

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.832.1:578.1

Васин А.В.^{1,2}, Петрова-Бродская А.В.^{1,2}, Плотникова М.А.¹, Цветков В.Б.^{1,3,4}, Клотченко С.А.¹

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ДИНАМИКА СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКА NS1 ВИРУСОВ ГРИППА А ЧЕЛОВЕКА

¹ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург;² ФГАО УВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, г. Санкт-Петербург;³ ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева» РАН, 119991, г. Москва;⁴ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА, 119435, г. Москва

Белок NS1 вируса гриппа А (ВГА) является одним из ключевых вирусных факторов, отвечающих за взаимодействие с клеткой-хозяином. NS1 противостоит системе клеточной противовирусной защиты, участвует в процессинге и экспорте клеточных мРНК, регулирует активность вирусной РНК-полимеразы и экспрессию вирусных генов, оказывает влияние на сигнальные системы клетки. Многочисленные функции NS1 осуществляются за счёт устоявшихся взаимодействий с клеточными факторами, число которых, по разным данным, превышает сотню. Примечательно, что только два сегмента генома ВГА человека — NS1 и NP — не подвергались реассортации и эволюционировали в процессе генетического дрейфа начиная с пандемии 1918 г. по настоящее время. Этот факт может свидетельствовать о важности NS1 и его многочисленных взаимодействий с клеточными факторами в межвидовой адаптации вируса. В обзоре представлены данные об эволюции белка NS1 ВГА человека и проведён анализ аминокислотных замен, произошедших в основных структурных и функциональных доменах белка NS1 в процессе эволюции.

Ключевые слова: вирус гриппа А; неструктурный белок NS1; структурные и функциональные домены; взаимодействие вирус—хозяин; эволюционная динамика.

Для цитирования: Васин А.В., Петрова-Бродская А.В., Плотникова М.А., Цветков В.Б., Клотченко С.А. Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(6): 246-258. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-246-258>

Vasin A.V.^{1,2}, Petrova-Brodskaya A.V.^{1,2}, Plotnikova M.A.¹, Tsvetkov V.B.^{1,3,4}, Klotchenko S.A.¹
EVOLUTIONARY DYNAMICS OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DOMAINS OF INFLUENZA A VIRUS NS1 PROTEIN

¹ Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, Russian Federation;³ A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russian Federation;⁴ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435, Russian Federation

Influenza A virus (IAV) NS1 protein is one of the key viral factors responsible for virus-host interactions. NS1 counteracts host antiviral defense, participates in the processing and export of cellular mRNAs, regulates the activity of viral RNA polymerase and the expression of viral genes, and influences the cellular signaling systems. Multiple NS1 functions are carried out due to the interactions with cellular factors, the number of which exceeds one hundred. It is noteworthy that only two segments of IAV genome – NS and NP – did not undergo reassortment and evolved in the course of genetic drift, beginning with the pandemic of 1918 to the present. This fact may indicate the importance of NS1 and its numerous interactions with cellular factors in the interspecific adaptation of the virus. The review presents data on the evolution of the human IAV NS1 protein and analysis of the amino acid substitutions in the main structural and functional domains of NS1 protein during evolution.

Key words: A virus; nonstructural protein NS1; structural and functional domains; virus-host interactions; evolutionary dynamics.

For citation: Vasin A.V., Petrova-Brodskaya A.V., Plotnikova M.A., Tsvetkov V.B., Klotchenko S.A. Evolutionary dynamics of structural and functional domains of influenza A virus NS1 protein. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(6): 246-258. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-246-258>

For correspondence: Andrey V. Vasin, Head of the Department of molecular biology of viruses, Director of the Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: influenza.spb@gmail.com

Information about authors:

Vasin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1391-7139>;Petrova-Brodskaya A.V., <http://orcid.org/0000-0001-5130-3755>;Plotnikova M.A., <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>;Tsvetkov V.B., <http://orcid.org/0000-0003-0494-3332>;Klotchenko S.A., <http://orcid.org/0000-0003-0289-6560>

Acknowledgment. This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 15-15-00170) and the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 16-34-01110).

Для корреспонденции: Васин Андрей Владимирович, заведующий отделом молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: influenza.spb@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 18 August 2017
Accepted 25 August 2017

Введение

Считается, что природным резервуаром вирусов гриппа А (ВГА) являются водоплавающие птицы, у которых встречаются вирусы, содержащие гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА) большинства известных подтипов [1]. Несмотря на значительный прогресс в области молекулярной вирусологии, эпидемиологии и эволюции ВГА, фундаментальный вопрос о механизмах передачи вируса от птиц (или других хозяев) к человеку и их адаптации для циркуляции в популяции человека до сих пор остаётся без ответа. Наибольшее внимание с этой точки зрения уделяется поверхностному белку НА, определяющему вирусный подтип и отвечающему за связывание и вхождение вируса в клетку, а также субъединицам PB1, PB2 и PA полимеразного комплекса [2]. Вместе с тем в процессе адаптации к новому хозяину важную роль играют другие вирусные белки, в частности неструктурный белок NS1 [3]. Основная функция NS1 заключается в противостоянии интерферон-опосредованному механизму противовирусной защиты и взаимодействию со множеством клеточных факторов [4, 5]. В литературе имеются данные об аминокислотных заменах в NS1, которые усиливают патогенность штаммов ВГА разной видовой специфичности [6]. Например, усиление вирулентности вируса H1N1 человека, содержащего ген NS высокопатогенных ВГА птиц H5N1, связано с заменой E92D, обеспечивающей усиление устойчивости клеток к вирусу, индуцированной интерфероном [7]. Между тем значимость выявленных замен, связанных с увеличением вирулентности, для смены видовой специфичности вируса и адаптации к новому хозяину остается малопонятной [5, 6]. Несомненным является то, что при изучении роли NS1 как в патогенезе инфекции, так и в процессе межвидовой адаптации необходимо четко понимать молекулярно-генетические детерминанты патогенности и эволюционное происхождение NS1. В обзоре обобщены современные данные об эволюции белка NS1 ВГА человека, описаны его основные структурные и функциональные сайты и проведён анализ произошедших в них в процессе эволюции аминокислотных замен.

Филогенетический анализ гена NS ВГА человека.

На протяжении последнего столетия в популяции человека преимущественно циркулировали ВГА подтипов H1N1, H2N2 и H3N2 [8, 9]. При этом появление вирусов каждого нового подтипа сопровождалось пандемиями в 1918, 1957, 1968, 1977 (псевдопандемия) и 2009 гг. [10]. Считается, что с 1510 г. произошло не менее 14 пандемий, вызванных ВГА [9]. При этом полные генетические последовательности известны только для ВГА, циркулировавших не ранее 1918 г., поэтому понимание вирусологической природы пандемий гриппа, происходящих до этого времени, сильно ограничено.

Общим предком для современных ВГА человека является вирус H1N1_{pdm1918}, вызвавший пандемию «испанского гриппа», которая унесла жизни не менее 50 млн человек [8]. На рис. 1 представлена схема филогенетического дерева гена NS (области гена NS, соответствующей открытой рамке считывания белка NS1) ВГА человека и свиньи, отражающая современную модель его эволюции [11, 12]. Включение в анализ ВГА свиного происхождения связано с тем, что они филогенетически близки вирусам человека и вносят существенный вклад в появление новых вирусных подтипов в процессе реассортации генетических сегментов [13, 14].

Среди генов NS ВГА человека и свиньи выделяют две эволюционные линии. Первая, обозначенная как NS_{av_ori}, содержит вирусы, произошедшие от ВГА птиц. Вторая линия, обозначенная как NS_{pdm1918}, соответствует ВГА

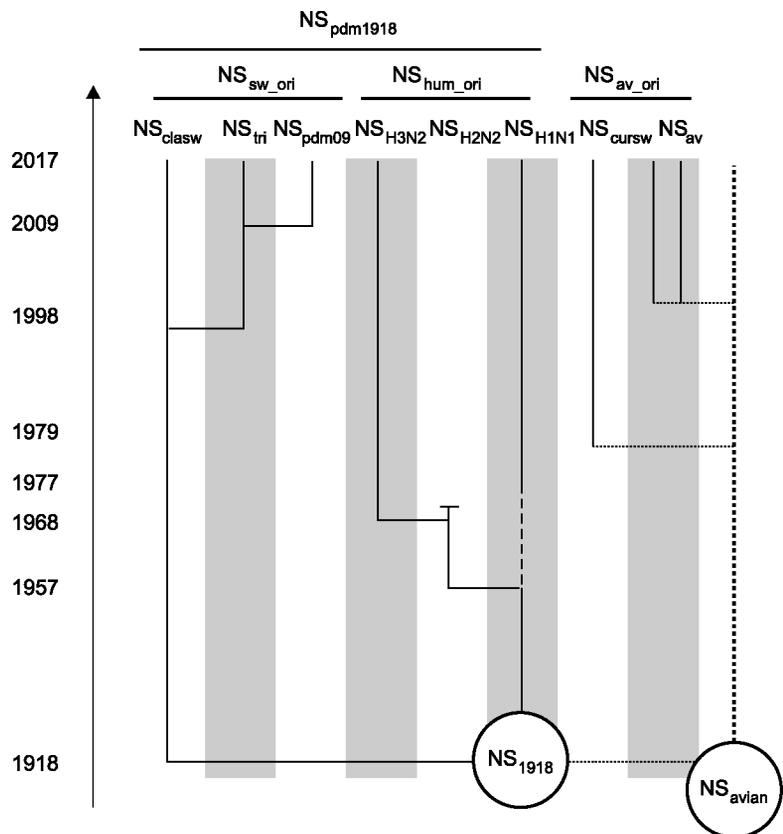


Рис. 1. Схема эволюции гена NS ВГА человека и свиньи с 1918 г. по настоящее время. NS_{av_ori} — NS1 пула ВГА птиц; NS₁₉₁₈ — NS1 ВГА H1N1_{pdm1918}; NS_{avian} — NS1 ВГА H1N1 человека; NS_{H2N2} — NS1 ВГА H2N2 человека; NS_{H3N2} — NS1 ВГА H3N2 человека; NS_{pdm09} — NS1 ВГА H1N1 человека; NS_{clasw} — NS1 ВГА классической линии свиней; NS_{tri} — NS1 тройного реассортантного ВГА свиней; NS_{sw_ori} — NS1 ВГА евразийской линии свиней; NS_{av} — NS1 ВГА человека и свиньи подтипов H5, H7, H9 птичьего происхождения. Линии NS_{H1N1}, NS_{H2N2} и NS_{H3N2} относятся к клейду NS_{hum_ori}; линии NS_{clasw}, NS_{tri} и NS_{pdm09} — к клейду NS_{sw_ori}; линии NS_{cursw} и NS_{av} — к клейду NS_{av_ori}. Клейды NS_{sw_ori} и NS_{av_ori} объединены в общий клейд NS_{pdm1918}, происходящий от гена NS₁₉₁₈. Чёрным цветом отмечены линии NS1 ВГА человека, серым — линии NS1 ВГА свиньи, линия NS1 ВГА птиц отмечена пунктиром.

