

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 578.832.1+579.22

БЕЛОК NSP, КОДИРУЕМЫЙ НЕГАТИВНОЙ ЦЕПЬЮ NS РНК ВИРУСА
ГРИППА А, ИНДУЦИРУЕТ КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ
У ИНФИЦИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ

О. П. Жирнов^{1,2,*}, Е. И. Исаева¹

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым 12.12.2018 г.

Поступило 20.12.2018 г.

При заражении мышей вирусами гриппа А наблюдали формирование клонов лимфоцитов, специфически распознающих вирусные домены в центральной зоне белка NSP (позиции аминокислот 83–119). Компьютерный анализ первичной структуры белка NSP показал наличие Т-клеточных эпитопов в центральной части молекулы NSP. Полученные данные свидетельствуют о наличии экспрессии вирусного гена NSP в организме инфицированных животных и верифицируют концепцию о биполярной стратегии (амбисенс-стратегия) генома вируса гриппа А.

Ключевые слова: вирус гриппа, амбисенс-полярность, сегмент NS, ген NSP.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524863389-394>

Вирус гриппа А относится к оболочечным РНК-содержащим вирусам, имеющим негативно-полярную стратегию экспрессии вирусного генома. Геном РНК-вируса, состоящий из 8 сегментов, служит матрицей для транскрипции позитивно-полярных мРНК, которые транслируются в заражённых клетках с образованием 16 вирусных белков с использованием механизмов сплайсинга и трансляционного сдвига для некоторых белков [1]. Посредством классического пути негативно-полярной стратегии 8-й сегмент мРНК кодирует белки NS (от англ. non-structural, неструктурный белок): антиинтерфероновый белок NS1 (Mr 27 кДа) и белок ядерного экспорта NEP (14 кДа, NS2 по прежней терминологии) [1].

В РНК-сегменте NS закодирован альтернативный путь синтеза третьего вирусного белка посредством позитивно-полярной стратегии. У подавляющего большинства вирусов гриппа А человека в вирионной РНК NS имеется открытая рамка считывания

для дополнительного вирусного белка — так называемого белка негативной цепи (negative strand protein, NSP) [2–4]. Эта рамка распознается рибосомами и способна в системе *in vitro*, сформированной на основе рибосом из клеток млекопитающих, иницировать и направлять синтез полипептида NSP с Mr 23 кДа [5]. Оценка эволюции гена NSP во времени методом мультиметрического анализа изменчивости у вирусных штаммов показала, что этот ген появился в популяции вирусов гриппа А только в начале XX в. [4].

В настоящее время экспрессия гена NSP при репликации вируса ещё не установлена [6–9]. Пока не известно, каким образом и в клетках каких тканей может синтезироваться белок NSP вирусов гриппа А. Однако в процессе его синтеза в целостном организме может формироваться гуморальный и/или клеточный иммунный ответ на данный вирусный белок. Наличие иммунного ответа будет служить подтверждением образования данного вирусного белка в инфицированном организме.

Для проверки этой гипотезы в настоящей работе исследовали образование иммунных лейкоцитов, специфичных к данному белку, у мышей после двукратного инфицирования вирусом гриппа А. Чтобы избежать иммунного торможения репликации инфицирующего вируса при повторном заражении, но

¹Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского

Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва

²Русско-немецкая академия медицинских и социальных наук,
Москва

*E-mail: zhirmov@inbox.ru

сохранить экспрессию гомологичных генов сегмента NS, использовали последовательное инфицирование мышей вначале вирусом A/WSN/33 (H1N1) и повторно антигенно гетерологичным вирусом-реассортантом A/Aichi/2/68-NSW (H3N2), несущим ген NS вируса A/WSN/33.

