

Потапова У.В.¹, Феранчук С.И.^{1,2}, Беликов С.И.¹, Леонова Г.Н.³

Сравнительный анализ белка NS5 штаммов трёх субтипов вируса клещевого энцефалита

¹ ФГБУН Лимнологический институт СО РАН
(664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, Россия)

² ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет»
(664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, Россия)

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»
(690087, г. Владивосток, Сельская ул., 1, Россия)

Резюме

Неструктурный белок 5 (NS5) вируса клещевого энцефалита является ферментом, который отвечает за копирование вирусной РНК и по трёхмерной структуре имеет сходство с РНК-полимеразами других вирусных семейств. Вирус клещевого энцефалита разделяется на три субтипа, различающиеся некоторыми из аминокислотных остатков в белках вируса, в том числе в белке NS5. Методы структурной биоинформатики позволяют реконструировать трёхмерную структуру белка NS5 для различных субтипов вируса.

В работе выполнен сравнительный анализ последовательностей белка NS5 для трёх субтипов вируса и были определены участки белка, в которых проявляется наибольшее различие между субтипами и внутри субтипов. «Зоны накопления мутаций», определённые таким образом, локализованы в домене метилтрансферазы, зоне междоменного интерфейса и трёх субдоменах домена полимеразы белка NS5. Обнаружена связь положения мутаций в белке NS5 с подвижностью участков белка в трёхмерной модели, определённых с помощью метода нормальных мод. А именно наиболее важные мутации локализованы в зонах, где наиболее велика амплитуда коллективных синхронных колебательных движений обоих доменов белка: во втором кармане связывания иона цинка в домене полимеразы, области N-концевого удлинения в междоменной зоне и области окружения активного центра домена метилтрансферазы.

Ключевые слова: субтипы вируса клещевого энцефалита, белок NS5, структура белка

Для цитирования: Потапова У.В., Феранчук С.И., Беликов С.И., Леонова Г.Н. Сравнительный анализ белка NS5 штаммов трёх субтипов вируса клещевого энцефалита. Acta biomedica scientifica, 2018, 3 (6), 36-47, DOI 10.29413/ABS.2018-3.6.5.

Comparative Analysis of NS5 Protein for Tick Borne Encephalitis Virus Strains in three Virus Subtypes

Potapova U.V.¹, Feranchuk S.I.^{1,2}, Belikov S.I.¹, Leonova G.N.³

¹ Limnological Institute SB RAS
(ul. Ulan-Batorskaya 3, Irkutsk 664033, Russian Federation)

² Irkutsk National Research Technical University
(ul. Lermontova 83, Irkutsk 664074, Russian Federation)

³ G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology
(Selskaya ul. 1, Vladivostok 690087, Russian Federation)

Abstract

Non-structural protein 5 (NS5) of tick-borne encephalitis virus is an enzyme which is responsible for a copying of viral RNA, and it has a strong structural similarity to RNA polymerases of another RNA virus families. The strains of the virus are separated into three subtypes, which differ by specific mutations in virus proteins, including NS5 protein. The methods of structural bioinformatics allow to construct a model of NS5 protein for several strains of the virus.

The paper presents the comparative analysis of sequences and structures of NS5 protein, for three subtypes of the tick-borne encephalitis virus. The segments of protein were identified where the highest difference between subtypes and within subtypes is observed. These segments, where most of the mutations are accumulated, are located in methyltransferase domain, in the inter-domain interface, and in the three subdomains of polymerase domain. The association between the locations of mutations in NS5 protein and the flexibility of a protein backbone was observed using normal mode analysis. Namely, the most important mutations are located in the parts of protein where the amplitude of synchronous oscillations estimated using normal mode analysis is the highest: in the second zinc binding pocket within polymerase domain, in the N-terminal extension within inter-domain interface, and around an active site of methyltransferase domain.

Key words: subtypes of tick-borne encephalitis virus, NS5 protein, protein structure

For citation: Potapova U.V., Feranchuk S.I., Belikov S.I., Leonova G.N. Comparative analysis of NS5 protein for tick borne encephalitis virus strains in three virus subtypes. Acta biomedica scientifica, 2018, 3 (6), 36-47, DOI 10.29413/ABS.2018-3.6.5.

изучения [7]. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) также относится к роду *Flavivirus*, и проблема поиска лекарственных средств против клещевого энцефалита (КЭ) считается важной задачей в биомедицинских исследованиях.

На территории России циркулирует три субтипа вируса КЭ, названные в соответствии с ареалом их распространения – европейский (I), дальневосточный (II) и сибирский (III) субтипы [8, 34]. Для исследования генетических и молекулярных механизмов патогенности была выбрана коллекция дальневосточных штаммов вируса КЭ. Данная коллекция штаммов уникальна, так как все штаммы были собраны одним и тем же исследователем на юге Дальнего Востока, причём случаи заболевания, вызванные различными вариантами вируса дальневосточного субтипа, варьируют от субклинических до летальных форм [20]. При анализе полных геномов двух групп штаммов разных по патогенности установлено, что они содержат специфичные характерные мутации, приводящие к 4 заменам аминокислот в вирусном белке NS5, а также к заменам в некоторых других вирусных белках [1].

Центральным белком репликации вируса КЭ является полидоменный белок NS5, выполняющий ряд основных функций при размножении вируса в организме хозяина [6]. Флавивирусный полноразмерный белок NS5, обладающий различными первичными ферментативными активностями, содержит N-концевой домен метилтрансферазы (Mtase), междоменную область (Inter-Domain Interface, IDI) и C-концевой домен РНК-зависимой РНК полимеразы (RdRp).

В ранних работах были найдены и достаточно полно охарактеризованы консервативные мотивы, общие для флавивирусных последовательностей RdRp [38]. Пять из них традиционно обозначаются как А, В, С, D, Е. Позднее были обнаружены эволюционно консервативные мотивы, названные G и F [3, 24, 31]. При изучении биологической последовательности белка NS5 всех крупных представителей флавивирусов обнаружена также высококонсервативная протяжённая область 752–771, названная мотивом Н, функциональная роль которой в настоящий момент пока не определена. Известно, что мотив G играет критическую роль в связывании и/или транслокации цепи шаблона РНК [37], а функциональная роль и точные границы мотива F были определены нами сравнительно недавно. В результате молекулярно-динамических экспериментов обнаружено, что мотив F служит пространственным переключателем между полимеразной и метилтрансферазной активностью флавивирусного белка NS5 [28].

Различные полимеразы флавивирусов, включая полимеразу вируса КЭ, имеют общую архитектуру, традиционно сравниваемую с формой «правой руки», и содержат структурные субдомены, условно обозначенные как «ладонь» (palm), «пальцы» (fingers) и «большой палец» (thumb) [17]. Второй домен белка NS5 имеет активность метилтрансферазы, которая необходима для кэпирования вирусной РНК [18].

Впервые кристаллическая структура флавивирусного домена Mtase была определена в 2002 г. [9], тогда как первая структура флавивирусного домена

RdRp определена позднее [25, 38]. Пространственная структура полноразмерного белка NS5 определена на примере вируса японского энцефалита сравнительно недавно [24]. Благодаря кристаллографическим исследованиям установлено, что флавивирусный домен полимеразы связывается с ионом Mg, участвующим в катализе, а также с двумя ионами Zn. При этом ионы Zn расположены в двух специфических сайтах связывания в субдоменах «палец» и «большой палец» [38]. Предположительно ионы цинка выполняют роль стабилизации структуры и регулируют переключение между открытой и закрытой конформацией туннеля для входа вирусной РНК в активный центр домена полимеразы (<https://www.biorxiv.org/content/early/2016/07/10/063024>) [29].