человека и свиньи, ведущим свое эволюционное происхождение от гена NS₁₉₁₈ вируса H1N1^{pdm1918}. Этот вирус, с одной стороны, происходит из пула ВГА птиц (NS_{avian}), с другой стороны, является предшественником подавляющего большинства современных ВГА человека [2, 8].

Внутри линии NS_{pdm1918} наблюдается достоверное разделение на два клейда NS_{hum_ori} и NS_{sw_ori}, которые соответствуют сезонным ВГА человека подтипов H1N1, H2N2 и H3N2 (линии NS_{H1N1}, NS_{H2N2} и NS_{H3N2} соответственно) и ВГА свиней классической линии, тройным реассортантным вирусам свиньи и пандемическим вирусам H1N1-^{pdm2009} человека (линии NS_{clasw}, NS_{tri} и NS_{pdm09} соответственно). Внутри линии NS_{av_ori} можно выделить ВГА свиней евразийской линии (NS_{eursw}) и ВГА человека и свиней, происходящие от вирусов птиц подтипов H5, H7, H9 (NS_{av}).

Эволюционная динамика гена NS ВГА человека.

Чтобы проследить эволюционную динамику гена NS ВГА человека, необходимо сопоставить данные его филогенетического анализа и эволюции самих вирусов [2]. Как было сказано ранее, вирусы H1N1^{pdm1918} являются предшественниками всех современных линий ВГА, циркулирующих в популяции человека, а также ВГА свиней за исключением вирусов евразийской линии. Начиная с 1918 г. ген NS эволюционировал в вирусах H1N1 человека с примерно постоянной скоростью вплоть до пандемии «азиатского гриппа» 1957 г., вызванной появлением реассортантного вируса, в геноме которого появились 3 новых произошедших от ВГА птиц сегмента: HA (подтипа H2), NA (подтипа N2) и PB1 [2]. Остальные 5 геномных сегментов (в том числе NS) вирусов H2N2 сохранились от сезонного вируса H1N1. ВГА H2N2 в 1968 г. были вытеснены из циркуляции новым пандемическим вирусом H3N2, вызвавшим пандемию «гонконгского гриппа». Этот вирус появился в результате реассортации геномных сегментов ВГА человека H2N2 и ВГА птиц, приведшей к возникновению новых сегментов HA (подтипа H3) и PB1 [2]. Вирус быстро стал эндемическим и циркулирует как сезонный в популяции человека по настоящее время. Сегменты NS вирусов H3N2 первых лет циркуляции и вирусов H2N2 последних лет циркуляции были филогенетически близки. Это свидетельствует о том, что ген NS, не претерпев существенных изменений, продолжил эволюционировать в вирусах H3N2 человека [11, 12].

ВГА человека H1N1 вновь появился в популяции человека в 1977 г., вызвав техническую пандемию, или псевдопандемию. Молекулярно-генетический анализ подтвердил, что штаммы ВГА H1N1 1977 г. были практически идентичны штаммам 1957 г. по последовательностям всех восьми геномных сегментов [15]. Так как вирус не мог в течение 20 лет циркулировать в другом хозяине без накопления мутаций, считается, что он находился в «замороженном» состоянии, после чего произошла его реактивация. Линия, соответствующая гену NS вирусов H1N1, продолживших циркулировать наряду с вирусами H3N2, образует отдельную от них эволюционную ветвь.

В 2009 г. произошла пандемия, вызванная появлением нового ВГА подтипа H1N1^{pdm2009}. В целом пандемия, вызванная вирусом H1N1^{pdm2009}, носила умеренный, близкий к слабому характер [16]. Данный вирус является сложным реассортантом двух неродственных вирусов H1N1 свиней классической, произошедшей от вируса H1N1^{pdm1918}, и евразийской, произошедшей от ВГА птиц, линий [2, 17]. Удаленность этих линий подтверждается и

данными филогенетического анализа гена NS, согласно которому кластеризуются две линии NS_{av_ori} и NS_{pdm1918} [11, 12]. Сегменты NA и M вирусов H1N1^{pdm2009} человека происходят от ВГА свиней H1N1 евразийской линии, в то время как остальные 6 сегментов — от тройного реассортантного вируса свиней H1N2, появившегося в конце 90-х годов прошлого века [10, 18]. В этом вирусе гены HA, NP и NS происходят от вирусов классической линии свиней, гены PB2 и PA — из пула ВГА птиц, а PB1 — от сезонных вирусов человека H3N2. Таким образом, ген NS вирусов H1N1^{pdm2009}, как и ген NS ВГА человека подтипов H1N1, H2N2 и H3N2, происходит от общего предкового гена NS пандемического вируса 1918 г. Однако этот сегмент эволюционировал в пуле ВГА свиней.

Согласно данным филогенетического анализа ВГА свиней, содержащие ген NS линии NS_{sw_ori} можно разделить на 3 группы. Первая группа включает ВГА свиней классической линии, содержащие гены NS клейда NS_{clasw}, произошедшие от NS₁₉₁₈. Вторая группа образована тройными реассортантными ВГА свиней, возникшими в результате реассортации ВГА свиней классической линии с ВГА H3N2 человека и ВГА птиц. Ген NS этих вирусов произошёл от гена NS ВГА свиней классической линии и дал начало генам NS вирусов гриппа H1N1^{pdm2009}. При этом клейд генов NS этих пандемических вирусов содержит последовательности гена NS вирусов свиней тех же годов выделения, что свидетельствует об их эволюционной близости. Примечательно, что линия генов NS_{dm09} содержит небольшую группу генов NS ВГА свиней подтипа H1N1 2003 г. выделения [12].

Известно также, что существуют спорадические случаи межвидовой передачи ВГА, однако такие вирусы не закрепляются в популяции человека. Например, в 1976 г. в США зарегистрированы случаи инфицирования людей вирусами свиней H1N1 [19]. Наиболее известными являются случаи межвидовой передачи ВГА птиц человеку, таких как высокопатогенные ВГА птиц H5N1 [20] или умеренно патогенные ВГА птиц H7N9 [20]. В этом случае ген NS имел птичье происхождение. Однако такие случаи межвидовой передачи носили локальный характер, и вирусы не смогли зафиксироваться в популяции человека. Следует отметить, что межвидовая прямая передача вируса может происходить не только от птиц к млекопитающим, но и между различными видами млекопитающих, в частности между человеком, свиньями и лошадьми [13].

Таким образом, общая схема, иллюстрирующая эволюционную динамику гена NS ВГА человека, показывает, что сегмент NS начиная с 1918 г. не подвергался реассортации и оставался неизменным у всех подтипов ВГА, циркулировавших в популяции человека (см. рис. 1). Мутации в гене NS накапливались постепенно в процессе генетического дрейфа. Среди всех геномных сегментов ВГА помимо NS неизменным в процессе эволюции ВГА человека оставался только сегмент NP [2].

Синтез и локализация NS1.

Белок NS1 кодируется 8-м сегментом генома ВГА. В процессе транскрипции по механизму альтернативного сплайсинга образуется не менее двух мРНК, кодирующих белки NS1 и NS2 [21]. Обе мРНК имеют 56 общих нуклеотидов на 5'-конце, в результате чего NS1 и NS2 содержат 10 общих N-концевых аминокислот [22]. Имеющиеся данные литературы относительно накопления мРНК NS1 и белка ядерного экспорта (NEP) свидетельствуют о низком уровне сплайсинга мРНК NEP, в ре-

зультате чего она составляет около 10% от мРНК NS1 [23, 24]. Экспрессия NS1 в инфицированных клетках поддерживается на высоком уровне: уже через 2 ч после заражения наблюдается характерное увеличение транскриптов NS1 [23].

NS2, также известный как NEP, является структурным компонентом вириона, отвечающим за экспорт вирусных рибонуклеопротеинов из ядра в цитоплазму [25]. NS1 считался неструктурным компонентом вириона ВГА [26], однако, по последним данным, он также входит в состав вирусных частиц [27].

Внутриклеточная локализация NS1 может различаться в зависимости от штамма вируса, типа клеточной линии, времени после инфицирования, а также уровня экспрессии самого белка NS1. В инфицированных клетках NS1 преимущественно локализуется в ядре, однако на поздних стадиях инфекции значительное количество белка обнаруживается в цитоплазме [5]. В зависимости от штамма вируса NS1 имеет 1 или 2 сигнала ядерной локализации (NLS1 и NLS2). При взаимодействии с клеточным белком импортином- α NLS отвечают за активный транспорт NS1 в ядро. Сигнальная последовательность NLS1 высококонсервативна и включает R35, R38 и K413, также участвующие в связывании днРНК [28]. Напротив, С-концевая сигнальная последовательность NLS2 содержит K219, R220, R231 и R232, присутствующие не у всех белков NS1 [28]. Существует также конкурирующая с NLS2 последовательность сигнала ядрышковой локализации (NoLS), которая содержит дополнительные основные остатки R224 и R229 [29].

