



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-203>

© ИВАНОВ П.А., ЛЯШКО А.В., КОСТ В.Ю., ЛОМАКИНА Н.Ф., РТИЦЕВ А.А., БУНЬКОВА Н.И., ТИМОФЕЕВА Т.А., БАЛАНОВА М.А., ИОНОВ С.А., ГОРИКОВ Д.В., МАРКУШИН С.Г., 2023

Определение активности полимеразы холодоадаптированного вируса гриппа (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) методом минигенома с флуоресцентным белком

Иванов П.А.¹, Ляшко А.В.¹, Кост В.Ю.², Ломакина Н.Ф.^{1✉}, Ртищев А.А.³, Бунькова Н.И.¹, Тимофеева Т.А.¹, Баланова М.А.¹, Ионов С.А.^{1,4}, Гориков Д.В.^{1,4}, Маркушин С.Г.³¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997, г. Москва, Россия;³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия;⁴ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125047, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Ранее было показано, что полимеразные белки PB1 и PB2 определяют холодоадаптированный фенотип вируса гриппа A/Краснодар/101/35/59 (H2N2).**Цель работы.** Создать репортерные конструкции и определить активность вирусной полимеразы при 33 и 37 °С методом минигенома.**Материалы и методы.** Совместная трансфекция клеток Cos-1 плазмидами pHW2000, экспрессирующими белки вирусной полимеразы PB1, PB2, PA, NP (минигеном) и репортерную конструкцию.**Результаты.** На основе сегмента 8 созданы две репортерные конструкции, которые содержат прямую или инвертированную последовательность NS1-GFP-NS2 для экспрессии белков NS2 и NS1, трансляционно слитных с зелёным флуоресцентным белком (GFP), которые позволили оценить транскрипционную и/или репликативную функции вирусной полимеразы.**Заключение.** Полимераза вируса A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) обладает более высокой репликативной и транскрипционной активностью при 33 °С, чем при 37 °С. Её транскрипционная активность в большей степени зависит от температуры, чем репликативная. Репликативная и транскрипционная активности полимеразы вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, вариант Mount Sinai) не имеют существенных различий и не зависят от температуры.**Ключевые слова:** обратная генетика; вирус гриппа А; полимеразы вируса гриппа; минигеном вируса гриппа; зелёный флуоресцентный белок; холодоадаптированный вирус гриппа**Для цитирования:** Иванов П.А., Ляшко А.В., Кост В.Ю., Ломакина Н.Ф., Ртищев А.А., Бунькова Н.И., Тимофеева Т.А., Баланова М.А., Ионов С.А., Гориков Д.В., Маркушин С.Г. Определение активности полимеразы холодоадаптированного вируса гриппа (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) методом минигенома с флуоресцентным белком. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 526–535. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-203> EDN: <https://elibrary.ru/lxvxzf>**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-203>

Determination of cold-adapted influenza virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) polymerase activity by the minigenome method with a fluorescent protein

Pavel A. Ivanov¹, Aleksandr V. Lyashko¹, Vladimir Yu. Kost², Natalia F. Lomakina¹✉, Artyom A. Rtishchev³, Nataliya I. Bunkova¹, Tatiana A. Timofeeva¹, Marina A. Balanova¹, Stepan A. Ionov^{1,4}, Dmitry V. Gorikov^{1,4}, Stanislav G. Markushin³

¹N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, the Russian Ministry of Health, 123098, Moscow, Russia;

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, 117997, Moscow, Russia;

³Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;

⁴Mendeleev University of Chemical Technology, 125047, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Polymerase proteins PB1 and PB2 determine the cold-adapted phenotype of the influenza virus A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2), as was shown earlier.

Objective. The development of the reporter construct to determine the activity of viral polymerase at 33 and 37 °C using the minigenome method.

Materials and methods. Co-transfection of Cos-1 cells with pHW2000 plasmids expressing viral polymerase proteins PB1, PB2, PA, NP (minigenome) and reporter construct.

Results. Based on segment 8, two reporter constructs were created that contain a direct or inverted NS1-GFP-NS2 sequence for the expression of NS2 and NS1 proteins translationally fused with green fluorescent protein (GFP), which allowed the evaluation the transcriptional and/or replicative activity of viral polymerase.

Conclusion. Polymerase of virus A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) has higher replicative and transcriptional activity at 33 °C than at 37 °C. Its transcriptional activity is more temperature-dependent than its replicative activity. The replicative and transcriptional activity of polymerase A/Puerto Rico/8/34 virus (H1N1, Mount Sinai variant) have no significant differences and do not depend on temperature.

Keywords: reverse genetics; influenza A virus; influenza virus polymerase; influenza virus minigenome; green fluorescent protein; cold-adapted influenza virus

For citation: Ivanov P.A., Lyashko A.V., Kost V.Yu., Lomakina N.F., Rtishchev A.A., Bunkova N.I., Timofeeva T.A., Balanova M.A., Ionov S.A., Gorikov D.V., Markushin S.G. Determination of cold-adapted influenza virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) polymerase activity by the minigenome method with a fluorescent protein. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(6): 526–535. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-203> EDN: <https://elibrary.ru/lxvxzf>

Funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Введение

Вирус гриппа А, представитель семейства *Orthomyxoviridae*, имеет сегментированный геном из однонитчатой «минус»-цепи РНК. Каждый из 8 сегментов кодирует 1–2 и более вирусных белков и упакован в виде рибонуклеопротеида (РНП). В состав последнего входят вирионная «минус»-цепь РНК (вирусная геномная РНК, vRNA), покрытая, как бусами, молекулами вирусного белка NP, и одна копия вирусной полимеразы в виде гетеротримера из белков PB1, PB2, PA. С этой структуры в ядре инфицированной клетки вирусная полимеразы осуществляет сначала транскрипцию, а позднее репликацию вирусной РНК. Сегмент 8 кодирует два белка – NS1 и NEP/NS2, из которых последний транслируется со сплайсированной матричной РНК (mRNA) и принимает участие в транспорте вновь

образованных РНП из ядра к клеточной мембране для сборки новых вирионов. Сегменты 4 и 6 кодируют поверхностные гликопротеиды HA и NA, которые служат основными антигенными детерминантами, провоцирующими развитие иммунного ответа в инфицированном организме [1]. HA обеспечивает взаимодействие вириона с рецепторами и проникновение вирусного генома в клетку, а NA способствует выходу вирусного потомства из клетки.

