

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Васин Андрей Владимирович

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ И  
ХИМИОТЕРАПИИ ГРИППА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОМНЫХ И  
ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научные консультанты:

Пучкова Людмила Валентиновна  
доктор биологических наук,  
профессор

Киселев Олег Иванович

Академик РАН,  
доктор биологических наук,  
профессор

Санкт-Петербург – 2018

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	20
1.1. Определение и классификация вирусов гриппа .....	20
1.2. Строение и молекулярный состав вириона вируса гриппа типа А ...	21
1.3. Геном и протеом вируса гриппа типа А .....	23
1.3.1. Геном вируса гриппа типа А .....	23
1.3.2. Протеом вируса гриппа типа А .....	26
1.3.3. Вирусные молекулярные факторы патогенности вируса гриппа типа А .....	33
1.3.4. NS1 – ключевой вирусный белок, регулирующий взаимодействия между вирусом и хозяином .....	36
1.4. Молекулярно-биологические механизмы цикла репликации вируса гриппа типа А и роль в них клеточных факторов .....	48
1.4.1. Связывание вируса с клеточной поверхностью .....	48
1.4.2. Вхождение вируса в клетку .....	52
1.4.3. Транскрипция генома вируса гриппа типа А .....	53
1.4.4. Репликация генома вируса гриппа типа А .....	56
1.4.5. Регуляция транскрипции и репликации .....	60
1.4.6. Ядерный экспорт вирусного рибонуклеопротеинового комплекса	63
1.4.7. Сборка и почкование вируса гриппа типа А .....	65
1.5. Молекулярные механизмы реализации врожденного противовирусного иммунного ответа организма-хозяина на вирус гриппа типа А .....	66
1.5.1. Паттерн-распознающие рецепторы, активируемые при инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А .....	67
1.5.2. Активация системы интерферонов I типа .....	75

1.5.3. Стимулируемые интерфероном гены при инфекции, вызванной вирусом гриппа А .....	75
1.6. Патогенез гриппозной инфекции на примере механизма развития острого респираторного дистресс-синдрома .....	79
1.7. Практические аспекты борьбы с гриппом .....	86
1.7.1. Лекарственные препараты для лечения гриппа .....	86
1.7.1.1. Препараты, обладающие противовирусной активностью в отношении вируса гриппа типа А .....	86
1.7.1.2. Неспецифическая терапия гриппа .....	96
1.7.2. Методы диагностики гриппа .....	99
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	104
2.1. Филогенетический анализ .....	106
2.2. Клеточная модель инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А ....	107
2.3. Анализ с помощью экспрессионных микрочипов и секвенирования нового поколения .....	109
2.4. Изучение противовирусной активности siРНК .....	111
2.5. Изучение механизмов ингибирования протеиндисульфидизомеразы..	113
2.6. Разработка олигонуклеотидных микрочипов .....	120
2.7. Мультиплексная ПЦР для детекции цитокинов .....	122
2.8. Статистический анализ .....	123
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	124
3.1. Белок NS1 – перспективная мишень в системе вирус гриппа типа А/клетка-хозяин для разработки средств терапии гриппа .....	124
3.1.1. Анализ эволюционной динамики NS1 вируса гриппа типа А человека .....	125
3.1.1.1. Филогенетический анализ гена NS вируса гриппа типа А человека .....	125

3.1.1.2. Анализ аминокислотных замен в структурных и функциональных сайтах NS1 .....	131
3.1.2. Создание системы поиска связанных с NS1 клеточных мишеней для терапии гриппа и оценки эффективности препаратов против вируса гриппа типа А .....	138
3.1.2.1. Рекомбинантные вирусы гриппа типа А с полноразмерным и укороченным геном NS как модель для изучения роли NS1 .....	138
3.1.2.2. Изучение роли белка NS1 вируса гриппа типа А в индукции цитокинового ответа в клетках A549 .....	142
3.1.2.3. Полногеномный анализ экспрессии генов клеток A549 при инфицировании их wtNS1 и ΔNS1 вирусами гриппа .....	145
Заключение по разделу 3.1. ....	157
3.2. Использование механизма РНК-интерференции для терапии гриппа..	159
3.2.1. Инкапсулированные siРНК, направленные на ингибирование гена NS, обладают противовирусной активностью в отношении вируса гриппа типа А <i>in vitro</i> .....	160
3.2.2. Клеточные miРНК – новые мишени для терапии гриппа с помощью компенсаторных siРНК .....	169
Заключение по разделу 3.2. ....	175
3.3. Протеиндисульфидизомераза – клеточная мишень для противовирусной терапии. 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины – ингибиторы протеиндисульфидизомеразы? .....	176
3.3.1. Клонирование и получение рекомбинантной протеиндисульфидизомеразы .....	178
3.3.2. Анализ экспрессии протеиндисульфидизомеразы в клетках человека .....	180
3.3.3. Окислительная способность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении цистеинов в белках .....	181

3.3.4. Оценка окислительной способности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении пептидов из активного центра протеиндисульфидизомеразы .....	187
3.3.5. Молекулярный докинг 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с протеиндисульфидизомеразой .....	189
3.3.6. Ингибирование ферментативной активности протеиндисульфидизомеразы соединениями ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов .....	196
3.3.7. Анализ экспрессии протеиндисульфидизомеразы в клетках A549 под действием 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов .....	199
3.3.8. Изучение специфической противовирусной активности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов <i>in vivo</i> .....	201
Заключение по разделу 3.3. ....	204
3.4. Применение технологии олигонуклеотидных микрочипов для диагностики гриппа .....	204
3.4.1. Разработка универсальной методики выявления и субтипирования вируса гриппа типа А человека и животных на основе олигонуклеотидных микрочипов .....	205
3.4.1.1. Подбор олигонуклеотидных зондов для типирования и субтипирования вируса гриппа типа А .....	205
3.4.1.2. Разработка метода флуоресцентного мечения вирусной РНК для гибридизации на микрочипе .....	207
3.4.1.3. Проверка специфичности олигонуклеотидного микрочипа .....	213
3.4.2. Разработка мультиплексных методов анализа экспрессии цитокинов человека, характеризующих протекание гриппозной инфекции .....	219
3.4.2.1. Олигонуклеотидный микрочип для анализа экспрессии цитокинов .....	219

3.4.2.2. Разработка метода мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для анализа экспрессии цитокинов .....	222
3.4.2.3. Клиническая апробация мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для анализа экспрессии цитокинов .....	224
Заключение по разделу 3.4. ....	228
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	230
ВЫВОДЫ .....	243
БЛАГОДАРНОСТИ .....	245
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	246
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	251
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	303

## ВВЕДЕНИЕ

*«The virocell concept tells us that viruses are too important for life evolution and cell biology to be only interesting for virologists» [91]*

**Актуальность темы исследования.** Грипп – острая респираторная вирусная инфекция, вызывающая глобальные эпидемии и периодические пандемии. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно фиксируют до 5 миллионов случаев тяжелого сезонного гриппа. При этом от связанных с гриппом осложнений умирает до 650 000 человек в год [371]. Для вируса гриппа характерна чрезвычайно высокая степень генетической изменчивости, приводящая к быстрому развитию устойчивости к противовирусным препаратам и вакцинам [338], что определяет актуальность поиска новых подходов к созданию средств профилактики, лечения, а также диагностики гриппа.

Одной из главных тенденций развития вирусологии является применение последних достижений биохимии и клеточной молекулярной биологии для изучения патогенеза инфекции. Установление роли вирусных белков стимулировало разработку препаратов, направленных на подавление их ферментативной активности. Однако используемый при этом вирусоцентрический подход оказался малоэффективным, так как не позволяет решить проблему быстрого возникновения устойчивости. Ярким примером такого препарата является ремантадин, к которому была потеряна чувствительность среди большинства циркулирующих в популяции человека штаммов вируса гриппа.

За последнее десятилетие появились новые методы высокопроизводительного мультиплексного анализа, которые позволяют

применять новый – системный – подход к изучению и характеристике клеточного ответа на инфекцию для получения максимально полной картины взаимодействий «вирус-хозяин» [162]. Это новое направление, основанное на применении методов системной биологии и биохимии в области вирусологии, получило название системная вирусология. При этом в качестве биологической системы рассматривают зараженные вирусом клетки, ткани (органы) и целые организмы [321]. В основе системного анализа лежит возможность измерения изменений всех известных компонентов изучаемой системы на уровне генома, транскриптома, протеома, липидома, метаболома и т.д. Такой хозяин-ориентированный подход выступает в противовес более традиционному подходу, сфокусированному на заранее определенных ограниченных по числу наборам молекул [173].

Появление системной биологии и системной вирусологии, в частности, стало возможным после завершения проекта по секвенированию генома человека и благодаря появлению высокопроизводительных технологий, таких как метод экспрессионных микрочипов [169]. Внедрение последних в практику послужило лейтмотивом развития системной вирусологии и анализа взаимодействий «вирус-хозяин» в последующие годы [17, 173, 252]. С помощью экспрессионных микрочипов был подробно изучен клеточный ответ на инфицирование вирусами иммунодефицита человека [115], гриппа [114, 165], гепатита С [116], тяжелого острого респираторного синдрома [26], иммунодефицита обезьян [327], лихорадки Западного Нила [93], простого герпеса 1 типа [251], Эбола [167] и многими другими. Такие исследования позволили выявить ключевые клеточные факторы, задействованные в развитии инфекции, которые можно рассматривать в качестве мишеней при создании новых препаратов для лечения вирусных инфекций. Помимо применения в системной биологии, технология микрочипов может быть использована в диагностике, так как она позволяет в рамках одного эксперимента проводить анализ большого количества диагностических маркеров [39].

**Степень разработанности темы исследования.** Системная вирусология значительно расширила понимание ответа организма-хозяина на вызванную вирусом гриппа типа А (ВГА) инфекцию, особенно на клеточном уровне. Пионерские работы, посвященные изучению паттерна ВГА-индуцированной экспрессии на уровне генома, были выполнены в период с 2002 по 2006 годы [25, 162, 165, 173]. С развитием и успешным практическим применением высокопроизводительных технологий стал очевиден их огромный потенциал в создании многомерной (пространственной) модели взаимодействий между ВГА и клеточными факторами. Примечательно, что молекулярные механизмы иммунного ответа на ВГА инфекцию во многом также были изучены и дополнены с применением методов системной вирусологии. Вместе с тем сложная сеть взаимодействий между вирусом и хозяином далеко не исчерпывается иммунным ответом. Много исследований было посвящено вирусному неструктурному белку NS1, выполняющему множество функций, потенциально влияющих на вирулентность ВГА [107, 136]. NS1, с одной стороны, является антагонистом системы интерферона (IFN), с другой стороны, отвечает за взаимодействие с несколькими десятками клеточных белков, выполняя роль главного «посредника» между ВГА и инфицируемой клеткой. Именно этот белок был выбран в качестве основного вирусного компонента в работе. В качестве объекта для изучения роли NS1 использовали рекомбинантные ВГА с полноразмерным и частично делетированным геном NS, полученные методом обратной генетики<sup>1</sup> [78, 186, 278, 293].

Методы системной вирусологии позволили по-новому подойти к вопросу диагностики и лечения гриппа. Традиционный подход к разработке противовирусных препаратов против гриппа ориентирован на вирусные компоненты. Однако в силу вариабельности вирусного генома, к этим препаратам относительно быстро вырабатывается устойчивость. Появление и развитие высокопроизводительных геномных и постгеномных технологий позволило перейти от вирус-центрического подхода в изучении гриппа к

многопараметрическому анализу глобального ответа организма хозяина на вирусную инфекцию, опосредованного сложной сетью взаимодействий вирусных и клеточных факторов [35]. В настоящее время системная вирусология становится платформой для поиска новых мишеней для противовирусной терапии, а также выяснения и/или уточнения механизма действия уже существующих препаратов [188, 208]. Одними из таких препаратов являются 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины, для которых была показана противовирусная активность, но точный механизм действия оставался неизвестным. Только появление методов системной биологии позволило приблизиться к нахождению клеточных мишеней для этих препаратов.

В работе представлены данные собственных экспериментальных исследований, направленных на поиск новых подходов к диагностике и лечению гриппа с применением геномных и постгеномных методов биохимии, вирусологии и молекулярной биологии. Эти исследования проводились под руководством академика РАН, доктора биологических наук, профессора О.И. Киселева в возглавляемой автором Лаборатории структурной и функциональной протеомики ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, в дальнейшем преобразованной в Отдел молекулярной биологии вирусов. В работе представлены данные исследований, выполненных в период с 2005 по 2017 годы.

**Цель исследования.** Создание платформы для разработки новых подходов к поиску лекарственных препаратов против гриппа и его диагностики с использованием методов системной вирусологии.

**Задачи исследования:**

1) Провести анализ эволюционной динамики гена NS и белка NS1 ВГА человека.

2) Определить клеточную модель, позволяющую проводить изучение механизмов взаимодействия между ВГА и инфицируемой клеткой и оценить вклад NS1 в развитие инфекции.

3) На основе анализа изменения транскриптома клеток в ответ на ВГА инфекцию определить связанные с NS1 клеточные гены и/или пути, которые можно рассматривать как потенциальные мишени для противовирусной терапии.

4) Оценить противовирусную эффективность подавления экспрессии гена NS ВГА с помощью механизма РНК-интерференции.

5) Оценить возможность использования синтетических аналогов клеточных miРНК, уровень экспрессии которых снижается при ВГА инфекции, в качестве нового подхода для лечения гриппа.

6) Изучить возможность окисления производными 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов цистеин-содержащих пептидов гемагглютинина ВГА и активных центров протеиндисульфидизомеразы.

7) Разработать олигонуклеотидный микрочип для определения и субтипирования ВГА человека и животных.

8) Разработать мультиплексный метод определения уровня мРНК цитокинов человека, характеризующих течение гриппозной инфекции.

**Научная новизна.** Впервые проведен подробный филогенетический анализ и изучена эволюционная динамика гена NS ~15000 штаммов ВГА человека и свиней, циркулирующих в соответствующих популяциях с 1918 года по настоящее время. Продемонстрировано, что ген NS всех эпидемических вариантов ВГА человека эволюционировал только в процессе генетического дрейфа и ведет свое начало от вируса H1N1pdm1918. Сравнительный анализ структурных и функциональных доменов белка NS1 ВГА человека показал, что они преимущественно оставались консервативными в процессе эволюции. Таким образом, NS1 можно рассматривать как перспективную мишень для терапии гриппа. Впервые показано, что инкапсулированная в гибридные микрокапсулы анти-NS siРНК NS-777 обладает сопоставимой с озельтамивиром противовирусной активностью *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов (H1N1, H1N1pdm09, H3N2, H5N2 и H7N9).

Клеточная (эпителиальные клетки A549) модель ВГА инфекции с использованием рекомбинантных вирусов с полноразмерной и частично удаленной открытой рамкой считывания (ОРС) NS1 в гене NS (вирусы wtNS1 и ΔNS1, соответственно) была использована для установления связанных с NS1 клеточных факторов – потенциальных мишеней для терапии гриппа. Впервые показано, что NS1 ВГА отвечает за активацию экспрессии некодирующих РНК SNAR: G1, H, F, B2, G2, D и A3, ассоциированных с противовирусным ядерным белком NF90, и генов HSPA5 (GRP78), HSPA1B, HSPA1A, DNAJB1 и BAG3, участвующих в регуляции HSF1-зависимого ответа на тепловой шок. С использованием клеточной модели ВГА инфекции предложен новый подход к разработке препаратов против гриппа, основанный на применении синтетических компенсаторных аналогов клеточных miРНК, уровень экспрессии которых снижается под действием вирусного заражения. Высокоэффективное (сопоставимое с озельтамивиром) ингибирование репликации ВГА *in vitro* было достигнуто при использовании коктейля синтетических аналогов клеточных miРНК let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194.

Впервые показано, что соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов катализируют образование дисульфидных связей в цистеин-содержащих пептидных фрагментах гемагглютинина (НА) ВГА и активных центрах протеиндисульфидизомеразы (ПДИ). Полученные данные позволяют предположить, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины могут влиять на активность ПДИ посредством окисления SH-групп цистеинов в активном центре фермента. Впервые показано, что натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат может обладать умеренной противовирусной активностью в отношении вируса Денге.

Разработан оригинальный олигонуклеотидный диагностический микрочип «IAVchip» для субтипирования ВГА человека и животных. Его отличительной особенностью от аналогов является то, что для получения флуоресцентно меченых кДНК копий геномных сегментов ВГА используется метод

одностадийной ОТ-ПЦР с праймерами к консервативным областям всех восьми геномных сегментов ВГА. Такой подход позволил унифицировать процедуру подготовки пробы для анализа на микрочипе и избавиться от необходимости использования подтип- и/или сегмент-специфических мультиплексных праймеров, что значительно упростило процесс проведения анализа.

Впервые разработан набор мультиплексных ПЦР в режиме реального времени для определения содержания мРНК цитокинов IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL10, IL12 $\beta$ , IL18, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  человека при гриппозной инфекции. Тест-система была успешно апробирована на клеточной культуре и образцах крови пациентов. Установлено, что NS1 ВГА в эпителиальных клетках A549 отвечает за активацию экспрессии мРНК IL4, препятствующего развитию Th1-опосредованного цитотоксического клеточного ответа. У пациентов с лабораторно подтвержденным гриппом в лейкоцитах крови происходит увеличение уровня мРНК IL6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL10 и IL18, при этом значимое повышение мРНК IL10 и TNF $\alpha$  характерно только для пациентов с гриппом, но не с респираторными инфекциями другой этиологии.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты проведенного исследования содержат как новые фундаментальные данные в области биохимии, молекулярной биологии и вирусологии, так и прикладные результаты.

Подробно изучены эволюционная динамика гена NS и распределение ключевых аминокислотных замен в структурных и функциональных сайтах белка NS1 ВГА, циркулирующих в популяции человека с 1918 года по настоящее время. Получены новые данные о механизмах клеточного ответа на ВГА инфекцию. Использованный в работе методологический подход, который заключается в изучении взаимодействий между ВГА и инфицированными клетками с применением высокопроизводительных методов системной вирусологии, представляет собой платформу для поиска новых клеточных мишеней для терапии гриппа. Кроме того, с ее помощью возможно проводить оценку

механизмов действия уже известных препаратов. Предложенный подход позволил выявить в клетках A549 NS1-зависимую активацию экспрессии генов, участвующих в регуляции фолдинга и сборки белков, а также клеточные miРНК, которые можно рассматривать в качестве мишеней для противовирусной терапии. Предложенная в работе клеточная модель ВГА инфекции используется в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России для создания и изучения механизма действия молекул, проявляющих противовирусную активность.

Предложенные в работе подходы по использованию анти-NS siРНК и компенсаторных miРНК будут в дальнейшем использованы при создании противовирусных препаратов, механизм действия которых основан на явлении РНК-интерференции. Для разработанных препаратов в случае их успешных испытаний *in vivo* будут проведены доклинические исследования в сотрудничестве с индустриальными партнерами.

Раскрыт один из потенциальных механизмов действия соединений ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, который заключается в воздействии на цистеин-содержащие пептиды и белки, в частности, на ПДИ человека. Соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов находятся на различных стадиях доклинических, клинических и пострегистрационных исследований. Полученные в работе данные о потенциальном механизме их действия будут применены для расширения спектра действия этих препаратов на другие инфекции.

Разработанные тест-системы были успешно апробированы на практике. Набор для определения мРНК цитокинов методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени прошел клиническую апробацию. Методический задел, полученный при создании диагностических микрочипов, стал основой для проведения разработки новой уникальной тест-системы «ТОРИ-ТЕСТ» для персонифицированной диагностики острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) человека.

Полученные в работе данные используются при преподавании курсов молекулярной вирусологии и молекулярной эволюции в Санкт-Петербургском

политехническом университете Петра Великого (СПбПУ) и аспирантуре ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

**Методология и методы исследования.** В работе применены современные методы биохимии, молекулярной биологии и вирусологии. Использован метод биологических микрочипов для анализа экспрессии генов и создания новых методов молекулярной диагностики. Применялись различные методы амплификации нуклеиновых кислот (вирусных РНК, клеточных мРНК и miРНК), методы генной инженерии для создания рекомбинантных вирусов (обратная генетика) и получения рекомбинантных белков. При работе с вирусами *in vitro* использовали методы классической и молекулярной вирусологии, культивирования клеточных культур, конфокальной и электронной микроскопии. При работе с 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазидами применяли методы масс-спектрометрии. Использовали компьютерные методы анализа: филогенетический анализ, статистическую обработку данных клеточной экспрессии, полученных методом микрочипов и секвенирования нового поколения (NGS), молекулярный докинг. Все эксперименты выполнены в достаточном количестве повторов, позволяющих адекватно применить статистический анализ.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Методологический подход, состоящий в применении методов системной вирусологии для изучения взаимодействий между ВГА и инфицированными клетками, является платформой для первичного поиска новых, клеточных, мишеней для терапии гриппа и оценки механизмов действия уже известных препаратов. Данный подход позволил выявить в эпителиальных клетках A549 NS1-зависимую активацию экспрессии генов, участвующих в регуляции фолдинга и сборки вирусных белков, и предложить их в качестве мишеней для противовирусной терапии.

2. Белок NS1 ВГА является одним из наиболее эволюционно консервативных и значимых для адаптации к организму хозяина белков ВГА, выполняя роль ключевого «координатора» в системе комплексных

взаимодействий вирус-хозяин, что делает его перспективной мишенью для нового подхода к терапии гриппа, направленного, в первую очередь, на снижение патогенного воздействия ВГА на организм. С использованием механизма РНК-интерференции показано, что выключение экспрессии гена NS ВГА демонстрирует противовирусное действие *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов.

3. Клеточные miРНК являются новыми перспективными мишенями для лечения гриппа. Применение коктейля синтетических компенсаторных аналогов клеточных miРНК, уровень экспрессии которых снижается под действием вирусного заражения, вызывает сопоставимое с озельтамивиром ингибирование репликации ВГА *in vitro*.

4. Противовирусная активность соединений ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов обусловлена их способностью катализировать образование дисульфидных связей в цистеин-содержащих фрагментах вирусных и клеточных белков. Одной из потенциальных мишеней для 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов является клеточный фермент – ПДИ, участвующий в фолдинге поверхностных вирусных белков.

5. Мультиплексные методы типирования и субтипирования ВГА и определения клеточных маркеров, характеризующих развитие заболевания, позволяют сформулировать новый персонафицированный подход к диагностике гриппа и других респираторных вирусных инфекций.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Результаты получены с помощью современных методов. Объем выборок и число независимых экспериментов позволили оценить значимость результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. Материалы работы были представлены на следующих мероприятиях: II Международном форуме «Российско-Китайское биомедицинское сотрудничество» в рамках инициативы «Один пояс – один путь» (11–16 ноября 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), 42-м Конгрессе FEBS (10–14 сентября 2017 г., Иерусалим, Израиль), Международной

конференции «Trends in Influenza Research» (18–20 сентября 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), заседании Российского общества биохимиков и молекулярных биологов при РАН (Совет Санкт-Петербургского отделения) (17 мая 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» (18–20 апреля 2017 г., Москва, Россия), 51-й Школе ПИЯФ по физике конденсированного состояния (11–16 марта 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), 5-й Конференции ESWI (14–17 сентября 2014 г., Рига, Латвия), European Human Genetics Conference (8–11 июня 2013 г., Париж, Франция), 38-м Конгрессе FEBS (6–11 июля 2013 г., Санкт-Петербург, Россия), Научной конференции «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика, лечение», посвященной 45-летию НИИ гриппа (24–25 октября 2012 г., Санкт-Петербург, Россия), II Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (29–31 марта 2010 г., Москва, Россия), Международной конференции «Новое поколение противогриппозных вакцин» (28–29 октября 2009 г., Санкт-Петербург, Россия), Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней» (14–15 мая 2009 г., Новосибирск, Россия), Международной научно-практической конференции «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития» (20–22 мая 2008 г., Алматы, Казахстан), Международной конференции «Preparedness to the Influenza Pandemic – an International Outlook» (15–17 марта 2007 г. Санкт-Петербург, Россия).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 17 статей в рецензируемых журналах, из них 15 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в библиографических базах данных WoS, Scopus и PubMed; 2 монографии, получено 3 патента РФ.

**Личный вклад соискателя.** Автор провел анализ литературы по проблеме исследования, разработал концепцию работы, осуществил планирование

экспериментов и анализ результатов, которые представил в докладах на конференциях и опубликовал в научных статьях. Соискателем были проведены филогенетический и биоинформационный анализ, выполнены эксперименты по созданию микрочипов и ПЦР тест-систем. При участии сотрудников Отдела молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России выполнены следующие работы: эксперименты по анализу экспрессии генов проведены к.б.н. С.А. Клотченко и к.б.н. М.А. Плотниковой, масс-спектрометрические измерения – д.х.н. О.А. Миргородской, Я.А. Забродской и А.С. Тараскиным, анализ противовирусной активности siРНК проведен А.В. Бродской, микроскопические изображения получены к.б.н. А.Н. Горшковым, молекулярный докинг выполнен к.х.н. В.Б. Цветковым. Опыты по получению рекомбинантных вирусов гриппа выполнены к.б.н. Е.А. Романовской-Романько (Лаборатория векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России). Упаковка siРНК в микрокапсулы осуществлена А.С. Тиминим (СПбПУ). Статистическая обработка данных экспрессионных микрочипов и NGS проведена А.В. Предеусом (Институт биоинформатики).

**Структура диссертации.** Диссертация содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 392 источников, из них 8 – отечественных, и «Приложения». Диссертация изложена на 311 страницах. Результаты и обсуждение представлены в 23 таблицах и иллюстрированы 65 рисунками.

**Финансовая поддержка.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-13734 («Разработка и создание лабораторного образца системы определения цитокинов на основе микрочипов»); проекта 8121 ФЦП «Кадры» («Системный анализ молекулярно-генетических механизмов патогенности вирусов гриппа типа А, опосредованной экспрессией гена NS»), гранта РНФ №15-15-00170 («Клеточные микроРНК - новые молекулярные мишени для терапии тяжелых вирусных инфекций»), финансируемых

Министерством здравоохранения Российской Федерации тем Государственного задания ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России («Изучение молекулярно-генетических механизмов взаимодействия между вирусом гриппа и инфицированными клетками методами системной вирусологии» и «Научное обоснование технологических аспектов фармацевтической разработки готовой лекарственной формы препарата против лихорадки Эбола»), плановых тем НИР «НИИ гриппа» («Фундаментальные основы молекулярной генетики вирусов и патогенеза гриппозной инфекции» и «Разработка высокоспецифичных и высокочувствительных методов диагностики вирусных инфекций и оценки иммунного статуса человека»), договора на выполнение НИР с РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК («Разработка новых методов и средств раннего выявления и дифференциальной детекции возбудителей опасных инфекционных болезней»), грантов Правительства Санкт-Петербурга для молодых ученых и кандидатов наук.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Определение и классификация вирусов гриппа

Вирус гриппа – это РНК-содержащий вирус семейства *Orthomyxoviridae*. Из четырех существующих типов вируса гриппа (А, В, С и D) наибольшую эпидемическую опасность представляют ВГА, обнаруженные у человека, птиц, свиней, лошадей, собак, тюленей, китов, норок, верблюдов и летучих мышей [369]. Вирусы гриппа В преимущественно циркулируют только в популяции человека и вносят существенный вклад в ежегодные эпидемии [198]. Вирусы гриппа С человека встречаются значительно реже и являются менее вирулентными. Недавно выделенные в отдельный тип вирусы гриппа D были обнаружены у свиней и коров [61, 140, 306]. Для ВГА введена дополнительная классификация, основанная на антигенных различиях внешних (поверхностных) гликопротеинов: гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA). В настоящее время известно 18 подтипов НА и 11 подтипов NA [124]. Все подтипы были обнаружены у водоплавающих птиц, за исключением вирусов H17N10 и H18N11, обнаруженных только у летучих мышей [335]. Для вирусов гриппа типов В и С существующие антигенные различия не так велики, поэтому они не нуждаются в дополнительной классификации, хотя для вирусов гриппа В выделяют две линии: Ямагатскую и Викторианскую. Согласно рекомендации ВОЗ номенклатура штаммов вирусов гриппа включает: 1) тип вируса (А, В, С, D); 2) естественного хозяина, если это не человек; 3) географическое происхождение штамма; 4) порядковый номер штамма; 5) год выделения штамма, за которым в круглых скобках следует подтип (для ВГА). Например, наименование штамма A/St.Petersburg/8/2006 (H1N1) означает, что он относится к ВГА человека подтипа H1N1 и был выделен в Санкт-Петербурге в 2006 году.

## 1.2. Строение и молекулярный состав вириона вируса гриппа типа А

Вирион ВГА представляет собой сферическую, диаметром 80-120 нм, или палочкообразную, длиной до 300 нм, частицу [233], на поверхности которой расположены три типа трансмембранных белков: HA, NA и образующий ионные каналы белок матрикса 2 (M2) (рисунок 1.1). Гликопротеины HA и NA встраиваются в липидную оболочку вируса, образуя шипообразные структуры, видимые методом электронной микроскопии [96]. HA и NA составляют, соответственно, около 25% и 5% общего белкового состава вириона, M2 присутствует в оболочке вириона в гораздо меньших количествах [26].

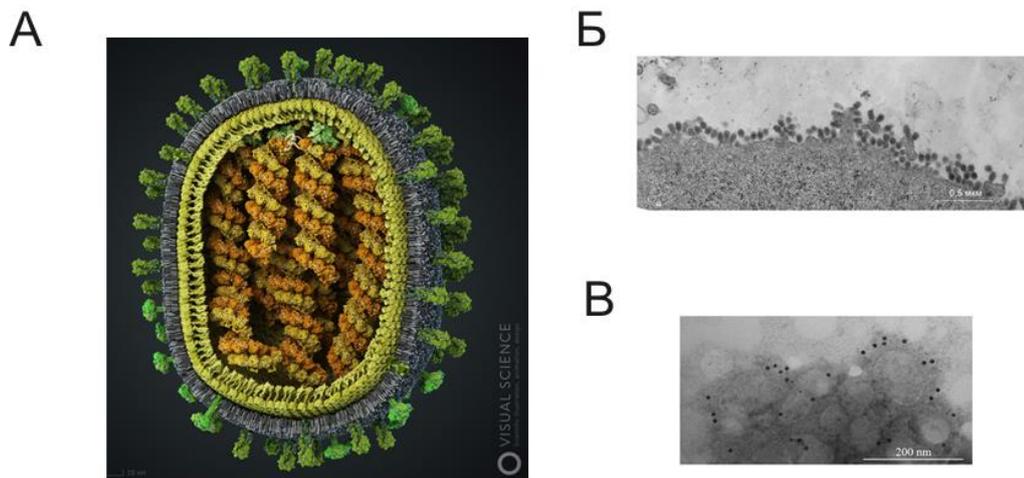


Рисунок 1.1 – Морфология вириона ВГА

*А – 3D реконструкция вириона ВГА [http://visualscience.ru]. Б – электронная микрофотография почкования вирионов ВГА от поверхности клеток линии MDCK. В – иммуноэлектронная микроскопия вирионов ВГА с моноклональными антителами к HA.*

Внутри вириона упакован вирусный геном, который состоит из восьми отдельных сегментов однонитевой (–)-РНК (вРНК), представленных в форме рибонуклеопротеиновых комплексов (вРНП). Каждый вРНП состоит из молекулы РНК, покрытой нуклеопротеином (NP), и ассоциированной с ней вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (далее – РНК-полимераза), представляющей собой гетеротример, образованный субъединицами основного полимеразного белка 1

(PB1), основного полимеразного белка 2 (PB2) и кислого полимеразного белка (PA). Внутри вириона сегменты РНП окружены белком матрикса 1 (M1), выстилающим вирусную мембрану. Кроме того, в вирионе присутствует белок экспорта в ядро (NEP) [28]. Большинство из вышеописанных вирусных белков было обнаружено в 1970-х годах методом электрофоретического разделения в полиакриламидном геле (ПААГ). По причине того, что данный метод позволяет преимущественно определять мажорные белки, минорные белки M2 и NEP были обнаружены в вирионе ВГА позже [26, 28].

Геном ВГА кодирует также присутствующие только в инфицированных клетках неструктурные белки NS1, PB1-F2, PA-X и некоторые другие минорные белки [348]. По последним данным NS1 также входит в состав вирусных частиц [150]. Общий перечень генов и белков, кодируемых геномом ВГА, представлен в разделе 1.3.2 [348].

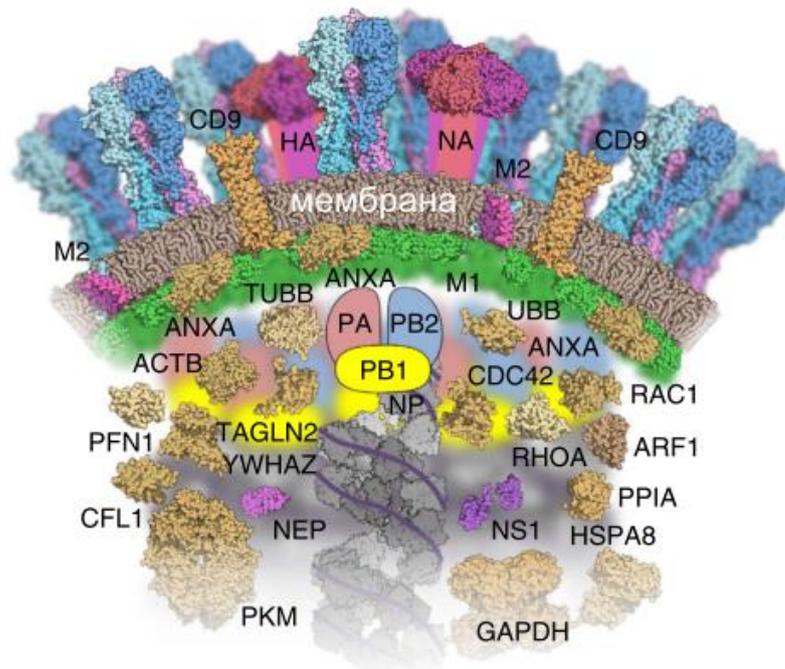


Рисунок 1.2 – Белковый состав вириона ВГА [150]

*В состав вириона входят как вирусные (HA, NA, M2, PB1, PB2, PA, NP, NS1), так и клеточные (CD9, ACTB, ANXA, TUBB, UBB, CDC42, RAC1, ARF1, PFN1, TAGLN2, RHOA, PPIA, HSPA8, YWHAZ, CFL1, PKM, GAPDH) белки.*

Помимо вирусных в состав вирионов также могут входить клеточные белки, представленные в малых количествах (рисунок 1.2) [150, 297]. Часть из обнаруженных в вирионе ВГА клеточных белков были ранее выявлены в вирусах других семейств (герпесвирусы, поксвирусы, ретровирусы). Возможно, они играют роль на определенных стадиях жизненного цикла оболочечных вирусов, участвуя в процессах слияния с клеточной мембраной и почкования вириона. Следует иметь в виду, что в процессе образования вирусных частиц в их оболочку случайным образом попадают клеточные мембранные и цитозольные белки, находящиеся в сайте почкования. В частности, для ВГА это будут мажорные цитозольные и характерные для липидных рафтов белки: тубулин, актин (АКТВ), аннексины, енолаза, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (GAPDH), пируваткиназа, глипикан 4,  $\gamma$ -глутамилтрансфераза, белок теплового шока 27 (HSP27) и трансгелин, а также заякоренный белок CD59. Неизвестно, определяет наличие этих белков сайт почкования, или наоборот.

Некоторые клеточные белки могут быть специфически рекрутированы и упакованы в вирион, например, в результате взаимодействия с вирусными белками или РНК. Эти белки участвуют в жизненном цикле вируса. Каждый вирусный белок взаимодействует с различными клеточными белками на разных стадиях жизненного цикла, и эти взаимодействия носят кратковременный характер. Набор клеточных белков, с которыми взаимодействует вирус, соответствует определенному этапу его жизненного цикла. Упакованные в вирион клеточные белки переносятся от клетки к клетке, поэтому их роль может быть чрезвычайно важна.

### **1.3. Геном и протеом вируса гриппа типа А**

#### **1.3.1. Геном вируса гриппа типа А**

Геном ВГА состоит из 8 сегментов однонитевой вРНК длиной от ~890 до ~2340 нуклеотидов. 5'- и 3'-концевые участки вРНК содержат консервативные

последовательности длиной 12-13 н, которые образуют частично комплементарную двунитевую структуру, обеспечивающую кольцевую конформацию вРНК типа «сковорода с ручкой» (рисунок 1.3). Методом сайт-направленного мутагенеза было показано, что взаимодействия внутри концевого двунитевого участка в такой структуре не являются обязательными для инициации транскрипции. Вероятно, вторичная структура концевых участков вРНК претерпевает конформационные изменения на разных стадиях цикла репликации ВГА [129].

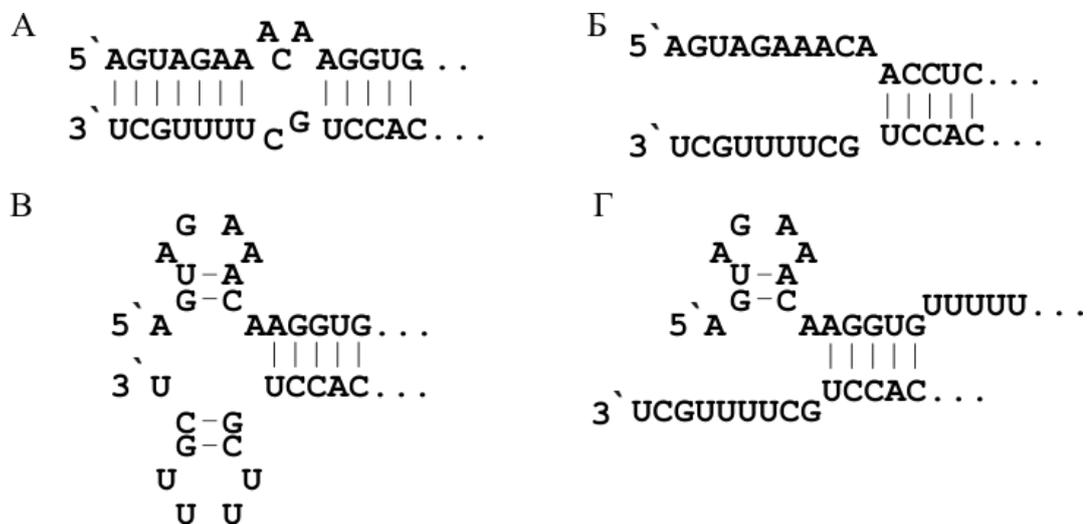


Рисунок 1.3 – Вторичная структура 5'- и 3'-концевых участков вРНК ВГА

*А – структура типа «сковорода с ручкой». Б – структура типа «вилка», в которой концы вРНК остаются только частично двунитевыми. В – структура типа «шпатель», в которой на концах вРНК образуются две короткие шпильки; такая конформация обеспечивает тесное связывание вРНК с РНК-полимеразой и реализацию эндонуклеазной активности. Г – структура типа «5'-крюк»; представляет собой физический барьер, задерживающий РНК-полимеразу на поли(U) участке, отвечающем за полиаденилирование вирусных мРНК.*

вРНК имеют диаметр около 13 нм и длину от 30 до 110 нм, которая коррелирует с длиной геномных сегментов (рисунок 1.4) [388]. Структура отдельных вРНК хорошо изучена методами электронной и криоэлектронной микроскопии [21, 92, 241, 388]. В составе вРНК комплекса вРНК находится в

полностью или частично расплавленном состоянии, так как формирование стабильных вторичных структур, вероятно, будет препятствием для эффективной сборки вРНК частиц. Несмотря на общую неструктурированность вРНК в некоторых сегментах наблюдается упорядоченность вторичной структуры. Кроме того, в вРНК могут формироваться локальные вторичные структуры в свободных от NP областях, образующихся на некоторых стадиях цикла репликации.

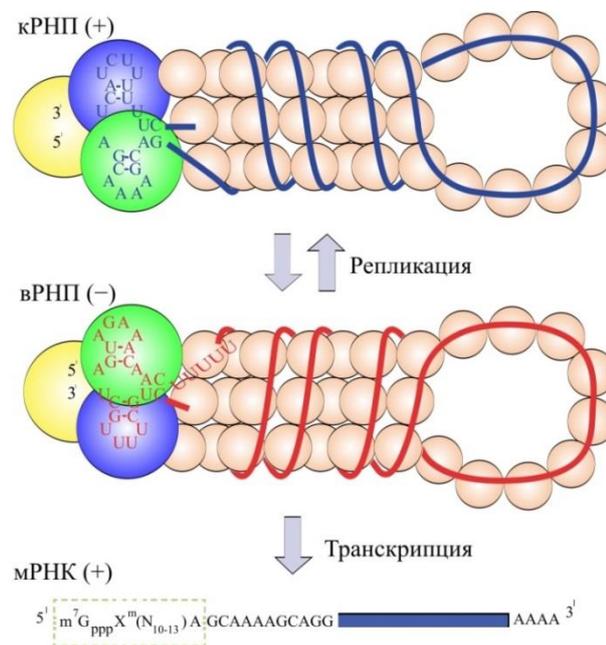


Рисунок 1.4 – Структура вРНК ВГА

*вРНК* представляет собой двунитевую спиральную структуру, образованную двумя антипараллельными нитями из белка NP, с которыми связана вРНК. С открытыми 5'- и 3'-концами вРНК связана РНК-полимераза [54,55]. Замкнутый конец вРНК содержит петлю, образованную 3-8 молекулами NP. Расстояние между субъединицами NP составляет от 28.4 до 32.6 Å, на один оборот спирали приходится 5-6 молекул NP и 120-150 нуклеотидов вРНК [21, 225]. Предположительная РНК-связывающая бороздка спирали вРНК экспонирована на его внешнюю поверхность.

Сегментированность генома ВГА, с одной стороны, предоставляет вирусу эволюционное преимущество, а, с другой стороны, усложняет упаковку новосинтезированных сегментов в вирионы потомства. Генетические и морфологические данные свидетельствуют о существовании селективного

сегмент-специфического механизма упаковки ВРНП, при котором в вирион встраиваются точно 8 сегментов ВРНП [240]. На 3'- и 5'-концах сегментов ВРНП и на расстоянии 100-300 нуклеотидов от них были обнаружены сегмент-специфические сигналы упаковки [151]. Также описаны дополнительные области типа «целующихся петель» между некоторыми геномными сегментами.

Методом электронной микроскопии было показано, что в почкующемся вирионе ВРНП образуют специфическую структуру, в которой семь из них окружают один центральный ВРНП [241]. Анализ длины ВРНП показал, что в вирион включается каждый из 8 сегментов, при этом порядок их расположения варьирует. Взаимодействия между сегментами ограничены, центральный ВРНП может не быть специфически связан со всеми периферическими ВРНП, а каждый периферический ВРНП может не иметь специфических взаимодействий с соседними, иначе порядок сегментов был бы идентичен во всех вирионах.

По данным сканирующей трансмиссионной электронно-микроскопической томографии ВРНП являются гибкими змеевидными кривыми структурами, что хорошо согласуется с данными об олигомеризации NP [242]. Наблюдаются прямые контакты между периферическими ВРНП, а также периферическими и центральным ВРНП, в том числе посредством коротких струноподобных структур диаметром 2 нм и длиной около 10 нм, которые напоминают РНК [18]. Можно предположить, что 8 ВРНП собираются в ядре или цитоплазме и упаковываются в вирион в виде связанного комплекса, а не отдельных ВРНП. По данным электронной микроскопии НА и М2 участвуют в связывании структурированных ВРНП на начальных стадиях почкования и, возможно, делают это более эффективно для комплекса из 8 сегментов, а не каждого по отдельности [92].

### **1.3.2. Протеом вируса гриппа типа А**

Ранее считалось, что 8 геномных сегментов ВГА кодируют 10 белков: PB1, PB2, PA, NP, NA, NA, M1, M2, NS1 и NS2. В 2001 году был обнаружен 11-ый

белок ВГА, PB1-F2, транслируемый в альтернативной открытой рамке считывания (ОРС) [344]. Следует отметить, что PB1-F2 присутствует не у всех подтипов ВГА. Позже были обнаружены и/или вновь открыты еще шесть новых белков (или белковых изоформ), в том числе PB1-N40, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42 и NS3, а также предсказан гипотетический белок NSP, кодируемый расположенной на (-)-нити открытой рамкой считывания NEG8 [348]. Подробное описание функций «новых» вирусных белков и молекулярных механизмов, используемых ВГА для расширения своего протеома, представлено в обзоре [348]. Схема ОРС в геноме ВГА показана на рисунке 1.5, краткое описание белков ВГА и выполняемых ими функций – в таблице 1.1.

ВГА, как и большинство РНК-содержащих вирусов, имеет очень компактный геном, который подвергается постоянному давлению отбора. С целью оптимизации использования доступного геномного пространства ВГА в процессе эволюции выработал различные механизмы, позволяющие осуществлять экспрессию несколько белков с матриц одной мРНК. ВГА использует различные механизмы неканонической трансляции. Белки PB1-N40, PB1-F2, PA-N155 и PA-182 образуются в результате проскальзывания рибосомы и использования альтернативных AUG кодонов. В случае PB1-N40 и PB1-F2 этот механизм совмещен с механизмом реинициации, а PB1-F2 транслируется в альтернативной ОРС. Белок PA-X экспрессируется с использованием механизма рибосомального сдвига рамки считывания.

В отличие от большинства РНК-содержащих вирусов транскрипция и репликация генома ВГА происходит в ядре, а не в цитоплазме инфицированных клеток. Это означает, что ВГА могут использовать клеточную машинерию сплайсинга для образования мРНК, кодирующих белки M2, M42, NEP и NS3. Ядерная локализация процессов транскрипции и репликации генома ВГА теоретически позволяет предположить существование в геноме ВГА участков, кодирующих микроРНК (miРНК).

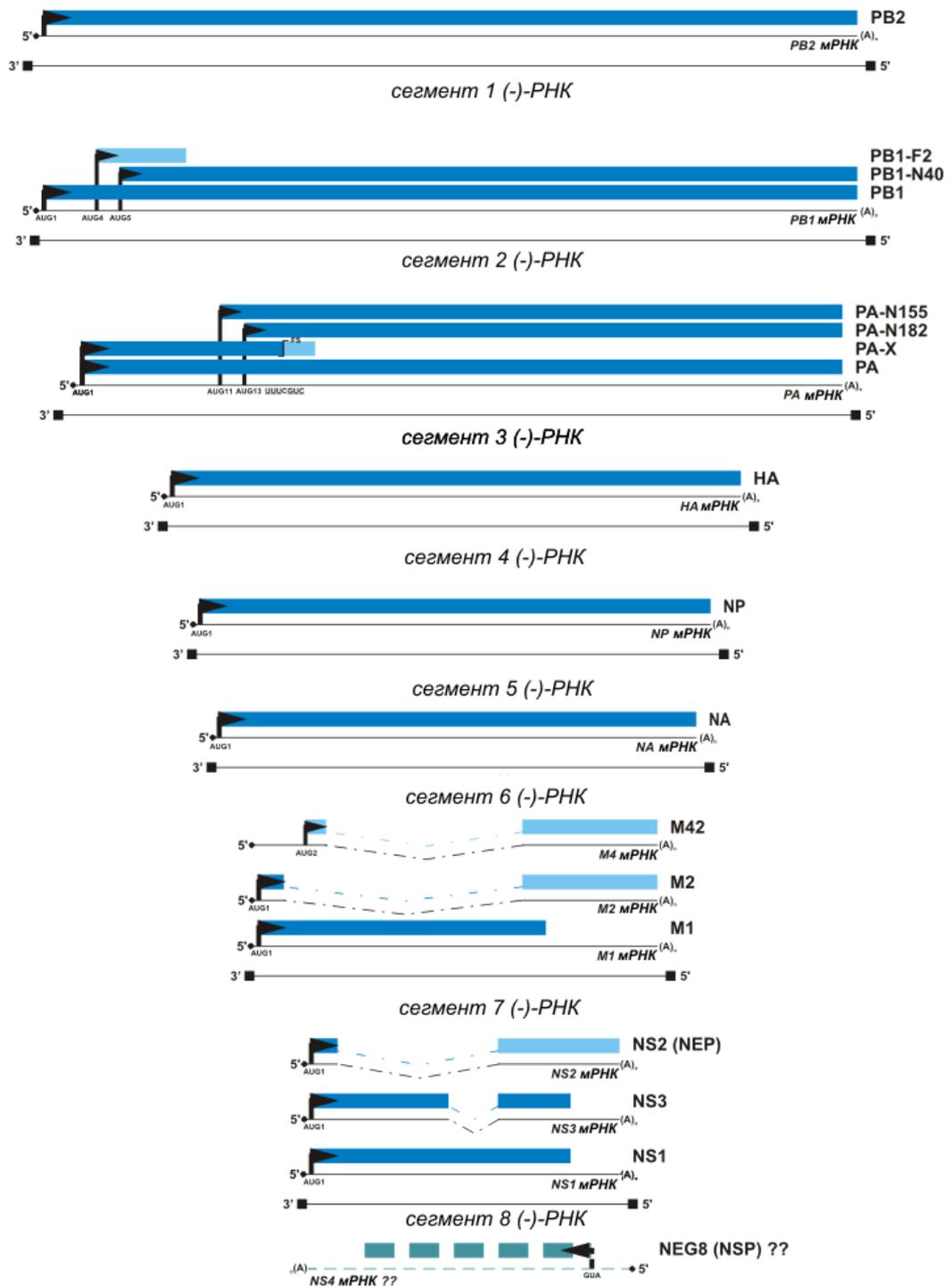


Рисунок 1.5 – Открытые рамки считывания в геноме ВГА [348]

Таблица 1.1 – Геном и протеом ВГА человека

Сегмент генома (ген)	Белок	мРНК	Механизм экспрессии	Размер, а.о.*	Функция
1 ( <i>PB2</i> )	PB2	Несплайсированная мРНК сегмента 1 (PB2 мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС	759	PB2 является субъединицей РНК-полимеразы. PB2 напрямую взаимодействует с РА. PB2 участвует в узнавании 5`-кэп структур РНК клеток-хозяина. PB2 вносит вклад в видовую специфичность и вирулентность ВГА
2 ( <i>PB1</i> )	PB1	Несплайсированная мРНК сегмента 2 (PB1 мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС	757	PB1 – каталитическая субъединица РНК-полимеразы, отвечающая за элонгацию синтеза цепи РНК при репликации и транскрипции. PB1 взаимодействует с PB2 и РА.
	PB1-N40	Несплайсированная мРНК сегмента 2 (PB1 мРНК)	Трансляция с AUG5 в основной ОРС в результате сканирования рибосомой	718	PB1 – укороченная с N-конца форма PB1, поддерживает баланс между экспрессией PB1 и PB1-F2
	PB1-F2	Несплайсированная мРНК сегмента 2 (PB1 мРНК)	Трансляция с AUG4 в альтернативной (+1	90 (может быть короче у	PB1-F2 – фактор вирулентности, индуцирует митохондрий-опосредованный апоптоз, взаимодействует с PB1 и влияет на активность РНК-полимеразы

			относительно РВ1) ОРС в результате сканирования рибосомой	некоторых штаммов ВГА)	
3 (РА)	РА	Несплайсированная мРНК сегмента 3 (РА мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС	716	РА – субъединица РНК-полимеразы, обеспечивает РНК эндонуклеазную активность (для механизма «похищения кэпов»). РА взаимодействует с РВ1
	РА-Х	Несплайсированная мРНК сегмента 3 (РА мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС и +1 рибосомальный сдвиг ОРС в кодонах 190-193	252	РА-Х модулирует клеточный ответ и вирулентность вируса
	РА-N155	Несплайсированная мРНК сегмента 3 (РА мРНК)	Трансляция с AUG11 в основной ОРС в результате сканирования рибосомой	568	?
	РА-	Несплайсированная	Трансляция с	535	?

	N182	мРНК сегмента 3 (РА мРНК)	AUG13 в основной ОРС в результате сканирования рибосомой		
4 (HA)	HA	Несплайсированная мРНК сегмента 4 (HA мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС	560	HA отвечает за узнавание и связывание рецепторов (сиаловых кислот, SA) на мембране инфицируемых клеток. Обеспечивает слияние вирусной и эндосомальной мембран для высвобождения ВРПП в цитозоль
5 (NP)	NP	Несплайсированная мРНК сегмента 5 (NP мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС	498	NP – основной компонент ВРПП. NP контролирует ядерно-цитоплазматический транспорт РНК
6 (NA)	NA	Несплайсированная мРНК сегмента 6 (NA мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС	465	NA отщепляет SA от клеточных рецепторов HA, обеспечивая выход вирусного потомства из клеток
7 (M)	M1	Несплайсированная мРНК сегмента 7 (M1 мРНК1)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС мРНК1	252	M1 – компонент вирусной мембраны, выстилает вирусную оболочку и играет важную роль в сборке вирионов и процес
	M2	Альтернативно сплайсированная мРНК сегмента 7 (M2 мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС мРНК2	97	M2 – мембранный белок, образующий протонный канал, активируемый в условиях кислого рН, важен для раздевания ВРПП при вхождении вируса.