Цитоплазматическая локализация NS1 регулируется тремя механизмами. Во-первых, это секвестрирование новосинтезированного белка в цитоплазму при помощи клеточных или вирусных факторов, которые маскируют NLS [29]. Во-вторых, в цитоплазматическом транспорте участвует сигнал ядерного экспорта (NES), расположенный между 138-м и 147-м аминокислотным остатком (а. о.) и требующий наличия L144 и L146, которые обычно маскируются близлежащими остатками в положениях 148—161 [30]. Таким образом, возможно, что в течение инфекции для активации цитоплазматической локализации требуется «открытие» данных аминокислот. В-третьих, возможна конкуренция между NLS и NES, так как последовательность NES становится определяющей после того, как последовательности NLS перекрываются клеточным NS1-связывающим белком (NS1-BP). Молекулярные события, управляющие этими тремя возможными механизмами, до сих пор не установлены, но есть основания полагать, что специфические клеточные факторы играют ключевую роль в определении внутриклеточной локализации белка [31]. Например, возможна регуляция белка NS1 в процессе фосфорилирования, так как мутация в потенциальном сайте фосфорилирования S195 приводит к задержке NS1 в ядре [32].

В целом различное внутриклеточное распределение NS1 в течение всей инфекции необходимо для реализации его различных функций [5].

Структура NS1.

Белок NS1 имеет относительно малые размеры, и у

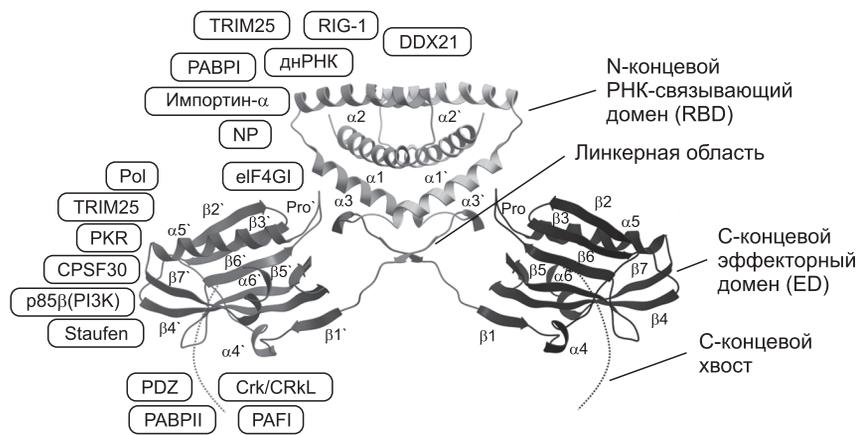


Рис. 2. Кристаллическая структура димера белка NS1 ВГА (PDB 4OPH). Мономер справа отмечен более светлым оттенком (РНК-связывающий домен), оттенком темнее (линкерная область), темно-серым цветом (С-концевой ED-домен). Аналогичные домены мономера слева симметричны и также выделены различными оттенками серого. Пунктирной линией обозначен С-концевой хвост. $\alpha 1$ — $\alpha 5$ и $\alpha' 1$ — $\alpha' 5$ — α -спирали (имеют координаты 2—25, 29—50, 54—70, 94—100, 170—188, 195—202 а. о. соответственно). $\beta 1$ — $\beta 7$ и $\beta' 1$ — $\beta' 7$ — β -нити (имеют координаты 88—91, 107—112, 115—120, 127—137, 140—151, 156—162, 191—194 а. о. соответственно). Pro и Pro' — богатая пролином петля (координаты 162—170 а. о.). В прямоугольниках показаны клеточные и вирусные факторы, с которыми взаимодействует NS1.

большинства ВГА его длина составляет не более 237 а.о. В структуре NS1 выделяют 2 функционально различных домена: N-концевой РНК-связывающий (RBD) и С-концевой эффекторный (ED) домены, которые соединены между собой гибкой линкерной областью (рис. 2). Кроме того, в молекуле NS1 имеется короткий С-концевой хвост. NS1 преимущественно функционирует в виде димеров, которые образуются за счет формирования ионных связей [33]. NS1 также способен к олигомеризации в присутствии молекул днРНК [33, 34]. N-концевой RBD длиной 73 а. о., образованный тремя α -спиральными участками, содержит NLS1 и сайт распознавания днРНК [34]. Антипараллельные α -спирали $\alpha 2$ и $\alpha 2'$ в димере NS1 связываются с большой бороздкой днРНК посредством нескольких основных аминокислот, в частности R38 и K41 [34]. Следует отметить, что такая структура, состоящая из двух антипараллельных основных α -спиралей, характерна для многих РНК-связывающих белков, действующих в форме димера.

С-концевой ED длиной около 164 а. о. осуществляет взаимодействие с ядерными белками клетки-хозяина и отвечает за ядерно-цитоплазматический транспорт зрелых мРНК в инфицированных клетках. ED состоит из трех α -спиралей и семи β -нитей [32]. Последние формируют большой антипараллельный β -слой, окружающий одну сторону длинной α -спирали $\alpha 5$. Пространственная структура ED содержит высококонсервативный набор заряженных экспонированных на поверхность аминокислот.

Длина С-конца NS1 широко варьирует у различных штаммов [5]. На С-конце NS1 имеются 2 SH-связывающих домена типов SH2 и SH3 [35]. Оба домена специфически взаимодействуют с регуляторной субъединицей р85 β фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) [36]. Активация опосредованного ею сигнального пути играет ключевую роль в обеспечении вирусной репликации [37]. Особенно важной является антиапоптотическая функция активации PI3K, так как действие противовирусных интерферонов

(ИФН) направлено на индукцию программы апоптоза инфицированных клеток [38]. Большинство белков NS1 на С-конце имеют состоящий из четырех аминокислот PDZ-связывающий мотив [39]. PDZ-связывающие мотивы играют ключевую роль в активации сигнальных путей, обеспечивающих противостояние действию ИФН и приводящих к активации клеточных генов, поддерживающих репродукцию вируса [40, 41].

Показано, что молекулы NS1 обладают конформационным полиморфизмом, который заключается в различной ориентации ED относительно RBD, приводящей к трем возможным конформациям белка: открытой, полуоткрытой и закрытой [33]. Ключевую роль в образовании таких структур играет длина линкерной области и аминокислота в положении 71 [33]. Такая конформационная подвижность зависит от стадии инфекции, внутриклеточной локализации и посттрансляционных модификаций NS1 и может вносить вклад в мультифункциональность этого белка.

Функциональные домены NS1 и роль NS1 в жизненном цикле ВГА.

NS1 является одним из наиболее многофункциональных белков ВГА. Посредством взаимодействия со множеством клеточных факторов NS1 участвует в регуляции сплайсинга, экспорте и трансляции вирусных мРНК, антагонизме с системами клеточного противовирусного ответа [5]. Наибольший прогресс в понимании роли белка NS1 был достигнут с появлением методов системной биологии [42].

Одна из первых фундаментальных работ по комплексной оценке роли гена *NS1* в жизненном цикле ВГА была опубликована в 2002 г. [43]. Авторы с помощью кДНК микрочипа определили профили экспрессии генов эпителиальных клеток легкого A549, инфицированных вирусами A/PR/8/34, содержащими полноразмерный и укороченные гены NS (wtNS- и ΔNS-вирусы, соответственно). Использование дефектного по открытой рамке считывания NS1 вируса позволило оценить вклад этого гена в клеточный ответ на уровне мРНК. Было показано, что инфекция вирусом wtNS приводила к значительной индукции генов, вовлеченных в ИФН-путь. Делеция открытой рамки считывания NS1 в гене *NS* приводила к увеличению числа и степени экспрессии клеточных генов, вовлеченных в ИФН, NFκB и другие противовирусные пути. При этом разные индуцируемые ИФН-гены проявляли разную чувствительность к NS1-опосредованному ингибированию их экспрессии. Рекомбинантный вирус, содержащий С-концевую делецию в гене *NS*, индуцировал паттерн экспрессии клеточных мРНК, промежуточный между вирусом дикого типа и вирусом, полностью нокаутным по NS1. В дальнейшем было показано, что на клеточный ответ на ВГА-инфекцию значительное влияние оказывает последовательность гена *NS* [44].

В процессе подготовки к написанию обзора мы повторили вышеприведенный эксперимент на клетках A549, инфицированных wtNS- и ΔNS-вирусами [45], с использованием современных микрочипов SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K v2 («Agilent», США), позволяющих проводить анализ экспрессии более 32 000 аннотированных генов, псевдогенов и некодирующих РНК. При обработке результатов анализа оставили только гены, экспрессия которых изменилась более чем в 2 раза (\log_2 FC больше +1 или меньше -1). Экспрессия 129 генов возрастала только в случае заражения вирусом ΔNS, 66 генов оказались специфичными для вируса

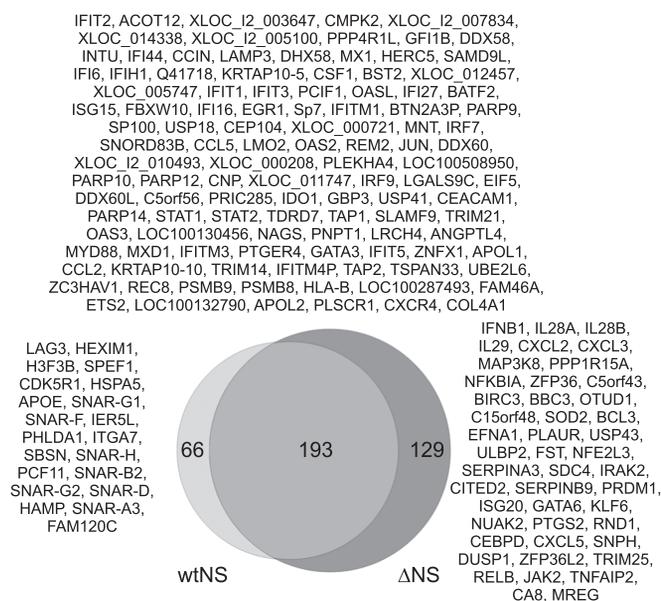


Рис. 3. Дифференциальная экспрессия генов клеток A549, инфицированных wtNS- и ΔNS-вирусами. Показаны гены, число транскриптов для которых увеличилось (значения \log_2 FC больше +2) по сравнению с контрольными клетками.

wtNS, при этом экспрессия 193 генов увеличивалась в случае обоих вирусов (рис. 3).