Вирус гриппа сопровождает человечество на протяжении столетий и наиболее громко напоминает о себе во время сезонных эпидемий гриппа, которые в ряде случаев характеризуются высокой смертностью. Одной из действенных превентивных мер против гриппа остается вакцинация. На сегодняшний день существует огромное разнообразие противогриппозных вакцин, созданных на основе различных технологий

[1]. Среди цельновирионных вакцин, к которым относятся инактивированные и живые аттенуированные вакцины, наиболее эффективными считаются вторые. Принцип их действия основан на том, что вакцинный штамм способен размножаться при пониженной температуре (25–33 °С), которая соответствует температуре в носовых ходах человека. В нижних дыхательных путях, где температура превышает 37 °С, вирус утрачивает способность размножаться и элиминируется из организма, не вызывая заболевания. Контакт с вакцинным вирусом активизирует гуморальный и клеточный иммунитет, который защищает организм от тяжелого заболевания при встрече с диким вирусом. В свое время в качестве живой вакцины против вирусов гриппа А H2N2 применяли аттенуированные холодоадаптированные штаммы A/Leningrad/134/17/57 в России и A/Ann Arbor/6/60 в США [2–4]. Позднее эти штаммы использовали в качестве доноров аттенуации при получении реассортантных вакцинных штаммов, в которых гены поверхностных белков HA и NA были заменены на гены циркулирующих актуальных штаммов [5–7].

Существенный прогресс в создании противогриппозных вакцин был достигнут благодаря методу обратной генетики. Суть его заключается в том, что каждый из восьми сегментов генома вируса гриппа А клонирован в плазмиде. Из этих плазмид, как из конструктора, можно собирать вирус с заданными свойствами [8–10].

Одним из вирусов, реконструированных плазмидной технологией, был вирус A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), обладающий высокой репродуктивной способностью в куриных эмбрионах (КЭ). Его предполагалось использовать в качестве донора генов внутренних белков при создании инактивированных рекомбинантных вакцин, в частности, против вируса H5N1 [11].

В США в настоящее время лицензионно одобрено применение метода обратной генетики в производстве противогриппозных вакцин, включая живую вакцину FluMist против сезонного гриппа (<http://www.flu.org.cn/en/news-11930.html>) [5].

Обратная генетика широко используется в исследовании функции вирусных белков и механизмов их взаимодействия с клеточными факторами хозяина, а также для выяснения роли определенных участков генома и точечных мутаций в изменении фенотипа.

Применение плазмидной технологии позволяет проводить исследование без сборки полноценного вируса. Например, для выяснения активности вирусной полимеразы достаточно собрать конструкцию из плазмид, экспрессирующих белки PB1, PB2, PA и NP, – так называемый минигеном. Чтобы по флуоресцентному или люминесцентному свечению оценить экспрессию минигенома в трансфицированных клетках, в конструкцию дополнительно вводят репортерный ген, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), или люциферазу [12, 13].

Совершенствование технологии обратной генетики применительно к вирусу гриппа заключается в кон-

струировании плазмид под конкретные цели, упрощении синтеза копий вирусных генов в виде кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и способа их встраивания в плазмиды для клонирования. Первые системы для полноценной сборки вируса включали 12 плазмид, в последующем их число удалось сократить до 8 и менее. Конструкция двухцепочечной плазмиды rHW2000 с двумя промоторами позволила с одного встроенного фрагмента ДНК на одной цепи синтезировать mRNA для трансляции вирусного белка, а в противоположном направлении, на комплементарной цепи, получить vRNA, которая впоследствии входит в состав РНП зрелых вирионов. При этом для синтеза mRNA используется сильный цитомегаловирусный промотор (CMV), который узнается клеточной РНК-полимеразой II; для синтеза vRNA используется клеточный промотор для РНК-полимеразы I [9, 10].

Исследования на молекулярном уровне холодоадаптированных штаммов показали, что большинство мутаций, ответственных за ts-, sa-, att¹-фенотип, локализованы в генах полимеразного комплекса. Так, для штамма A/Ann Arbor/6/60 выявлены точечные мутации в PB2 (N265S), PB1 (K391E, D581G и A661T) и NP (D34G) [14, 15], для штамма A/Leningrad/134/57 мутации обнаружены в генах PB2 (V478L), PB1 (K265N, V591I) и NEP (M100I) [16]. Введение этих мутаций в соответствующие сегменты различных штаммов вируса гриппа методом обратной генетики приводило к проявлению признаков ts-, sa- и att-фенотипа в разной степени в зависимости от штамма вируса, в который были внесены мутации. Один из возможных механизмов аттенуации и холодоадаптации может быть связан с нарушением транскрипционной и/или репликативной активности полимеразы при повышенной температуре. В работе L. Rodriguez и соавт. [15], где применяли метод минигенома, было показано, что введение соответствующих мутаций в сегменты полимеразы штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) приводило к существенному уменьшению ее активности при повышении температуры до 37 и 39 °С.

При поисках новых доноров аттенуации в России был получен холодоадаптированный штамм A/Краснодар/101/35/59 (H2N2), который отличался от своего дикого прародителя мутациями в семи сегментах за исключением сегмента 8 [17, 18]. Две одиночные мутации присутствовали в полимеразных белках PB1 (I147T) и PB2 (V290L). Для выяснения их роли в формировании ts-фенотипа методом обратной генетики аналогичные замены были внесены в вирус A/WSN/33 (H1N1), вследствие чего получили варианты вируса, которые отличались от исходного штамма единственной заменой в PB1 (I147T) либо в PB2 (V290L). Мутантные варианты хорошо размножались в КЭ при 34 °С и хуже при повышенных температурах [19–21].

¹ts – термочувствительность (снижение репродукции при высокой температуре); sa – адаптация к росту при пониженной температуре; att – аттенуация.

Целью настоящей работы было освоение методики получения минигенома вирусов гриппа и репортерной конструкции с флуоресцентным белком, с целью их использования в разработке репортерных конструкций для исследования функции вирусных полимераз в процессах транскрипции и репликации при разном температурном режиме. Для сравнения были взяты гены полимеразных белков (*PB1*, *PB2*, *PA*) и *NP* от холодоадаптированного штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и штамма А/Puerto Rico/8/34 (H1N1, вариант Mount Sinai).

Материалы и методы

Клонирование генов *PB1*, *PB2*, *PA* и *NP*

Вирус гриппа человека А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), вариант Mount Sinai, был получен из коллекции НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского.