	M42	Альтернативно сплайсированная мРНК сегмента 7 (M4 мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС мРНК4	99	Роль M42 может быть связана с функциональной подменой M2
8 (NS)	NS1	Несплайсированная мРНК сегмента 8 (NS1 мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС NS1 мРНК	217	NS1 – многофункциональный белок, вовлеченный во множество взаимодействий вирус-хозяин, включая ускользание от механизмов клеточной противовирусной защиты и регуляцию экспрессии клеточных и вирусных генов
	NS2 (NEP)	Альтернативно сплайсированная мРНК сегмента 8 (NEP мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС NEP мРНК	121	NEP – структурный компонент вирусных частиц, участвует в экспорте вРНК из ядра в цитоплазму
	NS3	Альтернативно сплайсированная мРНК сегмента 8 (NS3 мРНК)	Трансляция с AUG1 в основной ОРС NS3 мРНК	174	Роль NS3 может быть связана с межвидовой адаптацией вируса
	NEG8 (NSP) (?)	(-)-мРНК сегмента 8 (NS4 мРНК) (?)	Трансляция с ОРС (-)-нити (?)	156 (216)	?

\* *предсказано для вируса A/Anhui/1/2013 (H7N9)*

Существование консервативной ОРС NEG8 на (-)-нити 8 сегмента генома большинства штаммов ВГА человека может быть косвенным свидетельством того, что вирус находится в процессе эволюции к «ambisense»-стратегии, при которой (-)-нить трансформируется в «ambisense»-РНК и приобретает новый ген в противоположенной полярности [64].

### 1.3.3. Вирусные молекулярные факторы патогенности вируса гриппа типа А

Степень патогенности ВГА определяется целым комплексом факторов, в том числе генетических, идентификация и характеристика которых необходима для понимания пандемического потенциала вируса. В настоящее время известен ряд замен в вирусных белках, которые оказывают влияние на патогенность [286].

**Гемагглютинин.** Аминокислотные замены в НА разных подтипов, изменяющие специфичность связывания с рецептором, могут оказывать влияние на тканевой тропизм и видовую специфичность вируса. Паттерн связывания рецепторов ВГА подтипа H1<sub>pdm09</sub> определяется аминокислотами в положениях 190 и 225, подтипа H2 и H3 – в положениях 226 и 228 [118, 217, 340]. НА современных ВГА человека происходит из пула ВГА птиц, поэтому большое внимание уделяется заменам, определяющим межвидовую адаптацию НА вирусов птиц. В частности, в НА высокопатогенных вирусов H5N1 обнаружены аминокислотные замены, влияющие на связывание с рецепторами –  $\alpha$ 2,6-сиаловыми кислотами ( $\alpha$ 2,6-SA) человека [286]. Большинство из них расположено в области сайта связывания с рецептором.

Одной из наиболее известных детерминант патогенности ВГА птиц является мультиосновный сайт расщепления НА, последовательность которого определяет то, какими клеточными протеазами происходит расщепление НА, и, следовательно, тропизм и вирулентность вируса (рисунок 1.6) [384]. У млекопитающих связь между присутствием мультиосновного сайта расщепления и системным распространением вируса важна, но не столь очевидна, так как в

этом процессе участвуют дополнительные факторы. Кроме того, выявлена связь развития тяжелого гриппа с наличием замен консенсусного аминокислотного остатка D на G или N в 222 положении HA [222].

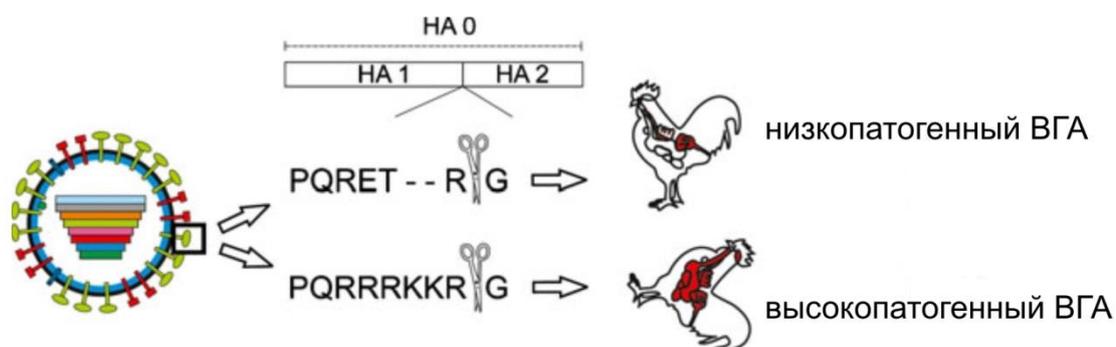


Рисунок 1.6 – Сайт расщепления HA как фактор патогенности ВГА [286]

HA расщепляется на две субъединицы HA1 и HA2 клеточными протеазами, которые узнают моноосновный или мультиосновный сайт расщепления. HA низкопатогенных ВГА птиц содержит моноосновный сайт расщепления, разрезаемый только трипсин-подобными протеазами. Тем самым репликация вируса ограничивается тканями, в клетках которых эти протеазы экспрессируются, то есть респираторным и пищеварительным путями. HA высокопатогенных ВГА птиц подтипов H5 и H7 может быть расщеплен повсеместно экспрессирующимися фурин-подобными протеазами, что обеспечивает системную репликацию вируса у домашней птицы.

**Белки полимеразы.** Субъединицы РНК-полимеразы, особенно РВ2, также относятся к молекулярным детерминантам патогенности. Хорошо изучена замена Е627К в контексте адаптации ВГА к разной температуре тела организма-хозяина [314]. Большинство ВГА птиц, содержащих Е в 627 положении, реплицируется в пищеварительном тракте при 41°C, в то время как ВГА человека, содержащие К в 627 положении, реплицируются в дыхательных путях при 33°C [314]. Замена Е627К появляется при адаптации ВГА птиц к мышам и обнаружена у высокопатогенных вирусов H5N1 и H7N7 человека [286]. Кроме того, в вирусах

птиц H5N1 описана замена N701D в PB2, приводящая к увеличению их патогенности и расширению видовой специфичности [286]. Эта замена усиливает связывание PB2 с импортном  $\alpha 1$  в клетках млекопитающих, что приводит к усилению транспорта PB2 в ядро [98]. В случае вирусов H1N1<sub>pdm09</sub> такие замены не наблюдали, а их введение не приводило к увеличению патогенности. В PB1 вирусов H1N1<sub>pdm09</sub> обнаружили замены R590S и R591S, которые влияют на взаимодействие с вирусными и/или клеточными факторами, и, следовательно, на способность реплицироваться в клетках млекопитающих [144]. Также описан целый ряд мутаций в PB1, PA, NP и NEP, усиливающих активность полимеразы ВГА птиц в клетках млекопитающих.

**PB1-F2.** PB1-F2 вносит вклад в патогенность пандемических и птичьих ВГА, вызывая индукцию апоптоза инфицированных клеток и усиливая тяжесть вторичных пневмоний [55]. Показано, что замена S66N в PB1-F2 приводит к снижению продукции IFN [344]. В вирусах H1N1<sub>pdm09</sub> OPC PB1-F2 нарушена 3 стоп-кодонами, однако ее восстановление лишь незначительно влияет на патогенность вируса в мышинной модели инфекции [286].

**PA-X.** PA-X регулирует противовирусный ответ, подавляя экспрессию клеточных генов. Дефектные по OPC PA-X вирусы вызывают более тяжелое заболевание у мышей в результате раннего усиленного противовирусного ответа хозяина. Было высказано предположение о видоспецифичности эволюции PA-X [298].

**NS1.** NS1 рассматривается как молекулярная детерминанта патогенности, являясь антагонистом IFN [136]. Вирусы с удаленной OPC NS1 при сохранении OPC NEP, способны размножаться в клетках и мышах, дефектных по IFN-ответу [107]. Повышенная устойчивость вирусов птиц H5N1 к противовирусному действию IFN определяется заменой E92D в NS1. Эта мутация была определена как детерминанта патогенности ВГА у свиней [291]. Еще одной детерминантой патогенности ВГА является расположенный на С-конце NS1 PDZ-связывающий

домен типа X-S/T-X-V, наличие которого увеличивает вирулентность вируса [120].

**Нейраминидаза.** Баланс между активностями HA и NA является критическим для вирусной репликации и трансмиссивности [357]. Известны 2 случая, когда NA стимулирует дополнительные механизмы, вызывающие расщепление HA. В первом случае NA нейровирулентного лабораторного штамма A/WSN/33 привлекает плазминоген, который после превращения в плазмин расщепляет HA в отсутствие трипсина. Во втором случае NA вируса H1N1<sub>1918</sub> позволяет вирусу реплицироваться в отсутствие трипсина [123]. Кроме того, NA играет критическую роль в высокой вирулентности пандемического вируса H1N1<sub>1918</sub> в мышах [339]. Сравнение летального и нелетального вирусов H7N7 человека выявило наличие 4 аминокислотных замен в NA, которые увеличивали ее активность, приводящую к более эффективной репликации в клетках млекопитающих, вероятно, предотвращая образование вирусных агрегатов [286]. Другим примером фактора патогенности ВГА является усиливающая его вирулентность делеция в области стебля NA, возникшая в процессе адаптации вируса от диких к домашним птицам [286].

#### **1.3.4. NS1 – ключевой вирусный белок, регулирующий взаимодействия между вирусом и хозяином**

Белок NS1 кодируется 8-ым сегментом генома ВГА. В процессе транскрипции по механизму альтернативного сплайсинга образуется не менее двух мРНК, кодирующих белки NS1 и NEP [348]. Обе мРНК имеют 56 общих нуклеотидов на 5'-конце, в результате чего кодируемые ими белки содержат 10 общих N-концевых аминокислот [107]. Экспрессия NS1 в инфицированных клетках поддерживается на высоком уровне: уже через два часа после заражения наблюдается характерное увеличение мРНК NS1 [275]. NS1 считался

неструктурным белком ВГА [297], однако по последним данным он входит в состав вирусных частиц [150].

Внутриклеточная локализация NS1 может различаться в зависимости от штамма вируса, типа клеточной линии, времени после инфицирования, а также уровня экспрессии самого белка. В инфицированных клетках NS1 преимущественно локализуется в ядре, но на поздних стадиях инфекции значительное его количество обнаруживается в цитоплазме [136]. В зависимости от штамма вируса NS1 имеет один или два сигнала ядерной локализации (NLS1 и NLS2). При взаимодействии с клеточным белком импортином- $\alpha$  NLS отвечают за активный транспорт NS1 в ядро. Сигнальная последовательность NLS1 высоко консервативна и включает в себя R35, R38 и K413, также участвующие в связывании двунитевой РНК (днРНК) [126]. Напротив, С-концевая сигнальная последовательность NLS2 содержит K219, R220, R231 и R232, присутствующие не у всех белков NS1 [126]. Существует также конкурирующая с NLS2 последовательность сигнала ядрышковой локализации (NoLS), которая содержит дополнительные основные остатки R224 и R229 [284].

Цитоплазматическая локализация NS1 регулируется тремя механизмами. Во-первых, это секвестрирование новосинтезированного белка в цитоплазму при помощи клеточных или вирусных белков, которые маскируют NLS [284]. Во-вторых, в цитоплазматическом транспорте участвует сигнал ядерного экспорта (NES), расположенный между 138 и 147 а.о. и требующий наличия L144 и L146, которые обычно «маскируются» близлежащими остатками в положениях 148-161 [196]. 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 механизмами, до сих пор не установлены, но

есть основания полагать, что специфические клеточные факторы играют ключевую роль в определении внутриклеточной локализации белка [41]. Например, возможна регуляция белка NS1 в процессе фосфорилирования, так как мутация в потенциальном сайте фосфорилирования S195 приводит к задержке NS1 в ядре [40]. В целом, различное внутриклеточное распределение NS1 в течение всей инфекции необходимо для реализации его различных функций [136].

Белок NS1 имеет относительно малые размеры и у большинства ВГА его длина составляет не более 237 а.о. В структуре NS1 выделяют два функционально различимых домена: N-концевой РНК-связывающий (RBD) и С-концевой эффекторный (ED) домены, которые соединены между собой гибкой линкерной областью (рисунок 1.7). Кроме того, в молекуле NS1 имеется короткий С-концевой хвост. NS1 преимущественно функционирует в виде димеров, которые образуются за счет формирования ионных связей [49]. NS1 также способен к олигомеризации в присутствии молекул днРНК [49, 131]. N-концевой RBD длиной 73 а.о., образованный 3  $\alpha$ -спиральными участками, содержит NLS1 и сайт распознавания днРНК [131]. Антипараллельные  $\alpha$ -спирали  $\alpha 2$  и  $\alpha 2'$  в димере NS1 связываются с большой бороздкой днРНК посредством нескольких основных аминокислот, в частности R38 и K41 [131]. Следует отметить, что такая структура, состоящая из двух антипараллельных основных  $\alpha$ -спиралей, характерна для многих РНК-связывающих белков, действующих в форме димера.

С-концевой домен 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 3  $\alpha$ -спиралей и 7  $\beta$ -нитей [40]. Последние формируют большой антипараллельный  $\beta$ -слой, окружающий одну сторону длинной  $\alpha$ -спирали  $\alpha 5$ . Пространственная структура ED содержит высоко консервативный набор заряженных экспонированных на поверхность аминокислот.

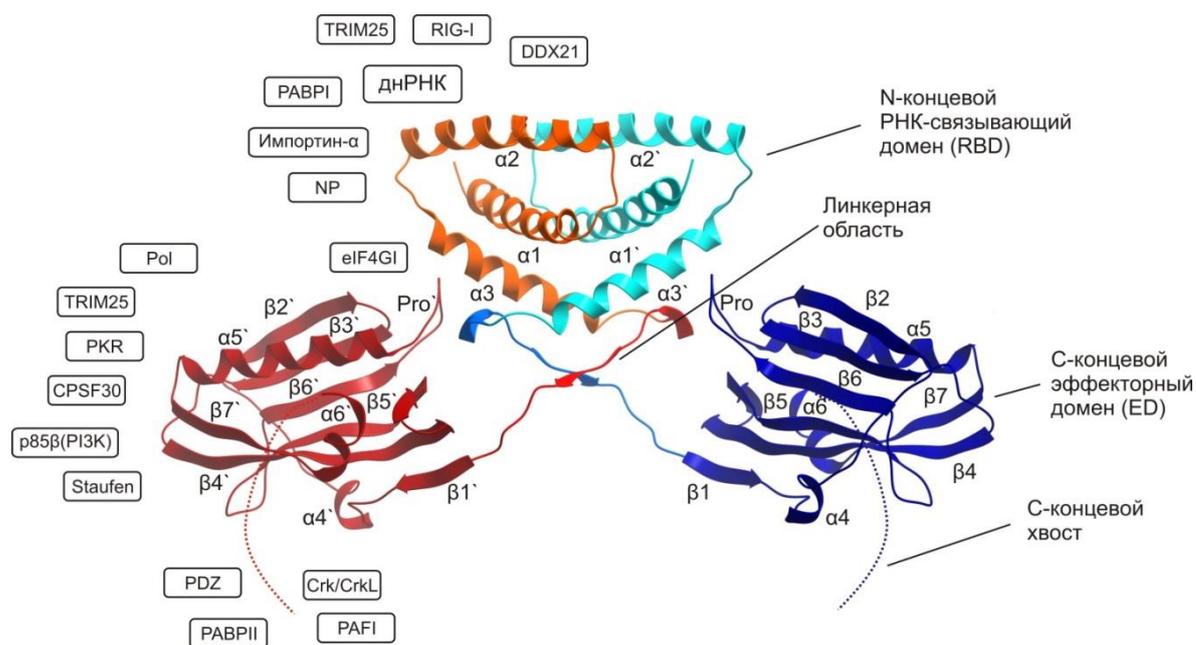


Рисунок 1.7 – Модель димера NS1 ВГА, полученная на основе кристаллической структуры белка (PDB 4OPH)

Мономер слева выкрашен оранжевый (РНК-связывающий домен), красный (линкерная область), вишнёвый (С-концевой ED домен) цвета. Аналогичные домены мономера справа выкрашены в светло-голубой, синий и тёмно-синий соответственно. Пунктирной линией обозначен С-концевой хвост.  $\alpha 1-5$  и  $\alpha' 1-5$  –  $\alpha$ -спирали (имеют координаты 2-25, 29-50, 54-70, 94-100, 170-188, 195-202 а.о., соответственно).  $\beta 1-7$  и  $\beta' 1-7$  –  $\beta$ -нити (имеют координаты 88-91, 107-112, 115-120, 127-137, 140-151, 156-162, 191-194 а.о., соответственно). Pro и Pro' – пролин-богатая петля (координаты 162-170 а.о.). В прямоугольниках показаны клеточные и вирусные факторы, с которыми взаимодействует NS1.

Длина С-конца NS1 отличается у различных штаммов [136]. На С-конце NS1 имеется два SH-связывающих домена типов SH2 и SH3 [299]. Оба домена специфически взаимодействуют с регуляторной субъединицей p85 $\beta$  фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) [194]. Активация опосредованного ей сигнального пути играет ключевую роль в обеспечении вирусной репликации [79]. Особенно важной является антиапоптозная функция активации PI3K, так как действие IFN направлено на индукцию апоптоза инфицированных клеток [81].

Большинство белков NS1 на С-конце имеют PDZ-связывающий мотив [159]. Он играет ключевую роль в активации сигнальных путей, обеспечивающих противостояние действию IFN и приводящих к активации клеточных генов, поддерживающих репродукцию вируса [34, 120].

Показано, что молекулы NS1 обладают конформационным полиморфизмом. Он заключается в различной ориентации ED относительно RBD, которая приводит к трем возможным конформациям белка: открытой, полуоткрытой и закрытой [49]. Ключевую роль в образовании таких структур вносят длина линкерной области и аминокислота в положении 71 [49]. Такая конформационная подвижность зависит от стадии инфекции, внутриклеточной локализации и пост-трансляционных модификаций NS1.

NS1 является одним из наиболее многофункциональных белков ВГА (таблица 1.2). NS1 взаимодействует с множеством клеточных белков и участвует в регуляции сплайсинга, экспорте и трансляции вирусных мРНК, противодействии системам клеточного противовирусного ответа [136]. Наибольший прогресс в понимании роли белка NS1 был достигнут с появлением методов системной биологии [252]. Одна из первых фундаментальных работ по комплексной оценке роли гена *NS* в жизненном цикле ВГА была опубликована в 2002 году [117]. Авторы с помощью кДНК микрочипа определили профили экспрессии генов эпителиальных клеток легкого A549, инфицированных вирусами A/PR/8/34, содержащими полноразмерную и укороченную OPC NS1 (wtNS1 и  $\Delta$ NS1 вирусы, соответственно). Инфекция вирусом wtNS1 в отличие от  $\Delta$ NS1 приводила к значительной индукции генов, вовлеченных в IFN путь. Использование дефектного по OPC NS1 вируса позволило оценить вклад этого гена в клеточный ответ на уровне мРНК. В дальнейшем было показано, что на клеточный ответ на ВГА инфекцию значительное влияние оказывает последовательность гена NS1 [168].

Помимо оценки профиля экспрессии генов много данных было получено с использованием различных методов анализа белок-белковых взаимодействий [54,

294, 331, 361, 383]. В настоящее время известно более 100 клеточных белков, с которыми может взаимодействовать NS1, но их исчерпывающий список далек от формирования [24, 210, 331]. Это связано не только с применением новых методов и подходов, но и с тем, что взаимодействующие с NS1 белки могут отличаться для разных штаммов ВГА из-за полиморфизмов в аминокислотной последовательности NS1.

Клеточные и вирусные партнеры NS1 можно разделить на 4 группы [24, 210, 331]. Первая группа включает ядерные белки, задействованные в созревании и экспорте клеточных мРНК из ядра в цитоплазму, такие как 30 кДа субъединица фактора специфического расщепления и полиаденилирования (CPSF30), поли(А)-связывающий белок II (PABPII), фактор ядерного экспорта РНК 1 (NXF1/TAP), нуклеолин, NS1-ВР, днРНК-специфическая аденозин-дезаминаза 1 (ADAR1), РНК геликазы DDX9 и DDX21, фактор процессинга пре-мРНК 19 (PRPF19). Вторая группа включает белки цитоплазмы, участвующие в транспорте и трансляции мРНК: днРНК-связывающий белок hStaufen, фактор инициации трансляции eIF4GI, поли(А)-связывающий белок I (PABPI), импортин- $\alpha$ . В третью группу входят белки, участвующие в сигналинге и механизмах противовирусной защиты, такие как геликаза RIG-I, трипартит-мотив-содержащий белок 25 (TRIM-25), РНК-активируемая протеинкиназа (PKR), активатор PKR (PACT), PI3K, PDZ-содержащие белки, белок теплового шока 90 (HSP90), ядерный фактор NF90. В четвертую группу входят белки ВГА: РНК-полимераза и NP. Большинство из белков взаимодействует с областью ED NS1. Некоторые белки, например, изоформы импортин- $\alpha$ , напрямую связываются с RBD, в то время как другие взаимодействуют через связанную днРНК, либо находясь в составе белковых комплексов [210, 211]. Необходимо учитывать, что взаимодействия определяются полиморфизмами в белковой последовательности NS1.

Подробное описание структуры и функций NS1 представлено в многочисленных обзорах [131, 136, 210].

Таблица 1.2 – Структурные и функциональный домены и сайты в NS1 ВГА [243]

Домен	Длина	а.о.	Описание	Ссылка
RBD	73	1..73	N-концевой RBD отвечает за связывание с молекулами РНК и взаимодействие с RIG-I (через днРНК, PABPI и импортин- $\alpha$ )	[57, 136, 378]
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	[58, 362, 378]
Интерфейс димеризации RBD	6	12,19,29,32, 35,46	Димеризация RBD необходима для реализации РНК-связывающей активности	[200, 362]
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 импортина- $\alpha$	[126, 221]
Детерминанта вирулентности; тканевой тропизм	1	42	Введение замены P42S 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 IFN путь	[160]

Междоменный линкер	13	74..86	Подвижный линкер между RBD и ED. Может варьироваться по длине. Делеция 5 а.о. часто встречается современных изолятах вирусов H5N1	[40]
Детерминанта вирулентности	5	80..84	Введение искусственной делеции из 15 нуклеотидов в рекомбинантном вирусе A/WSN/33/(H1N1) х A/Duck/Shangdong/093/2004(H5N1) (HA,NA) привело к увеличению вирулентности у мышей	[205, 291]
Сайт взаимодействия с eIF4GI	33	81..113	Взаимодействие NS1 с eIF4GI может приводить к предпочтительной трансляции вирусных мРНК	[19]
Эффекторный домен (ED)	117	87..203	ED опосредует взаимодействия с несколькими клеточными белками и может стабилизировать RBD	[40, 66, 132, 136]
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	[81, 101, 133, 134, 299]
Детерминанты	5	90..94	Делеция пяти аминокислот, расположенных внутри области	[391]

патогенности; детерминанты вирулентности			eIF4GI-связывающего домена NS1, увеличивает вирулентность и патогенность вирусов H5N1	
Детерминанты вирулентности	10	90..99	Укорочение eIF4GI-связывающего домена аттенуирует вирусную репликацию <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	[391]
Детерминанта патогенности	1	92	Внесение замены E92D в вирус А/НК/156/97 усиливало его устойчивость к цитокинам	[291]
Сайт взаимодействия с TRIM25	2	96,97	Сайт необходим для взаимодействия с TRIM25 и ингибирования RIG-I; важен для активации PI3K (вероятно осуществляя прямой контакт с петлей активации p110 [134])	[99]
Детерминанты вирулентности	1	101	Вирулентность штаммов НК156 у мышей определяется аминокислотными заменами в НА (211), PB1 (456 and 712), PA (631), NP (127) и NS1 (101)	[99]
Тканевой тропизм; Детерминанта вирулентности	2	103,106	Введение замен L103F и I106M в вирус А/НК/483/1997 усилило его вирулентность по сравнению с вирусом дикого типа по показателю летальности у мышей	[185, 307]
Сайт связывания CPSF30	28	103, 105..110, 117,119..126,	Необходим для связывания CPSF30 и ингибирования посттранскрипционного 3`-концевого процессинга клеточных	[66, 137, 179, 239,

		151,153, 155..157,180, 181,183,184, 187..189	пре-мРНК	343]
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>	[132, 134]
Сайт связывания PKR	4	123,124,126, 127	Необходим для взаимодействия с PKR, приводящего к ингибированию фосфорилирования eIF2 $\alpha$	[224]
Детерминанта патогенности	1	125	Мутация D125G вызывает высокую патогенность у мышей на последнем 10-м пассаже и также вызывает усиленную способность к связыванию $\alpha$ 2,3- и $\alpha$ 2,6-SA	[232]
NES	11	137..147	L144 и L146 существенны для активности NES	[196]
Сайт маскирования NES	14	148..161	Последовательность сайта ингибирует активность NES. R148, E152 и E153 критичны для функционирования данного сайта	Li <i>et al.</i> , 1998)
Детерминанта	1	171	Мутация A171Y приводит к снижению экспрессии IFN и IFN-	[256]

патогенности			стимулируемых генов в клетках A549	
Подвижный хвостовой домен	27	204..230	Подвижный хвост вероятно является неструктурированным и переменным по длине. Он содержит ряд мотивов, в том числе CDK/ERK фосфорилирования, Crk/CrkL SH3 связывания, PDZ лиганд и NoLS/NLS2	[132]
Детерминанты патогенности	2	205,21	Аминокислотные остатки в положениях 200 и 205 NS1 вносят вклад в повышенную IFN типа I антагонистическую активность. Аминокислотные отличия в положениях 134 HA, 200 и 205 NS1, и 47 и 51 NS2 вызывают отличия в вирулентности между высоко- и низкопатогенными вирусами H5N1	[155]
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 пандемическом вирусе человека 1918 года	[143]
Сайт фосфорилирования	6	213..217,219	Thr215 фосфорилируется киназами CDKs/ERKs. Необходим для эффективной вирусной репликации в культуре тканей.	[135]
Сигнал ядерной локализации 2	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.	[126, 221]

(NLS2)			формируют NoLS у некоторых штаммов	
Сайт связывания PABPII	15	223..237	Соответствует PABPII-связывающей области NS1. Может быть вовлечен в ингибирование пост-транскрипционного 3`-концевого процессинга клеточных пре-мРНК	[56, 195]
Тканевой тропизм; Клинические симптомы заболевания	5	226..230	Встраивание этого мотива в С-концевую область NS1 вируса А/WSN/33 приводило к существенному снижению веса животных по сравнению с вирусом дикого типа. Вирус вызывал тяжелый альвеолит и геморрагию в тканях легких мышей	[159]
Мотив PDZ лиганда	4	227..230	Связывает PDZ домен-содержащие белки. С-концевой PDZ-связывающий мотив обнаруживается преимущественно у птичьих изолятов (обычные варианты включают ESEV/EPEV/KSEV у ВГА птиц)	[159, 199, 244, 305, 392]
С-концевое расширение	7	231..237	Функция неизвестна, но может вносить вклад в NoLS/NLS2. Мотив превалировал среди вирусов, выделенных с 1950 по 1987 год	[221]

## **1.4. Молекулярно-биологические механизмы цикла репликации вируса гриппа типа А и роль в них клеточных факторов**

### **1.4.1. Связывание вируса с клеточной поверхностью**

Процесс вхождения ВГА в клетку состоит из нескольких этапов (рисунок 1.8), в которых задействованы различные клеточные факторы, часть из которых приведена в таблице 1.3. Сначала вирус должен распознать специфический клеточный рецептор на поверхности инфицируемой клетки:  $\alpha 2,3$ - и  $\alpha 2,6$ -SA, ковалентно связанные с олигосахарами поверхностных клеточных гликозилированных белков или гликолипидов [384]. ВГА человека преимущественно связывается с  $\alpha 2,6$ -SA, а ВГА птиц в основном узнает  $\alpha 2,3$ -SA, распространенные у птиц (рисунок 1.9). У человека  $\alpha 2,6$ -SA встречаются в эпителии верхних дыхательных путей, а  $\alpha 2,3$ -SA – нижних дыхательных путей [238, 272, 300]. Было показано, что вирусы птиц H5N1 могут инфицировать культуры тканей назофарингеального и орофарингеального эпителия человека *ex vivo* несмотря на малочисленность  $\alpha 2,3$ -SA [238], что может свидетельствовать о наличии других сайтов связывания на поверхности эпителиальных клеток. Вместе с тем другие специфические клеточные рецепторы ВГА не обнаружены [47].

Логично предположить, что факторы, контролирующие экспрессию и специфичность олигосахаридных структур в тканях человека, могут вносить вклад в чувствительность хозяина к вирусам и/или в степень развития инфекции в верхних или нижних дыхательных путях. За образование  $\alpha 2,3$ -SA структур в клетках легких отвечает фермент ST3  $\beta$ -галактозамид- $\alpha$ -2,3-сиалилтрансфераза 1 (ST3GAL1), в то время как  $\alpha 2,6$ -SA структуры преимущественно образуются при участии ST6  $\beta$ -галактозамид- $\alpha$ -2,6-сиалилтрансферазы 1 (ST6GAL1) [384]. Показано, что в клетках MDCK, в которых повышен уровень экспрессии гена *ST6GAL1*, значительно увеличена восприимчивость к ВГА человека, и они продуцируют большее число вирусного потомства по сравнению с немодифицированными клетками [216, 245].

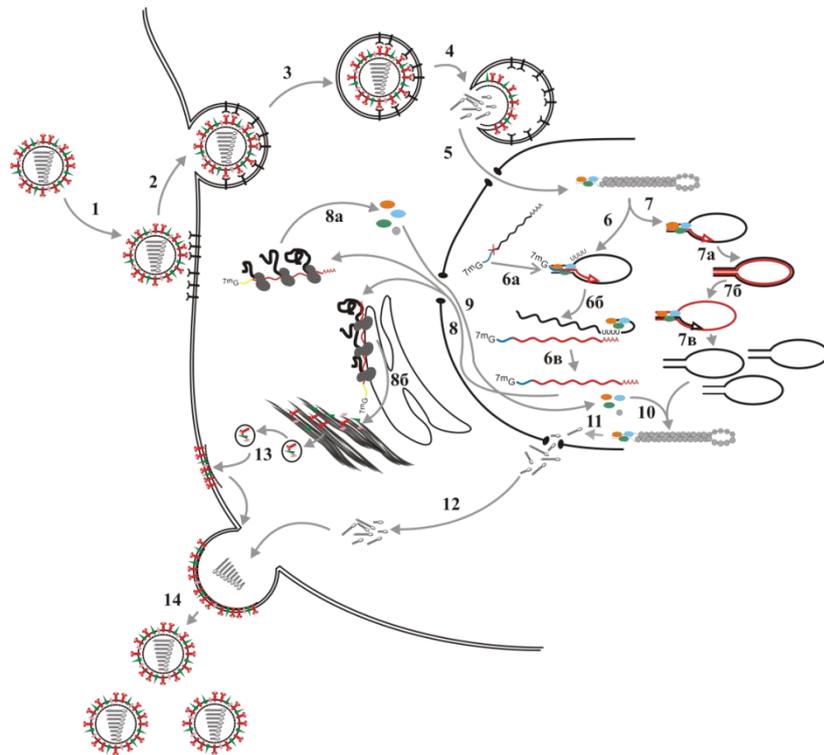


Рисунок 1.8 – Жизненный цикл вируса гриппа А

НА ВГА узнает SA рецепторы на поверхности клеток (1), после чего происходит интернализация вируса в процессе эндоцитоза (2, 3). рН-зависимое конформационное изменение НА приводит к слиянию мембран вируса и эндосомы, vРНП высвобождаются в цитоплазму (4) и транслоцируются в ядро (5). В результате исходного раунда транскрипции (6) образуются 5`-кэпированные и 3`-полиаденилированные вирусные мРНК (6в), транслоцируемые в цитоплазму для трансляции (8). Затем vРНК реплицируются с образованием промежуточной кРНК (7). Транскрипция мРНК зависит от процесса «похищение кэпов» от ядерных пре-мРНК (6а). Терминация транскрипции происходит в результате «пробуксовки» РНК-полимеразы на поли(U) участке, что приводит к образованию полиА хвоста (6б). Репликация vРНК является праймер-независимой реакцией (7а) и терминируется «соскакиванием» транскрипции с матрицы vРНК при образовании полноразмерной кРНК (7б). После образования vРНП внутри ядра (10) М1, NР и NР катализируют их транспорт в цитоплазму по CRM1-зависимому пути (11). М1-vРНП комплексы направляются к участкам апикальной плазматической мембраны (12), на которых аккумулированы НА и NA (13). М1 взаимодействует с цитоплазматическими хвостами гликопротеинов, что приводит к сборке и почкованию вирионов. Окончательное высвобождение от клеточной поверхности зависит от сиалидазной активности вирусной NA (14).

Таблица 1.3 – Клеточные факторы, задействованные в основных стадиях жизненного цикла ВГА [296]

Стадия жизненного цикла ВГА	Клеточные факторы
Связывание вируса	SA
Интернализация вируса	Клатрин, епсин-1, динамин, EGFR, PLCc1, MAPK1, MAPK8, PAK1, PI3K, киназы семейства Src, FAK/PTK2
Эндосомальный трафик	Актин, динеин, RAB5, RAB7, пролидаза, HDAC8, Cullin-3/SPOPL, PKC
Слияние оболочки вируса с мембраной эндосомы	v-АТФазный комплекс, RNASEK, CD81, катепсин W, TMPRSS2, HAT
Раздевание вирусной частицы	ITCH, HDAC6
Импорт ВРПП в ядро	кариоферин/импортин, HSP40/DNAJB1
Транскрипция	RNA POL II, CHD1, NXP2/MORC3, RRP1B, SFPQ, DDX19
Синтез РНК	Циклин T1/CDK9, hCLE/C14ORF166, DNAJA1
Репликация	ANP32A/PP32, ANP32B/APRIL
Сплайсинг NS1	RED, SMU1
Сплайсинг M1	SF2/ASF, CLK1, NS1-BP, hnRNPK
Ядерный экспорт ВРПП	CRM1/XPO1, AIMP2, HSC70, NXT1, CHD3, PRC2, нуклеолин, CLUH, RAF/MEK/ERK путь, SK1, RANBP3, SGK1, CASPASE 3
Транспорт РНК	RAB11A/RAB11B, YB-1, HRB
Транспорт мембранных белков ядерный фактор NF90	SEC61, CDC42, UBR4, TRAPPC6A, COPI
Сборка/почкование вирусных частиц	Актин, кофилин, CD81, RACK1, F1F0-АТФаза

Клетки хозяина могут предотвращать присоединение вируса путем мукоцилиарного очищения или продукции мукопротеинов, способных связываться с вирусным НА [215]. Эту функцию выполняют относящиеся к коллектинам белки сурфактанта А1 и D, и манноза-связывающий лектин 2 (MBL2) [384]. К содержащим остатки SA гликопротеинам или протеогликанам, конкурирующим за связывание с клеточными рецепторами ВГА, относят  $\alpha$ 2-макроглобулин, компонент сывороточного амилоида P (APCS), DMBT1, и муцины, кодируемые разными генами *MUC* [384]. Показано, что полиморфизмы в генах *MBL2*, *SFTP A1* и *SFTP D* связаны с развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [215, 384].

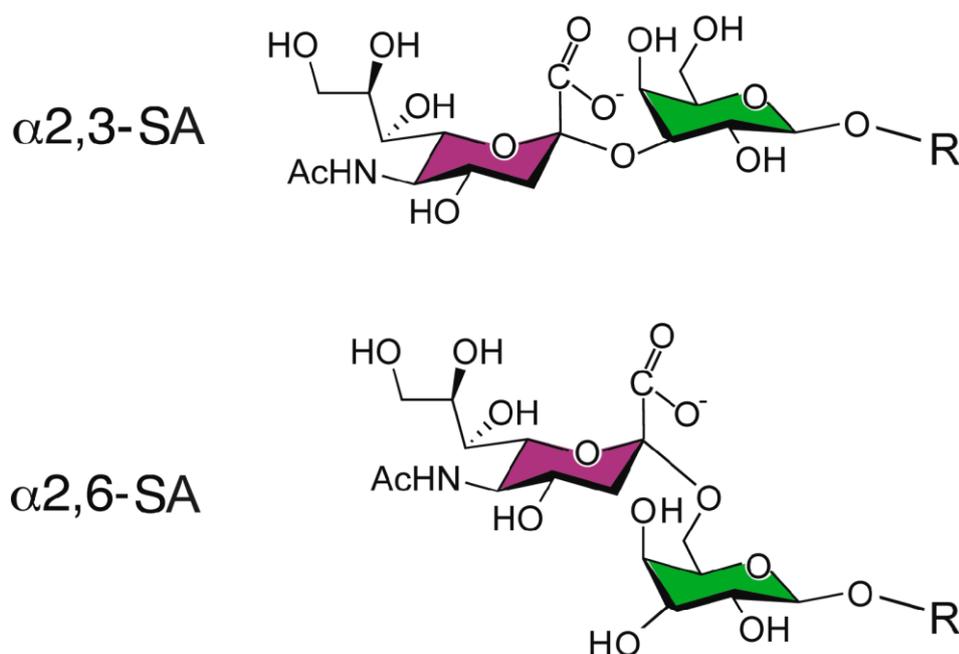


Рисунок 1.9 – Клеточные рецепторы ВГА птиц и млекопитающих [47]

НА узнает гликановые структуры, на конце которых находится *N*-ацетилнейраминная (сиаловая) кислота (SA). Связь, по которой SA присоединена к галактозе, является детерминантой видоспецифичности. Для ВГА птиц характерна  $\alpha$ 2,3 связь ( $\alpha$ 2,3-SA), для ВГА млекопитающих –  $\alpha$ 2,6 связь ( $\alpha$ 2,6-SA).

Еще одним путем предотвращения связывания вируса с клеточным рецептором является продукция экзосом. Показано, что трахеобронхиальные

эпителиальные клетки человека секретируют экзосомы, обогащенные  $\alpha 2,6$ -SA, но не  $\alpha 2,3$ -SA сахарами, в основном ассоциированными с муцинами [175]. При этом в экспериментах *in vitro* было показано, что препарат таких экзосом нейтрализует инфекционность ВГА до 85–99% [175].

#### 1.4.2. Вхождение вируса в клетку

Связывание вирусной частицы с клеточной поверхностью вызывает эндоцитоз, приводящий к формированию эндосомы, в которую инкапсулирован вирион [94]. Эндоцитоз может быть как клатрин-зависимым, так и независимым [367]. Эндосома далее транслоцируется в сторону клеточного ядра, и в результате вызванного активностью белка М2 закисления в поздних эндосомах происходит слияние эндосомальной и вирусных мембран, ключевая роль в котором принадлежит тримеру НА. В процессе эндосомального транспорта задействованы ГТФазы RAB5, RAB7/РКСβII, RAB10, и комплекс везикулярного транспорта COP1 [367]. Слияние мембран, необходимое для выхода ВРНП в цитоплазму, происходит только после расщепления НА клеточными протеазами на две субъединицы НА1 и НА2 и экспонирования пептида слияния, расположенного на N-конце НА2 [94]. Как было сказано ранее, сайт расщепления НА является одной из детерминант патогенности и клеточного тропизма ВГА [311]. НА ВГА человека и низкопатогенных вирусов птиц содержит в сайте расщепления консенсусный мотив, разрезаемый трипсин-подобной протеазой. У человека такой протеазой, присутствующей в дыхательных путях или жидкостях, могут быть трансмембранные протеазы TMPRSS2, TMPRSS11D и TMPRSS4, а также плазмин [50]. У высокопатогенных ВГА птиц в сайте расщепления НА имеется инсерция, вследствие которой разрезание происходит под действием более распространенных субтилизин-подобных протеаз (фурин, PCSK5 и TMPRSS13), что позволяет этим вирусам инфицировать различные типы клеток и вызывать системную инфекцию [384]. Помимо клеточных, бактериальные протеазы также

могут активировать НА, что может играть роль в синергизме вирусной и бактериальной ко-инфекции [322]. Активность клеточных протеаз можно ингибировать, например, с помощью клеточных белков SLPI в верхних дыхательных путях, и SFTPA1 и SFTPD – в нижних [177]. В результате слияния мембран сегменты vRNP транслицируются в ядро, где происходит транскрипция и репликация вирусного генома.

### 1.4.3. Транскрипция генома вируса гриппа типа А

Синтез вирусных мРНК осуществляется действующей в *цис*-положении РНК-полимеразой, которая связывается с промотором, расположенным в области 5'- и 3'-концевых мотивов vRНК длиной 13 и 12 нуклеотидов, соответственно. Они являются консервативными для всех ВГА и обладают частичной инвертированной комплементарностью. Промоторная область vRНК имеет структуру типа «штопор», состоящую из внутреннего стебля, состоящего из 5-7 комплементарных пар оснований (в зависимости от сегмента), и концевых участков в форме динуклеотидной шпильки и петли. Эта концевая структура необходима для связывания комплекса РНК-полимеразы.

После того как vRNP попадает в ядро, РНК-полимераза, входящая в состав vRNP и связанная с концом vRНК, синтезирует 5'-кэпированные и 3'-полиаденилированные вирусные мРНК. Для этого используется механизм «похищения кэпов», согласно которому РНК-полимераза использует в качестве затравок для транскрипции 5'-кэпированные концевые фрагменты клеточных РНК. При этом преимущественно используются некодирующие РНК (малые ядерные РНК, малые ядрышковые РНК, промотор-ассоциированные кэпированные малые РНК), а не мРНК или пре-мРНК [128]. Процесс «похищения кэпов» осуществляется РНК-полимеразой, находящейся в конформации преиницирующего комплекса транскрипции, в котором кэп-связывающий домен РВ2 и эндонуклеазный домен РА ориентированы так, чтобы полимераза могла

связать и расщепить экпированные РНК хозяина [351]. Для этого РНК-полимераза связывается с клеточной РНК-полимеразой II (Pol II). В результате расщепления клеточных РНК на расстоянии около 10-13 нуклеотидов от 5`-кэпа образуются экпированные праймеры со свободной 3`-гидроксильной группой, которые транслоцируются из эндонуклеазного в полимеразный активный сайт РНК-полимеразы через канал для вновь синтезированной вирусной мРНК [351]. Этот перенос, вероятно, осуществляется за счет вращения экп-связывающего домена полимеразы [269]. Соответственно, 3`-конец вРНК-матрицы должен также переместиться из расположенного на поверхности РНК-полимеразы сайта связывания в ее активный сайт через канал для вхождения вРНК-матрицы для транскрипции. 3`-конец вРНК стабилизируется в активном полимеразном сайте в результате взаимодействия с экпированным РНК-праймером или связывания иницирующего нуклеотида [351].

Транскрипция вирусных мРНК обычно начинается с добавления к 3`-концу экпированного праймера нуклеотида G, комплементарного предпоследнему нуклеотиду C на 3`-конце матрицы вРНК, кроме того, возможно добавление нуклеотида C, комплементарного нуклеотиду G в третьем положении матрицы вРНК [351]. Считается, что для инициации транскрипции предпочтительны праймеры с динуклеотидом CA на 3`-конце, однако структурное обоснование этого факта неизвестно. Четыре консервативных остатка на вершине праймирующей петли в активном сайте полимеразы избыточны для этого процесса, так как их удаление не влияет на инициацию транскрипции [350].

В настоящее время не ясно, как полимеразы копируют матрицу вРНК, находящуюся в составе вРНП. Вероятно, происходит только локальная перестройка спирали NP, когда РНК-полимераза отрывает вРНК от NP в активный сайт. Близость каналов вхождения и выхода РНК-матрицы согласуется с моделью, в которой вРНК диссоциирует от NP, переносится через входной

канал в активный сайт полимеразы и затем ре-ассоциирует с NP на выходе из канала [351].

Элонгация транскрипции происходит до последовательности, содержащей 5-7 U, которая обычно расположена на расстоянии 16 нуклеотидов от 5'-конца матрицы вРНК. Поли(U) последовательность выступает в качестве сигнала полиаденилирования. Предполагается, что РНК-полимераза при элонгации транскрипции остается связанной с 5'-концом вРНК, а матрица вРНК протягивается через активный сайт полимеразы в направлении  $3' \rightarrow 5'$ . Синтез мРНК продолжается до тех пор, пока полимеразы не достигнет участка поли(U) последовательности вРНК, на которой происходит ее пробуксовка, приводящая к синтезу поли(A) хвоста. Пробуксовка объясняется тем, что вРНК не может дальше проходить через активный центр полимеразы по причине стерического препятствия, а именно 5'-конца вРНК, связанного с полимеразой. Интересно, что если заменить поли(U) последовательность на поли(A), то это приведет к появлению мРНК с поли(U) хвостами [260].

Возвращение скопированного 3'-конца вРНК матрицы в исходное положение в области поверхности полимеразы и его комплементарное спаривание с 5'-концом потенциально способствуют «запиранию» 5'-конца в активном сайте РНК-полимеразы, тем самым препятствуя его высвобождению во время полиаденилирования. В момент инициации транскрипции 5'-кэп связан с кэп-связывающим доменом РВ2. Однако, как только полимеразы входят в стадию элонгации, кэп высвобождается и далее связывается клеточным ядерным кэп-связывающим комплексом (СВС), после чего запускается сборка вирусной мРНК в клеточную мРНК-подобную структуру [380] при участии дополнительных клеточных факторов, необходимых для экспорта из ядра, таких как комплекс TREX и NXF1/TAP [265].

Связывание РНК-полимеразы с РоIII, вероятно, необходимо не только для доступа к кэпам клеточных РНК, но и для «заимствования» факторов ядерного

экспорта мРНК и машинерии сплайсинга, используемого при транскрипции генов *M* и *NS*. Для сплайсинга вирус использует клеточную машинерию, однако вирусные белки могут выполнять регуляторную роль. В частности, NS1 участвует в регуляции соотношения альтернативно сплайсированных мРНК, кодируемых сегментом 7. Так как вирус гриппа использует для трансляции как безынтронные мРНК, так и сплайсированные и несплайсированные интрон-содержащие мРНК, вероятно, для разных типов мРНК требуются разные наборы клеточных факторов, осуществляющих ядерный экспорт и трансляцию мРНК.

После экспорта из ядра СВС, вероятно, заменяется в цитоплазме на фактор инициации трансляции eIF4E, хотя по некоторым данным трансляция может проходить и без участия eIF4E. ВГА также использует клеточную машинерию для трансляции мРНК. В селективном синтезе белков ВГА, вероятно, участвуют GRSF-1 и P58IPK [121, 166]. Обнаружено несколько клеточных генов, вовлеченных в формирование комплекса инициации трансляции и малой субъединицы рибосомы: *FAU*, *EIF3S5*, *RPS3A*, *RPS4X*, *RPS10*, *RPS14*, *RPS5*, *RPS16*, *EIF4A2*, *RPS20* и *EIF3S8*. Возможно, что некоторые из кодируемых этими генами белков вызывают вирус-специфическую трансляцию путем ингибирования трансляции клеточных мРНК и/или стимулирования трансляции вирусных мРНК.

#### 1.4.4. Репликация генома вируса гриппа типа А

Репликация генома ВГА состоит из двух этапов. На первом этапе геномная (–)-вРНК реплицируется в (+)-кРНК, а на втором этапе (+)-кРНК копируется в (–)-вРНК. кРНК представляет собой полноразмерную комплементарную копию вРНК, не содержащую 5`-кэп и 3`-поли(А) хвост (рисунок 1.10). По этой причине механизмы инициации и терминации синтеза кРНК и мРНК на одной и той же матрице вРНК должны отличаться друг от друга.

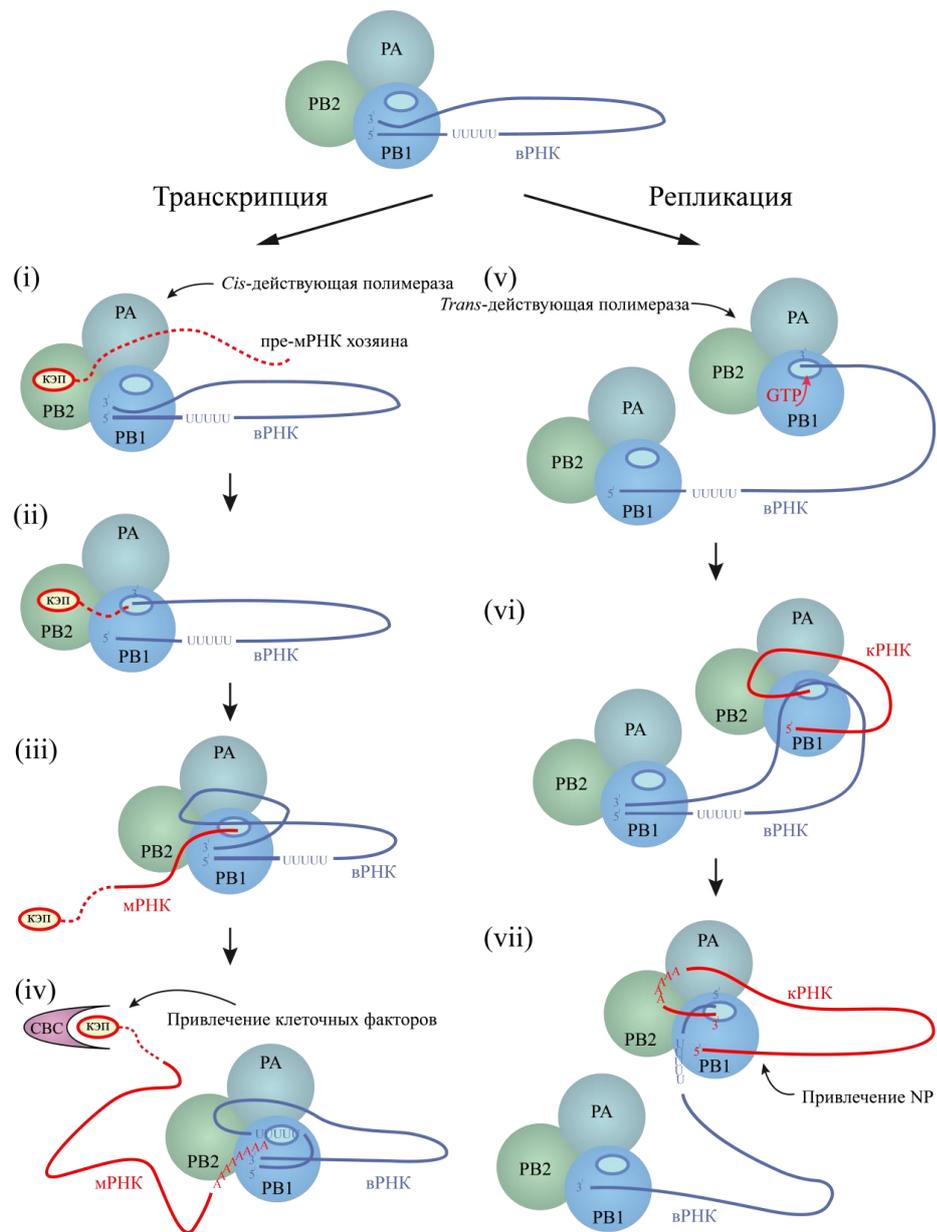


Рисунок 1.10 – Схема транскрипции и репликации vRNA ВГА [90]

*Пояснения в тексте*

Аналогично инициации транскрипции, инициация репликации требует транслокации 3'-конца vRNA в активный сайт РНК-полимеразы. В процессе инициации происходит образование динуклеотида pppAG, комплементарного нуклеотидам U1 и C2, расположенным на 3'-конце vRNA [68]. Как и в случае других *de novo* иницирующих РНК-полимераз образование динуклеотида на конце РНК-матрицы зависит от структурной поддержки праймирующей петли

[350]. Элонгация при репликации предположительно происходит аналогично синтезу мРНК с минимальным нарушением структуры вРНК. Однако, в отличие от транскрипции, во время терминации синтеза кРНК 5'-конец вРНК должен быть освобожден из связывающего кармана РНК-полимеразы, чтобы он мог быть скопирован. В настоящее время неясно, за счет чего это достигается.

Новосинтезированная кРНК собирается в кРНК комплекс, представляющий собой вРНК-подобную структуру, состоящую из вирусной РНК-полимеразы, связанной с 5'- и 3'-концами кРНК и NP, ассоциированным с остовом кРНК. Изображения выделенных кРНК, полученные методом электронной микроскопии, показали наличие закрученной двухспиральной структуры комплекса кРНК-NP, аналогичной вРНК [381]. Сборка кРНК в кРНК, вероятно, начинается, как только 5'-конец кРНК появляется из выходного тоннеля РНК-полимеразы и связывается с другой новосинтезированной РНК-полимеразой, которая привлекает первую молекулу NP за счет связывания с ней. Последующие молекулы NP рекрутируются за счет олигомеризации свободных и ассоциированных с кРНК мономеров NP [342]. Несколько механизмов, включая фосфорилирование и взаимодействие с клеточными факторами, в частности, импортинами, может быть использовано для поддержания NP в мономерной форме до его олигомеризации в составе РНК [161, 341].