Анализ генной онтологии (GO) генов, уровень мРНК которых увеличился в ответ на вирусное заражение, проведенный в программе PANTHER Reactome [46, 47], показал, что большая их часть ожидаемо принадлежала путям, задействованным в активации врожденного противовирусного ответа.

В случае заражения ΔNS-вирусом активировалась экспрессия 129 генов. Среди них следует отметить гены *ИФН-β1* и *ИФН-α*, *ИФН-λ1*, *ИФН-λ2*, *ИФН-λ3* (*ИЛ-29*, *ИЛ-28A* и *ИЛ-28B* соответственно), играющие ключевую роль в противовирусной защите в эпителиальных тканях [48]; иммунорегуляторных и воспалительных хемокинов и их рецепторов CXCL2, CXCL3; митоген-активируемой киназы MAP3K8, активирующей NFκB, ФНО-α, ИЛ-2, ИЛ-8; ингибитора NFκBα; регуляторной субъединицы 15 протеинфосфатазы 1 (PPP1R15A); участвующего в противовоспалительном ответе фактора ZFP36.

В случае wtNS-вируса большая часть генов не классифицировалась согласно GO-анализу. Можно было только выделить гены, участвующие в регуляции HSF1-опосредованного ответа на тепловой шок: *HSPA5*, *HSPA1B* и *HSPA1A* (семейство А белков теплового шока Hsp70), DNAJB1 (белок теплового шока семейства Hsp40) и BAG3 (ингибитор шапероновой активности Hsc70/Hsp70). В литературе была показана возможность взаимодействия вышеприведенных белков теплового шока с NS1 [49, 50]. Кроме того, в случае wtNS-вируса обнаружили увеличение уровня транскриптов некодирующих РНК SNAR: G1, H, F, B2, G2, D и A3. Эти РНК ассоциированы с ядерным белком ILF3/NF90, в частности активирующим экспрессию ИЛ-2 в Т-клетках. Недавно было показано, что NF90 является противовирусным фактором, регулирующим активацию PKR и образование стресс-гранул в ВГА-инфицированных клетках [51].

Штамм	РНК-связывающий домен (RBD) 1-73 нукл																Линкерный домен 74-87 нукл													
	3	4	6	18	21	22	23	25	26	27	41	44	48	53	55	56	59	60	63	67	70	74	76	77	80	81	82	84	86	87
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	S	N	V	V	R	F	A	Q	E	L	K	R	S	D	E	T	R	A	Q	R	K	D	A	L	T	I	A	V	A	S
A/Memphis/10/1983 (H1N1)	P	.	.	.	Q	V	K	C	V	M	.	A	.	.	
A/Malaysia/11641/1997 (H1N1)	.	H	.	.	Q	V	.	D	.	.	K	.	N	.	.	C	V	F	.	M	.	A	.	.
A/Taiwan/1/64 (H2N2)	Q	V	V	A	V	M	.	A	.	.	
A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2)	Q	V	V	N	.	A	V	M	.	A	.	.	
A/Oregon/02/2016 (H3N2)	.	.	.	I	Q	V	V	.	K	.	R	.	N	.	K	A	H	V	.	K	M	V	T	.	.	
A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical)	.	.	.	I	.	.	.	N	G	.	.	K	.	N	.	.	L	.	W	.	N	T	S	.	
A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple)	.	.	.	I	.	.	.	N	G	.	.	K	N	.	.	L	V	.	W	.	S	T	T	.	
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	.	.	M	I	.	.	.	N	G	.	.	K	N	.	.	L	V	.	W	.	S	T	T	.	
A/swine/England/195852/1992 (Eurasian)	W	G	.	.	.	N	E	.	P	.	.	.	E	
A/Vietnam/CL01/2004 (avian)	N	E	

Штамм	Эффекторный домен (ED) 88-203 нукл																													
	91	95	98	103	106	108	111	112	114	117	119	123	125	127	129	135	139	143	145	164	166	171	172	178	179	180	189	196	197	198
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	T	L	M	F	M	K	V	A	S	I	M	I	D	N	I	S	D	T	I	P	L	D	E	V	G	V	D	E	T	L
A/Memphis/10/1983 (H1N1)	.	I	P	V	N	.	I	K	.	.	
A/Malaysia/11641/1997 (H1N1)	.	I	P	V	T	.	N	.	I	
A/Taiwan/1/64 (H2N2)	.	I	L	.	.	.	E	P	.	I	.	.	.	M	I	.	I	K	.	.	
A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2)	.	I	L	.	.	.	E	P	.	I	.	.	.	M	I	.	I	K	.	.	
A/Oregon/02/2016 (H3N2)	.	T	L	.	.	.	E	P	.	.	.	E	S	M	N	.	.	V	.	F	I	.	I	.	.	.	K	N	.	
A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical)	A	.	.	.	R	.	.	V	.	E	L	G	.	N	.	
A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple)	A	.	.	.	R	I	T	.	V	.	E	G	.	N	.	
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	S	.	.	.	R	I	I	P	V	L	V	E	.	V	.	N	G	.	N	I	
A/swine/England/195852/1992 (Eurasian)	T	I	.	.	K	A	.
A/Vietnam/CL01/2004 (avian)	T	G	.	I	I	.

Штамм	С-концевой домен 204-237 нукл															
	205	206	207	209	211	212	213	214	215	217	221	224	226	227	228	229
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	S	S	N	N	R	P	P	L	P	K	K	R	I	K	S	E
A/Memphis/10/1983 (H1N1)	T	R	.	.	.
A/Malaysia/11641/1997 (H1N1)	.	.	.	G	.	F	T	T	.	G	.	R
A/Taiwan/1/64 (H2N2)	T	R	.	K	.	.
A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2)	T	.	.	.	V	R	.	K	.	.
A/Oregon/02/2016 (H3N2)	.	.	.	G	.	.	T	.	E	K	A	R
A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical)	.	R	E	-	-	-	-	-	-	-	-
A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple)	N	R	.	D	.	S	.	E	-	-	-	-	-	-	-	-
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	N	C	D	.	.	S	.	E	-	-	-	-	-	-	-	-
A/swine/England/195852/1992 (Eurasian)	.	I	.	D	.	.	F	G	P	.	.	.
A/Vietnam/CL01/2004 (avian)	.	.	D	D	.	L	.	.	.	N	.	.	.	E	.	.

Рис. 5. Аминокислотные замены в белке NS1 штаммов ВГА человека и свиньи, относящихся к различным филогенетическим линиям. Представленные штаммы относятся к следующим клейдам гена NS: A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1) — NS₁₉₁₈; A/Memphis/10/1983 (H1N1), A/Malaysia/11641/1997 (H1N1) — NS_{H1N1}; A/Taiwan/1/64 (H2N2) — NS_{H2N2}; A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2), A/Oregon/02/2016 (H3N2) — NS_{H3N2}; A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical) — NS_{class}; A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple) — NS_{tri}; A/California/14/2009 (H1N1pdm09) — NS_{pdm09}; A/swine/England/195852/1992 (Eurasian) — NS_{eursw}; A/Vietnam/CL01/2004 — NS_{av}.

однако она сохранилась только для клейда NS_{H1N1}, а в клейдах NS_{H2N2} и NS_{H3N2} произошла обратная замена K44R. Примечательно, что такая же замена R44K появилась в NS_{class} в 1971 г. и сохранилась в NS_{tri} и NS_{pdm09}. Остальные а.о., образующие РНК-связывающий сайт, в процессе эволюции не изменялись.

Область, отвечающая за димеризацию RBD, образована шестью аминокислотами в положениях 12, 19, 29, 32, 35 и 46 [64, 65]; эти аминокислоты являются абсолютно консервативными среди всех изучаемых последовательностей.

В области 21—23 а.о. мутации произошли только в NS_{hum_ori}. По сравнению с предковой последовательностью NS₁₉₁₈ в NS_{hum_ori} присутствовали замены R21Q (с 1948 г.) и F22V. Кроме того, в NS_{H2N2} с 1960 г. появилась замена A23V, которая сохранилась и для NS_{H3N2}. Эта область соответствует С-концевому фрагменту α-спирали (2—25) RBD.

Для всех NS_{hum_ori} начиная с 1940 г. и NS_{sw_ori} начиная с 1978 г. наблюдается замена A60V. В NS_{eursw} и NS_{av} встречается спорадическая замена A60E. Замена в 60-м положении не соответствует ни одному из известных функциональных доменов NS1 и приходится на область α-спирали (54—70).

Для NS_{sw_ori} выявлены следующие замены: V18I, Q25N, R59L и R67W (все с 1957 г.), а также E26G (с 1966 г.) и R44K (с 1971 г.). Все эти замены сохранились и в NS_{pdm09}. Кроме того, для NS_{pdm09} были описаны замены V6M, D2E (с 2015 г.) и E55K (с 2013 г.). Все эти замены за исключением R44K расположены за пределами функциональных сайтов и приходятся на области α-спиралей.

Междоменная линкерная область.

