

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-143>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Вариабельность генов неструктурных белков ротавируса A (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) генотипа G9P[8] в период доминирования на территории Нижнего Новгорода (центральная часть России) (2011–2020)

Великжанина Е.И., Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, г. Нижний Новгород, Россия

Введение. В России ротавирус A является основной причиной тяжёлого гастроэнтерита вирусной этиологии у детей раннего возраста. Молекулярные особенности, позволяющие ротавирусу того или иного генотипа получить эволюционное преимущество, остаются неясны, поэтому изучение генетического разнообразия ротавирусов на основе генов, кодирующих неструктурные белки, ответственных за репродукцию вируса в клетке, является актуальной задачей.

Цель работы – изучение генетического разнообразия ротавирусов генотипа G9P[8], доминировавшего в Нижнем Новгороде в 2011–2020 гг., на основе генов, кодирующих неструктурные белки.

Материалы и методы. Ротавирус-положительные образцы стула детей исследовали методами ПЦР-генотипирования и секвенирования нуклеотидных последовательностей генов *NSP1–NSP5*. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA X.

Результаты. В период 2011–2020 гг. в Нижнем Новгороде происходила коциркуляция ротавирусов G9P[8], имеющих четыре варианта гена *NSP2*. Новые аллели были отмечены в 2012 (N1-a-III), 2016 (N1-a-IV) и 2019 гг. (N1-a-II). Появление новых вариантов других генов произошло в 2014 (E1-3, *NSP4*), 2018 (T1-a3-III, *NSP3*) и 2019 гг. (A1-b-II, *NSP1*). Наиболее вариабельным по аминокислотной последовательности был *NSP2* (16 замен), для *NSP1*, *NSP3* и *NSP4* было показано от 2 до 7 замен, *NSP5* был консервативен.

Обсуждение. Полученные результаты согласуются с данными литературы и свидетельствуют об участии генов *NSP* в поддержании гетерогенности популяции ротавирусов.

Заключение. До 2018 г. генетическое разнообразие ротавирусов в Нижнем Новгороде определялось коциркуляцией штаммов, несущих несколько аллелей гена *NSP2*, и консервативными генами *NSP1*, *NSP3–NSP5*. К концу изучаемого периода в популяции сформировались новые варианты генотипа G9P[8], несущие ранее не встречавшиеся комбинации аллелей неструктурных генов.

Ключевые слова: ротавирус; неструктурные гены; филогенетический анализ; генетические варианты; аминокислотные замены

Для цитирования: Великжанина Е.И., Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Вариабельность генов неструктурных белков ротавируса A (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) генотипа G9P[8] в период доминирования на территории Нижнего Новгорода (центральная часть России) (2011–2020). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 475–486. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-143>

Для корреспонденции: Великжанина Елена Игоревна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, г. Нижний Новгород, Россия. E-mail: www.e_velikzhanina@mail.ru

Участие авторов: Великжанина Е.И. – проведение экспериментальных исследований, обработка данных, написание и редактирование текста; Сашина Т.А. – проведение экспериментальных исследований, контроль проведения исследований, написание и редактирование текста; Морозова О.В. – редактирование текста; Епифанова Н.В. – проведение экспериментальных исследований, редактирование текста; Новикова Н.А. – организация и контроль проведения исследований, редактирование текста.

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей несовершеннолетних пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (протокол № 6 от 24.03.2021).

Поступила 28.09.2022

Принята в печать 21.11.2022

Опубликована 30.12.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-143>

Variability of genes encoding nonstructural proteins of rotavirus A (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) genotype G9P[8] during the period of dominance in the territory of Nizhny Novgorod (central part of Russia) (2011–2020)

Elena I. Velikzhanina, Tatiana A. Sashina, Olga V. Morozova, Natalia V. Epifanova, Nadezhda A. Novikova

«Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology», 603950, Nizhny Novgorod, Russia

Introduction. In Russia, rotavirus A is the main cause of severe viral gastroenteritis in young children. The molecular features that allow a rotavirus of a particular genotype to gain an evolutionary advantage remain unclear, therefore, the study of the genetic diversity of rotaviruses based on genes encoding nonstructural proteins (NSPs) responsible for the reproduction of the virus in the cell is an urgent task.

Objective. To study the genetic diversity of rotaviruses of genotype G9P[8], which dominated Nizhny Novgorod in 2011–2020, based on genes encoding nonstructural proteins.

Materials and methods. Rotavirus-positive samples were subjected to PCR-genotyping and sequencing of *NSP1*–*NSP5* genes. Phylogenetic analysis was carried out in the MEGA X program.

Results. In the period 2011–2020, G9P[8] rotaviruses with four variants of the *NSP2* gene were co-circulating in Nizhny Novgorod. New alleles were noted in 2012 (N1-a-III), 2016 (N1-a-IV) and in 2019 (N1-a-II). The appearance of new variants of other genes occurred in 2014 (E1-3, *NSP4*), 2018 (T1-a3-III, *NSP3*) and in 2019 (A1-b-II, *NSP1*). *NSP2* gene had the most variable amino acid sequence (16 substitutions), 2 to 7 substitutions were observed in *NSP1*, *NSP3* and *NSP4*, *NSP5* was conservative.

Discussion. The results obtained are consistent with the literature data and indicate the participation of *NSP* genes in maintaining the heterogeneity of the rotavirus population.

Conclusion. Until 2018, the genetic diversity of rotaviruses in Nizhny Novgorod was determined by the circulation of strains carrying several alleles of the *NSP2* gene and conservative genes *NSP1*, *NSP3*–*NSP5*. By the end of the study period, new variants of the genotype G9P[8] were formed in the population, carrying previously unknown combinations of alleles of nonstructural genes.

Keywords: rotavirus; nonstructural genes; phylogenetic analysis; genetic variants; amino acid substitutions

For citation: Velikzhanina E.I., Sanina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Variability of genes encoding nonstructural proteins of rotavirus A (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) genotype G9P[8] during the period of dominance in the territory of Nizhny Novgorod (central part of Russia) (2011–2020). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 475–486. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-143>

For correspondence: Elena I. Velikzhanina, Junior Researcher at the Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 603950, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: www.e_velikzhanina@mail.ru

Information about authors:

Velikzhanina E.I., <https://orcid.org/0000-0003-4069-1427>

Sashina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-3203-7863>

Morozova O.V., <https://orcid.org/0000-0002-8058-8187>

Epifanova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-7679-8029>

Novikova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Contribution: Velikzhanina E.I. – conducting experimental research, data processing, writing and editing text; Sashina T.A. – conducting experimental research, monitoring research, writing and editing text; Morozova O.V. – editing text; Epifanova N.V. – experimental research, editing text; Novikova N.A. – organization and control of research, text editing.

Funding. The study was conducted as part of the State Task of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being (Rospotrebnadzor).

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the legal representatives of minor patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the FSBI “Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology” of the Federal Service for Supervision of Consumer Right Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) (Protocol No. 6 dated March 24, 2021).

Received 28 September 2022

Accepted 21 November 2022

Published 30 December 2022

Введение

Ротавирусы (РВ, род *Rotavirus*, семейство Reoviridae) являются важным этиологическим агентом тяжёлых дегидратирующих диарей преимущественно у детей младшего возраста, в разных странах обуславливая от 30 до 70% случаев острого гастроэнтерита, требующих госпитализации [1]. Повсеместное распространение, стабильность возбудителя во внешней среде, большое разнообразие факторов передачи и выраженная сезонность являются причинами высокого уровня заболеваемости населения ротавирусной инфекцией [2].

РВ имеют сегментированный двухцепочечный РНК-геном, состоящий в общей сложности из около 18 555 нуклеотидов [3, 4]. Наличие сегментированного генома обуславливает способность к обмену сегментами (реассортации) между штаммами разных генотипов при одновременном инфицировании клетки, что является важным механизмом эволюции и поддержания генетического разнообразия РВ [5].