Вирусную РНК выделяли из аллантаоисной жидкости инфицированных КЭ с помощью набора QIAamp Viral RNA mini kit (#52904; Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Обратную транскрипцию проводили при температуре 42 °С в течение 1 ч в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 8 мкл РНК, 1 мкл праймера *uni12* с концентрацией 50 нг/мкл (13,5 нМ), 10 мкл воды, 1 мкл 10 мМ dNTP, 5 мкл 5× буфера и 100 ед. MMLV (ООО «Альфа Фермент», Москва). Полученную кДНК 3 мкл использовали в ПЦР объемом 30 мкл (94 °С – 15 с, 52 °С – 15 с, 72 °С – 1 мин, 30 циклов) со специфическими концевыми праймерами для синтеза полноразмерных сегментов генома [22] в присутствии 0,5 мкл фермента Pfu (ООО «Альфа Фермент», Москва). Амплифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1,2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, и элюировали из геля набором Diatom DNA Elution (#D1031; ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Очищенные сегменты были встроены в вектор pHW2000 безлигазным методом с помощью ДНК-полимеразы T4 [23]. Вектор для клонирования был любезно предоставлен доктором Р. Вебстером (Dr. R. Webster, St. Jude Children's Research Hospital, Мемфис, США).

Конструкции из 8 плазмид pHW2000, включающие сегменты генома для сборки вируса А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), были созданы в лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва) [24], как описано ранее [19, 20].

Репортерная конструкция с геном *GFP*

Сегмент 8 вируса А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), кодирующий белки NS1 и NS2 (в результате сплайсинга), был заменен репортерной конструкцией, созданной, как описано в работе [25]. Методами ПЦР и безлигазного клонирования [23] из этого сегмента был удален сайт сплайсинга для NS2. Далее последовательность сегмента между стоп-кодоном *NS1* и 3'UTR была заменена на последовательность, содержащую ген *GFP* и сплайсированный ген *NS2*,

разделенные последовательностью для пептида 2А, где происходит «проскок» рибосомы. Конечная конструкция включала последовательно расположенные в одной рамке считывания гены *NS1*, *GFP*, последовательность для пептида 2А и ген *NS2*. В результате трансляции mRNA данной конструкции образуются два отдельных белка: NS1, трансляционно слитный с GFP, и NS2. Конструкция была названа NS1GFPNS2 (рис. 1 а). Затем из векторной части данной конструкции с помощью методов ПЦР и безлигазного клонирования [23] был удален промотор CMV, конструкция названа dCMV (рис. 2). Аналогичным образом была получена плазмидная конструкция, в которой последовательность сегмента NS1GFPNS2 была инвертирована. Конструкция была названа dCMVrev (рис. 3).

Структура праймеров, использованных в работе, доступна по запросу. Структура всех конструкций, встроенных в плазмиды, подтверждена секвенированием.

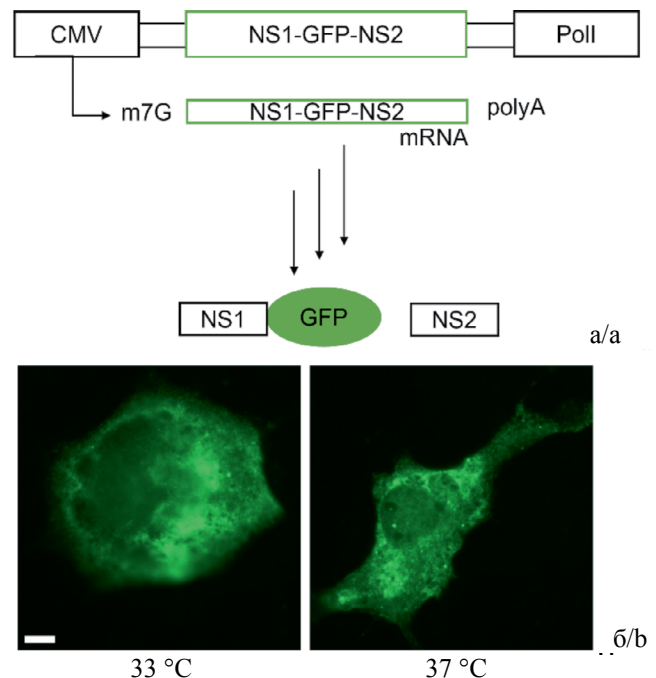


Рис. 1. Репортерная конструкция NS1GFPNS2 (контроль).

а – встроенный в плазмиду модифицированный сегмент 8 вируса гриппа А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) включает ген *NS1* (с удаленным сайтом сплайсинга для *NS2*), ген зеленого флуоресцирующего белка (*GFP*), сплайсированный ген *NS2*. Клеточная РНК-полимераза II с промотора CMV синтезирует мРНК (mRNA) конструкции NS1GFPNS2, с которой транслируются белки NS2 и NS1, трансляционно слитный с GFP; б – экспрессия слитного белка NS1-GFP в трансфицированных клетках Cos-1, культивируемых при 33 °С (слева) и 37 °С (справа). Масштабная линейка – 10 мкм.

Fig. 1. NS1GFPNS2 reporter construct (control).

а – modified segment 8 of A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) influenza virus is inserted in the plasmid which includes the *NS1* gene (with a removed splicing site for *NS2*), the green fluorescent protein gene (*GFP*), and spliced *NS2* gene. Cellular RNA polymerase II uses the CMV promoter of the NS1GFPNS2 reporter to synthesize mRNA (mRNA) followed by translation of NS2 and fused NS1-GFP proteins; б – expression of the fused NS1-GFP protein in transfected Cos-1 cells cultured at 33 °C (left) and 37 °C (right). The scale ruler is 10 microns.

Оценка активности минигенома вируса гриппа по экспрессии белка NS1-GFP

Переживаемую линию клеток Cos-1 культивировали при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки и антибиотиков. Клетки пересеивали 1 раз в 2 дня с использованием 0,25% трипсина в растворе Версена, поддерживая конфлюэнтность 70–90%. Для трансфекции клетки высевали с конфлюэнтностью 70% в 6-луночные планшеты, на дне которых находились покровные стекла. Трансфекцию проводили с помощью липофектина-3000 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. В лунку 6-луночного планшета вносили 2 мкг ДНК. После трансфекции клетки инкубировали в течение ночи при температуре 37 или 33 °С и фиксировали 3% раствором параформальдегида на фосфатном буфере (ФСБ). Далее покровные стекла с прикрепленными зафиксированными клетками промывали ФСБ и монтировали микроскопический препарат, применяя раствор, содержащий 9,1% Мовиола 4-88 и 2,3% глицерина в 100 mM Tris-HCl, pH 8,5.