Репликация РНК вируса включает несколько обязательных этапов, в которые вовлечены оба домена белка NS5. Вопросы относительной пространственной ориентации доменов и их возможной перегруппировки на разных стадиях репликации вируса являются предметом постоянных дискуссий [4, 25]. Этот вопрос остался открытым даже после того, как были получены кристаллические структуры полноразмерного белка с двумя возможными ориентациями доменов, описанных в экспериментах [24, 39]. Было предложено несколько моделей для взаимодействия между доменами NS5, чтобы объяснить движение РНК продукта в активный сайт Mtase [15, 16, 32, 33], однако большинство исследователей сходятся во мнении о том, что центральную роль в этом процессе выполняет междоменная область (IDI), которая из-за высокой подвижности остаётся мало изученной с помощью кристаллографических экспериментов [35, 37, 39].

Структурно в флавивирусной IDI области выделяют несколько значимых регионов. Это небольшой консервативный участок, названный «точка поворота» (Pivot), соответствующий остаткам 263–265 GTR. За ним следует участок под названием линкер 266–275; заканчивается IDI важным участком N-концевого удлинения (остатки 276–303) [23, 24]. Область N-концевого удлинения вместе со вставкой большого пальца, называемой петлёй прайминга (priming loop) (остатки 790–812), является общими добавочными участками для RdRP, которые инициируют синтез РНК de novo (в частности для семейства *Flaviviridae*), по сравнению с другими вирусными семействами, у которых эти вставки и удлинения отсутствуют [5, 21, 25, 38].

Известно, что крупные перестройки в белке NS5 происходят не только за счёт области линкера, состоящей всего из 10 остатков, но и за счёт N-концевого удлинения – достаточно протяжённого участка, состоящего из 28 остатков [24]. Область N-концевого удлинения обеспечивает дополнительную гибкость на стыке доменов Mtase и RdRP и часто рассматривается как часть домена Mtase [26, 30]. В результате исследований по направленному мутагенезу обнаружено, что мутации в четырёх последних остатках 300–303 O-концевого удлинения приводят к уменьшению полимеразной активности до 40–70 % [30]. Функциональное значение зоны O-концевого

удлинения и всей междометной области в целом до конца не установлены. Существует предположение, что универсальность взаимодействий, возможных благодаря возникновению N-концевого удлинения в флавивирусном белке NS5, может значительно увеличить пространственную свободу для размещения домена Mtase относительно основного домена RdRP, что позволяет двум доменам принимать радикально отличные относительные ориентации в пространстве для переключений ферментативной активности [24].

В ходе исследований, касающихся сравнения белка NS5, у трёх субтипов вируса КЭ было обнаружено несколько интересных особенностей. Как оказалось, между последовательностями этого белка для дальневосточного, сибирского и европейского субтипов существует три полных субтипоспецифичных мутации, одна из которых расположена в зоне N-концевого удлинения. Вторым немаловажным фактом является то, что вся междометная область белка NS5 для трёх субтипов вируса КЭ изобилует мутациями, частично разделяющими субтипы, по сравнению с функциональными доменами белка, где подобные мутации встречаются значительно реже.

Из данных наблюдений возникла идея детально рассмотреть всю последовательность белка NS5 для трёх субтипов вируса КЭ и выявить эволюционные особенности и функциональные закономерности, присущие этим близкородственным группам штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ были включены депонированные нуклеотидные последовательности штаммов трёх субтипов ВКЭ из банка данных NCSA при использовании программных инструментов на языке Python и пакета Biopython. Всего было проанализировано 216 штаммов вируса, представленных как полные геномы, из них 109 относились к сибирскому субтипу, 70 – к дальневосточному, 37 – к европейскому. Для определения позиций аминокислотных замен использовались пакеты Mafft для построения множественного выравнивания [14] и специально разработанные вспомогательные программы и скрипты на языках программирования C++ и Python (https://github.com/sferanchuk/tbev_ns5). Фрагменты полипротеина разных штаммов, соответствующие белку NS5, были определены на основании выравнивания последовательностей полипротеина и аннотации положения отдельных белков в полипротеине относительно дальневосточного штамма Dal'negorsk. Среди проанализированных штаммов были отобраны штаммы, использованные для представления результатов: 28 – из дальневосточного субтипа, 6 – из сибирского, 7 – из европейского. Были рассчитаны позиции аминокислотных замен в полных выборках штаммов для каждого субтипа, критериями для отбора штаммов в рамках субтипа являлись наличие наиболее характерных аминокислотных замен и дополнительные факторы, такие как источник и место выделения вируса.

Отобранные штаммы использовались для построения сводного множественного выравнивания и филогенетического анализа. Оценка статистической

значимости гипотезы, предполагающей связь наличия мутаций с разделением штаммов на две группы, проводилась с помощью «точного теста Фишера». Филогенетическое дерево было рассчитано с помощью пакета FastMe методом neighbour-joining [11]. Для расчётов частично использовался веб-интерфейс, реализованный на сайте <http://bri-shur.com>. Для визуализации филогенетического дерева использовался пакет Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Для визуализации трёхмерных структур белков использовался пакет NCSA Chimera [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании основное внимание было сосредоточено на обсуждении различий штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа, так как исследовательской задачей было обнаружение молекулярно-генетических особенностей белка NS5, гипотетически коррелирующих с различной патогенностью штаммов для человека. Хотя бесспорно определённый интерес вызывает и изучение штаммов ВКЭ сибирского и европейского субтипов, способное дополнить и расширить представление о роли эволюционно значимых мутаций в ключевом белке репликации вируса КЭ.

Известно, что основным переносчиком в природе штаммов дальневосточного и сибирского субтипов является таёжный клещ *Ixodes persulcatus*, границы обитания которого проходят от Восточной Европы и Сибири до Китая и Японии, а также он обнаружен на западном побережье Финляндии [13]. Основным переносчиком штаммов Европейского субтипа служит европейский лесной клещ *Ixodes ricinus*, обитающий в континентальной Европе и на Британских островах. Штаммы дальневосточного и сибирского субтипов предположительно развивались в течение длительного времени, по сравнению со штаммами европейского субтипа [22]. Территория распространения обоих видов клеща весьма обширна, но при этом идентичность нуклеотидных последовательностей штаммов внутри европейского субтипа значительно выше, чем у штаммов дальневосточного и сибирского субтипов, и составляет от 96 до 99 % в различных участках генома [12]. Причём столь низкая генетическая вариабельность внутри штаммов европейского субтипа не имеет корреляции с географическим ареалом обитания клеща и временем изоляции штамма, поэтому и для филогенетического анализа, и для сравнительного анализа последовательностей белка NS5 были использованы как прототипные, так и современные штаммы европейского субтипа, выделенные из клещей и мозга мышей с территорий Финляндии и Германии (рис. 1, 2).

В связи с тем, что для штаммов европейского субтипа нет достаточных сведений о различиях в патогенности для человека, данный параметр при филогенетическом анализе не учитывался.

Напротив, внутри сибирского субтипа генетическая вариабельность значительно выше, и прослеживается зависимость от географического местобитания клеща [10], а также существуют сведения о патогенности некоторых штаммов для человека [19].

Поэтому учитывая оба этих параметра, для первого обзорного этапа исследования взят широкий спектр современных штаммов, изолированных в последние десятилетия из клеща, из крови и мозга людей с территорий Восточной и Западной Сибири и Монголии (рис. 1).