Одиннадцать сегментов РНК ротавирусов вида А (РВА) кодируют 12 белков. Шесть белков являются структурными компонентами капсида (VP1–VP4, VP6, VP7), принимающими участие в построении вирусной частицы и проникновении в клетку-хозяина. Остальные шесть белков являются неструктурными и выполняют такие важные функции, как блокировка апоптоза и механизмов врождённой иммунной защиты клеток (NSP1), репликация генома вируса, упаковка капсида и формирование вироплазм (NSP2 и NSP5), ингибирование синтеза белков хозяина (NSP3), интоксикация организма, что ведёт к появлению дегидратирующих диарей (NSP4) [6].

РВ характеризуются широким антигенным и генетическим разнообразием. У РВА человека и животных в рамках бинарной классификации установлено существование не менее 41 G-генотипа (детерминирован геном гликопротеина VP7) и 57 P-генотипов (детерминирован геном протеазочувствительного белка VP4). Помимо бинарной, существует полногеномная классификация, позволяющая отнести каждый сегмент генома вируса к определённому генотипу [7]. Для описания полного генотипа используют обозначение Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, для генов, кодирующих белки, – VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/NSP6 соответственно [5].

В настоящее время в мире наиболее распространёнными считаются шесть G[P]-типов РВА: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [8–11]. РВ данных генотипов широко распространены и на территории России. Представители G9P[8] были впервые идентифицированы у новорождённых г. Омска в 2002 г., а в 2009 г. обнаружены в европейской части России (Московская область) [12–15]. В Нижнем Новгороде этот генотип был выявлен в сезон 2011–2012 гг., когда его доля составила 26,9%, а к 2016 г. он стал доминирующим (58,8%) [8, 16].

РВ генотипа G9P[8] ранее были охарактеризованы на основе генов, кодирующих белки VP7 и VP4,

участвующие в проникновении вируса в клетку [8, 13, 17]. Высокая активность циркуляции РВ может поддерживаться за счёт эволюционных изменений неструктурных белков, ответственных за репродукцию вируса в клетке. Основной функцией белка NSP1 является блокирование апоптоза и механизмов врождённой иммунной защиты клеток [18]. Белок NSP2 участвует в репликации генома вируса и упаковке капсида, совместно с NSP5 играет решающую роль в формировании вироплазм при созревании вирусных частиц [19]. NSP3 участвует в ингибировании синтеза белков хозяина, инактивируя два фактора инициации трансляции (eIF4F и eIF2), необходимые для трансляции мРНК (матричной) клетки-хозяина [20]. Гликопротеин NSP4 является ротавирусным энтеротоксином и обладает иммуногенными свойствами [21]. Как известно, 11-й геномный сегмент кодирует два белка РВ – NSP5 и NSP6. Открытая рамка считывания гена *NSP6* располагается между нуклеотидными позициями 80–358 и кодирует белок NSP6 длиной 92 аминокислотных остатка (а.о.) [22]. Белок NSP5 играет роль в репликации вирусного генома, совместно с NSP2 в инфицированных вирусом клетках участвует в образовании вироплазм. Функции белка NSP6 окончательно не определены, есть сведения, что он взаимодействует с нуклеиновыми кислотами [23].

В связи с этим **целью работы** было изучение генетического разнообразия РВ генотипа G9P[8], доминировавшего в Нижнем Новгороде в 2011–2020 гг., на основе генов, кодирующих неструктурные белки.

Материалы и методы

В работе использовали образцы фекалий детей, госпитализированных с симптомами острой кишечной инфекции в детский инфекционный стационар Нижнего Новгорода в период 2011–2020 гг.

Для экстракции нуклеиновых кислот и постановки реакции обратной транскрипции применяли наборы реагентов «РИБО-преп» и «РЕВЕРТА-L» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ), Россия). Обнаружение ротавирусной РНК проводили с использованием тест-системы полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результата в реальном времени «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» (ЦНИИЭ, Россия).

Определение G/P-генотипа РВ осуществляли в ходе мультиплексной ПЦР для идентификации 12 генотипов генов VP4 и VP7 с использованием набора типоспецифических праймеров для генотипов G1–G4, G6, G8, G9, G12, P[4], P[6], P[8] и P[9] [24–29]. Детекцию результатов проводили с помощью электрофореза в агарозном геле, содержащем бромид этидия.

Наработку фрагментов кДНК (комплементарной) для секвенирования осуществляли в ходе ПЦР с использованием реактивов производства ООО «Силекс» (Россия) и праймеров, синтезированных в ООО НПФ «Синтол» (Россия). Последовательности праймеров опубликованы в работе Т.А. Sashina и соавт. [13].

Секвенирование кДНК фрагментов неструктурных генов *NSP1–NSP5* проводили по двум цепям с помощью прямого и обратного праймера [13], набора для постановки реакции секвенирования Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) QuickStartKit (Beckman Coulter, США) и системы генетического анализа Beckman Coulter CEQ 8000 (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Поиск родственных последовательностей выполняли с использованием онлайн-сервиса BLAST. Для филогенетического анализа из базы данных GenBank были взяты нуклеотидные последовательности генома нижегородских штаммов РВ, опубликованные ранее [14, 17], и из других стран, доступные в GenBank. Полученные в данной работе нуклеотидные последовательности размещены в GenBank под номерами MW842500–MW842550.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей, филогенетический анализ и анализ выведенных аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA X [30]. Для статистической оценки топологии дерева проводили бутстрэп-анализ с использованием 1000 случайных выборок. Оптимальную модель замен нуклеотидов для каждого выравнивания подбирали с использованием байесовского информационного критерия. Наиболее подходящей моделью для генов *NSP1–NSP4* была трёхпараметрическая модель Тамуры (Tamura 3-parameter), а для гена *NSP5* – двухпараметрическая модель Кимуры (Kimura 2-parameter). Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) в программе MEGA X [31].

Принадлежность изучаемых штаммов к филогенетическим линиям и сублиниям определяли на основе

кластеризации изолятов на филогенетических деревьях с индексом поддержки узлов более 75 и высокого уровня сходства нуклеотидных последовательностей (97,0–100,0%). Филогенетические линии и сублинии обозначили согласно принятой в литературе классификации [13, 17, 32–35].

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей несовершеннолетних пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (протокол № 6 от 24.03.2021).

Результаты

В период 2011–2020 гг. исследовано 13 777 образцов фекалий детей, госпитализированных с диагнозом «острая кишечная инфекция». В 3994 случаях (28,9%) была обнаружена ротавирусная РНК, которую в дальнейшем использовали для G[P]-генотипирования. Методом ПЦР в 2736 образцах (68,5%) определён G[P]-тип РВ. Для 1258 образцов (31,5%) генотип установить не удалось.

Долевой вклад ротавирусов генотипа G9P[8] в период 2011–2020 гг. в Нижнем Новгороде

Долевое распределение РВ разных генотипов в изучаемый период показано на рис. 1 а.

Спектр идентифицированных методом ПЦР G/P-генотипов РВ включал 6 широко распространённых в мире (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8]). За весь изучаемый период долевой вклад генотипа G9P[8] составил 29,3%, и было отмечено его

