

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ СТАТЬЯ

# Клеточный иммунный ответ у инфицированных животных против белка NSP, кодируемого негативной цепью NS RNA вируса гриппа А

О. П. Жирнов<sup>1,2</sup>, Т. Е. Конакова<sup>1</sup>, Д. Анхлан<sup>3</sup>, С. Людвиг<sup>3</sup>, Е. И. Исаева<sup>1</sup><sup>1</sup>ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи МЗ России, Москва, Российская Федерация<sup>2</sup>Русско-немецкая академия медицинских и социальных наук, Москва, Российская Федерация<sup>3</sup>Институт вирусологии, Вестфальский университет им. Вильгельма, г. Мюнстер, Германия<sup>\*</sup>Для корреспонденции: Олег Жирнов, e-mail: zhirnov@inbox.ru**Ключевые слова:** вирус гриппа, стратегия генома, белок NSP, амбисенс-вирусы**DOI:** 10.18527/2500-2236-2019-6-1-18-27

Получена 30 декабря 2018 г.

Принята к печати 13 марта 2019 г.

Опубликована 30 апреля 2019 г.

## АННОТАЦИЯ

Вирус гриппа А относится к оболочечным RNA-содержащим вирусам с негативно-полярным геномом, состоящим из 8 сегментов RNA, каждый из которых является матрицей для синтеза позитивно-полярных mRNA, которые, в свою очередь, служат матрицей для синтеза 16 вирусных белков с использованием для некоторых механизма сплайсинга или трансляционного шифта. Восьмой сегмент NS посредством классической негативной стратегии генома кодирует белок NS1, обладающий анти-интерфероновой активностью (27 кДа), и белок ядерного экспорта NEP (NS2) (nuclear export protein, 14 кДа). Кроме этого, в сегменте NS обнаружена дополнительная открытая рамка для синтеза третьего вирусного белка по альтернативному пути посредством прямой трансляции негативно полярной вирусной RNA. Эта стратегия генома получила название позитивно-полярной. Образование данного белка, названного NSP (negative strand protein), при инфекции вируса гриппа А в целостном организме пока не обнаружено. Анализ белка NSP *in silico* выявил наличие доменов МНС-I (major histocompatibility complex-1) и МНС-II. Сравнительный анализ вирусов гриппа подтипа H3N2, циркулировавших среди людей в период с 1968 по 2018 гг., показал высокую изменчивость гена белка NSP, которая сходна с изменчивостью поверхностных белков гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). Наибольшая изменчивость обнаруживалась в зонах, соответствующих N- и C-концевым участкам белка NSP. В настоящей работе изучена возможность образования иммунных лейкоцитов, специфичных к белку NSP, у мышей после инфекции вирусом гриппа А. Показано, что у мышей после заражения последовательно двумя вирусами гриппа А разных сероподтипов обнаруживаются иммунные лейкоциты, специфически распознающие вирусные домены в центральной зоне белка NSP (позиции аминокислот 82-119). Полученные данные с большой вероятностью позволяют утверждать, что при инфекции вирусом гриппа А в организме животных имеет место экспрессия гена NSP, что в свою очередь подтверждает концепцию о биполярной (амбисенс) стратегии генома вируса гриппа А.

## Cellular immune response in infected mice to NSP protein encoded by the negative strand NS RNA of influenza A virus

Oleg P. Zhirnov<sup>1,2</sup>, Tatyana E. Konakova<sup>1</sup>, Darisuren Anhlan<sup>3</sup>, Stephan Ludwig<sup>3</sup>, and Elena I. Isaeva<sup>1</sup><sup>1</sup>N. F. Gamaleya Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation<sup>2</sup>The Russian-German Academy of Medical and Biotechnological Sciences, Moscow, Russian Federation<sup>3</sup>Institute of Virology, Westfaelische Wilhelms-University Muenster, Muenster, Germany<sup>\*</sup>Corresponding author: Oleg Zhirnov, e-mail: zhirnov@inbox.ru**Keywords:** influenza virus, genome strategy, NSP protein, ambisense viruses

## ABSTRACT

Influenza A virus belongs to a family of enveloped viruses with an RNA genome of negative polarity consisting of 8 RNA segments. The transcription of this RNA genome results in the synthesis of positive-sense mRNAs that translate up to 16 unique viral proteins with the help of splicing and translational shift mechanisms. The 8th NS segment encodes the NS1 protein (27 kDa), which is an active interferon antagonist, and the nuclear export protein NEP (14 kDa) through the standard negative polarity pathway. In

addition, an alternative open reading frame for the synthesis of a third viral protein (NSP, negative-strand protein) by means of a direct translation of genome polarity RNA (the so-called positive polarity genome strategy) was identified in the *NS* segment. Since it is unknown as to whether the NSP protein can be synthesized in the infected organism post viral infection, the generation of spleen leucocytes specific to this protein was studied in mice after two sequential infections with influenza A viruses of H1N1 and H3N2 subtypes. It was found that leucocyte clones specifically recognizing a peptide domain in the central region of the NSP protein (amino acid positions 82-119) were generated in mice infected with influenza A viruses. *In silico* prediction has shown strong major histocompatibility complex-1 (MHC-I) and MHC-II specific epitopes in this central domain of the NSP. Comparative analysis of the influenza H3N2 viruses circulating in humans during 1968-2018 has shown high NSP variability, which was similar to that shown for the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins. The highest variability was found to be in the N- and C-terminal parts of the NSP. These observations suggest that synthesis of the NSP protein occurs in infected animals and further support a bipolar (ambisense) strategy of the RNA genome of human influenza A virus.

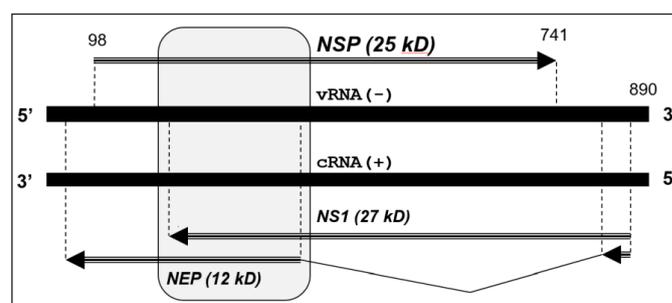
## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа А (семейство *Orthomyxoviridae*, род *alphainfluenzavirus*) – оболочечный вирус с RNA-геномом, имеющим негативно-полярную стратегию репликации и экспрессии в инфицированных клетках. Геном вируса состоит из 8 сегментов RNA негативной полярности, каждый из которых является матрицей для синтеза (транскрипции) позитивно-полярных комплементарных mRNA (cRNA), которые транслируются в зараженных клетках с образованием 16 вирусных белков, для некоторых – с использованием механизма сплайсинга и трансляционного сдвига рамки [1, 2]. Восьмой сегмент *NS* RNA кодирует два белка: неструктурный белок NS1 (27 кДа), обладающий анти-интерфероновой (анти-IFN) активностью, и белок ядерного экспорта (nuclear export protein, 14 кДа) NEP (NS2) – посредством классической негативно-полярной стратегии [1].