Для наблюдения флуоресценции в клетках использовали микроскоп Imager M2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтром для FITC и объективом 40×. Изображения клеток получали с помощью цифровой камеры AxioCam 503 mono и сохраняли в формате tiff с 16-битной разрядностью. Изображения обрабатывали и анализировали с помощью программы ImageJ². Перед анализом изображения из него вычитали фоновую флуоресценцию. Для этого на изображении измеряли среднее значение флуоресценции в области, где отсутствовали клетки. Полученную величину вычитали из значений флуоресценции для каждой из точек данного изображения. Чтобы исключить из анализа участки изображения вне клеток, величину порога яркости подбирали вручную. Индивидуальные клетки на изображениях выявляли с помощью команды «analyze particles». Далее для каждой клетки измеряли средний уровень флуоресценции. Было проведено три независимых эксперимента по трансфекции каждой репортерной конструкции. В каждом эксперименте было сделано от 10 до 40 измерений. Для вычисления среднего значения флуоресценции использовали суммарное количество измерений во всех независимых экспериментах для каждой конструкции.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica (StatSoft, США). Для статистического анализа отличий в уровне флуоресценции при различных температурах инкубации трансфицированных клеток использовали критерий Манна–Уитни. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение*Минигеном и репортерная конструкция с флуоресцентным белком*

Минимальный набор плазмид, способный воспроизвести функцию полимеразы вируса гриппа в инфицированной клетке, состоит из четырех плазмид с сегментами *PB1*, *PB2*, *PA* и *NP*. В одной цепи каждого плазмидного вектора находится CMV, который распознает клеточная РНК-полимераза II и синтезирует с встроенного сегмента mRNA для последующей трансляции вирусного белка. В противоположной цепи расположен промотор для клеточной РНК-полимеразы I, способной синтезировать vRNA с того же сегмента (рис. 1 а).

Чтобы функционирование такого неполного генома (минигеном) в живой клетке можно было наблюдать под микроскопом при флуоресценции, была создана репортерная конструкция. Контролем служила плаزمиды, в которую был встроен модифицированный сегмент 8, с которого экспрессировался белок NEP/NS2 и отдельно белок NS1 с присоединенным к нему GFP. При трансфекции клеток такой одиночной плазмидой в них наблюдали зеленое свечение (рис. 1 б).

Транскрипционная активность

Репортерная плазмиды dCMV (рис. 2) с удаленным промотором CMV для клеточной РНК-полимеразы II может функционировать в живой клетке только в присутствии вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), образующейся в результате котрансфекции репортерной плазмиды dCMV вместе с плазмидами, несущими вирусные гены *PB2*, *PB1*, *PA* и *NP*. Благодаря клеточной PolII, с одной цепи ДНК(+) встроенной двухцепочечной репортерной конструкции dCMV синтезируется vRNA(-), на которой вирусная RdRp образует mRNA для трансляции флуоресцирующего белка. Наличие флуоресценции свидетельствует о транскрипционной активности вирусной полимеразы.

Репликативная и транскрипционная активность

В случае репортерной плазмиды dCMVrev (рис. 3), в которой встроенный фрагмент NS1GFPNS2 инвертирован, в клетке за счет активности клеточной РНК-полимеразы I с комплементарной цепи ДНК(-) вставки синтезируется комплементарная сRNA(+). Затем происходит репликация, т.е. в результате активности уже вирусной РНК-полимеразы образуется vRNA(-), которая на стадии транскрипции служит матрицей для синтеза mRNA, с которой транслируется флуоресцирующий белок. Таким образом, по экспрессии белка NS1-GFP можно судить о репликативной и транскрипционной активности вирусной полимеразы RdRp.

Активность вирусной полимеразы при разных температурах

Метод минигенома использовали для исследования активности полимераз вирусов A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) и A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) при разных температурах.

²Программа в свободном доступе, разработчик Wayne Rasband, NIH, США.

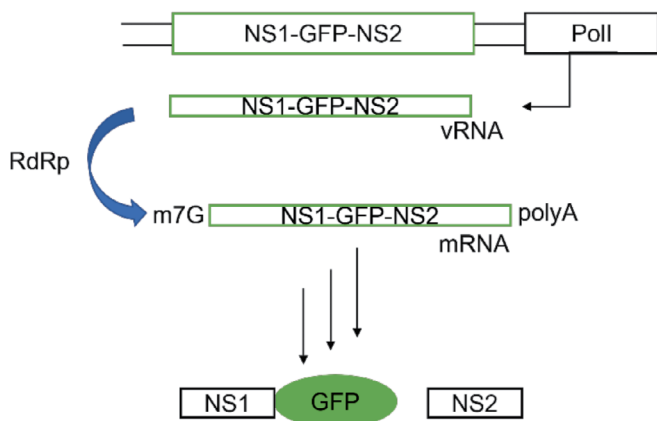


Рис. 2. Репортерная конструкция dCMV для оценки транскрипционной активности вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp).

В плазмиде с встроенной последовательностью NS1GFPNS2 удален промотор CMV. На одной цепи встроенного двухцепочечного фрагмента ДНК клеточная РНК-полимераза I (PolII) с промотора PolII синтезирует вирионную РНК (vRNA), с которой вирусная РНК-полимераза RdRp, экспрессируемая минигеномом, в результате транскрипции синтезирует mRNA для трансляции белков NS1-GFP и NS2.

Fig. 2. The dCMV reporter construct for evaluating the transcriptional activity of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp).

The CMV promoter has been removed from a plasmid carrying inserted NS1GFPNS2 sequence. On one chain of the inserted double-stranded DNA fragment, cellular RNA polymerase I (PolII) synthesizes virionic RNA (vRNA) from the PolII promoter. Then, the viral RNA polymerase RdRp, expressed by the minigenome, uses this vRNA for synthesis of mRNA that translates NS1-GFP and NS2 proteins.

Для каждого вируса был получен минигеном в культуре клеток Cos-1 при одновременной трансфекции плазмидами, экспрессирующими белки PB2, PB1, PA и NP, совместно с репортерной конструкцией dCMV или dCMVrev. Трансфецированные клетки культивировали при 33 или 37 °С. Эффективность трансфекции составляла 5–10%.

При трансфекции клеток только репортерными конструкциями (без вирусного минигенома) специфическая флуоресценция GFP отсутствовала (данные не показаны). При котрансфекции репортерных конструкций вместе с плазмидами, несущими гены *PB2*, *PB1*, *PA* и *NP* обоих вирусов, наблюдали флуоресцентное свечение в трансфецированных клетках. В случае минигенома вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) не было выявлено существенной разницы в флуоресценции клеток, культивируемых при разных температурах (рис. 4, 5 верхний ряд). Однако при коэкспрессии с репортерными конструкциями полимеразы холодоадаптированного штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) флуоресценция клеток была значительно выше при пониженной температуре (33 °С) (рис. 4, 5, нижний ряд).