На второй стадии репликации кРНК выступают в качестве матрицы для синтеза вРНК. На матрице кРНК происходит внутренняя инициация репликации на нуклеотидах U4 и C5 [68]. Динуклеотид rppAG комплементарно спаривается с остатками U1 и C2, расположенными на 3'-конце кРНК, выступая в качестве затравки для элонгации синтеза вРНК. Последние данные показывают, что полноразмерная праймирующая петля не является необходимой для внутренней инициации на матрице кРНК, возможно, по причине того, что 3'-UCG выступ вносит вклад в стабилизацию комплекса матрицы с динуклеотидом [350].

При этом репликация на матрице кРНК абсолютно зависит от присутствия дополнительной (внешней, не ассоциированной с кРНК) полимеразы. Было показано, что кРНК, выделенные из лизатов инфицированных клеток, приобретали активность *in vitro* только при добавлении внешней РНК-полимеразы, при этом не обязательно каталитически активной [381]. Вероятно, внешняя РНК-полимераза выполняет роль, которая не требует РНК-синтезирующей активности, и является скорее *транс*-активирующей, а не *транс*-действующей [381].

Можно предположить, что *транс*-активирующая РНК-полимераза индуцирует конформационную перестройку в *цис*-действующей РНК-полимеразе, способствующую переносу 3'-конца кРНК в активный сайт и/или внутренней инициации на 3'-конце кРНК. Можно предположить, что в состоянии покоя 3'-конец кРНК матрицы занимает тот же сайт, что и 3'-конец матрицы вРНК. В этой модели синтеза вРНК *транс*-активирующая РНК-полимераза будет также выполнять роль полимеразы, которая связывается с 5'-концом появляющейся насцентной вРНК и привлекает первый мономер NP для начала сборки вРНК. Этот процесс, вероятно, происходит сходным образом с тем, что было описано выше для кРНК. Альтернативная модель второй стадии репликации предполагает наличие каталитически активной *транс*-действующей РНК-полимеразы, вероятно, ассоциированной с малыми вирусными РНК (мвРНК). Она привлекается к *цис*-действующей РНК-полимеразе и получает доступ к 3'-концу матрицы кРНК, который попадает в активный сайт *транс*-действующей РНК-полимеразы, в котором происходит внутренняя инициация репликации на матрице кРНК по механизму, описанному выше. Однако, в этой модели *транс*-действующей РНК-полимеразы должна присутствовать еще одна РНК-полимераза, которая должна связываться с 5'-концом насцентной вРНК для инициации сборки вРНК. В подтверждение этой модели были получены электронно-микроскопические фотографии комплексов вРНК, имеющих

разветвленную структуру, в которой короткий вновь синтезируемый РНП отделялся от большого полноразмерного РНП [225].

#### 1.4.5. Регуляция транскрипции и репликации

В регуляции транскрипции и репликации вирусных РНК задействовано множество вирусных и клеточных факторов. Ранее предполагалось, что белок NP играет роль переключателя РНК-полимеразы с транскрипционной на репликативную активность, но, скорее всего, это не так. Было показано, что короткие геномные сегменты длиной до 76 н, имеющие большие внутренние делеции, но сохраняющие 5'- и 3'-концевые последовательности, могут эффективно транскрибироваться и реплицироваться в отсутствие NP *in vivo* [225]. Таким образом, роль NP, вероятно, заключается в стабилизации насцентных кРНК, защите вновь синтезируемых вРНК от деградации, а также их дальнейшей упаковке в вирионы. NS1 и NEP также вовлечены в регуляцию транскрипции и репликации. NS1 взаимодействует с NP и принимает участие в репликации вРНК [213, 273] и сплайсинге мРНК [274]. NEP играет важную роль в синтезе вРНК, так как его присутствие необходимо для синтеза в инфицированных клетках мвРНК длиной 22-27 нуклеотидов, соответствующих 5'-концу вРНК [253, 276]. мвРНК являются важным вирусным фактором, участвующим в синтезе вРНК на матрице кРНК. Предположительно, они ассоциированы с *транс*-действующей РНК-полимеразой, будучи связанными областью узнавания 5'-концов вРНК.

Транскрипция и репликация регулируется множеством клеточных факторов, однако детально была изучена роль лишь небольшого их числа. Так как транскрипция и репликация вРНК происходят в ядре инфицированной клетки, вРНП транслоцируются в ядро в область ядерного матрикса или хроматина посредством специфических взаимодействий РНК-полимеразы с хроматин-ремоделирующими белками CHD1 и CHD6, белком ядерного матрикса 2 (NXP2) и модулятором функции PolIII CLE (C14orf166) [14, 212, 277, 353].

Синтез вирусных мРНК тесно связан с клеточной PolIII. Показано, что РНК-полимераза напрямую взаимодействует с фосфорилированной формой большой субъединицы (CTD) PolIII [86], которая рекрутирует клеточные кэпирующие ферменты в область сайта инициации транскрипции [37]. Взаимодействие РНК-полимеразы с CTD PolIII обеспечивает ей доступ к насцентным клеточным кэпированным РНК, а также способствует локализации синтеза вирусных мРНК в области с высокой концентрацией клеточных факторов сплайсинга и сборки клеточных мРНК. Таким образом, взаимодействие РНК-полимеразы с PolIII необходимо не только для реализации механизма «похищения кэпов», но и для процессинга вирусных мРНК и сборки мРНК [380].

Известно, что мРНК, кодирующие белки M1, NS1 и PB2, подвергаются сплайсингу [376], который осуществляется клеточной машинерией с участием, в частности, белков RED (RER, или IK), SMU1, SF2 (ASF1, или SRSF1), SFPQ (PSF), гетерогенного ядерного РНК К (hnRNP К) и NS1-BP [351]. Фактор сплайсинга SFPQ взаимодействует с вРНК и играет важную роль в синтезе вирусных мРНК, увеличивая эффективность их полиаденилирования [187].

Клеточная машинерия транскрипции обеспечивает РНК-полимеразу платформой внутри клеточного ядра, вокруг которой организован не только синтез вирусных мРНК, но и репликация вРНК. Например, показано, что репликацию вРНК стимулирует комплекс поддержания минихромосомы (MCM). MCM – это клеточная геликаза, вовлеченная в репликацию ДНК и участвующая в элонгации транскрипции полимеразой PolIII в процессе взаимодействия с CTD. MCM взаимодействует с субъединицей PA РНК-полимеразы и, вероятно, стимулирует переход от *de novo* инициации к элонгации транскрипции на матрице вРНК [187].

Члены семейства белков ANP32 вовлечены в различные клеточные пути, включая регуляцию транскрипции в процессе ремоделирования хроматина, экспорт мРНК и клеточную гибель. Взаимодействие ANP32A и ANP32B с

вирусной РНК-полимеразой необходимо для осуществления второй стадии репликации вРНК [315]. Интересно, что ANP32A является одним из факторов видовой специфичности ВГА [206]. PB2 ВГА птиц содержит Е в положении 627, тогда как в полимеразе ВГА млекопитающих в этой позиции находится К. Кроме того, по сравнению с белком человека ANP32A птиц содержит 33 дополнительные аминокислоты между лейцин-богатыми повторами и С-концевой кислой областью. Было показано, что экспрессия в клетках млекопитающих гена *ANP32A* птиц или гена *ANP32A* человека, содержащего вставку из 33 а.о. и Е627, поддерживает в этих клетках активность РНК-полимеразы ВГА птиц на одном уровне с активностью, адаптированной к млекопитающим РНК-полимеразы.

Клеточные белки РНК-геликазы DDX39B (UAP56), TATSF1 и регулятор трансляции и экспорта мРНК FMR1 усиливают репликацию вРНК, вызывая взаимодействие NP с РНК-полимеразой или привлечение NP к насцентным вРНК и кРНК во время сборки РНП [351]. Изоформы импортина- $\alpha$  задействованы в репликации вРНК, взаимодействуя с субъединицей PB2 РНК-полимеразы [270].

Таким образом, взаимодействия между вирусной и клеточной машинериями транскрипции обеспечивают РНК-полимеразу платформой для координации механизмов «похищения кэпов», транскрипции, репликации и процессинга вРНК, а также ядерного экспорта мРНК и вРНК [351]. Кроме того, эти взаимодействия позволяют вирусу вмешиваться в экспрессию клеточных генов, ингибируя экспрессию генов, обеспечивающих противовирусный ответ. Например, вирусный белок NS1 препятствует образованию 3'-конца клеточных мРНК, взаимодействуя с клеточной машинерией полиаденилирования [235]. Взаимодействие РНК-полимеразы с PolII необходимо для расщепления насцентных кэпированных клеточных РНК [356]. Более того, показано, что деградация большой субъединицы PolII также наблюдается в клетках, инфицированных ВГА, и связана с увеличением патогенности вируса в мышцах [204, 355].

#### 1.4.6. Ядерный экспорт вирусного рибонуклеопротеинового комплекса

После синтеза вРНП экспортируется из ядра через комплекс ядерной поры. Этот процесс является энергозависимым и осуществляется посредством клеточной машинерии экспорта мРНК и Ran-GTP. CRM1 (XPO1) является главным экспортином, ответственным за транспорт вРНП из ядра в цитоплазму, который осуществляется за счет наличия сигнала ядерного экспорта в NEP [236]. Во взаимодействии вРНП с клеточной машинерией экспорта задействованы вирусные белки NEP и M1 [296]. M1 отвечает за предотвращение экспорта из ядра незрелых вРНП. На ранних стадиях инфекции M1 подвергается убиквитинированию по K242, направляющему его на деградацию [104], однако на поздних стадиях он становится сумоилированным по K242, что приводит к его стабилизации и позволяет связывать новосинтезированные вРНП в ядре [373]. Это переключение регулируется белком AIMP2 [104].

HSC70 также участвует в экспорте вРНП, оказывая влияние на образование комплекса РНП-M1-NEP [364]. HSC70 может выступать конкурентным ингибитором NEP за связывание с С-концевым доменом M1 [365], или же через взаимодействие с CRM1 опосредовать ядерный экспорт комплексов РНП-M1 независимо от NEP [366]. В NEP-независимом пути экспорта участвует белок NXT1, который связывается с NP и взаимодействует с машинерией CRM1 [59]. NXT1 – это фактор ядерного экспорта, вовлеченный в последние стадии CRM1-зависимого транспорта из ядра [296]. Было показано, что NP, NXT1 и CRM1 формируют комплекс, вызывающий экспорт NP [59].

Важная роль в экспорте вРНП принадлежит хроматину. При ВГА инфекции CRM1 релокализуется в области конститутивного хроматина, и наблюдается увеличение ассоциации CRM1, Ran и RCC1 [53]. Образование CRM1-RAN-RCC1-комплекса необходимо для регенерации Ran-ГТФ из Ran-ГДФ, позволяющей CRM1 связывать новые субстраты. Предполагается, что направляя вРНП к хроматину, где образуются эти новые CRM1-Ran-ГТФ комплексы, вирус

монополизирует машинерию ядерного экспорта. Кроме того, NEP взаимодействует с белком CHD3 посредством первого сигнала ядерного экспорта, необходимым для локализации NEP и CRM1 в область конститутивного гетерохроматина. В экспорте vРНП также задействован комплекс PRC2, необходимый для образования факультативного гетерохроматина [22], который взаимодействует с M1 и обеспечивает формирование комплекса между M1 и vРНП. Также взаимодействие между NP и нуклеолином усиливает ассоциацию vРНП с хроматином [325]. Кроме того, белок CLUN, хотя и не требуется для CRM1-зависимого экспорта, важен для внутриядерного транспорта vРНП и M1 через ядерные спеклы перед их взаимодействием с машинерией экспорта [18].

Сигнальные пути клетки играют важную роль в регуляции процесса экспорта vРНП во времени. Было показано, что ингибирование RAF/MEK/ERK сигнального пути приводит к накоплению vРНП в ядре [258]. Этот MAP-киназный каскад активируется вирусной инфекцией через 4 часа после заражения, что приводит к фосфорилированию определенных клеточных факторов, играющих важную роль в экспорте vРНП [258]. ВГА инфекция также усиливает экспрессию и активацию сфингозин киназы 1 (SK1), регулирующей несколько путей, включая NFκB, ERK MAPK и PI3K/AKT [292]. Ингибирование SK1 блокирует активацию RanBP3 киназами ERK MAPK и PI3K/AKT, а так как RanBP3 является кофактором CRM1, это связывает активность ERK с CRM1-опосредованной машинерией экспорта [292]. Другая киназа, SGK1, также связана с экспортом vРНП, однако неизвестно, регулирует ли она вирусные или клеточные факторы [11].

Также возможен CRM1-независимый путь транспорта vРНП из ядра в цитоплазму, особенно на поздних стадиях инфекции. ВГА вызывает апоптоз на поздних стадиях инфекции, при этом блокирование каспазы 3 ингибирует ВГА и вызывает накопление vРНП в ядре [374]. Активация каспазы 3 связана с

деградацией субъединицы комплекса ядерной поры NUP153, приводящей к увеличению размера ядерной поры [228].

#### 1.4.7. Сборка и почкование вируса гриппа типа А

На поздних стадиях жизненного цикла компоненты вириона, в том числе vРНП, М1, белки оболочки НА, NA и М2, транспортируются к сайту сборки на апикальную плазматическую мембрану в поляризованных эпителиальных клетках [234].

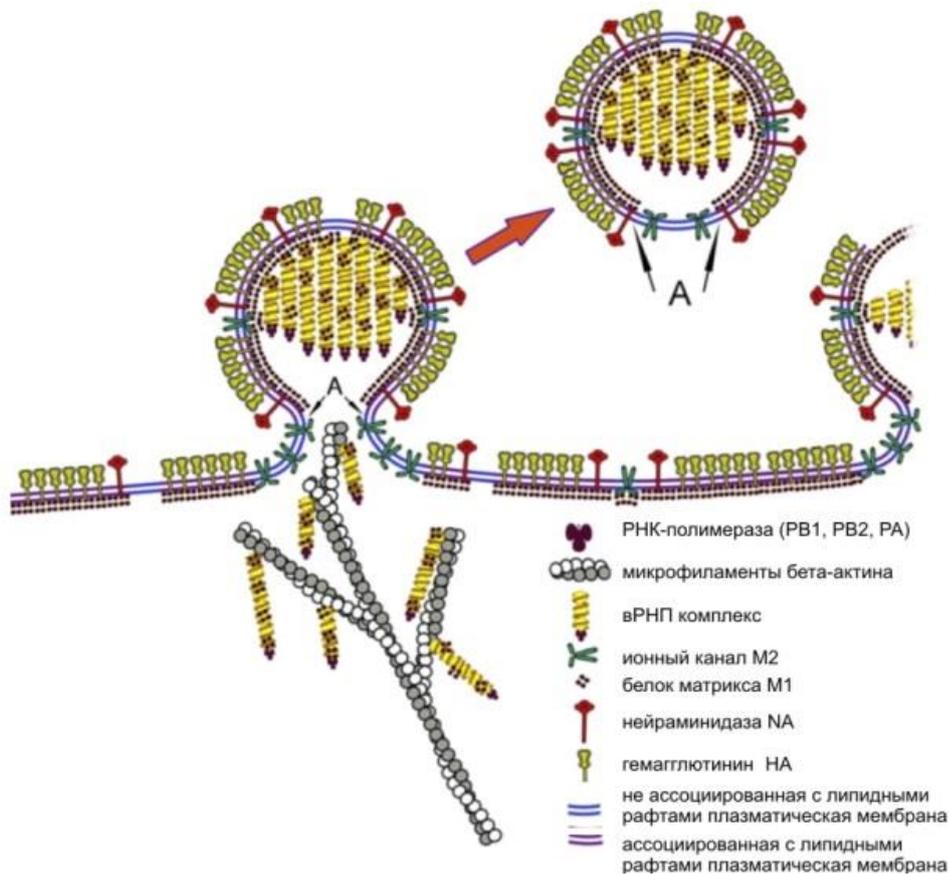


Рисунок 1.11 – Схема почкования вириона ВГА от клеточной мембраны [233]

В транспорте вирусных гликопротеинов (НА и NA) к клеточной поверхности задействован COP1 комплекс [367]. НА и NA содержат сигналы ассоциации с липидными рафтами, являющимися неионными устойчивыми к детергентам липидными микродоменами в плазматической мембране. ВГА

преимущественно почкуются из областей липидных рафтов. Хотя точный механизм транспорта комплексов М1-вРНП к клеточной поверхности все еще не ясен, белок М2, вероятно, играет роль во встраивании М1-вРНП в вирусные частицы посредством взаимодействия между М1 и цитоплазматическим концом М2. NP и М1 взаимодействуют с компонентами цитоскелета, такими как актин, для транспорта вРНП к месту почкования вируса [23]. На последних стадиях вирусные компоненты концентрируются в микродоменах липидных рафтов, которые могут обеспечивать стадию высвобождения вирусных частиц от клеточной поверхности [319]. В процессе почкования вирусной частицы задействованы различные клеточные факторы, такие как актин, малая ГТФаза Rab11, F1Fo-АТРаза, RACK1, CD81 [296, 367]. Модель почкования ВГА приведена на рисунке 1.11.

### **1.5. Молекулярные механизмы реализации врожденного противовирусного иммунного ответа организма-хозяина на вирус гриппа типа А**

Противовирусный иммунный ответ представляет собой одну из важнейших и наиболее изученных составляющих комплексного взаимодействия ВГА с клетками хозяина. Многие молекулярно-генетические механизмы иммунного ответа на ВГА инфекцию были выявлены с применением методов системной биологии [172]. Первым неспецифическим уровнем защиты от ВГА инфекции является врожденный иммунитет, ограничивающий вирусную репликацию и приводящий к развитию приобретенного клеточного и гуморального иммунных ответов. Необходимо учитывать, что ВГА запускает механизмы противодействия иммунному ответу, и на процесс исхода заболевания во многом влияют как индивидуальный иммунный статус, так и молекулярно-генетические свойства самого вируса [158]. Далее будут рассмотрены основные механизмы реализации врожденного иммунного ответа на ВГА инфекцию.

### **1.5.1. Паттерн-распознающие рецепторы, активируемые при инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А**

На ранних стадиях ВГА инфекции первичная защитная функция принадлежит IFN-индуцированному клеточному противовирусному ответу [105]. Молекулы РНК вирусного происхождения, присутствующие в зараженных клетках, узнаются паттерн-распознающими рецепторами (PRR), которые активируют секрецию IFN, провоспалительных цитокинов, эйкозаноидов и хемокинов, стимулирующих экспрессию сотен IFN-стимулируемых генов (ISG) в соседних клетках, что приводит к возникновению антивирусного статуса клеток [158]. Провоспалительные цитокины и эйкозаноиды вызывают локальное и системное воспаления, а также запускают приобретенный иммунный ответ на ВГА инфекцию. Хемокины локально продуцируются в области инфекции и привлекают дополнительные иммунные клетки, такие как нейтрофилы, моноциты, NK-клетки. Если действия запущенных механизмов не достаточно для элиминации вируса, то активируются механизмы приобретенного иммунного ответа.

ВГА узнаются системой врожденного иммунитета при участии пяти представителей PRR трех типов: Toll-подобных рецепторов TLR3, TLR7 и TLR8, RIG-I-подобного рецептора RIG-I и NOD-подобного рецептора NLRP3 [80]. TLR3 узнает вирус-инфицированные клетки по присутствию днРНК, а TLR7 (и TLR8 у человека) – онРНК в эндосомах [80]. RIG-I и NLRP3 детектируют вирус, присутствующий в цитозоле инфицированных клеток. При этом RIG-I узнает содержащие 5'-трифосфат молекулы РНК, NLRP3 – различные стимулы [16, 379].

*Toll-подобные рецепторы TLR3, -7 и -8 при гриппе.* TLR содержат гидрофобные обогащенные лейцином повторы, трансмембранный домен и цитоплазматический домен TIR (домен гомологии с Toll/IL1-R). TLR3 узнает в эндосомах днРНК [13], а TLR7 и TLR8 – уридин-богатые последовательности онРНК [80].

TLR3 конститутивно экспрессируется в эпителиальных клетках дыхательных путей человека. В инфицированных вирусом клетках РНК-геликаза UAP56 предотвращает образование днРНК, поэтому TLR3, вероятно, узнает какие-то неидентифицированные РНК-структуры, присутствующие в подвергнувшихся фагоцитозу клетках [158]. Активированный TLR3 индуцирует через адаптерный белок TRIF сигнальные пути, которые приводят к активации транскрипционных факторов IRF3 (через киназы TBK-1 и IKKε) и NFκB (через киназу IKK2) [158] (рисунок 1.12А). В результате происходит индукция IFN I и III типов, а также провоспалительных цитокинов, способных вызывать не только защитный, но и патологический эффекты [13]. Эксперименты, проведенные на *Tlr3<sup>-/-</sup>* мышах, показывают, что несмотря на более высокую вирусную нагрузку в легких такие мыши при летальной дозе инфекции живут дольше по сравнению с мышами дикого типа [119]. В отсутствие TLR3 при заражении вирусом снижаются экспрессия хемокинов в легких, а также инфильтрация лейкоцитов и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. В тоже время, отсутствие TLR3 не влияет на антительный ответ, генерацию CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток при сублетальных дозах ВГА, что говорит об отсутствии роли TLR3 в появлении Т-клеточного иммунного ответа [142]. Таким образом, хотя TLR3 индуцирует сигналы, ограничивающие вирусную репликацию, он одновременно может вызывать избыточное привлечение клеток врожденного и приобретенного иммунитета, наносящих повреждения организму-хозяину.

TLR7 узнает в плазмацитоидных дендритных клетках (pDC) попадающие в эндосомы геномные вирусные онРНК [70] (рисунок 1.12Б). В этом случае для узнавания вирусных РНК компонентов нет необходимости в репликации ВГА. Активированный TLR7 индуцирует адаптерный белок MyD88, что приводит к активации транскрипционных факторов NFκB или IRF7 в процессе фосфорилирования через IL1R-ассоциированную киназу 1 (IRAK-1) [80]. NFκB и IRF7 отвечают за стимулирование экспрессии провоспалительных цитокинов и

IFN I типа, соответственно. Согласно данным экспериментов, проведенных на дефектных по гену *TLR7* мышях, инфицированных большими дозами ВГА, нельзя точно сказать, является ли *TLR7* абсолютно необходимым для врожденной защиты организма [119]. Вместе с тем, *TLR7* играет ключевую роль во врожденной защите у мышей, экспрессирующей IFN-индуцируемый ГТФ-связывающий белок *MX1*. С другой стороны, при инфицировании мышей сублетальной дозой ВГА *TLR7* отвечает за установление сильной выработки антител против ВГА, но не Т-клеточного ответа [158]. Таким образом, *TLR7* играет важную роль в противовирусной резистентности организма посредством стимулирования В-клеток для выработки необходимых антител.

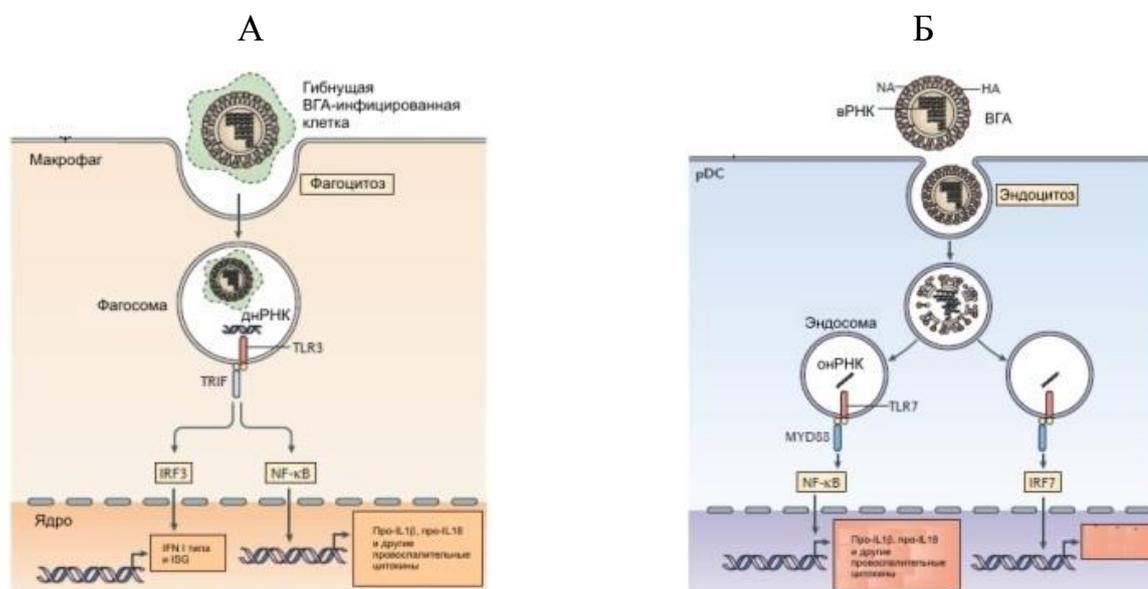


Рисунок 1.12 – Узнавание вируса гриппа А паттерн-распознающими Toll-подобными рецепторами *TLR3* и *TLR7* системы врожденного иммунитета [158]

*А* – инфицированные клетки фагоцитируются макрофагами, и *TLR3* узнают днРНК, что приводит к активации экспрессии *NFκB*-зависимых провоспалительных цитокинов и *IFN I* типа и стимулируемых ими через фактор *IRF3* генов. *Б* – вирусные онРНК, содержащиеся в вирионе, высвобождаются в процессе разрушения вирусных мембраны и капсида внутри закисленных эндосом и узнаются *TLR7* в *pDC*. *TLR7*-опосредованный сигналинг индуцирует экспрессию *NFκB*- и *IRF7*-зависимых генов.

TLR8 экспрессируется в моноцитах и макрофагах человека, и его стимулирование онРНК приводит к продукции IL-12, но не IFN $\alpha$  [10]. Однако точная роль TLR8 при гриппе остается неизвестной.

Эндосомальные TLR выполняют разные роли при ВГА инфекции. TLR3 узнает поли I:C структуры в инфицированных клетках и индуцирует сигналинг, опосредованный IFN I типа, тем самым вызывая противовирусное состояние [198]. При этом TLR3 оказывает патологическое воздействие, привлекая вызывающие повреждения воспалительные клетки. TLR7 индуцирует IFN-ответ, блокирующий вирусную репликацию и вызывающий выработку антител.

***RIG-I при гриппе.*** RIG-I является цитоплазматической содержащей DEx(D/H) мотив РНК-геликазой, которая передает сигнал через гомотипичную каспазную активацию и задействование домена CARD с митохондриальным белком стимулятором промотора IFN $\beta$  (IPS-1) [170, 184]. RIG-I преимущественно узнает (-)-РНК-содержащие вирусы [184]. В случае ВГА RIG-I играет важную роль в детекции вируса и продукции IFN I типа в инфицированных эпителиальных клетках, обычных дендритных клетках и альвеолярных макрофагах [170]. В цитозоле ВГА-инфицированных клеток RIG-I узнает содержащие 5'-трифосфат вирусные онРНК, образующиеся при вирусной репликации [158] (рисунок 1.13). После узнавания таких РНК геликазный домен RIG-I связывает АТФ, вызывающий конформационные изменения, позволяющие его каспаза-привлекающим доменам связываться с сигнальным адаптерным митохондриальным противовирусным сигнальным белком (MAVS) [158].

MAVS-сигналинг приводит к образованию провоспалительных цитокинов через активацию NF $\kappa$ B и IFN I типа, и ISG посредством активации IRF3. IPS-1 активирует транскрипционные факторы IRF3 и NF- $\kappa$ B через TBK-1 и IKK $\epsilon$ , соответственно [80]. После активации конститутивно-экспрессируемый IRF-3 фосфорилируется в цитоплазме, димеризуется и переносится в ядро. Взаимодействие с ко-активаторами, такими как CREB-связывающий белок (CBP)

и p300, вызывает связывание фактора с IRF3-связывающим сайтом в IFN $\beta$ -энхансосоме и инициирует индукцию экспрессии гена *IFNB* при ВГА инфекции [80]. Активация транскрипционных факторов NF $\kappa$ B и AP-1 также требуется для индукции экспрессии IFN $\beta$ . Следует отметить, что AP-1 состоит из гетеродимеров ATF-2/c-Jun, обладающих связывающими сайтами в IFN $\beta$ -энхансосоме. Секретируемый IFN $\beta$  связывается с рецептором IFN типа I, что приводит к индукции экспрессии IRF7. В свою очередь, IRF7 вместе с другими транскрипционными факторами IRF9 и STAT индуцирует экспрессию гена *IFNA* и, соответственно, далее другие ISG [80].

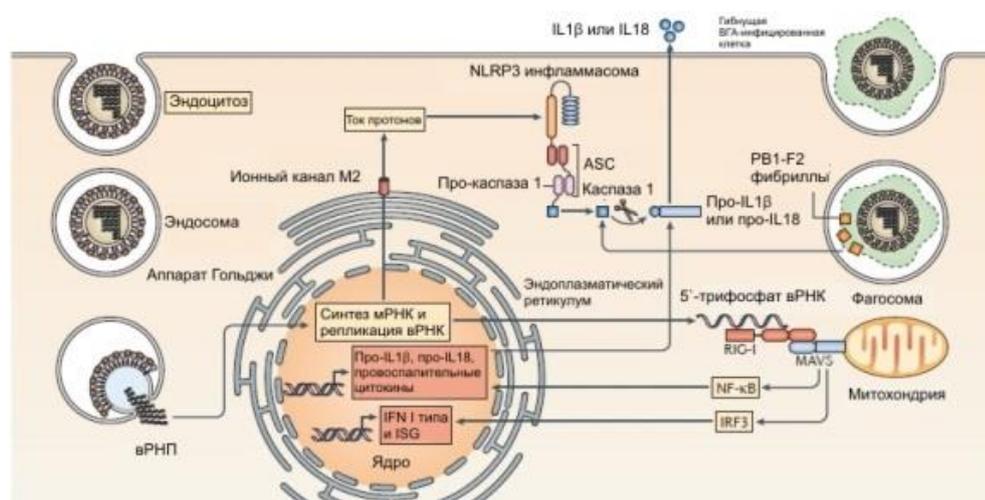


Рисунок 1.13 – Узнавание вируса гриппа А паттерн-распознающими RIG-I и NOD-подобными рецепторами системы врожденного иммунитета [158]

*Внутри инфицированных клеток вирусная РНК в цитозоле (возможно в стресс-гранулах) узнается RIG-I, что через активацию митохондриального белка MAVS приводит к индукции экспрессии провоспалительных цитокинов и IFN I типа. Активность образованного белком M2 ионного канала в аппарате Гольджи стимулирует образование NLRP3 инфламмосомы, приводящей к активации каспазы 1 и высвобождению цитокинов IL1 $\beta$  и IL18. Фибриллы PB1-F2 накапливаются в фагосоме, что приводит к активации NLRP3 и высвобождению IL1 $\beta$  и IL18.*

Дефектные по гену *MAVS* мыши характеризовались одинаковой вирусной нагрузкой и выживаемостью при летальной дозе ВГА [290]. При низкой дозе

вируса такие мыши имели нормальный адаптивный иммунный ответ [158, 290]. В мышцах, дефектных по гену *MX1*, MAVS играют минимальную роль во врожденном и приобретенном иммунитете к ВГА инфекции. Однако роль RLR-сигналинга во врожденном иммунном ответе не тестировалась на мышцах, нормальных по гену *MX1*. Тот факт, что NS1 блокирует RIG-I сигналинг, свидетельствует, что RIG-I-опосредованное узнавание является ключевой противовирусной детерминантой в естественно инфицированных хозяевах [158].

ВГА реплицируется в ядре, поэтому точная природа и локализация РНК, детектируемой посредством RIG-I, оставались неизвестными. Недавно было показано, что RIG-I попадает в противовирусные стресс-гранулы, где колокализированы вирусные РНК и продукты ISG, такие как PKR [247]. Разрушение стресс-гранул уменьшает RIG-I-опосредованный IFN ответ. PKR необходима для образования стресс гранул, а вирусный белок NS1 его блокирует посредством влияния на PKR [247]. Предполагается, что компоненты, необходимые для RIG-I сигналинга (такие как вирусные РНК, RIG-I и PKR), направляются в стресс гранулы для осуществления эффективной индукции IFN типа I ответа.

***NLRP3 инфламасома.*** Nod-подобные рецепторы (NLR) характеризуются наличием гидрофобного лейцин-обогащенного мотива, имеют сходство с TLR и являются чувствительными к различным патоген-ассоциированным молекулярным структурам в цитоплазме инфицированных клеток [80]. Точный регуляторный механизм участия NLR во врожденном иммунитете до конца не выяснен, но описаны регуляция и высвобождение провоспалительных цитокинов IL1 $\beta$  и IL18. Другой отличительной чертой NLR является их способность формировать молекулярные платформы, такие как инфламмосомы, позволяющие, например, активировать каспазы [80].

Инфламмасома – это мультибелковый комплекс, состоящий из NLR (или других PRR), адаптера ASC и про-каспазы 1. Активация инфламмосомы приводит к автокаталитическому процессингу про-каспазы 1, которая процессирует про-

IL1 $\beta$  и про-IL18, а также к запуску пироптоза инфицированных клеток [158]. Образование NLRP3 инфламмосомы запускается рядом стимулов, в том числе повреждением клеточной мембраны, инфекцией или стрессом [158].

NLRP3 экспрессируются клетками миелоидного типа, такими как моноциты, DCs, нейтрофилы и макрофаги, а также бронхиальными эпителиальными клетками человека [158]. Для запуска продукции цитокинов инфламмосомой необходимы два типа сигналов. Первый сигнал *in vivo* во многом обеспечивается синантропными бактериями и активирует экспрессию про-IL1 $\beta$ , про-IL18 и NLRP3 через TLR, IL1R и рецептор TNF (TNFR) [158]. Второй сигнал индуцируется повреждениями хозяина, которые приводят к активации и расщеплению каспазы 1 и секреции зрелых IL1 $\beta$  и IL18, и обеспечивается, по меньшей мере, тремя ВГА-ассоциированными стимулами. Во-первых, наличие онРНК ВГА достаточно для активации высвобождения IL1 $\beta$  из клеток THP1 [328]. Во-вторых, поток протонов через белок M2 в транс-Гольджи запускает активацию NLRP3, формирование инфламмосомы и расщепление про-IL1 $\beta$  и про-IL18 [153]. Он нейтрализует кислый рН в транс-Гольджи для предотвращения активации НА до фьюзогенной формы, и эта активность каким-то образом запускает активацию NLRP3 инфламмосомы. В-третьих, в макрофагах (предположительно в клетках, поглотивших мертвые инфицированные клетки) находящиеся в лизосомах высокомолекулярные агрегаты PB1-F2 стимулируют активацию NLRP3 инфламмосомы [219].

В макрофагах ВГА-индуцированная активация NLRP3 требует изменения в мембранном потенциале митохондрий и митофузине 2, ассоциированном с NLRP3 в формировании комплекса инфламмосомы [320]. В бронхиальных эпителиальных клетках легких, праймирование сигнала 1 (экспрессия IL1B и NLRP3 мРНК) требует RIG-I-зависимой продукции IFN, за которой следует сигналинг посредством рецепторов IFN I типа (IFNAR). Кроме того, RIG-I напрямую связывается с ASC для формирования RIG-I-ASC инфламмосомы в

эпителиальных клетках дыхательных путей [158]. Таким образом, ВГА инфекция стимулирует активацию разных инфламмасом – NLRP3 инфламмасом в миелоидных клетках и RIG-I инфламмасом в клетках эпителия дыхательных путей.

Важность NLRP3 инфламмасы во врожденном ответе против ВГА показана в двух исследованиях [16, 328]. При инфицировании вирусом A/PR/8/34 (H1N1) в высокой дозе NLRP3 играет существенную роль в привлечении лейкоцитов в легкие [328]. Кроме того, дефектные по генам *NLRP3*, *CASP1* или *IL1R* мыши подвержены увеличенному некрозу в легких и ослаблению респираторных функций, что ведет к повышенной смертности по сравнению с контрольными мышами [328]. В отличие от IFN I типа IL1 $\beta$  и IL18 не вызывают устойчивость к вирусу, что свидетельствует о том, что восприимчивость к ВГА в дефектных по инфламмасоме мышах не зависит от неспособности поддерживать вирусную репликацию [158]. В соответствие с этим в обоих исследованиях не было найдено различий в вирусной нагрузке между дефектными по NLRP3 и контрольными мышами в течение 7 дней после инфекции [16, 328]. Это предполагает, что NLRP3-опосредованная защита хозяина вовлекает возрастание в толерантности к инфекции, а не устойчивости к заражению. В частности, активация NLRP3 инфламмасы увеличивает толерантность тканей к высоким дозам ВГА посредством привлечения клеток и индукции восстановления тканей в дыхательных путях [16, 328]. Более того, использование низких доз вируса выявило важную роль инфламмасом и IL1R-сигналинга в активации В- и Т-клеточных ответов [158].

При ВГА инфекции активированная криопориновая инфламмосома и каспаза-1 индуцируют высвобождение IL1 $\beta$  и IL18, уменьшая степень повреждения легких и некроза эпителия [328]. В другом исследовании продемонстрировано, что каспаза-1 вносит вклад в В- и Т-клеточные ответы при ВГА инфекции [152]. Позднее было показано, что активация NLRP3 инфламмасы при ВГА инфекции запускает

высвобождение IL1 $\beta$  из моноцитов человека под действием стимуляции онРНК или днРНК [16].

### **1.5.2. Активация системы интерферонов I типа**

Узнавание ВГА-ассоциированных молекулярных структур при участии PRR приводит к активации системы IFN I типа, являющейся основной компонентой клеточного иммунного ответа при гриппе. IFN I типа принадлежит группе секретируемых противовирусных цитокинов, действующих как межклеточные сигналы коммуникации. У млекопитающих описано несколько представителей семейства IFN I типа ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ), при этом в ответ на инфекцию ВГА незамедлительно экспрессируются IFN $\alpha/\beta$ . IFN не только индуцирует транскрипцию противовирусных генов, но и активирует дендритные и другие типы иммунных клеток и инициализируют систему приобретенного иммунного ответа [106]. Инфицированные вирусом клетки синтезируют IFN и секретируют его в межклеточное пространство, где он связывается с соответствующими рецепторами IFNAR1 и IFNAR2 на поверхности соседних неинфицированных клеток. Это связывание сопровождается активацией JAK/STAT сигнального пути, индуцирующего образование тримера транскрипционного фактора ISGF3, состоящего из STAT1, STAT2 и IRF-9, который регулирует экспрессию сотен ISG, в том числе *CXCL10*, *MX1*, *PKR*, *OAS1*, *RNASEL*, *PML* и других [106]. IFN также стимулирует продукцию NOS2A и MHC классов I и II, играющих важную роль в иммунном ответе на инфекцию. Кроме того, IFN может напрямую вызывать экспрессию таких белков как RIG-I, IKK $\epsilon$  и STAT по принципу положительной обратной связи.

### **1.5.3. Стимулируемые интерфероном гены при инфекции, вызванной вирусом гриппа А**

ISG в основном противостоят вирусной репликации. Некоторые ISG играют непосредственную роль в ограничении ВГА инфекции, среди них гены,

кодирующие белки MX, IFN-индуцируемые трансмембранные белки (IFITM) и PKR.

Гены *MX* семейства ГТФаз резистентности к ортомиксовирусам, кодирующих белки MX, были одними из первых идентифицированных ISG, ограничивающих ВГА инфекцию [158]. В мышах *MX1* экспрессируется в ядре и является потенциальным блокатором ВГА инфекции, тогда как *MX2* присутствует в цитозоле и не обладает активностью против ВГА [158]. У человека экспрессируются белки *MXA* и *MXB*. *MXA* – это цитозольный белок, имеющий потенциальную активность против ВГА и ряда других вирусов [158]. *MXB*, наоборот, присутствует на цитоплазматической стороне комплекса ядерной поры и ингибирует ВИЧ-1, но не ВГА инфекцию [158]. Белки MX имеют N-концевой ГТФазный домен и C-концевой домен лейциновой застёжки, соединенные через центральный домен взаимодействия. Последние два узнают вирусные структуры [282]. Противовирусное действие белков MX заключается в том, что *MX1* вмешивается в первичную транскрипцию в ядре, тогда как *MXA* ингибирует последующие посттранскрипционные стадии, вероятно происходящие в цитоплазме инфицированных клеток [80]. *MX1* и *MXA* взаимодействуют с субъединицей *PB2* вирусной полимеразы и белком *NP*, что, вероятно, приводит к блокированию эффективной репликации вируса [282]. ВГА птиц более чувствительны к белкам MX, чем ВГА человека. *NP* – основная мишень для MX [71]. Нужно с осторожностью переносить данные, полученные на мышах, на человека, так как почти все инбредные мыши не имеют функциональных *MX1* и *MX2*.

Белки IFITM ограничивают репликацию большого числа вирусов, в том числе ВГА, блокируя слияние вирусной и клеточной мембран, происходящее после связывания вируса с клеткой и эндоцитоза [43, 254]. Дефектные по гену *IFITM3* мыши сильно подвержены ВГА инфекции [28, 87]. IFITM3 конститутивно экспрессируется в респираторных эпителиальных клетках, макрофагах и

эндотелиальных клетках. Интересно, что мыши, дефектные по *IFITM3*, подвержены ВГА инфекции также как мыши, у которых отсутствует весь локус *IFITM* целиком (гены *IFITM1*, 2, 3, 5, 6), что подчеркивает важность *IFITM3* для врожденного иммунного ответа на ВГА инфекцию [28]. Хотя дефектные по гену *IFITM3* мыши могут первоначально противостоять вирусной репликации, они все же поддаются инфицированию вирусами на 4 день [87]. Следует отметить, что у дефектных по *IFITM3* мышей развивается тяжелый отек и геморрагический плеврит [87], что предполагает, что *IFITM3* могут играть роль в ограничении повреждений хозяина в дополнение к опосредованию резистентности к ВГА инфекции.

2'-5'-олигоденилат синтаза (OAS) и рибонуклеаза L (РНКаза L) действуют совместно для деградации вирусных РНК в цитозоле [158]. После связывания днРНК OAS становится ферментативно активной, конвертируя АТФ в 2'-5'-олигоденилат, который действует как вторичный мессенджер для активации латентной РНКазы L. У человека и мышей имеется четыре гена *OAS*, с которых транскрибируется множество сплайсированных вариантов мРНК [158]. Активированная РНКаза L разрушает вирусные и клеточные онРНК, что приводит к ингибированию синтеза белка и росту вируса. Мыши, дефектные по РНКазе L, более подвержены действию РНК-содержащих вирусов, в том числе ВГА [302].

PKR – это зависящая от днРНК серин/треониновая киназа, которая фосфорилирует  $\alpha$ -субъединицу эукариотического фактора инициации трансляции  $2\alpha$  (EIF2 $\alpha$ ) [158]. PKR конститутивно экспрессируется на базальном уровне, который возрастает при выработке IFN. При связывании РНК с двумя днРНК-связывающими доменами PKR происходит ее димеризация, приводящая к автофосфорилированию и активации ферментативной активности [106]. PKR фосфорилирует eIF2 $\alpha$ , что затрудняет обмен ГДФ на ГТФ и приводит к уменьшению уровня ГТФ-eIF2 $\alpha$ . Это, в конечном итоге, приводит к прекращению

*de novo* синтеза клеточных и вирусных белков и, следовательно, к снижению вирусной репликации. PKR также играет роль в передаче сигнала и контроле транскрипции, активируя ингибитор NF-κB (IκB) [106]. Активация PKR в инфицированных клетках приводит к апоптозу, задержке клеточного цикла и аутофагии, которые служат для сдерживания вирусной репликации и распространения в организме хозяина [158]. В дополнение к вирус-ограничивающей функции PKR, она также стабилизирует мРНК IFNα и IFNβ, тем самым обеспечивая хорошую продукцию IFN [287]. Мыши, дефектные по PKR, подвержены различным вирусным инфекциям, в том числе ВГА [158]. Так как при ВГА инфекции не генерируются днРНК, вероятно, что стимулировать PKR могут вторичные структуры типа «сковорода с ручкой», образующиеся между концами вирусной геномной РНК, или другие днРНК-структуры [129].

В дополнение к хорошо известным ISG, описанным выше, выявлен еще ряд генов, способных блокировать ВГА инфекцию. Например, показано, что увеличение экспрессии ISG *SLC16A1*, *FAM46A*, *PRKD2*, *MX1*, *IRF1*, *IFITM2* и *IFITM3* приводит к подавлению ВГА в фибробластах мыши [285]. Механизмы, по которым транспортер монокарбоксилата-1α (*SLC16A1*), *FAM46A* и серин/треониновая протеинкиназа D2 (*PRKD2*) блокируют вирусную репликацию неизвестны. Кроме того, увеличение уровня экспрессия гена *RSAD2*, кодирующего IFN-индуцируемый белок вперин, блокирует высвобождение вируса, связываясь с фарнезил-дифосфат синтазой и нарушая образование липидных рафтов, от которых почкуются вирионы [363]. Ген *CH25H*, кодирующий холестерин 25-гидроксилазу, экспрессируется под действием IFN и конвертирует холестерин в растворимый 25-гидроксихолестерин, который оказывает противовирусное действие на стадии слияния мембран оболочечных вирусов, включая ВГА [202]. Содержащий трипартитный мотив белок 22 (*TRIM22*) блокирует инкапсидацию вирусного генома, что приводит к подавлению ВГА инфекции [255]. ISG15 – это убиквитин-подобный белок,

нацеленный на свежетранслированные вирусные белки; дефектные по гену *ISG15* мыши более подвержены ВГА инфекции [282].

Исследования на нокаут мышах выявили важную роль множества ISG в ограничении репликации ВГА *in vivo*. Однако непонятно, почему ни один из этих индивидуальных ISG не достаточен для вызывания врожденной иммунной защиты в хозяине. Одно из объяснений может быть связано с тем, что в разных типах клеток экспрессируются и используются отдельные наборы ISG.

### **1.6. Патогенез гриппозной инфекции на примере механизма развития острого респираторного дистресс-синдрома**

Главным осложнением при гриппе является вирусная и/или бактериальная пневмония, которая может привести к развитию ОРДС [183]. Быстрая репликация и распространение ВГА по легким вызывает локальное и системное воспаление, сопровождающееся продукцией хемокинов и цитокинов – ключевых компонентов и регуляторов иммунного ответа [174]. Цитокины активируют иммунные клетки, тем самым стимулируя продукцию еще большего количества цитокинов. В норме такая положительная обратная связь поддерживается в балансе отрицательными регуляторами, в том числе другими специфическими цитокинами. В некоторых случаях, неконтролируемый или избыточный иммунный ответ на ВГА инфекцию приводит к высвобождению избыточного числа хемокинов и цитокинов [248]. В этом случае в сыворотке повышается концентрация как про-воспалительных ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL}1\beta$  и  $\text{IL}6$ ), так и противовоспалительных ( $\text{IL}10$  и  $\text{IL}1\text{RN}$ ) цитокинов. Запуск неконтролируемого цитокинового каскада, приводящий к развитию ОРДС, носит название «цитокиновый шторм». Именно «цитокиновый шторм» мог быть одной из важных причин высокого уровня развития тяжелых и летальных исходов заболевания у людей, инфицированных вирусом  $\text{H}1\text{N}1_{\text{pdm}1918}$  или высокопатогенными ВГА птиц  $\text{H}5\text{N}1$  [168].

Основной причиной дыхательной недостаточности при острой фазе ОРДС является повреждение эпителиально-эндотелиального барьера (ЭЭБ) в альвеолах, в которых происходит газообмен (рисунок 1.14). Повреждение этого барьера приводит к затоплению просвета альвеол отечной жидкостью, содержащей фибрин, эритроциты и воспалительные клетки, что приводит к снижению уровня газообмена и, как следствие, острой дыхательной недостаточности [329].

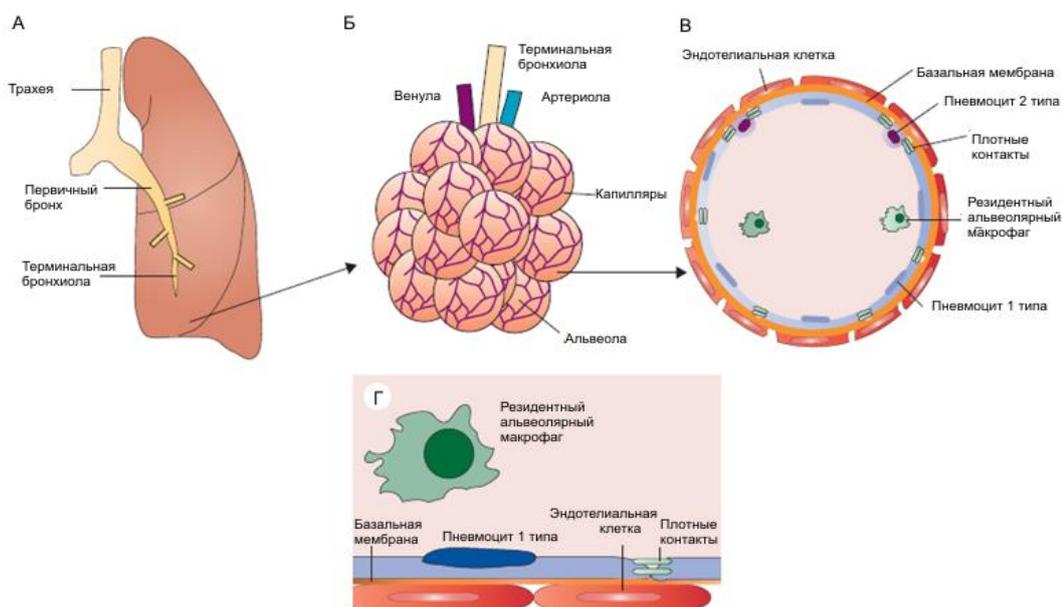


Рисунок 1.14 – Схематическое представление эпителиально-эндотелиального барьера дыхательных путей [301]

*А – в нижних дыхательных путях трахея разделяется на первичные бронхи и несколько уровней бронхов и бронхиол вплоть до терминальных бронхиол. Б – каждая терминальная бронхиола снабжает ацинус из около 2000 альвеол. Альвеолярные стенки содержат сеть легочных капилляров, снабжаемых кровью, попадающей из легочных артериол и направляющейся в легочные вены. В – каждая альвеола содержит несколько альвеолярных макрофагов и обрамлена плоскими пневмоцитами 1 типа и кубовидальными пневмоцитами 2 типа. Пневмоциты лежат на базальной мембране, которая расположена рядом или срастается с базальной мембраной легочных капилляров, которые выстланы эндотелиальными клетками. Г – газообмен между кровью в легочных капиллярах и воздухом в люмене альвеол проходит через ЭЭБ, состоящий из эпителиального слоя альвеол, базальной мембраны или мембран, и эндотелиального слоя легких.*

Большая часть данных о механизмах поражения ЭЭБ в острой фазе ОРДС была получена при изучении бактериального сепсиса, при котором первичным местом повреждения является эндотелий [218]. Данная модель не совсем подходит для ВГА инфекции, так как вирус исходно инфицирует клетки эпителия. Молекулярные и клеточные механизмы развития ВГА-индуцированного ОРДС подробно представлены в обзоре [301].

Общая схема развития ОРДС представлена на рисунке 1.15. После попадания в альвеолы ВГА инфицирует эпителиальные клетки, которые подвергаются гибели по механизму апоптоза или некроза, тем самым открывая эпителиальный слой. ВГА-инфицированные эпителиальные клетки также продуцируют цитокины (например, CCL2, CCL5 и CXCL10), которые привлекают нейтрофилы и моноциты к альвеолам прямым хемотаксисом. Активация эндотелиальных клеток при ВГА инфекции приводит к увеличению уровня молекул адгезии для экстравазации лейкоцитов и продукции цитокинов, таких как CCL2, CXCL10,  $IFN\alpha$ , IL6,  $TNF\alpha$  и  $IFN\gamma$ . Оба этих процесса далее привлекают нейтрофилы и макрофаги к альвеолам. Привлеченные нейтрофилы продуцируют свободные радикалы, которые могут вызывать повреждение тканей. Нейтрофилы также продуцируют цитокины в ответ на ВГА инфекцию. В частности, продукция CXCL10 может повредить ЭЭБ путем запуска продукции супероксида или способствуя хемотаксису нейтрофилов. Привлеченные макрофаги могут повреждать ЭЭБ тремя способами. Во-первых, они могут экспрессировать TRAIL, который взаимодействует с DR5 на эпителиальных клетках и индуцирует апоптоз эпителиальных клеток. Во-вторых, активируя NO-синтазу 2 (NOS2), привлеченные макрофаги могут увеличивать концентрации NO и пероксинитрита, которые вызывают повреждения тканей. В-третьих, они являются важными продуцентами провоспалительных цитокинов, которые далее усугубляют воспалительный ответ и могут вызвать повреждение ЭЭБ.