За RBD следует подвижная междоменная линкерная область длиной 13 а. о., соединяющая RBD и ED NS1 [32]. Для вирусов H5N1 в линкерной области описана делеция

Структурные и функциональные домены и сайты в белке NS1 ВГА

Домен	Длина, а.о.	А.о.	Описание	Ссылка
РНК-связывающий домен (RBD)	73	1—73	N-концевой RBD отвечает за связывание с молекулами РНК и взаимодействие с RIG-I (через днРНК, РABPI и импортин- α)	[5, 61, 62]
РНК-связывающий сайт	13	5, 29, 31, 34, 35, 37, 38, 41, 42, 44, 45, 46, 49	Несколько а.о. вносят вклад в эффективное связывание днРНК белком NS1, но только R38 является абсолютно необходимой	[62, 65, 92]
Интерфейс с димеризацией RBD	6	12, 19, 29, 32, 35, 46	Димеризация RBD необходима для реализации РНК-связывающей активности	[64, 65]
Сигнал ядерной локализации 1 (NLS1)	3	35, 38, 41	А.о. в положениях 35, 38 и 41 играют ключевую роль в функционировании NLS1 и необходимы для связывания импортин- α	[28, 63]
Детерминанта вирулентности; тканевой тропизм	1	42	Введение замены Р42S из вируса A/Duck/Guangxi/27/03 в A/Duck/Guangxi/12/03 увеличивало вирулентность по показателям летальности у мышей и системному распространению инфекции. Эта замена также влияет на ИФН-путь	[93]
Междоменный линкер	13	74—86	Подвижный линкер между RBD и ED. Может варьироваться по длине. Делеция 5 а.о. часто встречается в современных изолятах вирусов H5N1	[32]
Детерминанта вирулентности	5	80—84	Введение искусственной делеции из 15 нуклеотидов в рекомбинантном вирусе A/WSN/33/(H1N1) x A/Duck/Shangdong/093/2004 (H5N1) (HA,NA) привело к увеличению вирулентности у мышей	[7, 66]
Сайт взаимодействия с eIF4GI	33	81—113	Взаимодействие NS1 с eIF4GI может приводить к предпочтительной трансляции вирусных мРНК	[94]
Эффекторный домен (ED)	117	87—203	ED опосредует взаимодействия с несколькими клеточными белками и может стабилизировать RBD	[5, 32, 75, 81]
Сайт связывания p85b-PI3K	20	87, 89, 91, 95, 96, 98, 99, 101, 118, 133, 135, 142, 143, 145, 146, 148, 159, 161, 162, 164	Связывание NS1 с p85b-PI3K приводит к активации PI3K-сигналинга, необходимой для эффективной вирусной репликации, вероятно, по механизму предотвращения апоптоза клеток хозяина или повышения активности натриевых каналов	[35, 38, 68—70]
Детерминанты патогенности; детерминанты вирулентности	5	90—94	Делеция 5 аминокислот, расположенных внутри области eIF4GI-связывающего домена NS1, увеличивает вирулентность и патогенность вирусов H5N1	[67]
Детерминанты вирулентности	10	90—99	Укорочение eIF4GI-связывающего домена аттенуирует вирусную репликацию <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	[67]
Детерминанта патогенности	1	92	Внесение замены E92D в вирусе A/HK/156/97 усилило устойчивость к цитокинам	[7]
Сайт взаимодействия с TRIM-25	2	96, 97	Сайт необходим для взаимодействия с TRIM-25 и ингибирования RIG-I; важен для активации PI3K (вероятно, осуществляя прямой контакт с петлей активации p110 [70])	[71]
Детерминанта вирулентности	1	101	Вирулентность штаммов НК156 у мышей определяется аминокислотными заменами в HA (211), PB1 (456 and 712), PA (631), NP (127) и NS1 (101)	[71]
Тканевой тропизм; детерминанты вирулентности	2	103, 106	Введение замен L103F и I106M в вирусе A/HK/483/1997 усилило вирулентность по сравнению с вирусом дикого типа по показателю летальности у мышей	[72, 73]
Сайт связывания CPSF30	28	103, 105—110, 117, 119—126, 151, 153, 155—157, 180, 181, 183, 184, 187—189	Необходим для связывания CPSF30 и ингибирования посттранскрипционного 3'-концевого процессинга клеточных пре-мРНК	[74—78]
Сайт димеризации ED	17	106, 108—110, 117, 119, 121, 124, 179—181, 183, 184, 186—189	Структура двух петель ED консервативна во всех кристаллических моделях апо-ED, хотя ее физиологическая значимость неизвестна. W187 существенен для ED-димеризации <i>in vitro</i>	[70, 81]
Сайт связывания PKR	4	123, 124, 126, 127	Необходим для взаимодействия с PKR, приводящего к ингибированию фосфорилирования eIF2 α	[79]
Детерминанта патогенности	1	125	Мутация D125G вызывает высокую патогенность у мышей на последнем пассаже I0 и также вызывает усиленную способность к связыванию α 2,3- и α 2,6-сиаловых рецепторов	[80]
Сигнал ядерного экспорта (NES)	11	137—147	L144 и L146 существенны для активности NES	[30]
Сайт маскирования NES	14	148—161	Последовательность сайта ингибирует активность NES. R148, E152 и E153 критичны для функционирования данного сайта	[30]
Детерминанта патогенности	1	171	Мутация A171Y приводит к снижению экспрессии ИФН и ИФН-стимулируемых генов в клетках A549	[95]

Продолжение табл. см. на стр. 254

REVIEWS

Подвижный хвостовой домен	27	204—230	Подвижный хвост, вероятно, является неструктурированным и варибельным по длине. Он содержит ряд мотивов, в том числе CDK/ERK фосфорилирования, Crk/CrkL-SH3 связывания, PDZ-лиганд и NoLS/NLS2	[81]
Детерминанты патогенности	2	200, 205	А.о. в положениях 200 и 205 NS1 вносят вклад в повышенную ИФН типа I антагонистическую активность. Аминокислотные отличия в положениях 134 HA, 200 и 205 NS1, 47 и 51 NS2 вызывают разницу в вирулентности между высоко- и низкопатогенными вирусами H5N1	[82]
Сайт связывания Crk/CrkL-SH3	4	212, 214, 215, 217	Необходим для связывания с Crk/CrkL. Мотив связывания Crk/CrkL-SH3 часто встречается в штаммах ВГА птиц, а также в пандемическом вирусе человека 1918 г.	[83]
Сайт фосфорилирования	6	213—217, 219	Thr215 фосфорилируется киназами CDKs/ERKs. Необходим для эффективной вирусной репликации в культуре тканей	[84]
Сигнал ядерной локализации 2 (NLS2)	6	219, 220, 224, 229, 231, 232	Эти основные а.о. существенны для функционирования NLS2 и требуются для связывания импортина- α . Эти же а.о. формируют сигнал нуклеолярной локализации (NoLS) у некоторых штаммов	[28, 63]
Сайт связывания PABPII	15	223—237	Соответствует PABPII-связывающей области NS1. Может быть вовлечен в ингибирование посттранскрипционного 3'-концевого процессинга клеточных пре-мРНК	[85, 86]
Тканевой тропизм; клинические симптомы заболевания	5	226—230	Встраивание этого мотива в С-концевую область NS1 вируса A/WSN/33 приводило к существенному снижению массы животных по сравнению с вирусом дикого типа. Вирус вызывал тяжелый альвеолит и геморрагию в тканях легких мышей	[39]
Мотив PDZ-лиганда	4	227—230	Связывает PDZ-домен-содержащие белки. С-концевой PDZ-связывающий мотив обнаруживается преимущественно в птичьих изолятах (обычные варианты включают ESEV/EPEV/KSEV у ВГА птиц)	[39, 87—90]
С-концевое расширение	7	231—237	Функция неизвестна, но оно может вносить вклад в NoLS/NLS2. Мотив превалировал среди вирусов, выделенных с 1950 по 1987 г.	[63]

участка 80—84 а.о., которая, вероятно, нарушает ориентацию и/или стабильность RBD, что приводит к увеличению устойчивости к цитокинам и усилению вирулентности [66]. В этой области в NS_{hum ori} присутствует замена I81M. Кроме того, с 1940 г. выявлена замена V84A, которая сохранилась в NS_{H1N1} и NS_{H2N2}, однако в NS_{H3N2} с 1971 г. произошла замена A84T. Для NS_{sw ori} характерны замены в двух сайтах: A76T и A86S (NS_{classw}) и A86T (NS_{ori} и NS_{pdm09}). Кроме того, для NS_{pdm09} была описана замена K78R.

Эффекторный домен.

За линкерной областью следует протяженный ED, который осуществляет взаимодействие с ядерными белками клетки-хозяина и отвечает за ядерно-цитоплазматический транспорт зрелых мРНК в инфицированных клетках [5].

С 81-го по 113-й а.о. NS1 локализован сайт взаимодействия с фактором трансляции eIF4G1, связывание с которым приводит к преимущественной трансляции с вирусными мРНК [67]. Вышеописанные замены в 81, 84 и 86-м положениях линкерной области NS1, как и замены в положениях 90, 91, 95, 98, 108, 111 и 112 (см. далее), приходятся именно на сайт взаимодействия с eIF4G1. Мотив, отвечающий за связывание с фактором eIF4G1, перекрывается с рядом сайтов.

К ним относится сайт, отвечающий за связывание с белком и активацию PI3K сигнального пути, которые обеспечивают эффективную репликацию, вероятно, по механизму задержки апоптоза инфицированных клеток или увеличение активности натриевых каналов. В состав P85 β -PI3K-связывающего сайта входят а.о. в положениях 87, 89, 91, 95, 96, 98, 99, 101, 118, 133, 135, 142, 143, 145, 146, 148, 159, 161, 162, 164 [35, 38, 68—70]. В области сайта взаимодействия с eIF4G1 и P85 β в NS_{sw ori} появилась мутация в 91-м положении — T91A,

при этом в NS_{pdm09} произошла замена A91S. В NS_{hum ori} с 1940 г. наблюдалась замена L95I. Однако в NS_{H1N1} с 2001 г. появилась замена I95V, в NS_{H3N2} — I95T с 1975 г. В NS_{H2N2} после 1961 г. произошла замена M98L, которая далее сохранилась в последовательностях клейда NS_{H3N2}.