Мышей линии BALB/c (масса тела 8–10 г) заражали указанными вирусами с интервалом в 21 день посредством вдыхания вирусного аэрозоля в дозе 10–100 фокусобразующих единиц (ФОЕ) вируса на мышь. Через 5 сут после вторичной инфекции у мышей извлекали селезёнку, получали суспензию спленоцитов, которую вносили в лунки 96-луночного планшета по 1,1–1,6 млн клеток на лунку и культивировали в течение 24 ч при 37 °С в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco®, “ThermoFisher Scientific”, США). Далее в лунки вносили исследуемые препараты: пептид NSP (в конечной концентрации 1 мкг/мл), очищенный рекомбинантный белок NSP (около 2 мкг/мл), либо вирус H3N2 (с множественностью инфицирования около 0,01 ФОЕ на клетку). Далее клетки дополнительно инкубировали в течение 20 ч. Затем клетки собирали из каждой лунки, осаждали и использовали для выделения РНК с последующим анализом методом ПЦР в реальном времени уровней мРНК для интерферона-гамма и рибосомальной 28S РНК (в качестве количественного референс-маркера).

На первом этапе работы оценивали инфицирование мышей вирусом A/WSN/33 посредством наблюдения динамики потери массы тела животными, которая, как известно, отражает тяжесть течения гриппозной инфекции. Аэрозольное заражение мышей вирусом гриппа вызывало характерное замедление прибавки в весе по сравнению с неинфици-

рованными мышами в период с 3-го по 8-й день после заражения. Набор веса животных восстанавливался через 15 дней от начала инфекции. Через 21 сут после инфицирования титр антител против вируса в сыворотке крови, оцениваемый в тесте торможения гемагглютинации, колебался у разных животных в диапазоне 1/40–1/160. После повторного заражения сублетальной дозой реассортанта A/Aichi-NSW/2/68 (H3N2), который имел сегмент NS/WSN, мы зарегистрировали замедление в динамике прибавки веса животных, что указывало на развитие инфекционного процесса. Титры вируса в бронхолёгочных смывах у мышей при повторном заражении варьировались в диапазоне 10^2 – 10^4 ФОЕ вируса на 1 мл смыва у разных особей через 3 сут после инфицирования. Эти данные подтвердили заражение мышей и развитие гриппозной инфекции у животных при повторном инфицировании.

Через 5 сут после вторичного заражения у 5 инфицированных и неинфицированных мышей оценивали по уровню индукции интерферона-гамма сенсibilизацию лейкоцитов селезёнки к цельному вирусу, синтетическому полипептиду NSP_{83–119} и рекомбинантному белку NSP. У контрольных и дважды инфицированных мышей выделяли лейкоциты из селезёнки. Далее лейкоциты инкубировали в среде, содержащей различные антигены: без специфического антигена (проба 2), с олигопептидом NSP_{83–119} (проба 3), с рекомбинантным белком NSP (проба 4) и инактивированным вирусом гриппа A/WSN/33 (проба 5). Рекомбинантный белок NSP вируса A/WSN/33 (H1N1), фланкированный на N- и C-концах 6-членным His-трактом, синтезировали в клетках *E. coli* BL21-D3/LysS с очисткой на агарозе N-NTA. Результаты этой

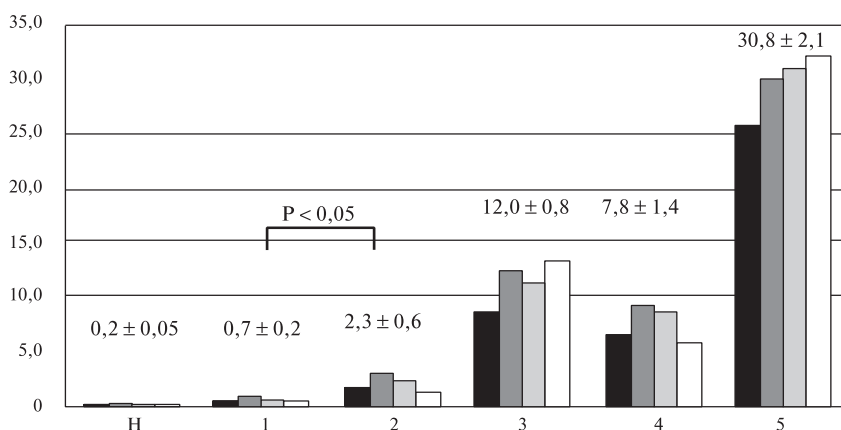


Рис. 1. Уровни стимуляции мРНК интерфероном-гамма в лейкоцитах инфицированных мышей после контакта с антигенами-мишенями. $M \pm SD$, $n = 4$. По оси ординат — содержание мРНК для интерферона-гамма в условных (арбитражных) единицах, нормализованных по количеству рибосомальной 28S РНК в пробе. По оси абсцисс — номера проб.