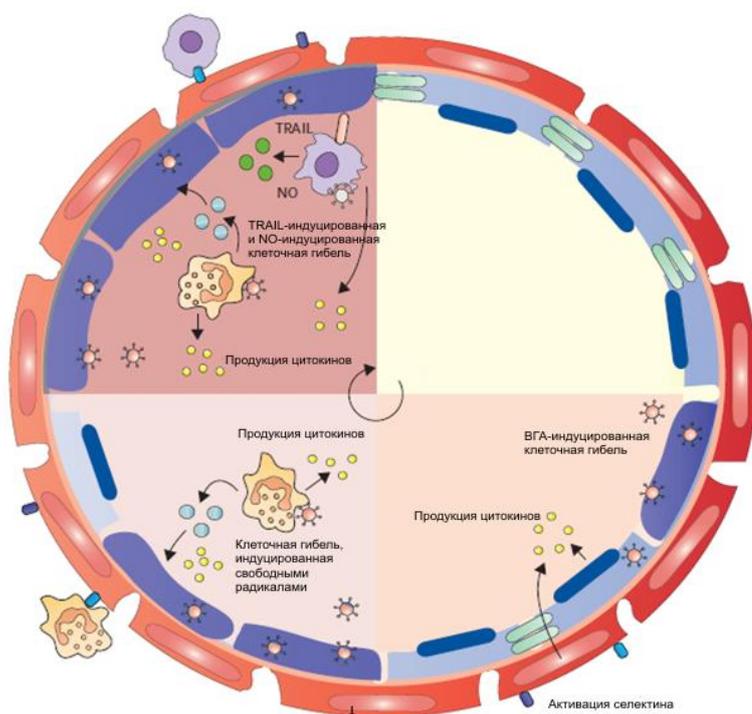


Рисунок 1.15 – Модель патогенеза ВГА-индуцированного ОРДС [301]

*В здоровых легких люмен альвеол свободен от жидкости для обеспечения оптимального газообмена (правый верхний квадрант). После начала инфекции ВГА индуцирует гибель эпителиальных клеток, что приводит к попаданию белок-содержащей жидкости в люмен альвеол (правый нижний квадрант). ВГА также индуцирует продукцию цитокинов эпителиальными и эндотелиальными клетками и активацию экспрессии селектинов в эндотелиальных клетках. Последняя обеспечивает экстравазацию нейтрофилов, которые одними из первых рекрутируются в легкие при ВГА инфекции (нижний левый квадрант). Нейтрофилы повреждают ЭЭБ посредством высвобождения токсичных гранул и продукции цитокинов, что приводит к увеличению тока белок-содержащей жидкости в люмен альвеол. Активация экспрессии селектинов на эндотелиальных клетках обеспечивает экстравазацию макрофагов, которые повреждают барьер через продукцию NO, TRAIL и цитокинов (верхний левый квадрант). В добавок к белок-содержащей жидкости и инфильтрующим лейкоцитам, прогрессирующее разрушение ЭЭБ приводит к отложению фибрина и кровотечению в люмене альвеол.*

Таким образом, патогенез ВГА-индуцированного ОРДС сфокусирован на альвеолярном эпителии. Такой подход контрастирует с классической моделью

патогенеза ОРДС, в которой сосудистый эндотелий легких считается основной мишенью. Важной причиной ОРДС в классической модели является бактериальный сепсис, который отличается от вирусного двумя важными особенностями. Во-первых, типичный патологический агент при сепсисе, липополисахарид (ЛПС), попадает в альвеолы через кровоток, тогда как ВГА – через дыхательные пути [218]. Во-вторых, основной целью ЛПС являются эндотелиальные клетки, тогда как для ВГА – эпителиальные [218]. Однако независимо от того, является ли причиной ОРДС сепсис, респираторный вирус, или другой патоген, патогенез существенно зависит от повреждения эпителия альвеол, который в основном отвечает за поддержание осмотического давления через ЭЭБ [122].

Помимо самого вируса важный вклад в развитие ОРДС и летальной пневмонии вносят сопутствующие или вторичные бактериальные инфекции. Пандемия гриппа 1918 года унесла жизни 50 миллионов человек во многом по причине развития вторичной бактериальной пневмонии. По разным оценкам при лабораторно подтвержденном гриппе число бактериальных ко-инфекций и/или вторичных инфекций может составлять от 11 до 65%. При этом в случае гриппа, приводящего к развитию тяжелой пневмонии, до 75% пациентов имеют бактериальную ко-инфекцию [227]. Наиболее часто при гриппе встречаются ко-инфекции, вызванные *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *S. Aureus*, реже – *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и рядом других *Streptococcus* и *Staphylococcus* spp. [227]. Тяжесть ко-инфекции и/или вторичной бактериальной инфекции зависит от многих факторов, среди которых можно отметить штамм вируса, серотип/штамм бактерии, интервал между вирусной инфекцией и бактериальным проявлением, плотность бактериальной колонизации. Летальный синергизм между ВГА и бактериальными агентами объясняется целым рядом процессов (таблица 1.4). Известно, например, что

бактериальная адгезия может усиливаться при разрушении дыхательного эпителия вирусом или вызванным вирусной инфекцией воспалением, а также при экспонировании клеточных рецепторов для бактерий в результате утраты SA под действием NA ВГА. В свою очередь, некоторые бактерии способны выделять протеазы, расщепляющие НА ВГА, что приводит к усилению инфекционности вируса. Воспалительный ответ на вирусную инфекцию может усиливать экспрессию в эпителиальных клетках рецептора тромбоцит-активирующего фактора (PAFR) и молекул клеточной адгезии CEACAM и ICAM-1, которые бактерии могут использовать в качестве рецептора [220]. С помощью анализа с использованием ДНК микрочипов было показано, что 15 ассоциированных с PAFR молекул специфически индуцировались в легких грызунов, коинфицированных ВГА и *Streptococcus pneumoniae* [288].

Вирусная инфекция может приводить к развитию бактериальной суперинфекции, ослабляя способность организма хозяина запускать продуктивный иммунный ответ на последующую бактериальную инфекцию. Иммунопатология хозяина может быть усилена в результате сверхпродукции некоторых воспалительных цитокинов, цитокинового шторма и апоптоза [168]. Показано, что в результате инфекции, вызванной ВГА и *Streptococcus pneumoniae*, в легких грызунов активируется экспрессия около 1300 генов, 36% которых были специфичны для *Streptococcus pneumoniae* и 30% – для ВГА; дифференциальный ответ наблюдали на уровне цитокинов и хемокинов, хотя индукция генов *IFN I* и *II* типа, *TNF* и *IL6* была общей в случае обеих инфекций [279].

Таким образом, ВГА инфекция может готовить дыхательные пути к бактериальной инфекции, при этом оказывая влияние на иммунную систему. Вызванная вирусом иммуносупрессия может способствовать развитию бактериальной суперинфекции.

Таблица 1.4 – Стадии патогенеза вторичной бактериальной пневмонии [262]

Иммунная функция	Опосредованное вирусом воздействие
Колонизация носоглотки	Изменение микробиоты хозяина, возможно, в пользу более патогенных организмов
Прямое мукозальное/эпителиальное повреждение	Расщепление муцина вирусной и бактериальной нейраминидазой; деструкция эпителия и экспонирование базальной мембраны; ослабление цилиарной функции
Усиление бактериальной адгезии	Расщепление SA → экспонирование бактериальных рецепторов на мукозальной поверхности
Ответ альвеолярными макрофагами	Снижение количества альвеолярных макрофагов после вирусной инфекции; снижение уровня рецептора MARCO, приводящее к ослаблению фагоцитоза бактерий; снижение уровня экспрессии хемокинов и привлечения иммунных клеток; десенсибилизация TLR → долговременные иммунные дефекты
Нейтрофильный ответ	Возможное снижение привлечения в легкие; снижение фагоцитирующей функции; снижение продукции свободных радикалов; нарушение функции нейтрофильных внеклеточных ловушек
Изменение цитокинового статуса	Увеличение уровня IFN I типа → снижение привлечения макрофагов и нейтрофилов в легкие; увеличение уровня IFN II типа → нарушение фагоцитирующей функции макрофагов, возможное вирусное уклонение от нейтрофилов; аттенуирование функции T <sub>H</sub> 17 клеток и снижение секреции IL-17 → увеличенная восприимчивость к <i>S pneumoniae</i> , сниженная продукция антимикробных пептидов

Во многих исследованиях на животных моделях было показано, что ВГА увеличивает и пролонгирует рост бактерий по причине снижения аккумуляции макрофагов и снижения бактериального клиренса из-за уменьшения фагоцитирующей активности. Ко-инфекция *S. pneumoniae* и ВГА приводит к снижению числа локальных альвеолярных макрофагов вследствие их гибели в процессе апоптоза и некроза, что приводит к усилению бактериальной нагрузки и пролонгированному воспалительному ответу [295]. Конечно, вирусная инфекция не только способствует развитию бактериальной. Было предложено несколько механизмов синергизма между вирусами и бактериями. В ряде исследований было зафиксировано увеличение вирусной нагрузки, так как при бактериальной ко-инфекции снижается вирусный клиренс. Однако неясно, связано ли это с взаимодействием между бактерией и вирусом, или просто бактерии обременяют иммунную систему хозяина, что приводит к сокращению вирусной эрадикации. Поэтому необходимы дальнейшие исследования для понимания комплексных взаимодействий между ВГА и бактериями при ко-инфекции.

## **1.7. Практические аспекты борьбы с гриппом**

### **1.7.1. Лекарственные препараты для лечения гриппа**

#### **1.7.1.1. Препараты, обладающие противовирусной активностью в отношении вируса гриппа типа А**

Грипп относится к одной из немногих вирусных инфекций, для которых применяют специфическую противовирусную терапию [60]. В мире существует 4 признанных ВОЗ препарата для лечения гриппа: амантадин, римантадин, озельтамивир и занамивир (рисунок 1.16). При этом к препаратам адамантанового ряда циркулирующие в настоящее время вирусы проявляют устойчивость.

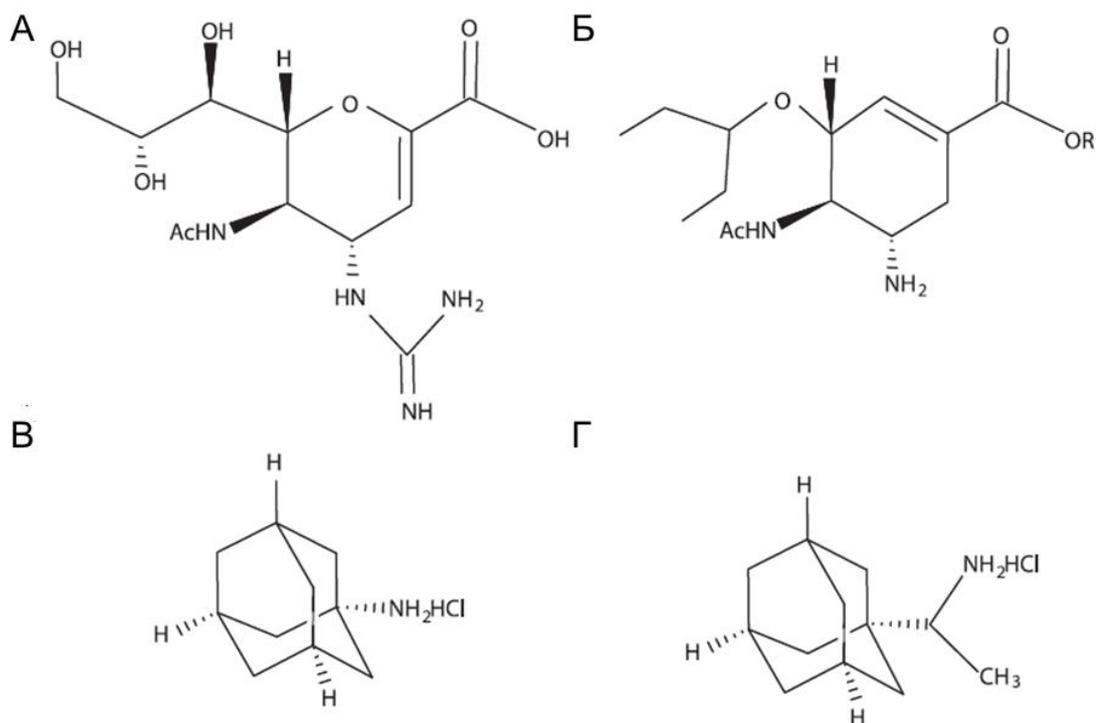


Рисунок 1.16 – Признанные ВОЗ препараты для лечения гриппа

Представлены химические формулы (А) занамивира (*Relenza*), (Б) озельтамивира (*Tamiflu*), (В) амантадина (*Symmetrel*) и (Г) римантадина (*Flumadine*) [94].

Большое количество противовирусных препаратов против гриппа в настоящее время находятся на поздних стадиях клинических исследований (таблица 1.5). Большинство из них отличаются по механизму действия от применяемых на практике препаратов.

**Ингибиторы присоединения и разделения ВГА.** При вакцинации от гриппа иммунный ответ направлен, в первую очередь, на образование вируснейтрализующих антител к поверхностному НА, которые блокируют присоединение вируса к SA рецептору на клеточной поверхности.

Очевидной является идея создания лекарственных препаратов, которые блокировали бы связывание НА с SA. В настоящее время известно несколько перспективных соединений, механизм действия которых основан на данном принципе.

Таблица 1.5 – Противовирусные препараты против гриппа на II и III фазах клинических исследований (по данным [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) [181]

Мишень	Название	Тип соединения	Специфическая мишень	Введение	Фаза; производитель
Клеточная мишень	DAS181-F03/F04	Сиалидаза	$\alpha$ 2,3- и 2,6-связи SA	ингаляция	I, II; Ansun
	Нитазоксанид	Тиазолид	Созревание НА	таблетка	III; Romark
Вирусная мишень	JNJ-63623872	Низкомолекулярный ингибитор	PB2	таблетка	I, II; Janssen
	T705	Пуриновое псевдооснование	РНК-полимераза	таблетка	II, III; Toyama
	S-033188	Низкомолекулярный ингибитор	Кэп-зависимая эндонуклеаза	таблетка	III; Shionogi,
	CR6261	МКА	Стебель НА	В/в	I, II; Crucell/Janssen
	CR8020	МКА	Стебель НА	В/в	I, II; Crucell/Janssen
	MEDI8852	МКА	Стебель НА	В/в	I, II; MedImmune
	MHAA4549A	МКА	Стебель НА	В/в	II; Genentech
	VIS410	МКА	Стебель НА	В/в	II; Visterra

*В/в – внутривенный путь введения, МКА – моноклональное антитело, F03 и F04 – разные варианты DAS181.*

Эффективным в экспериментах на клеточной культуре и животных моделях ВГА инфекции оказалось использование конъюгированной сиалидазы DAS181 [36, 382]. Производные хинона, открытые в 1993 году, предотвращают первую стадию конформационных изменений НА и тем самым ингибируют инфекцию [38]. Они способны ингибировать размножение некоторых, но не всех штаммов ВГА. Еще одним перспективным соединением является нитазоксанид, который предотвращает концевое гликозилирование НА, что приводит к нарушению его созревания и транспорта к клеточной поверхности [280]. Однако до сих пор ни один из ингибиторов НА не вышел за рамки экспериментальных исследований.

Другой подход заключается в ингибировании посттрансляционного расщепления НА, необходимого для слияния вирусной и эндосомальной мембран и выхода ВРНП в цитоплазму. С этой целью было исследовано несколько экзогенных ингибиторов протеаз, из которых апротинин оказался наиболее эффективным в клинических исследованиях [389]. Препараты данного класса также оказались успешными для терапии ВИЧ инфекции, но так и не получили применения для лечения или профилактики гриппа у человека.

Амантадин, который на протяжении нескольких десятилетий являлся эффективным ингибитором большинства циркулирующих штаммов ВГА, направлен на блокирование ионного канала М2. При попадании вируса в эндосому при кислом рН происходит активация ионного канала, приводящая к транспорту протонов внутрь вирусной частицы. Этот процесс, необходимый для диссоциации ВРНП комплекса от белка М1 и его высвобождения в цитоплазму, блокируется амантадином и его производными, включая римантадин [94]. Кроме того, амантадин может влиять на регуляцию уровня рН в везикулах, вовлеченных в транспорт вирусных гликопротеинов на клеточную поверхность к месту сборки и почкования вириона [94]. Таким образом, помимо блокирования раздевания вируса амантадин также способен нарушать стабильность НА некоторых штаммов ВГА при везикулярном транспорте. К сожалению, к амантадину, и его

на порядок более активному производному – римантадину, развилась устойчивость среди ВГА человека и животных. В настоящее время адамантаны не рекомендуются для применения в клинической практике.

***Ингибиторы РНК-полимеразы.*** РНК-полимераза является хорошей терапевтической мишенью, так как обладает уникальными свойствами, которые не встречаются у клеточных белков. Был разработан целый ряд препаратов, направленных на РНК-полимеразу ВГА. В работах [139, 333] показано, что 2,4-диоксобутановая кислота и производные 2,6-дикетопиперазина селективно ингибируют эндонуклеазную активность РА. Рибавирин, одобренный для лечения гепатита С, и несколько других аналогов нуклеотидов также могут ингибировать ВГА человека, однако эти соединения обладают высокой токсичностью [94]. Одним из наиболее перспективных соединений является Т-705 (фавипиравир), который ингибирует активность РНК-полимеразы ВГА, действуя как аналог пурина [97]. Кроме того, Т-705 оказался эффективным в отношении нескольких других РНК-содержащих вирусов. В качестве противовирусных соединений рассматривали кэпированные и некэпированные фрагменты РНК, которые способны вмешиваться в жизненно важные для ВГА процессы связывания кэпа, праймирования транскрипции и образования вторичной структуры в области промотора [94]. Эти соединения имеют фармакологические ограничения по причине трудности доставки заряженных молекул в клетку. Интересно, что в процессе скрининга были выявлены молекулы, направленные на вирусные белки NP и PB1 [94].

***Ингибиторы нейраминидазы.*** Исследование температурно-чувствительных мутантов ВГА с дефектами в NA показало, что функция этого фермента заключается в высвобождении новообразованных вирусных частиц с клеточной поверхности [250]. Было обнаружено, что аналоги нейраминовой кислоты подавляют размножение ВГА в культуре ткани, при этом на поверхности клетки в присутствии этих препаратов образуются агрегаты вируса [249]. На

основе трехмерной рентгеновской структуры была разработана производная нейраминовой кислоты, которая имела гуанидиновую группу у 4-го атома углерода вместо ОН группы у ранее изученных ингибиторов нейраминидазы [94]. Это соединение, занамивир, не имеет биодоступности при оральном применении и одобрено FDA для введения путем ингаляции или в виде назального аэрозоля [84]. Совсем недавно была изучена возможность его внутривенного введения. В многочисленных исследованиях было показано, что это соединение является высокоэффективным профилактическим и терапевтическим препаратом против гриппа [94]. Другой ингибитор NA – перамивир – получил одобрение в США во время пандемии 2009 года и успешно апробирован в ряде стран Азии [12]. Этот препарат можно вводить внутривенно. Недавно был разработан длительно действующий ингибитор NA – ланинамивир, который требует однократного введения на весь курс лечения [154].

Поиск соединений, которые проявляют активность при оральном введении, привел к созданию озельтамивира [156]. Его пролекарством является этиловый эфир аналога сиаловой кислоты, в котором три гидроксильных группы при атомах C7-C9 заменены гидрофобной боковой цепью, что делает возможным попадание этого соединения через кишечник в кровь [94]. Это системно активное вещество весьма эффективно против вирусов гриппа А и В, включая штаммы, содержащие ген NA вируса, вызвавшего пандемию 1918 года. Вместе с тем, в вирусах H1N1<sub>pdm09</sub> и H3N2 описаны мутации (H274Y), приводящие к возникновению устойчивости к озельтамивиру [157]. Учитывая тот факт, что подавляющее большинство циркулирующих ВГА устойчиво к адамантанам, приобретение устойчивости к озельтамивиру может привести к появлению вирусов со множественной лекарственной устойчивостью, представляющих значительную угрозу населению. К счастью, мутации, связанные с устойчивостью к озельтамивиру все еще редки и, как правило, не приводят к возникновению устойчивости к занамивиру. Изучение пространственной структуры

озельтамивир-устойчивых молекул NA, которые сохраняют чувствительность к занамивиру, показало, что в этом случае происходит изменение гидрофобного кармана в активном центре NA, которое влияет на связывание озельтамивира, но не занамивира [62].

***Ингибиторы NS1.*** NS1 рассматривается в качестве перспективной противовирусной мишени по причине своей важной роли как фактора вирусной патогенности. Потеря активности NS1 должна восстанавливать нормальный иммунный ответ в инфицированных ВГА клетках и стимулировать естественный IFN ответ и противовирусный статус соседних неинфицированных клеток. По этой причине проводится поиск низкомолекулярных ингибиторов, способных предотвратить опосредованное NS1 ингибирование врожденного иммунного ответа. В некоторых работах применяют скрининг соединений, способных нарушить взаимодействие NS1 с РНК, тогда как в других нацелены на NS1-опосредованное ингибирование экспрессии генов хозяина [94]. В целом, белок NS1 все еще слабо изучен в качестве мишени для противовирусной терапии.

***Терапевтические моноклональные антитела.*** Для лечения тяжелого гриппа было разработано несколько моноклональных антител (МКА). В настоящее время клинические исследования проходят пять МКА, направленных на высококонсервативный стебель HA ВГА. Так как МКА направлены на консервативные эпитопы в вирусных белках, они могут нейтрализовать вирусы многих подтипов ВГА. МКА CR6261 связывается со спиральной областью в проксимальном к мембране стебле HA1/HA2, обеспечивая нейтрализацию широкого спектра ВГА [63, 330]. Данное МКА также обладает хорошей профилактической и терапевтической активностями на модели грызунов, инфицированных вирусом H5N1 [63, 330].

МКА CR8020 также связывается с эпитопами в стебле HA и нацелено на блокирование слияния мембран. Оно обладает противовирусной активностью против группы двух подтипов HA и оказалось эффективным в отношении вирусов

H3N2 и H7N7 *in vitro* и *in vivo* [82]. В отношении CR8020 были проведены двойные плацебо-контролируемые клинические исследования II фазы на экспериментально инфицированных добровольцах и госпитализированных пациентах с гриппом, в процессе выполнения которых, в том числе, провели сравнение с МКА CR6261 [181]. Было показано, что CR8020 нацелен на аминокислотные остатки, склонные к генетическому дрейфу, поэтому в случае возникновения эскейп-мутантов, их эффективность будет снижена [326].

МКА MEDI8852 также нацелено на стебель HA, но обладает большей эффективностью и шириной спектра активности, эффективно ингибируя все 16 подтипов HA [163]. MEDI8852 превосходило озельтамивир по показателям предотвращения гибели грызунов, инфицированных вирусом H5N1, при применении в течение 3 дней после инфицирования [163]. MEDI8852 хорошо переносилась добровольцами в рамках I фазы клинических исследований.

МКА MНAA4549A также направлено на стебель HA и эффективно в связывании HA ВГА всех подтипов [130]. Доклинические исследования показали эффективность этого МКА у мышей и грызунов при H5N1 инфекции при введении в течение 72 часов после инфицирования. Два клинических исследования I фазы продемонстрировали, что МКА хорошо переносится добровольцами при одном внутривенном введении в дозе до 10800 мг и обладает средним временем полужизни 22,5- 23,7 дней [197]. Оно также было эффективно для терапии в высоких дозах (3600 мг) у волонтеров, экспериментально инфицированных вирусом A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) [181].

МКА VIS-410 защищает мышей от вируса H7N9 при профилактическом применении. Одна доза (10-50 мг/кг) защищала всех мышей от гибели при инфицировании устойчивым к озельтамивиру штаммом ВГА [31]. Результаты I фазы клинических исследований были удовлетворительными.

Антитело TCN032 отличается от вышеприведенных тем, что оно направлено на N-концевой фрагмент белка M2, являющийся консервативным

эпитопом у ВГА. Связывание МКА с этим сайтом ингибировало почти все подтипы ВГА и защищало мышей от заражения летальной дозой вирусов H5N1 или H1N1 [125]. МКА TCN032 проходит фазу II исследований экспериментальной гриппозной инфекции у людей [264].

**Антисенс-олигонуклеотиды и siРНК.** Для синтетических олигодезоксинуклеотидов была показана высокая эффективность в отношении ВГА. Перспективным методом ингибирования репликации ВГА является РНК-интерференция с использованием siРНК. Это процесс, при котором молекулы днРНК специфически узнают комплементарные участки в мРНК и направляют их на деградацию. В случае ВГА мишенями для siРНК могут выступать не только вирусные мРНК, но также геномные кРНК и вРНК. Для ряда siРНК, направленных на гены ВГА, показана противовирусная активность на клеточной культуре и мышах [112, 263, 334]. Практическое применение siРНК ограничивается двумя сложностями. Первая проблема связана с необходимостью их эффективной и безопасной доставки в инфицированные клетки. Было предложено и изучено множество носителей для siРНК, однако ни один из них так и не был внедрен в клиническую практику. Вторая проблема связана с противоречивыми результатами об индукции IFN и цитокинов посредством siРНК. В этой области были достигнуты серьезные успехи, позволяющие минимизировать вероятность неспецифического и токсичного действия siРНК. Несмотря на очевидные трудности в практическом внедрении технологии siРНК, данный подход представляется одним из наиболее перспективных, так как позволяет проводить быстрый рациональный дизайн препаратов.

**Ингибирование клеточных факторов.** Выявление факторов организма хозяина, которые необходимы для оптимальной вирусной репликации, позволяет находить дополнительные мишени для противовирусных препаратов. Такой подход имеет определенные преимущества и недостатки. Во-первых, ингибирование клеточной активности, имеющей важное значение для выживания

или роста клеток, может быть губительно для клетки, поэтому такие факторы не могут быть пригодны в качестве противовирусных мишеней. Однако, при короткой продолжительности терапии в случае с острыми инфекциями (таким как грипп) можно позволить временную потерю клеточных функций без ущерба для организма хозяина. Основным преимуществом таргетирования клеточного фактора перед вирусным является то, что развитие устойчивости в этом случае будет происходить с гораздо меньшей вероятностью. Кроме того, направленные на клеточные мишени соединения могут обладать широким спектром специфичности, так как многие вирусы используют одинаковые клеточные функции. Например, ингибиторы белка теплового шока HSP90 блокируют размножение вирусов гриппа, гепатита С и Эбола [52, 303]. Некоторые ингибиторы ферментов, задействованных в метаболическом пути синтеза пиримидинов *de novo*, и ингибиторы рецепторных тирозинкиназ ингибируют репликацию широкого спектра вирусов, включая грипп [94].

Определение мишени для новых соединений, противовирусная активность которых была обнаружена в процессе скрининга, является сложной задачей. Если соединение может ингибировать вирусы, принадлежащие к разным семействам, и/или показывает видоспецифическую активность, настоятельно рекомендуется проводить поиск клеточной мишени. Кроме того, известные ингибиторы клеточных факторов или сигнальных путей, имеющие критическое значение для репликации ВГА, могут быть перенацелены как противовирусные препараты на другие вирусы, или, по крайней мере, использованы как химические зонды для исследования функций взаимодействий вирус–хозяин. Показано, что ингибиторы клеточных белков MEK, SAMK2B, vATPаза и CLK1 ингибируют размножение вирусов гриппа [94]. Помимо подавления активности клеточного белка, противовирусное соединение также может активировать клеточные факторы, обладающие противовирусной активностью. Такой эффект был показан для

химической активации экспрессии REDD1, которая приводит к блокированию размножения вирусов гриппа и везикулярного стоматита [94].

### **1.7.1.2. Неспецифическая терапия гриппа**

При тяжелых случаях гриппа исход заболевания определяется как вирулентностью вируса, так и состоянием организма, поэтому в этом случае можно применять комплексную терапию как противовирусными, так и иммуномодулирующими препаратами [201]. В ряде исследований было показано, что применение иммуномодулирующих препаратов, как в комбинации с противовирусными, так и отдельно, снижало смертность и повреждения органов при тяжелом гриппе.

**Кортикостероиды.** Кортикостероиды – это класс стероидных гормонов, обладающих противовоспалительной активностью за счет связывания с цитоплазматическим рецептором кортикостероидов, который регулирует транскрипцию противовоспалительных генов [65]. Кортикостероиды широко применяются для лечения воспаления. В литературе описаны случаи применения кортикостероидов для лечения пациентов с ОРДС во время пандемии гриппа H1N1<sub>pdm09</sub> во Франции и при вспышке вируса H7N9 в 2013 году в Китае [45, 103]. Согласно другим клиническим исследованиям, проведенным в Японии, обоснованность применения кортикостероидов вызывает вопросы.

**Агонисты активируемых пероксисомным пролифератором рецепторов.** Активируемые пероксисомным пролифератором рецепторы (PPARs) PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  и PPAR $\gamma$  являются важными регуляторами воспаления. Агонист PPAR $\alpha$ , гемфиброзил, способный ингибировать TNF, IL6 и IFN $\gamma$ , был предложен для лечения тяжелого гриппа. Однако, данные экспериментов на мышинной модели инфекции оказались противоречивыми [46, 386]. Фармакологический механизм гемфиброзила для лечения тяжелого гриппа еще требует изучения. Среди агонистов PPAR $\beta$  можно отметить только безафибрат, который обеспечивал

частичную защиту пациентов с грипп-ассоциированной энцефалопатией [377]. Наиболее перспективными кандидатами для лечения тяжелого гриппа являются агонисты PPAR $\gamma$ , в частности, росиглитазон и пиоглитазон [65]. Эти тиазолидиндионы не только снижали воспалительный ответ при вирусной пневмонии, но и увеличивали выживаемость инфицированных мышей [33]. Более того, эффективность лечения агонистами PPAR $\gamma$  была выше, чем для гемфиброзила [65]. Естественный агонист PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$ , биоканин А, выделенный из клевера лугового, обладал сходным иммуномодулирующим действием, что и гемфиброзил, при лечении гриппа *in vivo* [201].

**Агонисты сфингозин-1-фосфатного рецептора 1.** В последние годы наблюдался интерес к развитию новых препаратов, обладающих активностью против иммунопатологических повреждений через путь сфингозин-1-фосфатного (S1P) рецептора [246]. Из пяти S1P рецепторов, регулирующих нижестоящие сигнальные пути, только S1P1, локализованный преимущественно в эндотелиальных клетках легкого, проявляет активность в подавлении цитокинового шторма, выступая супрессором врожденного клеточного и цитокинового/хемокинового ответов [246]. Например, агонисты S1P1 рецептора СУМ- 5442 и RP-002 защищали мышей от летальной инфекции тяжелым гриппом, подавляя продукцию цитокинов и привлечение клеток врожденного иммунного ответа [201]. При этом агонисты S1P1 рецептора увеличивали выживаемость животных до 80% по сравнению с 50% выживаемостью при применении озельтамивира [246]. Более того, комбинированная терапия двумя препаратами позволила достичь 96% защиты. В настоящее время это наиболее многообещающие результаты по применению иммуномодулирующей терапии.

**Ингибиторы циклооксигеназы.** Селективные ингибиторы циклооксигеназы (COX), такие как целекоксиб и месалазин, широко применяются в клинической практике по причине своих жаропонижающих, анальгезирующих и противовоспалительных свойств. Монотерапия целекоксибом на мышьяной

модели инфекции не показала значимого снижения тяжести заболевания [48]. Однако, использование ингибиторов COX-2 в комбинации с ингибиторами нейраминидазы привело к увеличению выживаемости мышей, инфицированных вирусом H5N1 [386]. Тройная комбинация терапии занамивиром, целекоксибом и месалазином значительно снижала смертность и уровни цитокинов и хемокинов у инфицированных мышей [386]. Таким образом, ингибиторы COX-2 имеют перспективу применения в комбинированной терапии.

**Антиоксиданты.** Так как активные формы кислорода играют центральную роль в воспалительном ответе и вирусной репликации, антиоксиданты, обладающие противовирусным и противовоспалительным эффектами, могут также быть эффективными для лечения цитокинового шторма при тяжелом гриппе [201]. N-ацетилцистеин, модифицированная форма цистеина, способен ингибировать репликацию вируса H5N1 и вызванную им продукцию провоспалительных факторов (IL6, CCL5, CXCL8, CXCL10) в эпителиальных клетках легкого [113]. Глицирризин, ингибитор гидроксистероиддегидрогеназы, способен ингибировать репликацию вируса H5N1 и экспрессию провоспалительных генов [223]. Многие антиоксиданты, выделенные из растений (например, полифенол, флавоноиды и др.), также могут снижать уровень повреждений эпителиальных клеток и смертность мышей, вызванную тяжелым гриппом [201]. В случае антиоксидантов монотерапия без комбинации с противовирусными препаратами также оказывает крайне низкий эффект на предотвращение цитокинового шторма [108].

**Терапия, направленная на TNF.** Хотя комплексная природа «цитокинового шторма» так и остается до конца не понятной, ключевым цитокином при острых вирусных заболеваниях считается TNF, оказывающий воздействие локально и системно [201]. Таким образом, направленная на блокирование TNF терапия может рассматриваться для лечения тяжелого гриппа. Было показано, что применение TNF-нейтрализующих МКА или растворимых рекомбинантных

рецепторов TNF может снижать продукцию цитокинов и инфильтрацию воспалительных клеток в легких инфицированных мышей, однако при этом не наблюдается увеличение выживаемости [283, 318]. Таким образом, клиническое применение анти-TNF терапии, вероятно, является неэффективным.

*Другие препараты.* Помимо вышеперечисленных еще целый ряд препаратов может обладать противовоспалительным эффектом при тяжелом гриппе, среди них статины, блокаторы рецептора ангиотензина, ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента (ACE), ингибиторы ССR, активаторы аденозин-5'-монофосфат-активируемой протеинкиназы (AMPK), супрессоры цитокинового сигналинга (SOCSs) [201]. Кроме того, некоторые антибиотики (эритромицин, кларитромицин, рокситромицин, азитромицин) и противовирусные средства (умифеновир) обладают противовоспалительным действием в дополнение к своей противопатогенной активности [201].

Таким образом, имеется достаточно большое число препаратов, которые потенциально могут быть применены для лечения тяжелого гриппа, однако только широкомасштабные клинические испытания позволят ответить на вопрос, какие из них действительно обладают фармакологической активностью, позволяющей противостоять развитию ОРДС и вторичных бактериальных осложнений.

### **1.7.2. Методы диагностики гриппа**

Точная и своевременная диагностика гриппа является критической для быстрого начала противовирусной терапии для снижения заболеваемости гриппом и смертности во время сезонных эпидемий и пандемий. В настоящее время существует несколько различных подходов для диагностики гриппа у человека. Они включают вирусовыделение в культуре клеток, иммунофлуоресцентный анализ, амплификацию нуклеиновых кислот, иммунохроматографические экспресс-тесты и др [352]. Новые

диагностические подходы разрабатываются для преодоления ограничений, связанных с традиционными методами обнаружения. Далее представлены применяемые в настоящее время методы диагностики для обнаружения вирусов гриппа в организме человека.

**Выделение вируса с использованием культуры клеток.** Восстановление вирусов гриппа в клинических образцах путем размножения в клетках млекопитающих или куриных эмбрионах является наиболее традиционным методом диагностики гриппа. Введенный в 1940-х годах подход по культивированию вируса на клеточных культурах является одним из золотых стандартов диагностики вирусных инфекций. Этот подход заключается в инокуляции перmissive клеточных линий или куриных эмбрионов инфекционными образцами, за которым следует распространение инфекции в течение 7-10 дней, позволяющее отслеживать развитие цитопатического эффекта, и окончательное подтверждение заражения вирусом, используя специфическое окрашивание антителами, гемадсорбцию с применением эритроцитов, или иммунофлуоресцентную микроскопию [182]. Выделение ВГА с использованием этого подхода, как правило, выполняется на определенных клеточных линиях, таких как MDCK, A549, Mv1Lu и др. Также применяют SVC (shell viral culture) метод выделения вируса, при котором размножают вирусы в клетках млекопитающих, культивируемых во флаконах или лунках планшета, с последующим окрашиванием ВГА флуоресцирующими антителами [352]. SVC подход является относительно более простым и чувствительным по сравнению с традиционным методом вирусного выделения и позволяет обнаруживать вирус в течение 24-48 часов.

**Прямой иммунофлуоресцентный анализ.** Этот тест, также известный как иммунофлуоресцентный тест (ИФ), представляет собой антигенный тест, обычно применяемый для диагностики гриппа. В начале 1960-х годов данный подход предполагал прямое окрашивание респираторных эпителиальных клеток,

полученных из мазков или смывов из носоглотки, флуоресцентно-мечеными специфическими антителами с последующим анализом под флуоресцентным микроскопом [352]. Благодаря простоте и скорости проведения анализа ИФ-тесты широко использовались для диагностики гриппа. Однако по своей чувствительности и специфичности ИФ-тесты уступают молекулярным методам, и все реже применяются в клинико-диагностических лабораториях.

*Серологический анализ.* Серологические методы анализа чаще всего используются с целью обнаружения вирус-специфического антительного ответа. К ним относят реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), нейтрализацию, радиальный гемолиз (РГ), анализ реакции связывания комплемента, иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноблоттинг [352].

РТГА является наиболее часто используемым методом для определения наличия специфических антител к НА вируса гриппа в сыворотке крови после естественной инфекции и вакцинации в организме человека и животных. Этот анализ основан на способности НА-специфических антител предотвращать связывание ВГА с эритроцитами, полученными из курицы, индейки, человека, лошади, морских свинок. Наибольшее разведение сыворотки, которое предотвращает полную гемагглютинацию называется РТГА-титром сыворотки.

Метод нейтрализации используется для измерения индукции вирус-специфических антител после естественного инфицирования или вакцинации, и рутинно используется для обнаружения титра антител к сезонным штаммам ВГА. Этот подход основан на способности вирус-специфических антител нейтрализовать вирус, тем самым предотвращая вирусное заражение клеток. Обратная величина наибольшего разведения сыворотки, при котором вирусная инфекция полностью блокируется, считается титром вирусной нейтрализации. Хотя нейтрализация является более чувствительным по сравнению с РТГА методом, ее применение для рутинной диагностики ограничено из-за

необходимости использования инфекционных вирусов и сертифицированных BSL2+ и BSL3 лабораторий [352].

Метод РГ обычно используется для определения индукции антител после естественного инфицирования или вакцинации. Он используется для измерения комплемент-опосредованного гемолиза, вызванного комплексами антиген-антитело. РГ является более чувствительным, чем РТГА и не требует предварительной обработки сыворотки для инактивации неспецифических ингибиторов.

Тесты на основе ИФА доступны как в формате микротитровального планшета, так и бумажных стрипов. ИФА был впервые введен для диагностики заболеваний в начале 1990-х годов и неизменно демонстрирует высокую чувствительность и специфичность. В мире доступны несколько одобренных FDA ИФА-тестов для диагностики ряда бактериальных и вирусных инфекций. Одним из основных ограничений более широкого распространения ИФА для диагностики гриппа является их более низкая чувствительность по сравнению с методами амплификации нуклеиновых кислот.

**Быстрые тесты.** Быстрые тесты, как правило, основаны на детекции антигенов антителами в формате, позволяющем проводить диагностику «у постели больного» [182]. В таких тестах, как правило, используют МКА, специфически связывающиеся с вирусным NP, и применяются в формате иммуноферментного или иммунохроматографического анализа. Быстрые тесты доступны в форматах небольших кассет, карт и т.п., время анализа составляет менее 30 минут. Предполагается визуальное наблюдение результатов, основанное на изменении цвета или других оптических сигналов. Благодаря простоте в использовании и скорости получения результата анализа, быстрые тесты обычно используются в случаях, когда нет возможности применять методы традиционной вирусологической, иммунологической или молекулярной диагностики для оперативной диагностики гриппа [182]. Доступные в настоящее время быстрые

тесты позволяют выявлять вирусы гриппа А+В, только ВГА и дифференцировать вирусы гриппа А и В. При этом ни один из доступных быстрых тестов не позволяет проводить субтипирование ВГА. Эффективность быстрых тестов зависит от распространенности ВГА, циркулирующих в популяции [64]. Для диагностики сезонного гриппа эффективность быстрых тестов сильно отличается. Мета-анализ 159 проведенных исследований с участием 26 коммерческих быстрых тестов показал, что их чувствительность составляет 62,3% по сравнению с ПЦР-методами диагностики гриппа [51]. В этом исследовании, чувствительность быстрых тестов для обнаружения ВГА была выше по сравнению с вирусами гриппа В (64.6% и 52.2%, соответственно).

***Тесты на основе детекции молекул нуклеиновых кислот.*** Появление ПЦР в 1993 году революционизировало область диагностики вирусных инфекций. Методы детекции нуклеиновых кислот основаны на применении ПЦР для детекции генетического материала вируса (молекул РНК или ДНК), а не вирусных антигенов или антител. Тесты на основе детекции молекул нуклеиновых кислот более чувствительны по сравнению с методами детекции антигенов и позволяют определять вирус в анализируемом образце на более ранних сроках инфекции. В настоящее время доступно множество вариантов методов детекции нуклеиновых кислот: ОТ-ПЦР, лигазная цепная реакция, тесты на основе секвенирования (включая пиросеквенирование и NGS), ДНК микрочипы, амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), изотермальная петлевая амплификация (LAMP), simple amplification-based assay (SAMBA), транскрипционная амплификация, амплификация с перемещением цепи и многие другие [352]. Анализ с использованием большинства из этих тестов занимает 2-4 часа, обладает высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с антигенными тестами. В настоящее время FDA одобрено более 20 тест-систем для диагностики гриппа, основанных на детекции молекул нуклеиновых кислот.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусы.** В работе использовали штаммы ВГА человека и животных, среди которых: A/Almaty/1/98 (H1N1), A/Almaty/5/98 (H1N1), A/Almaty/32/98 (H1N1), A/Astrakhan/72/08 (H1N1), A/Brisbane/59/07 (H1N1), A/Voronezh/4/08 (H1N1), A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/swine/31/76 (H1N1), A/duck/Alberta/35/76 (H1N1), A/Khabarovsk/74/77 (H1N1), A/Egypt/96/02 (H1N2), A/Singapore/1/57 (H2N2), A/duck/Germany/215/73 (H2N3), A/Brisbane/10/07 (H3N2), A/Victoria/3/75 (H3N2), A/Novosibirsk/1/08 (H3N2), A/Samara/68/08 (H3N2), A/Sydney/5/97 (H3N2), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), A/duck/Potsdam/1402-6/86 (H5N2), A/duck/Singapore/F119/97 (H5N3), A/duck/Netherlands/00 (H7N3), A/duck/California/72 (H3N8), A/tern/South Africa/59 (H5N3), A/duck/Czechoslovakia/56 (H4N6), А/серебристая чайка/Атырау/2186/07 (H2N2), А/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6), А/ворон/Иркутск/402/08 (H3N8), А/лошадь/Алматы/26/07 (H3N8), А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8), А/серебристая чайка/Иркутск/111/05 (H3N8), А/чирок-свистунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8), А/малая поганка/Алаколь/791/04 (H4N6), А/голубая чернеть/Актау/1455/06 (H4N6), А/лысуха/Актау/1454/06 (H4N6), А/домашний гусь/Павлодар/1/05 (H5N1), А/курица/Курган/5/05 (H5N1), А/лебедь-шипун/Мангистау/3/06 (H5N1), А/скворец/Костанай/233/07 (H5N1), А/утка-широконоска/Костанай/58/07 (H5N1), А/серебристая чайка/Сарма/51с/06 (H6N1), А/Алматы/331/06 (H7N7), А/каспийский тюлень/1/00 (H7N7), А/сизая чайка/Иркутск/121/08 (H9N7), А/черноголовый хохотун/Атырау/284/02 (H13N6), А/серебристая чайка/Атырау/2216/07 (H16N3). Штаммы взяты из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России или предоставлены РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК.

**Клеточные культуры.** В работе использовали культуру клеток Vero (Европейская Коллекция Клеточных Культур), полученную из компании «ГринХиллзБиотехнология» (Австрия), адаптированную к росту в

бессывороточной среде OptiPro («Invitrogen», США) с добавлением 4 мМ L-глутамина («Gibco», США). В качестве модели IFN-компетентных клеток была использована культура клеток MDCK (банк клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России). Клетки культивировали в питательной среде DMEM/F12 (1:1) («Gibco», США) с добавлением 4 мМ L-глутамина и 5–10% фетальной сыворотки (FBS) («Gibco», США). Для моделирования гриппозной инфекции использовали культуру клеток A549 (Европейская Коллекция Клеточных Культур), полученную из компании «ГринХиллзБиотехнология» (Австрия). Клетки культивировали в питательной среде DMEM («Gibco», США) без антибиотиков с добавлением 10% FBS («Gibco», США). Для проведения экспериментов использовали суточный монослой, с концентрацией клеток от  $\approx 10^5$  до  $\approx 10^7$  в 1 мл в зависимости от поставленных задач. Все клеточные культуры поддерживали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

**Трансфекционные агенты.** В работе использовали трансфекционные агенты полиэтиленимин (ПЭИ) (P3143, «Sigma-Aldrich») и липофектамин «Lipofectamine® 2000» (11668019, «Invitrogen»). Гибридные микрокапсулы, пустые и с упакованной siРНК, были синтезированы и охарактеризованы по описанной ранее методике [332] в лаборатории микрокапсулирования и управляемой доставки биологически активных соединений RASA-центра (СПбПУ, Россия).

**Синтетические siРНК.** При подборе siРНК выбирали наиболее консервативные участки генов-мишеней и руководствовались «правилами Тушла» [83, 271]. Все РНК-нуклеотиды были синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Москва), последовательности приведены в тексте. Олигонуклеотиды были растворены в стерильной DEPC-обработанной H<sub>2</sub>O до конечной концентрации 100 мкМ. Для приготовления двунитевых siРНК синтезированные комплементарные одностранные олигонуклеотиды смешивали эквимольно и проводили гибридизацию по следующему протоколу: нагрев до 95°C в течение 3

минут; плавное понижение температуры до 35°C с понижением на 1°C в течение 30 секунд; охлаждение с 35°C до 5°C с понижением на 1°C за минуту. Полученные РНК-дуплексы анализировали методом электрофоретического разделения в 15% ПААГ.

**Моноклональные антитела.** Моноклональные антитела (МКА) к белкам NP, NA и NS1 получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

**Пептиды.** Цистеин-содержащие пептиды NA и ПДИ были синтезированы в ООО «НПФ Верта» (Россия).

**Соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов.** В работе использовали следующие производные 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов:

- натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, брутто-формула  $[C_5H_3N_6O_3S] Na^+ \times 2H_2O$ , м.м. 227;
- натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, брутто-формула  $[C_6H_5N_6O_3S]^- Na^+ \times 2H_2O$ , м.м. 241;
- натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат, брутто-формула  $[C_6H_3N_6OS]^- Na^+ \times 3H_2O$ , м.м. 284.

Все соединения были синтезированы в Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (УрФУ) и Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН (ИОС УрО РАН), их молекулярная масса была подтверждена методом MALDI-MS на масс-спектрометре UltrafleXtreme («Bruker», Германия).

## 2.1. Филогенетический анализ

Нуклеотидные последовательности гена NS были взяты из базы NCBI Influenza Virus Resource. После удаления идентичных друг другу последовательностей было проведено их множественное выравнивание с использованием программного обеспечения MAFFT

(<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) [171]. Филогенетический анализ проводили с помощью онлайн службы на сайте [www.fludb.org](http://www.fludb.org), используя алгоритм RAxML [308] и бутстрэп анализ с количеством реплик, равным 500.

## 2.2. Клеточная модель инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А

**Заражение клеток вирусом.** В работе использовали суточный монослой культуры клеток, выращенный в стандартных планшетах или флаконах Nunc («Thermo Fisher Scientific», США). Для моделирования гриппозной инфекции на клетках A549 к полностью сформированному монослою клеток ( $10^5$ – $10^6$  клеток/мл) вносили рекомбинантные ВГА с множественностью заражения (MOI) от 0,001 до 1. Заражение проводили в среде DMEM («Gibco», США), содержащей 1 мкг/мл трипсина («Sigma-Aldrich», США) и 1% пенициллин-стрептомицин («Thermo Fisher Scientific», США). Объем вирусосодержащей среды рассчитывали по формуле 2.1:

$$V[\text{мл}] = \frac{\frac{X[\%]}{100[\%]} \times \rho \times S[\text{см}^2] \times a \times MOI}{\text{титр}}} \quad (2.1)$$

где X — конфлюентность;  $\rho$  — плотность клеток при 100% конфлюентности,  $\rho = 150000$ ; S — площадь монослоя,  $\text{см}^2$ ; a — число слоев,  $a = 1$  для планшетов; титр —  $\text{TCID}_{50}/\text{мл}$ .

В качестве контроля использовали незараженные клетки в поддерживающей среде. После инкубации в течение 30 минут вирусосодержащий материал удаляли, монослой клеток отмывали от неадсорбированных вирусных частиц и вносили свежую культуральную среду. Инкубацию клеток проводили при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ .

**Получение рекомбинантных ВГА.** Рекомбинантные ВГА получали методом обратной генетики в процессе трансфекции клеток Vero плазмидными ДНК, кодирующими сегменты генома ВГА, как описано в [148, 257].

**Определение инфекционной активности вируса.** Инфекционную активность вирусов определяли методом предельных разведений на клетках

MDCK и Vero. Для этого готовили серии 10-кратных разведений вирусодержащей суспензии на среде Alpha MEM («Биолот», Россия) с добавлением трипсина («Sigma-Aldrich», США) (до конечной концентрации 2,5 мкг/мл) и антибиотиков стрептомицина/пенициллина (до 1%). Для определения 50% тканевой инфекционной дозы (ТИД<sub>50</sub>) использовали 96-луночные культуральные планшеты Nunc («Thermo Fisher Scientific», США) с суточным монослоем клеток. После удаления среды в лунки вносили по 100 мкл приготовленных разведений вирусодержащего материала. Далее планшеты инкубировали 72–96 часов при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Учет результатов проводили визуально по наличию цитопатического эффекта для каждой лунки и контролировали с помощью метода гемагглютинации с использованием 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Расчет 50% ТИД<sub>50</sub> для всех вирусных штаммов проводили по методу Рида и Менча [268] и выражали в lgТИД<sub>50</sub>/мл.

**Выделение тотальной РНК.** Выделение тотальной РНК проводили с использованием реагента TRIzol («Invitrogen», США), концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher», США). мРНК из препаратов тотальной РНК выделяли на oligodT шариках с использованием набора Dynabeads mRNA Purification Kit («Ambion», США).

**Детекция вирусной РНК методом ПЦР.** ОТ-ПЦР проводили в соответствии с рекомендациями CDC с использованием SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit («Invitrogen», США) и предназначенных для типирования ВГА праймеров InfA (InfA F 5'-GACCRATCCTGTACCTCTGAC-3'; InfA R 5'-AGGGCATTYTGGACAAA-KCGTCTA-3'; InfA P 5'-FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-BHQ1-3').

**Детекция вирусных белков методом ИФА.** Сэндвич-ИФА проводили по методике, описанной в [332], с использованием МКА к НА и NP ВГА и 96-луночных планшетов Microlon High Binding (55061, «Greiner Bio-One», Германия). Все инкубации, кроме сорбции захватывающих антител, проводили в

термошейкере для иммунологических планшетов PST-60HL-4 («BioSan», Латвия) при температуре 37°C и 250 об/мин. Колориметрическую реакцию проводили с использованием набора TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (1721067, «Bio-Rad», США). После остановки цветной реакции добавлением в каждую лунку по 100 мкл 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> измеряли оптическую плотность на длинах волн 450 (OD<sub>450</sub>) и 655 нм (OD<sub>655</sub>) на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar («BMG Labtech», Германия). Обработку результатов проводили с использованием программ MARS Data Analysis, Microsoft Office Excel и GraphPad Prism 6.

### **2.3. Анализ с помощью экспрессионных микрочипов и секвенирования нового поколения**

*Подготовка библиотек мРНК и их гибридизация на микрочипе.* мРНК из пулированных препаратов тотальной РНК выделяли на oligo-dT шариках с использованием набора Dynabeads mRNA Purification Kit («Ambion», США) в соответствии с протоколом производителя. Очищенные препараты мРНК использовали для приготовления библиотек с применением набора Quick Amp Labeling Two Color Kit («Agilent», США) и флуоресцентных меток Cyanine 5-PTC Dye Pack, two-color («Agilent», США). Все этапы подготовки флуоресцентно меченых библиотек для гибридизации проводили в полном соответствии с инструкцией производителя, обеспечивающей введение внутренних контролей. Полученные флуоресцентно меченые библиотеки были очищены от непрореагировавших компонентов реакций с помощью набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», США). Чистоту и концентрацию полученной кРНК, а также концентрацию встроенной метки, определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Для высокопроизводительного анализа дифференциальной экспрессии использовали олигонуклеотидный микрочип SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K v2 («Agilent», США), содержащий зонды, специфически выявляющие кРНК человека. Данная версия

чипа состоит из 8 субэреев, что позволяет попарно сравнивать 16 биологических проб в процессе одного эксперимента. Для обеспечения биологической достоверности гибридизацию каждой пробы проводили в трех повторах. В каждый из субэреев наносили по 25 мкл образца, содержащего по 300 нг каждой из двух сравниваемых проб кРНК, помеченных разными метками — Cy3 или Cy5, а также блокирующий реагент и гибридизационный буфер. Перед гибридизацией пробы предварительно фрагментировали в буфере для фрагментации в течение 30 минут. Этапы подготовки пробы для гибридизации и саму гибридизацию осуществляли с использованием реагентов компании «Agilent» в полном соответствии с инструкцией производителя. Микрочип инкубировали на крутящейся стойке в гибридизационной печи («Agilent Microarray Hybridization Oven») при 10 об/мин и 65°C в течение 17 часов (оставляли на ночь). На следующий день осуществляли отмывку микрочипа в несколько этапов с использованием буферов «Gene Expression Wash Buffer 1» и «Gene Expression Wash Buffer 2» («Agilent», США) в соответствии с протоколом производителя.