Ранее сообщалось, что в сегменте *NS* закодирован альтернативный путь синтеза третьего вирусного белка посредством прямой трансляции вирионной негативно-полярной vRNA, представленный на Рис. 1 [3-5]. В сегменте *NS* подавляющего большинства вирусов гриппа А человека выявлена открытая рамка трансляции для дополнительного вирусного белка, так называемого негативно-полярного белка (negative strand protein, NSP) [6]. Оценка эволюции гена *NSP* во времени методом мультиметрического анализа изменчивости гена у разных вирусных штаммов показала, что ген *NSP* появился в популяции вирусов гриппа А человека в начале XX века [6]. У подавляющего большинства вирусов гриппа А птиц область гена *NSP* в сегменте *NS* блокирована присутствием серии стоп-кодона. По структурным характеристикам, составленным на основе анализа первичной структуры гена *NSP* различных вирусных штаммов, белок можно отнести к трансмембранным, так как он имеет два выраженных гидрофобных домена в N- и C-концевых областях молекулы и один потенциальный сайт N-гликозилирования [4].

Ранее нами установлено, что ген *NSP* белка вируса гриппа, встроенный в геном бакуловируса насекомых (вируса ядерного полиэдроза), способен

экспрессироваться в клетках яичника капустной совки (клеточная линия H5) [7]. Синтезированный белок в этих клетках имел околядерную локализацию и, возможно, был связан с мембранами аппарата Гольджи благодаря своим трансмембранным свойствам.



**Рис. 1.** Схема организации vRNA сегмента *NS* вируса гриппа А. Схематическое изображение генов в сегменте *NS* вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2). Цифрами обозначены позиции нуклеотидов от 5'-конца vRNA. vRNA – вирионная RNA негативной полярности; cRNA – комплементарная RNA (репликативная форма) позитивной полярности. Экзоны генов для белков NS1, NEP и NSP показаны стрелками. Ломаной линией показана зона сплайсинга mRNA гена *NEP*. Серым полем обозначена область перекрытия трех вирусных генов: *NS1*, *NEP* и *NSP*.

Ранее мы показали, что полноразмерная RNA сегмента 8 (*NS*) вируса гриппа человека А/Aichi/2/68 (H3N2) может распознаваться рибосомами и способна в системе *in vitro*, приготовленной на основе рибосом из клеток млекопитающих, инициировать и направлять синтез вирусных полипептидов с молекулярной массой (м.м.) 23 и 13 кДа, которые специфически реагировали с антителами к пептиду NSP<sub>82-119</sub> центральной части белка NSP вируса гриппа А [8]. Эти результаты подтверждают, что vRNA сегмента 8 вируса гриппа А человека (имеющая негативную полярность) обладает матричной функцией трансляции, что согласуется с концепцией о биполярной (амбисенс) стратегии генома вируса гриппа А.

В настоящее время значение обнаруженного гена и возможность экспрессии белка NSP при репликации вируса еще не установлены [9-12]. Однако на важность позитивно-полярного гена в вирусе гриппа А

указывает тот факт, что, появившись у вируса гриппа в начале XX века, этот ген сохраняется полноценным в геноме современных вирусных штаммов человека, несмотря на выраженную дрейфовую изменчивость вирусного генома [6]. Пока не известно, каким образом и в клетках каких тканей может синтезироваться белок NSP вирусов гриппа А. В случае его синтеза в целостном организме может формироваться специфический гуморальный и (или) клеточный ответ на данный вирусный белок. Наличие такого ответа будет служить подтверждением экспрессии гена *NSP* и образования данного вирусного белка (или его продуктов) в инфицированном организме.

Для проверки этой гипотезы в настоящей работе исследовали образование лейкоцитов, специфичных к данному белку, после двукратного инфицирования мышей вирусом гриппа А.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Вирусы

В работе использовали вирус гриппа А/WSN/33 (H1N1) и реассортант вируса А/Aichi/2/68 (H3N2) с вирусом А/WSN/33, полученный путем классической реассортации вирусов, содержащий только один ген *NS* от вируса А/WSN/33, обозначенный как А/Aichi/2/68-WSN (H3N2). Вирусы накапливали в аллантаоисной полости 9-дневных куриных эмбрионов.

### Титрование вирусов

Для определения инфекционного титра вирусов использовали метод образования инфекционных фокусов в клеточной линии Madin Darby canine kidney (MDCK), как описано ранее [6, 13]. Инфекционную активность вирусных препаратов выражали в фокусобразующих единицах (ФОЕ).

### Получение рекомбинантного белка NSP в бактериальных клетках

Для синтеза белка NSP в бактериальной системе *E. coli* BL21(DE3)pLysS использовали IPTG-индуцируемый вектор pET30a со встроенным геном *NSP*, включающим аминокислоты 27-158, согласно структуре гена *NSP* штамма вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) (Genbank accession number M12597.1). N-терминальный гидрофобный 26-членный пептид был удален для снижения токсичности синтезируемого белка NSP в клетках *E. coli*. Укороченный ген *NSP*, используя праймеры NSP(-sp)/Bgl/fo (tat aag atc tcc aag cga atc tct gta g) и NSPwsnR1/re (tat cga att cgg aac tga cat gac tct tga gg), добавляющие две последовательности 6xHis на N- и C-концах *NSP*, интегрировали в pET30a между сайтами Bgl-II и Eco-R1. Компетентные клетки BL21(DE3)pLysS трансформировали плазмидой pET30a-NSP(- 26)-his+ в буфере TSS (Transformation and Storage Solution) по стандартной схеме с термошоком при 42°C. Положительные колонии отбирали в присутствии канамицина и выращивали ночную культуру в среде Luria-Bertani (LB). Для индукции

синтеза белка NSP (расчетная м.м. 19.5 кДа) ночную культуру смешивали с 4 частями среды LB, подращивали в течение 1.5 ч при 37°C, вносили IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) до конечной концентрации 1 mM и инкубировали в течение 3.5 ч при 25°C. Клетки осаждали, разрушали ультразвуком, центрифугировали при 12000 g в течение 20 мин при +4°C для осаждения частиц белка NSP. Осадок растворяли в 5 M мочеvine, приготовленной на 50 mM фосфатном буфере (PBS, pH 7.3), содержащем 0.3% детергента NP-40 и коктейль ингибиторов протеаз (Calbiochem). Очистку белка проводили на Ni - NTA агарозе (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. Элюцию белка осуществляли буфером, содержащим 0.3 M NaCl, 0.4 M имидазол, 50 mM PBS, pH 6.0. Элюат белка NSP диализовали против 50 mM PBS, pH 7.3. В полученных препаратах содержание белка NSP составляло 60-80%.