Все штаммы коллекции вируса КЭ дальневосточного субтипа являются патогенными для человека, однако вызвали различную тяжесть заболевания. Часть штаммов была выделена из крови пациентов, инфицированных вирусом КЭ, но не имевших клинических проявлений инфекции (обозначенные как sfd

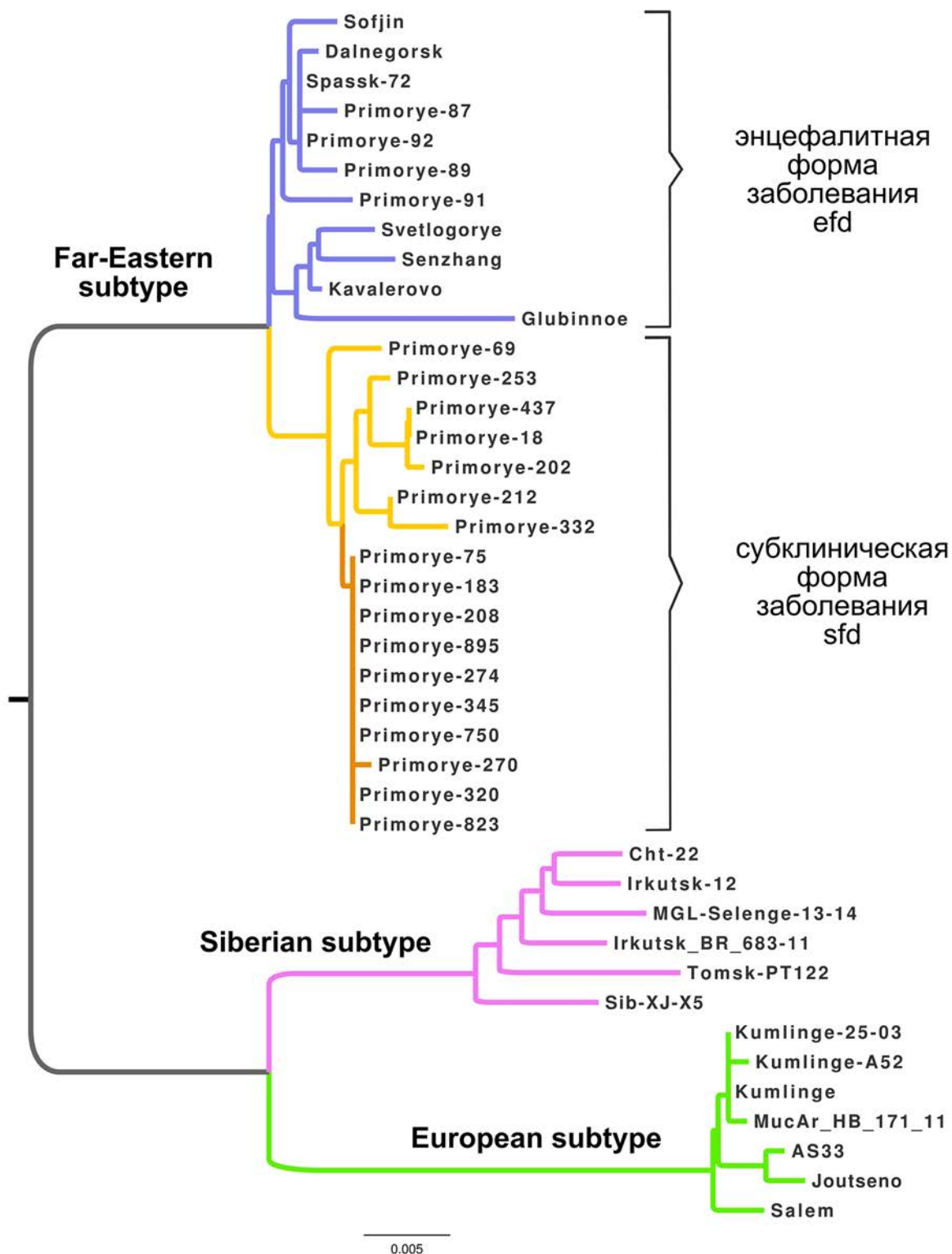


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения аминокислотных последовательностей полноразмерного белка NS5 исследованной коллекции штаммов дальневосточного субтипа вируса КЭ с включением ряда штаммов сибирского и европейского субтипов.

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed from full-length NS5 protein sequences of the Far-East TBEV strains collection, with the addition of several selected strains of Siberian and European subtype.

– субклиническая форма заболевания). Вторая часть штаммов выделена из мозга людей, умерших от энцефалита с очаговыми формами. Эта группа штаммов условно обозначена как *efd* – энцефалитная форма заболевания (рис. 1) на основании сходства симптомов у заболеваний, характерных для этих штаммов [1]. Для детального сравнительного анализа последовательности белка NS5 выбраны штамм из этих двух групп.

Существует и третья группа штаммов, которая вызвала лихорадочную форму заболевания (*ffd*), являясь промежуточным эволюционным звеном между группами *efd* и *sfd*. Группа *ffd* не образует отдельный кластер на филогенетическом древе и была детально описана в предыдущей работе авторов [1]. Несмотря на то, что для группы *ffd* точно охарактеризована тяжесть индуцированного заболевания у человека, штаммы этой группы не имеют чётко очерченного набора группоспецифичных замен и потому выпущены из анализа в данной работе.

Группы *efd*- и *sfd*-штаммов изолированы в Хабаровском и Приморском крае, однако чёткой корреляции между географическим ареалом распространения и патогенностью штаммов для человека не прослеживается (рис. 1).

При анализе полных геномов *efd*- и *sfd*-штаммов установлено, что они содержат 17 специфичных мутаций, приводящих к значимым заменам аминокислот в вирусных белках NS3 и NS5 [1]. Причём 4 группоспецифичные мутации локализованы в домене полимеразы неструктурного белка NS5, и 2 мутации локализованы в домене протеазы белка NS3. В то время как роль мутаций в белке NS3 на примере штаммов Dal'negorsk и Pymogye-270 описана в предыдущей работе авторов [29], предстояло выяснить функциональное значение и провести сравнительный анализ мутаций в белке NS5 на примере тех же классических штаммов.

По результатам филогенетического анализа белка NS5 достаточно широкого спектра штаммов, изолированных из разных географических мест в разные годы и выделенных из различных биологических объектов (клещ, мышь, человек), становится ясно, что независимо от этих параметров субтипы вируса КЭ образуют три отдельные филогенетические клады.

Причём, как показывает сравнительный анализ последовательности белка NS5 трёх субтипов вируса КЭ, существует определённый набор субтипоспецифичных мутаций, частично совпадающих с группоспецифичными мутациями в штаммах дальневосточного субтипа, которые и определяют разделение их на три кластера филогенетического древа (рис. 1).

Сравнительный анализ полноразмерного белка NS5 был проведён на примерах представителей (по два штамма на субтип), что показано на рисунке 2.

Изучение первичной и третичной структуры белка NS5

Исходя из сравнительного анализа выравнивания белка NS5, можно сказать о том, что существует 6 видов мутаций, из которых, не считая единичных, 5 типов статистически значимых мутаций: субтипоспецифичные – однозначно разделяющие штаммы по субтипу, комбинированные – субтипоспецифичные мутации, совпадающие с группоспецифичными по

дальневосточному субтипу, сдвоенные сибирско-европейские, профильные мутации – характерные для каждого субтипа в отдельности, группоспецифичные – мутации внутри дальневосточного субтипа между *efd*- и *sfd*-штаммами (рис. 2).

