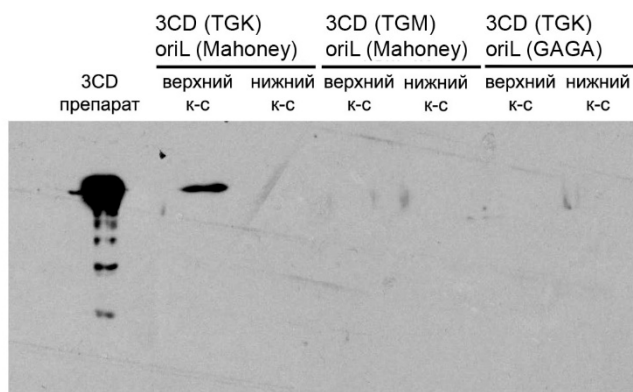


Рисунок 7. Электрофорез и последующий Western Blot белков, содержащихся в вырезанных после EMSA комплексах. Для эксперимента были использованы препараты 3CD дикого типа или с аминокислотной заменой Lys<sub>156</sub>Met (соответствующий белок 3CD не имеет РНК-связывающей активности, не опубликовано) и препараты *oriL* с тетрапетлей дикого типа либо с тетрапетлей GAGA.

Эффективность взаимодействия *oriL* с различными тетрапетлями в апикальном участке домена d коррелирует с эффективностью репликации соответствующих вариантов и их фенотипом. В этих экспериментах *oriL*, содержащий тетрапетли с пространственными

структурами GNRA или gCUUGc, практически не связывается с рекомбинантным белком 3CD (Рисунок 6, дорожки 2 и 5;). Напротив, *oriL*, содержащая тетрапетлю, имеющую свойства структурного класса UNCG – GCUA - связывается с 3CD, хотя и менее эффективно, чем контрольный *oriL*, соответствующий таковому штамма Mahoney (Рисунок 6, дорожка 4). Эффективность связывания резко падает при введении фланкирующей пары uu-aa при тетрапетле GCUA (Рисунок 6, дорожка 7). Замена фланкирующей пары при тетрапетле CUUG с g-c на u-g восстанавливает эффективность связывания с 3CD (Рисунок 6, дорожка 6). Также, *oriL*, содержащий выпетленный пятый нуклеотид в апикальном участке домена d, не узнается рекомбинантным 3CD (Рисунок 6, дорожка 8). Эксперименты были повторены два раза (приведены данные одного опыта) с независимо полученными препаратами РНК и 3CD с одинаковым результатом. Таким образом, наблюдаемые блестящие фенотипы и эффективность репликации обусловлены эффективностью взаимодействия 3CD и *oriL*.

## Заключение

В данной работе продемонстрировано, что любое положение апикального октонуклеотида домена d *oriL* полиовируса может быть занято практически любым нуклеотидным остатком (кроме шестого положения, где не может быть U). При этом апикальный участок домена d *oriL* способен поддерживать эффективную репликацию в широком диапазоне последовательностей, из которого, однако, можно выделить консенсусы: nYNHGm (за исключением gCUUGc) и uGVUAg, где n и m – любые комплементарные нуклеотиды, H – любой нуклеотид, кроме G, V – любой нуклеотид, кроме U.

На основании наших данных мы можем оценить, какова будет вероятность сохранения фитнеса, сравнимого с диким типом, в случае одной мутации в тетрапетле, то есть уровень помехоустойчивости этого элемента. Для примера возьмем тетрапетлю полиовируса первого типа штамма Mahoney UGCG. Условия сохранения фенотипа дикого типа по нашим данным: первое положение занимает пиримидин, второе - любой нуклеотид, третье - не гуанозин, четвертое только гуанозин. Всего возможно 12 вариантов: по три замены на каждый нуклеотид. С учетом вышеописанных условий, 6 из них (50%) будут репродуцироваться с эффективностью полиовируса штамма Mahoney (CGCG, UACG, UCCG, UUCG, UGAG, UGUG). При этом любой из 12 вариантов будет жизнеспособным. Таким образом, наши данные демонстрируют высокий уровень помехоустойчивости апикального участка домена d: ни одна из возможных замен в нем не является летальной

для вируса. С другой стороны, известно, что у близких родственников полиовируса апикальная тетрапетля и ее прилегающая фланкирующая пара напрямую вовлечены во взаимодействие с белком 3CD и что это взаимодействие является одним из ключевых событий инициации репликации вирусного генома (Andino *et al.*, 1993; Gamarnik & Andino, 1998; Ohlenschläger *et al.*, 2004; Ihle *et al.*, 2005). Эти два факта предполагают, что последовательность этого элемента должна быть консервативна, что противоречит нашим результатам.

Мы считаем, что одной из причин, почему этот элемент сохраняет свою функциональность при значительных изменениях своей последовательности является то, что белок 3CD узнает скорее определенную пространственную структуру этого участка, а не специфическую последовательность нуклеотидных остатков.

Для тех тетрапетель, которые были обнаружены у вирусов, отобранных в наших экспериментах из набора со случайными последовательностями и способных к эффективной репродукции, для которых известна пространственная структура, она относится к классу UNCG (UGCG, UACG, UCAG, CCCG, UUCG, GCUA, UUUG) (Varani *et al.*, 1991; Abdelkafi *et al.*, 1998; Finger *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2004; Melchers *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2014).

