



УДК 578.833.27'112.083.3

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ 98–113 БЕЛКА Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЯВЛЯЕТСЯ УЧАСТКОМ СЛИЯНИЯ ВИРУСА С КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНОЙ

© 1998 г. Т. Д. Волкова<sup>#</sup>, О. М. Вольпина, В. Т. Иванов, В. В. Варгин\*, М. Ф. Ворович\*,  
А. В. Тимофеев\*, Б. Ф. Семенов\*, Н. А. Цехановская\*\*, Е. К. Прессман\*\*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\* Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва;

\*\* Институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 13.03.98 г. Принята к печати 13.04.98 г.

Синтетический пептид, соответствующий консервативной последовательности 98–113 белка Е вируса клещевого энцефалита, исследован с целью выяснения его роли в функционировании флавивирусов. Показано, что пептид 98–113 ингибирует инфицирование вирусом макрофагов *in vitro*. Среди набора моноклональных антител к белку Е найдено одно, специфически связывающееся с данным пептидом, и установлено, что оно препятствует проникновению вируса в липосомы. Полученные результаты сопоставлены с данными о пространственной структуре белка Е и межвидовой гомологии. Установлено, что последовательность 98–113 белка Е вируса клещевого энцефалита является участком слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной.

*Ключевые слова:* вирус клещевого энцефалита; синтетические пептиды; макрофаги; моноклональные антитела; липосомы.

По современным представлениям, вирусы семейства *Flaviviridae* способны проникать в клетку либо путем слияния вирионов непосредственно с плазматической мембраной [1], либо рецепторопосредуемым эндоцитозом, когда происходит слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной при пониженных значениях рН внутри эндосомы [2]. И в том и другом случае ингибирование слияния антивирусными иммуноглобулинами приводит к потере инфекционности [3]. Предполагается, что белок Е участвует в процессе слияния вирусной оболочки с клеточными мембранами, причем для слияния необходимо изменение конформации белка [4].

Чтобы определить участок белка, ответственный за слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной, мы проанализировали результаты проведенной нами ранее работы по изучению свойств ряда синтетических пептидов, соответствующих потенциально антигенным участкам по-

следовательности гликопротеина Е вируса КЭ [5]. Эти исследования показали, что только антитела к пептидам, соответствующим последовательности 98–113 и 394–403 белка Е (рис. 1), связываются с белком и вирусом в ИФА, а антитела к пептиду 98–113 также нейтрализуют вирус в культуре клеток. Однако из всего набора исследованных пептидов только пептид 35–51 связывается с поликлональной сывороткой к белку Е, в то время как ни пептид 394–403, ни пептид 98–113 не способны связываться с противобелковой или противовирусной сывороткой. Другими словами, среди всего набора пептидов только пептид последовательности 98–113 стимулирует выработку вируснейтрализующих антител, но при этом, поскольку он не связывается с антителами к вирусу

35 Ala Glu Gly Lys Pro Ser Met Asp Val Trp Leu Asp Ser Ile Tyr Gln Glu 51

98 Asp Arg Gly Trp Gly Asn His Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile 113

394 Gln Lys Gly Ser Ser Ile Gly Arg Val Phe 403

Рис. 1. Синтетические фрагменты гликопротеина Е.

Сокращения: ПЭС – перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи; МКА – моноклональные антитела; PBS – 0.01 М Na-фосфатный буфер, рН 7.4; БОЕ – бляшкообразующие единицы; КОИЦ – количество инфекционных центров; ОВА – овалбумин, BSA – бычий сывороточный альбумин; NEPES – Na-соль N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфокислоты), MES – Na-соль 2-(N-морфолино)этансульфокислоты, КЭ – клещевой энцефалит.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: fmdv@ibch.siobc.ras.ru).