серии опытов представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, лейкоциты инфицированных мышей максимально реагировали на живой вирус, что вполне логично проявилось суммарным ответом на все антигены вируса, в том числе и на вирусные белки, синтезируемые *de novo* в культуре тестируемых лейкоцитов при внесении вируса. Менее выраженный, но достоверно превышающий уровень неинфицированных мышей ответ формировался на рекомбинантный белок NSP и полипептид NSP_{83–119} (рис. 1). Такой результат представлялся вполне закономерным, поскольку регистрируемая реакция индукции интерферона-гамма, нарастающая в последовательности пептид → рекомбинантный белок → цельный вирус, отражала суммарный эффект эпитопов в антигенах-мишенях. Количество антигенных эпитопов было наибольшим в вирусе, наименьшим в пептиде и на промежуточном уровне — в рекомбинантном белке NSP. Контрольное тестирование показало, что пептид и рекомбинантный белок NSP практически не вызывали достоверной индукции интерферона-гамма в культуре лейкоцитов неинфицированных животных (данные не представлены). Полученные результаты показывают, что развитие гриппозной инфекции в организме мышей индуцирует формирование клонов сенсibilизированных лейкоцитов, которые специфически распознают эпитопы вирусного белка NSP.

Результаты компьютерного анализа первичной структуры белка NSP вируса гриппа А, прогнозирующего структуру эпитопов иммунных Т- и В-клеток,

представлены на рис. 2. Эпитопы Т-клеток идентифицировали с помощью программ, выполненных на основе предсказания связывания пептидных доменов nHLAPred и NetMHCIIpan рецепторами МНС–I и МНС–II соответственно [10, 11]. Эпитопы В-клеток оценивали на основании индекса антигенности Jameson и Wolf [12]. В белке NSP мы обнаружили три эпитопные зоны Т-клеток в позициях аминокислот 10–25, 40–50 и 85–110 (рис. 2г, д). Эпитопные зоны В-клеток мы выявили также в трёх аминокислотных участках: 70–80, 85–95 и 110–120 (рис. 2в), которые, как видно на рисунке, имели низкую гидрофобность (рис. 2б). Эти результаты показывают, что пептид 83–119, использованный в настоящей работе, включал два близлежащих эпитопа, распознаваемых рецепторами МНС–I (рис. 2г) и МНС–II (рис. 2д). Наличие данных эпитопов в молекуле NSP могло обуславливать клеточный иммунный ответ, наблюдаемый в инфицированном организме и регистрируемый нами в тесте гамма-интерфероновый индукции лейкоцитов.

Негативная полярность гена *NSP* предполагает специфический механизм его экспрессии, который должен отличаться от такового других вирусных белков. Пока можно лишь предположить непосредственную трансляцию в инфицированных клетках свободной негативно-полярной геномной NS РНК до момента её инкапсидации нуклеокапсидным белком NP. Последний формирует вирусные рибонуклеопротеидные комплексы (сегменты РНП) и, вероятно, играет роль негативного регулятора, закрывая доступ рибосом к РНК. Нельзя исключить