Количественная оценка показала, что при повышении температуры до 37 °С флуоресценция GFP досто-

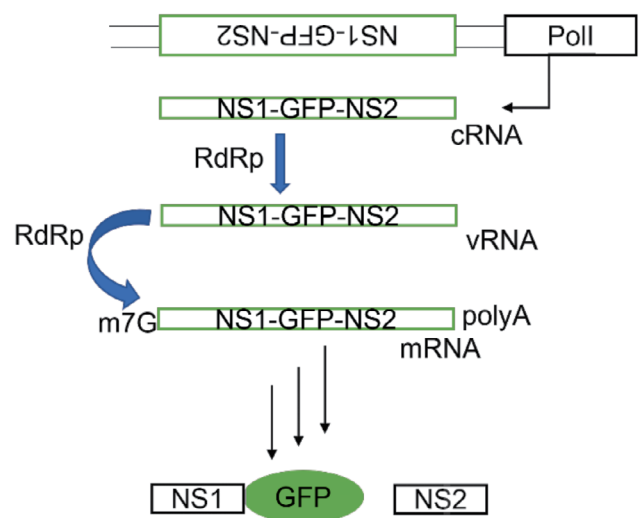


Рис. 3. Репортерная конструкция dCMVrev для оценки репликативной и транскрипционной активности вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp).

В плазмиду встроен инвертированный двухцепочечный ДНК-фрагмент NS1GFPNS2 и удален промотор CMV. Клеточная РНК-полимераза I (PolII) синтезирует комплементарную цепь NS1GFPNS2 встроенной конструкции (cRNA). Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) реплицирует с нее вирусную РНК (vRNA), на которой затем синтезирует mRNA для трансляции белков NS1-GFP и NS2.

Fig. 3. The dCMVrev reporter construct for evaluating the replicative and transcriptional activity of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp).

An inverted double-stranded DNA fragment NS1GFPNS2 is inserted in the plasmid in which the CMV promoter is deleted. Cellular RNA polymerase I (PolII) synthesizes a complementary NS1GFPNS2 chain (cRNA) of an inserted construct. Viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) replicates viral RNA (vRNA) from cRNA. Then RdRp uses vRNA as a template for synthesis of mRNA for following translation of NS1-GFP and NS2 proteins.

верно снижается для минигенома холодоадаптированного штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) в сочетании с обеими репортерными конструкциями как dCMVrev, так и dCMV (рис. 6, серый столбец).

Критерием оценки зависимости активности полимеразы от температуры служит соотношение флуоресценции репортерной конструкции в составе соответствующего минигенома при 33 и 37 °С (Ф33/Ф37, таблица).

Для минигенома холодоадаптированного штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) флуоресценция GFP с повышением температуры уменьшается примерно в 5 раз для репортерной конструкции dCMV и примерно в 3 раза для репортерной конструкции dCMVrev (рис. 6), что указывает на повышенную полимеразную активность при 33 °С полимеразы холодоадаптированного штамма. При этом ее транскрипционная активность в большей степени зависит от температуры, чем репликативная (коэффициент 4,9 против 2,7, таблица).

Для полимеразы вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) не было обнаружено существенной зависимости от температуры и достоверных различий в транскрипционной и репликативной + транскрипционной активности (рис. 6, таблица).

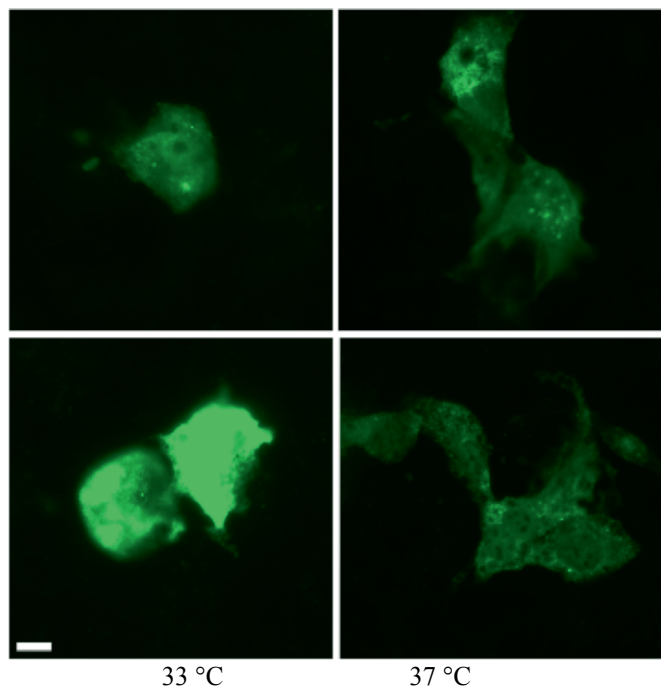


Рис. 4. Экспрессия NS1-GFP в клетках Cos-1 после трансфекции репортерной конструкции без промотора CMV (dCMV) совместно с минигеномом вируса A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) (нижний ряд) либо A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (верхний ряд) при 33 °C (левая колонка) и 37 °C (правая колонка).

Масштабная линейка – 10 мкм.

Fig. 4. Expression of NS1-GFP in Cos-1 cells after transfection with a reporter construct without a CMV promoter (dCMV) together with the minigenome of A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) virus (bottom row), or A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (top row) at 33 °C (left column) and 37 °C (right column).

The scale ruler is 10 microns.

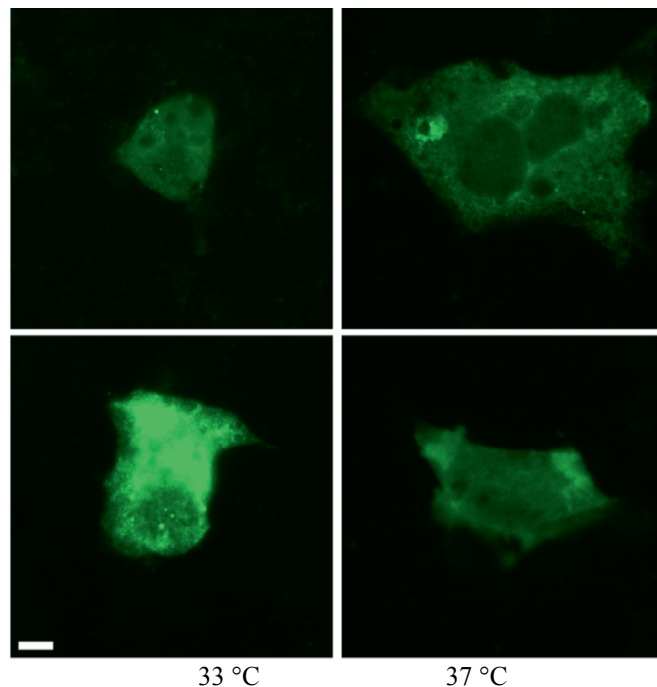


Рис. 5. Экспрессия NS1-GFP в клетках Cos-1 после трансфекции репортерной конструкции с инвертированной последовательностью NS1GFPNS2 и без промотора CMV (dCMVrev) совместно с минигеномом вируса A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) (нижний ряд) либо A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (верхний ряд) при 33 °C (левая колонка) и 37 °C (правая колонка).