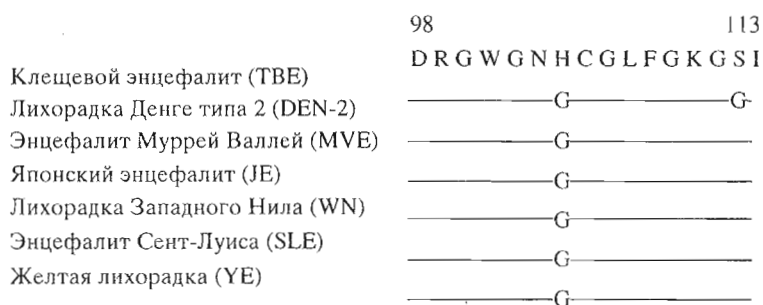


Рис. 2. Консервативный участок белка E в различных представителях семейства Flaviviridae.

КЭ, т.е. не проявляет антигенных свойств, его нельзя отнести к В-эпитопам белка E.

Сравнивая первичную структуру белков E различных флавивирусов, можно видеть, что абсолютно консервативное положение остатков цистеина в их молекулах делает консервативной и общую структуру этих белков. Средний уровень гомологии для белков E таких вирусов, как возбудители лихорадки Денге (DEN), энцефалита Муррей Валлей (MVE), японского энцефалита (JE), лихорадки Западного Нила (WN), энцефалита Сент-Луиса (SLE) и желтой лихорадки (YF), составляет 65% [6]. Между тем данные вирусы относятся к разным группам внутри семейства Flaviviridae, они различаются серологически и по картине патогенеза. В молекуле гликопротеина E имеется вариабельный регион (1–121), в котором локализованы основные типоспецифичные эпитопы и уровень гомологии которого <50%. Внутри этого района и расположен участок 98–113, достаточно протяженный и с чрезвычайно высокой степенью гомологии (98%) (рис. 2). Очевидно, что этот фрагмент белка должен быть функционально значим для всего семейства флавивирусов. Поэтому еще в 1989 г. на основании исключительной консервативности участка 98–113 выдвигалось предположение о роли данного фрагмента как

участка, ответственного за слияние [6]. Кроме того, обращалось внимание на относительную гидрофобность его последовательности и обилие в ней остатков глицина, что также делает его структуру схожей со структурой участков слияния других вирусных белков. Недавно с помощью рентгеноструктурного анализа была установлена третичная структура растворимого фрагмента белка E [7]. В этой структуре участок 98–113 представляет собой выступающую петлю, фиксированную у основания двумя S–S-мостиками. При изменении конформации, связанном с агрегированием молекул белка E, необходимым для взаимодействия вируса с клеточной мембраной, петля выступает на поверхность вириона, что также согласуется с гипотезой об участии фрагмента 98–113 в процессе слияния. Однако до сих пор не было экспериментальных данных, подтверждающих это предположение. Настоящая работа представляет такие эксперименты.

Нами была проведена серия опытов по изучению воздействия пептида 98–113 на инфекцию макрофагов *in vitro* вирусом клещевого энцефалита. Макрофаги были выбраны в качестве клеточной модели, поскольку они являются естественной клеткой-мишенью для вируса КЭ. Были использованы перитонеальные и селезеночные

Таблица 1. Влияние пептида 98–113 на способность вируса КЭ инфицировать макрофаги мышей *in vitro*

Макрофаги	Доза вируса (БОЕ/клетка)	Число инфекционных центров		
		Пептид 98–113 (500 мкг/мл)	Контрольный пептид* (500 мкг/мл)	В отсутствие пептида
Перитонеальные	$1 \times 10^{-4}$	70(±21)	250(±39)	280(±26)
	$3 \times 10^{-4}$	25(±8)	100(±21)	90(±16)
	$1 \times 10^{-5}$	5(±3)	20(±6)	20(±9)
Селезеночные	$1 \times 10^{-4}$	12(±3)	86(±17)	98(±15)
	$3 \times 10^{-4}$	4(±2)	29(±7)	67(±11)
	$1 \times 10^{-5}$	1(±1)	16(±4)	20(±5)

\* В качестве контрольного был использован пептид PNGAPEAAL, воспроизводящий последовательность 90–98 белка VP1 вируса ящура штамма A<sub>22</sub>.