Все 5 типов мутаций по большей части кластеризованы в определённых областях белка NS5, и лишь случайные одиночные мутации рассредоточены по неконсервативным участкам белка. При этом значимые мутации локализованы либо в непосредственной близости, в окрестности от консервативных функционально стабильных регионов: вблизи активного центра метилтрансферазы и карманов связывания молекулы РНК, кофакторов ГТФ и САХ, 7 консервативных мотивов А, В, С, D, F, G, H, а также петли Прайминга, добавочного региона для всего семейства *flaviviridae*, двух карманов связывания ионов цинка, – либо образуют большое скопление в зоне между доменами, которая также имеет консервативные участки и выполняет важную роль в перегруппировке доменов для переключения ферментативных активностей белка NS5 (рис. 3).

Исключением из этого правила являются мутации непосредственно внутри консервативного мотива Е, перекрывающегося со вторым карманом связывания иона цинка: здесь обнаружены и комбинированная, и сдвоенная мутации.

Одним из результатов исследования влияния группоспецифичных мутаций на функциональные особенности белка NS5, проведённого в работе [28] для дальневосточного субтипа, явилось наблюдение об изменении механизма перестроения доменов в белке, проявляющееся через зону междоменного интерфейса. Несмотря на то, что все группоспецифичные мутации локализованы в домене полимеразы и существенно удалены от междоменного региона, эффект изменения свойств зоны IDI был косвенно объяснён с помощью ряда вычислительных экспериментов, в том числе анализа нормальных мод (NMA), проведённых для структуры белка NS5.

При движении атомов в белке часто можно обнаружить «коллективные эффекты», или согласованные изменения конформации отдельных фрагментов белка. Метод анализа нормальных мод позволяет определить некоторые характерные согласованные движения атомов молекулы белка путём расчёта малых колебаний атомов белка возле положения равновесия. Для белка NS5 наиболее важная степень свободы при колебаниях атомов («первая нормальная мода») состоит в одновременном смещении атомов в зонах локализации группоспецифичных мутаций и в зоне междоменного интерфейса. В целом проведённые в работе расчёты указывают на специфические различия между динамическими свойствами белка NS5 для двух исследованных штаммов вируса. Эти различия затрагивают, главным образом, междоменную зону, активный сайт метилтрансферазы и второй карман связывания иона цинка в домене полимеразы. Следует отметить, что описанные в настоящей работе различия между последовательностями белка NS5 в трех субтипах вируса также в основном относятся к

		47G/100V			
Dalnegorsk	GGSEGDTLGLDWKRLNCTKEEFFAYRRTGILETERDKARELLRR				KAYTIGGKGHETPKMVTSLGWNLIKFRAGMDV
Primor 270	GGSEGDTLGLDWKRLNCTKEEFFAYRRTGILETERDKARELLRR		Lys 61		KAYTIGGKGHETPKMVTSLGWNLIKFRAGMDV
Cht 22	GGSEGDTLGLDWKRLNCTKEEFFAYRRTGILETERDKARELLRR				KAYTIGGKGHETPKMVTSLGWNLIKFRAGMDV
Irkutsk_BR	GGSEGDTLGLDWKRLNCTKEEFFAYRRTGILETERDKARELLRR				KAYTIGGKGHETPKMVTSLGWNLIKFRAGMDV
Kumlinge	GGSEGDTLGLDWKRLNCTKEEFFAYRRTGILETERDKARELLRR		active site		KAYTIGGKGHETPKMVTSLGWNLIKFRAGMDV
MucAr_HB	GGSEGDTLGLDWKRLNCTKEEFFAYRRTGILETERDKARELLRR				RAYTIGGRGHEAPKMVTSLGWNLIKFRSGMDV

		180C/235N		237Q/260G	
Dalnegorsk	FSMQPHRADTIMCDIGESNPDAVVEGERTRKVILLMEQWKNRNPAT	Lys 183	I		VGTRCVVLAEDKVKKEKDVQERISALRE
Primor 270	FSMQPHRADTIMCDIGESNPDAVVEGERTRKVILLMEQWKNRNPAT		I		VGTRCVVLAEDKVKKEKDVQERISALRE
Cht 22	FSMQPHRADTIMCDIGESNPDAVVEGERTRKVILLMEQWKNRNPAT				VGTRCVVLAEDKVKKEKDVQERISALRE
Irkutsk_BR	FSMQPHRADTIMCDIGESNPDAVVEGERTRKVILLMEQWKNRNPAT				VGTRCVVLAEDKVKKEKDVQERISALRE
Kumlinge	FSMQPHRADTIMCDIGESNPDAVVEGERTRKVILLMEQWKNRNPAT				VGTRCVVLAEDKVKKEKDVQERISALRE
MucAr_HB	FSMQPHRADTIMCDIGESNPDAVVEGERTRKVILLMEQWKNRNPAT				VGTRCVVLAEDKVKKEKDVQERISALRE

		298E/357K		398E/420W	
Dalnegorsk	QYGETWHMDE				SSAKEAVEDPAFWQLVDEERERHL
Primor 270	QYGETWHMDE	end IDI			SSAKEAVEDPAFWQLVDEERERHL
Cht 22	QYGETWHMDE				SSAKEAVEDPAFWQLVDEERERHL
Irkutsk_BR	QYGETWHMDE				SSAKEAVEDPAFWQLVDEERERHL
Kumlinge	QYGETWHMDE	beta NLS			SSAKEAVEDPAFWQLVDEERERHL
MucAr_HB	QYGETWHMDE				SSAKEAVEDPAFWQLVDEERERHL

		446G/487F		528G/553Q		568T/633A	
Dalnegorsk	A	EALGFLNEDHWASRGSSGSGVEGISLNYLGWHLKGLSTLE		LLRYMEGEHKQLAA		SDAHNPRLLRVERWLR	
Primor 270	A	EALGFLNEDHWASRGSSGSGVEGISLNYLGWHLKGLSTLE	Zn1	LLRYMEGEHKQLAA		SDAHNPRLLRVERWLR	
Cht 22	A	EALGFLNEDHWASRGSSGSGVEGISLNYLGWHLKGLSTLE		LLRYMEGEHKQLAA		SDAHNPRLLRVERWLR	
Irkutsk_BR	A	EALGFLNEDHWASRGSSGSGVEGISLNYLGWHLKGLSTLE		LLRYMEGEHKQLAA	motif A	SDAHNPRLLRVERWLR	motif B
Kumlinge	M	EALGFLNEDHWASRGSSGSGVEGISLNYLGWHLKGLSTLN		LLRYMEGEHKQLAT		ADAHNPRLLRVERWLR	
MucAr_HB	M	EALGFLNEDHWASRGSSGSGVEGISLNYLGWHLKGLSTLN		LLRYMEGEHKQLAT		ADAHNPRLLRVERWLR	

		651H/670P		704W/723R		742S/780I	
Dalnegorsk	D	VDDRFKALYFLNMAKTRKDIGEWEHSAVGFSS		ALVPCRDQDELVGRARV		CSAVPVDWVPTGRTTWSIH	
Primor 270	D	VDDRFKALYFLNMAKTRKDIGEWEHSAVGFSS		SLVPCRDQDELVGRARV	Zn2	CSAVPVDWVPTGRTTWSIH	
Cht 22	E	VDDRFKALYFLNMAKTRKDIGEWEHSAVGFSS		ALVPCRDQDELVGRARV		CSAVPVDWVPTGRTTWSIH	
Irkutsk_BR	E	VDDRFKALYFLNMAKTRKDIGEWEHSAVGFSS		ALVPCRDQDELVGRARV		CSAVPVDWVPTGRTTWSIH	
Kumlinge	E	VDDRFKALYFLNMAKTRKDIGEWEHSAVGFSS		TLVPCRDQDELVGRARI	motif E	NSAVPVDWVPTGRTTWSIH	new H
MucAr_HB	E	VDDRFKALYFLNMAKTRKDIGEWEHSAVGFSS		TLVPCRDQDELVGRARI		NSAVPVDWVPTGRTTWSIH	