**Высокопроизводительное секвенирование (NGS).** Для анализа паттернов экспрессии miРНК использовали платформу MiSeq («Illumina», США). Все этапы подготовки библиотек miРНК для NGS, включающие в себя стадии лигирования 5'- и 3'-адаптеров, обратной транскрипции, амплификации библиотек с одновременным введением индексов, проводили с использованием набора «TruSeq Small RNA Library Prep Kit Set A» («Illumina», #RS-200-0012) согласно инструкции производителя. Общее количество пулированных библиотек составило 15 пМ. При запуске использовали картридж MiSeq v2 Reagent kit 50 Cycles PE («Illumina», #MS-102-2001).

**Компьютерные методы анализа.** Сканирование экспрессионного микрочипа К после гибридизации проводили на сканере SureScan Microarray Scanner («Agilent Technologies», США). С помощью программы Feature Extraction v.12 проводили оцифровку полученного на сканере изображения и оценку

качества гибридизации. В результате анализа изображения с помощью этого программного обеспечения для каждого из восьми субэреев микрочипа получали таблицы данных, содержащие информацию об интенсивности флуоресценции зондов на каналах Cy3 и Cy5. Для выявления дифференциально экспрессирующихся генов в полученных таблицах данных применяли бесплатный пакет limma (Linear Models for Microarray), реализованный с помощью языка R version 3.1 в среде разработки RStudio. Аннотация зондов была проведена с помощью пакета biomaRt также в среде разработки RStudio. Конечный анализ на данном этапе был выполнен с помощью базы данных по функциональной аннотации DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Для оценки качества данных высокопроизводительного секвенирования клеточных miRNA полученные FASTQ-файлы анализировали в программе FastQC. Далее проводили выравнивание прочтений каждого образца на референсный геном человека версии GRCh38.p3 с использованием программы STAR v.2.5.0 [75].

#### **2.4. Изучение противовирусной активности siRNA**

***Приготовление комплексов с siRNA.*** Комплексы siRNA с липофектаминоном были получены путем смешивания реагента Lipofectamine® 2000 и siRNA в соотношениях, указанных в протоколе производителя. siRNA с Lipofectamine® 2000 вносили в лунки культурального планшета согласно протоколу производителя. Микрокапсулы в водном растворе добавляли в среду, доводя до нужной концентрации по siRNA, и вносили к клеткам в соотношении приблизительно 2–5 микрокапсул на клетку. Комплексы добавляли к монослою клеток A549 с последующей инкубацией в течение 24 часов.

***Оценка жизнеспособности клеток.*** Для оценки жизнеспособности клеток применяли микротетразолиевый тест (МТТ). Раствор 3-(4,5-диметилазол-2-ил) 2,5-дифенилтетразолия бромид в концентрации 2,5 мг/мл вносили на

предварительно отмытые PBS клетки в лунках 96-луночных планшетов и инкубировали 4 часа при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, затем раствор сливали, и добавляли 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (100 мкл) для разрушения клеточных мембран и растворения осадка. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере CLARIOstar («BMG Labtech», Германия) в режиме снятия поглощения с лунки на длине волны 570 нм.

**Определение эффективности внутриклеточной доставки siРНК.** Для оценки эффективности проникновения siРНК в клетки была использована FAM-меченая siРНК. siРНК с липофектаминам, а также микрокапсулы с FAM-меченой siРНК, вносили в лунки 96-луночного планшета в трех повторах (концентрация siРНК в лунке 1 мкМ). Через 24 часов клетки отмывали PBS, чтобы избавиться от не вошедших в клетку комплексов, фиксировали ацетоном и окрашивали DAPI. Изображения, качественно подтверждающие наличие FAM-меченой siРНК в цитоплазме клеток, а также полуколичественный расчет эффективности доставки siРНК с учетом отрицательного контроля (сигнал фона) и нормировки на количество клеток были получены с помощью системы формирования изображений Cytell Cell Imaging System («GE Healthcare», США) (настраиваемое приложение MyBioApp).

**Определение противовирусной активности siРНК.** Противовирусную активность препаратов siРНК оценивали по профилактической схеме на клеточной культуре A549. Препараты siРНК добавляли к монослою клеток, инкубировали 24 часа (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), отмывали PBS и заражали вирусом в разведениях на поддерживающей среде DMEM с глутамином, 0,1 мкг/мл трипсина и 0,1 мг/мл стрептомицина. Через 30 минут инкубации (8°C) сменяли среду на поддерживающую. Клетки инкубировали 24 и 72 ч (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), после чего оценивали вирусную репродукцию в клетках и вирус-содержащей культуральной жидкости (ВКЖ), полученной от них. Быстрый скрининг действия siРНК, доставляемой в клетки с помощью липофектамина, проводили на двух

клеточных культурах, A549 и MDCK, по профилактической схеме. Препараты siРНК (50 пмоль/ $10^5$  клеток) вносили за 1 час до заражения вирусом при значении множественности инфекции (МОИ) 0,1, выбранной в соответствии с данными в работе [268]. Репродукцию вируса в ВКЖ оценивали методом реакции гемагглютинации (РГА) с 0,5% куриными эритроцитами для двукратно раститрованных ВКЖ, полученных от клеток через 24 и 72 часа после заражения. Титр вируса выражали в единицах ГА, обратных максимальному разведению вызывающих агглютинацию эритроцитов. Накопление вирусного белка NP в инфицированных клетках и ВКЖ, полученных от них, определяли методом ИФА с использованием антител 6D11-HRP.

**Определение уровня вирусного белка в фиксированных клетках.** Клетки фиксировали 80% холодным ацетоном в течение 30 минут при 4°C, затем трижды отмывали раствором PBS с добавлением 0,05% Tween 20 (PBST). После этого клетки инкубировали в 5% растворе молока на PBST. Конъюгированные с HRP антитела мыши 6D11 добавляли в концентрации 1 мкг/мкл, инкубацию проводили 1 час при температуре 37°C. Специфическую реакцию связывания антитела с антигеном детектировали путём добавления в каждую лунку реагентов из набора TMB Peroxidase EIA Substrate Kit («Bio-Rad», США) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере CLARIOstar («BMG Labtech», Германия) при длине волны 450 нм (за вычетом значения при 655 нм для учёта фонового сигнала).

## **2.5. Изучение механизмов ингибирования протеиндисульфидизомеразы**

**Получение рекомбинантного белка ПДИ.** В качестве исходной референсной последовательности использовался человеческий белок P4NB P07237 (Uniprot). Нативный сигнальный пептид на N-конце в итоговой конструкции был заменен на прокариотический сигнальный пептид PelB, отвечающий за транспорт полипептида в периплазму. Кроме того, были удалены

последние 29 аминокислот, составляющие кислый хвост и сигнал удержания белка в эндоплазматическом ретикулуме. Согласно работе [358] этот С-концевой хвост не участвует в ферментативной активности белка, но при этом способен затруднить кристаллизацию белка. Расчетная молекулярная масса процессированного Р4НВ равна 53,3 кДа, а изоэлектрическая точка 5,24.

**Клонирование гена Р4НВ.** Из клеток линии НЕК293 была выделена РНК с помощью реактива TRIzol согласно инструкции. РНК была обработана ДНКазой (Deoxyribonuclease I – Amplification Grade, «Sigma-Aldrich», США) и использована в качестве матрицы для получения кДНК набором MMLV RT kit («Евроген», Россия). Для амплификации полученной кДНК проводили ПЦР с использованием высокоточной Pfu-полимеразы (здесь и далее — все ферменты производства «Thermo Fisher Scientific», США) и праймеров, содержащих сайты эндонуклеаз рестрикции (в случае MscI только 3'-область сайта): Р4НВ-MscI-F2 и Р4НВ-NotI-R. Продукт ПЦР был осажден этиловым спиртом с ацетатом аммония, растворен в воде и обработан рестриктазой NotI. Плазмида pET22B(+) была обработана рестриктазами MscI и NotI и щелочной фосфатазой. Продукты рестрикции были очищены из агарозного геля набором (Cleanup Mini, «Евроген», Россия) и лигированы друг с другом T4 лигазой. Полученной лигазной смесью была произведена электропорация клеток *E. coli* штамма DH10B. Несколько клонов были отобраны для секвенирования. Выделение плазмид осуществляли набором (Plasmid Miniprep, «Евроген», Россия). Последовательности вставок полученных экспрессионных конструкций были определены методом ферментативного секвенирования (по Сэнгеру) на приборе ABI PRISM 3500 («Applied Biosystems», США) с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Был отобран клон, в котором транслированная последовательность гена совпадает с референсной P07237 (Uniprot). Штамм-продуцент был создан электропорацией этой плазмиды в штамм *E. coli* BL21(DE3).

**Экспрессия P4HB-6×His.** Клетки штамма-продуцента рассеивали до отдельных колоний на чашку с агаризованной средой Lysogeny broth с добавлением антибиотика ампициллина до конечной концентрации 100 мкг/мл. После роста колоний проводили отбор (по одной) для посева в 8 мл жидкой среды Lysogeny broth с добавлением 100 мкг/мл ампициллина (LB Amp) и культивировали ночь при 30°C и 250 об/мин на шейкере. Далее часть инокулята переносили в двухлитровую колбу с 200 мл LB Amp до финальной OD=0,1. Культуру инкубировали на шейкере при 30°C 250 об/мин до оптической плотности OD=0,7–0,8 и добавляли 0,5 mM IPTG («Sigma-Aldrich», США), после чего культивировали клетки еще 4 часа. Далее выращенные бактериальные культуры центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин при 4°C (ротор JA-20/JA-14 от напольной центрифуги Beckman).

**Очистка белка.** Осадок клеток ресуспендировали в буфере (0,1M Tris-HCl; pH 8,0; 0,3M NaCl; 5mM DTT; 1mM PMSF) до OD=10. После трех циклов замораживания/оттаивания клетки подвергали соникации до полного осветления суспензии. Нерастворимые остатки клеток удаляли центрифугированием на 20000 об/мин /20мин/4°C (ротор JA-20/JA-14 от напольной центрифуги Beckman). Осветленный лизат очищали методом металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием колонки 1 мл Protino Ni-NTA Column («Macherey-Nagel», Германия) на хроматографе ÄKTAprime plus («GE Healthcare», США).

**Масс-спектрометрическая идентификация белков.** Ферментативный гидролиз белков в геле трипсином проводили согласно [336], минуя этап восстановления дисульфидных связей и их карбамидометилирования. Вырезанные фрагменты геля, содержащие интересующие окрашенные зоны, отмывали от красителя дважды по 15 минут 30mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 40% ацетонитрилом и обезвоживали ацетонитрилом. Затем ацетонитрил отбирали, гель высушивали и добавляли 20 мкг/мл трипсина («Promega», США) в 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Ферментативный гидролиз проводили в течение 5 часов при 37°C. Реакцию

останавливали раствором 0,5% трифторуксусной кислоты, 10% ацетонитрила. Полученные триптические пептиды смешивали с матрицей НССА (альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота, «Bruker», Германия), наносили на мишень «GroundSteel» и анализировали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре «ultrafleXtreme» («Bruker», Германия) в режиме регистрации положительных ионов. Для каждого спектра суммировали 5000 импульсов лазера. Идентификация белков осуществлялась с использованием MASCOT (matrixscience.com) при обращении к базе данных NCBI. В качестве переменных модификаций указывали окисление метионинов. Погрешность ограничили 20 ppm.

***Количественная масс-спектрометрическая оценка окислительной способности соединений ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов.*** В качестве пептидной модели ПДИ использовали два пептида из его ферментативного центра: G74 (APWCGHCKA) и G75 (APWCGHCKQ). Пептиды в концентрации 0,1 мкМ смешивали с каждым из препаратов ряда азоло-азинов в концентрации 0,025 мкМ, растворённого в 100 мМ бикарбонате аммония ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). В качестве контроля препараты ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов заменяли на воду или на буфер. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 7,5; 15; 30 и 110 минут. Реакцию останавливали 2% трифторуксусной кислотой. Масс-спектрометрические измерения проводили, как описано выше. Степень окисления оценивали по соотношению окисленной и восстановленной форм пептидов (с замкнутыми и свободными дисульфидными группами), долю которых в общем количестве пептида рассчитывали, исходя из площади соответствующих им пиков изотопных распределений в программе flexAnalysis («Bruker», Германия). Скорость окисления рассчитывали с использованием уравнения кинетики реакций первого порядка.

***Оценку ингибирования ПДИ*** проводили с использованием набора PDI Inhibitor Screening Assay Kit (ab139480, «Abcam», США) в соответствии с инструкцией производителя.

**Молекулярный докинг.** 3-D модели лигандов и мишени были созданы с помощью молекулярно-графического пакета SYBYL 8.0 (Centara, USA). Стартовые координаты для построения 3-D модели ПДИ были взяты из базы данных PDB: 4EKZ и 3UEM. Была проведена оценка заряженных состояний всех аминокислотных остатков, входящих в состав мишеней, чьи боковые группы могут нести заряд, с учетом pH 7,0. Оптимизация молекулы с целью устранения неблагоприятных Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, возникших в процессе кристаллизации, была проведена с помощью молекулярно-механической минимизации в SYBYL-X, используя метод Пауэла [261] со следующими параметрами: для молекулярно-механических вычислений использовалось силовое поле TRIPOS [95], частичные заряды на атомах мишенях были рассчитаны с помощью топологического подхода, используя метод Гайстагера – Хюккеля [110], радиус обрезания для нековалентных взаимодействий был равным 8 Å, диэлектрическая проницаемость бралась как функция от расстояния, число итераций было равным 2000, в начале оптимизации использовался симплекс метод, критерий сходимости для градиента энергии брался равным 0,05 ккал · моль<sup>-1</sup> · Å<sup>-1</sup>. Для расчёта частичных зарядов на атомах исследуемые лиганды были оптимизированы с применением теории функционала плотности (DFT), используя гибридный функционал B3LYP [189, 190, 203] с базисным набором 6-31G(2d,2p). Учитывая, что результаты оценки электростатической составляющей в процедуре докинга зависят от величин частичных зарядов на атомах, и зависимость количества расчётного времени от величины количества исследуемых лигандов, для полученной в результате оптимизации геометрии был осуществлён поиск схемы расчёта, дающей приемлемую корреляцию с экспериментальными данными и позволяющей использовать разумное время для проведения расчётов, с применением как топологического подхода, так и квантовомеханического. В рамках первого был использован наиболее востребованный среди исследователей упомянутый выше метод Гайстагера-Хюккеля. В рамках второго – наряду с

полуэмпирическими методами: AM1 [69], PM3 [312], PM6 [313]; для рассчитанной распределения электронной плотности были использованы анализ заселенности орбиталей: по Милликену [229] и натуральный популяционный анализ (NBO) [266, 267], метод расчёта электростатического потенциала на сетке CHELPG [44]. Все квантово-механические вычисления делались с помощью пакета Gaussian 9 [95].

Для определения наиболее вероятного сайта связывания на поверхностях мишеней и оценки энергии связывания использовали процедуру докинга. Последняя была проведена с помощью программы ICM-Pro 3.8-6a [9]. Процедура докинга проводилась дважды. Вначале был реализован «жесткий» докинг, во время которого при поиске возможных положений лиганда учитывалась только конформационная, позиционная и вращательная подвижности лиганда, а геометрия мишени оставалась неизменной. Затем была проведена уточняющая процедура «гибкого» докинга, во время которой учитывались не только конформационная, вращательная и позиционная подвижности лиганда, а также подвижность боковых цепей аминокислот и участков неструктурированных петель, контактирующих с лигандом. Перед началом докинга мишень и структуры лигандов были трансформированы в ICM объекты, поскольку согласно методологии ICM молекулярные модели описываются с использованием внутренних координат. Оценка энергии межатомных взаимодействий производилась с помощью молекулярно-механических вычислений, параметры которых для мишени брались как из силового поля ECEPP/3 (Empirical Conformational Energy Program for Peptides) [20], так и силового поля Merck Molecular Force Field MMFF [138], а для лиганд – из силового поля MMFF. В течении процедуры докинга для генерации случайных смещений атомов при сканировании пространства возможных размещений лигандов на поверхности мишени использовался метод Монте-Карло (в англ. варианте ВРМС (biased probability Monte Carlo)). Сам алгоритм поиска возможных геометрий размещения

лигандов на поверхности мишени представляет циклическую процедуру, где цикл состоял из следующих шагов: на первом этапе происходит смещение атомов из положений, задаваемых стартовой конформацией лиганда, за счёт случайных изменений значений свободных переменных, описывающих расположения атомов, в соответствии с непрерывным вероятностным распределением, заданным в коде программы, далее полученная геометрия оптимизируется за счёт минимизации термов, входящих в функцию оценки энергии взаимодействия, и представленных аналитическими дифференцируемыми выражениями, при удовлетворении критериям сходимости при минимизации происходит окончательное вычисление энергии, включая энергию сольватации и энтропийную составляющую, учитывающую изменение конформационной подвижности, и на последнем этапе происходит принятие или игнорирование полученной конформации, основанном на критерии Метрополиса. На третьем шаге описанной выше процедуры оценка энергии связывания основывалась на заранее рассчитанных сеточных потенциалах, оценивающих гидрофобность за счёт поверхности доступной растворителю, электростатические и ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, формирование водородных связей, десольватацию за счёт открытых доноров и акцепторов водородной связи, а также на расчёте внутренней энергии лиганда. Центр сетки для расчёта сеточных потенциалов брался в центре мишеней. Размер ячейки брался равным 0.5 Å. Количество узлов бралось таким образом, чтобы сетка покрывала объём, формируемый мишенями. Из всего набора конформаций, сформированных во время первой процедуры докинга, было отобрано 100 лучших по энергии связывания конформаций, которые послужили в качестве стартовых для второй «гибкой» процедуры докинга. Затем геометрия комплексов, полученных на первом этапе, была оптимизированная с применением ВРМС процедуры. На этом этапе оптимизации подвергались как конформации лиганда, так и конформации боковых групп аминокислот, расположенных в области с радиусом 4 Å. Описание ВРМС

процедуры и того, как производилась оценка энергии связывания, можно найти в статье [336]. Финальный конформационный стэк, полученный на второй стадии, был отсортирован по значению оценки энергии связывания. Свободная энергия комплексообразования рассчитывалась по формуле 2.2:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{bind} + \Delta G_{eq} + \Delta G_{VdW} + \Delta G_{hbond} + \Delta U - T\Delta S + \Delta G_{solv} \quad (2.2)$$

как сумма энергии комплексообразования в вакууме и разницы между энергией сольватации комплекса и суммой энергией сольватации несвязанных мишени и лиганда  $\Delta G_{solv}$ . Энергии комплексообразования в вакууме оценивались как сумма изменения электростатической  $\Delta G_{eq}$  и Ван-дер-Ваальсовой  $\Delta G_{VdW}$  составляющих, энергию формирования водородных связей  $\Delta G_{hbond}$ , энергию напряжений связей, валентных и двугранных углов  $\Delta U$ , изменение энтропии за счёт потери конформационной подвижности как мишени, так и лиганда  $T\Delta S$ . Энергия сольватации оценивалась по методу Вессона-Айзенберга [370]. Для построения распределения гидрофобного и электростатического потенциала на поверхности мишени был также использован молекулярно-графический пакет SYBYL –X.

## 2.6. Разработка олигонуклеотидных микрочипов

**Печать микрочипов.** Олигонуклеотидные зонды, содержащие амиолинкер («ДНК-Синтез», Россия), в трехкратном SSC-буфере в концентрациях 300 нг/мкл наносили на альдегидный субстрат (Vantage Aldehyde Slides, «CEL Associates», США) методом контактной печати с использованием споттера SpotBot® 3 Personal Microarrayers («Arrayit Corporation», США). После печати слайды оставляли на ночь в споттере, а затем проводили ковалентную пришивку зондов с помощью УФ-облучения в кросслинкере BioLink («Biometra», Германия) при 0,09 Дж/см<sup>2</sup>.

**Флуоресцентное мечение вирусной РНК.** Одностадийную ОТ-ПЦР проводили с помощью набора SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System («Invitrogen», США) в соответствии с инструкцией производителя.

Для мультисегментной амплификации использовали универсальную пару праймеров, подобранную к концевым высококонсервативным областям, имеющимся во всех геномных сегментах ВГА (МВТuni-12 и МВТuni-13) [72]. Амплификацию проводили, как описано ранее [349]. Флуоресцентное мечение пробы осуществляли путем прямого встраивания Cy5-dСТР («ДНК-Синтез», Россия) непосредственно в процессе ОТ-ПЦР, реакционная смесь при этом дополнительно содержала 33 мкМ 1 мМ Cy5-dСТР.

**Флуоресцентное мечение мРНК цитокинов.** Синтез кДНК проводили методом ОТ в объеме 25 мкл. К образцу РНК в количестве 1–2 мкг добавляли 1 мкл олиго(dT<sub>16</sub>) (10 ОЕ/мл) и DEPC-обработанную H<sub>2</sub>O до объема 10 мкл, затем проводили отжиг при +70°C в течение 5 минут в термошейкере Comfort plus («Eppendorf», Германия), после чего пробы немедленно охлаждали на льду. Далее добавляли 15 мкл реакционной смеси, содержащей 200 ед. M-MLV ревертазы («Invitrogen», США) в 1× ОТ-буфере и эквимоллярную (по 500 мкМ) смесь четырех dNTP («ДНК-Синтез», Россия). Реакцию ОТ проводили в течение 1 часа при 37°C. Флуоресцентное мечение кДНК проводили в процессе ПЦР. 30 мкл реакционной смеси для ПЦР содержали: 2,5 ед. Taq-полимеразы в 1× Taq-буфере, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 250 мкМ dATP, dTTP, dGTP, 100 мкМ dСТР и 17 мкМ Cy5-dСТР («ДНК-Синтез», Россия), 30 пмоль прямого и обратного праймеров, 1 мкл кДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе MJ Mini («Bio-Rad», США) по следующей программе: 95°C — 4 минуты; 10 циклов 95°C — 30 секунд, 62°C — 0,5°C — 30 секунд, 72°C — 30 секунд; 20 циклов 95°C — 30 секунд, 57°C — 30 секунд, 72°C — 30 секунд; 72°C — 5 минуты. Последовательности использованных в работе праймеров и олигонуклеотидных зондов («ДНК-Синтез», Россия) приведены в [259]. В случае мультиплексной ПЦР использовали смесь прямых и обратных пар праймеров (по 30 пмоль). Электрофоретическое разделение ПЦР продуктов проводили в 1% агарозном геле с использованием 1×

трис-боратного буфера в камере Mini Sub Cell («Bio-Rad», США). Гели документировали с помощью системы Kodak Image Station («Kodak», США).

**Гибридизация.** К 1 мкл ПЦР-смеси, содержащей Cy5-кДНК, добавляли раствор для гибридизации, доводили общий объем до 50 мкл Milli-Q H<sub>2</sub>O и прогревали в твердотельном термостате при 99°C 2 минуты, затем охлаждали во льду 2 минуты и сразу наносили на микрочип. Олигонуклеотидные зонды на микрочипе также денатурировали кипячением слайда в Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 минуту с последующей инкубацией в 96% этаноле (с –20°C) в течение 1 минуты, после чего слайд высушивали центрифугированием при 300 g 2 минуты. Гибридизацию проводили с использованием открытой рамки на 16 субэппреев FAST<sup>®</sup> Frame («Whatman», США) в течение 2 часов при 37°C с перемешиванием при 250 об/мин в термошейкере Biosan PST-60 HL plus («BioSan», Латвия). После этого проводили отмывку слайда от раствора для гибридизации и несвязавшихся молекул пробы, затем слайд высушивали на центрифуге.

**Сканирование микрочипов** проводили на сканере ScanArray Express («PerkinElmer», США) с разрешением 5 мкм и при значении PMT в пределах 60—90. Флуоресцентное сканирование для метки Cy5 проводили при длине волны возбуждения 650 нм и длине волны регистрации 670 нм. Обработку получаемых изображений проводили с использованием программы ScanArray Express 3.0 («PerkinElmer», США).

## **2.7. Мультиплексная ПЦР для детекции цитокинов**

мПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 1× Taq-буфер, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 единиц Taq-полимеразы («Медиген», Россия), эквимольную смесь четырех dNTP по 330 мкМ каждого («Promega», США), 2–5 мкл кДНК, смесь специфических прямых и обратных праймеров и олигонуклеотидных TaqMan зондов, подобранных в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России и синтезированных в компании «ДНК-Синтез»

(Россия). Количественное соотношение праймеров и олигонуклеотидных TaqMan зондов в реакционных смесях было оптимизировано экспериментально [259].

## **2.8. Статистический анализ**

Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента или непараметрических критериев Уилкоксона-Манна-Уитни с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2010 и Statistica 6.0.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Белок NS1 – перспективная мишень в системе вирус гриппа типа А/ клетка-хозяин для разработки средств терапии гриппа

В природе известны сотни вирусов, вызывающих заболевания человека, однако число разрешенных к применению противовирусных препаратов едва превышает несколько десятков [60]. Большинство из них, как например, озельтамивир – ингибитор NA ВГА, являются препаратами направленного действия. Главные недостатки таких препаратов связаны с моноспецифичностью и относительно быстрым возникновением устойчивости. Тот факт, что процесс создания нового лекарственного средства занимает в среднем 8-12 лет и обходится в сумму около 2 миллиардов долларов, ставит под сомнение экономическую и практическую целесообразность разработки препаратов, направленных на конкретный вирус [214]. Современный подход к созданию противовирусных лекарственных средств заключается в поиске новых соединений широкого спектра действия и соединений, направленных на нарушение интерфейса вирус/клетка-хозяин [208]. В этом случае лекарственными мишенями могут выступать не только вирусные, но и клеточные гены и белки. Для ВГА одной из наиболее перспективных мишеней является многофункциональный неструктурный белок NS1 [2]. В случае дизайна лекарственных препаратов, направленных на NS1, может быть использовано несколько стратегий. Во-первых, можно блокировать синтез самого белка, например, с помощью siРНК, направленных на консервативные области гена NS. Во-вторых, в качестве мишеней для терапии гриппа можно рассматривать не NS1, а его клеточные белки-партнеры, взаимодействие с которыми необходимо для успешной вирусной репликации. В-третьих, можно подбирать молекулы (низкомолекулярные соединения, пептиды, ДНК аптамеры), специфически блокирующие сайты взаимодействия NS1 с клеточными или вирусными белками

и молекулами нуклеиновых кислот. В настоящее время в литературе описано несколько соединений, мишенью для которых является белок NS1. Для некоторых из них показана противовирусная активность *in vitro* и даже *in vivo*, однако большинство таких разработок находится на ранних стадиях [85]. Прежде чем приступить к дизайну препаратов, направленных на NS1 или связанные с ним клеточные факторы (гены, мРНК, белки), необходимо было доказать эволюционную консервативность гена *NS* и белка NS1 среди ВГА человека, а также выбрать клеточную модель ВГА инфекции, которая позволила бы оценить вклад этого белка в ее развитие.

### **3.1.1. Анализ эволюционной динамики NS1 вируса гриппа типа А человека**

#### **3.1.1.1. Филогенетический анализ гена *NS* вируса гриппа типа А человека**

На протяжении последнего столетия в популяции человека преимущественно циркулировали ВГА подтипов H1N1, H2N2 и H3N2 [226, 324]. При этом появление вирусов каждого нового подтипа сопровождалось пандемиями, которые произошли в 1918, 1957, 1968, 1977 (псевдопандемия) и 2009 годах [304]. Полные генетические последовательности в основном известны только для ВГА, циркулировавших не ранее 1918 года, поэтому понимание вирусологической природы пандемий гриппа, происходящих до этого времени, ограничено.

Несмотря на значительный прогресс в области молекулярной вирусологии, эпидемиологии и эволюции ВГА фундаментальный вопрос о механизмах передачи и адаптации вируса от птиц (или других хозяев) к человеку до сих пор остается без ответа. Наибольшее внимание с этой точки зрения уделяется поверхностному HA, определяющему вирусный подтип и отвечающему за проникновение вируса в клетку, а также субъединицам PB1, PB2 и PA РНК-полимеразы, осуществляющей транскрипцию и репликацию вРНК [323]. Вместе с тем, в процессе адаптации к новому хозяину важную роль играют другие

вирусные белки, в частности, NS1, основная функция которого заключается в противостоянии IFN-опосредованным механизмам противовирусной защиты и взаимодействии с множеством клеточных факторов [78, 136]. В литературе имеются данные об аминокислотных заменах в NS1, которые усиливают патогенность штаммов ВГА разной видовой специфичности [210]. Например, усиление вирулентности ВГА H1N1 человека, содержащего ген NS высокопатогенных ВГА птиц H5N1, связано с заменой E92D в NS1, обеспечивающей усиление индуцированной IFN устойчивости клеток к вирусу [291]. Вместе с тем значимость выявленных замен, связанных с увеличением вирулентности, для смены видовой специфичности вируса и адаптации к новому хозяину остается мало понятной [136, 210]. Несомненным является то, что при изучении роли NS1 как в патогенезе инфекции, так и в процессе межвидовой адаптации необходимо четко понимать его молекулярно-генетические детерминанты патогенности и эволюционное происхождение.

На первом этапе работы провели филогенетический анализ гена NS ВГА. В базе данных «Influenza Virus Resource» [30] выбрали полноразмерные последовательности ORF NS1 гена NS ВГА человека всех известных подтипов, а также ВГА свиньи. 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 [337, 354]. Далее последовательности кластеризовали согласно вирусному подтипу. В результате получили более 7000 уникальных (после элиминирования идентичных) нуклеотидных последовательностей ORF NS1 ВГА человека и свиньи. Филогенетический анализ такого большого числа последовательностей вызывает затруднения при использовании стандартных программных пакетов, предназначенных для анализа ограниченного числа генов или белков с использованием персональных компьютеров, примененных автором, например, в работе [345]. В связи с этим для анализа использовали *on-line*

сервисы, предлагающие упрощенные алгоритмы анализа нескольких тысяч последовательностей. Множественное выравнивание выбранных нуклеотидных последовательностей гена *NS* провели с использованием программы MAFFT [171], и на его основе построили филогенетическое дерево с помощью алгоритма RAxML. Филогенетически значимые группы были определены на основе значений бутстреп-анализа. При классификации также учитывали такие характеристики вируса, как подтип, год выделения и организм-хозяин. Построенное филогенетическое дерево гена *NS* представлено на рисунке 3.1. Топология полученного дерева согласуется с данными других авторов и принятой моделью эволюции ВГА человека [323, 375].

Общим предком для современных ВГА человека является вирус H1N1<sub>pdm1918</sub>, вызвавший пандемию «Испанского гриппа», которая унесла жизни не менее 50 миллионов человек [324]. Среди генов *NS* ВГА человека и свиньи выделяют две эволюционные линии. Первая, обозначенная как NS<sub>av\_ori</sub>, содержит ген *NS* вирусов, произошедших от ВГА птиц. Вторая линия, обозначенная как NS<sub>pdm1918</sub>, соответствует гену *NS* ВГА человека и свиньи, ведущему свое эволюционное происхождение от соответствующего гена (NS<sub>1918</sub>) вируса H1N1<sub>pdm1918</sub>. Этот вирус, с одной стороны, происходит из пула ВГА птиц (NS<sub>avian</sub>), с другой стороны, является предшественником подавляющего большинства современных ВГА человека [323, 324]. Внутри линии NS<sub>pdm1918</sub> наблюдается достоверное разделение на два клайда NS<sub>hum\_ori</sub> и NS<sub>sw\_ori</sub>, которые соответствуют сезонным ВГА человека подтипов H1N1, H2N2 и H3N2 (линии NS<sub>H1N1</sub>, NS<sub>H2N2</sub> и NS<sub>H3N2</sub>, соответственно) и ВГА свиней Классической линии, тройным реассортантным ВГА свиньи и пандемическим вирусам H1N1<sub>pdm2009</sub> человека (линии NS<sub>clasw</sub>, NS<sub>tri</sub> и NS<sub>pdm09</sub>, соответственно). Внутри линии NS<sub>av\_ori</sub> можно выделить гены *NS* ВГА свиней Евразийской линии (NS<sub>eursw</sub>) и ВГА человека и свиней, происходящих от вирусов птиц подтипов H5, H7, H9 (NS<sub>av</sub>).

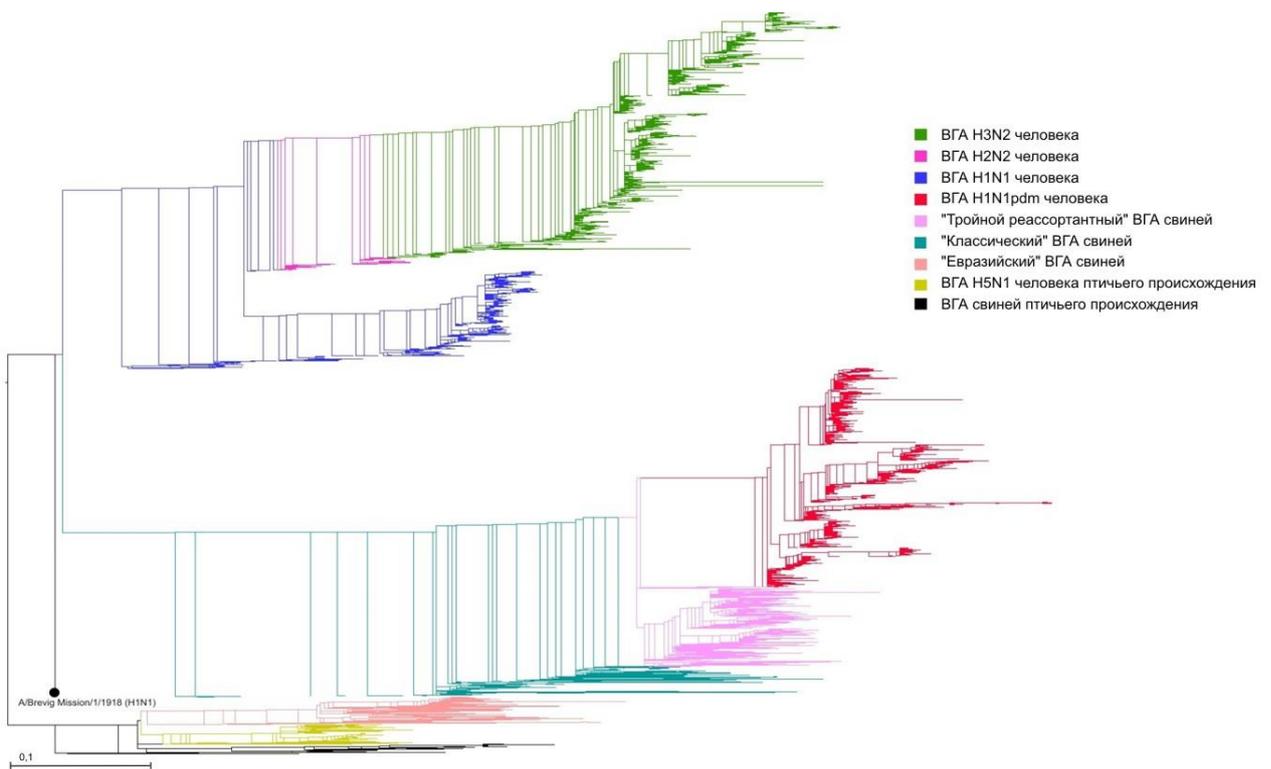


Рисунок 3.1 – Филогенетическое дерево гена *NS* (открытой рамки считывания NS1) ВГА человека и свиньи, построенное методом RAxML. Анализ 1000 бутстреп-повторов был выполнен с использованием GTR-GAMMA модели замен

Для того чтобы проследить эволюционную динамику гена *NS* ВГА человека необходимо сопоставить данные его филогенетического анализа и эволюции самих вирусов [323]. Как было сказано ранее, вирусы  $H1N1_{pdm1918}$  являются предшественниками всех современных ВГА человека и ВГА свиней (за исключением вирусов Евразийской линии). Ген *NS* эволюционировал в вирусах  $H1N1$  человека с примерно постоянной скоростью с 1918 года вплоть до пандемии «Азиатского гриппа» 1957 года, вызванной появлением реассортантного ВГА  $H2N2$ , в геноме которого появились новые сегменты *NA* подтипа *H2*, *NA* подтипа *N2* и *PB1*, произошедших от вирусов птиц [323]. ВГА  $H2N2$  в 1968 году был вытеснен из циркуляции новым вирусом  $H3N2$ , вызвавшим пандемию «Гонконгского гриппа». Этот вирус появился в результате

реассортации геномных сегментов ВГА человека H2N2 и ВГА птиц, приведшей к появлению новых сегментов NA подтипа H3 и PB1 [323]. При этом ген NS без существенных изменений сохранился в ВГА H3N2 человека [346, 375], который быстро стал эндемическим и циркулирует как сезонный в популяции человека по настоящее время.

ВГА человека H1N1 вновь появился в популяции человека в 1977 году, вызвав псевдопандемию. Штаммы ВГА H1N1 1977 года были практически идентичны штаммам 1957 года по последовательностям всех восьми геномных сегментов [231]. 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 гена этих вирусов эволюционную ветвь.

В 2009 году произошла пандемия, вызванная появлением нового ВГА подтипа H1N1<sub>pdm2009</sub>, которая носила умеренный, близкий к слабому, характер [4]. Данный вирус является сложным реассортантом двух неродственных вирусов H1N1 свиней классической и Евразийской линий [109, 323], что подтверждается и данными филогенетического анализа гена NS [346, 375]. Сегменты NA и M вирусов H1N1<sub>pdm2009</sub> человека происходят от ВГА свиней H1N1 Евразийской линии, в то время как остальные шесть сегментов – от «тройного реассортантного» вируса свиней H1N2, появившегося в конце 1990-х годов [180, 304]. В этом вирусе гены HA, NP и NS происходят от вирусов Классической линии свиней, гены PB2 и PA происходят из пула ВГА птиц, а PB1 – от сезонных вирусов человека H3N2. Таким образом, ген NS вирусов H1N1<sub>pdm2009</sub> эволюционировал в пуле ВГА свиней, при этом он также как и ген NS ВГА человека подтипов H1N1, H2N2 и H3N2 происходит от общего предкового гена NS пандемического вируса 1918 года.

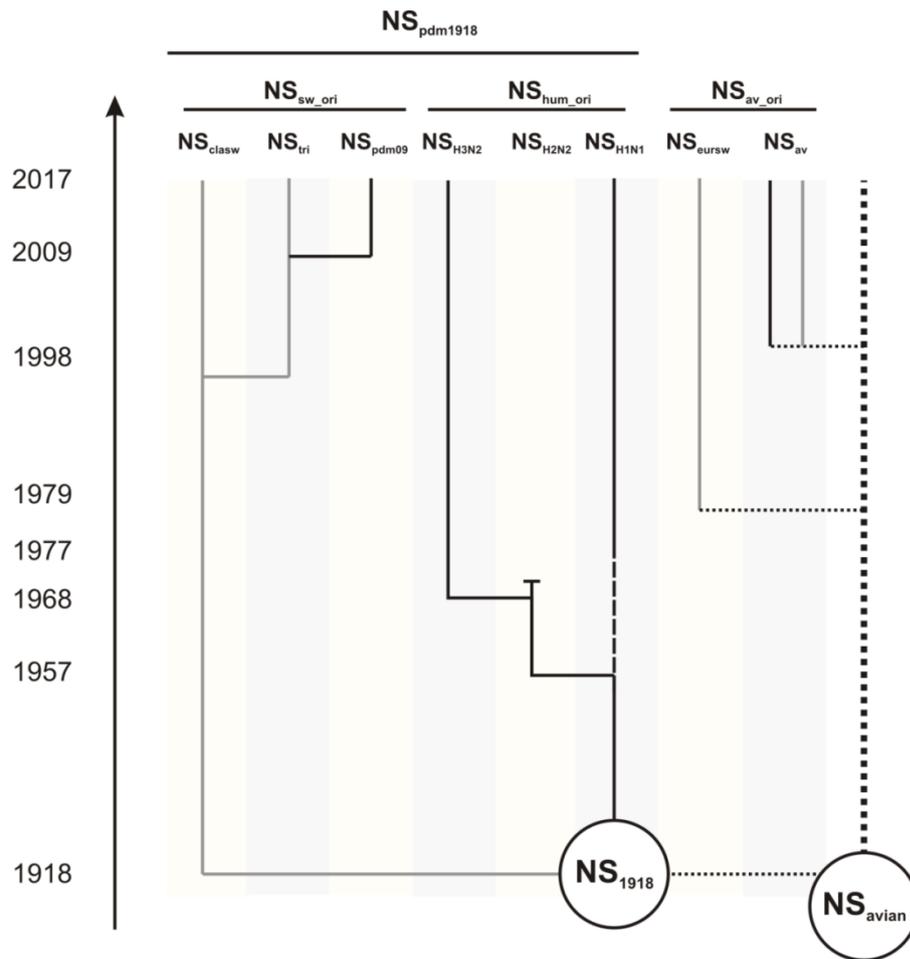


Рисунок 3.2 – Схема эволюции гена *NS* ВГА человека и свиньи с 1918 года по настоящее время.  $NS_{avian}$  – *NS* пула ВГА птиц;  $NS_{1918}$  – *NS* ВГА  $H1N1_{pdm1918}$ ;  $NS_{H1N1}$  – *NS* ВГА  $H1N1$  человека;  $NS_{H2N2}$  – *NS* ВГА  $H2N2$  человека;  $NS_{H3N2}$  – *NS* ВГА  $H3N2$  человека;  $NS_{pdm09}$  – *NS* ВГА  $H1N1_{pdm09}$  человека;  $NS_{clasw}$  – *NS* ВГА Классической линии свиней;  $NS_{tri}$  – *NS* тройного реассортантного ВГА свиней;  $NS_{eursw}$  – *NS* ВГА Евразийской линии свиней;  $NS_{av}$  – *NS* ВГА человека и свиньи подтипов  $H5$ ,  $H7$ ,  $H9$  птичьего происхождения. Линии  $NS_{H1N1}$ ,  $NS_{H2N2}$  и  $NS_{H3N2}$  относятся к клайду  $NS_{hum\_ori}$ ; линии  $NS_{clasw}$ ,  $NS_{tri}$  и  $NS_{pdm09}$  относятся к клайду  $NS_{sw\_ori}$ ; линии  $NS_{eursw}$  и  $NS_{av}$  относятся к клайду  $NS_{av\_ori}$ . Клайды  $NS_{hum\_ori}$  и  $NS_{sw\_ori}$  объединены в общий клайд  $NS_{pdm1918}$ , происходящий от гена  $NS_{1918}$ . Черными отмечены линии *NS* ВГА человека, серым отмечены линии *NS* ВГА свиньи, линия *NS* ВГА птиц отмечена пунктиром

Известно также, что существуют спорадические случаи межвидовой передачи ВГА. Например, в 1976 году в США произошло инфицирование людей вирусами свиней H1N1 [111]. Наиболее известными являются случаи передачи человеку высокопатогенных ВГА птиц H5N1 [372] и умеренно патогенных ВГА птиц H7N9 [372]. В этих вирусах ген *NS* очевидно имел птичье происхождение. Однако такие случаи межвидовой передачи ВГА носили локальный характер, и вирусы не смогли зафиксироваться в популяции человека. Следует отметить, что прямая межвидовая передача ВГА может происходить не только от птиц к млекопитающим, но и между различными видами млекопитающих, в частности, между человеком, свиньями и лошадьми [354].

Таким образом, общая схема, иллюстрирующая эволюционную динамику гена *NS* ВГА человека, показывает, что сегмент *NS*, начиная с 1918 года, не подвергался реассортации и оставался неизменным у всех подтипов ВГА, циркулировавших в популяции человека (рисунок 3.2). 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* [323].

### **3.1.1.2. Анализ аминокислотных замен в структурных и функциональных сайтах NS1**

Белок NS1 является относительно консервативным с точки зрения эволюции ВГА, выполняя множество функций взаимодействия с клеточными факторами и важную роль в адаптации вируса к хозяину. В связи с этим, крайне интересно оценить количество аминокислотных замен в ключевых функциональных сайтах NS1 разных клайдов ВГА человека (рисунок 3.3) [2].

**РНК-связывающий домен.** N-концевой RBD содержит сайты ядерной локализации, связывания с днРНК и димеризации [57, 136, 378]. По сравнению с предковой последовательностью белка NS<sub>1918</sub> в РНК-связывающем сайте NS<sub>hum</sub>

имеется несколько аминокислотных замен. Образующие NLS1 R35, R38 и K41 абсолютно необходимы для связывания NS1 с импортном- $\alpha$  [126, 221]. R35 и R38 в NS1 являются консервативными для всех изученных вирусов. K41 также не меняется, за исключением NS<sub>H3N2</sub>, у которых в 1974 году произошла замена K41R. В NS<sub>hum\_ori</sub> в 1935 году произошла замена R44K, однако в клайдах NS<sub>H2N2</sub> и NS<sub>H3N2</sub> произошла обратная замена K44R. Интересно, что такая же замена R44K имеется в NS<sub>pdm09</sub>, появившись в NS<sub>clasw</sub> в 1971 году. Остальные аминокислоты, образующие РНК-связывающий сайт, в процессе эволюции не изменялись. Область, отвечающая за димеризацию RBD, образована шестью консервативными аминокислотными остатками в положениях 12, 19, 29, 32, 35 и 46 [200, 362]. В области 21-23 а.о., соответствующей С-концевому фрагменту  $\alpha$ -спирали (2-25) RBD, мутации имеются только в NS<sub>hum\_ori</sub>. По сравнению с предковой последовательностью NS<sub>1918</sub> в NS<sub>hum\_ori</sub> присутствовали замены R21Q (с 1948 года) и F22V. В NS<sub>H2N2</sub> с 1960 года появилась замена A23V, которая сохранилась и для NS<sub>H3N2</sub>. Для всех NS<sub>hum\_ori</sub>, начиная с 1940 года, и NS<sub>sw\_ori</sub>, начиная с 1978 года, наблюдается замена A60V. В NS<sub>pdm09</sub> выявлены замены E26G, R44K, V18I, Q25N, R59L и R67W, которые появились в разное время в предковых последовательностях NS<sub>sw\_ori</sub>. Исключительно для NS<sub>pdm09</sub> характерны замены V6M, D2E (с 2015 года) и E55K (с 2013 года). Все вышеперечисленные мутации в RBD, за исключением R44K, расположены за пределами функциональных сайтов и приходятся на области  $\alpha$ -спиралей.

**Междоменная линкерная область.** За RBD следует подвижная междоменная линкерная область длиной 13 а.о., соединяющая RBD и ED NS1 [40]. Для вирусов H5N1 в этой области известна делеция участка 80-84 а.о., которая, вероятно, нарушает ориентацию и/или стабильность RBD, что приводит к усилению устойчивости к цитокинам и вирулентности [205]. В этой области в NS<sub>hum\_ori</sub> присутствует замена I81M. Кроме того, с 1940 года выявлена замена

V84A, которая сохранилась в NS<sub>H1N1</sub> и NS<sub>H2N2</sub>, однако в NS<sub>H3N2</sub> с 1971 года произошла замена A84T. Для NS<sub>pdm09</sub> характерны замены A86T и K78R.

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	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	N	.	
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	S	.	.	.	.	R	I	I	P	V	L	V	E	.	V	.	N	.	.	.	.	Y	.	.	.	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	.	.

Рисунок 3.3 – Аминокислотные замены в белке NS1 штаммов ВГА человека и свиньи, относящихся к различным филогенетическим линиям [2].

Представленные штаммы принадлежат следующим клайдам по гену NS:

A/Brevig\_Mission/1/1918 (H1N1) – NS<sub>1918</sub>; A/Memphis/10/1983 (H1N1),  
 A/Malaysia/11641/1997 (H1N1) – NS<sub>H1N1</sub>; A/Taiwan/1/64 (H2N2) – NS<sub>H2N2</sub>;  
 A/Hong\_Kong/1\_1/1968 (H3N2), A/Oregon/02/2016 (H3N2) – NS<sub>H3N2</sub>;  
 A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical) – NS<sub>clasw</sub>; A/swine/Iowa/8548\_1/98 (Triple) –  
 NS<sub>tri</sub>; A/California/14/2009 (H1N1pdm09) – NS<sub>pdm09</sub>; A/swine/England/195852/1992  
 (Eurasian) – NS<sub>eursw</sub>; A/Vietnam/CL01/2004 – NS<sub>av</sub>

**Эффекторный домен.** За линкерной областью следует протяженный ED, который отвечает в NS1 за взаимодействие с ядерными белками клетки-хозяина и ядерно-цитоплазматический транспорт зрелых мРНК [136]. С 81 по 113 а.о. NS1 локализован сайт взаимодействия с фактором трансляции eIF4G1, связывание с которым приводит к преимущественной трансляции с вирусных мРНК [391]. На сайт взаимодействия с eIF4G1 приходятся замены в 81, 84 и 86 положениях линкерной области, и 90, 91, 95, 98, 108, 111 и 112 положениях в ED. Мотив, отвечающий за связывание с фактором eIF4G1, перекрывается с рядом сайтов, в том числе P85β-PI3K-связывающим сайтом, отвечающим за активацию PI3K-сигнального пути, который обеспечивает эффективную репликацию, вероятно, по механизму задержки апоптоза инфицированных клеток или увеличения активности натриевых каналов [81, 101, 133, 134, 299]. В области сайтов взаимодействия с eIF4G1 и P85β-PI3K в NS<sub>pdm09</sub> произошла замена A91S. В NS<sub>hum\_ori</sub> с 1940 года наблюдалась замена L95I, однако в NS<sub>H1N1</sub> с 2001 появилась замена I95V, в NS<sub>H3N2</sub> – I95T с 1975 года. В NS<sub>H2N2</sub> после 1961 года произошла замена M98L, которая далее сохранилась в последовательностях клэйда NS<sub>H3N2</sub>. Ключевую роль в патогенности вирусов играет участок с 90 по 94 а.о. домена связывания с eIF4G1. Показано, что делеция этих 5 а.о. приводит к увеличению вирулентности и патогенности вирусов H5N1 [391]. Для NS<sub>H3N2</sub> с 1971 года в этом участке присутствует замена L90I, такая же мутация появилась в NS<sub>pdm09</sub> с 2012 года. Мутация D92E, определяющая устойчивость к цитокинам и снижающая эффективность фосфорилирования NS1 [291], была обнаружена только для последовательностей NS<sub>av</sub>.

За взаимодействие с белком TRIM25, обеспечивающим ингибирование RIG-I, отвечают 96 и 97 а.о. в NS1 [99]. Они же существенны для активации PI3K, вероятно осуществляемой за счет прямого контакта с петлей активации p110 [134]. 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 [99]. Замена D101N присутствует в NS<sub>H3N2</sub> с 1980 года. Замены F103L и M106I, которые также могут приводить к увеличению вирулентности [185, 307], были обнаружены только для NS<sub>av</sub>.

Далее по последовательности NS1 расположен мотив связывания фактора CPSF30, которое приводит к ингибированию посттранскрипционного 3'-концевого процессинга клеточных пре-мРНК [66, 137, 179, 239, 343]. Множество замен приходится на область 108-119 а.о., часть из них затрагивает сайт связывания с CPSF30. В NS<sub>sw\_ori</sub> с 1971 года одновременно появились две замены K108R и I117V. Вторая из них произошла и в последовательностях клэйда NS<sub>H1N1</sub> в 1980 году. В NS<sub>H2N2</sub> с 1960 года закрепились замены M119I, которая передалась NS<sub>H3N2</sub>, но с 1977 года в них произошла обратная замена I119M.

Область 123-127 а.о. отвечает за взаимодействие с PKR, приводящее к ингибированию фосфорилирования eIF2 $\alpha$  [224]. В NS<sub>H3N2</sub> (после 1977 года) и NS<sub>sw\_ori</sub> в этой области присутствует замена D125E, в NS<sub>pdm09</sub> с 2013 года произошла обратная замена E125D. По данным [232] замена G125D приводит к высокой патогенности у мышей и усиливает сродство к  $\alpha$ 2,3-SA и  $\alpha$ 2,6-SA рецепторам. В последовательностях NS1 всех изучаемых вирусов, кроме вирусов птичьего происхождения, присутствует замена S114P. В NS<sub>H2N2</sub> после 1960 года появилась замена A112E, которая сохранилась в клэйде NS<sub>H3N2</sub>. Эти замены не соответствуют никаким функциональным сайтам и находятся на стыке двух  $\beta$ -нитей (107-112) и (115-120). Сопоставление 3D структуры соответствующих участков NS1 вирусов H1N1 и H5N1 показало отсутствие каких-либо изменений пространственной структуры прилегающих  $\beta$ -нитей. В NS<sub>H2N2</sub> появилась замена I129M, сохранившаяся и в NS<sub>H3N2</sub>. Кроме того, в этом же положении появилась замена I129V в NS<sub>pdm09</sub>.