Масштабная линейка – 10 мкм.

Fig. 5. Expression of NS1-GFP in Cos-1 cells after cotransfection with a reporter construct carrying an inverted NS1GFPNS2 sequence and deleted a CMV promoter (dCMVrev) together with the minigenome of A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) (bottom row) or A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (top row) viruses at 33 °C (left column) and 37 °C (right column).

The scale ruler is 10 microns.

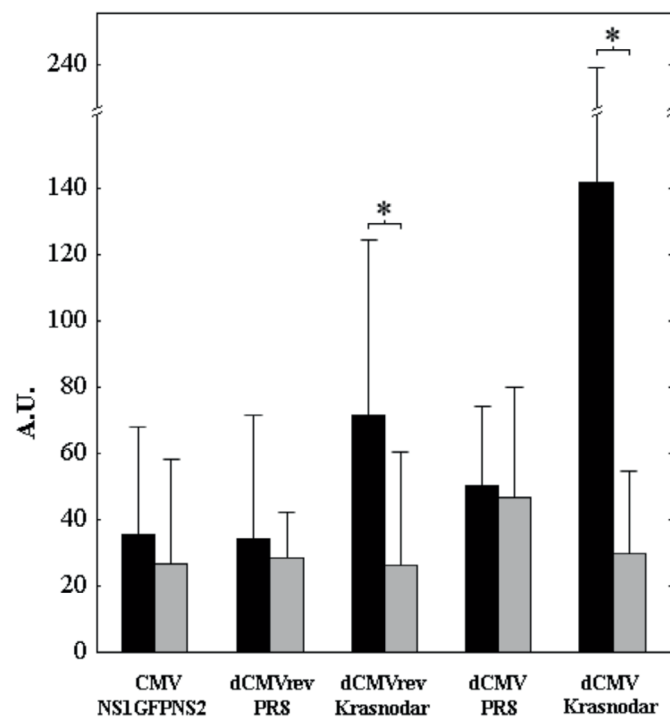


Рис. 6. Флуоресценция NS1-GFP в условных единицах (Arbitrary Units – A.U., вертикальная шкала) при температуре 33 °C (черный столбец) и 37 °C (серый столбец) в клетках Cos-1, трансфицированных репортерными конструкциями совместно с минигеномом вирусов A/Puerto Rico/8/34 (PR8) или A/Краснодар/101/35/59 (Krasnodar).

В каждом столбце приведено среднее арифметическое значение по результатам трех независимых экспериментов со среднеквадратичным отклонением. Конструкция dCMV характеризует активность полимеразы преимущественно при транскрипции, а dCMVrev – активность полимеразы при репликации и транскрипции. * – достоверное различие при $p < 0,008$. Обозначения: CMV/NS1GFPNS2 – репортерная конструкция NS1GFPNS2 с CMV промотором (контроль); dCMV – репортерная конструкция NS1GFPNS2 без промотора CMV; dCMVrev – репортерная конструкция без промотора CMV с инвертированной последовательностью NS1GFPNS2.

Fig. 6. NS1-GFP fluorescence in conventional units (Arbitrary Units – A.U., Y-axis) at a temperature of 33 °C (black column) and 37 °C (gray column) in Cos-1 cells transfected by reporter constructs together with the virus minigenome of A/Puerto Rico/8/34 (PR8) or A/Krasnodar/101/35/59 (Krasnodar).

In each column, the arithmetic mean is given according to the results of three independent experiments with a standard deviation. The dCMV construct characterizes polymerase activity mainly during transcription, and dCMVrev characterizes polymerase activity during replication and transcription. * – significant difference at $p < 0.008$. Designations: CMV/NS1GFPNS2 – NS1GFPNS2 reporter construct with CMV promoter (control); dCMV is a reporter construct of NS1GFPNS2 without a CMV promoter; dCMVrev is a reporter construct without a CMV promoter with an inverted NS1GFPNS2 sequence.

Таблица. Соотношение репликативной и транскрипционной активностей РНК-зависимой РНК-полимеразы вирусов А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) при температуре 33 и 37 °С на основании интенсивности флуоресценции (Φ_{33}/Φ_{37}) зеленого белка, экспрессируемого репортерной конструкцией

Table. The ratio of replicative and transcriptional activities of RNA-dependent RNA polymerase of viruses A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) and A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) at temperatures 33 and 37 °C based on the fluorescence intensity (F33/F37) of the green protein expressed by the reporter construct

Минигеном вируса Minigenome of virus	Функция вирусной полимеразы (репортерная конструкция), значение Φ_{33}/Φ_{37} The function of viral polymerase (reporter construct), F33/F37 value	
	транскрипция transcription (dCMV)	репликация + транскрипция replication + transcription (dCMVrev)
Контроль, NS1GFPNS2 Control, NS1GFPNS2	1,3	–
А/Puerto Rico/8/34	1,1	1,2
А/Краснодар/101/35/59 A/Krasnodar/101/35/59	4,9	2,7

Примечание. Обозначения, как на рис. 6.

Note. Designation according to Fig. 6.

Заключение

Созданы две репортерные конструкции с флуоресцентным белком на основе 8-го сегмента штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), позволяющие контролировать репликативную и транскрипционную активность белков полимеразного комплекса вируса гриппа методом минигенома.

С помощью метода минигенома показано, что полимеразы холодоадаптированного вируса А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) обладает более высокой репликативной и транскрипционной активностью при температуре 33 °С, чем при 37 °С, в отличие от полимеразы вируса А/Puerto Rico/8/34 (H1N1, вариант Mount Sinai), активность которой существенно не различается при 33 и 37 °С.

Результаты настоящей работы, полученные методом минигенома, не только подтвердили выводы ранних исследований, проведенных другими методами [20, 21], о том, что ts-фенотип холодоадаптированного штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) обусловлен вирусной полимеразой, но и показали, что транскрипционная активность полимеразы этого штамма в большей степени зависит от температуры, чем репликативная.