Таблица 2. Связывание пептидов 35–51, 393–403 и 98–113 с моноклональными антителами

МКА	Подкласс	Нейтрализация	Титр связывания с пептидом			
			35–51	394–403	98–113	Контроль*
5F <sub>6</sub>	IgG <sub>1</sub>	–	<10	250	250	<10
2H <sub>3</sub>	IgM	+	250	250	250	250
3B <sub>7</sub>	IgM	–	250	250	250	<10
<b>4F<sub>7</sub></b>	IgM	–	250	<b>6250</b>	<b>6250</b>	250
2D <sub>1</sub>	IgG <sub>1</sub>	–	<10	<10	<10	250
5B <sub>5</sub>	IgM	–	<10	<10	<10	<10
5C <sub>5</sub>	IgG <sub>1</sub>	–	<10	<10	<10	<10
1H <sub>11</sub>	IgG <sub>1</sub>	+	250	250	250	250
5H <sub>9</sub>	IgG <sub>1</sub>	–	250	250	250	250
4A <sub>6</sub>	IgG <sub>1</sub>	–	250	250	<10	<10
1E <sub>11</sub>	IgM	–	250	250	250	250
13D <sub>6</sub>	IgG <sub>1</sub>	+	160	320	320	320
14D <sub>5</sub>	IgG <sub>1</sub>	+	320	160	160	160
<b>14D<sub>2</sub></b>	IgG <sub>1</sub>	–	320	160	<b>150000</b>	320
17C <sub>1</sub>	IgG <sub>1</sub>	–	320	320	640	320

\* Пептид PNGAPEAAL.

макрофаги мышей. Макрофаги инкубировали с пептидом, а затем в клеточную систему добавляли вирус в различных дозах. После этого макрофаги, отмытые от вируса, наносили на клетки ПЭС и на 4-е сут проводили учет негативных колоний (табл. 1). После обработки макрофагов пептидом 98–113 количество инфекционных центров для всех трех значений дозы вируса было на-

много ниже, чем в отсутствие пептида или после обработки контрольным пептидом, не относящимся к последовательности белка Е вируса КЭ. Таким образом, пептид 98–113 активно конкурирует с вирусом в процессе взаимодействия с макрофагами, вследствие чего инфицированность последних значительно снижается по сравнению с контролем.

Чтобы шире охарактеризовать функциональную значимость синтетических фрагментов, мы решили проверить их связывание с моноклональными антителами к белку Е, полученными в Новосибирском институте биоорганической химии. Эти МКА относятся к IgG- и IgM-классам, обладают различной вируснейтрализующей и гемагглютинирующей активностью. Из табл. 2 видно, что только два МКА (4F<sub>7</sub> и 14D<sub>2</sub>) связываются с пептидами. МКА 4F<sub>7</sub>, относящееся к IgM-классу, связывается с одинаковым титром (6250) с двумя пептидами, 98–113 и 394–403, моделирующими участки, удаленные друг от друга в последовательности белка Е и расположенные в различных доменах белковой молекулы.

С помощью конкурентного ИФА было показано, что связывание носит неспецифический характер, так как увеличение концентрации пептида 98–113, взаимодействующего с МКА 4F<sub>7</sub> в растворе, не влияло на связывание с антителами того же пептида, сорбированного на пластике (рис. 3). Другое антитело (14D<sub>2</sub>) связывается только с одним пептидом (98–113) с высоким титром (150 000), и было показано, что это связывание специфиче-