### Инфицирование мышей вирусом гриппа А

В работе использовали мышей линии Balb/C (массой 10-12 г). Все эксперименты на животных были одобрены комитетом по этике животных ФГБУ НЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. Экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных. Все болезненные процедуры выполнялись под наркозом, чтобы свести к минимуму страдания животных. Животных заражали последовательно вирусом гриппа А/WSN/33 (H1N1) и повторно вирусом-реассортантом А/Aichi/2/68-WSN (H3N2) с интервалом в 4 недели. Мышей заражали интраназально путем вдыхания в течение 2 мин аэрозоля, полученного распылением суспензии вируса с помощью ультразвукового небулайзера «Муссон-1» (Россия). Для генерирования аэрозоля использовали водную суспензию, содержащую около 10<sup>5</sup> ФОЕ/мл, при вдыхании которой заражающая доза составляла 10-100 ФОЕ/мышь. На 21-й день после заражения собирали сыворотку крови животных, в которой определяли наличие специфических антител к вирусу гриппа в реакции торможения геммагглютинирующей активности (РТГА), которую проводили по стандартной методике. Для определения вируса гриппа в легких мышей вскрывали на 3-й день после повторного заражения, собирали бронхолегочные смывы путем промывания легких 1 мл раствора PBS через трахею. Наличие вируса в смывах определяли титрованием методом инфекционных фокусов в культуре MDCK, как описано выше.

### Выделение фракции лейкоцитов из селезенки мышей, инфицированных вирусом гриппа

Селезенку от каждой мыши механически разрушали и получали клеточную суспензию, которую осветляли при 170 g в течение 10 мин (Eppendorf 5804/R, ротор FL100). Уровень жизнеспособности клеток в супернатанте, который оценивали по окраске трипановым синим, был не ниже 80%. Далее пробы клеток от каждой мыши вносили в три параллельные лунки на 96-луночный планшет по 1.1-1.6x10<sup>6</sup> клеток на лунку

и культивировали 24 ч при 37°C в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco BRL). Затем в клеточные пробы вносили исследуемые препараты: контроль (bovine serum albumin, BSA, в конечной концентрации 3 мкг/мл), пептид NSP<sub>82-119</sub> (1 мкг/мл), белок NSP (2.5 мкг/мл) или вирус A/Aichi/2/68-WSN (H3N2) (со множественностью инфекции 0.01 ФОЕ/клетку) – и клетки дополнительно инкубировали в течение 20 ч. Далее клетки из каждой лунки собирали, осаждали и использовали для выделения RNA с последующим анализом уровня mRNA IFN $\gamma$  и рибосомальной 28S RNA методом ОТ-ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР).

### Оценка индукции IFN $\gamma$ в лейкоцитах методом РВ-ПЦР

Для изучения клеточного иммунитета у мышей после двукратной инфекции вирусом гриппа оценивали степень иммунной реактивности лейкоцитов к белку NSP. В качестве антигена-мишени использовали 38-членный полипептид NSP<sub>82-119</sub> с последовательностью аминокислот CTSSVCPGREGSGEISPTIVPSSVKALSNIRVSSRSK из центральной области белка NSP вируса гриппа A/WSN/33 (H1N1), сходной для большинства вирусных штаммов, в котором первая аминокислота лейцин (L) была заменена на цистеин (C) для конъюгирования с белком-носителем KHL (keyhole limpet hemocyanin) при иммунизации [7]. Пептид был синтезирован с 90% степенью чистоты (Quyun, КНР). Степень реактивности лейкоцитов оценивали по уровню внутриклеточной продукции mRNA IFN $\gamma$  методом РВ-ПЦР со специфическими для гена мышинного IFN $\gamma$  праймерами (Таблица 1) в лейкоцитах после их контакта с пептидом NSP<sub>82-119</sub>, очищенным рекомбинантным белком NSP или вирусом гриппа. RNA из лейкоцитов выделяли с помощью набора «Проба-НК» по протоколу производителя (ДНК-технология, Россия). На матрице полученных RNA синтезировали DNA-копии с использованием «случайного» праймера по протоколу набора Reverta-1 (АмплиСенс, Москва). Далее на полученной DNA-матрице ставили РВ-ПЦР с праймерами к гену IFN $\gamma$ . Для нормализации полученных значений для mRNA IFN $\gamma$  относительно количества лейкоцитов параллельно в анализируемой пробе оценивали уровень рибосомальной 28S RNA мыши, используя специфические для рибосомальной RNA праймеры (Таблица 1). Значения содержания mRNA IFN $\gamma$  выражали в условных (арбитражных) единицах (АЕ), нормализованных по количеству рибосомальной 28S RNA в анализируемой пробе.

### Электрофорез в полиакриламидном геле и Вестерн-блот (ВВ) анализ

Полипептиды фракционировали в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (SDS). Белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Protran 0.45 мкм (Schleicher & Schuell) полусухим методом [13]. Мембрану промывали в PBS, инкубировали 2 ч в 3% обезжиренном молоке и далее в течение ночи при +5°C в PBS, содержащем 0.5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma) и специфические первичные антитела. В работе использовали антитела морской свинки против олигопептида NSP<sub>82-119</sub>, полученные нами и описанные ранее [7], и моноклональные антитела Tetra-His (Qiagen, Германия). Затем мембрану промывали PBS и обрабатывали видоспецифическими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Dako, США), с последующей идентификацией с помощью хемилюминесценции (Enhanced Chemiluminescent, ECL) с супер-субстратом (Pierce, США), как описано ранее [13].

### Статистика

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Excel. Для каждой мыши измерения проводили в трех пробах, подсчитывали среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD). Данные представляли как M  $\pm$  SD. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Изменчивость гена NSP вирусов гриппа человека подтипа H3N2

В первой части работы мы оценили изменчивость гена и белка NSP в ходе естественной эволюции вируса гриппа. С этой целью проанализировали первичную структуру гена NSP штаммов вируса гриппа человека подтипа H3N2, циркулирующих в период с 1968 г., когда появился данный вирусный подтип, до настоящего времени. Динамика появления мутаций в белке NSP показана на Рис. 2. Видно, что белок NSP претерпевал выраженную изменчивость, которая затрагивала в основном N- и C-концевые области белка, тогда как центральная зона изменялась незначительно. Для оценки скорости изменчивости рассчитывали коэффициент варибельности (KV) белка, показывающий количество мутаций на 100 аминокислот в белке в течение года (Таблица 2).