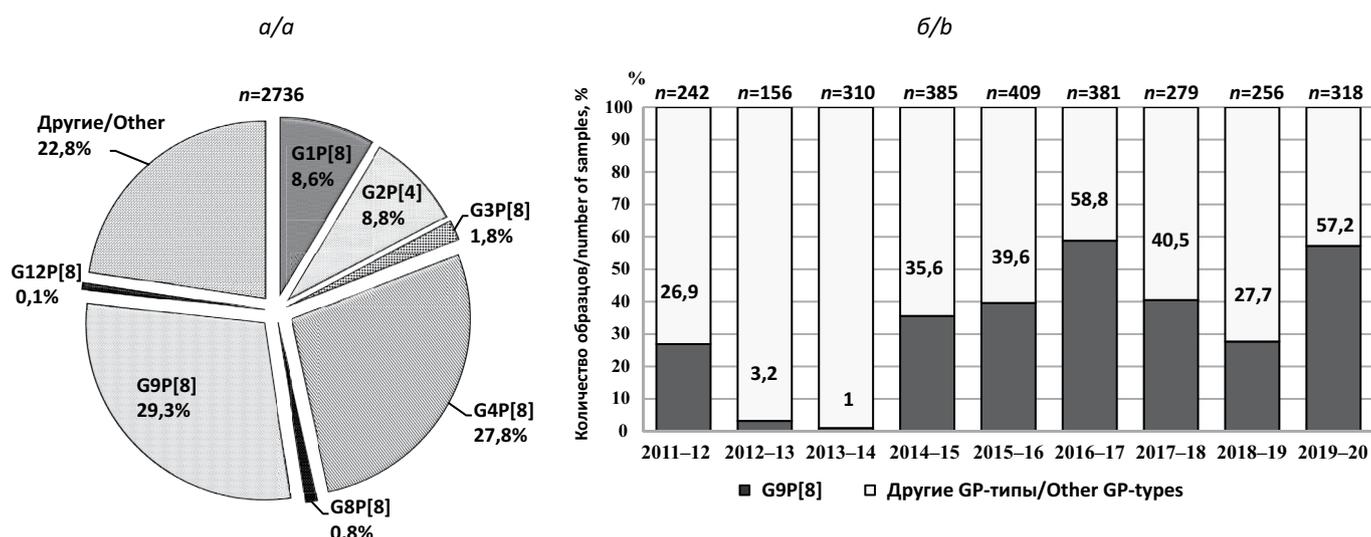


Рис. 1. Распределение генотипов ротавируса А в Нижнем Новгороде в период 2011–2020 гг.: а – долевое распределение ротавирусов основных генотипов за весь изучаемый период; б – долевой вклад ротавирусов генотипа G9P[8] в разные сезоны изучаемого периода.

Fig. 1. Distribution of rotavirus A genotypes in Nizhny Novgorod in the period 2011–2020: а – the percent distribution of basic genotypes of rotaviruses in whole study period; б – the percent of genotype G9P[8] rotaviruses in different seasons of the period of study.

доминирование на территории Нижнего Новгорода. Второе место занимали штаммы генотипа G4P[8] – 27,8%, далее G2P[4] (8,8%), G1P[8] (8,6%), G3P[8] (1,8%), G8P[8] (0,8%) и G12P[8] (0,1%).

В разные сезоны наблюдалось колебание долевого вклада РВ генотипа G9P[8]. Впервые данные штаммы были обнаружены на территории Нижнего Новгорода в сезон 2011–2012 гг., когда их доля составила 26,9% (рис. 1 б). Следующие два сезона характеризовались низкой активностью циркуляции РВ генотипа G9P[8] (1,0–3,2%), которая к сезону 2014–2015 гг. существенно возросла, достигнув 35,6%. В сезон 2015–2016 гг. вклад РВ данного генотипа достиг 39,6%, и они вытеснили доминировавшие ранее штаммы генотипа G4P[8]. Сезон 2016–2017 гг. отличался наибольшей долей представителей генотипа G9P[8], которая составила 58,8%. К 2017–2018 гг. их доля снизилась до 40,5%, а в сезон 2018–2019 гг. – до 27,7%. В 2019–2020 гг. генотип G9P[8] вновь стал превалировать с показателем 57,2%.

Колебания долевого вклада РВ генотипа G9P[8] могли быть связаны с генетическими перестройками в популяции, затрагивающими неструктурные гены.

Филогенетический анализ ротавирусов генотипа G9P[8] на основе генов NSP1–NSP5

Для молекулярно-генетической характеристики РВ генотипа G9P[8] на основе генов, кодирующих неструктурные белки, были взяты 16 штаммов, выявленных в разные сезоны периода 2011–2020 гг.

На рис. 2 а представлено сокращенное филогенетическое дерево, содержащее 86 нуклеотидных последовательностей гена NSP1 РВ, в том числе 21 последовательность из Нижнего Новгорода.

В изучаемый период на территории Нижнего Новгорода были идентифицированы РВ генотипа А1, принадлежащие к двум сублиниям (А1-b-I и А1-b-II) филогенетической линии А1-b. Основная часть нижегородских штаммов генотипа G9P[8], выделенных на протяжении всего изучаемого периода (86,7%), а также родственные им РВ из Венгрии, Германии, Италии и Египта, которые имели генотипы G1P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8], вошли в сублинию А1-b-I. Сходство нуклеотидных последовательностей нижегородских штаммов внутри сублинии составило 97,8–99,9%. Также представителями сублинии

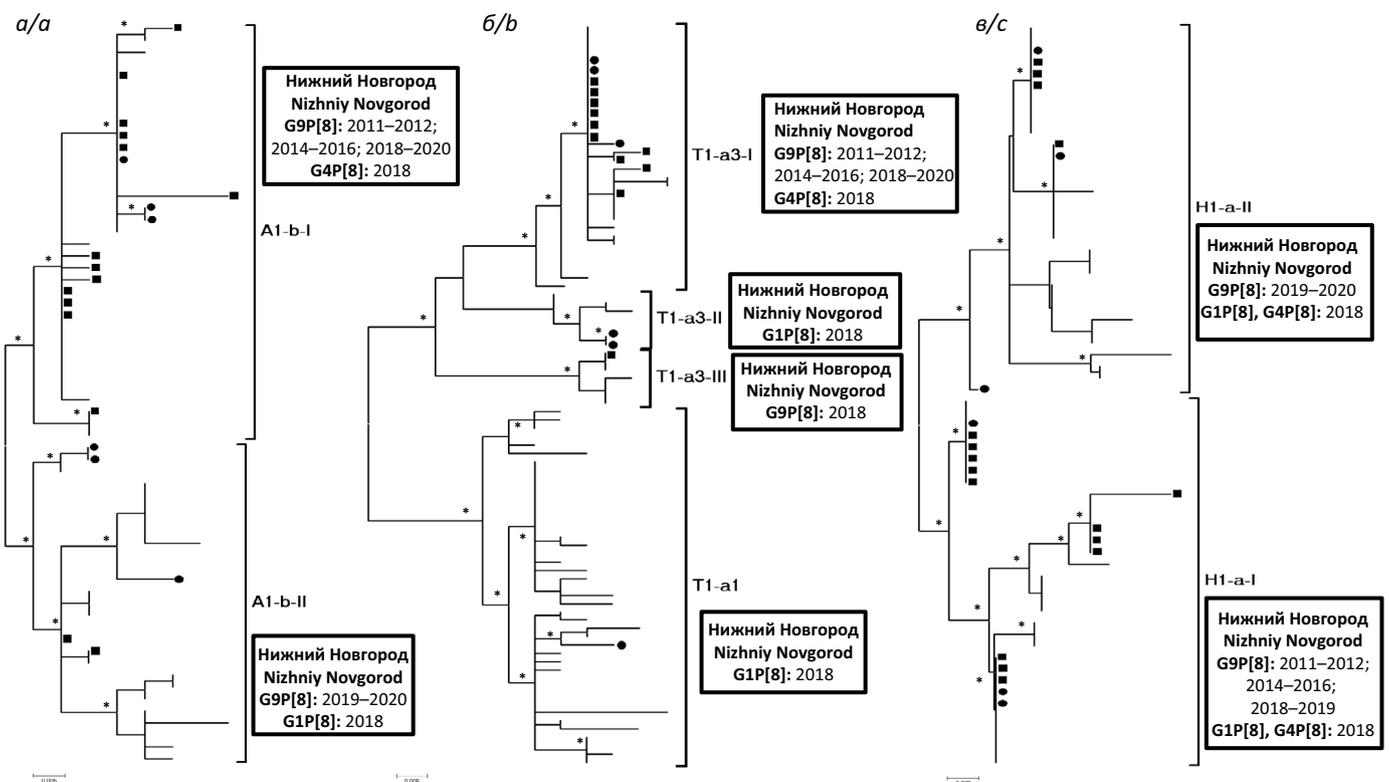


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена: а – NSP1; б – NSP3; в – NSP5 штаммов ротавируса А.

Знаком ■ отмечены штаммы ротавируса А генотипа G9P[8]; знаком ● отмечены штаммы ротавируса А других генотипов (G1P[8], G4P[8]).