ЛИТЕРАТУРА

- Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., et al. Influenza. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018; 4(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
- Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophilic influenza strain. *Rev. Roum. Inframicrobiol.* 1965; 2(3): 179–86.
- Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C. *Nature*. 1967; 213(76): 612–4. <https://doi.org/10.1038/213612a0>
- Maassab H.F., Bryant M.L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med. Virol.* 1999; 9(4): 237–44. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1654\(199910/12\)9:4%3C237::aid-rmv252%3E3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1654(199910/12)9:4%3C237::aid-rmv252%3E3.0.co;2-g)
- Ambrose C.S., Luke C., Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2008; 2(6): 193–202. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00056.x>

- Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories. *Vaccine*. 2016; 34(45): 5436–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.018>
- Casparid H., Mallory R.M., Yu J., Ambrose C.S. Live-attenuated influenza vaccine effectiveness in children from 2009 to 2015–2016: a systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect. Dis.* 2017; 4(3): ofx111. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx111>
- Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000; 97(11): 6108–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.100133697>
- Hoffmann E., Krauss S., Perez D., Webby R., Webster R.G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*. 2002; 20(25–26): 3165–70. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00268-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00268-2)
- Neumann G., Horimoto T., Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza viruses – applications in research and vaccine design. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., Stech J., eds. *Avian Influenza. Volume 27*. Basel: Karger; 2008: 118–33.
- Horimoto T., Takada A., Fujii K., Goto H., Hatta M., Watanabe S., et al. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*. 2006; 24(17): 3669–76. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.005>
- Kittel C., Sereinig S., Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Wolkerstorfer A., et al. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame. *Virology*. 2004; 324(1): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.035>
- Te Velthuis AJW, Long JS, Barclay WS. Assays to measure the activity of influenza virus polymerase. In: Yamauchi Y., eds. *Influenza Virus. Methods in Molecular Biology, Volume 1836*. New York: Humana Press; 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8678-1_17
- Cox N.J., Kitame F., Kendal A.P., Maassab H.F., Naeve C. Identification of sequence changes in the cold-adapted, live attenuated influenza vaccine strain, A/Ann Arbor/6/60 (H2N2). *Virology*. 1988; 167(2): 554–67.
- Rodriguez L., Blanco-Lobo P., Reilly E.C., Maehigashi T., Nogales A., Smith A., et al. Comparative study of the temperature sensitive, cold adapted and attenuated mutations present in the master donor viruses of the two commercial human live attenuated influenza vaccines. *Viruses*. 2019; 11(10): 928. <https://doi.org/10.3390/v11100928>
- Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G., et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology*. 2011; 412(2): 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.004>
- Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Акопова Н.К., Ахмадова Н.К., Коптяева И.Б. Новые холодоадаптированные

- штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(1): 11–7. <https://elibrary.ru/pwjuoj>
18. Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Терехов А.В., Лисовская К.В., Аكوпова И.И. Холодоадаптированный штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) – перспективный штамм-донор аттенуации для получения живых гриппозных вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (5): 27–32. <https://elibrary.ru/zqjyex>
 19. Маркушин С.Г., Кост В.Ю., Аكوпова И.И., Коптяева И.Б., Лисовская К.В., Переверзев А.Д. и др. Исследование возможности использования сайт-специфического мутагенеза в конструировании живых гриппозных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (6): 100–3. <https://elibrary.ru/tenlph>
 20. Kost V., Tsfasman T., Terekhov A., Koptiaeva I., Lisovskaja K., Markushin S. Attenuation of the cold-adapted (ca) A/Krasnodar/101/35/1959 (H2N2) influenza strain: Role of the Ile147Thr mutation in the PB1 gene. *IJSRM.Human*. 2017; 6(2): 96–114.
 21. Кост В.Ю., Ртищев А.А., Минтаев Р.Р., Аكوпова И.И., Лисовская К.В., Маркушин С.Г. Изучение биологических свойств аттенуированных вариантов штамма А/WSN/33, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза PB2-гена. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; (2): 68–76. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-68-76> <https://elibrary.ru/wrchzu>
 22. Stech J., Stech O., Herwig A., Altmepfen H., Hundt J., Gohrbandt S., et al. Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(21): e139. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn646>
 23. Jeong J.Y., Yim H.S., Ryu J.Y., Lee H.S., Lee J.H., Seen D.S., et al. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(15): 5440–3. <https://doi.org/10.1128/aem.00844-12>
 24. Терехов А.В., Цфасман Т.М., Маркушин С.Г., Коптяева И.Б., Лисовская К.В., Кост В.Ю. Изучение att-фенотипа реассортантов между вирулентным штаммом вируса гриппа А(H1N1)/WSN/33 и вакцинным холодоадаптированным штаммом вируса гриппа А(H2N2)/Краснодар/101/35/59. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; (5): 41–7. <https://elibrary.ru/refcoj>
 25. Perez J.T., Garcia-Sastre A., Manicassamy B. Insertion of a GFP reporter gene in influenza virus. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2013; Chapter 15: 15G4. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15g04s29>