Ключевую роль в патогенности вирусов играет участок 90—94 а.о. домена связывания с eIF4G1. Показано, что делеция этих 5 а.о. приводит к увеличению вирулентности и патогенности вирусов H5N1 [67]. Для NS_{H3N2} с 1971 г. в этом участке присутствует замена L90I. В NS_{ori} также встречается замена L90I примерно в половине штаммов, при этом замена L90I коррелирует с заменой K70R. Для NS_{pdm09} замена L90I присутствует с 2012 г.

В 92-м положении NS1 описана мутация D92E, определяющая устойчивость к цитокинам и снижающая эффективность фосфорилирования NS1 [7]. Такую мутацию обнаружили только для последовательностей NS_{av} вирусов птичьего происхождения.

В положениях 96 и 97 NS1 находятся а.о., отвечающие за взаимодействие с белком TRIM-25, которое обеспечивает ингибирование RIG-I [71]. Эти же а.о. существенны для активации PI3K, вероятно, осуществляемой за счет прямого контакта с петлей активации p110 [70]. Замен в этих положениях среди анализируемых последовательностей не обнаружено.

В 101-м положении NS1 находится а.о., замена которого в совокупности с заменами в HA (211), PB1 (456 и 712), PA (631), NP (127) может приводить к усилению вирулентности [71]. Замена D101N присутствует в NS_{H3N2} с 1980 г.

В 103-м и 106-м положениях NS1 расположены аминокислоты, замены которых (F103L и M106I) также могут приводить к увеличению вирулентности [72, 73].

При анализе данных а.о. отличия были обнаружены только для последовательностей NS_{av} и штамма A/Puerto Rico/8/34 (F103S и M106I).

Далее по последовательности NS1 расположен мотив связывания фактора CPSF30, связывание с которым приводит к ингибированию посттранскрипционного 3'-концевого процессинга клеточных пре-мРНК [74–78]. Он включает а.о. в положениях 103, 105–110, 117, 119–126, 151, 153, 155–157, 180, 181, 183, 184, 187–189.

Много замен приходится на область 108–119 а.о., часть из них затрагивает сайт связывания с CPSF30. В NS_{sw_ori} с 1971 г. одновременно появились замены K108R и I117V. Замена I117V произошла и в последовательностях клейда NS_{H1N1} в 1980 г. В NS_{H2N2} с 1960 г. закрепились замена M119I, которая передалась последовательностям NS_{H3N2}, но с 1977 г. в них произошла обратная замена I119M.

Область 123–127 а.о. отвечает за взаимодействие с PKR, приводящее к ингибированию фосфорилирования eIF2 α [79]. В NS_{H3N2} (после 1977 г.) и NS_{sw_ori} в этой области присутствует замена D125E, в NS_{pdm09} с 2013 г. произошла обратная замена E125D. По данным работы [80] замена G125D приводит к высокой патогенности у мышей и усиливает сродство к α 2,3- и α 2,6-сиаловым рецепторам.

В последовательностях NS1 всех изучаемых вирусов, кроме вирусов птичьего происхождения, присутствует замена S114P. В NS_{H2N2} после 1960 г. появилась замена A112E, которая сохранилась в клейде NS_{H3N2}. Эти замены не соответствуют никаким функциональным сайтам и находятся на стыке двух β -нитей (107–112 и 115–120). Однако сопоставление пространственной структуры соответствующих участков NS1 вирусов H1N1 и H5N1 показало отсутствие каких-либо изменений пространственной структуры прилегающих β -нитей. В NS_{H2N2} появилась замена I129M, сохранившаяся и в NS_{H3N2}. Кроме того, в этом же положении появилась замена I129V в NS_{pdm09}.

Далее по последовательности NS1 следует NES, расположенный между 137-м и 147-м а.о. [30]. Ключевая роль в NES принадлежит L144 и L146, которые обычно маскируются близлежащим участком 148–161 а.о., в котором критически важны R148, E152 и E153. В 144-м положении в NS_{H3N2} в 1995 г. появилась замена L144I, в остальных NS_{hum_ori} других значимых замен в 144-м и 146-м положениях нет. В NS_{sw_ori} с 1977–1979 г. присутствует замена D139N, характерная и для NS_{av}, однако она не затрагивает ключевые аминокислоты NES.

Кроме того, в области NES есть замена I145T, появившаяся с 1985 г. в NS_{H1N1}, и I145V, появившаяся с 1979 г. в NS_{H3N2}. А.о. в 145-м положении соответствуют одному из а.о., образующих сайт связывания P85 β , который перекрывается с NES. Далее по последовательности NS1 нет значимых замен в сайте связывания P85 β .

Область маскирования NEP перекрывается с аминокислотами в 151, 153, 155–157-м положениях, входящими в состав сайта связывания CPSF30, однако в этой области замен нет. Оставшаяся часть сайта связывания CPSF30 расположена в области 180–189 а.о., в которой есть одна замена D189G в NS_{sw_ori}.

В NS_{H1N1} присутствует замена D171N, а в NS_{H2N2} с 1960 г. и в NS_{H3N2} — N171I. Этот сайт является варибельным, так как в нём есть замены и в остальных клейдах. Для всех NS_{hum_ori} после 1935 г. имеется замена V178I. Такая

же замена V178I обнаружена у всех последовательностей NS_{av} и NS_{eursw}, но не NS_{sw_ori}. Эти замены приходится на область α -спирали (170–188).

В клейде NS_{hum_ori} присутствует замена E196K с 1940 г., однако в NS_{H1N1} с 1987 г. произошла обратная замена K196E. В NS_{sw_ori} и NS_{H3N2} после 1985 г. появилась замена T197N. А.о. в этих двух положениях находятся рядом с потенциальным сайтом фосфорилирования S195, замена которого приводит к задержке NS1 в ядре. У всех изученных вирусов замены в 195-м положении нет.

Неструктурированный С-концевой домен.

Далее с 204-го по 230-й а.о. следует подвижный С-концевой домен переменной длины. Он содержит ряд мотивов, таких как сайты CDK/ERK фосфорилирования, Crk/CrkL-SH3 связывания, PDZ-лиганд и NoLS/NLS2 [81].

Аминокислоты в 200-м и 205-м положениях NS1 вместе с 134-м а.о. HA и 47-м и 51-м а.о. NEP вносят вклад в повышенную активность антагониста ИНФ I типа, обеспечивая разницу в вирулентности между низко- и высокопатогенными вирусами H5N1 [82]. В NS_{tri} и NS_{pdm09} присутствует замена S205N, однако в NS_{pdm09} в 2012 г. произошла обратная замена. В 206-м положении выявлены замены S206R среди NS_{sw_ori} и NS_{tri} и S206C в NS_{pdm09}. Кроме того, в 207-м (у NS_{sw_ori}) и 209-м (кроме NS_{pdm09}) положениях выявлены замены N на D. В NS_{avi} и NS_{sw_ori} таких замен нет.

Далее следует сайт связывания Crk/CrkL-SH3 (212, 214, 215 и 217-й а.о.), характерный для ВГА птиц и вируса 1918 г. [83]. В 215-м положении у всех NS_{hum_ori} присутствует замена P215T. Кроме того, в NS_{sw_ori} появилась замена K217E (с 1957 г.), а в NS_{av} — P212S или P212L. Треонин в 215-м положении фосфорилируется пролинспецифическими киназами, такими как CDK/ERK, узнающими определённый мотив 213–217 и 219-й а.о. [84]. Этот сайт фосфорилирования отсутствует в NS_{sw_ori} (включая NS_{pdm09}) и NS_{av}.

Участок 219–232 а.о. соответствует области NLS2 [28, 63]. В нём ключевую роль играют а.о. в 219, 220, 224, 229, 231 и 232-м положениях. Эти же аминокислоты формируют в некоторых штаммах ВГА NoLS. Участок 219–232 а.о. частично перекрывается с PABPII-связывающим сайтом (223–237 а.о.), который вовлечён в ингибирование посттранскрипционного процессинга 3'-концов клеточных пре-мРНК [85, 86].

Участок 227–230 а.о. является PDZ-лигандом, который связывает белки, содержащие PDZ-домен [39, 87–90]. У всех сезонных штаммов в области PDZ-лиганда присутствует замена K227R, которая приводит к появлению мотива RSEV. Кроме того, для клейдов NS_{H2N2} и NS_{H3N2} в 229-м положении произошла замена E229K (мотив RSKV). Примечательно, что единственным исключением является относящийся к подтипу H3N2 штамм A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2), содержащий мотив RSEV. Таким образом, для клейдов NS_{H2N2} и NS_{H3N2} характерен мотив RSKV. Однако в NS_{H3N2} с 2011–2012 гг. наблюдалась спорадическая замена K229E, которая окончательно зафиксировалась с 2013 г. В клейде NS_{H1N1} присутствует мотив RSEV. В частности, у вируса подтипа H1N1 USSR77 1977 г. присутствует мотив RSEV, как и у последнего вируса H1N1 1957 г. При этом варианты ESEV/EPEV/KSEV являются мотивами для связывания PDZ-домена, а RSKV/RSEV не являются. В NS_{av} имеются мотивы EPEV и ESEV. В NS_{sw_ori} после 1966 г. наблюдается делеция области 220–230 а.о. Такая же делеция спорадически встре-

чается в NS_{tri} и NS_{class}, но не в NS_{pdm09}. В NS_{eursw} также иногда встречается делеция этой области, а также замена K227G в случае, если эта область не удалена.