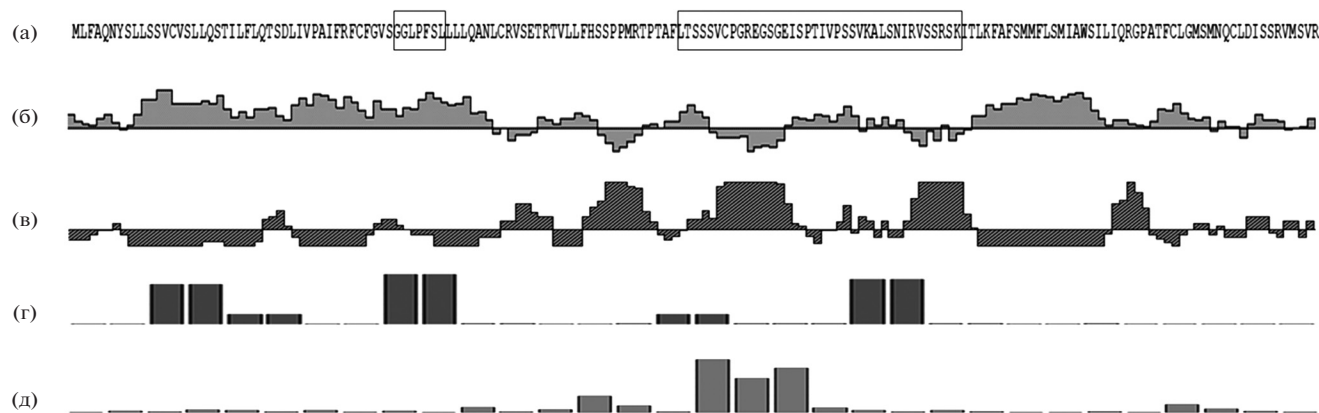


Рис. 2. Доменная структура белка NSP вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1). Первичная структура NSP (Mг 19 кДа) вируса А/WSN/33 (H1N1) (GenBank ac.n. M12597.1). (а) — первичная структура NSP в однобуквенном коде. (б) — профиль гидрофобности по Kyte–Doolittle. (в) — эпитопы В-клеток (г) и (д) — Т-клеточные эпитопы, предсказанные по алгоритму взаимодействия с рецепторами МНС–I и МНС–II соответственно. По оси ординат — количество различных аллелей МНС–I, способных распознавать каждый из указанных эпитопов (г), и индекс аффинности взаимодействия 12-членных эпитопов с МНС–II при сканировании по длине молекулы NSP (д). Прямоугольники сверху показывают зоны расположения аминокислот 44–51 и 81–119.

наличие позитивной регуляции, при которой вирусный белок NS1 может выступать в качестве усилителя трансляции геномной РНК в инфицированных клетках. О подобной усиливающей трансляции функции белка NS1 сообщалось в работе [13]. Возможно, что клеточные факторы могут играть решающую роль в регуляции трансляции NSP и определять тканевую специфичность синтеза данного белка в инфицированном организме. Предположение о прямой трансляции геномной РНК согласуется с данными об эффективной трансляции этой РНК *in vitro* рибосомами из клеток млекопитающих с образованием мажорного полипептида NSP с Mr 23 кДа [5].

Наблюдения, указывающие на иммунный ответ клеточного типа к вирусному белку NSP в организме мышей, инфицированных вирусом гриппа А, предполагают образование этого белка в процессе вирусной репликации в организме. Это предположение согласуется с данными [14] об обнаружении лейкоцитарных клонов, которые у мышей при заражении вирусом гриппа А/PR/8/34 (H1N1) взаимодействовали с восьмичленным пептидом GPLPFSLL, названным авторами цитируемой работы “гипотетический пептид”. Этот пептид, гомологичный аминокислотному участку 44–51 NSP вируса А/WSN/33, и наш пептид NSP (83–119 ак) соответствовали Т-клеточным эпитопам, предсказанным в структуре белка NSP (рис. 2е, ж). Таким образом, эти результаты подтверждают, во-первых, предположение о синтезе белка NSP в инфицированном организме и, во-вторых, указывают на присутствие в цент-

ральной зоне этого белка домена, обладающего свойствами Т-клеточного эпитопа.