**Таблица 1.** Структура праймеров для детекции mRNA IFN $\gamma$  и рибосомальной 28S RNA мыши

Назначение праймера	Структура праймера
1. Праймер для синтеза фрагмента 28S RNA (F)	5'-GTCATTAAATCAGTTATGGTTC-3'
2. Праймер для синтеза фрагмента 28S RNA (R)	5'-GAGGTTATCTAGAGTCACCA-3'
3. Зонд для детекции 28S RNA	P [R6G]-CGCTCGCTCCTCTCCTACTTGG-[BHQ2]
4. Праймер для синтеза фрагмента IFN $\gamma$ (F)	5'-GCCTAGAAAGTCTGAATA-3'
5. Праймер для синтеза фрагмента IFN $\gamma$ (R)	5'-CCAGATATCCAAGAAGAG-3'
6. Зонд для детекции IFN $\gamma$	P [R6G]-TCTTCCACATCTATGCCACTTGA-[BHQ2]

1	100
1968	MLFAQNYSLL SSICVSLLOQ AILSLRTPDL TVLAIIRFCF GVSGGLPPSL LLPQANLCRV LETRTVLSFH SPPMRTPIA FLTSSIVCPG REGNGEISPT
1969-78	.....V.....A.....K.....
1979-98	.....Q. FLV.....Q.....P.....L.....F.....K.....
1999-02	.....Q. FLV.....Q.....P.....L.....F.....K.....
2003	.....Q. FLV.....Q.....P.....L.....F.....K.....
2004-08	.....V.S.FQ. FLV.....Q.....P.....L.....F.....K.....
2009-11	.....V.S.FQ. FL.....L.....Q.....S.....P.....L.....F.....K.....
2012-13	.....V.S.FQ. FL.....L.....Q.S.....P.....L.....F.....K.....
2014-16	.....V.S.FQ. FL.....P..L.....Q.S.....P.....L.....F.....K.....
2017-18	.....V.S.FQ. FL.....P..L.....Q.S.....P.....L.....F.....K.....
Consensus	...a.n.sq. fl!...l..s.....q.f. a...f.....p.....l.....f.....k.....
101	200
1968	IAPSSVKALS NIRVSSRSKI TLKFAFNMF LSMIAWSILM QRGPSTFCLG ISMNQSLDNS SIVMSVRYRE AGAEMVILS ASSDSSFRIL STICPFTRVA
1969-78	.....T.....F.....F.....M.....V.....F.....W.....
1979-98	.....TM.....F.....F.....M.....V.....F.....W.....
1999-02	.....TMF.....F.....F.....M.....V.....P..F.....W.....
2003	.....TMF.....F.....F.....M.....V.....P..F.....W.....
2004-08	.....TM.....F.....F.....M.....V.T.....F.....W.....
2009-11	.....TM.....F.....F.....M.....V.T.....F.....W.....
2012-13	.....TM.....P.....F.....M.....V.T.....F.....W.....
2014-16	.....TM.....P.....F.....M.....V.T.....F.....W.....
2017-18	.....TM.....P.....F.....M.....V.T.....P..F.....W.....
Consensus	.....tm.....s.....f.....f.....m.....v.a.....s..f.....w.....
201	216
1968	ASMFRPRVLP LFLRDF
1969-78	.....L.S.....L.....
1979-98	.....L.S.....L.....
1999-02	.....L.S.....L.....
2003	.....L.S.....L.....
2004-08	.....L.S.....L.....
2009-11	.....L.S.....L.....
2012-13	.....L.S.....L.....
2014-16	.....L.S.....L.....
2017-18	DL.S.....L.....
Consensus	...l.s.....l.....

Рис. 2. Динамика накопления мутаций в белке NSP вируса гриппа человека H3N2 в ходе естественной эволюции с 1968 по 2018 гг. Для составления диаграммы использовали сиквенсы NS генов вирусов гриппа подтипа H3N2, выделенных в период с 1968 по 2018 гг., представленные в информационной базе данных GenBank.

Таблица 2. Эволюционная изменчивость белков вируса гриппа подтипа А/Н3N2 в период 1968-2018 гг.

Вирусные белки	Молекулярная масса белка (Да)	Количество проанализированных последовательностей за 50 лет	Количество выявленных мутантных позиций	Коэффициент варибельности (KB) <sup>1</sup>
PВ1	86,000	13,215	23	0.05
PВ2	87,000	13,201	34	0.08
РА	85,000	13,183	47	0.1
НА	75,000	19,639	139	0.4
NP	56,000	13,505	58	0.2
NA	56,000	17,147	114	0.4
M1	27,000	16,145	12	0.09
NS1	27,000	13,847	34	0.26
M2	14,000	15,438	7	0.14
NEP	14,000	13,739	5	0.08
NSP	25,000	14,331	37	<b>0.34</b>

<sup>1</sup> Эволюционную изменчивость белка оценивали по коэффициенту варибельности, который определяли по количеству аминокислотных позиций в отдельном вирусном белке, претерпевших мутации у штаммов вируса гриппа человека А/Н3N2 за период с 1968 по 2018 гг. KB рассчитывали как общее количество мутантных аминокислотных позиций за один год в расчете на 100 аминокислот в каждом белке. Использовали данные GenBank.

Белок NSP имел KB 0.34, сходный с таковым для наиболее изменчивых поверхностных белков гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA), имеющих KB 0.4. Полученные результаты позволили также заключить, что выраженная варибельность N-концевой области NSP детерминирована самим белком NSP, поскольку белки NEP и NS1, имея KB 0.08 и 0.26 соответственно, не могли дать такую изменчивость. Представленные данные подтверждают, что белок NSP подвержен выраженной эволюционной изменчивости, которая может быть следствием его приспособления к тканевым факторам и (или) параллельно изменяющимся вирусным белкам, с которыми он, возможно,

взаимодействует, а также ускользанием от иммунных эффекторов хозяина.

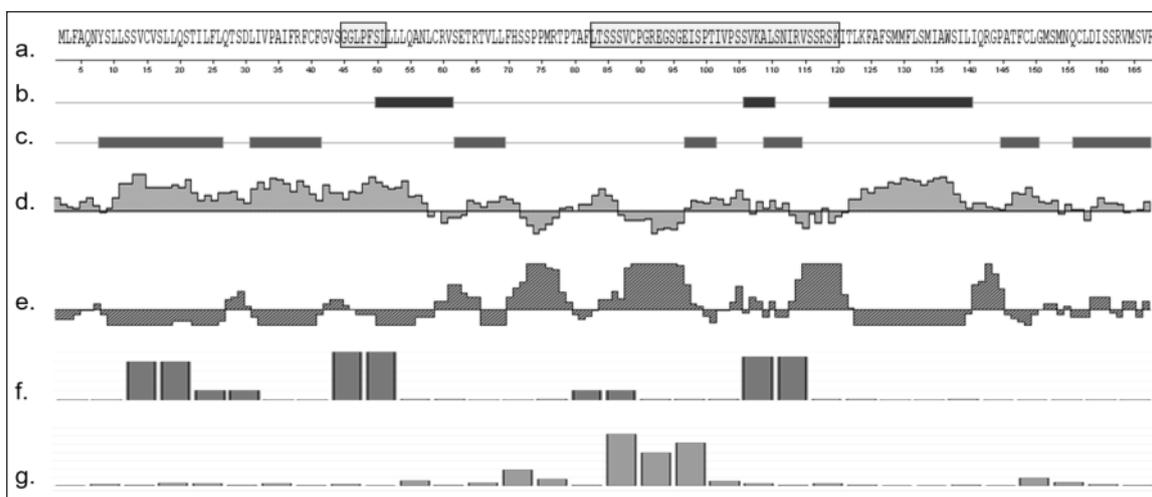
### Анализ иммунологических доменов *in silico* в структуре белка NSP