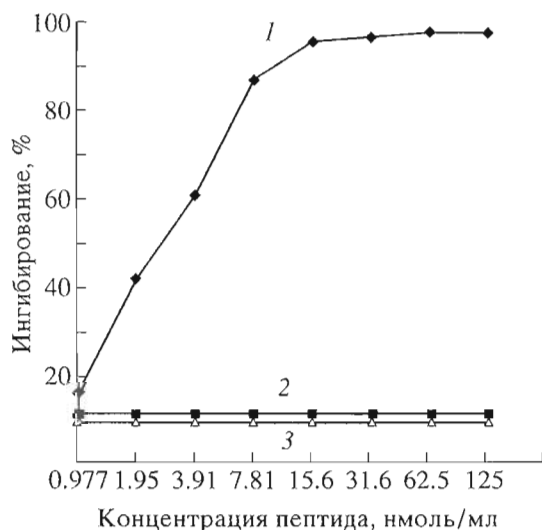


Рис. 3. Ингибирование пептидом 98–113 связывания МКА 14D<sub>2</sub> и 4F<sub>7</sub> с пептидом 98–113. 1 – пептид 98–113 и МКА 14D<sub>2</sub>; 2 – контрольный пептид и МКА 14D<sub>2</sub>; 3 – пептид 98–113 и МКА 4F<sub>7</sub>.

ское, поскольку наблюдалась зависимость связывания закрепленного на пластике пептида с МКА 14D<sub>2</sub> от концентрации того же пептида в растворе (рис. 3). МКА 14D<sub>2</sub> относится к IgG<sub>1</sub>-классу и, как и первое, не обладает способностью нейтрализовать вирус, но проявляет высокую активность в реакции подавления гемагглютинации.

Далее мы использовали МКА 14D<sub>2</sub> для проверки гипотезы об участии фрагмента 98–113 последовательности белка Е в процессе слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной. Предыдущие опыты ясно показывают способность пептида 98–113 оказывать влияние на взаимодействие вируса с клетками, однако, поскольку макрофаги являются сложной моделью, в которой присутствует и рецепторное узнавание, и слияние с эндосомальной либо плазматической мембраной, нельзя сделать вывод, на какую именно стадию процесса оказывается воздействие. Чтобы сузить рамки и рассматривать только процесс слияния, нами была проведена серия экспериментов на липосомах с использованием МКА 14D<sub>2</sub> и меченого вируса. В литературе описана способность поликлональной противовирусной сыворотки [3], а также МКА к белку Е [8] ингибировать слияние вирусных частиц с липосомами, происходящее, как и в эндосомах, при пониженных значениях pH. В настоящей работе мы использовали МКА, направленное против конкретного участка белка, а именно против участка 98–113. Для изучения влияния антител на процесс слияния вируса с липосомами аликвоты вируса инкубировали с МКА 14D<sub>2</sub> и затем добавляли липосомы с заключенной внутри РНКазой. При слиянии вирусных частиц с липосомами вирусная липидно-белковая оболочка удалялась и вирусная РНК становилась доступной для деградации нуклеазой внутри липосом. По степени деградации вирусной РНК оценивали степень слияния вируса с мембранами (табл. 3). В качестве положительного и отрицательного контроля использовали соответственно поликлональные мышинные иммуноглобулины против вируса КЭ и иммуноглобулины из нормальной асцитной жидкости. МКА 14D<sub>2</sub> препятствовали слиянию вируса с липосомами. Степень слияния при разведении 1 : 10 составляла всего лишь 2–5% от таковой в отсутствие антител. Такая же степень слияния наблюдалась при использовании поликлональных иммуноглобулинов к вирусу КЭ (рис. 4). Таким образом, показано, что МКА 14D<sub>2</sub> подавляют процесс слияния, по-видимому, связываясь с участком на поверхности вириона, посредством которого вирус взаимодействует с мембраной.

Совокупность свойств фрагмента 98–113 белка Е вируса КЭ, а именно: вируснейтрализующая активность противопептидных антител, способность пептида ингибировать инфекцию макрофа-

Таблица 3. Влияние МКА 14D<sub>2</sub> на слияние вируса КЭ с липосомами

Антитела*	Степень слияния, %**
–	100
14D <sub>2</sub>	2–5
Поликлональные антитела против вируса КЭ	2–5
Антитела из нормальной асцитной жидкости	100

\* Данные приведены для разведения антител 1 : 10.

\*\* За 100% принята степень слияния вируса КЭ с липосомами в отсутствие антител при pH 6.0. Интервал указывает минимальные и максимальные значения степени слияния во всех опытах.