Далее по последовательности NS1 следует NES, расположенный между 137 и 147 а.о. [196]. 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<sub>H3N2</sub> в 1995 году появилась замена L144I, в остальных NS<sub>hum\_ori</sub> других значимых замен в 144-м и 146-м положениях нет. В NS<sub>sw\_ori</sub> с 1977-1979 годов присутствует замена D139N, характерная и для NS<sub>av</sub>, однако она не затрагивает ключевые аминокислоты NES. Кроме того, в области NES есть замены I145T, появившиеся с 1989 года в NS<sub>H1N1</sub>, и I145V – с 1979 года в NS<sub>H3N2</sub>. А.о. в 145-м положении соответствуют одному из а.о., образующих сайт связывания P85β, который перекрывается с NES. Далее по последовательности NS1 нет значимых замен в сайте связывания P85β. Область маскирования NEP перекрывается с аминокислотами в 151-м, 153-м, 155-157-м положениях, входящими в состав сайта связывания CPSF30, однако в этой области замен также нет.

В NS<sub>H1N1</sub> присутствует замена D171N, а в NS<sub>H2N2</sub> с 1960 года и в NS<sub>H3N2</sub> – N171I. Это сайт является варибельным, так как в нем есть замены и в остальных клайдах. Для всех NS<sub>hum\_ori</sub> после 1935 года имеется замена V178I. Такая же замена V178I обнаружена у всех последовательностей NS<sub>av</sub> и NS<sub>eursw</sub>, но не NS<sub>sw\_ori</sub>. Эти замены приходятся на область α-спирали (170-188). В клайде NS<sub>hum\_ori</sub> присутствует замена E196K с 1940 года, однако, в NS<sub>H1N1</sub> с 1987 года произошла обратная замена K196E. В NS<sub>sw\_ori</sub> и NS<sub>H3N2</sub> после 1985 года 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 по 230 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 [132]. 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 IFN 1 типа, обеспечивая разницу в вирулентности между

низко- и высокопатогенными вирусами H5N1 [155]. В NS<sub>pdm09</sub> присутствует замена S205N, однако в NS<sub>pdm09</sub> в 2012 году произошла обратная замена. Кроме того, у NS<sub>pdm09</sub> выявлены замены S206C и N207D. Далее следует сайт связывания Crk/CrkL-SH3 (212, 214, 215, 217 а.о.), характерный для ВГА птиц и вируса 1918 года [143]. В 215-м положении у всех NS<sub>hum\_ori</sub> присутствует замена P215T. Треонин в 215-м положении фосфорилируется пролин-специфическими киназами, такими как CDK/ERK, узнающими определенный мотив 213-217 и 219 а.о. [135]. Этот сайт фосфорилирования отсутствует в NS<sub>pdm09</sub>.

Участок 219-232 а.о. соответствует области NLS2 [126, 221]. В нем ключевую роль играют а.о. в 219-м, 220-м, 224-м, 229-м, 231-м 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 вовлечен в ингибирование посттранскрипционного процессинга 3'-концов клеточных пре-мРНК [56, 195]. Участок 227-230 а.о. является PDZ лигандом, который связывает белки, содержащие PDZ домен [159, 199, 244, 305, 392]. У всех сезонных штаммов в области PDZ лиганда присутствует замена K227R, которая приводит к появлению мотива RSEV. Кроме того, для клонированных NS<sub>H2N2</sub> и NS<sub>H3N2</sub> в 229-м положении произошла замена E229K (мотив RSKV). Интересно, что единственным исключением является относящийся штамм A/Hong\_Kong/1\_1/1968 (H3N2), содержащий мотив RSEV. Таким образом, для клонированных NS<sub>H2N2</sub> и NS<sub>H3N2</sub> характерен мотив RSKV. В NS<sub>H3N2</sub> с 2011-2012 годов наблюдалась спорадическая замена K229E, которая окончательно зафиксировалась с 2013 года. В клонированном NS<sub>H1N1</sub> присутствует мотив RSEV. В частности, у вируса подтипа H1N1 USSR77 1977 года присутствует мотив RSEV, также как и у последнего вируса H1N1 1957 года. При этом варианты ESEV/EPEV/KSEV – являются мотивами для связывания PDZ домена, а RSKV/RSEV – нет. В NS<sub>av</sub> имеются мотивы EPEV и ESEV. В NS<sub>sw\_ori</sub> после 1966

года наблюдается делеция области 220-230 а.о. Такая же делеция спорадически встречается в  $NS_{tri}$  и  $NS_{clasw}$ , но не  $NS_{pdm09}$ .

В сезонных штаммах с 1940 года стал появляться мотив RRNKMVD, расположенный в области 231-237 а.о. Его функция точно неизвестна, но предположительно может вносить вклад в NoLS/NLS2. [221]. В этом мотиве периодически возникала замена V236A, которая окончательно зафиксировалась в клейде  $NS_{H2N2}$  с 1957 года. Далее в 1960 году появилась замена N233D, которая сохранилась в клейдах  $NS_{H2N2}$  и  $NS_{H3N2}$ . Далее мотив RR(N/D)KMAD присутствовал в сезонных вирусах до 1990 года, после чего был deletирован.

Проведенный анализ аминокислотных замен в структурных и функциональных доменах белка NS1 ВГА человека [2] показывает, что большинство из них оставались консервативными в процессе эволюции в течение последнего столетия. Наблюдаемая консервативность NS1 наряду с данными о том, что делеция OPC NS1 (а также некоторые замены в гене *NS*) существенно снижает уровень репликации и степень патогенности ВГА, делают этот белок перспективной мишенью для терапии гриппа. Однако, прежде чем приступить к проверке этого предположения, необходимо было получить хорошо охарактеризованную клеточную модель ВГА инфекции, которая позволяла бы оценить вклад NS1 в развитие инфекции, осуществить поиск клеточных факторов, связанных с NS1, а также провести скрининг отобранных соединений *in vitro*.

### **3.1.2. Создание системы поиска связанных с NS1 клеточных мишеней для терапии гриппа и оценки эффективности препаратов против вируса гриппа типа А**

#### **3.1.2.1. Рекомбинантные вирусы гриппа типа А с полноразмерным и укороченным геном *NS* как модель для изучения роли NS1**

Для изучения роли отдельных генов в молекулярной биологии часто используют клеточные линии и животных, нокаутных по целевому гену. Развитие

методов обратной генетики дало возможность получать штаммы ВГА с желаемым составом генома, в том числе содержащие делеции генов или их фрагментов [148, 257]. В работе использовали рекомбинантные вирусы, сконструированные на основе штамма IVR-116, адаптированного к росту на культуре клеток Vero, который представлял собой 6:2 реассортант, содержащий гены *PB2*, *PB1*, *PA*, *M*, *NP* и *NS1* вируса A/PR/8/34 (H1N1), и *HA* и *NA* вируса A/курица/Курган/5/05 (H5N1). В сайте расщепления *HA* мотив повторяющихся основных аминокислот RRRK высоко патогенных штаммов H5N1 был заменен на последовательность, характерную для низко патогенных штаммов [149]. Один из вирусов (wtNS1) содержал полноразмерный ген *NS*, в другом вирусе ( $\Delta$ NS1) исходная последовательность гена *NS*, состоящая из 890 нуклеотидов, была укорочена до 418 нуклеотидов. Такая делеция приводила к удалению основной части OPC NS1, но не отражалась на способности вирусов  $\Delta$ NS1 образовывать мРНК, кодирующую NEP [77]. Рекомбинантные вирусные штаммы были получены к.б.н. Е.А. Романовской-Романько.

Вирусы wtNS1 и  $\Delta$ NS1 являлись генетически стабильными и были способны расти до высоких титров на культуре клеток Vero (таблица 3.1). Как и предполагалось, отсутствие экспрессии NS1, являющегося антагонистом системы IFN, в клетках, инфицированных штаммом  $\Delta$ NS1, приводило к снижению его ростовых показателей в IFN-компетентной клеточной системе MDCK.

Для моделирования гриппозной инфекции выбрали клеточную линию карциномы легкого человека A549, часто используемую для изучения взаимодействия между ВГА и клеткой-хозяином. Это было обусловлено тем, что основными мишенями ВГА являются клетки эпителия верхних и нижних дыхательных путей, а клетки A549 представляют собой пневмоциты II типа и содержат узнаваемые вирусом  $\alpha$ 2,3-SA рецепторы [146].

Для моделирования экспериментальной гриппозной инфекции клетки A549 заразили вирусами wtNS1 и  $\Delta$ NS1 в дозе 1 MOI. Клетки и надосадочную жидкость

отбирали через 4, 8, и 24 часа после заражения. Вирусную репликацию подтверждали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (рисунок 3.4). Ростовые характеристики вирусов в клетках A549 представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Ростовые показатели рекомбинантных штаммов ВГА wtNS1 и ΔNS1 на культурах клеток Vero, MDCK и A549

Штамм	Культура клеток	Титр вируса, lgТИД <sub>50</sub> /мл
ΔNS1	Vero	7,72±0,25
	MDCK	4,50±0,17
	A549	2,5±0,25
wtNS1	Vero	7,89±0,19
	MDCK	7,39±0,10
	A549	3,5±0,25

Для оценки динамики синтеза белка NS1 в инфицированных ВГА клетках A549 использовали полученные в Отделе биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России специфические МКА 5D2 к 15 кДа рекомбинантному белку NS1<sub>1-124</sub>, представляющему собой первые 124 а.о. N-концевого фрагмента NS1. Белок клонировали в Лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России и далее выделяли из биомассы клеток *E.coli* методом аффинной хроматографии с последующей очисткой от высокомолекулярных примесей методом гель-фильтрационной хроматографии. Последовательность белка NS1<sub>1-124</sub> подтвердили методом MALDI масс-спектрометрии. Нижний порог выявления антителами белка NS1<sub>1-124</sub> при использовании метода вестерн-блоттинга составил 38 нг.

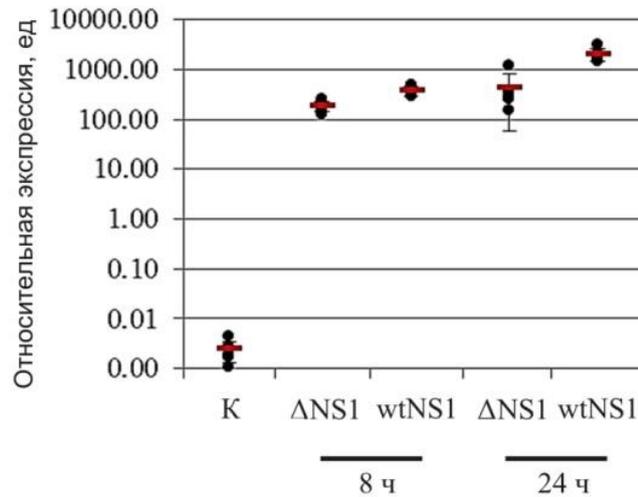


Рисунок 3.4 – Уровень геномной РНК (М-сегмент) вирусов wtNS1 и  $\Delta$ NS1 в клетках A549 через 8 и 24 часа после заражения, определенный методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

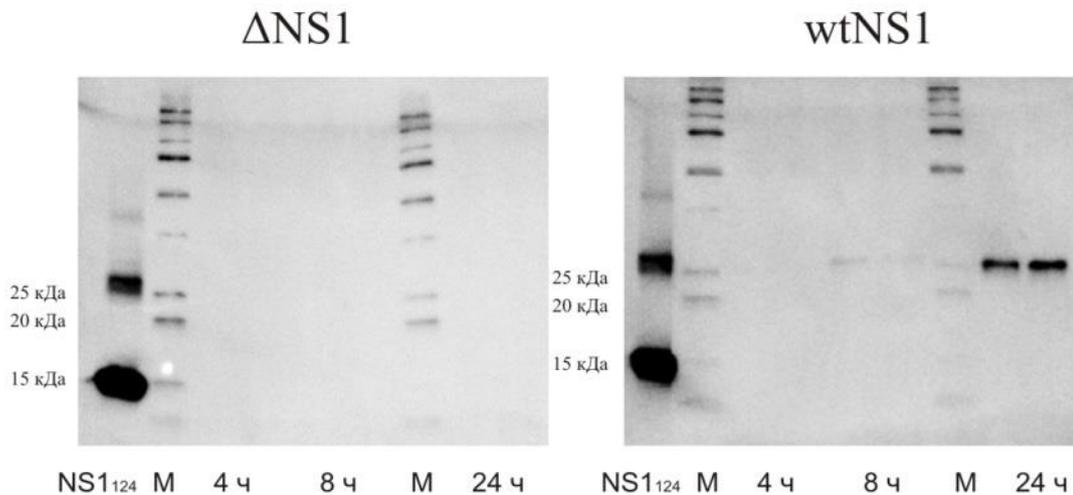


Рисунок 3.5 – Результаты вестерн-блоттинга с антителами к NS1 лизатов клеток A549, заражённых вирусами  $\Delta$ NS1 и wtNS1 в дозе 1 MOI, через 4, 8 и 24 часа после заражения

Суспензии клеток нанесены в 2 биологических повторях. NS1<sub>124</sub> – рекомбинантный белок NS1<sub>1-124</sub> (1 мкг/мл); M – маркер молекулярных масс «Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards» (Bio-Rad, США).

Далее определили динамику накопления NS1 через 4, 8 и 24 часа после заражения (рисунок 3.5). В клетках, заражённых вирусом  $\Delta$ NS1, белок NS1, ожидаемо, выявлен не был. В случае вируса wtNS1 наблюдали накопление белка NS1, начиная с 8 часов после заражения.

### **3.1.2.2. Изучение роли белка NS1 вируса гриппа типа А в индукции цитокинового ответа в клетках A549**

Одна из основных функций NS1 заключается в противостоянии IFN-опосредованному клеточному противовирусному ответу. Отсутствие экспрессии NS1 приводит к существенной потере вирусом такой способности [88] и, как следствие, повышению уровня экспрессии IFN и других цитокинов, блокирующих размножение ВГА. В свою очередь дисбаланс цитокинового ответа может приводить к развитию «цитокинового шторма», вызывающего легочные осложнения [201].

В связи с этим на следующем этапе работы использовали метод ОТ-ПЦР (см. раздел 3.4.2) для характеристики цитокинового профиля мРНК клеток A549, инфицированных вирусами wtNS1 и  $\Delta$ NS1, через 8 и 24 часа после заражения. Провоспалительный цитокиновый ответ (на уровне транскрипции) клеток A549, зараженных вирусом  $\Delta$ NS1, был более выраженным в сравнении с клетками, инфицированными вирусом wtNS1 (рисунок 3.6). В частности, укорочение OРС NS1 привело к возрастанию уровня мРНК TNF $\alpha$  и IL6 на всех рассматриваемых сроках заражения. Оба штамма ВГА, независимо от присутствия OРС NS1, стимулировали в клетках A549 повышение уровня мРНК IL1 $\beta$  и IL12 $\beta$ , нарастающее со временем. Штамм wtNS1 на всех рассматриваемых сроках после заражения индуцировал в клетках экспрессию IL4, в то время как в клетках A549, инфицированных  $\Delta$ NS1 вирусом, экспрессия IL4 была полностью подавлена, так же как и в контрольных клетках. Следует отметить, что IL4 является маркером поляризации иммунного ответа в сторону Th2.

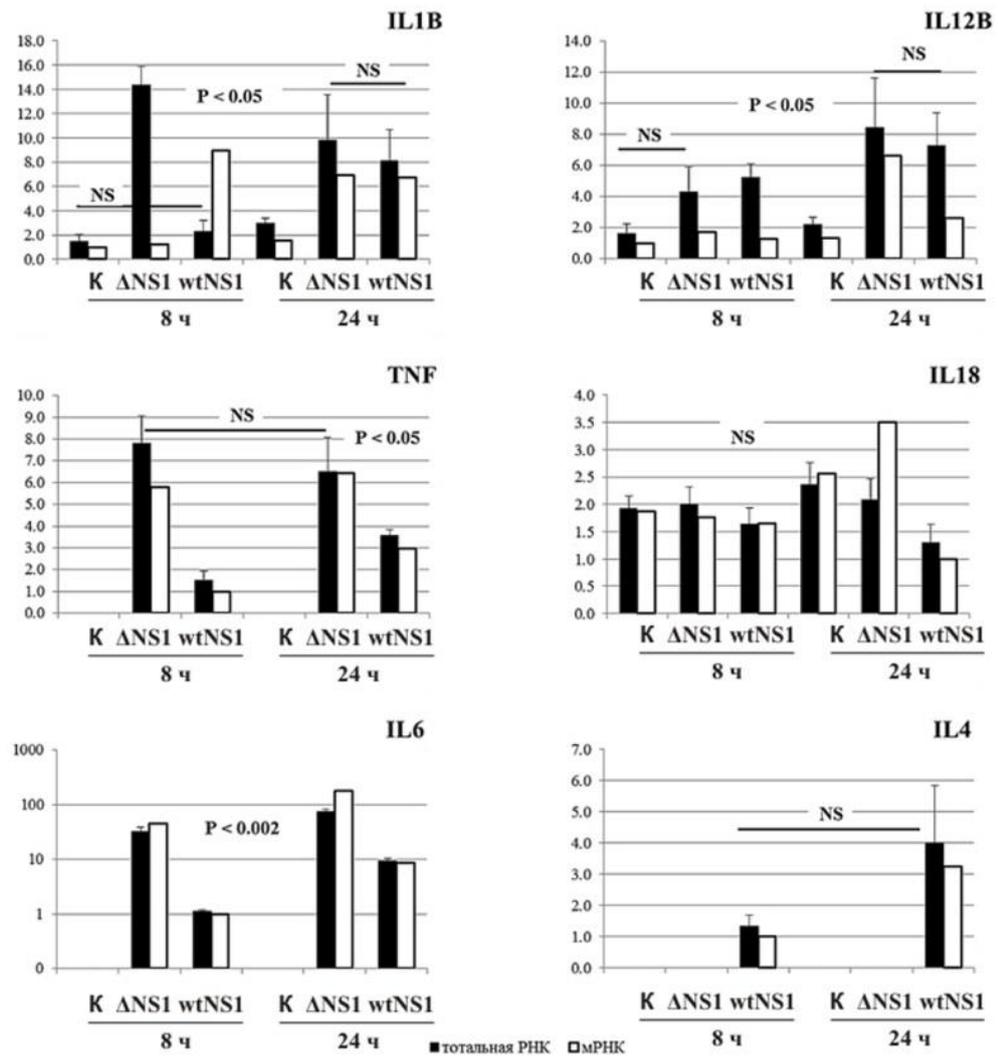


Рисунок 3.6 – Уровни экспрессии цитокинов (IL1 $\beta$ , IL12, TNF $\alpha$ , IL18, IL6, IL4) в препаратах тотальной РНК и мРНК контрольных клеток и клеток A549, зараженных вирусами  $\Delta$ NS1 и wtNS1 ( $\Delta\Delta$ Сt-анализ результатов ОТ-ПЦР)

На рисунке черным цветом показаны средние значения относительных уровней экспрессии  $\pm$  стандартное отклонение для тотальных РНК, рассчитанные для биологических повторов в каждой группе. Белым цветом показаны значения относительных уровней экспрессии, полученные для мРНК. Значения уровней экспрессии для IL-6 представлены в логарифмической шкале.  $P < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни). NS1 – статистически незначимые отклонения между указанными группами. По оси ординат показаны относительные уровни экспрессии, ед.

Изучение уровней мРНК IL18 не выявило никакой закономерности между экспрессией этого цитокина и вирусной инфекцией на рассматриваемых сроках после заражения, за исключением незначительного снижения уровня мРНК IL18 при заражении wtNS1 вирусом на поздних сроках (подтверждается данными ИФА, данные не приводятся). Следует отметить, что IL1 и IL18 продуцируются в активную форму белка в основном благодаря инфламмасоме и каспазе 1, поэтому уровень экспрессии мРНК этих цитокинов не позволяет в полной мере судить о содержании активного белка [309].

При инфицировании клеток вирусом ΔNS1 наблюдали экспрессию мРНК IL10, однако эти данные варьировали от эксперимента к эксперименту. Методом ИФА во внеклеточной среде IL10 не обнаружили (данные не приводятся). Следует отметить, что продукция противовоспалительных цитокинов, особенно IL10, является одним из механизмов регуляции воспаления. Системная продукция IL10, следующая за началом «цитокинового шторма», является или маркером противовоспалительного ответа, или фактором ингибирования активности NK-клеток. Аналогично спорадически наблюдали экспрессию мРНК IFN $\gamma$  в случае ΔNS1 вируса в отсутствие IL10. При этом уровень экспрессии этой мРНК был низкий – близкий к фоновому.

Полученные результаты исследования цитокиногенного действия ВГА в клетках A549 позволяют заключить, что в случае инфекции происходит NS1-опосредованное подавление активации провоспалительного ответа (посредством супрессии транскрипции провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL6) и запуск противовоспалительного IL4, препятствующего развитию Th1-опосредованного цитотоксического клеточного ответа.

В целом же, инфицирование вирусами гриппа вызвало повышение экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов IL6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL12 $\beta$ . При этом вирус wtNS1 индуцировал более высокий уровень экспрессии мРНК IL6 и

TNF $\alpha$ , чем вирус  $\Delta$ NS1 (таблица 3.2). В то же время мы наблюдали появление мРНК IL4 только при заражении клеток wtNS1 вирусом.

Таблица 3.2 – Динамика уровня мРНК цитокинов в клетках A549 при инфицировании wtNS1 и  $\Delta$ NS1 вирусами

	TNF $\alpha$	IL6	IL4	IL18	IL1 $\beta$	IL12 $\beta$	IL10	IFN $\gamma$
A549	—	+	—	+	+	+	—	—
A549 + wtNS1	+ $\uparrow$	+ $\uparrow$	+	+ $\downarrow$	+ $\uparrow$	+ $\uparrow$	—	—
A549 + $\Delta$ NS1	+++ $\uparrow$	+++ $\uparrow$	—	+	+ $\uparrow$	+ $\uparrow$	—	—

Полученные результаты согласуются с литературными данными [9, 10, 12, 13], что дополнительно подтверждает релевантность выбранной нами модели ВГА инфекции.

### 3.1.2.3. Полногеномный анализ экспрессии генов клеток A549 при инфицировании их wtNS1 и $\Delta$ NS1 вирусами гриппа

Для детальной характеристики клеточных процессов, возникающих в клетках A549 при заражении их вирусами wtNS1 и  $\Delta$ NS1, был применен высокопроизводительный метод анализа экспрессии генов с использованием микрочипов SurePrint G3 Human Gene Expression («Agilent», США). Для моделирования экспериментальной гриппозной инфекции клетки A549 инфицировали вышеописанными вирусами в дозе 1 MOI, РНК выделяли через 8 и 24 часа после заражения. Репликацию генома вируса в клетках A549 подтвердили методом ОТ-ПЦР, отсутствие деградации и целостности полученных образцов выделенной из клеток тотальной РНК было подтверждено ее анализом на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (рисунок 3.7).

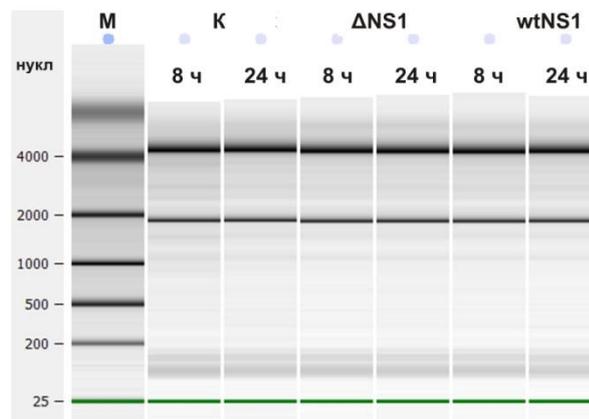


Рисунок 3.7 – Анализ препаратов тотальной РНК, выделенной из клеток A549, инфицированных вирусами wtNS1 и  $\Delta$ NS1. Представлены результаты капиллярного электрофоретического разделения РНК, выполненного с помощью системы Agilent 2100 Bioanalyzer

Методика проведения анализа и статистической обработки результатов описана в разделе «Материалы и методы». В результате статистической обработки полученных данных для дальнейшего анализа оставили только гены, экспрессия которых изменилась более чем в 2 раза ( $\log_2FC$  больше +1 или меньше -1). Для клеток, зараженных вирусом  $\Delta$ NS1, в эту категорию попал 321 ген, экспрессия которых возросла по сравнению с контролем, и 17 генов, экспрессия которых уменьшилась. Для вируса wtNS1 эти значения составили 255 и 32 гена, соответственно. При этом среди генов, экспрессия которых увеличилась, 66 относились только к вирусу wtNS1, 129 –  $\Delta$ NS1, а 193 увеличивали свою экспрессию в обоих случаях (рисунок 3.8). Полученные данные впоследствии были подтверждены с использованием метода NGS. Список генов, экспрессия которых значительно менялась при заражении wtNS1 и  $\Delta$ NS1 вирусами, приведен в приложении 1.

*Гены, транскрипция которых изменяется в клетках A549 при инфицировании вирусами wtNS1 и  $\Delta$ NS1.* В ответ на ВГА инфекцию, независимо от присутствия ОРС NS1, возросла экспрессия 193 генов. Классификация генов согласно анализу геной онтологии (GO), выполненному в программе PANTHER

Reactome (ver. 58, Rel. 2016.12.07), представлена в таблице 3.3. Среди общих активируемых обоими вирусами генов наблюдали повышение уровня экспрессии цитоплазматических паттерн-распознающих рецепторов RIG-I/DDX58 и MDA5/IFIH1, выполняющих роль цитоплазматического сенсора вирусных нуклеиновых кислот и активирующих индукцию IFN I типа и провоспалительных цитокинов, а также связанных с ними белков семейства DExD/H-бокс геликаз DDX60 и DDX60L. Активация RIG-I происходит посредством убиквитинирования домена CARD белком TRIM25 и приводит к активации транскрипционных факторов IRF3 и NFκB, необходимых для экспрессии IFNβ. Белок NS1 ингибирует взаимодействие TRIM25 с CARD доменом RIG-I. Интересно, что уровень мРНК TRIM25 возрастал в случае ΔNS1 вируса. В случае wtNS1 вируса наблюдали активацию экспрессии генов *TRIM14*, *TRIM21* и *TRIM26*.

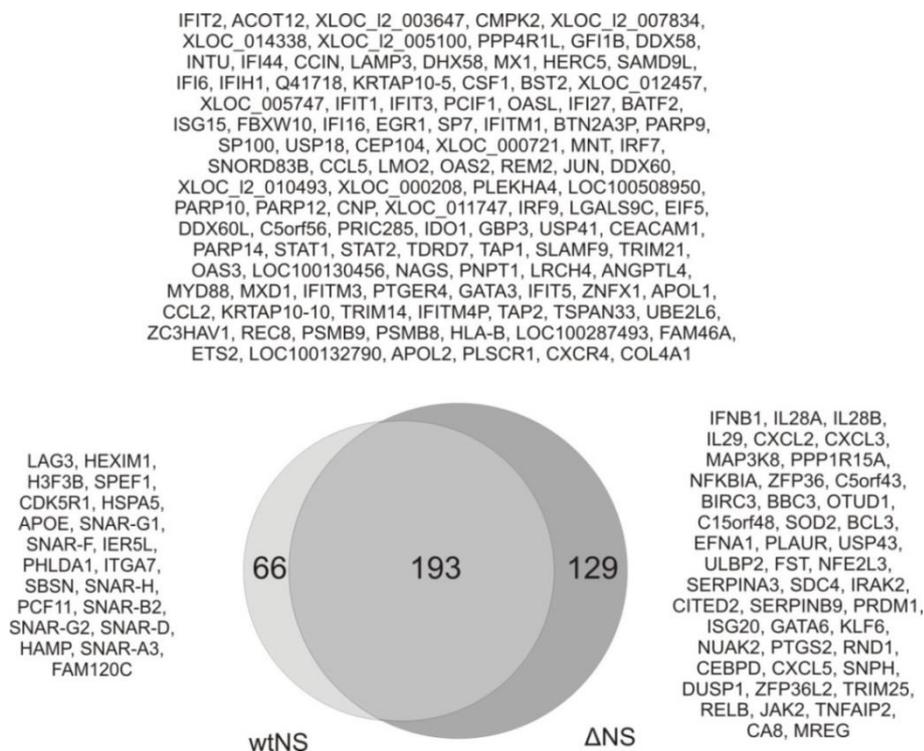


Рисунок 3.8 – Дифференциальная экспрессия генов клеток A549, инфицированных wtNS1 и ΔNS1 вирусами

Показаны гены, число транскриптов для которых увеличилось (значения  $\log_2FC$  больше +2) по сравнению с контрольными клетками.

Кроме того, среди общих активируемых генов были гены, кодирующие индуцируемые интерферонами содержащие тетратрикопептидные повторы белки IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5; индуцируемые интерфероном белки IFI6, IFI44, IFI6, IFI27, IFI35; блокирующие входение вирусов в цитоплазму на уровне слияния в эндосоме индуцируемые интерфероном трансмембранные белки IFITM1, IFITM2, IFITM3, IFITM4P, а также иммунорегуляторные и воспалительные хемокины и их рецепторы CCL2, CCL5, CXCL1, IL8 (CXCL8), CXCR4, колониестимулирующий фактор 1 (CSF1).

Таблица 3.3 – Анализ онтологии генов клеток A549, экспрессия которых изменялась при заражении вирусами wtNS1 и ΔNS1

Пути в «Reactome»	Число генов (всего в пути)	ожида- ние	Кратность обогащения	р-значе- ние
IFN $\gamma$ сигналинг	17 (91)	0,63	27,02	4,22E-16
IFN сигналинг	40 (192)	1,33	30,13	1,85E-43
Цитокиновый сигналинг	43 (610)	4,22	10,20	1,13E-27
Иммунная система	53 (1604)	11,09	4,78	1,40E-19
Регуляция IFN $\alpha$ сигналинга	4 (23)	0,16	25,15	4,01E-02
IFN $\alpha/\beta$ сигналинг	28 (66)	,46	61,36	7,22E-38
TRAF6 опосредованная активация IRF7	5 (32)	0,22	22,60	6,12E-03
RIG-I/MDA5- опосредованная индукция	9 (80)	0,55	16,27	1,15E-05

IFN $\alpha/\beta$ путей				
Негативная регуляция RIG-I/MDA5 сигналинга	5 (34)	0,24	21,27	8,20E-03
ISG15-опосредуемый противовирусный механизм	10 (70)	0,48	20,66	1,67E-07
Противовирусный механизм через ISG	10 (70)	0,48	20,66	1,67E-07
ЭР-фагосома путь	7 (84)	0,58	12,05	4,18E-03
Процессинг и кросс-презентация антигена	7 (100)	0,69	10,12	1,29E-02
МНС-I-опосредованный процессинг и презентация антигена	14 (369)	2,55	5,49	6,09E-04
Неклассифицируемые	61 (11676)	80,73	0,76	0,00E00

Возросла экспрессия генов пути, опосредованного убиквитин-подобным модифицирующим белком ISG15, играющим ключевую роль во врожденном иммунном ответе на вирусную инфекцию в процессе ISGилирования. Среди них сам ISG15, а также основная для конъюгации ISG15 E3 лигаза HERC5 и убиквитин специфическая пептидаза 18 (USP18) (и ее паролог USP41), способная специфически расщеплять фьюжены ISG15. Кроме того, в ответ на ВГА инфекцию активировались индуцируемые интерфероном динамин-подобная ГТФаза MX1, обладающая противовирусной активностью в отношении широкого круга РНК-содержащих и некоторых ДНК-содержащих вирусов, и

противовирусные 2'-5'-олигоаденилатсинтазы OAS1, OAS2, OAS3, OASL; адапторный белок MYD88, участвующий в TLR и IL1R сигналинге в механизме врожденного иммунного ответа; ацил-КоА тиоэстераза 12 (ACOT12), цитидин/уридин монофосфат киназа 2 (CMPK2), псевдоген регуляторной субъединицы 1 протеин фосфатазы 4 (PPP4R1L) и регуляторная субъединица 121 протеинфосфатазы 1 (PPP1R121, или PCIF1), взаимодействующая с фосфорилированным CTD большой субъединицы PolII.

В ответ на ВГА инфекцию возрастал уровень мРНК различных транскрипционных факторов, среди которых можно выделить следующие: цАМФ-зависимый транскрипционный фактор ATF; транскрипционный репрессор GFI1B, участвующий в регуляции цитокинового сигналинга, выключая промотор генов SOCS1 и SOCS3; транскрипционный фактор EGR1, опосредующий ответ на ишемию и гипоксию, регулируя экспрессию таких белков как IL1B и CXCL2, а также вовлеченный в регуляцию EGR1 белок SAMD9L; интерферон регулирующие факторы 1, 7, 9 (IRF1, IRF7, IRF9); транскрипционные факторы SP7 и SP100; активаторы транскрипции STAT1 и STAT2; субъединица JUN транскрипционного фактора AP-1; геликаза PRIC285, выступающая в роли транскрипционного коактиватора ядерных рецепторов PPARA, PPARG, THRA, THRB и RXRA; транскрипционный фактор BATF2 семейства AP-1, контролирующей дифференцировку клеток иммунной системы.

Среди остальных активируемых генов следует выделить ген *INTU*, кодирующий PDZ домен-содержащий белок 6; ген *LAMP3*, кодирующий ассоциированный с лизосомой мембранный белок 3, играющий роль в функционировании дендритных клеток и адаптивном иммунитете; гены *CFB* фактора комплемента В, проявляющего противовирусную активность в отношении вирусов гриппа, и *C1R* компонента 1R комплемента; ген *GBP3* гуанилат-связывающего белка 3; ген *IDO1* индоламин 2,3-диоксигеназы, регулирующей поведение Т-клеток и участвующей в антимикробной защите,

иммунорегуляции и антиоксидантной защите; ген *PTGER4* рецептора 4 простагландина E; гены *SOCS1* и *SOCS3* супрессоров цитокинового сигналинга 1 и 3, формирующих систему отрицательной обратной связи, регулирующей цитокиновый сигналинг; гены *PARP9*, *PARP10*, *PARP12*, *PARP14* семейства поли(АДФ-рибоза)полимераз (в частности, белок PARP9 вовлечен в индукцию экспрессии генов, отвечающих на IFN $\gamma$ ).

При этом в случае инфицирования  $\Delta$ NS1 вирусом по сравнению с wtNS1 вирусом значительно возросла экспрессия целого ряда генов. Наибольшая разница в экспрессии ( $\log_2$ FC больше 3) обнаружена для генов *IL8*, *CXCL1*, *CCL2*, *CXCR4*, *PTGER4*, *ATF3*, *IDO1* и *EGR1*. Для большинства генов экспрессия увеличивалась в случае  $\Delta$ NS1 инфекции, однако для генов *ACOT12*, *XLOC\_014338*, *PPP4R1L*, *FBXW10* (субстрат-распознающий компонент E3-убиквитинлигазного комплекса), она, наоборот, снизилась.

Кроме того, в случае заражения обоими вирусами снизился уровень экспрессии нескольких генов. Среди них *C22orf29*, кодирующий участвующий в ВНЗ домен-зависимой индукции апоптоза белок; *HILPDA*, кодирующий индуцируемый гипоксией белок, который стимулирует экспрессию цитокинов IL6, MIF и VEGFA; регуляторная длинная некодирующая РНК (lncРНК) NEAT1; гены *ZNF226* и *ZNF469* одноименных цинк-фингер мотив-содержащих регуляторов транскрипции; *SLITRK6*; *LFNG* O-фукозилпептид 3-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы. LFNG, в частности, участвует в NOTCH-сигнальном пути [27], который задействован в активации функции HIF1 $\alpha$ . NOTCH1 усиливает функцию HIF1 $\alpha$ , секвестрируя HIF1 $\alpha$ N от HIF1 $\alpha$ .

*Гены, транскрипция которых изменяется в клетках A549 при инфицировании вирусом  $\Delta$ NS1.* В случае заражения  $\Delta$ NS1 вирусом число генов, экспрессия которых значительно возросла, заметно больше. GO анализ показал, что большая часть генов, экспрессия которых увеличилась в ответ на заражение

вирусом ΔNS1, ожидаемо принадлежала путям, задействованным в активации врожденного противовирусного ответа.

Среди них следует отметить гены интерферона β1 (*IFNB1*) и интерферона α (*EFNA1*); интерферонов λ1, λ2 и λ3 (*IL29*, *IL28A* и *IL28B*, соответственно), играющие ключевую роль в противовирусном защитном механизме, особенно в эпителиальных тканях; гены *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5* иммунорегуляторных и воспалительных хемокинов и их рецепторов; ген *MAP3K8* митоген-активируемой киназы, активирующей, в частности, NFκB, TNFα, IL2, IL8; ген *NFKBIA* ингибитора NFκB альфа; ген *PPP1R15A* регуляторной субъединицы 15 протеинфосфатазы 1; ген *ZFP36* одноименного белка, участвующего в противовоспалительном ответе, супрессируя в процессе ARE-опосредованной задержки мРНК продукцию TNFα и HIF1α; ген *BIRC3* E3 убиквитин-белок лигазы, семейства IAP ингибиторов апоптоза, регулирующей NFκB-сигналинг; гены *SERPINA3* и *SERPINB9* семейства ингибиторов сериновых протеаз. Для ΔNS1 вируса снизилась экспрессия участвующего в мембранном транспорте белка YIF1B, лизосомальной цистеиновой карбоксидипептидазы катепсин Z (CTSZ), регулирующей везикулярный транспорт низкомолекулярной ГТФазы RAB37, ABCC5 (мультиспецифическая помпа органических анионов, способная транспортировать аналоги нуклеотидов), DDIT4L (регулятор mTOR сигнального пути, играющей важную роль в ответ на клеточный стресс, в том числе гипоксию и повреждение ДНК), регулятора экспорта железа SLC40A1.

*Гены, транскрипция которых изменяется в клетках A549 при инфицировании вирусами wtNS1.* В случае wtNS1 вируса обнаружили увеличение уровня 63 транскриптов. Согласно данным GO анализа выделяются гены, участвующие в регуляции опосредованного фактором теплового шока 1 (HSF1) ответа на тепловой шок, а именно *HSPA5* (*GRP78*), *HSPA1B* и *HSPA1A* – гены членов 5, 1B и 1A семейства А белков теплового шока HSP70, *DNAJB1* – ген члена В1 семейства белков теплового шока HSP40, а также *BAG3*. BAG3

ингибирует шапероновую активность HSP70/HSC70, конкурируя с Hip за связывание с АТФазным доменом HSP70/HSC70.

Кроме того, 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 IL2 в Т-клетках. Недавно было показано, что NF90 является противовирусным фактором, регулирующим активацию PKR и образование стресс гранул в ВГА-инфицированных клетках [192]. Вместе с тем, точный механизм такого ингибирования еще не определен.

Таблица 3.4 – GO анализ генов, транскрипция которых возросла в клетках A549 при инфицировании вирусом wtNS1

Пути в «Reactome»	Число генов (всего в пути)	ожида- ние	Кратность обогащения	р-значе- ние
Аттенуация транскрипционного ответа на тепловой шок	4 (14)	0,04	>100	1,09E-04
HSF1-зависимая трансаktivация	4 (24)	0,06	64,73	9,20E-04
Клеточный ответ на тепловой стресс	6 (87)	0,22	26,78	1,97E-04
Регуляция HSF1- опосредованного ответа на тепловой шок	5 (67)	0,17	28,98	1,64E-03
Неклассифицируемые	24 (11676)	30,06	0,80	0,00E00

Все остальные гены в рамках GO анализа не кластеризовались. Наибольшее увеличение экспрессии обнаружили для гена *LAG3* лимфоцит активирующего белка 3; гена *HEXIM1* транскрипционного регулятора, являющегося общим ингибитором транскрипции РНК-полимеразой II и способного регулировать NFκB-зависимую транскрипционную активность; гистон-кодирующего гена *H3F3B*; гена *CDK5R1* регуляторной субъединицы 1 циклин-зависимой киназы 5; гена *APOE* аполипопротеина E; кодирующего регулятор апоптоза гена *PHLDA1*; гена *PCF11* субъединицы фактора расщепления и полиаденилирования; гена *IL11*, кодирующего одноименный цитокин, стимулирующий Т-клетки-зависимое развитие иммуноглобулин-продуцирующих В клеток. Кроме того, увеличилась экспрессия генов *ARHGAP5* Rho ГТФаза активирующего белка 5, являющегося негативным регулятором Rho ГТФаз, и *RND3* ГТФазы 3 семейства Rho, способной связываться с ГТФ, но не обладающей ГТФазной активностью, а также проявляющей устойчивость к Rho-специфичным ГТФаза-активирующим белкам. Возрастает и уровень экспрессии гена *HAMP*, кодирующего антимикробный пептид гепцидин. Пре-белок НАМР посттрансляционно расщепляется на зрелые активные пептиды 20, 22 и 25 а.о., обогащенные цистеинами, формирующими внутримолекулярные связи и стабилизирующие структуры β-слоев. Эти пептиды обладают антимикробной активностью в отношении бактерий и грибов. При инфекционных и воспалительных стимулах (в том числе ВГА) ключевую роль в регуляции гепцидина играет IL6. Также следует отметить активацию экспрессии генов *AGER*, *NAPA*, *RGS2*, *TNFRSF10D*, *CREBP* и *AZI2*. *AGER* – это рецептор конечных продуктов гликирования (AGE), относится к надсемейству иммуноглобулиновых поверхностных клеточных рецепторов, действует как медиатор острого и хронического воспаления сосудов. AGE/RAGE-сигналинг играет важную роль в регуляции продукции TNFα, окислительном стрессе и дисфункции эндотелия при диабете 2 типа. *NAPA* относится к семейству белков SNAP, играющих важную роль в докировании и слиянии везикул с мембранами,

как составная часть 20S NSF-SNAP-SNARE комплекса. NAPA играет роль в завершении слияния мембран, опосредуя взаимодействие N-этилмалеимид чувствительного фактора (NSF) с комплексом рецептора SNAP (SNARE) и стимулируя АТФазную активность NSF. NAPA требуется для везикулярного транспорта между ЭР и АГ. RGS2 – это регулятор белков семейства сигналинга G-белков, он ингибирует передачу сигнала в процессе увеличения ГТФазной активности субъединиц G-белка альфа, тем самым приводя их в неактивную ГДФ-связанную форму. TNFRSF10D – это член 10d надсемейства TNFR, рецептор цитотоксического лиганда TRAIL; содержит усеченный домен DD и поэтому не способен индуцировать апоптоз, но защищает от TRAIL-опосредованного апоптоза. CREBP – это CREB связывающий белок, специфически связывающийся с фосфорилированным CREB и усиливающий его транскрипционную активность в отношении генов ответа на цАМФ. AZI2 (или NAP1) вносит вклад в активацию NFκB-зависимой экспрессии, активируя ИКК-связанные киназы, такие как NAK (TBK1).

В случае wtNS1 вируса снизился уровень транскриптов, кодируемых генами MAVS (MAVS действует в ответ на активацию DDX58/RIG-I и IFIH1/MDA5, координируя пути, приводящие к активации NFκB, IRF3 и IRF7 и последующей индукции противовирусных цитокинов, таких как IFNβ и RANTES (CCL5)), ZADH2 (кодирует 15-оксо-простагландин 13-редуктазу, оверэкспрессия которой репрессирует транскрипционную активность PPARG), P2RY2 (пуринергический рецептор P2RY2 отвечает на внеклеточный пуриин или пиримидин, задействован в GPCR-сигналинге и метаболизме сурфактанта), AR рецептора андрогена, IGFBP1 (белок IGFBP1 участвует, в том числе, в HIF1α-пути), KIAA1609 (паролог транскрипционного активатора NCOA7, среди мишеней которого гены *ESR1*, *THRβ*, *PPARG* и *RARA*), *SMCR7* (фактор элонгации митохондрий), *PDCD7* (кодирует проапоптозный и участвующий в сплайсинге белок), *PHRF1* (регуляторная субъединица 125 протеинфосфатазы 1), *C3orf19* (CCDC174

взаимодействует с eIF4A и является компонентом комплекса выщепления экзона, вовлеченного в процессинг РНК, трансляцию и нонсенс-опосредованный распад мРНК), *GJC1* (белок щелевых контактов), *PTPN14* (протеинтирозинфосфатаза, которая регулирует, в том числе, экспрессию TGF $\beta$ ).

Таким образом, при инфицировании вирусом wtNS1, но не  $\Delta$ NS1, в клетках активируется транскрипция генов, участвующих в регуляции и активации белков теплового шока, играющих важную роль в регуляции фолдинга, конформации, сборки и сортировки белков.

Согласно данным экспрессии ОРС NS1 ВГА отвечает за возрастание в клетках A549 числа транскриптов, кодирующих белки теплового шока – молекулярные шапероны, которые поддерживают нативную конформацию белка и предотвращают белок-белковую агрегацию, или шаперонины, которые обеспечивают фолдинг белка [237]. Белки теплового шока обнаружены во всех клеточных компартментах, вовлеченных в фолдинг белка – цитозоле, митохондриях, ЭР – и группируются в пять семейств: HSP27, HSP40, HSP70, HSP90 и HSP110/104. Также в ЭР локализуется еще ряд ферментов, осуществляющих фолдинг белка, в том числе углевод-связывающий белок кальретикулин и действующие как оксидоредуктазы протеиндисульфидизомеразы (ПДИ). Для некоторых белков теплового шока показано, что их выключение приводит к уменьшению репликации ряда вирусов.

На рисунке 3.9 представлена сеть взаимодействий белка HSPA5/GRP78 (Bir), полученная в программе STRING [317]. Среди этих белков есть и ПДИ, отвечающая за фолдинг сложных поверхностных белков, к которым относится НА вируса гриппа. ПДИ катализирует образование нативных дисульфидных связей в синтезируемых полипептидах, а также является молекулярным шапероном, участвующим в процессе фолдинга белковых цепей. Анализ литературы показал, что данные по роли ПДИ в жизненном цикле ВГА

отсутствуют. Для других вирусов, в частности, ВИЧ, вируса гепатита С, ротавирусов, вируса Денге, имеются данные о важной роли ПДИ [73, 74].

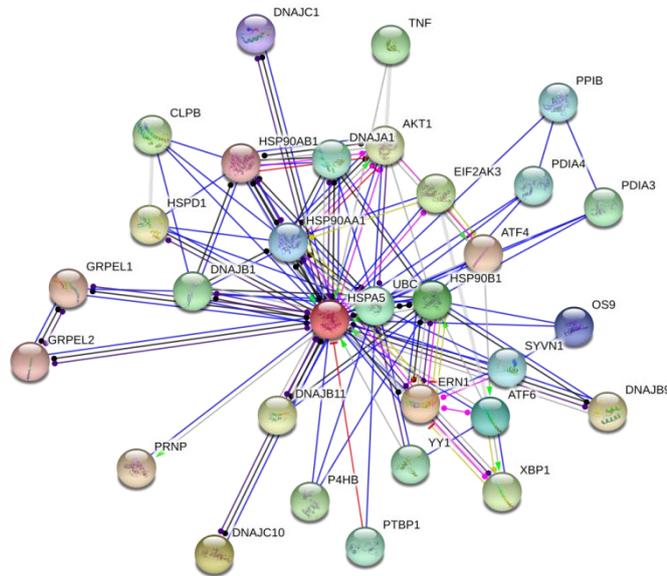


Рисунок 3.9 – Интерактивная карта белка GRP78 (HSPA5), полученная в программе STRING v.10.5

Показаны следующие белки: убиквитин С (UBC), белки семейств HSP40 (DNAJA1, DNAJB9, DNAJB1, DNAJB11, DNAJC1, DNAJC10), HSP90 (HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1) и HSP60 (HSPD1), протеиндисульфидизомеразы (P4HB/PDIA1, PDIA3, PDIA4), протеинкиназа AKT1, GRPEL1, АТФаза шаперонин CLPB, пептидилпролилизомеразы В (PPIB), EIF2α киназа 3 (EIF2AK3), лектин ЭР (OS9), GRPEL2, PTBP1, SYVN1, PRNP, TNF, ERN1, транскрипционные факторы (YY1, ATF4, ATF6, XBP1).

### Заключение по разделу 3.1.

Проведенный анализ аминокислотных замен в структурных и функциональных доменах белка NS1 ВГА человека показал их консервативность в процессе эволюции в течение последнего столетия. Полученные данные наряду с тем, что делеция OPC NS1 и/или некоторые замены в гене NS существенно снижают уровень репликации и степень патогенности ВГА, делают этот белок

перспективной мишенью для терапии гриппа. С одной стороны, «выключение» гена *NS* лишает вирус способности противостоять клеточному противовирусному ответу, опосредованному, в первую очередь, действием системы IFN. С другой стороны, вирус, содержащий укороченный ген *NS*, все же сохраняет ограниченную способность к репликации, достаточную для запуска механизмов врожденного и приобретенного иммунных ответов.

В данном разделе провели всестороннюю характеристику клеточной модели ВГА инфекции, которая позволяет оценить вклад *NS1* в развитие инфекции и осуществить методами системной вирусологии поиск клеточных факторов, связанных с *NS1*. В модели использовали эпителиальные клетки A549 и два рекомбинантных вирусных штамма, один из которых (*wtNS1*) содержит полноразмерный ген *NS*, а во втором ( $\Delta$ *NS1*) укорочена ОРС *NS1*. В результате проведения анализа экспрессии генов на уровне мРНК в клетках A549, инфицированных *wtNS1* и  $\Delta$ *NS1* вирусами, выявили основные клеточные пути, за активацию которых отвечает ОРС *NS1*. Ожидается делеция ОРС *NS1* привела к активации генов врожденного иммунного ответа. В случае *wtNS1* вируса обнаружили увеличение уровня мРНК двух групп генов. К первой группе относятся некодирующие РНК SNAR: G1, H, F, B2, G2, D и A3, ассоциированные с ядерным белком NF90, выполняющим противовирусную функцию [192]. Ко второй группе относят кодирующие белки теплового шока гены *HSPA5 (GRP78)*, *HSPA1B* и *HSPA1A* (семейство HSP70), *DNAJB1* (семейство HSP40) и *BAG3*. С вышеописанной группой белков тесно связан фермент ПДИ.

Как говорилось ранее, в случае дизайна лекарственных препаратов, направленных на *NS1*, может быть использовано несколько стратегий. Согласно одной из них перспективным представляется «выключение» экспрессии гена *NS* с помощью siРНК. Именно такая технология была использована в разделе 3.2 работы. Согласно другой стратегии, в качестве мишени можно использовать клеточные факторы-партнеры *NS1*, связь с которыми необходима для вирусной

репликации. Такой подход будет рассмотрен в разделах 3.2 и 3.3, где в качестве клеточных факторов будут рассмотрены клеточные miРНК и фермент ПДИ.

### **3.2. Использование механизма РНК-интерференции для терапии гриппа**

РНК-интерференция – это осуществляемый малыми РНК высокоспецифичный механизм подавления экспрессии генов на уровне мРНК, приводящий к блокированию трансляции [3]. РНК-интерференция может использоваться для выключения определенных генов в экспериментальной биологии и биотехнологии, а также в медицине для лечения различных заболеваний, в том числе инфекционных [29, 141]. В ряде исследований была продемонстрирована эффективность siРНК для ингибирования ВГА и других респираторных вирусов [3, 209]. Однако практическое применение терапевтических siРНК осложнено по причине их низкой стабильности, необходимости использования эффективных и безопасных средств доставки в клетки-мишени, а также возможной иммуногенности [360]. Для преодоления подобных барьеров активно ведутся поиски новых систем доставки малых РНК, которые обеспечивали бы эффективное связывание и доставку нуклеиновых кислот с их последующим высвобождением внутри клетки, биосовместимость, способность к биodeградации и низкую токсичность. В случае противовирусных siРНК мишенями для них могут служить не только вирусные, но и клеточные гены, с которых транскрибируются мРНК и различные некодирующие РНК, в частности miРНК. Открытие miРНК, как важных регуляторных агентов генной экспрессии, расширило терапевтические возможности применения синтетических олигонуклеотидов. Терапия с помощью siРНК, направленных на miРНК мишени, в отличие от мРНК, нацелена на регуляцию экспрессии не отдельных генов, а целых клеточных путей или процессов. При использовании ориентированного на miРНК подхода можно восполнять miРНК, уровень которых снизился, синтетическим siРНК, а также смягчать эффекты, вызванные повышенной экспрессией miРНК, используя их блокаторы, которыми могут быть как антисенс-олигонуклеотиды, так и

малые молекулы. Учитывая перспективность применения РНК-интерференции для лечения инфекционных заболеваний в следующей части работы мы использовали синтетические siРНК, направленные на «выключение» гена *NS* ВГА, а также компенсирующие некоторые клеточные miРНК, уровень которых снижается при ВГА инфекции.