		804W/825M		856E/876G		878E/896L	
Dalnegorsk	ASGS	HSKEKIAEWRDVPYLPKSHDMLCSSLVGRK		Q		KLESSII	
Primor 270	ASGA	HSKEKITEWRDVPYLPKSHDMLCSSLVGRK		Q		KLESSII	
Cht 22	ASGA	QNKERVAEWRDIPYLPKSHDMLCSSLVGRK	priming loop	P	C-term normal mode	RLESSII	
Irkutsk_BR	ASGA	QNKERVAEWRDIPYLPKSHDMLCSSLVGRK		P		RLESSII	
Kumlinge	ASGA	QNKERVMEWRDVPYLPKSHDMLCSSLVGRK		P	alfa helix	RLESSII	
MucAr_HB	ASGA	QNKERVMEWRDVPYLPKSHDMLCSSLVGRK		P	C-end protein	RLESSII	

Рис. 2. Сравнительный анализ белка NS5 штаммов трех субтипов вируса КЭ. Границы доменов и субдоменов обозначены в соответствии со следующей цветовой схемой: циан – домен Mtase; синий – субдомен RdRP «пальцы»; зелёный – субдомен RdRP «ладонь»; красный – субдомен RdRP «большой палец». Абсолютно консервативные участки последовательности белка убраны, субтипоспецифичные мутации выделены чёрными блоками, комбинированные субтипоспецифичные мутации выделены красными блоками, сдвоенные мутации по сибирскому и европейскому субтипу отмечены красным жирным шрифтом и выделены серыми блоками, профильные мутации по субтипу отмечены чёрным жирным шрифтом и выделены серыми блоками в колонке выравнивания, одиночные мутации отмечены чёрным жирным шрифтом и выделены серыми блоками в единичной позиции.

Fig. 2. Comparative analysis of NS5 protein strains for three TBEV subtypes. Bounds of domains and subdomains in protein sequence are shown according to a following color scheme: cyan – Mtase; blue – RdRP “fingers” subdomain; RdRP; green – “palm” subdomain; red – RdRP, “thumb” subdomain. The segments of protein with a complete identity were removed. The mutations which separate all three subtypes are labeled with black background; the mutations specific for both subtype and groups are labeled with red background; the mutations duplicated in Siberian and European subtypes are labeled with bold red letters and gray background; the mutations specific for a subtype are labeled with bold black letters and gray column; the singleton mutations are labeled with bold black letters and gray background.

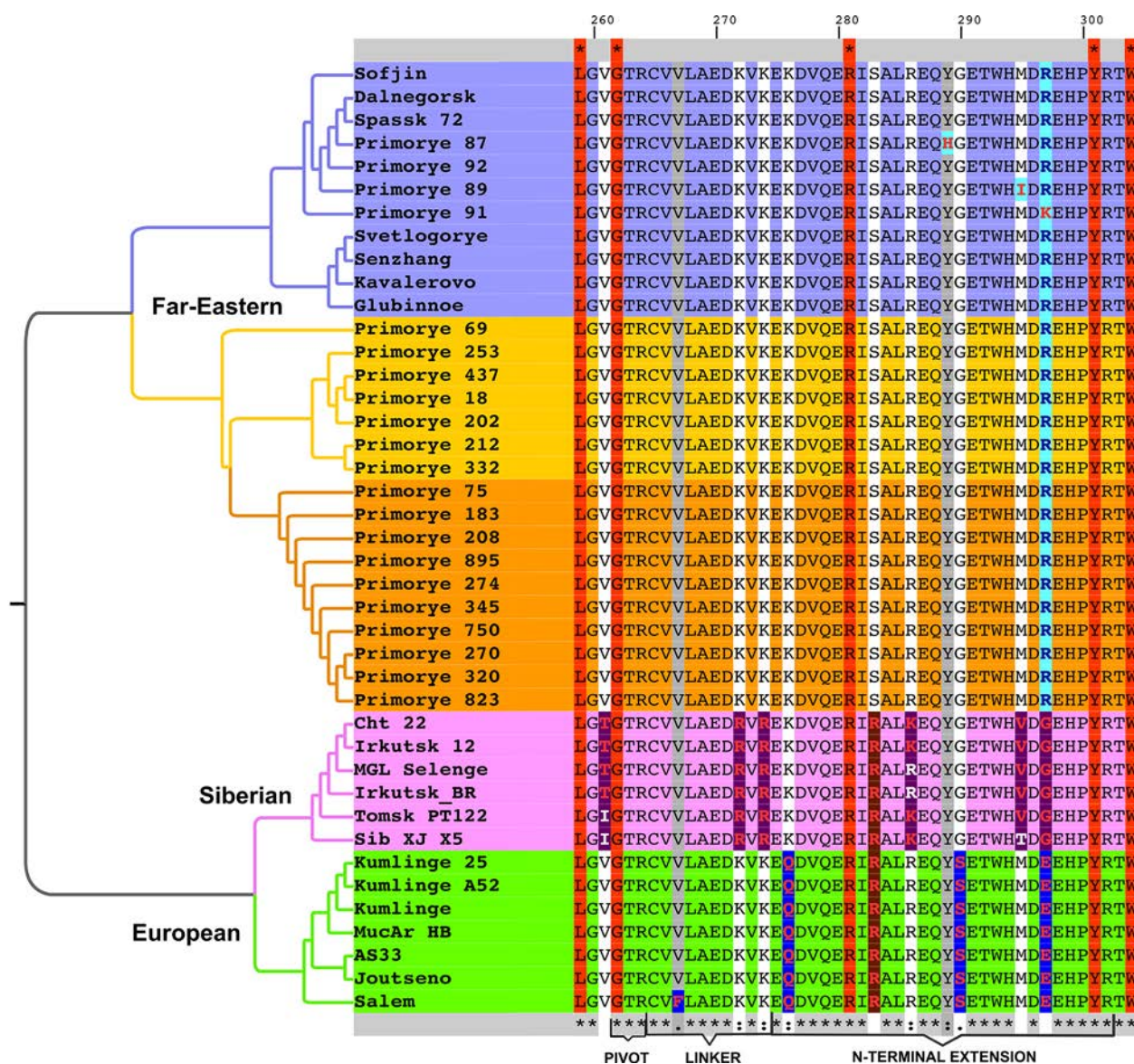


Рис. 3. Сравнение междоменной области в белке NS5 в трех субтипах вируса КЭ. Название штаммов перечислены в том же порядке что и на рисунке 1. Синий – efd-штаммы дальневосточного субтипа; светло- и темно- оранжевый – sfd-штаммы дальневосточного субтипа. Серыми блоками выделены позиции с одной аминокислотной заменой; белыми блоками – позиции, отличающиеся более чем одной заменой аминокислоты; красными блоками – строго консервативные позиции среди всех крупных групп флавивирусов.

Fig. 3. A comparison of inter-domain region in the NS5 protein for three TBEV subtypes. The labels of the strains are presented in the same order as in figure 1. Blue color – efd strains of Far-east subtype; light orange and dark orange – sfd strains of Far-east subtype. Positions with a single mutation are labeled with gray columns. Positions with two or more mutations are labeled with white columns. Red columns show the positions which are almost identical within all large flavivirus groups.

фрагментам последовательности, соответствующим перечисленным выше структурным зонам белка.

Субтипоспецифичные мутации

При анализе аминокислотных последовательностей штаммов разных субтипов обнаружено 3 ведущих позиции, первая из которых локализована в начале белка в домене метилтрансферазы 18 G/S/N (рис. 2, 4а), вторая – в междоменной области N-концевого удлинения 297 R/G/E (рис. 2, 3, 4а), третья мутация 671 V/I/L расположена в домене полимеразы в нижней центральной части субдомена ладони (рис. 4), следуя в выравнивании за консервативным мотивом С (рис. 2).