*Индекс поддержки узла более 75.

Fig. 2. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences: а – NSP1; б – NSP3; в – NSP5 gene of rotavirus A strains.

A sign ■ the strains of the G9P rotavirus A genotype are marked G9P[8]; with a sign ● rotavirus A strains of other genotypes (G1P[8], G4P[8]) were noted.

*Node support index over 75.

A1-b-I были 3 штамма из Нижнего Новгорода с генотипом G4P[8]. В сублинию A1-b-II вошли 2 штамма генотипа G9P[8] из Нижнего Новгорода, выделенные в 2019–2020 гг., сходство нуклеотидных последовательностей которых составило 99,6%. Их ближайшими родственниками были изоляты РВА с генотипами G9P[8] и G12P[8] из Пакистана и Парагвая. Отличие данных штаммов от представителей сублинии A1-b-I составило 6,3–8,1%. В состав данной сублинии также вошли 3 нижегородских штамма генотипа G1P[8].

Для изучения внутривидового разнообразия РВ на основе гена *NSP2* были взяты 107 нуклеотидных последовательностей, в том числе 21 – из Нижнего Новгорода. Адаптированное филогенетическое дерево показано на **рис. 3 а**. Анализируемые нуклеотидные последовательности РВ имели генотип N1, принадлежали к одной филогенетической линии N1-a и четырём сублиниям (I–IV). Сходство нуклеотидных последовательностей гена *NSP2* штаммов внутри сублиний составило 99,7–99,9%. Различия между представителями разных сублиний составило от 4,8 до 10%.

В сублинию N1-a-I вошли 4 штамма из Нижнего Новгорода, выявленные в 2018–2019 гг. Их ближайшими родственниками были изоляты с генотипами

G1P[8] и G4P[8] из Нижнего Новгорода, Новосибирска и Омска. В сублинию N1-a-II вошёл один нижегородский штамм генотипа G9P[8], выявленный в 2019 г., а также родственные ему РВ из Нижнего Новгорода, США, Италии, Японии и Новосибирска, которые имели генотипы G1P[8] и G3P[8]. Пять штаммов генотипа G9P[8] из Нижнего Новгорода, выявленные в 2012 и 2020 гг., были представителями сублинии N1-a-III. Им были родственны изоляты из Венгрии, Японии и Новосибирска с генотипом G1P[8]. В состав данной сублинии также вошёл один нижегородский штамм G1P[8] (2018). Сублиния N1-a-IV включала 5 нижегородских штаммов, выявленных в 2016 и 2019 гг., и родственные им РВ генотипа G4P[8] из Новосибирска и Эфиопии, выявленные в 2012 и 2016 гг.

Филогенетическое дерево, содержащее 89 нуклеотидных последовательностей гена *NSP3*, включая 17 из Нижнего Новгорода, приведено на **рис. 2 б**. Нижегородские РВ генотипа G9P[8] относились только к одной линии (T1-a3), при этом 10 из 11 (90,9%) штаммов вошли в состав сублинии T1-a3-I. Сходство нуклеотидных последовательностей этих штаммов между собой составило 99,1–99,6%. Их ближайшими

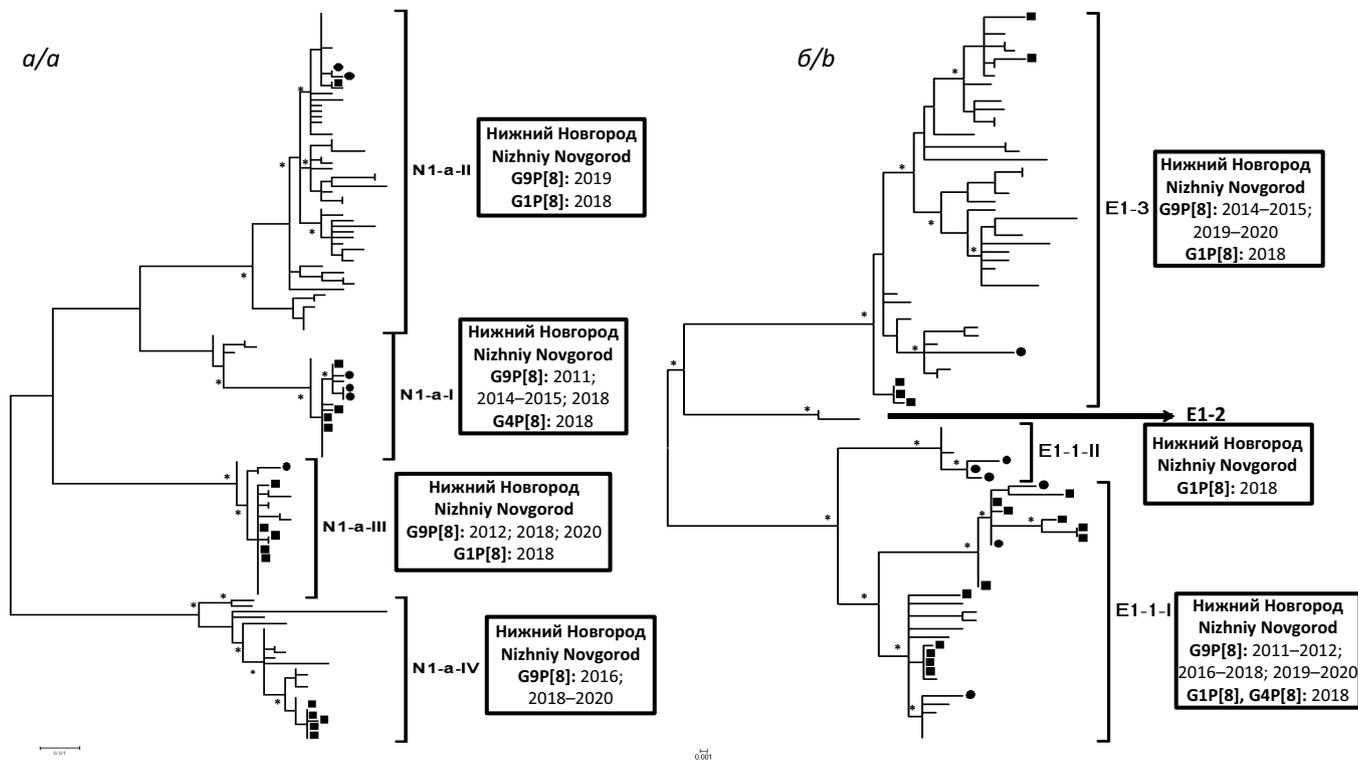


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена: а – *NSP2*; б – *NSP4* штаммов ротавируса А.

Знаком ■ отмечены штаммы ротавируса А генотипа G9P[8]; знаком ● отмечены штаммы ротавируса А других генотипов (G1P[8], G4P[8]).

*Индекс поддержки узла более 75.

Fig. 3. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences: а – *NSP2*; б – *NSP4* gene of rotavirus A strains.

A sign ■ the strains of the G9P rotavirus A genotype are marked G9P[8]; with a sign ● rotavirus A strains of other genotypes (G1P[8], G4P[8]) were noted.

*Node support index over 75.

ми родственниками были РВ с генотипами G9P[8] и G4P[8] из Венгрии и Таиланда. В состав данной сублинии также вошли 3 нижегородских штамма генотипа G4P[8], выявленные в 2018 г., однако сходство их нуклеотидных последовательностей с изучаемыми штаммами составило лишь 95,5–96,0%. Один штамм генотипа G9P[8], выявленный в Нижнем Новгороде в 2018 г., вошёл в сублинию T1-a3-III, которой также принадлежали 2 нижегородских РВ генотипа G1P[8]. Отличие данного штамма от T1-a3-I составило 8,1%.

Для анализа на основе гена *NSP4* взяты нуклеотидные последовательности 23 нижегородских штаммов, выявленных в Нижнем Новгороде, и 63 последовательности из других стран. Филогенетическое дерево представлено на **рис. 3 б**. Изучаемые нижегородские РВ имели генотип E1 и относились к двум филогенетическим линиям (E1-1 и E1-3).