### 3.2.1. Инкапсулированные siРНК, направленные на ингибирование гена *NS*, обладают противовирусной активностью в отношении вируса гриппа типа А *in vitro*

Как было показано ранее в п. 3.1 ген *NS* является перспективной мишенью для терапии ВГА инфекции с использованием механизма РНК-интерференции. В работе использовали направленные на блокирование экспрессии гена *NS* (анти-*NS*) siРНК: впервые подобранные в процессе выполнения работы NS-56, NS-535 и NS-777, и NS-128, ингибирующая способность которой была ранее описана в литературе [112]. Нуклеотидные последовательности siРНК и схема расположения мишеней siРНК в гене *NS* и кодируемых им мРНК NS1 и NEP приведены в таблице 3.5 и на рисунке 3.10, соответственно.

Таблица 3.5 – Последовательности комплементарных нитей анти-*NS* siРНК

siРНК	Последовательность	
	(+)-нить (5' → 3')	(-)-нить (5' → 3')
NS-56	CUUggUCUgCAAUCgUUUgC	AAACgAUUUgCAgACCAAgAA
NS-128	UCUgAUCUCGGCCGAAGCCG	CGGCUUCGCCGAGAUCAGA
NS-535	GUUAUCAUCCAUUCAAGUCC	ACUUGAAUGGAAUGAUAACAC
NS-777	CUUGCUCCAUUCAAGCAGUA	CUGCUUGAAGUGGAGCAAGAG
Неспецифическая siРНК	CAUGACCAACAAGAUGAAGAG	CUUCUGCUUGUUGGUCAUGCG



Рисунок 3.10 – Схема расположения мишеней для siРНК в гене *NS* и мРНК *NS1* и *NEP* ВГА

Оценку противовирусной активности siРНК проводили по профилактической схеме *in vitro*. siРНК в количестве 250 пмоль доставляли в клетки A549 с помощью липофектамина за 4 часа до заражения вирусом A/PR/8/34 (H1N1) с множественностью заражения 0.01. Через 24 часа определяли уровень белка NP в клетках методом ИФА, а во внеклеточной среде – вирусные титры реакцией гемагглютинации. Показали, что все исследуемые анти-NS siРНК обладают противовирусной активностью. При этом, по данным ИФА наибольшей эффективностью обладали NS-535 и NS-777, снижение уровня NP для них составило 38% и 32%, соответственно (рисунок 3.11). Согласно данным, полученным реакцией гемагглютинации, наибольшей ингибирующей активностью в отношении ВГА обладала siРНК NS-777 (таблица 3.6). При этом препарат доставки и контрольная неспецифическая siРНК не влияли на уровень репликации ВГА. Примечательно, что мишенью для NS-535 являются мРНК NS1 и NEP, а для NS-777 – только мРНК NEP.

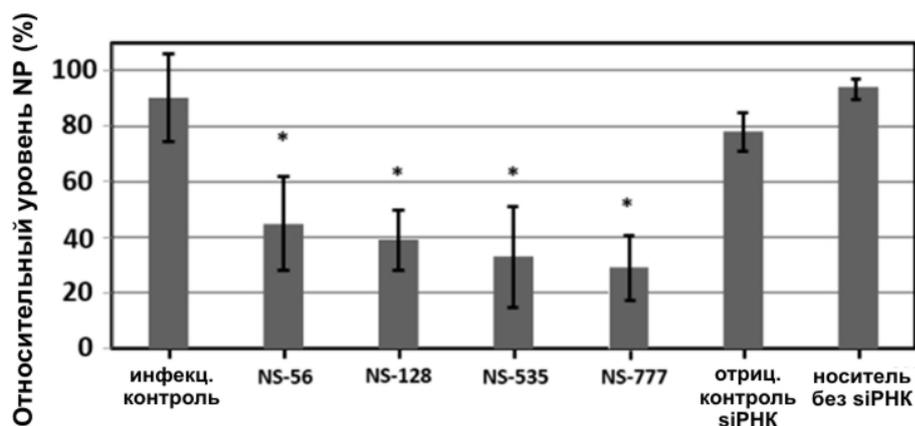


Рисунок 3.11 – Относительные уровни белка NP, определенные методом ИФА, в лизате инфицированных вирусом A/PR/8/34 (H1N1) клеток A549, обработанных анти-NS siРНК

На диаграмме приведены стандартные отклонения для  $n=8$  (\*  $p < 0.01$ ).

Таблица 3.6 – Влияние анти-NS siРНК на репродукцию вируса A/PR/8/34 (H1N1)

анти-NS siРНК	Титр вируса ( $\log_2$ HAU)
Контрольные инфицированные клетки	4
NS-56	3
NS-128	2
NS-535	2
NS-777	1
Неспецифическая siРНК	4
Препарат доставки (Lipofectamine <sup>®</sup> )	4

Выбор носителя для доставки siРНК в клетки является ключевым в вопросе изучения их активности и дальнейшей перспективы практического применения. Ранее мы провели ряд исследований, направленных на оценку эффективности доставки siРНК в клетки с использованием различных носителей (липофектамин, хитозан, полиэтиленимин, гибридные микрокапсулы), в результате которых

остановили выбор на гибридных микрокапсулах ( $\text{SiO}_2\text{-MC}$ ) (рисунок 3.12). Результаты сравнения носителей и описание  $\text{SiO}_2\text{-MC}$  подробно представлены в работах [5, 332].

Далее для инкапсулирования в  $\text{SiO}_2\text{-MC}$  частицы использовали siРНК NS-777, обладающую наибольшей противовирусной активностью по данным скрининга с липофектаминоном. Синтез  $\text{SiO}_2\text{-MC}$  проводили, как описано в [332]. Морфологию и размер капсул подтверждали методами SEM и TEM (рисунок 3.13). Для подтверждения загрузки siРНК в капсулы использовали siРНК, флуоресцентно меченую красителем ROX (ROX-siРНК).

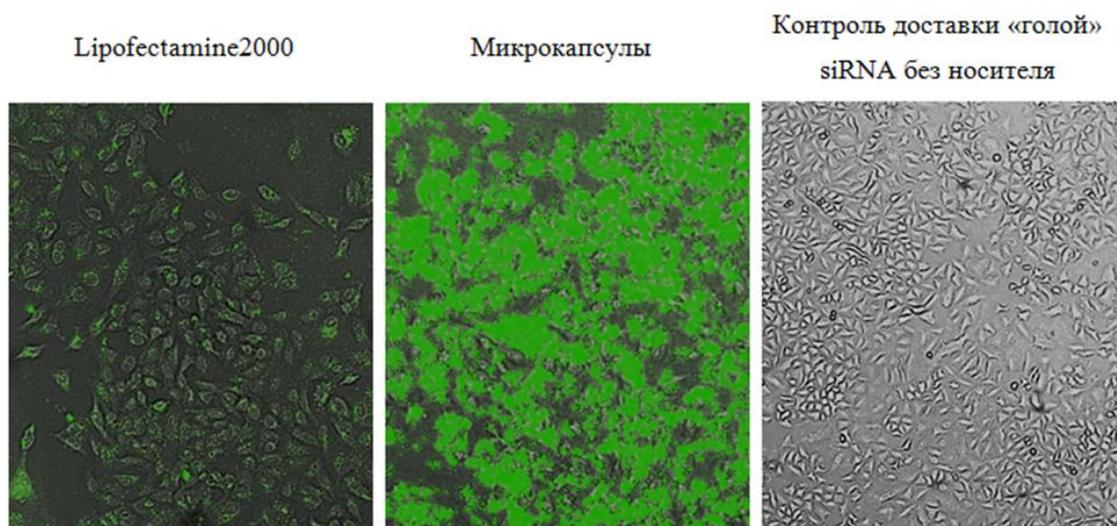


Рисунок 3.12 – Эффективность доставки синтетической двунитовой siРНК, содержащей карбоксифлуоресцеин (FAM) на 3'-конце, в клетки с использованием гибридных микрокапсул ( $\text{SiO}_2\text{-MC}$ ) и Lipofectamine<sup>®</sup> через 24 часа после внесения препаратов

*Изображения получены с помощью системы Cytell Cell Imaging System.*

Показали, что упакованные в  $\text{SiO}_2\text{-MC}$  siРНК устойчивы к обработке РНКазами, максимальная емкость капсул составляет  $6.4 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ , что является высоким значением по сравнению с другими невирусными системами доставки [310]. Методом конфокальной микроскопии в клетках A549 с использованием

меченой ROX-siРНК продемонстрировали присутствие siРНК внутри клеток уже через 4 часа после их введения, при этом через 24 часа наблюдали диффузию флуоресцентного сигнала по цитоплазме, что свидетельствует о высвобождении молекул siРНК в цитозоль (рисунок 3.14). Капсулы не приводили к ультраструктурным повреждениям клеток, что свидетельствует о их низкой цитотоксичности. Таким образом, была показана высокая эффективность захвата инкапсулированных siРНК клетками и низкая цитотоксичность используемых гибридных капсул.

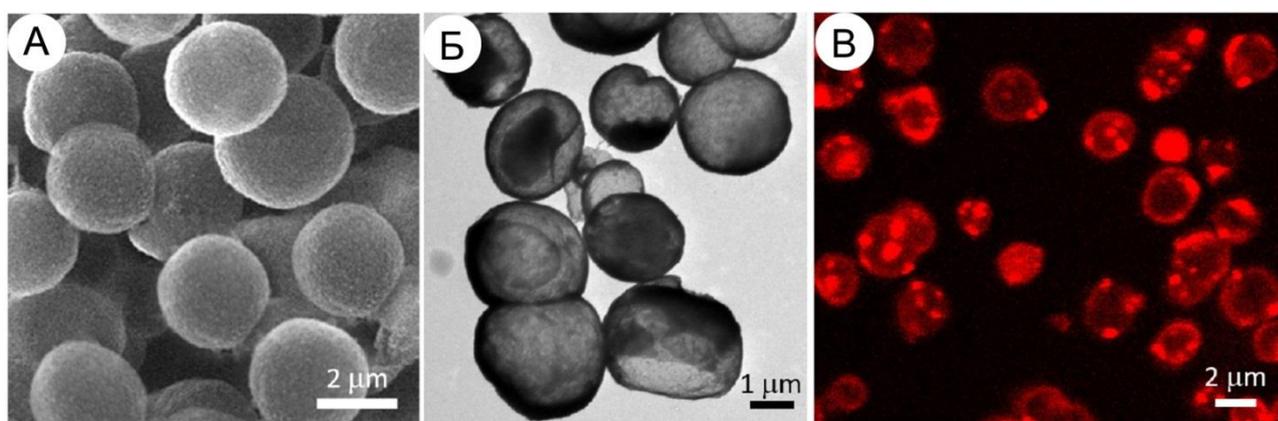


Рисунок 3.13 – Характеристика  $\text{SiO}_2$ -МС частиц, содержащих siРНК. Приведены SEM (А) и TEM (Б) изображения  $\text{SiO}_2$ -МС частиц, а также CLSM изображение  $\text{SiO}_2$ -МС частиц, в которые упакована siРНК, конъюгированная с флуоресцентной меткой ROX (В) [332]

Далее в клетках A549 тестировали противовирусную активность инкапсулированной siРНК NS-777. Клетки обрабатывали инкапсулированной NS-777 за 24 часа до заражения, затем инфицировали вирусом A/PR/8/34 (H1N1) при MOI, равном 0.05. Через 72 часа после инфицирования в клетках определяли относительное содержание белка NP методом ИФА. Капсулы без siРНК и микрокапсулы с неспецифической siРНК использовали как отрицательный контроль. Озельтамивир в конечной концентрации 150 мкг/мл использовали как

положительный контроль противовирусной активности. Кроме того, в качестве контроля использовали смесь siРНК, направленных на гены *NP* и *РА* ВГА (данные не опубликованы). Присутствие siРНК в клетках после трансфекции подтвердили методом электрофоретического разделения ПЦР продуктов, полученных с помощью miRNA RT-qPCR Detection Kit.

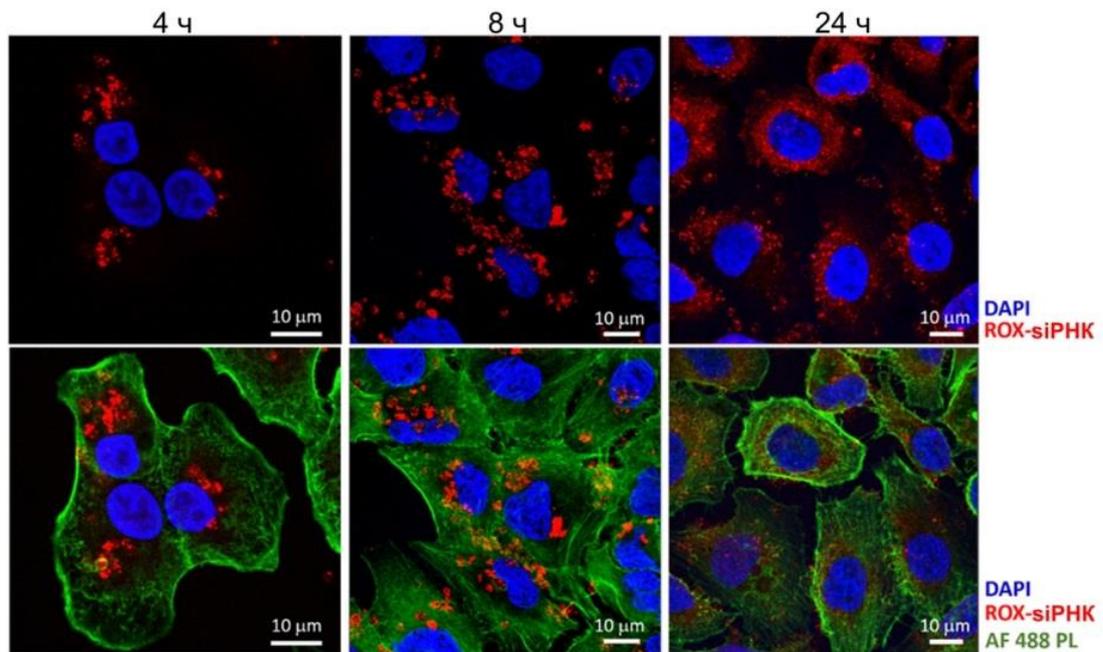


Рисунок 3.14 – Интернализация содержащих ROX-siРНК SiO<sub>2</sub>-МС частиц в клетки А549 и внутриклеточное распределение ROX-siРНК

*Приведены CLSM изображения, подтверждающие интернализацию ROX-siРНК через 4, 8 и 24 часа. siРНК конъюгирована с ROX (красный), ядро окрашено DAPI (синий), F-актин окрашен AF-488 PL (зеленый) [230].*

Методом ИФА было показано 80%-ое снижение относительного уровня NP в вирусном потомстве, что было сопоставимо с действием озельтамивира и смеси siРНК (рисунок 3.15А). Снижение уровня NP наблюдали и с использованием метода вестерн-блотинга (рисунок 3.15Б). Полученные данные коррелировали с результатами ОТ-ПЦР анализа уровня экспрессии мРНК M1 (рисунок 3.16). Таким образом, инкапсулированная NS-777 обладала противовирусным

действием *in vitro* и приводила к снижению уровня экспрессии вирусных генов на уровне, сопоставимом с препаратом сравнения – озельтамивиром.

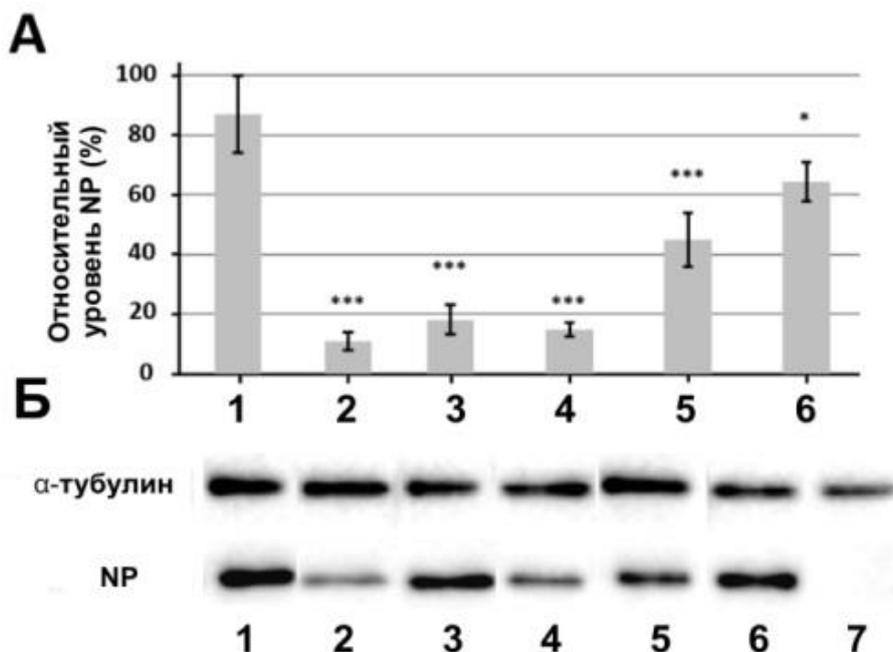


Рисунок 3.15 – Противовирусная активность siРНК NS-777.

(А) Относительный уровень NP в инфицированных клетках A549, измеренный методом ИФА. (Б) Относительный уровень NP (нормализованный по уровню α-тубулина) в инфицированных клетках A549, измеренный методом вестерн-блоттинга. Стандартные отклонения показаны на рисунке А ( $n=8$ ) ( $p$  values  $\leq 0.05$  (\*),  $< 0.005$  (\*\*),  $< 0.0005$  (\*\*\*)). 1 – зараженные вирусом A/PR/8/34 (H1N1) клетки, 2 – NS-777, 3 – анти-PA siРНК [332], 4 – озельтамивир, 5 – антисмысловая siРНК, 6 – SiO<sub>2</sub>-МС, 7 – контрольные клетки A549.

Исучаемые siРНК подбирали так, чтобы они были направлены на наиболее консервативные участки гена NS ВГА разных подтипов широкого круга хозяев. С целью изучения спектра субтиповой специфичности siРНК провели оценку эффективности NS-777 для следующих штаммов ВГА: A/PR/8/34 (H1N1), A/California/7/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>) и A/Anhui/1/13 (H7N9). Противовирусную активность оценивали на клетках MDCK с использованием метода титрования вирусного потомства (TCID<sub>50</sub> assay). Данные, представленные на рисунке 3.17,

показывают, что инкапсулированная NS-777 обладает сильным и специфическим противовирусным эффектом в отношении ВГА подтипов H1N1, H1N1<sub>pdm09</sub> и H7N9.

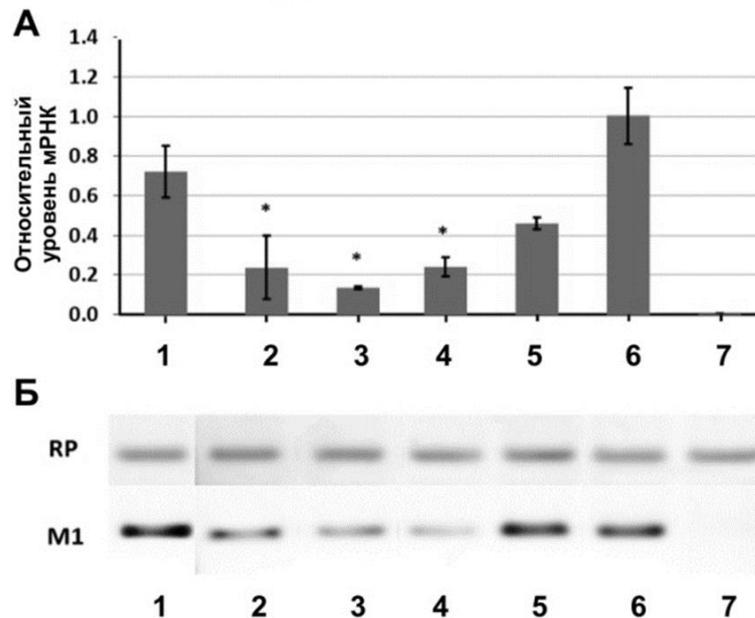


Рисунок 3.16 – Противовирусная активность инкапсулированной siРНК NS-777

*А* - относительная экспрессия мРНК M1 в лизатах культуры клеток, определенный методом ОТ-qПЦР. *Б* - электрофоретическое разделение продуктов ОТ-qПЦР амплификации мРНК M1 клеток A549, нормализованных по гену РНКазы Р. Стандартные отклонения показаны на рисунке А (n=8) (p values  $\leq 0.05$  (\*),  $< 0.005$  (\*\*),  $< 0.0005$  (\*\*\*)). 1 – зараженные вирусом A/PR/8/34 (H1N1) клетки, 2 – NS-777, 3 – PA, 4 – озельтамивир, 5 – антисмысловая siРНК, 6 – SiO<sub>2</sub>-МС, 7 – контрольные клетки A549.

При этом для NS-535 противовирусная активность наблюдается только для вирусов H1N1. Кроме того, NS-535 обладает противовирусным эффектом в отношении штаммов ВГА подтипов H3N2 и H5N2. Наблюдаемую неспецифичность в отношении ВГА разных подтипов можно объяснить наличием несовпадающих нуклеотидов между siРНК и мРНК мишенью (рисунок 3.18). Инкапсулированная NS-777 обладает противовирусной активностью в отношении всех исследованных вирусов.

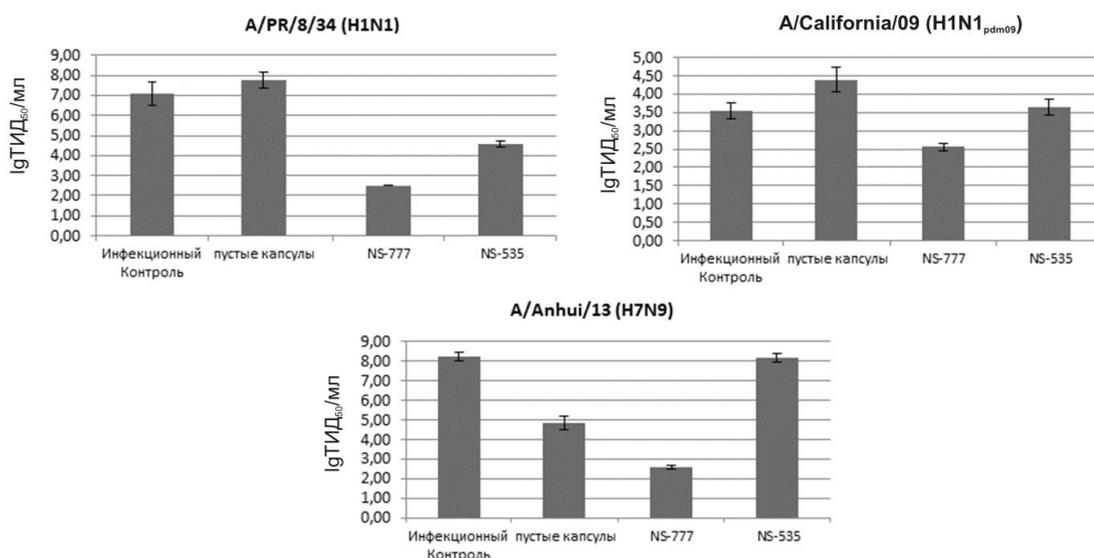


Рисунок 3.17 – Противовирусная активность инкапсулированных siPHK NS-777 и NS-535 в отношении вирусов A/PR/8/34 (H1N1), A/California/7/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>) и A/Anhui/1/13 (H7N9)

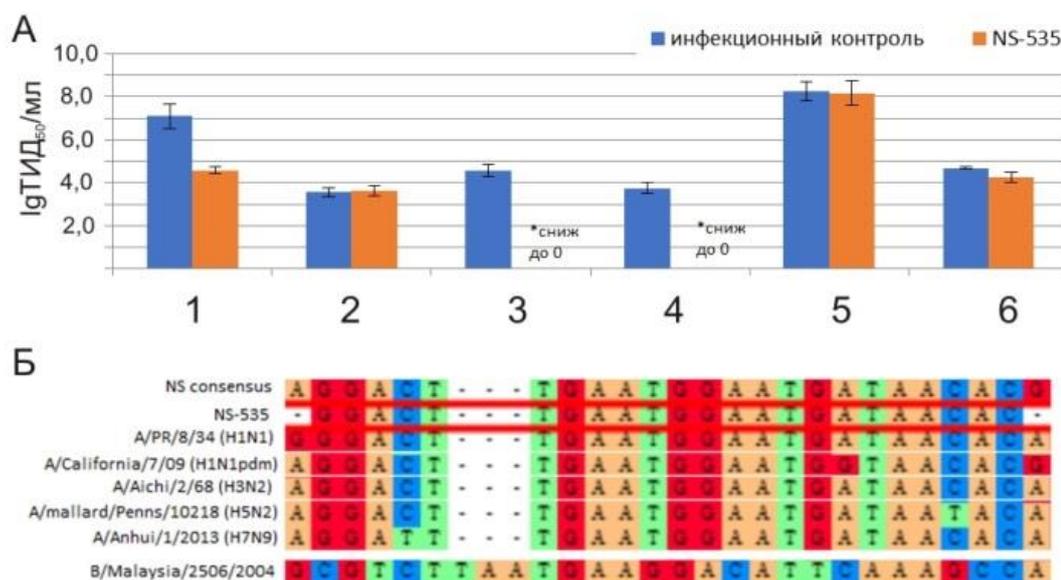


Рисунок 3.18 – Противовирусная активность инкапсулированной siPHK NS-535 в отношении ВГА разных подтипов

*А* - противовирусная активность siPHK. *Б* - выравнивание последовательностей siPHK NS-535 и участков мРНК-мишеней ВГА. 1 – A/PR/8/34 (H1N1), 2 – A/California/7/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>), 3 – A/Aichi/2/68 (H3N2), 4 – A/mallard/Pennsylvania/10218 (H5N2), 5 – A/Anhui/1/2013 (H7N9), 6 – B/Malaysia/2506/2004.

Таким образом, было показано, что инкапсулированная в гибридные микрокапсулы siРНК NS-777 обладает сопоставимой с озельтамивиром противовирусной активностью *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов. Использование siРНК, направленных на ген NS ВГА, является перспективным подходом к разработке новых лекарственных средств для лечения гриппа.

### **3.2.2. Клеточные miРНК – новые мишени для терапии гриппа с помощью компенсаторных siРНК**

miРНК играют важную роль в сложной пространственной и временной регуляции активности генов, поскольку определяют качественный и количественный состав транскриптов и, соответственно, белков, необходимых для развития эффективного иммунного ответа на инфекционное воздействие. В связи с этим miРНК также могут рассматриваться как клеточные мишени для создания нового поколения противовирусных препаратов.

На первом этапе работы аналогично п. 3.1 провели оценку изменений профиля экспрессии miРНК в клетках A549 в ответ на заражение рекомбинантными вирусами wtNS1 и  $\Delta$ NS1. Для оценки количества транскриптов miРНК использовали метод NGS на платформе MiSeq («Illumina», США). По результатам анализа выбрали 12 miРНК в качестве потенциальных мишеней для компенсаторной противовирусной miРНК-терапии гриппа *in vitro*. Список данных miРНК, изменение уровня их экспрессии, возможные гены-мишени и/или процессы, в которые данные miРНК вовлечены, представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Клеточные miРНК – потенциальные мишени для компенсаторной противовирусной miРНК терапии ВГА

miR	Цепь	Экспрессия		Процесс, в который вовлечена miРНК	Валидированные мишени miРНК
		wtNS	ΔNS		
let-7a	5p	↓	↓	RAF/MAPK каскадный сигналинг, регуляция клеточного цикла и апоптоза	
	3p	↓	↓		
miR-210	3p	↓	↓		FGFRL1, ISCU, EFNA3, CSF2RA – дисфункция метаболизма легочного сурфактанта
	5p	↓	↓		
miR-503	5p	↓	↓		CCND1, TNFRSF11A, PIK3R1, FGF2
miR-1260b		↓	↓	сигналинг, транскрипционные факторы, гены регулирующие связывание РНК с кЭПОМ	SMAD4,SFRP1, DKK2
miR-615	3p	↓	↓		29 мишеней, участвующих в развитии вирусной инфекции
miR-940		↓	↓	программированная гибель клеток, активация иммуноглобулинового рецептора	8 мишеней, участвующих в развитии вирусной инфекции

miR-29c	3p	↓	↑	система антиапоптоза	
miR-194	5p	↓	↑	иммунный ответ, АКТ сигналинг	Мишень, ассоциированная с ВГА KPNA1
miR-24	3p	↓	↑	Протеолитическое разрезание НА гриппа, необходимое для образования инфекционно активного вириона	Фурин
	5p	↑	↑		
miR-125b	5p	↓	↑	Про-вирусные цитокины	TP53INP1, ERBB2, KLF13, CBFB, PCTP, GSS, EIF4EBP1, NKIRAS2, TP53, VDR
	5p	↓	↑	Регулирование жизненного цикла клетки и программированной гибели	
miR-16	5p	↓	↑	Про-вирусные цитокины	TNF- $\alpha$
	5p	↑	↑	Клеточные сигнальные пути врожденного иммунитета	HGF
miR-6797	3p	↑	↓	Регуляция иммунного ответа	CANX, GTF2F1, POLR2F
	5p	↑	↓		3 мишени, участвующие в развитии вирусной инфекции

Далее провели скрининг противовирусной активности siРНК, являющихся компенсаторными по отношению к выбранным miРНК. Для этого использовали метод ИФА, определяя уровень белка NP в клетках через 72 часа после заражения вирусом wtNS1. Предварительно подобрали такие дозы заражения, чтобы вирус реплицировался в клетках, однако не вызывал значительного цитопатического действия, а также возможно было наблюдать вирус-ингибирующее действие озельтамивира. Выбранная доза заражения соответствовала 25 TCID<sub>50</sub>/ml или 0.0001 MOI. В такой дозе была возможна достоверная детекция белка NP методом ИФА в зараженных клетках и статистически достоверное снижение уровня NP при воздействии озельтамивира. Согласно [310] компенсаторные siРНК доставляли в клетки с помощью липофектамина в количестве 0,1 фмоль на клетку (конечная концентрация в среде 0,05 мкМ). Методом ИФА показали достоверно значимое снижение уровня NP в клетках после профилактического введения следующих miРНК: let7a, miR-16 и miR-24. Это свидетельствует об ингибировании инфекционного процесса в клетке при компенсации сниженных внутриклеточных уровней данных miРНК. Помимо содержания NP внутри клеток мы оценили его уровень в культуральной среде, содержащей вирусное потомство (рисунок 3.19А). Введение синтетических аналогов let-7a, miR-16, miR-24, miR-29c, miR-125b и miR-194 снижает содержание NP на уровне, сопоставимом с озельтамивиром. Эти данные подтверждаются результатами постановки РГА для вирусосодержащей культуральной жидкости этих клеток (рисунок 3.19Б).

Роль некоторых miРНК, для которых показали эффективный противовирусный эффект при профилактическом компенсаторном введении, в развитии гриппозной инфекции уже была описана в ряде работ. miR-24 участвует в регуляции протеолитического расщепления НА ВГА H5N1, необходимого для образования инфекционно активного вириона [207]. let7a и miR-29 хорошо изучены как участники сложных каскадных процессов регуляции клеточного

цикла и апоптоза, что может быть так или иначе ассоциировано с развитием вирусной инфекции [310].

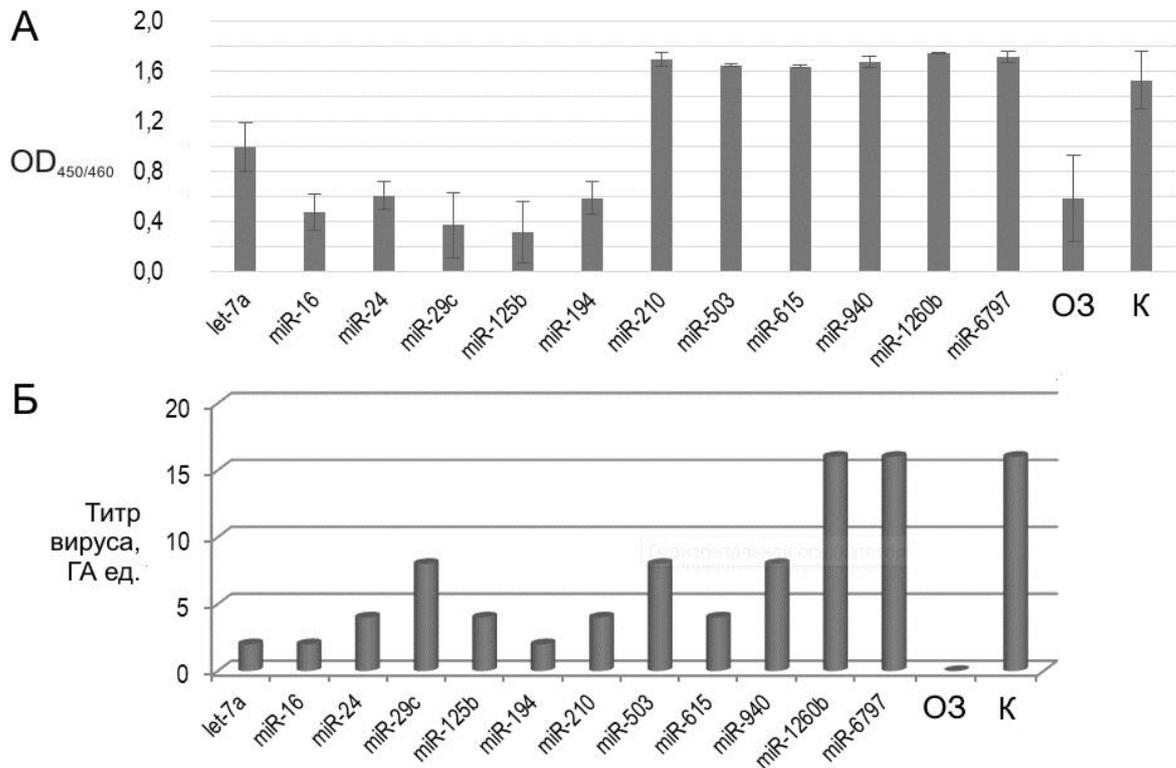


Рисунок 3.19 – Противовирусное действие компенсаторных аналогов miРНК, доставляемых в клетку с помощью Lipofectamin® за 4 часа до заражения клеток А549 вирусом wtNS1 в дозе 25 TCID<sub>50</sub>/ml (0.0001 moi)

*А* – относительный уровень белка NP в вирусосодержащей культуральной жидкости через 72 часа после заражения. *Б* – результаты РГА вирусосодержащей культуральной жидкости через 72 часа после заражения.

Интерес представляет miR-16, для которой были продемонстрированы снижение при заражении ВГА H1N1 и H7N7 и вовлеченность в клеточные пути сигналинга врожденного иммунитета, а также влияние на гены мишени провирусных цитокинов, в том числе TNF $\alpha$  [207]. Недавно была показана роль miR-16 в процессах индукции апоптоза и супрессии размножения энтеровируса 71 [387]. Возможно, аналогичный путь действия miR-16 проявляется и для ВГА, что отражается в наблюдаемой нами низкой выживаемости клеток, но при этом

снижении вирусной репродукции *in vitro*. Другая miРНК, miR-194, также снижающаяся при заражении пандемическими ВГА, имеет валидированную мишень – ген *KPNA1*, кодирующий субъединицу импорта  $\alpha$ , отвечающего за транспорт в ядро вирусных белков PB1 и NP [207].

Для дальнейших экспериментов по компенсаторной miРНК терапии были отобраны четыре miРНК: let-7a, miR-16, miR-24, miR-194. Как и в случае анти-NS siРНК, направленных на ген *NS* ВГА, для доставки компенсаторных siРНК далее использовали SiO<sub>2</sub>-МС носитель. Противовирусную активность оценивали на клетках A549, инфицированных вирусом A/PR/8/34 (H1N1) в дозе 6000 TCID<sub>50</sub>/ml (0,01 MOI). Мы использовали комбинацию из всех четырех инкапсулированных miРНК (let-7a, miR-16, miR-24, miR-194), которую доставляли в клетки по профилактической схеме за 24 часа до заражения. Общее трансфицируемое количество siРНК составило 1 фмоль на клетку (конечная концентрация в среде 1 мкМ).

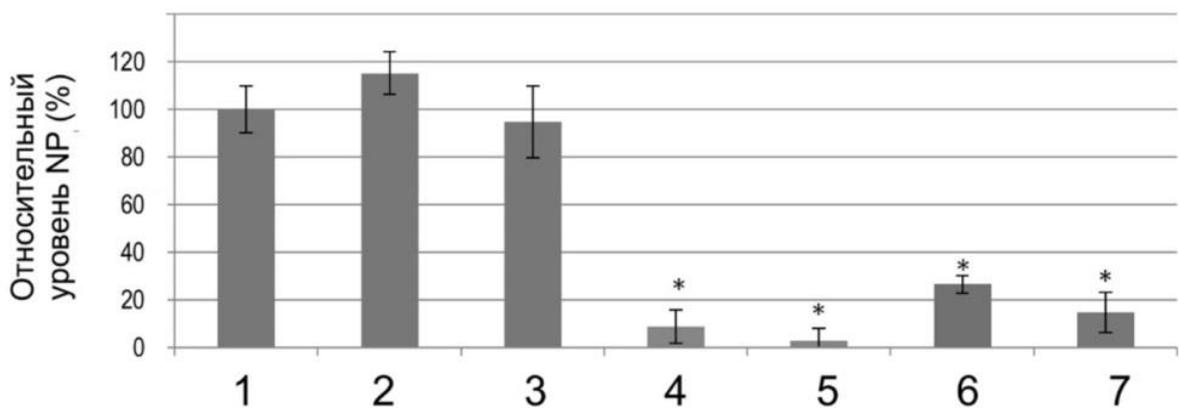


Рисунок 3.20 – Противовирусное действие коктейля синтетических siРНК, компенсирующих действие клеточных miРНК let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194, доставляемых в клетку гибридными микрокапсулами

Препарат введен в клетки A549 за 24 часа до заражения вирусом A/PR/8/34, (0.01 MOI) 1 – зараженные клетки, 2 – SiO<sub>2</sub>-МС, 3 – неспецифическая siРНК, 4 – коктейль компенсаторных miРНК, 5 – коктейль анти-PA, анти-NP и анти-NS siРНК, 6 – озельтамивир, 7 – контрольные клетки. \*  $p < 0.005$  вероятность по *t*-тесту Стьюдента.

Было продемонстрировано (рисунок 3.20) значимое, статистически достоверное снижение уровня NP на 90% в инфицированных клетках через 72 часа после заражения вирусом по сравнению с инфекционным контролем и действием неспецифической siРНК. Противовирусный эффект компенсаторных miРНК сопоставим с эффектом комбинации противовирусных siРНК, направленных на ингибирование генов NS, NP и PA ВГА, и в среднем превышает противовирусное действие озельтамивира.

Таким образом, в результате выполнения данной части работы мы успешно использовали инкапсулированные синтетические компенсаторные siРНК для эффективного подавления репродукции ВГА *in vitro*.

### **Заключение по разделу 3.2.**

Технология терапевтических siРНК, основанная на явлении РНК-интерференции, представляет собой перспективную платформу для таргетного «выключения» как вирусных, так и клеточных генов. В процессе выполнения данного раздела работы было продемонстрировано, что инкапсулированные в гибридные микрокапсулы анти-NS siРНК обладают значимым противовирусным эффектом *in vitro*. В результате проведенного скрининга выбрали перспективную для дальнейших исследований *in vivo* молекулу NS-777, которая обладает сопоставимой с озельтамивиром противовирусной активностью в отношении ВГА разных подтипов (H1N1, H1N1<sub>pdm09</sub>, H3N2, H5N2 и H7N9). Кроме того, был апробирован новый подход к поиску противовирусных молекул, основанный на применении синтетических siРНК, компенсирующих снижение уровня экспрессии клеточных miРНК под действием вирусного заражения. Для этого методом NGS было изучено изменение профиля экспрессии пула клеточных miРНК клеток A549 в условиях заражения вирусами wtNS1 и ΔNS1 и определены miРНК мишени для компенсаторной терапии. Высокоэффективное (сопоставимое с озельтамивиром) ингибирование репликации ВГА *in vitro* было достигнуто при

использовании коктейля синтетических аналогов клеточных miРНК let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194. Следует отметить, что данные miРНК играют важную роль не только в жизненном цикле ВГА, но и ряда других вирусов, что делает возможным создание на основе компенсаторных siРНК противовирусных препаратов широкого спектра действия.

### **3.3. Протеиндисульфидизомераза – клеточная мишень для противовирусной терапии. 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины – ингибиторы протеиндисульфидизомеразы?**

В разделе 3.1 показали, что ОРС NS1 гена *NS* ВГА отвечает за активацию HSF1-опосредованного ответа на тепловой шок. В частности, было продемонстрировано увеличение числа транскриптов, кодирующих ряд белков теплового шока, отвечающих за корректный фолдинг вирусных и клеточных белков [42]. К этой группе белков также относится ПДИ – 57 кДа оксидоредуктаза надсемейства тиоредоксинов, функционирующая в люмене ЭР, где она преимущественно проявляет активность оксидазы для формирования дисульфидных связей в насцентных секретируемых белках [15]. ПДИ катализирует перестройку неправильно образовавшихся дисульфидных связей посредством изомеразной активности, тем самым способствуя фолдингу белков (рисунок 3.21).

ПДИ также присутствует на поверхности лимфоцитов, гепатоцитов и тромбоцитов, и вместе с дополнительными секретируемыми белками ЭР может секретироваться на поверхность клеток. В эндосомах и на клеточной поверхности ПДИ действует как редуктаза, расщепляя дисульфидные связи в белках. Ассоциированная с поверхностью ПДИ вовлечена в широкий диапазон функций, включая способствующее вхождению в клетки восстановление дисульфидных связей в дифтерийном токсине, восстановление дисульфидных связей в эктодомене рецептора тиреотропина человека, поддержание восстановленного

состояния плазматической мембраны, участие в NO-сигналинге в мегакариocyтах и тромбоцитах [15, 127]. Функции ПДИ регулируются окислительно-восстановительным состоянием образованного четырьмя аминокислотами активного центра СХХС. В этом мотиве две аминокислоты между цистеинами важны для поддержания окислительно-восстановительного потенциала. Следует отметить, что мотив СХХС характерен для всех белков семейства ПДИ [102].

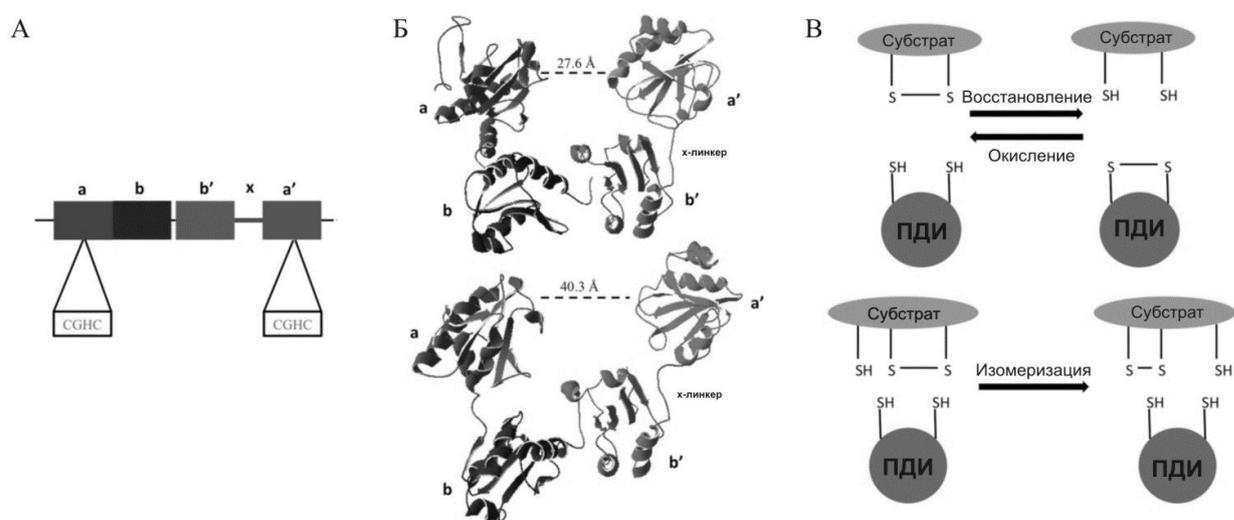


Рисунок 3.21 – Структура ПДИ, кодируемой геном *P4NB* человека [15]

*A* – линейная карта ПДИ. Белок состоит из 4 доменов (*a*, *a'*, *b*, *b'*), домены *b'* и *a'* соединены *x*-линкером, домены *a* и *a'* содержат в активном центре мотив СХХС. *B* – пространственная модель ПДИ. Показаны окисленная (верх) и восстановленная (низ) формы белка. *C* – схема ферментативной активности

Катализируемые ПДИ реакции происходят в процессе тиол-дисульфидного обмена между ПДИ и соседними белками или пептидами. При окислении ПДИ с окисленным мотивом вступает в реакцию с дитиолами белков или пептидов для формирования дисульфидных связей (рисунок 3.36). При восстановлении, однако, ПДИ с цистеинилдитиол СХХС мотивом восстанавливает дисульфидные связи в белках или пептидах, что приводит к образованию дисульфида в активном сайте ПДИ (рисунок 3.36). По данным литературы ингибирование ферментативной

активности ПДИ обладает противовирусным эффектом в отношении некоторых вирусов [73, 74]. В связи с этим, следующий раздел работы был посвящен оценке перспектив использования ПДИ как лекарственной мишени для разработки противовирусных препаратов широкого спектра действия.

### 3.3.1. Клонирование и получение рекомбинантной протеиндисульфидизомеразы

С целью изучения ингибирования ферментативной активности ПДИ получили соответствующий рекомбинантный белок в бактериальной системе экспрессии.

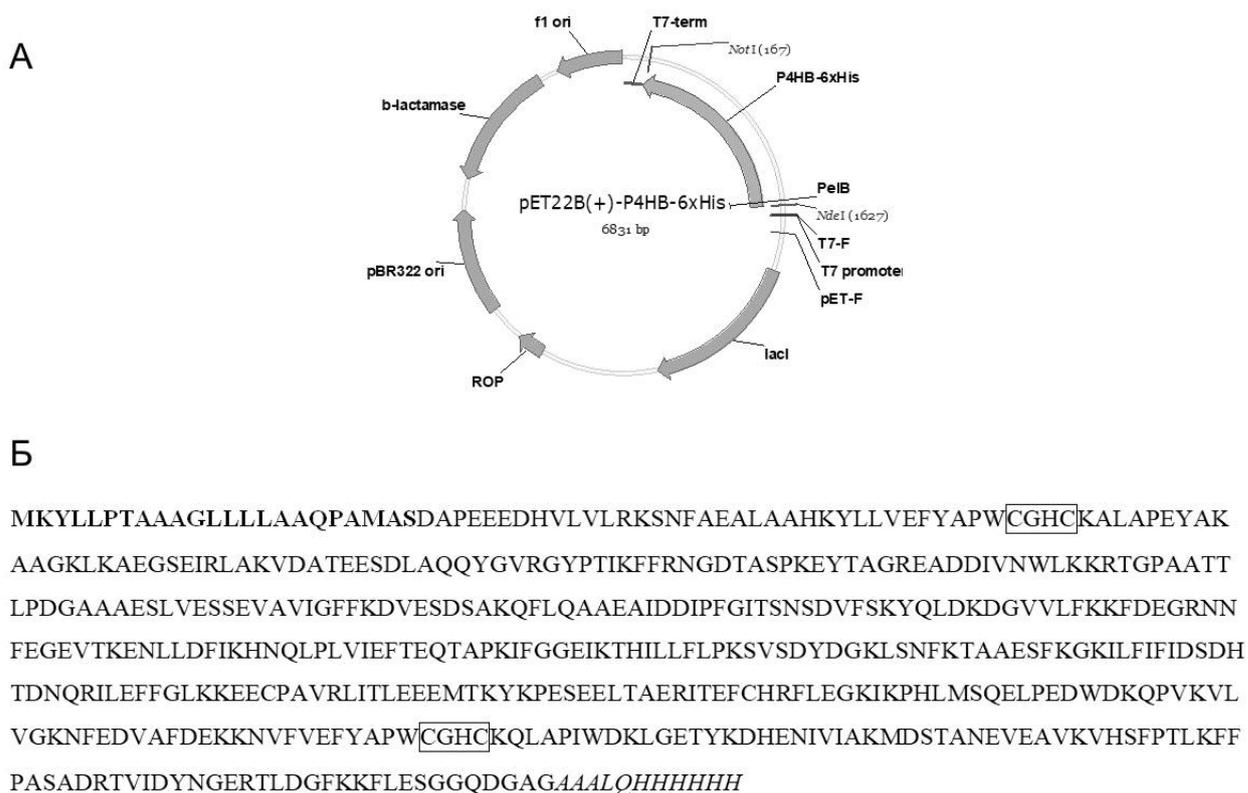


Рисунок 3.22 – Рекомбинантная ПДИ

*А* – карта экспрессионного вектора pET22B(+)-P4HB-6xHis. *Б* – аминокислотная последовательность периплазматической рекомбинантной ПДИ. Отщепляемый сигнальный пептид PeIB отмечен жирным шрифтом; дополнительные аминокислоты, в том числе C-концевой гистидиновый таг, отмечены курсивом. Ферментативный центр CGHC выделены рамкой.

В качестве исходной референсной последовательности для клонирования использовали мРНК гена *P4NB* человека (Uniprot P07237). Целевая последовательность рекомбинантной ПДИ показана на рисунке 3.22. Расчетная молекулярная масса процессированного белка составляет 53,3 кДа, изоэлектрическая точка – 5.24.

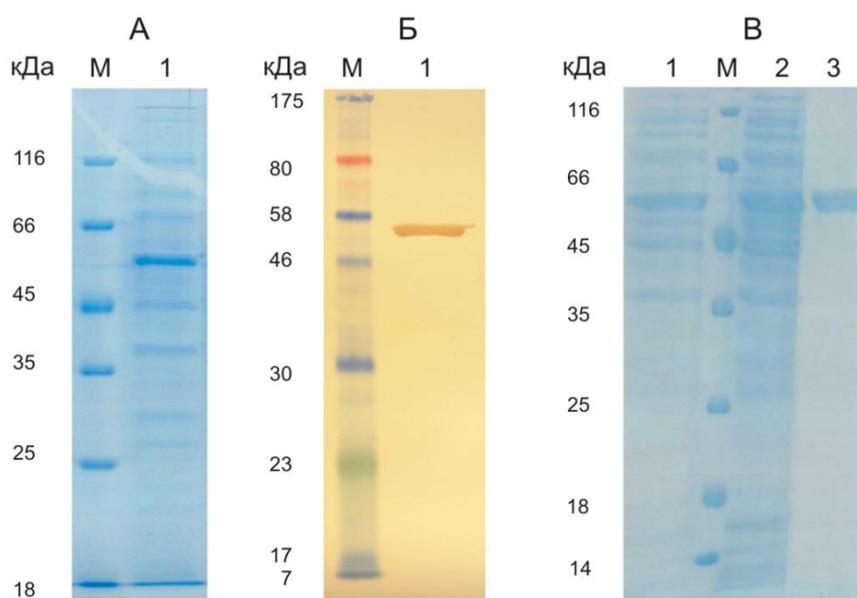


Рисунок 3.23 – Выделение и очистка рекомбинантной ПДИ

*A* – результаты электрофоретического разделения в ПААГ клеточного лизата, содержащего ПДИ. *Б* – результаты вестерн-блоттинга клеточного лизата, содержащего ПДИ, с антителами к His-тэгу. *В* – результаты электрофоретического разделения в ПААГ очищенной ПДИ. *М* – маркер молекулярного веса, *1* – тотальный клеточный лизат, *2* – не связавшиеся на колонке фракции, *3* – очищенная фракция, содержащая ПДИ. Наблюдаемая молекулярная масса ПДИ соответствует расчетной в пределах погрешности анализа.

Целевой белок очищали из клеточного лизата методом металл-хелатной хроматографии на хроматографе ÄKTAprime plus (GE). На рисунке 3.23 представлены результаты электрофоретического разделения в ПААГ содержащих ПДИ фракций до и после очистки.