Три субтипоспецифичные мутации существенно отличаются по физико-химическим свойствам аминокислот

и в пространстве находятся на поверхности с трёх разных сторон белковой глобулы (рис. 4а). Гипотетически подобная локализация замен может влиять либо на образование димерного комплекса белка NS5, который, как предполагают в ряде работ [16, 32], необходим для разрешения стерического парадокса в процессе реакции метилирования новообразованной вирусной РНК, либо на образование репликативного комплекса с другими неструктурными вирусными белками или неизвестными белками хозяина.

Комбинированные мутации

Комбинированные мутации – это три субтипоспецифичных мутации, совпадающих с группоспецифичными, у штаммов дальневосточного субтипа

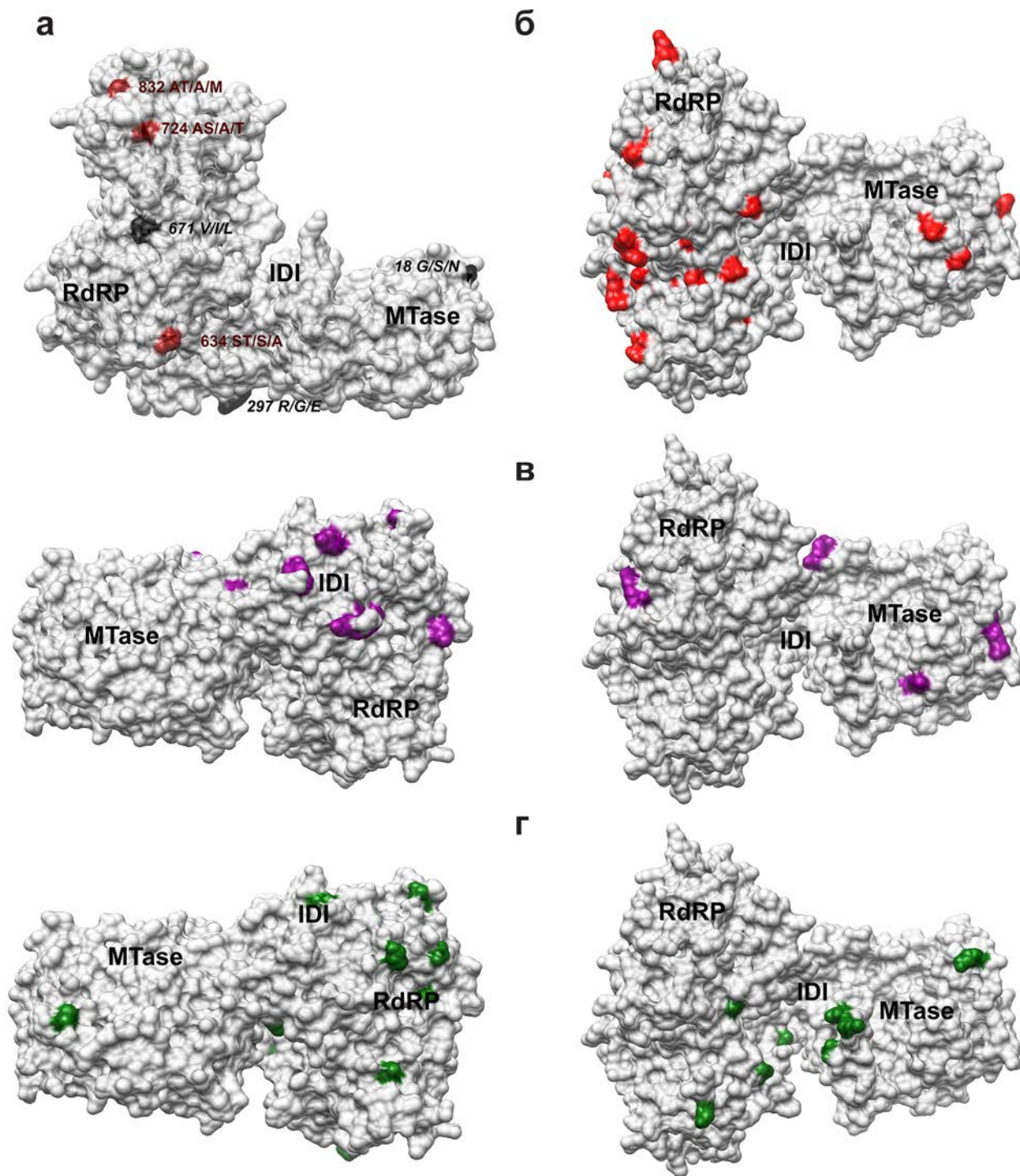


Рис. 4. Расположение в пространстве субтипоспецифичных, комбинированных, сдвоенных и профильных замен в флавивирусном белке NS5: серым цветом представлены субтипоспецифичные замены, красным цветом – комбинированные замены (а); алым цветом представлены сдвоенные сибирско-европейские замены (б); фиолетовым цветом выделены профильные замены сибирского субтипа (в); зелёным цветом представлены профильные замены европейского субтипа, серым цветом обозначена поверхность белка NS5 (г). Все изображения построены на основе координат модели белка NS5 штамма Dal'negorsk.

Fig. 4. Subtype-separating, combined, duplicated and subtype-specific mutations in NS5 protein. A) Mutations which separate all three subtypes are shown in gray, combined mutations are shown in red; B) mutations duplicated in both Siberian and European subtypes are shown in scarlet; C) mutations specific to Siberian subtype are shown in violet; D) mutations specific for European subtype are shown in green. The surface of NS5 protein is shown in light gray in all four images. The model of NS5 protein constructed using homology modeling for a sequence of Dal'negorsk strain was used to prepare the images.

634 S-T/S/A, 724 A-S/A/T, 832 A-T/A/M. При этом чёткое разделение наблюдается только для штаммов европейского субтипа, тогда как штаммы сибирского

субтипа по трём описанным позициям совпадают с efd-группой дальневосточного субтипа (рис. 2, 4а). Три этих позиции подробно исследованы в преды-

душей работе авторов [28], основной вывод которой заключается в том, что группоспецифичные замены совпадают с траекторией нормальной моды белка NS5, рассчитанной по результатам молекулярно-динамического эксперимента.

Сдвоенные сибирско-европейские мутации

Сдвоенные по сибирскому и европейскому субтипу мутации представляют собой самый многочисленный набор из 23 позиций и, как правило, локализованы вблизи либо по краям строго консервативных, функционально значимых участков белка (на рис. 2 обозначены красным шрифтом). Мутации в белковой глобуле рассредоточены таким образом, что 5 из них расположены в домене Mtase, 1 – в междоменном регионе, 3 – в субдомене пальца, и 14 мутаций находятся в одной плоскости пространства, образуя скопление в субдомене ладони и нижней части субдомена большого пальца (рис. 4б). Если детально рассмотреть положение в пространстве данного набора замен в белке NS5 (рис. 4б), то оно практически полностью совпадает с траекторией первой нетривиальной нормальной моды для белка NS5 efd-штамма дальневосточного субтипа (штамм Dal'negorsk) [28]. Соответственно, можно высказать предположение о том, что по аналогии с изменением нормальной моды для белка NS5 sfd-штамма (штамм Primorye-270) и, как следствие, с изменением физики белка и относительной подвижности доменов, по тому же принципу может происходить изменение физики белка и подвижности доменов у штаммов сибирского и европейского субтипов. Данная гипотеза хорошо согласуется с концепцией об эволюционном снижении патогенного потенциала штаммов сибирского и европейского субтипов за счёт появления и накопления сдвоенных мутаций в белке NS5.