гов, а также способность МКА, специфически связывающихся с пептидом, препятствовать слиянию вируса с липосомами, – доказывает участие фрагмента 98–113 в процессе слияния. Высокая консервативность участка 98–113 в ряду различных флавивирусов указывает на реализацию общего механизма слияния для различных представителей семейства Flaviviridae, в котором важную роль играет рассматриваемый пептидный сегмент.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали пептиды, синтез, антигенные и иммуногенные свойства которых описаны в работе [5].

Вирус клещевого энцефалита, штамм Софьин, был выделен и очищен по методу [9].

**Влияние пептида 98–113 на взаимодействие вируса КЭ с макрофагами.** На 96-ячеечном план-

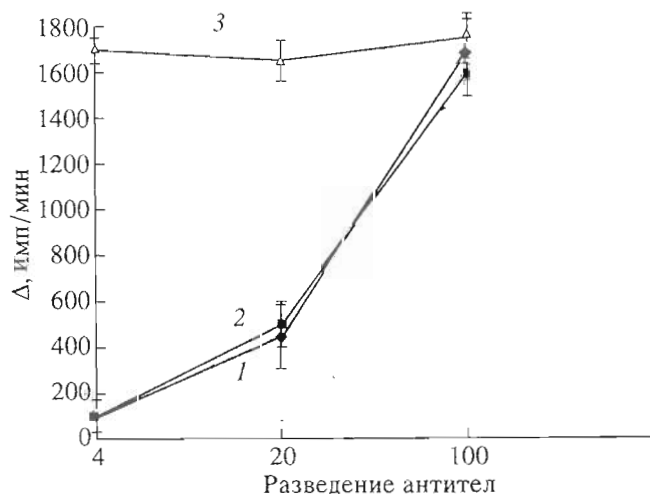


Рис. 4. Влияние антител на слияние вируса КЭ с липосомами. 1 – поликлональные противовирусные антитела; 2 – МКА 14D<sub>2</sub>; 3 – нормальная сыворотка.

шете сорбировали фракцию прилипающих к стеклу макрофагоподобных клеток (выделенных по методике [10]) селезенки мышей линии BALB/c либо аналогичных перитонеальных клеток (100 мкл в лунку, концентрация  $1 \times 10^6$  клеток/мл). После сорбции в течение 2 ч при 37°C промывали PBS и инкубировали с пептидом (500 мкг/мл в PBS, 1 ч при 37°C). Затем планшет промывали и добавляли вирус КЭ в трех концентрациях ( $1 \times 10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$  и  $1 \times 10^{-5}$  БОЕ/клетка), инкубировали 1 ч при 37°C. После этого макрофаги отмывали от вируса, нанесли на клетки ПЭС, инкубировали 1 ч при 37°C и заливали агаром [10]. Учет КОИЦ проводили на 4-е сут. Значения числа инфекционных центров рассчитаны по данным не менее трех опытов. Эти значения усредняли и рассчитывали величину стандартного отклонения с помощью программы Statgraph (ver. 2.1, PC Laboratory Integral, Москва, 1989).

**Моноклональные антитела.** Схема иммунизации, условия гибридизации и характеристики всех МКА, кроме 14D<sub>2</sub>, приведены в работе [11]. МКА 14D<sub>2</sub> получали, следуя тем же методикам. Его характеристики: титр связывания с белком Е в ИФА  $2.048 \times 10^6$ , титр в реакции торможения гем-агглютинации (РТГА) 20480, индекс в реакции нейтрализации 0, в реакции диффузионной преципитации в агаре (РДПА) 2, в реакции связывания комплемента (РСК) 0, подкласс IgG<sub>1</sub>.