Результаты компьютерного анализа первичной структуры белка NSP вируса гриппа А по предсказанию эпитопов Т-клеточного и В-гуморального ответов показаны на Рис. 3. Т-клеточные эпитопы идентифицировали с помощью программ, выполненных на основе предсказания связывания пептидных доменов рецепторами МНС-I (major histocompatibility complex-1) [14] и МНС- II [15]. В-гуморальные

эпитопы оценивали на основании классического индекса поверхностной экспозиции (алгоритм индекса антигенности) Jameson и Wolf [16]. Как видно на Рис 3, в белке NSP обнаруживаются три Т-эпитопные зоны в позициях аминокислот 10 - 25, 40 - 50 и 85 - 110 (Рис. 3f, g). В-эпитопные зоны выявляются в трех участках с позициями аминокислот 70 - 80, 85 - 95 и 110 - 120 (Рис. 3e), которые имеют низкую гидрофобность (Рис. 3d) и частичное перекрытие с одним эпитопом МНС-II (Рис. 3g). Эти результаты показывают, что пептид NSP<sub>82-119</sub>, использованный в настоящей работе, включает два близлежащих эпитопа, распознаваемых как МНС-I (Рис. 3f), так и МНС-II (Рис. 3g) рецепторами. Наличие таких эпитопов в молекуле NSP<sub>82-119</sub> может обуславливать иммунный ответ как В-, так и Т-клеточного типа.

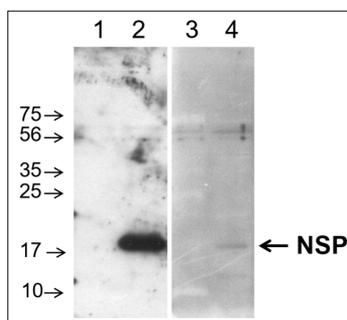
### Характеристика рекомбинантного белка NSP

Идентичность синтезированного в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysS рекомбинантного белка NSP анализировали методом Вестерн-блот со специфическими антителами, полученными к пептиду NSP<sub>82-119</sub> и к 6-членному олигопептиду 6xHis. Согласно методике, описанной в разделе «Материалы и методы», синтезированный белок NSP вируса А/WSN/33 содержал два пептида 6xHis на N- и C-концах. Как видно на Рис. 4, была обнаружена одна полоса, реагирующая как с антителами анти-NSP<sub>82-119</sub>, так и с анти-6xHis и соответствующая ожидаемому размеру белка NSP 19.5 kDa. Важно отметить, что в пробе нетрансформированных клеток этот белок не обнаруживался. Эти результаты подтверждают соответствие экспрессированного в клетках *E. coli* рекомбинантного белка NSP



**Рис. 3.** Доменная структура белка NSP вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1).

Показана первичная структура белка NSP (м.м. 19 кДа), составленная на основании нуклеотидной последовательности гена NSP вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1). (a) – Аминокислотная последовательность белка NSP в однобуквенном коде. (b) – Профиль гидрофобности, определенный методом Kyte-Doolittle. (c), (d) – Участки  $\alpha$ - и  $\beta$ -структур соответственно, идентифицированные по методу Chou-Fasman. (e) – В-гуморальные эпитопы, предсказанные по методу Jameson-Wolf, индекс антигенности. (f) и (g) – Т-клеточные эпитопы, предсказанные по алгоритму взаимодействия с рецепторами МНС-I и МНС-II. По оси ординат отложено количество аллелей МНС-I (f), способных распознавать каждый из указанных эпитопов, и индекс аффинности взаимодействия 12-членных эпитопов с МНС-II в алгоритме сканирования по длине молекулы NSP (g). Рамками выделены зоны аминокислотных позиций 44 - 51 и 82 - 119, соответствующие пептидам, исследованным в работе Zhong *et al.* [17] и в настоящей работе соответственно.



**Рис. 4.** Анализ специфичности рекомбинантного белка NSP методом Вестерн-блот.

Рекомбинантный белок NSP вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1), фланкированный на N- и C- концах 6xHis пептидами, экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysS и после очистки на Ni-NTA агарозе исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующим анализом в Вестерн-блоте. Дорожки 1, 3 – контрольный препарат нетрансформированных клеток BL21(DE3)pLysS; дорожки 2, 4 – препарат очищенного белка NSP из клеток BL21(DE3)pLysS, трансформированных плазмидой pET30a-NSP(-26)-his+. В качестве первичных антител использовали антитела Tetra-His (дорожки 1, 2) и антитела, полученные к пептиду NSP<sub>82-119</sub> (дорожки 3, 4). Слева показаны позиции маркерных белков с указанием м.м. (кДа).

соответствующему белку вируса гриппа А/WSN/33 (Рис. 4, дорожка 4).

### Развитие инфекции у мышей при последовательном заражении вирусами гриппа подтипов H1N1 и H3N2

Можно ожидать, что при гриппозной инфекции у мышей будет инициироваться формирование иммунного ответа организма-хозяина в ответ на белки вируса гриппа. На начальном этапе работы попытки зарегистрировать отчетливый клеточный иммунный ответ против белка NSP после однократной гриппозной инфекции мышей оказались безуспешными. Чтобы усилить иммунный ответ, применили последовательную двукратную инфекцию мышей с целью вызвать повторное заболевание. Для этого мышам первоначально заражали вирусом гриппа А/WSN/33 (H1N1), ген NS которого кодирует белок NSP с м.м. 19.5 кДа [4]. После выздоровления от первичной инфекции мышам заражали повторно гетерологичным вирусом – реассортантом А/Aichi/2/68-WSN (H3N2), в котором геномный сегмент NS был заменен на таковой от вируса WSN.

Уровень заболевания после первичного инфицирования мышам вирусом А/WSN/33 оценивали посредством наблюдения динамики потери веса животных, которая, как известно, отражает тяжесть течения гриппозной инфекции. Как видно на Рис. 5, аэрозольное заражение мышам вирусом гриппа вызывало характерное замедление прибавки в весе по сравнению с неинфицированными мышами в период с 3-го по 8-й день после заражения. Увеличение веса животных восстанавливалось к 15-му дню от начала инфекции. К 21-му дню после начала инфекции титр анти-гемагглютинирующих антител против вируса А/WSN/33 по данным РТГА в сыворотке животных колебался в диапазоне 1/40 – 1/160 (данные не показаны). Эти данные подтверждают эффективность заражения мышам и развитие гриппозной инфекции у всех животных.