В сезонных штаммах с 1940 г. стал появляться мотив RRNKMVD, расположенный в области 231—237 а. о. Его функция точно неизвестна, но он предположительно может вносить вклад в NoLS/NLS2 [63]. В этом мотиве периодически возникала замена V236A, которая окончательно зафиксировалась в клейде NS_{H2N2} с 1957 г. Далее в 1960 г. появилась замена N233D, которая сохранилась в клейдах NS_{H2N2} и NS_{H3N2}. Далее мотив RR(N/D)KMAD присутствовал в сезонных вирусах до 1990 г., после чего произошла его делеция.

Заключение

Проведённый анализ аминокислотных замен в структурных и функциональных доменах белка NS1 ВГА человека показывает, что большинство из них оставались консервативными в процессе эволюции в течение последнего столетия. Наблюдаемая консервативность NS1 наряду с данными о том, что делеция открытой рамки считывания NS1 (а также некоторые замены в гене NS) существенно снижает уровень репликации и степень патогенности ВГА, делают этот белок перспективной мишенью для терапии гриппа. При дизайне лекарственных препаратов, направленных на NS1, может быть использовано несколько стратегий. Во-первых, можно блокировать синтез самого белка, например, с помощью малых интерферирующих РНК, направленных на консервативные области гена NS. Во-вторых, можно подбирать соединения (низкомолекулярные соединения, пептиды, ДНК-аптамеры), специфически блокирующие сайты взаимодействия NS1 с ключевыми клеточными и вирусными факторами. В-третьих, в качестве мишеней для терапии гриппа можно рассматривать не сам NS1, а его клеточные белки-партнёры, взаимодействие с которыми необходимо для вирусной репликации. В настоящее время имеется несколько соединений, направленных на белок NS1, для которых показана противовирусная активность *in vitro* и даже *in vivo* [91]. Несмотря на то что большинство таких разработок находится в ранних стадиях, не вызывает сомнения, что данное направление будет активно развиваться в ближайшее время.

Финансирование. Данная работа выполнена при финансовой поддержке РФФ грант № 15-15-00170, а также при финансовой поддержке РФФИ грант № 16-34-01110.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—15, 17—44, 46—101 см. REFERENCES)

16. Киселёв О.И. *Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1v—2009*. СПб.-М.: Димитрейд График Групп; 2011.
45. Плотникова М.А., Васин А.В., Клотченко С.А., Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Егоров В.В. и др. Сравнение паттерна экспрессии мРНК цитокинов в эпителиальных клетках A-549, инфицированных вирусами гриппа A/H1N1pdm09, A/H3N2 и A/H5N1. *Цитокины и воспаление*. 2013; (12): 57—65.

REFERENCES

1. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol.* 1992; (56): 152—79.
2. Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell. Host. Microbe*. 2010; (7): 440—51.

3. Noronha J.M., Liu M., Squires R.B., Pickett B.E., Hale B.G., Air G.M., et al. Influenza virus sequence feature variant type analysis: evidence of a role for NS1 in influenza virus host range restriction. *J. Virol.* 2012; (86): 5857—66.
4. Egorov A., Brandt S., Sereinig S., Romanova J., Ferko B., Katinger D., et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 1998; (72): 6437—41.
5. Hale B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 2008; (89): 2359—76.
6. Marc D. Influenza virus non-structural protein NS1: Interferon antagonism and beyond. *J. Gen. Virol.* 2014; (95): 2594—611.
7. Seo S.H., Hoffmann E., Webster R.G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat. Med.* 2002; (8): 950—4.
8. Taubenberger J.K., Morens D.M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; (12): 15—22.
9. Morens D.M., Taubenberger J.K., Harvey H.A., Memoli M.J. The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. *Crit. Care Med.* 2010; (38): e10—e20.
10. Smith G.J.D., Bahl J., Vijaykrishna D., Zhang J., Poon L.L.M., Chen H., et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; (106): 11709—12.
11. Xu J., Zhong H.A., Madrahimov A., Helikar T., Lu G. Molecular phylogeny and evolutionary dynamics of influenza A nonstructural (NS) gene. *Infect. Genet. Evol.* 2014; (22): 192—200.
12. Vasin A.V., Petrova A.V., Egorov V.V., Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Karpenko M.N., et al. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure. *BMC Res. Notes*. 2016; (9): 279.
13. Vincent A., Awada L., Brown L., Chen H., Claes F., Dauphin G., et al. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. *Zoonoses Public Health*. 2014; (61): 4—17.
14. Trifonov V., Khiabani H., Rabadan R. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 115—9.
15. Nakajima K., Desselberger U., Palese P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*. 1978; 274: 334—9.
16. Kiselev O.I. *Genome of Pandemic Influenza A / H1N1v virus—2009 [Genom pandemicheskogo virusa grippa A/H1N1v—2009]*. St. Petersburg-Moscow: Dimitreyd Grafik Grupp; 2011. (in Russian)
17. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325: 197—201.
18. Komadina N., McVernon J., Hall R., Leder K. A Historical Perspective of Influenza A(H1N2) Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; (20): 6—12.
19. Gaydos J.C., Top F.H., Hodder R.A., Russell P.K. Swine influenza A outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; (12): 23—8.
20. de Wit E., Munster V.J., van Riel D., Beyer W.E.P., Rimmelzwaan G.F., Kuiken T., et al. Molecular determinants of adaptation of highly pathogenic avian influenza H7N7 viruses to efficient replication in the human host. *J. Virol.* 2010; (84): 1597—606.
21. Vasin A.V., Temkina O.A., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Plotnikova M.A., Kiselev O.I. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res.* 2014; 185: 53—63.
22. Garcia-Sastre A., Egorov A., Matassov D., Brandt S., Levy D.E., Durbin J.E., et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*. 1998; 252: 324—30.
23. Robb N.C., Jackson D., Vreede F.T., Fodor E. Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 2010; 91: 2331—40.
24. Chua M.A., Schmid S., Perez J.T., Langlois R.A., and Tenover B.R. Influenza A virus utilizes suboptimal splicing to coordinate the timing of infection. *Cell Rep.* 2013; (3): 23—9.
25. Paterson D., Fodor E. Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLoS Pathog.* 2012; 8(12): e1003019.
26. Shaw M.L., Stone K.L., Colangelo C.M., Gulcicek E.E., Palese P. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog.* 2008; (4): 1—13.
27. Hutchinson E.C., Charles P.D., Hester S.S., Thomas B., Trudgian D.,