Важным представляется вопрос, как мог возникнуть амбиполярный ген NSP в геноме вируса гриппа. Появление такого гена свидетельствует о существовании пока неизвестного закона соответствия (или правила обратного детерминирования) амбиполярных генов на одном участке молекулы РНК (наличие такой зоны в центре гена NSP показано на рис. 3). Этот пока гипотетический закон можно сформулировать следующим образом. Определённый ген предопределяет свойства и механизм возникновения функционального амбиполярного гена в процессе трансляции, или имеется определённая амбиполярная функция нового белка (или его мРНК). Также можно допустить случайную изменчивость, ведущую к появлению функционально смыслового гена с последующим отбором. Однако вероятность такого события очень мала, поскольку в этом случае изменчивость и отбор мутаций должны быть смысловыми сразу для трёх разнонаправленных генов — NSI, NEP, NSP.

Становится актуальным вопрос о классификации семейства Orthomyxoviridae, для которого характерна негативно-полярная стратегия генома. Представляется актуальным выделение нового рода ортомиксовирусов с амбиполярной (ambisense) стратегией реализации вирусного генома. Этот новый род вирусов гриппа подобен представителям известных вирусных двуполярных родов флебо-, тоспо-, арена- и тениувирусов [15]. Пока продукт гена NSP вируса гриппа А в биологических системах, таких как клеточные культуры или организм животных, не идентифицирован.

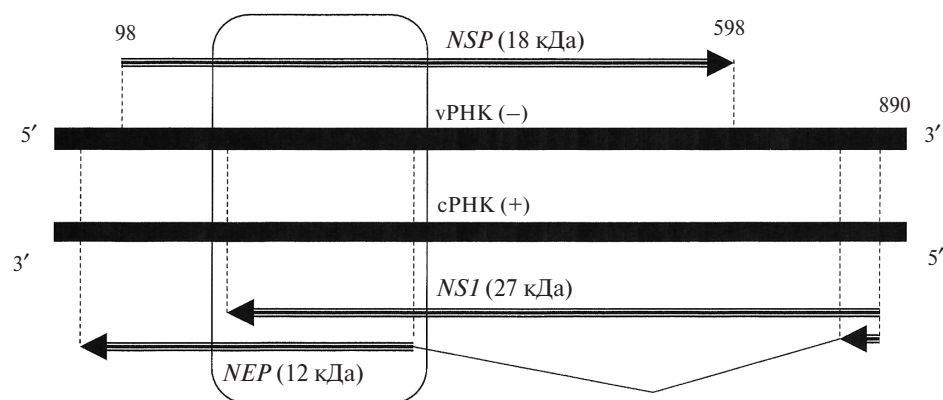


Рис. 3. Схема организации РНК геномного сегмента NS вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1). Цифрами обозначены позиции нуклеотидов от 5'-конца вирионной РНК. Экзоны генов для белков NSI (анти-интерфероновый белок), NEP (белок ядерного экспорта) и NSP (белок негативной цепи РНК) показаны стрелками. Ломаная линия — зона сплайсинга мРНК гена NEP, вРНК — геномная вирионная РНК негативной полярности, сРНК — комплементарная РНК (репликативная форма) позитивной полярности. Заштрихованным полем выделена область наложения трёх вирусных генов NSP, NSI, NEP.

Вместе с тем сохранение полноценного гена *NSP* в популяции вирусов гриппа человека в течение более 100 лет указывает на функциональную необходимость этого гена для биологии амбиполярных вирусов гриппа [4]. Результаты филогенетического анализа показывают выраженную эволюционную вариабельность гена *NSP* у вирусов гриппа А человека. Так, за последние 50 лет в белке NSP у вирусов субтипа H3N2, циркулирующих у людей, изменилось около 20% аминокислот, но при этом не возникло мутаций, образующих терминирующие стоп-кодоны, что также согласуется с идеей о биологической детерминированности данного гена.