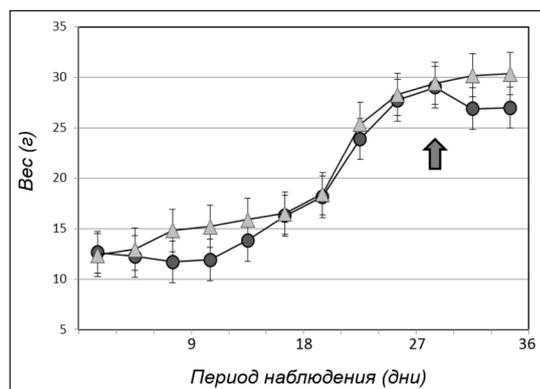


Рис. 5. Изменение веса мышам после заражения вирусами гриппа.

Мышам линии Balb/c заражали (день 0) вирусом А/WSN/33 (H1N1). На 30-й день мышам повторно заражали реассортантом А/Aichi/2/68-WSN (H3N2). В течение срока наблюдения проводили взвешивание каждой мыши в группе. Стрелкой указан день повторного заражения. Значками ▲ и ● обозначены кривые незараженных и зараженных групп мышам соответственно. Данные представлены как  $M \pm SD$ .

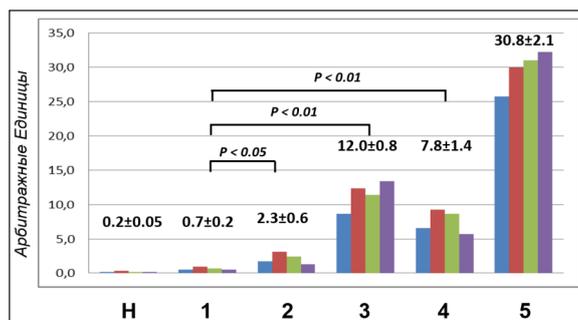
Через 4 недели после первичного заражения животных инфицировали повторно аэрозольным введением сублетальной дозы реассортанта А/Aichi/2/68-WSN (H3N2). Как и при первичном инфицировании, отмечалось замедление динамики прибавки веса, что указывает на развитие инфекционного процесса у животных. Титры вируса в бронхолегочных смывах у мышам на 3-й день после инфекции при повторном заражении варьировали в диапазоне  $10^2$ – $10^4$  ФОЕ/мл смыва у различных особей. Эти результаты подтвердили развитие продуктивной вирусной инфекции после повторного инфицирования.

Через 5 дней после повторной иммунизации у мышам извлекали селезенку, выделяли фракцию лейкоцитов и тестировали уровень сенсибилизации к олигопептиду NSP<sub>82-119</sub>, гомологичному центральной части NSP и к рекомбинантному белку NSP.

### NSP-зависимая иммунная реактивность лейкоцитов у инфицированных животных

Одним из методов оценки формирования клеточного иммунного ответа в организме животных после инфекции вирусом служит определение иммунных лейкоцитов, наличие которых измеряется по уровню индукции  $IFN\gamma$  лейкоцитами животных после их выделения и контакта *in vitro* с исследуемыми вирусными белками или их пептидами. Для оценки уровня лейкоцитарной mRNA  $IFN\gamma$  используется ОТ-ПЦР в реальном времени [18]. Поэтому для выявления иммунной реактивности лейкоцитов селезенки иммунизированных животных на белок NSP на 5-й день после вторичного заражения извлекали селезенку животных, выделяли фракцию лейкоцитов (спленоцитов) и полученные клетки растили в среде RPMI с FBS. Далее клетки сенсибилизировали пептидом NSP<sub>82-119</sub> и определяли уровень mRNA  $IFN\gamma$  методом РВ-ПЦР. Параллельно лейкоциты сенсибилизировали двумя препаратами очищенного белка NSP и цельным вирусом. Как видно на Рис. 6, в ответ на стимуляцию лейкоцитов полипептидом NSP<sub>82-119</sub> индуцировался  $IFN\gamma$  в количестве, достоверно ( $p < 0.05$ ) превышающем значения, полученные в контроле при стимуляции лейкоцитов с помощью BSA. Количество  $IFN\gamma$ , индуцируемого в ответ на стимуляцию лейкоцитов как первым, так и вторым препаратом рекомбинантного белка NSP, было еще выше (12.0 и 7.8 АЕ,  $p < 0.01$ ). Экспрессия  $IFN\gamma$  в лейкоцитах, сенсибилизированных вирусом, была самой высокой, что логично, поскольку она отражает суммарный эффект эпитопов, присутствующих в антигенах-мишенях, на пептид, рекомбинантный белок и цельный вирус.

Контрольное тестирование индукции  $IFN\gamma$  при сенсибилизации лейкоцитов неинфицированных животных пептидом NSP<sub>82-119</sub> не показало достоверной индукции  $IFN\gamma$  ( $p > 0.05$ ) (Таблица 3). Незначительный прирост  $IFN\gamma$  после стимуляции неинфицированных лейкоцитов рекомбинантным белком NSP (0.78 АЕ), по всей вероятности, обусловлен остаточной примесью бактериальных белков в препарате белка NSP. Значительная индукция  $IFN\gamma$  (14.5 АЕ) при стимуляции



**Рис. 6.** Уровни стимуляции mRNA IFN $\gamma$  в лейкоцитах инфицированных мышей после контакта с антигенами-мишенями.

У неинфицированных и дважды инфицированных мышей выделяли лейкоциты из селезенки. Лейкоциты инкубировали в среде: (1) – с BSA, (2) – с олигопептидом NSP<sub>82-119</sub>, (3 и 4) – с рекомбинантным белком NSP из двух различных партий выделения соответственно, (5) – с вирусом гриппа A/Aichi/2/68-WSN. Показаны значения для каждой мыши в группе. Сверху над столбцами представлены средние значения для группы  $M \pm SD$ . Н – лейкоцитарные пробы неинфицированных мышей. Достоверность разницы результатов оценивали по t-критерию Стьюдента, показаны результаты сравнения групп 1, 2, 3 и 4.

**Таблица 3.** Уровень индукции IFN $\gamma$  в незаряженных спленоцитах мыши

Пробы	Уровень индуцируемого IFN $\gamma$ (AE)	Достоверность различий между пробами
1. mock	0.04 $\pm$ 0.02	---
2. NSP <sub>82-119</sub>	0.06 $\pm$ 0.02	2 vs 1, $p > 0.05$
3. NSP	0.78 $\pm$ 0.26	3 vs 1, $p < 0.05$
4. A/Aichi/2/68-WSN	14.50 $\pm$ 5.10	4 vs 1, $p < 0.01$

Уровни индукции IFN $\gamma$  определяли в параллельных пробах из четырех незаряженных мышей, как описано в разделе «Материалы и методы». Показаны значения содержания mRNA IFN $\gamma$  в АЕ. Данные представлены как  $M \pm SD$  для групп: (1) интактные спленоциты (mock), (2) спленоциты, инкубированные с пептидом NSP<sub>82-119</sub>, (3) спленоциты, инкубированные с рекомбинантным белком NSP, и (4) спленоциты, инкубированные с вирусом A/Aichi/2/68-WSN.