**Связывание пептидов с МКА** исследовали с помощью твердофазного ИФА непрямым методом или в конкуренции по методике [12]. В качестве антигена на плату наносили ОВА-конъюгаты пептидов в концентрации 100 мкг/мл (в пересчете на пептид). Конъюгаты с ОВА получали по методике [5]. Поглощение измеряли при 492 нм на приборе Titertek Multiskan Plus. За титр антител принимали соответствующее разведение, дающее окрашивание  $>0.1$  ОЕ и превышающее фоновый уровень в 4 раза. В конкурентном ИФА к ОВА-конъюгату пептида, сорбированному на плате, добавляли смесь МКА с постоянным разведением 1 : 1000 и пептида с первоначальной концентрацией 0.5 ммоль/мл, который далее растравывали. Перед добавлением к ОВА-конъюгату смесь инкубировали 1 ч при 37°C.

**Получение препаратов вируса КЭ, меченного <sup>3</sup>Н-уридином,** проводили по методике [13]. Используемые для слияния вирусные препараты имели следующие характеристики:  $3.5 \times 10^{10}$  БОЕ/мл,  $2.84 \times 10^6$  имп/мин/мл, концентрация по белку Е 40 мкг/мл.

**Препараты липосом,** представляющие собой гетерогенную популяцию многослойных и однослойных липидных везикул с преобладанием последних диаметром 100–200 нм с заключенной внутри РНКазой, получали так же, как в работе [14]. 1.25 ммоль фосфатидилэтаноламина из *E. coli*

(KochLight LTD, США), 1.25 ммоль фосфатидилхолина из яичного желтка (Calbiochem, Швейцария), 1.25 ммоль сфингомиелина из мозга быка (Calbiochem, Швейцария) и 1.875 ммоль холестерина (Sigma, США) растворяли в 1 мл смеси хлороформ–метанол (2:1). Растворитель упаривали и полученную липидную пленку высушивали под вакуумом в течение 90 мин. Затем добавляли 1 мл НМ-буфера (0.13 М NaCl, 0.01 М HEPES, 0.01 М MES, pH 7.8), содержащего РНКазу (тип А-1 из поджелудочной железы быка, КФ 3.1.27.5; Sigma, США) в концентрации 2 мг/мл. Смесь интенсивно перемешивали 5 мин и подвергали воздействию ультразвука (частота 22 кГц, 3 мин). Полученную суспензию липосом разводили в 5.5 раза и хранили при 0°C. Липосомы, не включающие в свой состав нуклеазу (пустые липосомы), получали аналогично.

**Анализ слияния вируса КЭ с липосомами** выполняли по методике [14]. Вирусный материал, меченный <sup>3</sup>Н-уридином, смешивали с 150 мкл липосом, добавляли 1 М HCl до pH 6.0 и инкубировали 3 мин при 37°C. Использовали липосомы с включенной РНКазой или “пустые” липосомы, добавляя нуклеазу (2 мг/мл) непосредственно к смеси липосом с вирусными частицами. Для контроля деградации вирусной РНК при удалении вирусной липидной оболочки к пробам добавляли Тритон X-100 (конечная концентрация 1%). Пробирки с реакционной смесью немедленно переносили в водяную баню и прогревали при 37°C в течение 3 мин. Затем к пробам добавляли BSA до концентрации 0.1% и равный объем охлажденной 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробирки инкубировали 30 мин при 0°C, центрифугировали (10000g, 5 мин) и аликвоты супернатанта просчитывали в тритон-толуоловом сцинтилляторе на жидкостном счетчике Rack Beta (ЛКВ, Швеция). Представленные значения величины деградации вирусной РНК являются средними значениями, рассчитанными на основании результатов, полученных не менее чем в трех опытах. Степень слияния вируса с искусственными мембранами липосом рассчитывали как разность значений ТХУ-растворимой радиоактивности при слиянии вируса КЭ с липосомами с включенной РНКазой и “пустыми” липосомами при добавлении РНКазы в среду инкубации.