Профильные мутации Сибирского субтипа

Из 12 профильных мутаций, характерных для сибирского субтипа (рис. 2, 3, 4в) 5 мутаций локализованы в области IDI. Причём 1 мутация находится непосредственно перед строго консервативным участком среди всех крупных представителей флавивирусов, называемым Pivot – точка поворота доменов, 2 мутации расположены в конце области линкера, и 1 мутация – в зоне N-концевого удлинения перед второй субтипоспецифичной мутацией (рис. 3). Остальные 7 мутаций рассредоточены по последовательности белка NS5, таким образом, что 3 из них расположены в домене Mtase, 3 – в субдомене пальцев и 2 – в субдомене большого пальца. Наибольший интерес вызывают мутации в домене метилтрансферазы, локализованные внизу кармана связывания РНК и в правой части кармана связывания молекулы ГТФ (рис. 2, 4в). Второй важной особенностью является то, что основная часть замен сосредоточена с левой стороны структуры белка NS5 в междоменной зоне с примыканием субдомена пальцев и концевых структур домена метилтрансферазы (рис. 4в).

Профильные мутации Европейского субтипа

Из 20 профильных мутаций, характерных для европейского субтипа, 6 мутаций локализованы в домене Mtase, 2 – в зоне IDI, 7 – в субдомене пальцев,

1 – в субдомене ладони, 3 – в субдомене большого пальца (рис. 4г). Особый интерес вызывают 7 мутаций субдомена пальцев, которые лежат в той же плоскости что и 5 профильных мутаций междоменной области сибирского субтипа. Различие заключается в том, что 7 профильных мутаций европейского субтипа расположены ниже междоменной области и сосредоточены в ложбине, образованной бета-складками субдомена пальцев. Эта вогнутая поверхность считается традиционным перспективным местом для эффективного связывания с ингибиторами [40] и, как предполагают в литературе, является поверхностью связывания с доменом геликазы белка NS3 [2].

Часть мутаций образуют кольцо на входе в туннель полимеразы, тогда как часть мутаций локализованы с правой стороны домена полимеразы мутации внизу субдоменов ладони и большого пальца (рис. 4г).

Интересно отметить, что напротив мутаций, образующих скопление в области второго кармана связывания цинка (нижняя часть субдомена ладони и большого пальца), расположено скопление мутаций домена метилтрансферазы и междоменной области (рис. 4г). Расположение в пространстве сдвоенных сибирско-европейских и профильных мутаций не противоречит друг другу, они заполняют одни и те же области белка (рис. 4б, в, г).

В связи с тем, что группоспецифичные мутации штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа детально изучены в предыдущих работах [1, 28], в настоящей работе будет излишним подробно останавливаться на их изучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расчёт подвижности остатков для первой нетривиальной моды белка NS5 позволил обозначить три области в структуре белка с наибольшей степенью подвижности: 1) второй карман связывания иона цинка в домене полимеразы; 2) область N-концевого удлинения в междоменной зоне; 3) окружение активного центра домена метилтрансферазы. Для трех этих областей, которые условно можно назвать «опорными узлами», были обнаружены самые высокие значения согласованности движения атомов в белке NS5. Удивительно что и три субтипоспецифичных мутации, обнаруженные в результате выравнивания всех проанализированных полногеномных последовательностей вируса КЭ, точно совпадают с тремя опорными узлами.

В результате исследования обнаружено несколько специфических пулов в первичной и третичной структуре белка NS5, где плотность мутаций значительно выше, чем в среднем по последовательности и структуре белка, причём в найденных пулах накопления наблюдается характерное перекрывание мутаций различных типов.

Удивительно и то, что первые два опорных узла в большей и третий узел в меньшей мере совпадают с пулами накопления всех остальных типов статистически значимых мутаций – это более 30 позиций для сибирского субтипа и более 40 позиций для европейского субтипа.

Столь высокое накопление мутаций в трех опорных узлах, скорее всего, оказывает влияние на меха-

низм перестроения доменов и переключение ферментативных активностей белка и, так как большинство мутаций лежит на поверхности глобулы, возможно, на связывание с другими вирусными белками и сродство к разным клеточным белкам организма.

Так как движение атомов в трёх опорных узлах строго скоординировано, то изменения, вносимые мутациями, могут привести к возникновению нескольких равновероятных и равносуществующих сценариев регуляции функциональной активности полидоменного белка NS5 и, как следствие, к нескольким сценариям репликативного цикла с участием вирусных и хозяйских белков.

Таким образом, можно предположить, что в ходе эволюции у штаммов трёх субтипов вируса КЭ возникли отличные равновероятные механизмы репликации. Однако для подтверждения и более детального понимания физики белка NS5 необходимо провести дополнительные исследования по молекулярному моделированию этого белка штаммов сибирского и европейского субтипов.

Открытым остаётся вопрос о том, существовал ли некий прототипный штамм, которому по большей части присущ набор сдвоенных сибирско-европейских мутаций, или эта группа мутаций возникла наряду с профильными мутациями.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Belikov SI, Kondratov G, Potapova UV, Leonova GN. (2014). The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS ONE*, 9 (4), e94946. doi: 10.1371/journal.pone.0094946
2. Brooks AJ, Johansson M, John AV, Xu Y, Jans DA, Vasudevan SG. (2002). The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals. *J Biol Chem*, 27 (39), 36399-36806. doi: 10.1074/jbc.M204977200
3. Bruenn J. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 31, 1821-1829
4. Bussetta C, Choi KH. (2012). Dengue virus nonstructural protein 5 adopts multiple conformations in solution. *Biochemistry*, 51, 5921-5931. doi: 10.1021/bi300406n
5. Butcher SJ, Grimes JM, Makeyev EV, Bamford DH, Stuart DI. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature*, 410, 235-240. doi: 10.1038/35065653
6. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. (1990). Flavivirus genome organisation, expression and replication. *Ann Rev Microbiol*, 44, 649-688. doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245
7. Daep CA, Muñoz-Jordán JL, Eugenin EA. (2014). Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on Dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. *J Neurovirol*, 20 (6), 539-560. doi: 10.1007/s13365-014-0285-z
8. Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. (1999). Sequence analysis and genetic classification of tick-borne

encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*, 80 (1), 179-264. doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179

9. Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. (2002). An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J*, 21, 2757-2768. doi: 10.1093/emboj/21.11.2757

10. Golovljova I, Katargina O, Geller J, Tallo T, Mittgenkov V, Vene S, Nemirov K, Kutsenko A, Kilosanidze G, Vasilenko V, Plyusnin A, Lundkvist Å. (2008). Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype. *Int J Med Microbiol*, 298, 108-120. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.12.004

11. Guindon S, Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*, 52, 696-704

12. Jääskeläinen AE, Sironen T, Murueva G. (2010). Tick-borne encephalitis virus in ticks in Finland, Russian Karelia and Buryatia. *J Gen Virol*, 91, 2706-2712. doi: 10.1099/vir.0.023663-0

13. Jääskeläinen AE, Tikkakoski T, Uzcátegui NY, Alekseev AN, Vaheri A, Vapalahti O. (2006). Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerg Infect Dis*, 12 (10), 1568-1571. doi: 10.3201/eid1210.060320

14. Katoh K, Standley DM. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, 30, 772-852. doi: 10.1093/molbev/mst010

15. Klema VJ, Padmanabhan R, Choi KH. (2015). Flaviviral replication complex: coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping. *Viruses*, 7, 4640-4656. doi: 10.3390/v7082837