лейкоцитов вирусом вполне логично отражала первичный иммунный ответ спленоцитов на вирус.

Полученные результаты показывают, что развитие гриппозной инфекции в организме мышей стимулировало формирование клонов сенсibilизированных лейкоцитов, которые распознают эпитопы белков вируса, в том числе белка NSP, и индуцируют выработку IFN $\gamma$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

В наименьшем по размеру сегменте NS генома вируса гриппа А помимо генов NS1 и NEP выявлена протяженная открытая рамка трансляции (OPT) с характерными для полноценного гена ATG-инициаторным и TAG-терминирующим кодонами и структурными элементами для распознавания рибосомами [8]. Главная особенность трансляционной рамки гена NSP состоит в том, что она располагается в сегменте RNA негативной полярности в отличие от OPT NS1 и NEP, имеющих, как известно, комплементарную геному позитивную полярность (Рис. 1). Особая полярность гена NSP предполагает специфический механизм его экспрессии, который должен отличаться от такового у других вирусных белков. Можно предположить непосредственную трансляцию в инфицированных клетках свободной негативно-полярной NS vRNA до момента ее инкапсидации нуклеокапсидным белком NP. Белок NP образует с RNA вирусные рибонуклеопротеидные комплексы (сегменты) и, вероятно, выполняя роль негативного трансляционного

регулятора, закрывает доступ рибосом к RNA. Нельзя исключить и механизм положительной регуляции посредством вирусного белка NS1, который может усиливать трансляцию vRNA в инфицированных клетках [19-21]. Возможно, что клеточные факторы играют решающую роль в экспрессии NSP и определяют тканевую тропизм синтеза данного белка в инфицированном организме [22]. В заключение следует отметить, что нельзя исключить существование альтернативного механизма синтеза индивидуальной субгеномной mRNA/NSP на матрице позитивной cRNA вируса гриппа в инфицированных клетках.

Предположение о прямой трансляции NS vRNA согласуется с недавними наблюдениями, которые показали способность полноразмерной NS vRNA вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) эффективно транслироваться *in vitro* рибосомами из клеток млекопитающих с образованием двух полипептидов в 23 и 13 кДа, которые специфически реагировали с антителами к NSP<sub>82-119</sub> вируса гриппа А в реакции иммунной преципитации [8]. Этот результат предполагает потенциальную возможность специфической трансляции NS vRNA вируса гриппа в инфицированных клетках.

В настоящей работе получены данные, которые с большой вероятностью свидетельствуют о формировании специфического клеточного иммунного ответа к вирусному белку NSP в организме инфицированных вирусом гриппа А мышей. Эти наблюдения подразумевают образование данного белка (или его компонентов) в процессе вирусной репликации

в организме мышей. Косвенные данные об экспрессии гена *NSP* были получены недавно в опытах на мышах с рекомбинантным вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR/8), имеющим химерный ген *NSP* с репортерным индикатором экспрессии [23]. С данными настоящей статьи согласуются также результаты Zhong *et al.* [17], полученные при изучении иммунного профиля лейкоцитов у мышей после инфекции вирусом A/PR/8 (H1N1). Авторы обнаружили лейкоцитарные клоны, реагирующие с пептидом GGLPFSL, обозначенным авторами как «гипотетический пептид». Важно отметить, что как этот пептид, идентичный позициям 44-51 аминокислот *NSP* у вируса A/WSN/33, так и пептид *NSP*<sub>82-119</sub> отчетливо соответствуют Т-клеточным эпитопам, предсказанным в структуре белка *NSP* (Рис. 3g, f). Таким образом, эти результаты подтверждают, во-первых, экспрессию гена *NSP* в инфицированном организме и, во-вторых, присутствие в центральной зоне кодируемого белка *NSP* домена, обладающего свойствами Т-клеточного эпитопа.

На основании имеющихся данных пока трудно определить уровень и тканевую локализацию синтеза белка *NSP* (или его продуктов) у инфицированных животных. Более того, ранее предпринимались безуспешные попытки обнаружить образование зрелого белка *NSP in vitro* в клеточных культурах при заражении вирусом гриппа А [23], (Arikainen A. *et al.* Does segment 8 of influenza A virus encode a negative-strand polypeptide? 4th Influenza ESWI Conference, Malta 2011, abstract B305P, p. 179). Трудности обнаружения белка *NSP* могут быть обусловлены его быстрым (возможно, котрансляционным) протеолизом с образованием коротких функциональных пептидов кининового типа. Не исключена возможность экспрессии гена *NSP* лишь в ограниченном круге клеток в зависимости от специфических факторов, присутствующих только в определенных тканях организма-хозяина.

Кардинальный вопрос: как мог возникнуть новый амбиполярный ген *NSP* в геноме вируса гриппа А? Появление амбиполярного гена наталкивает на мысль о том, что может существовать пока неизвестный закон соответствия (или правило обратного детерминирования) амбиполярных генов на одном участке молекулы RNA (наличие такой зоны в центре гена *NSP* показано на Рис. 1 серым полем). В двух других участках ген *NSP* перекрывается либо с геном *NEP* (на старте гена), либо с *NS1* (на конце гена). Возможно, гипотетический закон состоит в том, что определенный ген может предопределять свойства и механизм возникновения амбиполярного гена. При отсутствии механизма детерминирования следует допустить случайное накопление мутаций, ведущее к появлению нового функционально смыслового гена с последующим отбором. Вероятность такого события мала, учитывая амбиполярное перекрывание нескольких генов, когда изменения в одном гене ведут к изменению в сцепленных амбиполярных генах. В этом случае изменчивость и отбор мутаций должны быть взаимосвязаны сразу в трех вирусных генах: *NS1*, *NEP* и *NSP*.