- Martinez-Alonso M., et al. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat. Commun.* 2014; (5): 4816.
28. Greenspan D., Palese P., Krystal M. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J. Virol.* 1988; 62: 3020—6.
 29. Schneider J., Wolff T. Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: Do they play a role in viral mRNA export? *Vaccine.* 2009; 27: 6312—6.
 30. Li Y., Yamakita Y., Krug R.M. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 4864—9.
 31. Boulo S., Akarsu H., Ruigrok R.W.H., Baudin F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* 2007; 124: 12—21.
 32. Bornholdt Z.A., Prasad B.V.V. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006; (13): 559—60.
 33. Carrillo B., Choi J.-M., Bornholdt Z.A., Sankaran B., Rice A.P., Prasad B.V.V. The influenza A virus protein NS1 displays structural polymorphism. *J. Virol.* 2014; 88: 4113—22.
 34. Hale B.G. Conformational plasticity of the influenza A virus NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(Pt. 10): 2099—105.
 35. Shin Y.K., Li Y., Liu Q., Anderson D.H., Babiuk L.A., Zhou Y. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation. *J. Virol.* 2007; 81: 12730—9.
 36. Li Y., Anderson D.H., Liu Q., and Zhou Y. Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85 β , but not the p85 α , subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 23397—409.
 37. Ehrhardt C., Ludwig S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell. Microbiol.* 2009; (11): 863—71.
 38. Ehrhardt C., Wolff T., Pleschka S., Planz O., Beermann W., Bode J.G., et al. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J. Virol.* 2007; 81: 3058—67.
 39. Jackson D., Hossain M.J., Hickman D., Perez D.R., Lamb R.A. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105: 4381—6.
 40. Golebiewski L., Liu H., Javier R.T., Rice A.P. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *J. Virol.* 2011; 85: 10639—48.
 41. Bavagnoli L., Dundon W.G., Garbelli A., Zecchin B., Milani A., Parakkal G., et al. The PDZ-ligand and Src-homology type 3 domains of epidemic avian influenza virus NS1 protein modulate human Src kinase activity during viral infection. *PLoS One.* 2011; (6): 1—12.
 42. Peng X., Chan E.Y., Li Y., Diamond D.L., Korth M.J., Katze M.G. Virus-host interactions: from systems biology to translational research. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009; (12): 432—8.
 43. Geiss G.K., Salvatore M., Tumpey T.M., Carter V.S., Wang X., Basler C.F., et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 10736—41.
 44. Kash J.C., Tumpey T.M., Proll S.C., Carter V., Perwitasari O., Thomas M.J., et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature.* 2006; 443: 578—81.
 45. Plotnikova M.A., Vasin A.V., Klotchenko S.A., Smirnova T.D., Danilenko D.M., Egorov V.V., et al. Comparison of the cytokine mRNA expression pattern in epithelial cells A-549 infected with the influenza viruses A / H1N1pdm09, A / H3N2 and A / H5N1. *Tsitokiny i vospalenie.* 2013; (12): 57—65. (in Russian)
 46. Mi H., Huang X., Muruganujan A., Tang H., Mills C., Kang D., et al. PANTHER version 11: Expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: D183—9.
 47. Fabregat A., Sidiropoulos K., Garapati P., Gillespie M., Hausmann K., Haw R., et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: D481—7.
 48. Davidson S., McCabe T.M., Crotta S., Gad H.H., Hessel E.M., Beinke S., et al. IFN λ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFN α treatment. *EMBO Mol. Med.* 2016; (8): 1099—112.
 49. Shimizu K., Iguchi A., Gomyou R., Ono Y. Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. *Virology.* 1999; 88: 14078—9.
 50. Cao M., Wei C., Zhao L., Wang J., Jia Q., Wang X., et al. DnaJA1/Hsp40 Is Co-Opted by Influenza A Virus To Enhance Its Viral RNA Polymerase Activity. *J. Virol.* 2014; 254: 213—9.
 51. Li T., Li X., Zhu W.F., Wang H.Y., Mei L., Wu S.Q., et al. NF90 is a novel influenza A virus NS1-interacting protein that antagonizes the inhibitory role of NS1 on PKR phosphorylation. *FEBS Lett.* 2016; 590(16): 2797—810.
 52. Downey J., Pernet E., Coulombe F., Allard B., Meunier I., Jaworska J., et al. RIPK3 interacts with MAVS to regulate type I IFN-mediated immunity to Influenza A virus infection. *PLoS Pathog.* 2017; (13): e1006326.
 53. Thulasi Raman S.N., Zhou Y. Networks of Host Factors that Interact with NS1 Protein of Influenza A Virus. *Front. Microbiol.* 2016; (7): 654.
 54. Zhang C., Yang Y., Zhou X., Yang Z., Liu X., Cao Z., et al. The NS1 protein of influenza A virus interacts with heat shock protein Hsp90 in human alveolar basal epithelial cells: Implication for virus-induced apoptosis. *Virology.* 2011; (8): 181.
 55. Wang L., Fu B., Li W., Patil G., Liu L., Dorf M.E., et al. Comparative influenza protein interactomes identify the role of plakophilin 2 in virus restriction. *Nat. Commun.* 2017; (8): 13876.
 56. de Chasse B., Aublin-Gex A., Ruggieri A., Meyniel-Schicklin L., Pradezynski F., Davoust N., et al. The Interactomes of Influenza Virus NS1 and NS2 Proteins Identify New Host Factors and Provide Insights for ADAR1 Playing a Supportive Role in Virus Replication. *PLoS Pathog.* 2013. (9): e1003440.
 57. Shapira S.D., Gat-Viks I., Shum B.O.V., Dricot A., de Grace M.M., et al. A Physical and Regulatory Map of Host-Influenza Interactions Reveals Pathways in H1N1 Infection. *Cell.* 2009; 139: 1255—67.
 58. Ayllon J., Garcia-Sastre A. The ns1 protein: A multitasking virulence factor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 386: 73—107.
 59. Calderone A., Licata L., Cesareni G. VirusMentha: A new resource for virus-host protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: D588—92.
 60. Marc D., Barbachou S., Soubieux D. The RNA-binding domain of influenza virus non-structural protein-1 cooperatively binds to virus-specific RNA sequences in a structure-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 434—49.
 61. Cheng A., Wong S.M., Yuan Y.A. Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res.* 2009; 19: 187—95.
 62. Yin C., Khan J.A., Swapna G.V.T., Ertekin A., Krug R.M., Tong L., et al. Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 20584—92.
 63. Melén K., Kinnunen L., Fagerlund R., Ikonen N., Twu K.Y., Krug R.M., et al. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J. Virol.* 2007; 81: 5995—6006.
 64. Liu J., Lynch P.A., Chien C.Y., Montelione G.T., Krug R.M., Berman H.M. Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat. Struct. Biol.* 1997; (4): 896—9.
 65. Wang W., Riedel K., Lynch P., Chien C.Y., Montelione G.T., Krug R.M. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA.* 1999; 5: 195—205.
 66. Long J.X., Peng D.X., Liu Y.L., Wu Y.T., Liu X.F. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes.* 2008; 36: 471—8.
 67. Zhou H., Zhu J., Tu J., Zou W., Hu Y., Yu Z., et al. Effect on virulence and pathogenicity of H5N1 influenza A virus through truncations of NS1 eIF4GI binding domain. *J. Infect. Dis.* 2010; 202: 1338—46.
 68. Gallacher M., Brown S.G., Hale B.G., Fearn R., Olver R.E., Randall R.E., et al. Cation currents in human airway epithelial cells induced by infection with influenza A virus. *J. Physiol.* 2009; 587: 3159—73.
 69. Hale B.G., Jackson D., Chen Y.-H., Lamb R.A., Randall R.E. Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103:14194—9.
 70. Hale B.G., Kerry P.S., Jackson D., Precious B.L., Gray A., Killip

- M.J., et al. E., and Russell R.J. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase activation by the influenza A virus NS1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107: 1954—9.
71. Gack M.U., Albrecht R.A., Urano T., Inn K.-S., Huang I.-C., Carnero E., et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*. 2009; (5): 439—49.
 72. Spesock A., Malur M., Hossain M.J., Chen L.-M., Njaa B.L., Davis C.T., et al. The virulence of 1997 H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins. *J. Virol.* 2011; 85: 7048—58.
 73. Kuo R.-L., Krug R.M. Influenza A virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells. *J. Virol.* 2009; 83: 1611—6.
 74. Kochs G., García-Sastre A., Martínez-Sobrido L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 2007; 81: 7011—21.
 75. Das K., Ma L.-C., Xiao R., Radvansky B., Aramini J., Zhao L., et al. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105: 13093—8.
 76. Hale B.G., Steel J., Medina R.A., Manicassamy B., Ye J., Hickman D., et al. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 2010; 84: 6909—22.
 77. Noah D.L., Twu K.Y., Krug R.M. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*. 2003; 307: 386—95.
 78. Twu K.Y., Kuo R.-L., Marklund J., Krug R.M. The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *J. Virol.* 2007; 81: 8112—21.
 79. Min J.-Y., Li S., Sen G.C., Krug R.M. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology*. 2007; 363: 236—43.
 80. Narasaraju T., Sim M.K., Ng H.H., Phoon M.C., Shanker N., Lal S.K., et al. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis. *Microbes Infect.* 2009; (11): 2—11.
 81. Hale B.G., Barclay W.S., Randall R.E., Russell R.J. Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain. *Virology*. 2008; 378: 1—5.
 82. Imai H., Shinya K., Takano R., Kiso M., Muramoto Y., Sakabe S., et al. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. *PLoS Pathog.* 2010; (6): e1001106.
 83. Heikkinen L.S., Kazlauskas A., Melén K., Wagner R., Ziegler T., Julkunen I., et al. Avian and 1918 Spanish influenza A virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 5719—27.
 84. Hale B.G., Knebel A., Botting C.H., Galloway C.S., Precious B.L., Jackson D., et al. CDK/ERK-mediated phosphorylation of the human influenza A virus NS1 protein at threonine-215. *Virology*. 2009; 383: 6—11.
 85. Li Y., Chen Z.Y., Wang W., Baker C.C., Krug R.M. The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo. *RNA*. 2001; (7): 920—31.
 86. Chen Z., Li Y., Krug R.M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* 1999; (18): 2273—83.
 87. Ziebecki F., Semmler I., Kalthoff D., Voss D., Mauel S., Gruber A.D., et al. Virulence determinants of avian H5N1 influenza A virus in mammalian and avian hosts: role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. *J. Virol.* 2010; (84): 10708—18.
 88. Soubies S.M., Volmer C., Croville G., Loupias J., Peralta B., Costes P., et al. Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence. *J. Virol.* 2010; (84): 6733—47.
 89. Liu H., Golebiewski L., Dow E.C., Krug R.M., Javier R.T., Rice A.P. The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. *J. Virol.* 2010; 84: 11164—74.
 90. Obenauer J.C., Denson J., Mehta P.K., Su X., Mukatira S., Finkelstein D.B., et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*. 2006; 311: 1576—80.
 91. Engel D.A. The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target. *Antiviral Res.* 2013; 99: 409—16.
 92. Chien C., Xu Y., Xiao R., Aramini J.M., Sahasrabudhe P.V., Krug R.M., et al. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry*. 2004; 43: 1950—62.
 93. Jiao P., Tian G., Li Y., Deng G., Jiang Y., Liu C., et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J. Virol.* 2008; 82: 1146—54.
 94. Aragón T., de la Luna S., Novoa I., Carrasco L., Ortín J., Nieto A. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* 2000; (20): 6259—68.
 95. Plant E.P., Ilyushina N.A., Sheikh F., Donnelly R.P., Ye Z. Influenza Virus NS1 Protein Mutations at Position 171 Impact Innate Interferon Responses by Respiratory Epithelial Cells. *Virus Res.* 2017; 240: 81—6.
 96. Han X., Li Z., Chen H., Wang H., Mei L., Wu S., et al. Influenza virus A/Beijing/501/2009(H1N1) NS1 interacts with β -tubulin and induces disruption of the microtubule network and apoptosis on A549 cells. *PLoS One*. 2012; (7): e48340.
 97. Murayama R., Harada Y., Shibata T., Kuroda K., Hayakawa S., Shimizu K., et al. Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 362: 880—5.
 98. Melén K., Tynell J., Fagerlund R., Roussel P., Hernandez-Verdun D., Julkunen I. Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin. *Viol. J.* 2012; (9): 167.
 99. Kumar M., Liu H., Rice A.P., Noury C., Grant S., Borg J., et al. Regulation of Interferon- β by MAGI-1 and Its Interaction with Influenza A Virus NS1 Protein with ESEV PBM. *PLoS One*. 2012; (7): e41251.
 100. Yu J., Li X., Wang Y., Li B., Li H., Li Y., et al. PDLim2 selectively interacts with the PDZ binding motif of highly pathogenic avian H5N1 influenza A virus NS1. *PLoS One*. 2011; (6): e19511.
 101. Zhao L., Xu L., Zhou X., Zhu Q., Yang Z., Zhang C., et al. Interaction of influenza virus NS1 protein with growth arrest-specific protein 8. *Viol. J.* 2009; (6): 218.

Поступила 18.08.17

Принята в печать 25.08.17