Двенадцать штаммов генотипа G9P[8] (70,6%) были представителями сублинии E1-1-I. Сходство нуклеотидных последовательностей составило 98,9–99,9%. Им были родственны штаммы с генотипами G1P[8] и G12P[8] из Австралии, Германии, США и Италии, выделенные в период 2008–2016 гг.

Линия E1-3 включала 4 штамма генотипа G9P[8] (29,4%) из Нижнего Новгорода, сходство нуклеотидных последовательностей между которыми составило 97,9–99,9%. Им были родственны один нижегородский штамм генотипа G1P[8] и РВ из Японии, Бельгии, Китая и Зимбабве с генотипами G1P[8], G3P[8] и G9P[8], выявленные в период 2010–2014 гг. Уровень различия нуклеотидных последовательностей пред-

ставителей кластеров E1-1-I и E1-3 составил 14,9%.

В анализ на основе гена *NSP5* были взяты 22 нижегородских РВ. Филогенетическое дерево, содержащее в сумме 93 нуклеотидные последовательности, показано на **рис. 2 в**. Штаммы генотипа G9P[8] из Нижнего Новгорода имели генотип N1, принадлежали к одной филогенетической линии N1-a и относились к двум сублиниям – N1-a-I и N1-a-II. Сходство их нуклеотидных последовательностей внутри сублиний составило 98,9–99,4%, в то время как различие между представителями разных сублиний варьировало от 3,1 до 3,7%.

Сублиния N1-a-I включала 12 нижегородских штаммов генотипа G9P[8] (2011–2019 гг.) и 3 штамма генотипов G1P[8] и G4P[8]. Ближайшими родственниками были РВА с генотипами G4P[8], G12P[8] и G1P[8] из Венгрии, Японии и Эфиопии, выделенные в 2008–2016 гг. В сублинию N1-a-II вошли 4 РВ генотипа G9P[8], циркулировавшие на территории Нижнего Новгорода в 2019–2020 гг., и 3 штамма других генотипов, выявленные в 2018 г. Родственные им штаммы имели генотипы G1P[8] и G12P[8] и были выявлены на территории Таиланда, Италии и Никарагуа в период 2010–2014 гг. Сочетание сублиний генов, кодирующих неструктурные белки, изучаемых штаммов РВ обобщены в **таблице**.

На протяжении всего изучаемого периода в нижегородской популяции происходила коциркуляция четырёх вариантов гена *NSP2*, при этом новые аллели отмечены в 2012 (N1-a-III), 2016 (N1-a-IV) и 2019 гг. (N1-a-II). Появление новых вариантов других генов

Таблица. Сочетания сублиний неструктурных генов *NSP1–NSP5/NSP6* у ротавирусов генотипа G9P[8] в Нижнем Новгороде
Table. Genes *NSP1–NSP5/NSP6* sublineages combinations among G9P[8] rotaviruses in Nizhny Novgorod

Штамм Strain	Год выявления Isolation year	Сегмент генома Genome segment					
		VP7, VP4 [8, 13, 17]	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5/6
NN2626	2011	G9-III-d, P[8]-3.6 [8]	A1-b-I	N1-a-I	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN445	2012	G9-III-d, P[8]-3.6	–	N1-a-III	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN459	2012	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	–	–	E1-1-I	H1-a-I
NN561	2012	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-III	–	E1-1-I	H1-a-I
NN2721	2014	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-I	T1-a3-I	E1-3	H1-a-I
NN414	2015	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-I	T1-a3-I	E1-3	H1-a-I
NN176	2016	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN291	2016	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN385	2018	G9-III-d, P[8]-3.6 [13]	A1-b-I	N1-a-III	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN386	2018	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN568	2018	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-I	T1-a3-III	E1-1-I	H1-a-I
NN856	2019	G9-VI-e, P[8]-3.6 [17]	A1-b-II	N1-a-II	–	E1-3	H1-a-I
NN1217	2019	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-II
NN1428	2019	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	–	E1-1-I	H1-a-II
NN839	2020	G9-III-d, P[8]-3.3	A1-b-II	N1-a-III	T1-a3-I	E1-3	H1-a-II
NN877	2020	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-III	–	E1-1-I	H1-a-II

происходило в 2014 (E1-3, ген *NSP4*), 2018 (T1-a3-III, ген *NSP3*), 2019 гг. (A1-b-II, ген *NSP1*; H1-a-II, ген *NSP5*).

Анализ выведенных аминокислотных последовательностей неструктурных белков ротавируса А генотипа G9P[8]

Анализ аминокислотной последовательности белка *NSP1* показал, что представители сублинии A1-b-II, появившиеся в нижегородской популяции в 2019 г., отличались от циркулировавших ранее РВ сублинии A1-b-I в 6 позициях (76, 115, 119, 131, 165 и 199). Анализ аминокислотной последовательности белка *NSP2*, штаммов генотипа N1, относящихся к 4 сублиниям (N1-a-I, N1-a-II, N1-a-III и N1-a-IV), показал вариабельность в 16 позициях (64, 75, 82, 97, 98, 100, 108, 118, 135, 143, 200, 218, 249, 253, 254 и 255). Среди представителей разных сублиний генотипа N1 наибольшее количество различий в аминокислотной последовательности (8 замен) имели штаммы сублинии N1-a-III, присутствовавшие в нижегородской популяции в 2012, 2018 и 2020 гг. РВ сублинии N1-a-I, циркулировавшие в период 2011–2018 гг., имели 3 аминокислотных отличия от других сублиний. Штаммы сублинии N1-a-IV, выявленные в Нижнем Новгороде в 2016 г., имели 4 аминокислотные замены, в то время как изолят, относившийся к сублинии N1-a-II (2019), характеризовался наличием двух замен. Анализ аминокислотной последовательности белка *NSP3* показал вариабельность представителя сублинии T1-a3-III в двух позициях (222 и 255) в сравнении со штаммами T1-a3-I, консервативными на протяжении всего периода изучения. В целом РВ, относящиеся к двум филогенетическим линиям (E1-1-I и E1-3), были вариабельны в 12 позициях белка *NSP4*. РВ линии E1-3, встречавшиеся в популяции в 2014–2015 и 2019–2020 гг., имели 7 замен аминокислот (D124E, K150R, V154I, I155V, V158I, S174N, S182V/I) в сравнении со штаммами линии E1-1 (сублинии I), циркулировавшими на протяжении всего изучаемого периода.

Анализ аминокислотной последовательности белка *NSP5/NSP6* представителей сублиний H1-a-I и H1-a-II показал вариабельность в 6 позициях (124, 153, 170, 182, 185, 195). Однако замен аминокислот, отличавших одну сублинию от другой, не обнаружено. Все замены были единичными (S124G, R153K, S170R, K182N, F185Y, A195S) и характерными для штаммов обеих сублиний, выявленных в 2012 (3 штамма), 2018 (3 штамма) и 2019 гг. (1 штамм).

Таким образом, у РВ генотипа G9P[8] наибольшее число замен наблюдалось в аминокислотной последовательности белка *NSP2* (16 позиций), которая была вариабельна на протяжении всего изучаемого периода. Для белков *NSP1*, *NSP3*, *NSP4* показано от 2 до 7 замен, специфичных для всех представителей определённых сублиний. Белок *NSP5* был наиболее консервативен: у единичных штаммов выявлены замены в 6 позициях.

Обсуждение

По данным литературы, штаммы РВ генотипа G9P[8] широко распространены в мире, причём на некоторых территориях они занимают доминирующее положение. Так, например, X. Zhou и соавт. (2020) в своей работе отмечали, что доля генотипа G9P[8] в Китае за период 2011–2019 гг. составила 74,5% [36]. Также отмечено преобладание G9P[8] в разных областях Италии, которое началось в 2008–2009 гг. [37]. Период 2012–2013 гг. характеризовался высокой долей РВ с генотипом G9P[8] в Москве (30%), которые были родственны нижегородским и турецким штаммам. Далее в 2015–2020 гг. штаммы данного генотипа доминировали в общей структуре с долей 37% [38]. В Нижнем Новгороде РВ генотипа G9P[8] доминировали в 2011–2020 гг. Долевой вклад G9P[8] в разные сезоны менялся и составлял от 1 до 58,8%.