Результаты настоящей работы могут иметь важное значение для классификации вирусов гриппа. Возникает вопрос о выделении дополнительного рода в семействе *Orthomyxoviridae*, имеющего амбиполярную (ambisense) стратегию реализации вирусного генома подобно представителям известных вирусных двуполярных родов флебо-, тоспо-, арена- и тенуивирюсов [24]. Пока прямой продукт гена *NSP* не идентифицирован в биологических системах, таких как инфицированные клеточные культуры или организм человека и животных, вопрос о классификации остается открытым. Вместе с тем сохранение полноценного гена *NSP* в популяции вирусов гриппа человека в течение более 100 лет указывает на функциональную необходимость этого гена для пока гипотетической группы амбиполярных вирусов гриппа [6]. Примечательно, что при выраженной эволюционной изменчивости белка *NSP*, сходной с таковой для наиболее вариабельных вирусных белков HA и NA, не обнаруживалось появления нонсенс-мутаций, формирующих терминирующие стоп-кодона, разрушающие ген *NSP*, что также поддерживает идею о биологической детерминированности данного гена.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной поддержке по грантам РФФИ № 16-04-01271 и № 13-04-001824 и Немецкого научного общества (DFG), SFB1009B2 и GRK2220 EvoPAD. Авторы благодарят академика РАН Г. П. Георгиева за полезные обсуждения и д-ра А. С. Червякова за помощь в подготовке статьи. Эти данные были представлены на 6th International Influenza Meeting, Münster, Germany, September 2-4, 2018 (Zhirnov OP, Konakova TE, Isaeva EI. A novel negative-sense polarity protein NSP of influenza A virus in infected mice, Abstract P31, 61)

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## ЦИТИРОВАНИЕ

Жирнов ОП, Конакова ТЕ, Анхлан Д, Людвиг С, Исаева ЕИ. Клеточный иммунный ответ у инфицированных животных против белка *NSP*, кодируемого негативной цепью NS RNA вируса гриппа А. *MIR J* 2019; 6(1), 18-27. doi: 10.18527/2500-2236-2019-6-1-18-27.

## АВТОРСКИЕ ПРАВА

© 2019 Жирнов и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

## ЛИТЕРАТУРА

- Pflug A, Lukarska M, Resa-Infante P, Reich S, Cusack S. Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Res* 2017; 234, 103-17. doi: 10.1016/j.virusres.2017.01.013.
- Dou D, Revol R, Ostbye H, Wang H, Daniels R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol* 2018; 9, 1581. doi: 10.3389/fimmu.2018.01581.
- Baez M, Zazra JJ, Elliott RM, Young JF, Palese P. Nucleotide sequence of the influenza A/duck/Alberta/60/76 virus NS RNA: conservation of the NS1/NS2 overlapping gene structure in a divergent influenza virus RNA segment. *Virology* 1981; 113(1), 397-402. PubMed PMID: 6927848.
- Zhirnov OP, Poyarkov SV, Vorob'eva IV, Safonova OA, Malyshev NA, Klenk HD. Segment NS of influenza A virus contains an additional gene NSP in positive-sense orientation. *Dokl Biochem Biophys* 2007; 414, 127-33. PubMed PMID: 17695319.
- Beklemishev AB, Blinov VM, Vasilenko SK, Golovin S, Karginov VA. Synthesis, cloning and determination of the primary structure of a full-size DNA copy of fragment 8 from the influenza virus type A genome. *Bioorg Khim* 1985; 11(5), 641-5. PubMed PMID: 4038350.
- Zhirnov OP, Vorobjeva IV, Saphonova OA, Poyarkov SV, Ovcharenko AV, Anhlan D, et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J Clin Virol* 2009; 45(4), 322-33. doi: 10.1016/j.jcv.2009.05.030.
- Zhirnov OP, Klenk HD. Integration of influenza A virus NSP gene into baculovirus genome and its expression in insect cells. *Vopr Virusol* 2010; 55(2), 4-8. PubMed PMID: 20455463.
- Zhirnov OP, Akulich KA, Lipatova AV, Usachev EV. Negative-sense virion RNA of segment 8 (NS) of influenza a virus is able to translate in vitro a new viral protein. *Dokl Biochem Biophys* 2017; 473(1), 122-7. doi: 10.1134/S1607672917020090.
- Clifford M, Twigg J, Upton C. Evidence for a novel gene associated with human influenza A viruses. *Virol J* 2009; 6, 198. doi: 10.1186/1743-422X-6-198.
- Gong YN, Chen GW, Chen CJ, Kuo RL, Shih SR. Computational analysis and mapping of novel open reading frames in influenza A viruses. *PLoS One* 2014; 9(12), e115016. doi: 10.1371/journal.pone.0115016.
- Yang CW, Chen MF. Uncovering the Potential Pan Proteomes Encoded by Genomic Strand RNAs of Influenza A Viruses. *PLoS One* 2016; 11(1), e0146936. doi: 10.1371/journal.pone.0146936.
- Sabath N, Morris JS, Graur D. Is there a twelfth protein-coding gene in the genome of influenza A? A selection-based approach to the detection of overlapping genes in closely related sequences. *J Mol Evol* 2011; 73(5-6), 305-15. doi: 10.1007/s00239-011-9477-9.
- Zhirnov OP, Klenk HD. Alterations in caspase cleavage motifs of NP and M2 proteins attenuate virulence of a highly pathogenic avian influenza virus. *Virology* 2009; 394(1), 57-63. doi: 10.1016/j.virol.2009.08.013.
- Bhasin M, Raghava GP. A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T cell epitopes. *J Biosci* 2007; 32(1), 31-42. PubMed PMID: 17426378.
- Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology* 2018; 154(3), 394-406. doi: 10.1111/imm.12889.
- Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci* 1988; 4(1), 181-6. PubMed PMID: 2454713.
- Zhong W, Reche PA, Lai CC, Reinhold B, Reinherz EL. Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire. *J Biol Chem* 2003; 278(46), 45135-44. doi: 10.1074/jbc.M307417200.
- Hempel DM, Smith KA, Claussen KA, Perricone MA. Analysis of cellular immune responses in the peripheral blood of mice using real-time RT-PCR. *J Immunol Methods* 2002; 259(1-2), 129-38. PubMed PMID: 11730848.
- Liu Y, Chia ZH, Liew J, Or SM, Phua KKL. Modulation of mRNA Translation and Cell Viability by Influenza A Virus Derived Nonstructural Protein 1. *Nucleic Acid Ther* 2018; 28(3), 200-8. doi: 10.1089/nat.2017.0712.
- Panthu B, Terrier O, Carron C, Traversier A, Corbin A, Balvay L, et al. The NS1 Protein from Influenza Virus Stimulates Translation Initiation by Enhancing Ribosome Recruitment to mRNAs. *J Mol Biol* 2017; 429(21), 3334-52. doi: 10.1016/j.jmb.2017.04.007.
- Nordholm J, Petitou J, Ostbye H, da Silva DV, Dou D, Wang H, et al. Translational regulation of viral secretory proteins by the 5' coding regions and a viral RNA-binding protein. *J Cell Biol* 2017; 216(8), 2283-93. doi: 10.1083/jcb.201702102.
- Jan E, Mohr I, Walsh D. A Cap-to-Tail Guide to mRNA Translation Strategies in Virus-Infected Cells. *Annu Rev Virol* 2016; 3(1), 283-307. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055014.
- Hickman HD, Mays JW, Gibbs J, Kosik I, Magadan JG, Takeda K, et al. Influenza A Virus Negative Strand RNA Is Translated for CD8(+) T Cell Immunosurveillance. *J Immunol* 2018; 201(4), 1222-8. doi: 10.4049/jimmunol.1800586.
- Nguyen M, Haenni AL. Expression strategies of ambisense viruses. *Virus Res* 2003; 93(2), 141-50. PubMed PMID: 12782362.