Для изучения влияния антител на процесс слияния аликвоты вирусных препаратов инкубировали с МКА 14D<sub>2</sub> в разведении 1 : 10 либо с поликлональной мышинной сывороткой к вирусу КЭ, либо с нормальной мышинной сывороткой в том же разведении в течение 90 мин при 25°C. Далее определяли степень слияния вируса КЭ с липосомами, как описано выше. Процент степени слияния подсчитан по результатам трех опытов, в каждом из которых использовали параллельно три препарата липосом. Значения деградации ви-

русной РНК (срт), полученные для каждого разведения антител, усредняли и рассчитывали величину стандартного отклонения с помощью программы Statgraph (ver. 2.1, PC Laboratory Integral, Москва, 1989).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hase T., Summers P.L., Eckels K.H. // Arch. Virol. 1989. V. 104. P. 129–143.
2. Gollins S.W., Porterfield G.S. // J. Gen. Virol. 1985. V. 66. P. 1969–1982.
3. Gollins S.W., Porterfield G.S. // Nature. 1986. V. 321. P. 244–246.
4. Kimura T., Gollins S.W., Porterfield G.S. // J. Gen. Virol. 1988. V. 69. P. 1247–1254.
5. Волкова Т.Д., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Рубин С.Г., Семашко И.В., Караванов А.С. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 100–111.
6. Roehrig J.T., Hunt A.R., Johnson A.J., Hawkes R.A. // Virology. 1989. V. 171. P. 49–60.
7. Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison S.C. // Nature. 1995. V. 375. P. 291–298.
8. Ворович М.Ф., Тимофеев А.В., Атанадзе С.Н., Тугизов Ш.М., Сидорович И.Г., Хозинский В.В., Куц А.А., Эльберт Л.Б. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 316. С. 231–234.
9. Чумаков М.П., Рубин С.Г., Кусов Ю.Ю., Семашко И.В., Сальников Я.А., Прессман Е.К., Цехановская Н.А. // Вопр. вирусологии. 1984. Т. 29. С. 701–705.
10. Варгин В.В., Семенов Б.Ф. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1983. Т. 11. С. 75–78.
11. Матвеев Л.Э., Годовиков А.А., Караванов А.С., Плетнев А.Г., Рубин С.Г., Семашко И.В., Цехановская Н.А., Чумаков М.П., Прессман Е.К. // Вопр. вирусологии. 1989. Т. 34. С. 694–697.
12. Суrowsой А.Ю., Гельфанов В.М., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Чепуркин А.В., Иванющенко В.Н., Дрягалин Н.Н., Бурдов А.Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. С. 1185–1192.
13. Ворович М.Ф., Тимофеев А.В., Мальдов Д.Г., Хаустов В.И., Эльберт Л.Б. // Вопр. вирусологии. 1989. Т. 34. С. 698–701.
14. Ворович М.Ф., Тимофеев А.В., Акимова Ю.Д., Терлецкая Е.Н., Эльберт Л.Б. // Вопр. вирусологии. 1991. Т. 36. С. 21–24.

### The Protein E 98–113 Sequence as the Fusion Site of Tick-Borne Encephalitis Virus with a Cellular Membrane

T. D. Volkova<sup>#</sup>, O. M. Vol'pina\*, V. T. Ivanov\*, V. V. Vargin\*\*, M. F. Vorovich\*\*, A. V. Timofeev\*\*, B. F. Semenov\*\*, N. A. Tsekhanovskaya\*\*\*, and E. K. Pressman\*\*\*

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

\*\*Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

\*\*\*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences

The synthetic peptide with the conservative 98–113 sequence of protein E of tick-borne encephalitis virus was studied in order to elucidate its role in the functioning of flaviviruses. The peptide was shown to inhibit the *in vitro* infection of macrophages with the virus. An antibody that specifically binds this peptide was found among the set of monoclonal antibodies produced against protein E. This antibody was found to prevent penetration of the virus into liposomes. A correlation was found between our results and data on the spatial structure of protein E and its interspecies homology. The protein E 98–113 sequence of the tick-borne encephalitis virus was found to be the fusion site of the viral envelope with a cellular membrane.

*Key words:* tick-borne encephalitis virus, synthetic peptides, macrophages, monoclonal antibodies, liposomes

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: 336-5777, e-mail: fmdv@ibch.siobc.ras.ru.