Для генотипа G9 выделено шесть филогенетических линий (I–VI) гена *VP7*. Представители линии G9-III широко распространены по всему миру [39]. Нижегородские РВ, выделенные в 2011–2016 гг., группировались на филогенетическом дереве внутри сублинии G9-III-d и формировали два кластера со штаммами из Новосибирска (2011–2012) и Турции (2014–2016) [8, 13]. На протяжении нескольких лет сублиния G9-III-d была единственной на территории Нижнего Новгорода. После 2018 г. в нижегородской популяции были выявлены штаммы генотипа G9P[8], относящиеся к сублинии G9-IV-e, в которую также вошли РВ человека, обнаруженные в Китае, и свиней, выделенные в Японии. Представители сублинии G9-III-d были консервативны по аминокислотному составу белка *VP7* на протяжении длительного периода и отличались от штаммов сублинии G9-VI-e одной аминокислотой в позиции 100 (D100N). Для генотипа P[8] наиболее распространённой на территории России филогенетической линией гена *VP4* является P[8]-3. В 2016–2020 гг. штаммы сублиний P[8]-3.1, P[8]-3.3 и P[8]-3.6 были широко распространены в Нижнем Новгороде, а также на территории Москвы и Новосибирска. В то же время единичные представители P[8]-3.4 были обнаружены в Нижнем Новгороде в 2017 г. и Омске в 2008 г. [17]. Используемые в данном исследовании штаммы были ранее охарактеризованы и имели аллели G9-III-d и P[8]-3.6 генов *VP7* и *VP4*.

Для генов неструктурных белков РВ генотипа G9P[8] показаны следующие особенности: консервативность на протяжении основной части изучаемого периода и появление новых аллелей к его концу (*NSP1*, *NSP3*, *NSP5*) либо вариабельность нуклеотидной последовательности (*NSP2*, *NSP4*) во время доминирования.

Так, аллель гена *NSP1* A1-b-I был единственным среди РВ G9P[8], циркулирующих на территории Нижнего Новгорода в период 2011–2018 гг. Начиная с 2019 г. в популяции отмечено появление штаммов сублинии A1-b-II и их совместная циркуляция со штаммами, несущими аллель A1-b-I. Анализ аминокислотных последовательностей белка *NSP1* показал,

что штаммы сублинии A1-b-I имели консервативный белок NSP1, в то время как штаммы сублинии A1-b-II в сравнении с ними имели 6 замен. Замены аминокислот в структуре NSP1 располагались в двух функциональных областях белковой молекулы: в РНК-связывающем домене (S76N), целостность которого важна для блокировки апоптоза и реализации механизмов врождённой иммунной защиты клеток путём деградации интерферон-регулирующих факторов (IRF3) хозяина, и в области взаимодействия с цитоскелетом (R115K, N119T, P131R, S165R), изменения в котором могут привести к перемещению белка NSP1 в ядро клетки (ядерная транслокация NSP1) [40]. Одна замена (L199V) располагалась в некодирующей области.

В случае гена *NSP3* аналогично с *NSP1* сублиния T1-a3-I являлась основной в Нижнем Новгороде и стабильной во времени на протяжении как минимум 9 лет. Появление нового аллеля (T1-a3-III) и генетическая гетерогенность РВ генотипа G9P[8] по гену *NSP3* отмечены только в 2018 г. Представители сублинии T1-a3-I имели консервативный белок NSP3 на всём протяжении изучаемого периода. У единственного представителя сублинии T1-a3-III показаны две замены аминокислот (I222V и A255V) в сравнении со штаммами сублинии T1-a3-I. Замены располагались в С-терминальной области белковой молекулы (205–313 а.о.), важной для подавления трансляции всех эукариотических мРНК. Этот домен конкурирует с поли(А)-связывающим белком (PABP) за сегмент фактора инициации трансляции эукариот 4G [18, 41, 42].

Для гена *NSP5* сублиния N1-a-I на протяжении 8 лет также была единственной среди нижегородских РВ генотипа G9P[8]. В 2019 г. в Нижнем Новгороде отмечено появление представителей сублинии N1-a-II. Различий в аминокислотной последовательности NSP5 между представителями разных сублиний не обнаружено. Показаны единичные замены аминокислот у отдельных штаммов (2012, 2018–2019 гг.), которые располагались в варибельной области (S124G, K143N), в домене взаимодействия с NSP6 (S170R, K182N, F185Y, A195S), а также в домене гомомультимеризации (A195S) [43, 44].

В отличие от рассмотренных выше генов, *NSP2* РВ генотипа G9P[8] характеризовался варибельностью нуклеотидных последовательностей. Всего было показано 4 аллеля гена, которые сменяли друг друга. В 2011 г. единственной среди РВ генотипа G9P[8] была сублиния N1-a-I. В 2012 г. отмечено появление представителей сублинии N1-a-III. Далее в 2014–2015 гг. вновь циркулировали РВ, принадлежащие сублинии N1-a-I, которых в 2016 г. сменили штаммы вновь появившейся сублинии N1-a-IV. В 2018 г. отмечена совместная циркуляция РВ генотипа G9P[8], имеющих триразных аллеля гена *NSP2* (N1-a-I, N1-a-III, N1-a-IV). В 2019 г. показаны представители новой сублинии (N1-a-II) в коциркуляции с N1-a-IV, в то время как в 2020 г. отмечено присутствие только штаммов сублинии N1-a-IV.

Варибельность аминокислотных последовательностей белка NSP2 была наибольшей из всех неструк-

турных белков и затрагивала 20 позиций. Замены аминокислот в структуре NSP2 располагались в двух функциональных областях белковой молекулы. Восемь замен затрагивали N-концевой домен мономера NSP2 (S64N, I75N, A82N, N82I, E97D, I98V, N100S и V108I). Данный домен содержит участки связывания односпиральной РНК (1–97 а.о.). Предполагается, что взаимодействие с РНК происходит в петле, состоящей из 24 а.о. (52–76 а.о.). Конформационное изменение в данной области может иметь влияние на эффективность взаимодействия белка и РНК. Двенадцать замен аминокислот были локализованы в С-концевом домене (K118R, S135A, S143L, V200I, V218I, A249T, T249V, V249A, N253I, I254V, V254T и T255I), где расположен сайт присоединения и гидролиза нуклеозидтрифосфата (109–317 а.о.). Замены в данной области также могут повлиять на результативность взаимодействия белка и РНК [45].

Подобно гену *NSP2*, кластеризация нижегородских штаммов по гену *NSP4* носила временной характер. Штаммы, выявленные в 2011–2012 гг., принадлежали сублинии E1-1-I. В 2014–2015 гг. показаны представители линии E1-3. Далее, в 2016 и 2018 гг., вновь были представлены РВ сублинии E1-1-I. В период 2019–2020 гг. были отмечены возвращение представителей линии E1-3 и их совместная циркуляция со штаммами сублинии E1-1-I.

В первичной структуре *NSP4* РВ показано 12 аминокислотных замен, которые располагались в трёх областях белковой молекулы. Замена T85I находилась в регионе домена H3 (63–90 а.о.), вовлечённого в механизм удержания белка в ЭПР (эндоплазматический ретикулум). Замена (D124E) была локализована в суперскрученном домене (95–137 а.о.), важном для олигомеризации белковой молекулы энтеротоксина, его взаимодействия с кавеоллином-1 и внутриклеточного транспорта NSP4 от ЭПР до поверхности клеток. Замены V158I, I166V, R167K, S174N затрагивали участок взаимодействия с белком внутреннего капсида VP6 (156–175 а.о.), который играет роль внутриклеточного рецептора для двуслойных вирусных частиц и является необходимым медиатором в вирусном морфогенезе. Другие замены находились в междоменных участках [46].