16. Klema VJ, Ye M, Hindupur A, Teramoto T, Gottipati K, Padmanabhan R, Choi KH. (2016). Dengue virus nonstructural protein 5 (N) assembles into a dimer with a unique methyltransferase and polymerase interface. *PLoS Pathog*, 12, e1005451. doi: 10.1371/journal.ppat.1005451

17. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256, 1783-1790. doi: 10.1126/science.1377403

18. Koonin EV. (1993). Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol*, 74, 733-740. doi: 10.1099/0022-1317-74-4-733

19. Kulakova NV, Andaev EI, Belikov SI. (2012). Tick-borne encephalitis virus in Eastern Siberia: complete genome characteristics. *Arch Virol*, 157 (11), 2253-2258. doi: 10.1007/s00705-012-1412-x

20. Leonova GN, Belikov SI, Kondratov IG, Takashima I. (2013). Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*, 15 (1), 89-98. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.029

21. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol*, 6, 937-943. doi: 10.1038/13305

22. Lindquist L, Vapalahti O. (2008). Tick-borne encephalitis. *Lancet*, 371, 1861-1871. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4
23. Lu G, Gong P. (2017). A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus. *Virus Res*, 234, 34-43. doi: 10.1016/j.virusres.2017.01.020
24. Lu G, Gong P. (2013). Crystal structure of the full-length Japanese encephalitis virus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface. *PLoS Pathogens*, 9 (8), e1003549. doi: 10.1371/journal.ppat.1003549
25. Malet H, Egloff MP, Selisko B, Butcher RE, Wright PJ, Roberts M, Gruez A, Sulzenbacher G, Vonrhein C, Bricogne G, Mackenzie JM, Khromykh AA, Davidson AD, Canard B. (2007). Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J Biol Chem*, 282, 10678-10689. doi: 10.1074/jbc.M607273200
26. Mastrangelo E, Bollati M, Milani M, Selisko B, Peyrane F, Canard B, Grard G, de Lamballerie X, Bolognesi M. (2007). Structural bases for substrate recognition and activity in Meaban virus nucleoside-2'-O-methyltransferase. *Protein Sci*, 16, 1133-1145. doi: 10.1110/ps.072758107
27. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004). UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25, 1605-1612. doi: 10.1002/jcc.20084
28. Potapova U, Feranchuk S, Leonova G, Belikov S. (2018). The rearrangement of motif F in the flavivirus RNA-directed RNA polymerase. *Int J Biol Macromol*, 108, 990-998. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.009
29. Potapova UV, Feranchuk SI, Potapov VV, Kulakova NV, Kondratov IG, Leonova GN, Belikov SI. (2012). NS2B/NS3 protease: allosteric effect of mutations associated with the pathogenicity of tick-borne encephalitis virus. *J Biomol Struct Dyn*, 30, 638-651. doi: 10.1080/07391102.2012.689697
30. Ray D, Shah A, Tilgner M, Guo Y, Zhao Y, Dong H, Deas TS, Zhou Y, Li H, Shi PY. (2006). West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. *J Virol*, 80, 8362-8370. doi: 10.1128/JVI.00814-06
31. Sholders AJ, Peersen OB. (2014). Distinct conformations of a putative translocation element in poliovirus polymerase. *J Mol Biol*, 426, 1407-1419. doi: 10.1016/j.jmb.2013.12.031
32. Tay MYF, Smith K, Ng IHW, Chan KW, Zhao Y, Ooi EE, Lescar J, Luo D, Jans DA, Forwood JK, Vasudevan SG. (2016). The C-terminal 18 amino acid region of dengue virus NS5 regulates its subcellular localization and contains a conserved arginine residue essential for infectious virus production. *PLoS Pathogens*, 12 (9), e1005886. doi: 10.1371/journal.ppat.1005886
33. Teramoto T, Balasubramanian A, Choi KH, Padmanabhan R. (2017). Serotype-specific interactions among functional domains of dengue virus 2 nonstructural proteins (NS) 5 and NS3 are crucial for viral RNA replication. *J Biol Chem*, 292, 9465-9479. doi: 10.1074/jbc.M117.775643
34. Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G. (2005). Family Flaviviridae. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, 981-998
35. Upadhyay AK, Cyr M, Longenecker K, Tripathi R, Sun C, Kempf DJ. (2017). Crystal structure of full-length Zika virus NS5 protein reveals a conformation similar to Japanese encephalitis virus NS5. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun*, 73, 116-122. doi: 10.1107/S2053230X17001601
36. Wang Q, Weng L, Tian X, Counor D, Sun J, Mao Y, Deubel V, Okada H, Toyoda T. (2012). Effect of the methyltransferase domain of Japanese encephalitis virus NS5 on the polymerase activity. *Biochim Biophys Acta*, 1819, 411-418. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.01.003
37. Wu J, Liu W, Gong P. (2015). A Structural Overview of RNA-Dependent RNA Polymerases from the Flaviviridae Family. *Int J Mol Sci*, 16, 12943-12957. doi: 10.3390/ijms160612943
38. Yap TL, Xu T, Chen YL, Malet H, Egloff MP, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J. (2007). Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J Virol*, 81, 4753-4765. doi: 10.1128/JVI.02283-06
39. Zhao Y, Soh TS, Zheng J, Chan KW, Phoo WW, Lee CC, Tay MY, Swaminathan K, Cornvik TC, Lim SP, Shi PY, Lescar J, Vasudevan SG, Luo D. (2015). A crystal structure of the dengue virus ns5 protein reveals a novel inter-domain interface essential for protein flexibility and virus replication. *PLoS Pathog*, 11, e04682. doi: 10.1371/journal.ppat.1004682
40. Zhou G, Chen YL, Dong H, Lim CC, Yap LJ, Yau YH, Yau YH, Shochat SG, Lescar J, Shi PY. (2011). Functional analysis of two cavities in flavivirus NS5 polymerase. *J Biol Chem*, 286, 14362-14434. doi: 10.1074/jbc.M110.214189

Сведения об авторах

Потапова Ульяна Валерьевна – главный специалист, ФГБУН Лимнологический институт СО РАН (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; e-mail: shuana1983@yandex.ru)


Феранчук Сергей Ильич – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН Лимнологический институт СО РАН; научный сотрудник, ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет» (664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83; e-mail: feranchuk@gmail.com) ● <http://orcid.org/0000-0002-2774-4179>


Леорова Галина Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией природно-очаговых трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1; e-mail: galinaleon@primorye.mail.ru) ● <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>


Беликов Сергей Иванович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией аналитической биологической химии, ФГБУН Лимнологический институт СО РАН (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; e-mail: belikov@lin.irk.ru) ● <http://orcid.org/0000-0001-7206-8299>

Information about the authors

Ulyana V. Potapova – Chief Specialist, Limnological Institute SB RAS (664033, Irkutsk, ul. Ulan-Batorskaya, 3; e-mail: shuana1983@yandex.ru

Sergey I. Feranchuk – Cand. Sc. (Phys.-Math.), Senior Research Officer, Limnological Institute SB RAS; Research Officer, Irkutsk National Research Technical University (664074, Irkutsk, ul. Lermontova, 83; e-mail: feranchuk@gmail.com)  <http://orcid.org/0000-0002-2774-4179>

Galina N. Leonova – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Flavivirus Infections, G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology (690087, Vladivostok, Selskaya ul., 1; e-mail galinaleon41@gmail.com)  <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>

Sergei I. Belikov – Dr. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory of Analytical Bioorganic Chemistry, Limnological Institute SB RAS (664033, Irkutsk, ul. Ulan-Batorskaya, 3; e-mail sergeibelikov47@gmail.com)  <http://orcid.org/0000-0001-7206-8299>