REFERENCES

1. Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., et al. Influenza. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018; 4(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
2. Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophilic influenza strain. *Rev. Roum. Inframicrobiol.* 1965; 2(3): 179–86.
3. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C. *Nature*. 1967; 213(76): 612–4. <https://doi.org/10.1038/213612a0>
4. Maassab H.F., Bryant M.L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med. Virol.* 1999; 9(4): 237–44. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1654\(199910/12\)9:4%3C237::aid-rmv252%3E3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1654(199910/12)9:4%3C237::aid-rmv252%3E3.0.co;2-g)
5. Ambrose C.S., Luke C., Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2008; 2(6): 193–202. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00056.x>
6. Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories. *Vaccine*. 2016; 34(45): 5436–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.018>
7. Caspard H., Mallory R.M., Yu J., Ambrose C.S. Live-attenuated influenza vaccine effectiveness in children from 2009 to 2015-2016: a systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect. Dis.* 2017; 4(3): ofx111. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx111>
8. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000; 97(11): 6108–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.100133697>
9. Hoffmann E., Krauss S., Perez D., Webby R., Webster R.G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*. 2002; 20(25-26): 3165–70. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00268-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00268-2)
10. Neumann G., Horimoto T., Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza viruses – applications in research and vaccine design. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., Stech J., eds. *Avian Influenza. Volume 27*. Basel: Karger; 2008: 118–33.
11. Horimoto T., Takada A., Fujii K., Goto H., Hatta M., Watanabe S., et al. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*. 2006; 24(17): 3669–76. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.005>
12. Kittel C., Sereinig S., Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Wolkerstorfer A., et al. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame. *Virology*. 2004; 324(1): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.035>
13. Te Velthuis AJW, Long JS, Barclay WS. Assays to measure the activity of influenza virus polymerase. In: Yamauchi Y., eds. *Influenza Virus. Methods in Molecular Biology, Volume 1836*. New York: Humana Press; 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8678-1_17
14. Cox N.J., Kitame F., Kendal A.P., Maassab H.F., Naeve C. Identification of sequence changes in the cold-adapted, live attenuated influenza vaccine strain, A/Ann Arbor/6/60 (H2N2). *Virology*. 1988; 167(2): 554–67.
15. Rodriguez L., Blanco-Lobo P., Reilly E.C., Maehigashi T., Nogales A., Smith A., et al. Comparative study of the temperature sensitive, cold adapted and attenuated mutations present in the master donor viruses of the two commercial human live attenuated influenza vaccines. *Viruses*. 2019; 11(10): 928. <https://doi.org/10.3390/v11100928>
16. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G., et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology*. 2011; 412(2): 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.004>
17. Ghendon Y.Z., Markushin S.G., Tsfasman T.M., Akopova I.I., Ahmatova N.K., Koptiaeva I.B. New cold-adapted donor strains for live influenza vaccine. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(1): 11–7. <https://elibrary.ru/pwjuoj> (in Russian)
18. Markushin S.G., Tsfasman T.M., Terekhov A.V., Lisovskaya K.V., Akopova I.I. Cold-adapted A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) strain-a promising strain-donor of attenuation for procurement of live influenza vaccines. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (5): 27–32. <https://elibrary.ru/zqjyex> (in Russian)
19. Markushin S.G., Kost V.Yu., Akopova I.I., Koptiaeva I.B., Lisovskaya K.V., Pereversev A.D., et al. The investigation of the possibility of site-specific mutagenesis using in construction of live influenza vaccines. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika*. 2014; (6): 100–3. <https://elibrary.ru/tenlph> (in Russian)
20. Kost V., Tsfasman T., Terekhov A., Koptiaeva I., Lisovskaja K., Markushin S. Attenuation of the cold-adapted (ca) A/Krasnodar/101/35/1959 (H2N2) influenza strain: Role of the Ile147Thr mutation in the PB1 gene. *IJSRM.Human*. 2017; 6(2): 96–114.
21. Kost V.Yu., Rtschev A.A., Mintaev R.R., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., Markushin S.G. Study of the biological properties of attenuated variants of the virulent A/WSN/33 strain of influenza virus, obtained by the site-specific mutagenesis of PB2-gene. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; (2): 68–76. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-68-76> <https://elibrary.ru/wrchzu> (in Russian)
22. Stech J., Stech O., Herwig A., Altmepfen H., Hundt J., Gohrbandt S., et al. Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(21): e139. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn646>
23. Jeong J.Y., Yim H.S., Ryu J.Y., Lee H.S., Lee J.H., Seen D.S., et al. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(15): 5440–3. <https://doi.org/10.1128/aem.00844-12>
24. Terekhov A.V., Tsfasman T.M., Markushin S.G., Kopt'ayeva I.B., Lisovskaya K.V., Kost V.Yu. Study att-reassortant phenotype between virulent strain of influenza A(H1N1)/WSN/33 and cold-adapted vaccine strain of influenza A(H2N2)/Krasnodar/101/35/59. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika*. 2013; (5): 41–7. <https://elibrary.ru/refcoj> (in Russian)
25. Perez J.T., Garcia-Sastre A., Manicassamy B. Insertion of a GFP reporter gene in influenza virus. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2013; Chapter 15: 15G4. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15g04s29>

Информация об авторах:

Иванов Павел Александрович – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: ivanovpa@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7105-7579>

Ляшко Александр Викторович – младший научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lyaalex@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Кост Владимир Юрьевич – научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии, Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия. E-mail: goron.dekar@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

Ломакина Наталья Федоровна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: nflomakina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2638-4244>

Ртищев Артём Андреевич – научный сотрудник лаборатория генетики РНК-содержащих вирусов, ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: rtishchevartyom@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Бунькова Наталья Ивановна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: nbounkova@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0007-8846-4633>

Тимофеева Татьяна Анатольевна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией физиологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Баланова Марина Анатольевна – научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: mbalanova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2727-7221>

Ионов Степан Александрович – лаборант-исследователь лаборатории физиологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия; студент, ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Россия. E-mail: stephan.ionov@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0005-3393-0399>

Гориков Дмитрий Вячеславович – лаборант-исследователь лаборатории физиологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия; студент, ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Россия. E-mail: gorikov.dmitry@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-5159-8738>

Маркушин Станислав Георгиевич – д-р мед. наук, заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: s.g.markushin@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

Участие авторов: Иванов П.А. – концепция и дизайн исследования, конструирование репортерных плазмид, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Ляшко А.В., Ртищев А.А., Ионов С.А., Гориков Д.В., Баланова М.А. – проведение экспериментов; Кост В.Ю. – конструирование плазмид с встроенными сегментами вируса, проведение экспериментов; Бунькова Н.И. – вирусологические работы; Ломакина Н.Ф. – секвенирование, интерпретация данных, подготовка текста; Тимофеева Т.А. – координация исследований, анализ и интерпретация данных; Маркушин С.Г. – концепция и дизайн исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Information about the authors:

Pavel A. Ivanov – PhD, senior researcher, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: ivanovpa@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7105-7579>

Aleksandr V. Lyashko – junior researcher, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: lyaalex@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Vladimir Yu. Kost – researcher, Laboratory of Molecular Toxinology, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: goron.dekar@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

Natalia F. Lomakina – PhD, senior researcher, the N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, the Russian Ministry of Health, Moscow, Russia. E-mail: nflomakina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2638-4244>

Artyom A. Rtishchev – researcher, Laboratory of genetics of RNA viruses, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: rtishchevartyom@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Nataliya I. Bunkova – PhD, senior researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: nbounkova@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0007-8846-4633>

Tatiana A. Timofeeva – PhD, leading researcher, head of Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Marina A. Balanova – researcher, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: mbalanova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2727-7221>

Stepan A. Ionov – laboratory technician, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia; student, FSBEI HE Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia. E-mail: stephan.ionov@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0005-3393-0399>

Dmitry V. Gorikov – laboratory technician, Laboratory of Virus Physiology, the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia; student, FSBEI HE Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia. E-mail: gorikov.dmitry@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-5159-8738>

Stanislav G. Markushin – DSc, head of Laboratory of genetics of RNA viruses, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: s.g.markushin@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

Contribution: Ivanov P.A. – concept and design of research, construction of reporter plasmids, carrying out experiments, analysis and interpretation of results, text preparation; Lyashko A.V., Rtishchev A.A., Ionov S.A., Gorikov D.V. – carrying out experiments; Kost V.Yu. – construction of plasmids with inserted virus segments, carrying out experiments; Bunkova N.I. – virological works; Lomakina N.F. – sequencing, data interpretation; text preparation, Timofeeva T.A. – research coordination, analysis and interpretation of results; Markushin S.G. – concept and design of research, approval of the final version of the article for publication.