Суммируя изложенное, гены *NSP1*, *NSP3*, *NSP5* характеризовались консервативностью до 2018 г., после чего для каждого из них было обнаружено по одному новому аллелю. Наиболее варибельным из генов, кодирующих неструктурные белки, был *NSP2*. На протяжении всего изучаемого периода в нижегородской популяции происходила коциркуляция его четырёх вариантов, при этом новые аллели отмечены в 2012 (N1-a-III), 2016 (N1-a-IV) и 2019 гг. (N1-a-II). Полученные результаты согласуются с данными, представленными G. Ianigo и соавт. (2013) [37]. В ходе анализа нуклеотидных последовательностей РВ генотипа G9P[8] были выявлены различия от 2 до 7% для разных генов. Итальянские штаммы имели схожую кластеризацию на филогенетических деревьях на основе генов *NSP1*, *NSP3* и *NSP5*. Изоляты группи-

ровались в составе двух кластеров внутри генотипов A1, T1 и N1. Ген *NSP2* показал наибольшую вариативность и самые низкие показатели идентичности (92%). Штаммы составили три кластера внутри генотипа N1. Ген *NSP4* был наиболее консервативным: все исследуемые последовательности вошли в один кластер [29]. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о роли неструктурных белков, участвующих в регуляции внутриклеточных процессов, в эволюции РВ наравне со структурными.

Заключение

Проведён ретроспективный анализ РВ генотипа G9P[8] на основе генов, кодирующих неструктурные белки. В период с 2011 по 2018 г., включивший доминирование данного генотипа в 2015–2017 гг., генетическое разнообразие РВ достигалось за счёт коциркуляции штаммов, несущих различные аллели гена *NSP2* (сублинии N1-a-I, N1-a-III, N1-a-IV). В аминокислотной последовательности *NSP2* обнаружено 16 замен, расположенных в функциональных областях, которые участвуют во взаимодействии с РНК и гидролизе нуклеозидтрифосфата.

В период с 2018 по 2020 г., характеризовавшийся спадом активности циркуляции РВ генотипа G9P[8], были отмечены появление новых аллелей генов *NSP1*, *NSP2*, *NSP3*, *NSP5* (сублинии A1-b-II, N1-a-II, T1-a3-III, N1-a-II) и возвращение аллеля гена *NSP4*, принадлежащего линии E1-3. В популяции сформировались новые варианты генотипа G9P[8], несущие ранее не встречавшиеся комбинации аллелей всех неструктурных генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приоритетные направления научных исследований, предпринимаемых в целях создания вакцин против диарейных болезней. *Бюллетень ВОЗ*. 2019; (6): 21–40.
2. Брико Н.И., Битиева Е.А., Горелов А.В., Горелова Е.А., Кудрявцев В.В., Миндлина А.Я. *Эпидемиология, клиника, лечение и иммунопрофилактика ротавирусной инфекции*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
3. Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1917–73.
4. Rixon F., Taylor P., Desselberger U. Rotavirus RVA segments sized by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 1984; 56(1): 233–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-1-233>
5. Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Banyai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *J. Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
6. Estes M.K., Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 1989; 53(4): 410–49. <https://doi.org/10.1128/mr.53.4.410-449.1989>
7. RCWG. Rotavirus classification working group; 2018. Available at: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
8. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>
9. Matthijnssens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *J. Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(10): 2431–6. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq137>
10. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *J. Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29–56. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
11. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
12. Морозова О.В., Сашина Т.А., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Различия в аминокислотном составе антигенных эпитопов белка VP7 российских ротавирусов с генотипом G9 и вакцинных штаммов RotaTeq, Rotavac и Rotarix. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(1): 57–66. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-57-66>
13. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Genotype constellations of the rotavirus A strains circulating in Nizhny Novgorod, Russia, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85:104578. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104578>
14. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus group A surveillance and genotype distribution in Russian Federation in seasons 2012–2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5(7): 407–13. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2014.57055>
15. Жираковская Е.В., Аксанова Р.Х., Горбунова М.Г., Тикун А.Ю., Курильщикова А.М., Соколов С.Н. и др. Генетическое разнообразие изолятов ротавирусов группы А, выявленных в Западной Сибири в 2007–2011 гг. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2012; 27(4): 33–41.
16. Епифанова Н.В., Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.В. Характеристика ротавируса генотипа G9, выявленного в Нижнем Новгороде в 2011–12 годах. *Медицинский алфавит*. 2013; 4(24): 20–6.
17. Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Леонов А.В., Новикова Н.А. Молекулярный мониторинг ротавирусов (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A), циркулирующих в Нижнем Новгороде (2012–2020 гг.): обнаружение штаммов с новыми генетическими характеристиками. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 140–51. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-46>
18. Both G.W., Bellamy A.R., Mitchell D.B. Rotavirus protein structure and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994; 185: 67–105. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78256-5_4
19. Taraporewala Z.F., Patton J.T. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *J. Virol.* 2001; 75(10): 4519–27. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4519-4527.2001>
20. Vende P., Piron M., Castagne N., Poncet D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* 2000; 74(15): 7064–71. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7064-7071.2000>
21. Mirazimi A., Nilsson M., Svensson L. The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J. Virol.* 1998; 72(11): 8705–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8705-8709.1998>
22. Krishna Mohan K.V., Arteya C.D. Nucleotide sequence analysis of rotavirus gene 11 from two tissue culture-adapted ATCC strains, RRV and Wa. *J. Virus Genes*. 2001; 23(3): 321–9. <https://doi.org/10.1023/a:1012577407824>
23. Torres-Vega M.A., Gonzalez R.A., Duarte M., Poncet D., Lopez S., Arias C.F. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 3): 821–30. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-3-821>
24. Novikova N.A., Sashina T.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Morozova O.V. Long-term monitoring of G1P[8] Rotaviruses circulating without vaccine pressure in Nizhny Novgorod, Russia, 1984–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(4): 865–75. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04553-2>
25. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(6): 1365–73. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.6.1365-1373.1992>
26. Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of ro-

- tavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(2): 276–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.276-282.1990>
27. Iturriza-Gymara M., Isherwood B., Desselberger U., Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 2001; 75(8): 3696–705. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.8.3696-3705.2001>
 28. Iturriza-Gymara M., Kang G., Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.* 2004; 31(4): 259–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.04.009>
 29. Maunula L., von Bonsdorff C.H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J. Gen. Virol.* 1998; 79(Pt. 2): 321–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-321>
 30. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 31. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA 10.0.5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *J. Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
 32. Mukherjee A., Dutta D., Ghosh S., Bagchi P., Chattopadhyay S., Nagashima S., et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 733–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0363-3>
 33. Ndze V.N., Esona M.D., Achidi E.A., Gonsu K.H., Dóro R., Marton S., et al. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010–2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 537–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.009>
 34. Wang Y.H., Pang B.B., Ghosh S., Zhou X., Shintani T., Urushibara N., et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. *PLoS One.* 2014; 9(3): e88850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088850>
 35. Agbemabiese C.A., Nakagomi T., Doan Y.H., Nakagomi O. Whole genomic constellation of the first human G8 rotavirus strain detected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 35: 184–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.033>
 36. Zhou X., Wang Y.H., Pang B., Chen N., Kobayashi N. Surveillance of human rotavirus in Wuhan, China (2011 – 2019): predominance of G9P[8] and emergence of G12. *J. Arch. Virol.* 2020; 9(10): 810–27. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100810>
 37. Ianiro G., Heylen E., Delogu R., Zeller M., Matthijnsens J., Ruggeri F.M., et al. Genetic diversity of G9P[8] rotavirus strains circulating in Italy in 2007 and 2010 as determined by whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 16: 426–32. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.031>
 38. Петруша О.А., Корчевая Е.Р., Минтаев Р.Р., Исаков И.Ю., Никонова А.А., Мескина Е.Р. и др. Молекулярно-генетические особенности ротавирусов группы А, выявленных в Москве в 2015–2020 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2022; 99(1): 7–19. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-208>
 39. Phan T.G., Okitsu S., Maneekarn N., Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 2007; 7(5): 656–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.05.001>
 40. Hua J., Patton J.T. The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *J. Virol.* 1994; 198(2): 567–76. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1068>
 41. Deo R.C., Bonanno J.B., Sonenberg N., Burley S.K. Recognition of polyadenylate RNA by the polyA binding protein cell. *J. Virology.* 2002; 98(6): 835–45. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81517-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81517-2)
 42. Imataka H., Gradi A., Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds polyA-binding protein and functions in polyA-dependent translation. *J. Virol.* 1998; 17(24): 7480–9. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7480>
 43. Mattion N. M., Cohen J., Estes M. K. The rotavirus proteins. In: Kapikian A. Z., ed. *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract.* New York: Marcel Dekker Inc.; 1994: 169–249.
 44. Vende P., Taraporewala Z.F., Patton J.T. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J. Virol.* 2002; 76(10): 5291–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.5291-5299.2002>
 45. Taraporewala Z.F., Patton J.T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *J. Virol.* 2004; 101(1): 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.006>
 46. Bowman G.D., Nodelman I.M., Levy O., Lin S.L., Tian P., Zamb T.J., et al. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J. Mol. Biol.* 2000; 304(5): 861–71. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4250>