Источники финансирования. Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ 16–04–01271, 13–04–001824 и научной Программы SFB293 Немецкого научного общества (DFG).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dou D., Revol R., Östbye H., Wang H., Daniels R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement // *Front Immunol.* 2018. V. 9. P. 1581. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01581
2. Palese Baez M., Zazra J.J., Elliott R.M., Young J.F., 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. V. 113. № 1. P. 397–402.
3. Журнов О.П., Поярков С.В., Воробьева И.В., Сафонова О.А., Малышев Н.А., Кленк Н.Д. Сегмент NS вирусов гриппа А содержит дополнительный ген NSP в позитивной ориентации // *ДАН.* 2007. Т. 414. № 4. С. 547–553. PubMed PMID:17695319.
4. Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A., Poyarkov S.V., Ovcharenko A.V., Anhlan D., Malyshev N.A. 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. V. 45. № 4. P. 322–333. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.05.030
5. Журнов О.П., Акулич К.А., Лунатова А.В., Усачев Е.В. Негативно-полярная вирионная РНК сегмента 8 (NS) вируса гриппа А способна транслировать *in vitro* новый вирусный белок // *ДАН.* 2017. Т. 473. № 4. С. 122–127. DOI: 10.1134/S1607672917020090
6. Clifford M., Twigg J., Upton C. Evidence for a Novel Gene Associated with Human Influenza A viruses // *Virol. J.* 2009. V. 6. P. 198. DOI: 10.1186/1743-422X-6-198
7. Gong Y.N., Chen G.W., Chen C.J., Kuo R.L., Shih S.R. Computational Analysis and Mapping of Novel Open Reading Frames in Influenza A Viruses // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 12. e115016. DOI: 10.1371/journal.pone.0115016
8. Yang C.W., Chen M.F. Uncovering the Potential Pan Proteomes Encoded by Genomic Strand RNAs of Influenza A Viruses // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 1. e0146936. DOI: 10.1371/journal.pone.0146936
9. Sabath N., Morris J.S., 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. V. 73. № 5/6. P. 305–315. DOI: 10.1007/s00239-011-9477-9
10. Jensen K.K., Andreatta M., Marcatili P., Buus S., Greenbaum J.A., Yan Z., Sette A., Peters B., Nielsen M. Improved Methods for predicting Peptide Binding Affinity to MHC Class II Molecules // *Immunology.* 2018. V. 154. № 3. P. 394–406. DOI: 10.1111/imm.12889
11. Bhasin M., Raghava G.P.S. A Hybrid Approach for Predicting Promiscuous MHC Class I restricted T Cell Epitopes // *J. Biosci.* 2006. V. 32. P. 31–42.
12. Jameson B.A., Wolf H. The Antigenic Index: a Novel Algorithm for Predicting Antigenic Determinants // *Comput. Appl. Biosci.* 1988. V. 4. № 1. P. 181–186.
13. Pantho B., Terrier O., Carron C., Traversier A., Corbin A., Balvay L., Lina B., Rosa-Calatrava M., Ohlmann T. The NS1 Protein from Influenza Virus Stimulates Translation Initiation by Enhancing Ribosome Recruitment to mRNAs // *J. Mol. Biol.* 2017. V. 429. № 21. P. 3334–3352. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.04.007
14. Zhong W., Reche P.A., Lai C.C., Reinhold B., Reinherz E.L. Genome-Wide Characterization of a Viral Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Repertoire // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 46. P. 45 135–45 144.
15. Nguyen M., Haenni A.L. Expression Strategies of Ambisense Viruses // *Virus Res.* 2003. V. 93. № 2. P. 141–150.

NSP PROTEIN ENCODED IN NEGATIVE NS RNA STRAND OF INFLUENZA A VIRUS INDUCES CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN INFECTED ANIMALS

O. P. Zhirnov^{1,2}, E. I. Isaeva¹

¹N.F. Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

²The Russian-German Academy of Medical and Biotechnological Sciences, Moscow, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS G.P. Georgiev December 12, 2018

Received December 20, 2018

Infection of mice with influenza A viruses led to the formation of clones of lymphocytes that specifically recognizes viral domains in the central zone of the NSP protein (amino acid positions 83–119). Computer analysis of the primary structure of the NSP protein showed the presence of T-cell epitopes in the central part of the NSP molecule. The findings indicate that the viral NSP gene is expressed in the infected animals and support the concept of the bipolar strategy (ambisense strategy) of the influenza A virus genome.

Keywords: influenza virus, ambisense polarity, segment NS, gene NSP.