Для того, чтобы оценить, могут ли тетрапетли с пространственной структурой, отличной от структуры класса UNCG, поддерживать эффективную репликацию вирусного генома, мы сконструировали геномы, содержащие тетрапетли классов GNRA и gCUUGc в апикальном участке домена d. Тетрапетли в апикальном участке домена d, принадлежащие к пространственным классам GNRA и gCUUGc, не способны поддерживать эффективную репликацию вирусного генома, хотя и не являются летальными и могут быть с разной эффективностью компенсированы заменами в белке 3C. Таким образом, наши данные подтверждают гипотезу о том, что пространственная структура апикальной тетрапетли домена d более значима для узнавания вирусным белком 3CD, чем ее последовательность. Известно, что пространственная структура класса UNCG может быть реализована очень широким набором нуклеотидных последовательностей (Petrov, Zirbel & Leontis, 2013). Таким образом, наличие именно этой пространственной структуры, по-видимому, определяет высокий уровень помехоустойчивости этого элемента.

## Выводы

1. Эффективная репродукция вируса полиомиелита с природной последовательностью 3С поддерживается множеством тетрапетель в апикальном участке домена d *oriL*, которое можно описать консенсусами: nYNHGm (за исключением gCUUGc) и uGVUAg, где n и m – любые комплементарные нуклеотиды, Н – любой нуклеотид, кроме G, V – любой нуклеотид, кроме U.
2. Исследованные тетрапетли в апикальном участке домена d, имеющие пространственную структуру класса UNCG, обеспечивают взаимодействие репликативного элемента *oriL* с вирусным белком 3CD и поддерживают эффективную репликацию вируса полиомиелита. Тетрапетли в апикальном участке домена d, имеющие пространственную структуру классов GNRA и gCUUGc, не обеспечивают взаимодействие репликативного элемента *oriL* с вирусным белком 3CD, и, соответственно, не могут поддерживать эффективную репликацию вируса полиомиелита. На основании этих данных может быть выдвинута гипотеза об первичном значении пространственной структуры апикального участка домена d *oriL* для взаимодействия с вирусным белком 3CD.
3. Аминокислотная замена Thr<sub>154</sub>Ile в белке 3С может компенсировать различные нарушения структуры апикального участка домена d и наличие тетрапетель, чья пространственная структура отличается от структуры класса UNCG.
4. Создана новая эффективная бактериальная система экспрессии и разработана методика получения (выделения и очистки) высокоэффективного вирусного рекомбинантного белка 3CD.

**Результаты были представлены на пяти международных конференциях.**

**Maria Prostova**, Elena Smertina, Denis Bakhmutov, Elena Khitrina, Anatoliy Gmyl, Vadim Agol, Marina Kolesnikova. *Requirements for recognition of the replicative element oriL of poliovirus RNA by the viral protein 3CD*. RNA 2016: The 21st Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japan; 07/2016

Yakovenko M., Gmyl A.P., **Prostova M.A.**, Sherstyuk A., Ivanova O., Ereemeeva T., Isaeca O., Agol V.I.. *Innocent VDPV? Preliminary results of investigation of vaccine - derived poliovirus with unusual genetic properties*. EUROPIC 2012; XVII Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Saint Raphaël, France, 3-7 June 06/2012

**Maria Prostova**, Anna Shishova, Ilya Belalov, Backhmutov Denis, Anatoly Gmyl, Elena Khitrina, William Melchers, Jan Zoll, Hans Heus. *Structure-function characterization of poliovirus RNA-element*. 4th Berlin Summer Meeting Computational and experimental molecular biology "From RNA to Protein and beyond"; 06/2011

**Maria Prostova**, Shishova Anna, Backhmutov Denis, Anatoly Gmyl, Elena Khitrina, William Melchers, Jan Zoll, Hans Heus, Vadim Agol: *Role of the terminal tetraloop of domain d of replicative cis-acting element oriL of poliovirus genome and its flanking base pairs in oriL-3Cd recognition*. EUROPIC 2010; XVth Meeting in St. Andrews, Scotland; 09/2010

**Maria Prostova**, Bakhmutov D.V., Gmyl A.P., Khitrina E.V., Melchers W.J.G., Hues H.A., Agol V.I.: *Requirements for optimal interaction of replicative cis-element oriL of poliovirus RNA with its protein ligand, protease 3CD*. EUROPIC 2008, XV Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Sitges Barcelona, Spain; 05/2008

### Публикации в журналах

По теме диссертации автором опубликовано 3 научных статьи в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus).

1. **Prostova, M. A.**, Deviatkin, A. A., Tcelykh, I. O., Lukashev, A. N. and Gmyl, A. P. (2017) 'Independent evolution of tetraloop in enterovirus oriL replicative element and its putative binding partners in protein 3C'. *PeerJ*: 5:e3896, doi: 10.7717/peerj.3896.
2. **Prostova, M. A.**, Gmyl, A. P., Bakhmutov, D. V, Shishova, A. A., Khitrina, E. V, Kolesnikova, M. S., Serebryakova, M. V, Isaeva, O. V and Agol, V. I. (2015) 'Mutational robustness and resilience of a replicative cis-element of RNA virus: promiscuity, limitations, relevance.', *RNA biology*, 12(12), pp. 1338–1354. doi:10.1080/15476286.2015.1100794.
3. Yakovenko, M. L., Gmyl, A. P., Ivanova, O. E., Eremeeva, T. P., Ivanov, A. P., **Prostova, M. A.**, Baykova, O. Y., Isaeva, O. V., Lipskaya, G. Y., Shakaryan, A. K., Kew, O. M., Deshpande, J. M. and Agol, V. I. (2014) 'The 2010 outbreak of poliomyelitis in Tajikistan: epidemiology and lessons learnt.', *Euro surveillance : European communicable disease bulletin*, 19(7), p. 20706. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.7.20706.