REFERENCES

1. Priority areas of scientific research undertaken in order to create vaccines against diarrheal diseases. *WHO Bulletin.* 2019; (6): 21–40. (in Russian)
2. Briko N.I., Bitieva E.A., Gorelov A.V., Gorelova E.A., Kudryavtsev V.V., Mindlina A.Ya. *Epidemiology, Clinic, Treatment and Immunoprophylaxis of Rotavirus Infection [Epidemiologiya, klinika, lechenie i immunoprofilaktika rotavirusnoy infektsii].* Moscow: GEOTAR-Media; 2015. (in Russian)
3. Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology.* Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1917–73.
4. Rixon F., Taylor P., Desselberger U. Rotavirus RVA segments sized by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 1984; 56(1): 233–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-1-233>
5. Matthijnsens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Bányai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *J. Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
6. Estes M.K., Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 1989; 53(4): 410–49. <https://doi.org/10.1128/mr.53.4.410-449.1989>
7. RCWG. Rotavirus classification working group; 2018. Available at: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
8. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>
9. Matthijnsens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *J. Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(10): 2431–6. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq137>
10. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *J. Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29–56. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
11. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
12. Morozova O.V., Sashina T.A., Epifanova N.V., Novikova N.A. Differences in the amino acid composition of the antigen epitopes of the VP7 protein of Russian rotaviruses with the G9 genotype and the vaccine strains Rotateq, Rotavac, and Rotarix. *Infektsiya i immunitet.* 2019; 9(1): 57–66. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-57-66> (in Russian)
13. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Genotype constellations of the rotavirus A strains circulating in Nizhny Novgorod, Russia, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104578. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104578>
14. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus group A surveillance and genotype distribution in Russian Federation in seasons 2012–2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5(7): 407–13. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2014.57055>
15. Zhirakovskaya E.V., Aksanova R.Kh., Gorbunova M.G., Tikonov A.Yu., Kuril'shchikov A.M., Sokolov S.N., et al. Genetic diversity of group A rotavirus isolates found in western Siberia in 2007–2011. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2012; 27(4): 174–83. (in Russian)

16. Epifanova N.V., Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.V. Characteristics of rotavirus with G9-genotype identified in Nizhny Novgorod during years 2011–12. *Meditsinskiy alfavit*. 2013; 4(24): 20–6. (in Russian)
17. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Kashnikov A.Yu., Leonov A.V., Novikova N.A. Molecular monitoring of the rotavirus (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A) strains circulating in Nizhny Novgorod (2012–2020): detection of the strains with the new genetic features. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(2): 140–51. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-46> (in Russian)
18. Both G.W., Bellamy A.R., Mitchell D.B. Rotavirus protein structure and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994; 185: 67–105. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78256-5_4
19. Taraporewala Z.F., Patton J.T. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *J. Virol.* 2001; 75(10): 4519–27. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4519-4527.2001>
20. Vende P., Piron M., Castagne N., Poncet D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* 2000; 74(15): 7064–71. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7064-7071.2000>
21. Mirazimi A., Nilsson M., Svensson L. The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J. Virol.* 1998; 72(11): 8705–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8705-8709.1998>
22. Krishna Mohan K.V., Arteya C.D. Nucleotide sequence analysis of rotavirus gene 11 from two tissue culture-adapted ATCC strains, RRV and Wa. *J. Virus Genes*. 2001; 23(3): 321–9. <https://doi.org/10.1023/a:1012577407824>
23. Torres-Vega M.A., Gonzalez R.A., Duarte M., Poncet D., López S., Arias C.F. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 3): 821–30. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-3-821>
24. Novikova N.A., Sashina T.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Morozova O.V. Long-term monitoring of G1P[8] Rotaviruses circulating without vaccine pressure in Nizhny Novgorod, Russia, 1984–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(4): 865–75. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04553-2>
25. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(6): 1365–73. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.6.1365-1373.1992>
26. Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(2): 276–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.276-282.1990>
27. Iturriza-Gymara M., Isherwood B., Desselberger U., Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 2001; 75(8): 3696–705. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.8.3696-3705.2001>
28. Iturriza-Gymara M., Kang G., Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.* 2004; 31(4): 259–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.04.009>
29. Maunula L., von Bonsdorff C.H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J. Gen. Virol.* 1998; 79(Pt. 2): 321–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-321>
30. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
31. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA 10.0.5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *J. Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
32. Mukherjee A., Dutta D., Ghosh S., Bagchi P., Chattopadhyay S., Nagashima S., et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 733–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0363-3>
33. Ndze V.N., Esona M.D., Achidi E.A., Gonsu K.H., Dóro R., Marton S., et al. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010–2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 537–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.009>
34. Wang Y.H., Pang B.B., Ghosh S., Zhou X., Shintani T., Urushibara N., et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. *PLoS One*. 2014; 9(3): e88850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088850>
35. Agbemabiese C.A., Nakagomi T., Doan Y.H., Nakagomi O. Whole genomic constellation of the first human G8 rotavirus strain detected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 35: 184–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.033>
36. Zhou X., Wang Y.H., Pang B., Chen N., Kobayashi N. Surveillance of human rotavirus in Wuhan, China (2011–2019): predominance of G9P[8] and emergence of G12. *J. Arch. Virol.* 2020; 9(10): 810–27. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100810>
37. Ianiro G., Heylen E., Delogu R., Zeller M., Matthijnsens J., Ruggeri F.M., et al. Genetic diversity of G9P[8] rotavirus strains circulating in Italy in 2007 and 2010 as determined by whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 16: 426–32. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.031>
38. Petrusha O.A., Korchevaya E.R., Mintae R.R., Isakov I.Yu., Nikonova A.A., Meskina E.R., et al. Molecular and genetic characteristics of group A rotaviruses detected in Moscow in 2015–2020. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2022; 99(1): 7–19. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-208> (in Russian)
39. Phan T.G., Okitsu S., Maneekarn N., Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 2007; 7(5): 656–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.05.001>
40. Hua J., Patton J.T. The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *J. Virol.* 1994; 198(2): 567–76. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1068>
41. Deo R.C., Bonanno J.B., Sonenberg N., Burley S.K. Recognition of polyadenylate RNA by the polyA binding protein cell. *J. Virology*. 2002; 98(6): 835–45. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81517-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81517-2)
42. Imataka H., Gradi A., Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds polyA-binding protein and functions in polyA-dependent translation. *J. Virol.* 1998; 17(24): 7480–9. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7480>
43. Mattion N. M., Cohen J., Estes M. K. The rotavirus proteins. In: Kapikian A. Z., ed. *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1994: 169–249.
44. Vende P., Taraporewala Z.F., Patton J.T. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J. Virol.* 2002; 76(10): 5291–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.5291-5299.2002>
45. Taraporewala Z.F., Patton J.T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *J. Virol.* 2004; 101(1): 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.006>
46. Bowman G.D., Nodelman I.M., Levy O., Lin S.L., Tian P., Zamb T.J., et al. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J. Mol. Biol.* 2000; 304(5): 861–71. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4250>