### 3.3.2. Анализ экспрессии протеиндисульфидизомеразы в клетках человека

С целью анализа экспрессии гена *P4NB* подобрали специфические праймеры и зонд к мРНК *P4NB* для использования в методе ПЦР в режиме реального времени. С помощью разработанной тест-системы провели анализ экспрессии ПДИ в клетках A549 при ВГА инфекции. В исследуемых образцах выявили мРНК *P4NB*, однако статистически достоверной разницы в ее уровне между контрольными и инфицированными клетками не обнаружили (рисунок 3.24)

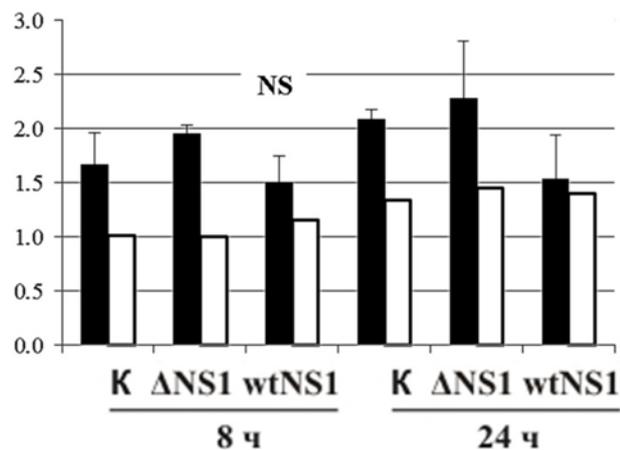


Рисунок 3.24 – Уровни мРНК *P4NB* в препаратах тотальной и мРНК ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -анализ результатов ОТ-ПЦР), выделенной из клеток A549, инфицированных вирусами wtNS1 и  $\Delta\text{NS1}$

На рисунке черным цветом показано среднее значение относительных уровней экспрессии  $\pm$  стандартное отклонение, рассчитанные для биологических повторов в каждой группе. Белым цветом показаны значения относительных уровней экспрессии, полученные для мРНК.  $P < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

Таким образом, показали, что в клетках A549 имеется экспрессия ПДИ. При этом инфицирование клеток A549 вирусами wtNS1 и  $\Delta\text{NS1}$  практически не влияет на уровень мРНК ПДИ, что согласуется с данными анализа экспрессии клеточных генов, полученными в разделе 3.1.2.4.

### 3.3.3. Окислительная способность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении цистеинов в белках

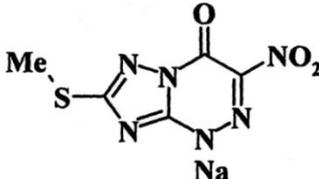
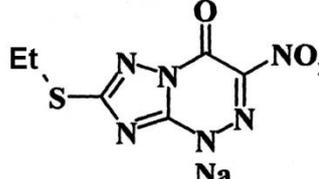
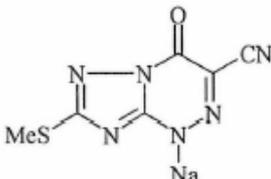
В процессе поиска потенциальных ингибиторов ПДИ обратили внимание на соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, для которых была показана противовирусная активность в отношении ВГА и некоторых других вирусов, но механизм действия оставался неизвестным [164]. Ранее в силу структуры этих соединений было высказано предположение о том, что они могут обладать окислительной способностью в отношении цистеинов в белках, в частности, в НА ВГА [1].

Для оценки окислительной способности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов использовали ряд их производных, которые отличаются по составу боковых групп (таблица 3.8). Соединения были синтезированы в УрФУ и ИОС УрО РАН, их молекулярная масса была подтверждена методом MALDI-MS на масс-спектрометре UltrafleXtreme («Bruker», Германия). Все изучаемые соединения регистрируются в режиме отрицательных ионов без использования матрицы. На рисунке 3.25 в качестве примера представлены MALDI-MS спектры для натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата и 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата. Последнее обстоятельство особенно ценно тем, что матрицы обычно продуцируют паразитные ионы именно в той области спектра, где регистрируются анионы 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов.

Для изучения взаимодействия 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с белками в качестве возможных мишеней использовали цистеин-содержащие пептиды LCKLGGIAPLHLGKCN-amid (PI) и LCDLNGVKPLILRDCS-amid (PII), являющиеся фрагментами НА двух штаммов ВГА подтипов H1N1 и H5N1. Эта пара пептидов имеет высокую степень взаимной гомологии и общую особенность – в каждом из них содержится по два цистеина, причем в структурной

организации нативных белков эти цистеины не связаны внутренней дисульфидной связью.

Таблица 3.8 – Обозначения, структура и некоторые характеристики соединений ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов

Наименование соединения	Структура и брутто-формула	m/z	Относительная скорость окисления	
		М (без Na)	PI	PII
натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат	 $[C_5H_3N_6O_3S]^-Na^+$	227.00	10	10
натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат	 $[C_6H_5N_6O_3S]^-Na^+$	241.01	4	3
натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат	 $[C_6H_3N_6OS]^-Na^+$	284	1	1

Наличие двух цистеинов в каждом из пептидов позволило предположить, что под действием нитрогруппы или цианогруппы, присутствующих в 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазилах, будет происходить образование дисульфидных

связей. Очевидно, что эти связи могут оказаться, как внутримолекулярными, так и межмолекулярными, хотя образование внутримолекулярных связей представляется более предпочтительным. При наличии в реакционной среде одновременно двух пептидов, наряду с образованием внутримолекулярных связей, можно предполагать формирование разного типа димеров, количественное соотношение между которыми, вероятно, могло бы пролить свет на возможность существования предшествующей стадии комплексообразования пептидов между собой. Использование масс-спектрометрии в данном случае весьма привлекательно, поскольку образование каждой дисульфидной связи легко детектируется по уменьшению массы соединения на 2 Да. При этом в случае образования гетеродимеров возможно оценить количество образовавшихся связей и установить их локализацию.

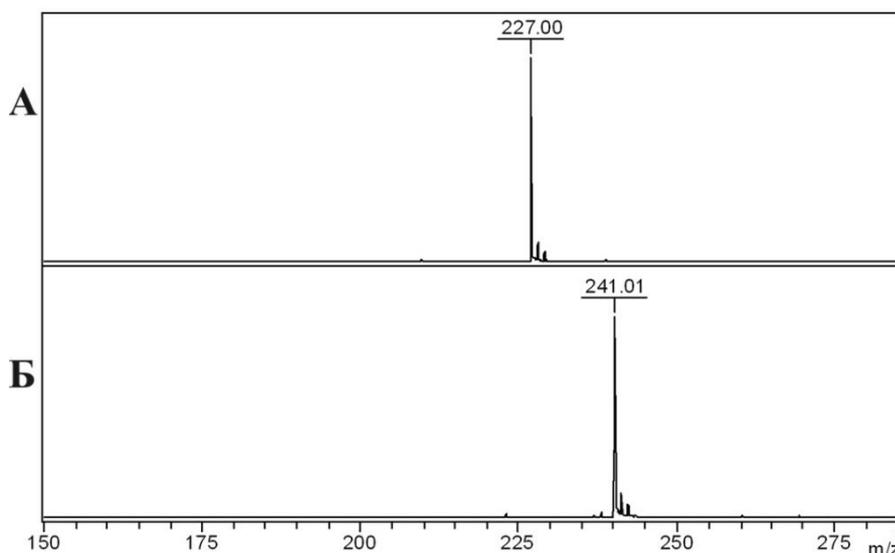


Рисунок 3.25 – Спектры MALDI-MS натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (А) и натриевой соли 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (Б) в (-) моде без матрицы

С этими намерениями были проведены эксперименты по взаимодействию смеси пептидов РІ и РІІ с 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинами и рядом других

окислителей ( $\text{SeO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) для сравнения. Окисление проводилось при температуре  $37^\circ\text{C}$  в присутствии  $25 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ . Из представленных на рисунке 3.26 данных следует, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины и другие использованные окислители катализируют образование дисульфидных связей (по сравнению с контролем). В качестве продуктов реакции образуются не только мономеры, но и димеры, и при этом формируется только одна дисульфидная связь. Отмечено, что при окислении в наибольшем количестве образуются гетеродимеры исследуемых пептидов.

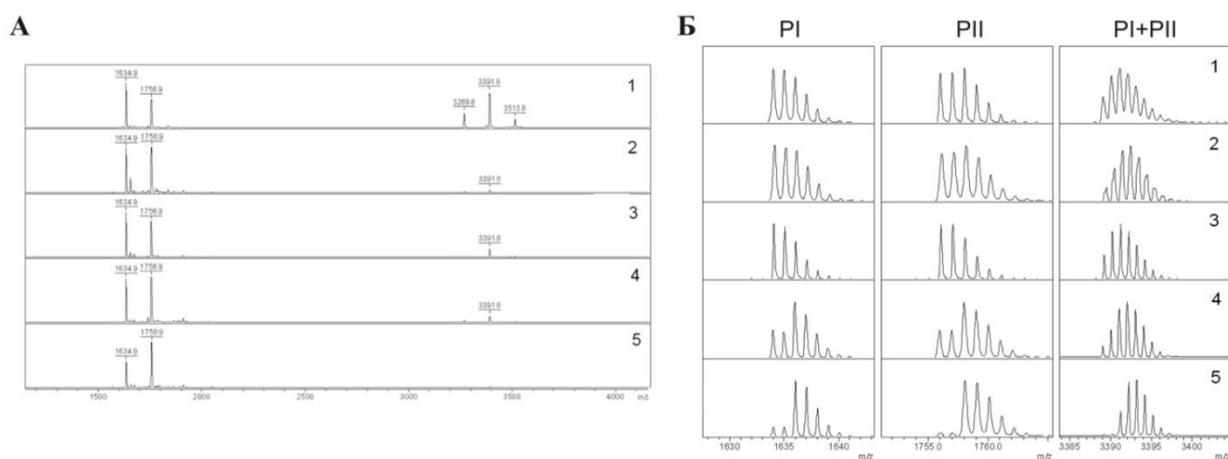


Рисунок 3.26 – Окисление смеси цистеин-содержащих пептидов PI и PII

Представлены MALDI-MS спектры реакционных масс, полученных при взаимодействии пептидов PI и PII с окислителями через 70 минут инкубации при  $37^\circ\text{C}$  (A), и фрагменты спектров, характеризующие образование дисульфидных связей (B). В каждой реакционной смеси для контроля окисления присутствовало по  $0,12 \text{ mM}$  пептидов PI и PII, к которым добавляли  $2 \text{ mM SeO}_2$  (1),  $9 \text{ mM}$  натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (2),  $0,6 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  (3). В качестве контроля использована смесь пептидов без добавления окислителей в буфере (4) и в растворе с 2% ТФУ (5) для предотвращения процессов окисления.

Далее изучили окислительную способность выбранных соединений в отношении образования внутримолекулярной дисульфидной связи с использованием масс-спектрометрии, что позволяет оценить относительные скорости окисления. Для повышения степени объективности этой оценки в

качестве мишеней использованы два гомологичных пептида РІ и РІІ, что позволяет оценить влияние микроокружения вблизи тиольных групп на их способности к окислению. Инкубация 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов была проведена одновременно для обоих пептидов. В качестве буфера использован 50 мМ бикарбонат аммония, величина рН которого близка к физиологическим значениям. Через разные промежутки времени реакцию останавливали добавлением эквивалентного объема 2% ТФУ и наносили на мишень для MALDI-MS-анализа.

Результаты масс-спектрометрических измерений на примере нитропроизводных 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов представлены на рисунке 3.27. Здесь же представлены результаты контрольных измерений для пептидов до окисления и спонтанного окисления в тех же условиях что и для окисления в присутствии исследуемых 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов. Как следует из представленных результатов, в каждом пептиде в процессе инкубации растёт доля дисульфидных форм. Оценка этого роста, с учетом изотопного распределения каждой из форм и вычетом спонтанного окисления пептидов в буфере, представлена в таблице 3.13. За единицу принята доля окисленной формы натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата.

Из полученных данных следует, что наибольшей окислительной способностью обладает натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, а наименьшей – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата. Отметим, что этот порядок сохраняется для обоих пептидов, однако окисленной (дисульфидной) формы пептида РІ образуется примерно в 2 раза больше, чем для пептида РІІ. Эта особенность, по-видимому, объясняется тем, что образование дисульфидных связей зависит от микроокружения вблизи цистеинов. При наличии высокой гомологии в последовательностях, скорость выше в том случае, когда вблизи

обоих остатков цистеина присутствуют основные аминокислоты, как у пептида PI. Соответственно, обратный эффект имеет место при наличии вблизи цистеина остатков отрицательно заряженных аминокислотных остатков, как у пептида PII. Заметим, что при исследуемых условиях окисления, когда pH близок к физиологическим значениям, 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины являются анионами, т.е. «несут» отрицательный заряд.

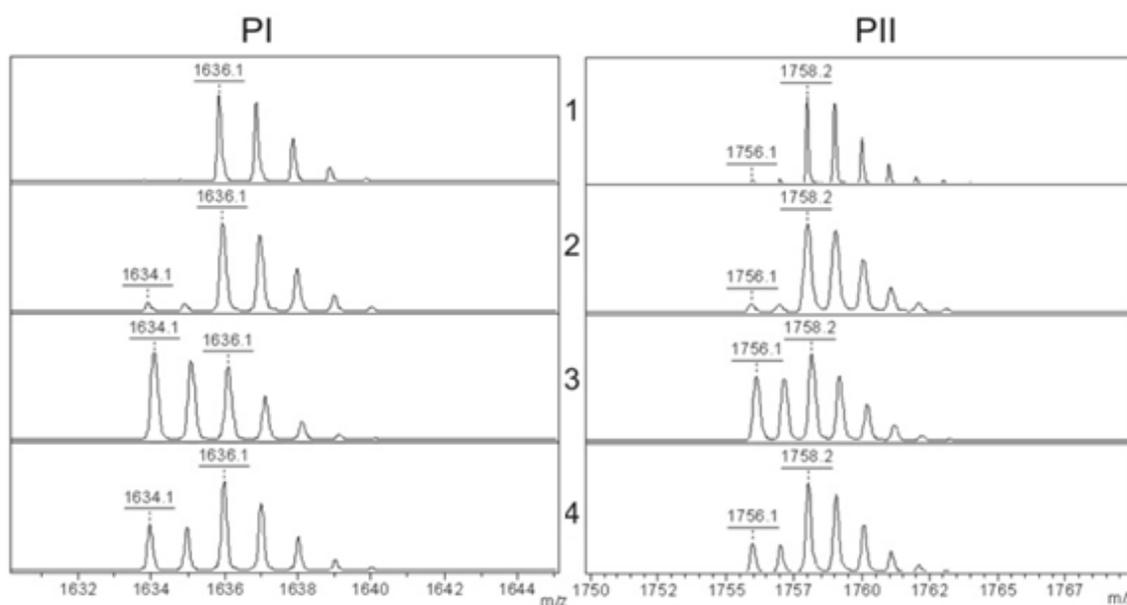


Рисунок 3.27 – Окисление 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины цистеин-содержащих пептидов PI и PII по отдельности

*Представлены фрагменты MALDI-MS спектров для пептидов PI и PII до окисления (1), окисления пептида в буфере (2) и в буфере в присутствии натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (3), и натриевой соли 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (4) через 3 минуты инкубации смесей при 20 °С.*

В заключении также отметим, что основным методом исследования явилась масс-спектрометрия (MALDI-MS). И не смотря на то, что исследования проводились, главным образом, в области низких масс, использование MALDI-MS позволило контролировать непосредственно как исходные соединения, так и продукты их превращений. Особо следует отметить возможность количественного определения этих соединений, что допустимо и для анализа в

биологических средах. Для контроля за составом тиолсодержащих продуктов непосредственно в реакционных смесях, а особенно для оценки относительной окислительной способности рассматриваемых соединений, масс-спектрометрия оказалась подходящим методом. Альтернативные подходы в этом случае были бы существенно более сложными и неоднозначными, поскольку любые процедуры с тиолами чреваты изменением их концентрации, так как использование специальных реагентов для определения концентраций свободных тиольных групп осуществляется в тех же условиях, что и превращения исходных соединений.

#### **3.3.4. Оценка окислительной способности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении пептидов из активного центра протеиндисульфидизомеразы**

Учитывая полученные в п. 3.3.3 результаты, далее изучили окислительную способность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении цистеинсодержащих пептидов APWC<sub>53</sub>GHC<sub>56</sub>KA и APWC<sub>397</sub>GHC<sub>400</sub>KQ из активных центров ПДИ. Степень окисления пептидов натриевой солью 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата оценивали по соотношению окисленной и восстановленной форм пептидов (с замкнутыми и свободными дисульфидными группами) методом масс-спектрометрии. Содержание восстановленной формы пептида в суммарной интенсивности спектра каждого пептида представлено в таблице 3.9. Полученные данные свидетельствуют о том, что натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата ускоряет окисление цистеинов в образующих активные центры ПДИ пептиде APWCGHCKA в 2 раза и пептиде APWCGHCKQ в 5 раз. Кроме того, провели анализ окислительной способности натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата в отношении пептидов активного центра ПДИ (рисунок 3.28).

Таблица 3.9 – Содержание восстановленной формы пептидов APWCGHCKA и APWCGHCKQ из активного центра ПДИ по действием натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата.

Время, мин	APWCGHCKA					APWCGHCKQ				
	0	7.5	15	30	110	0	7.5	15	30	110
Контроль, %	93,2	89,4	91,2	89,0	72,5	93,7	93,0	89,6	92,4	83,3
Натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, %	93,2	80,7	83,4	83,2	55,7	93,7	84,6	75,3	86,1	49,4

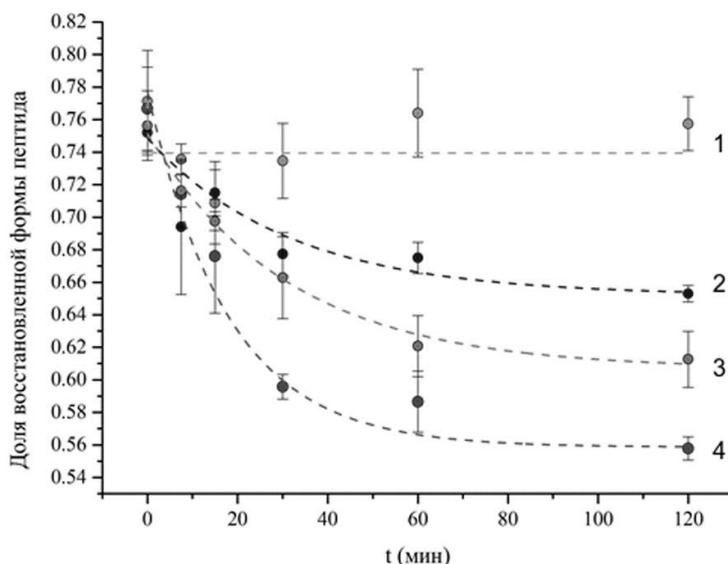


Рисунок 3.28 – Окислительная способность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении пептида APWCGHCKA из активного центра ПДИ

Показано изменение содержания восстановленной формы пептида в зависимости от времени инкубации с 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинами. 1 – H<sub>2</sub>O, 2 – контрольный раствор NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 3 – натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, 4 – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она (3), тригидрата.

Характерное время окисления цистеинов пептида APWCGHCKA под действием натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата было примерное в два раза больше, чем в случае натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата. При этом на окисление цистеинов пептида APWCGHCKQ натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата влияния не оказала.

Таким образом, продемонстрировали, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины способны стимулировать окисление цистеинов в пептидной модели ферментативных центров ПДИ, и их окислительная способность отличается в зависимости от структуры самих соединений. Такая активность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов может приводить к нарушению ферментативной активности клеточной ПДИ, которая играет роль шаперона, поддерживающего стабильную пространственную конформацию вирусных белков.

### **3.3.5. Молекулярный докинг 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с протеиндисульфидизомеразой**

Для выяснения потенциального механизма влияния 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов на ферментативную активность ПДИ была использована процедура докинга с применением программы ICM-Pro, проведенная к.х.н. В.Б. Цветковым. Докирование проводилось на поверхность ПДИ в области двух активных центров  $C_{53}GHC_{56}$  и  $C_{397}GHC_{400}$ . По результатам докинга отобрали комплексы с наилучшей энергией связывания для последующего анализа геометрии расположения лигандов на поверхности мишени и оценки величины отдельных вкладов в энергию связывания. Геометрия расположения лучших по энергии связывания конформаций и аминокислотных остатков, локализованных на расстоянии 3 Å от них, для активных центров ПДИ представлены на рисунках 3.29 и 3.31. Данные по оценке энергии связывания и величин отдельных вкладов в

неё представлены в таблицах 3.10 и 3.11. Наибольшее сродство к мишени в области активного центра  $C_{53}GHC_{56}$  проявляют натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат и натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат.

Таблица 3.10 – Значения энергии связывания (ккал/моль) 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с ПДИ в области активного центра  $C_{53}GHC_{56}$  и вкладов, её формирующих, для лучших по энергии связывания конформаций, полученных в результате докинга в программе ICM-Pro

Соединение	$\Delta G_{bind}$	$\Delta G_{eq}$	$\Delta G_{solv}$	$\Delta G_{VdW}$	$\Delta G_{hbond}$	$\Delta U$	$-\Delta TS$
натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат	-11,69	-23,11	29,48	-7,67	-13,24	0,07	2,78
натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат	-14,94	-22,64	22,59	-4,95	-13,33	0,07	3,32
натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат	-5,74	-10,6	15,77	-8,68	-4,07	0	1,84

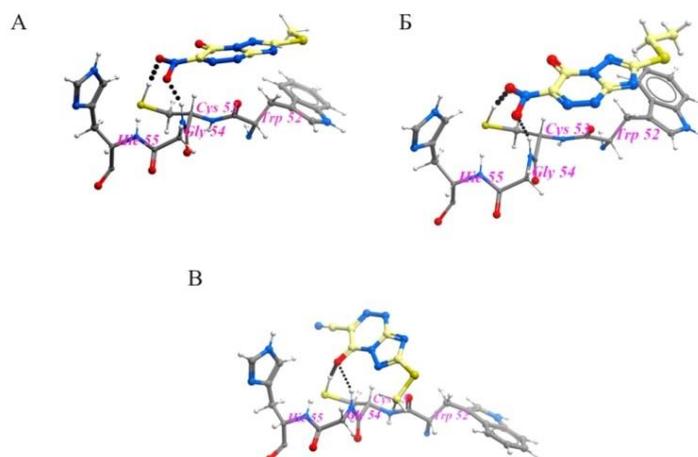


Рисунок 3.29 – Локализация аминокислотных остатков, расположенных на расстоянии 3 Å от лучших по энергии конформаций, полученных с помощью процедуры докинга в область активного центра ПДИ C<sub>53</sub>GHC<sub>56</sub> с использованием программы ICM-Pro

*А – натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, Б – натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, В – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат. Раскраска атомов: углерод в лигандах – жёлтый, в аминокислотных остатках – серый; кислород – красный, азот – синий, водород – белый. Пунктирными чёрными линиями отмечены водородные связи.*

Практически у всех лигандов электростатический вклад превышает Ван-дер-Ваальсово взаимодействие, что говорит о том, что основной вклад при взаимодействии с мишенью вносят полярные нитро- и цианогруппы. У лигандов, содержащих нитрогруппу, кулоновский вклад в разы больше Ван-дер-Ваальсового взаимодействия по сравнению с лигандом, содержащим цианогруппу. Данное обстоятельство может объяснить анализ распределения электронной плотности в этих группах, который указывает на то, что отрицательный заряд в нитрогруппе распределен по двум атомам кислорода, а в цианогруппе сосредоточен только на одном азоте. Вследствие этого область распределения отрицательного заряда в нитрогруппе существенно больше, что

увеличивает вероятность взаимодействия с аминокислотами, несущими положительный заряд.

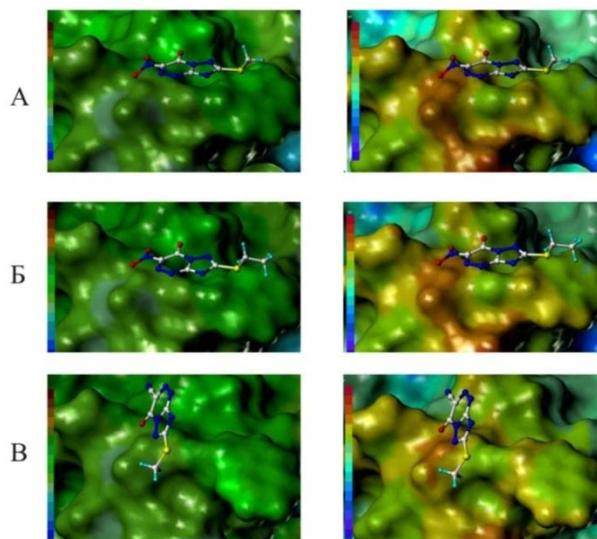


Рисунок 3.30 – Распределение гидрофобного (слева) и электростатического (справа) потенциала в районе локализации лучшей по энергии конформации на поверхности ПДИ в области активного центра  $C_{53}GHC_{56}$

*А – натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, Б – натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, В – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат. Частичные заряды на атомах посчитаны с помощью метода Гайстагера-Хюккеля. Слева на каждом рисунке дана шкала: у гидрофобного потенциала цвет меняется от минимального – синего, до максимального – тёмно-коричневого, у электростатического цвет меняется от отрицательного заряда – синего, к положительному – красному.*

Из данных таблицы 3.10 также видно, что вклад водородных связей в энергию связывания для натриевой соли 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата и натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата значительно больше, чем для натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата. Данное обстоятельство обусловлено тем, что замена нитрогруппы на

цианогруппу приводит к потере двух акцепторов водородной связи и, как указывалось выше, к уменьшению области отрицательного заряда, что, конечно, тоже уменьшило силу водородной связи. Превышение кулоновского вклада над Ван-дер-Ваальсовым при связывании с ПДИ в области активного центра  $C_{53}GHC_{56}$  объясняется геометрией расположения как самих лигандов на поверхности мишени (рисунок 3.29), так и характером распределений гидрофобного и электростатического потенциала на ней (рисунок 3.30). Полученные результаты указывают на то, что кулоновское взаимодействие при формировании комплекса в районе активного центра формируется в основном за счёт взаимодействия с положительно заряженными боковой группой  $H_{55}$ , водородами полярных групп N-N остова, формируемого остатками  $H_{55}$ ,  $C_{53}$ ,  $G_{54}$ , и SH-группой, входящей в  $C_{53}$ . NH- и SH-группы выступают как доноры водородной связи. Как видно из представленных на рисунке 3.29 данных, взаимодействие с активным центром ПДИ формируется в основном за счёт  $W_{52}$ ,  $C_{53}$ ,  $G_{54}$  и  $H_{55}$ .

Таблица 3.11 – Значения энергии связывания (ккал/моль) азоло-азинов с ПДИ в области активного центра, содержащего Cys397 и Cys400, и вкладов, её формирующих, для лучших по энергии связывания конформаций, полученных в результате докинга в программе ICM-Pro

Соединение	$\Delta G_{bind}$	$\Delta G_{eq}$	$\Delta G_{solv}$	$\Delta G_{VdW}$	$\Delta G_{hbond}$	$\Delta U$	$-\Delta TS$
TZV	-10,93	-7,65	10,34	-8,36	-7,43	0,02	2,15
УПИ-802	-9,81	-7,28	10,71	-9,43	-7,16	0,57	2,78
MNR-857	-3,84	-6,9	13,42	-8,56	-3,3	0,01	1,49
УПИ-241	-6,71	-21,77	29,61	-12,03	-4,83	0,04	2,27

Как и при взаимодействии с активным центром  $C_{53}GHC_{56}$ , в области второго активного центра  $C_{397}GHC_{400}$ . нитропроизводные 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов показывают значительную энергию связывания, только натриевая соль

2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата сильнее взаимодействует со вторым активным центром, чем натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата 2. В отличие от проанализированного ранее взаимодействия с активным центром  $C_{53}GHC_{56}$ , при связывании со вторым активным центром для большинства лигандов Ван-дер-Ваальсов вклад превышает кулоновский. Это объясняется тем, что площадь соприкосновения с поверхностью мишени в случае активного центра  $C_{397}GHC_{400}$  увеличилась (рисунок 3.31 и 3.32).

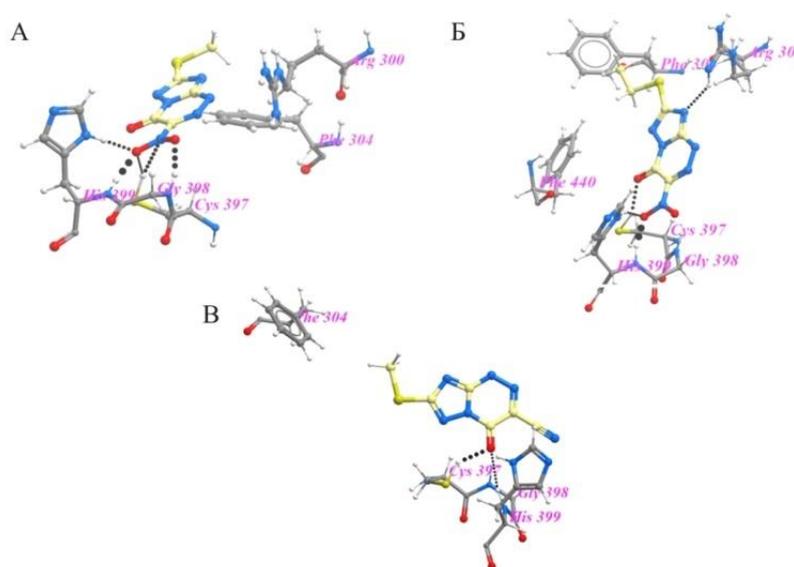


Рисунок 3.31 – Локализация аминокислотных остатков, расположенных на расстоянии 3 Å от лучших по энергии конформаций, полученных с помощью процедуры докинга в область активного центра ПДИ  $C_{397}GHC_{400}$  с использованием программы ICM-Pro

*А – натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, Б – натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, В – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат. Цветовой код: углерод в лигандах – жёлтый, в аминокислотных остатках – серый; кислород – красный, азот – синий, водород – белый. Пунктирными чёрными линиями отмечены водородные связи.*

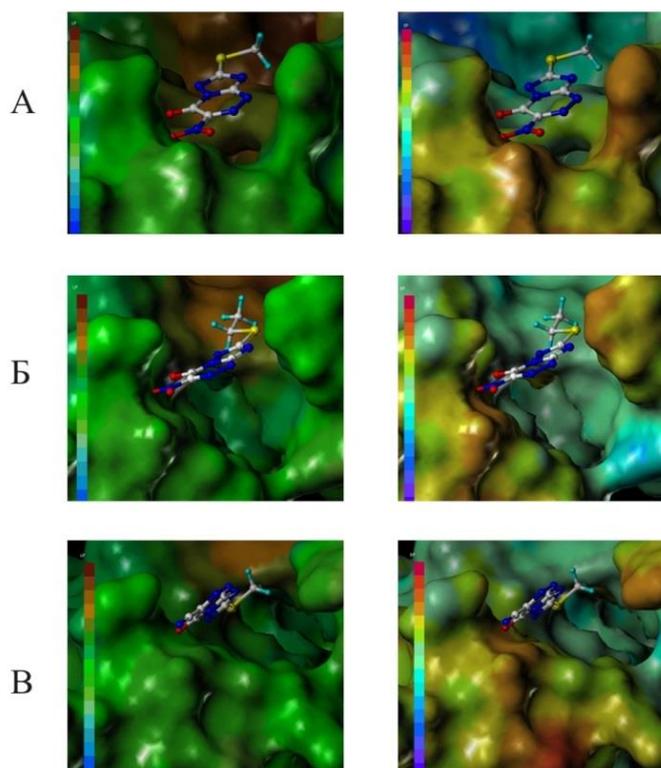


Рисунок 3.32 – Распределение гидрофобного (слева) и электростатического (справа) потенциала в районе локализации лучшей по энергии конформации на поверхности ПДИ в области активного центра  $C_{397}GHC_{400}$ .

*А – натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, Б – натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, В – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат. Частичные заряды на атомах посчитаны с помощью метода Гайстагера-Хюккеля. Слева на каждом рисунке дана шкала: у гидрофобного потенциала цвет меняется от минимального – синего, до максимального – тёмно-коричневого, у электростатического цвет меняется от отрицательного заряда – синего, к положительному – красному.*

Вклад водородных связей в энергию связывания, как и в случае взаимодействия с активным центром  $C_{53}GHC_{56}$  у лигандов натриевой соли 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата и натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата

значительно выше, чем у остальных по причинам, описанным ранее. Анализ полученной в результате докинга геометрии локализации лигандов, приведённой на рисунке 3.31, показывает, что основной вклад во взаимодействие с лигандами вносят  $R_{300}$ ,  $F_{304}$ ,  $C_{397}$ ,  $G_{398}$  и  $H_{399}$ . Донорами водородных связей выступают полярные группы  $R_{300}$ ,  $C_{397}$ ,  $G_{398}$  и  $H_{399}$ .

Тот факт, что натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат и натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, взаимодействуя с ПДИ в области активных центров  $C_{53}GHC_{56}$  и  $C_{397}GHC_{400}$ , оказываются в непосредственной близости от цистеинов, позволяет предположить участие этих соединений в окислении последних с образованием дисульфидной связи, что позволяет предположить их влияние на ферментативную активность ПДИ.

### **3.3.6. Ингибирование ферментативной активности протеиндисульфидизомеразы соединениями ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов**

Далее провели экспериментальную оценку способности триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов ингибировать ферментативную активность ПДИ. В работе помимо исследуемых соединений триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов использовали циклический пептид CYIQNC, являющийся фрагментом гормона окситоцина, содержащим замкнутые дисульфидные связи.

Оценку влияния соединений на ферментативную активность ПДИ проводили *in vitro* с использованием набора «PDI Inhibitor Screening Assay Kit» («Abcam»). Набор основан на катализируемом ПДИ восстановлении инсулина в присутствии дитиотреитола (ДТТ), приводящим к образованию инсулиновых агрегатов, которые связываются с флуорогенным реагентом «PDI Detection Reagent». В качестве ингибитора ПДИ в наборе используется бацитрацин (BAC). Анализ влияния препаратов на ферментативную активность ПДИ проводили в полном соответствии с инструкцией производителя. В присутствии ингибиторов

ПДИ не образуется способного к связыванию с флуоресцентным красителем продукта действия ПДИ (агрегатов инсулина). Общая схема анализа приведена на рисунке 3.33.

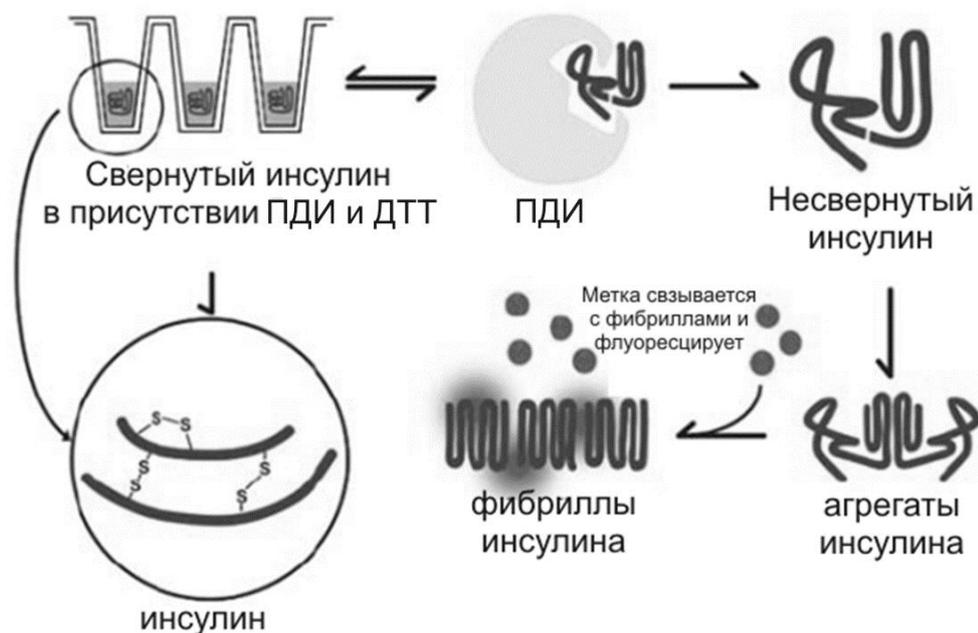


Рисунок 3.33 – Схема проведения анализа ингибирования ПДИ с помощью набора «PDI Inhibitor Screening Assay Kit» (Abcam)

В эксперименте использовали препараты в диапазоне концентраций 0-100 мМ. При этом, если ингибирование происходит, то достоверно оно выявляется в молярной концентрации от нескольких мМ ингибирующего вещества и выше. Для каждого соединения использовали по 8 точек разной концентрации. Точки в каждой концентрации каждого проверяемого соединения брали в трёх повторах в рамках одного эксперимента в одной плашке. Результаты анализа ингибирующей активности соединений представлены на рисунке 3.34.

Показали, что все исследуемые производные триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов обладают способностью ингибировать ферментативную активность ПДИ *in vitro*. Наибольшей ингибирующей активностью обладают натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат и натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она,

дигидрат. В концентрациях 3,7 мМ они ингибируют активность ПДИ примерно на 30 и 20%, соответственно. При 100 мМ концентрациях этих соединений ферментативная активность ПДИ практически отсутствует и составляет менее 10 % от исходной.

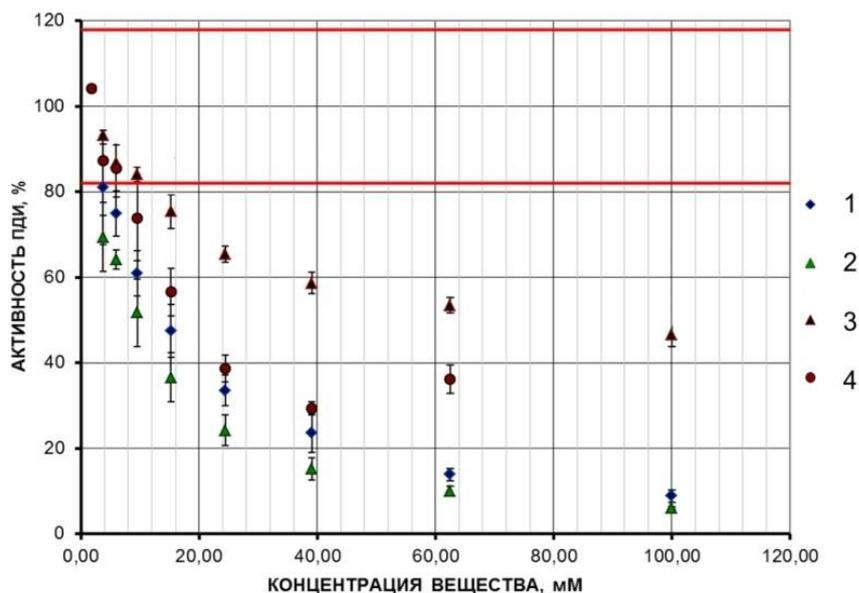


Рисунок 3.34 – Оценка влияния триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов на ферментативную активность ПДИ

По оси абсцисс – концентрации веществ в пробе, по оси ординат – активность ПДИ, определяемая флуоресценцией реагента, детектирующего активность ПДИ. Красными линиями ограничен диапазон колебаний величины флуоресценции, соответствующей активности ПДИ в отсутствие ингибитора. 1 – натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, 2 – натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, 3 – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат. 4 – циклический пептид *SYIQNC*.

Натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат обладает наименьшей ингибирующей активностью. Для этого соединения показано, что значимая ингибирующая активность наблюдается при концентрациях более 10 мМ. При 100 мМ концентрации натриевая соль 2-

метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат ингибирует около 50 % от изначальной активности ПДИ. Для пептида CYIQNC также установили ингибирующую активность. В частности, при концентрациях до 40 мМ пептид CYIQNC ингибировал активность ПДИ на уровне, сопоставимом с натриевой солью 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата и натриевой солью 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, однако при больших концентрациях его ингибирующая активность снижалась.

Таким образом, показали, что исследованные триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины и пептид CYIQNC способны ингибировать ферментативную активность ПДИ в примененном *in vitro* тесте. Наибольшей ингибирующей активностью обладают нитропроизводные триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в концентрациях от 3 до 100 мМ.

### **3.3.7. Анализ экспрессии протеиндисульфидизомеразы в клетках A549 под действием 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов**

По причине отсутствия возможности оценить ферментативную активность ПДИ на клеточной культуре и/или *in vivo* далее провели оценку изменения экспрессии ПДИ в клетках A549 методом ПЦР под действием 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов. Для этого использовали суточный монослой клеток A549, зараженных вирусами wtNS1 и ΔNS1. Натриевую соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата добавляли в концентрации 10 мкг/мл через 40 минут после заражения. РНК выделяли из клеток через 72 часа после заражения и определяли уровни экспрессии ПДИ методом ПЦР в режиме реального времени с нормализацией по методу ΔΔC<sub>q</sub> по гену *ACTB* (рисунок 3.35).

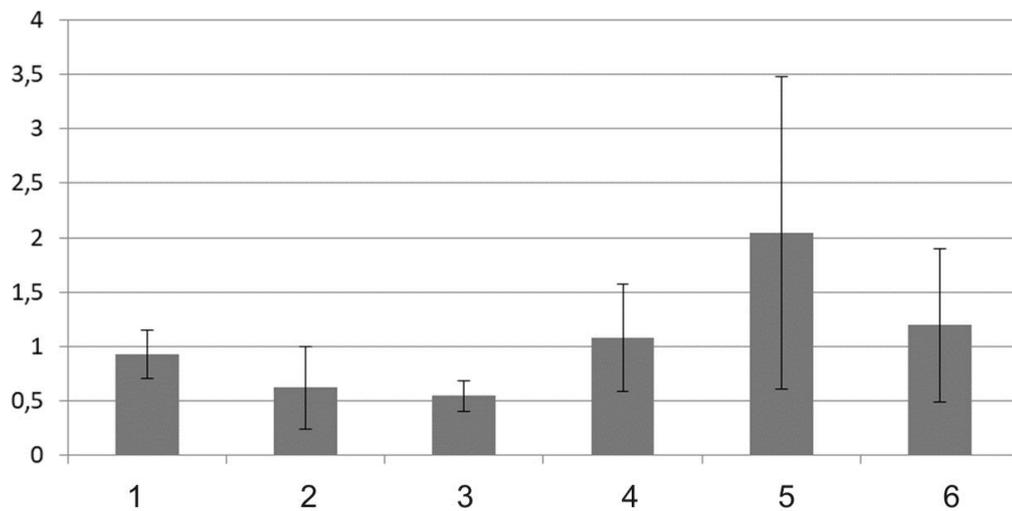


Рисунок 3.35 – Изменение уровня относительной экспрессии гена *P4HB* (*ПДИ*) в клетках A549 под действием заражения ВГА и натриевой соли 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата.

1 – натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, 2 – вирус wtNS1, 3 – вирус ΔNS1 и натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, 4 – контрольные клетки, 5 – вирус wtNS1 и натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, 6 – вирус ΔNS1. Нормализация проведена по гену *ACTB*, за единицу по оси ординат принята экспрессия в клеточном контроле.

Показали, что уровень мРНК *ПДИ* остается неизменным под воздействием натриевой соли 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата как в контрольных, так и инфицированных клетках, независимо от целостности ОРС NS1. Полученные данные позволяют предположить, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины проявляют свою активность на уровне ферментативной активности *ПДИ*, но при этом не вызывают изменения экспрессии гена *P4HB* на уровне мРНК.

### 3.3.8. Изучение специфической противовирусной активности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов *in vivo*

Ранее было показано, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины обладают противовирусной активностью в отношении ВГА *in vivo*, при этом для них показана чрезвычайно слабая активность *in vitro* [1]. По этой причине было решено апробировать 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины на противовирусную активность в отношении вирусов, в жизненном цикле которых ПДИ более важна, чем в случае ВГА. В частности, известно, что ПДИ играет ключевую роль в жизненном цикле вируса Денге, будучи локализованной на клеточной поверхности и взаимодействуя с вирусным белком NS1 [74]. В связи с этим оценили противовирусную активность натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата в отношении вируса лихорадки Денге. Работа была выполнена в ФГБУ «ГНИИИ ВМ» Минобороны России.

Моделирование смертельной инфекции лихорадки Денге проводили на белых беспородных мышях массой 8-10 г путем их подкожного заражения вирусосодержащим материалом в объеме 0,5 мл. В эксперименте использовали две заражающие дозы, которые различались на один порядок и в контрольных группах вызывали гибель 40-100 % мышей (в зависимости от использованной заражающей дозы вируса). После заражения за инфицированными животными устанавливали ежедневное наблюдение в течение 14 суток с регистрацией количества живых и павших особей. Инкубационный период при моделируемой инфекции составил 3-4 суток. Заболевание характеризовалось следующими признаками: у мышей развивалась адинамия, они отказывались от еды и питья, шерсть у них была взъерошена. В последующем развивались параличи и наступала гибель животных. Максимальная гибель инфицированных мышей отмечалась, как правило, на 6-9 сутки после инфицирования. Исследовали 3 схемы применения препарата – до, во время и после заражения.

Животных массой 8-10 г отдельно заражали вирусами Денге 4 типов, при этом использовали две заражающие дозы вируса – 5 и 50 ЛД<sub>50</sub>. В каждой группе было по 10 особей. Контрольным животным перорально вводили физиологический раствор хлорида натрия. За инфицированными животными устанавливали ежедневное динамическое наблюдение в течение 21 суток, оценивая количество живых и павших особей. При профилактическом за 24 часа до заражения и однократном одновременно с заражением применениях субстанции препарата натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата в дозе 62,1 мг/кг, которая была отработана в качестве эффективной в предварительных исследованиях, препарат оказался неэффективным. Многократное пероральное введение препарата экспериментальным животным через 4, 24 и 48 часов после заражения способствовало повышению устойчивости экспериментальных животных к вирусу Денге (таблица 3.12). При инфицировании животных вирусом в дозе 5 ЛД<sub>50</sub> уровень защиты в зависимости от схемы использования препарата составил 70-90 %, что достоверно ( $p < 0,05$ ) превышало контрольные значения. С увеличением заражающей дозы возбудителя до 50 ЛД<sub>50</sub> эффективность препарата несколько падала, однако продолжала оставаться на уровне 50-60 %.

Представленные в таблице 3.12 данные свидетельствуют, что многократное (не менее трех раз) применение субстанции натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата после заражения в отношении инфекции, вызванной вирусом Денге, является предпочтительным в плане формирования надлежащего уровня защиты, однако только в случае использования низких (не более 7 ЛД<sub>50</sub>) заражающих доз каждого из типов вируса Денге.

При этом вне зависимости от кратности использования препарата уровень защиты достоверно (на 60-80%) превышает контрольные значения ( $p < 0,05$ ). С увеличением кратности использования субстанции натриевой соли 2-метилтио-6-

циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата определенная тенденция в плане повышения невосприимчивости организма к данной инфекции имеет место и на более высоких заражающих дозах патогена.

Таблица 3.12 – Защитная эффективность натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата при трехкратном (через 4, 24 и 48 часов) применении после заражения вирусами Денге 1-4 типов

Группы	Доза на мышь, мг/кг	Вирус Денге, тип	Заражающая доза, ЛД <sub>50</sub>	п в группе	Выживаемость, %, Р±σр.	Защита, %, Р±σр	СГПЖ, сут,
препарат	62,1	1	50	10	10(0-44)	10(0-44)	9,2
			5	10	60(26-83)	60(26-83)*	16,4
		2	50	10	10(0-44)	10(0-44)	9,4
			5	10	70(35-93)	70(35-93)*	18,6
		3	50	10	0(0-31)	0(0-1)	9,2
			5	10	60(26-83)	60(26-83)*	16,6
		4	50	10	0(0-31)	0(0-31)	8,9
			5	10	70(35-93)	70(35-93)*	18,9
Контроль заражения	-	-	50	10	0(0-31)	-	8,7
			5	10	0(0-31)	-	10,4

\* - различия с контролем достоверны при  $p < 0,05$ . СГПЖ – средняя групповая продолжительность жизни

Таким образом, на примере вируса Денге продемонстрировали, что применение 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов может оказывать противовирусный эффект *in vivo*. Можно предположить наличие связи между окислительной способностью 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении ПДИ, ролью ПДИ в жизненном цикле вируса и наблюдаемой противовирусной

активностью. Вместе с тем, оценка противовирусной активности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении разных групп вирусов требует дальнейшего подробного изучения.

### **Заключение по разделу 3.3.**

ПДИ является перспективной мишенью для лекарственных препаратов, в том числе противовирусных. В разделе 3.3 работы показали, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины обладают способностью взаимодействовать с цистеинами в белках и способны вызывать их окисление, приводящее к образованию дисульфидных связей. При этом на модельных цистеин-содержащих пептидах, в том числе из активных центров ПДИ, показано, что окислительная способность разных производных 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов отличается. Используя данные молекулярного докинга 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с активными центрами ПДИ, а также результаты экспериментов по оценке их ингибирующей активности в отношении ПДИ *in vitro*, выявили, что они согласуются с полученными данными по окислительной способности. Способность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов влиять на активные центры ПДИ позволяет предположить наличие у этих соединений широкого спектра противовирусной активности, который будет зависеть от роли ПДИ в жизненном цикле того или иного вируса. Полученные *in vivo* данные в отношении вируса Денге согласуются с данным предположением.

### **3.4. Применение технологии олигонуклеотидных микрочипов для диагностики гриппа**

Проведение мероприятий комплексного надзора за гриппом требует создания чувствительных, надежных, высокопроизводительных и быстрых методов определения и субтипирования ВГА, а также оценки тяжести заболевания. Одной из таких технологий является метод биологических

микрочипов, который в начале 2000-х годов рассматривался как наиболее перспективный подход к высокопроизводительной мультиплексной диагностике [359]. Помимо возможности выявления и субтипирования самого ВГА микрочип в рамках одного анализа позволяет проводить оценку уровня экспрессии мРНК клеточных белков, в частности, цитокинов, баланс которых является одним из важнейших факторов, определяющих протекание вирусной инфекции [301, 318]. Анализ экспрессии цитокинов абсолютно необходим для понимания механизмов иммунного ответа (в том числе, штамм-специфического) при гриппе. При этом решающая роль в развитии иммунопатологии при гриппе, вероятно, принадлежит иммунному ответу, имеющему место в тканях, а не тем цитокинам, уровень которых обычно измеряют в периферической крови [301]. Мы разработали и апробировали в лабораторных условиях тест-систему «IAVchip» на основе олигонуклеотидного микрочипа, позволяющую детектировать и проводить субтипирование ВГА человека и животных [178, 316, 347, 349]. С целью оценки присутствия мРНК цитокинов в клетках мы разработали олигонуклеотидный микрочип [8] и метод количественной мультиплексной ПЦР в режиме реального времени [7, 259]. Для последнего была проведена одобренная Минздравом России клиническая апробация.

### **3.4.1. Разработка универсальной методики выявления и субтипирования вируса гриппа типа А человека и животных на основе олигонуклеотидных микрочипов**

#### **3.4.1.1. Подбор олигонуклеотидных зондов для типирования и субтипирования вируса гриппа типа А**

ВГА классифицируют на подтипы на основе антигенных отличий HA и NA. Типирование вирусов гриппа проводят в процессе сравнительного анализа более консервативных белков, например, NP или M2. С появлением молекулярно-генетических методов анализа (секвенирования и ОТ-ПЦР) гены, кодирующие

вышеприведенные белки, стали также использоваться для типирования и субтипирования ВГА [385]. По этой причине при подборе олигонуклеотидных зондов для типирования ВГА в качестве мишеней использовали геномные сегменты, кодирующие белки М2 и NP, для субтипирования – HA и NA. На первом этапе в программе MAFFT [171] провели выравнивания последовательностей мРНК NP, М2, HA 16-ти подтипов и NA 9-ти подтипов. Выполненный в программе Jalview [368] анализ показал, что внутри подтипов не для всех последовательностей мРНК HA и NA существуют высоко консервативные (99-100% идентичности) области длиной 40-60 н., которые можно было бы использовать в качестве универсальных мишеней для субтипирования ВГА. По этой причине последовательности мРНК каждого из подтипов HA и NA методом связывания ближайших соседей разбили на кластеры, внутри которых стало возможным выявить идентичные области необходимой длины. Далее для последовательностей из каждого кластера в программе OligoWiz 2.1 подобрали высокоспецифические олигонуклеотидные зонды (Приложение 2). Для исключения неспецифической гибридизации в программе BLAST подтвердили отсутствие высокоомологичных последовательностей среди других генов.

Синтезированные и очищенные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии олигонуклеотидные зонды иммобилизовали в соответствии с приведенной на рисунке 3.36 схемой на альдегидные стекла Vantage Aldehyde Slides в 3×SSC буфере в концентрации 300 нг/мкл методом контактной печати на споттере SpotBot 3 (ArrayIt, США). После печати слайды оставляли на 1 час при комнатной температуре, затем облучали ультрафиолетом при 0,09 Дж/см<sup>2</sup>. Готовые олигонуклеотидные микрочипы хранили в пластиковых боксах при +4°С. В этих условиях чип сохраняет активность не менее полугода.

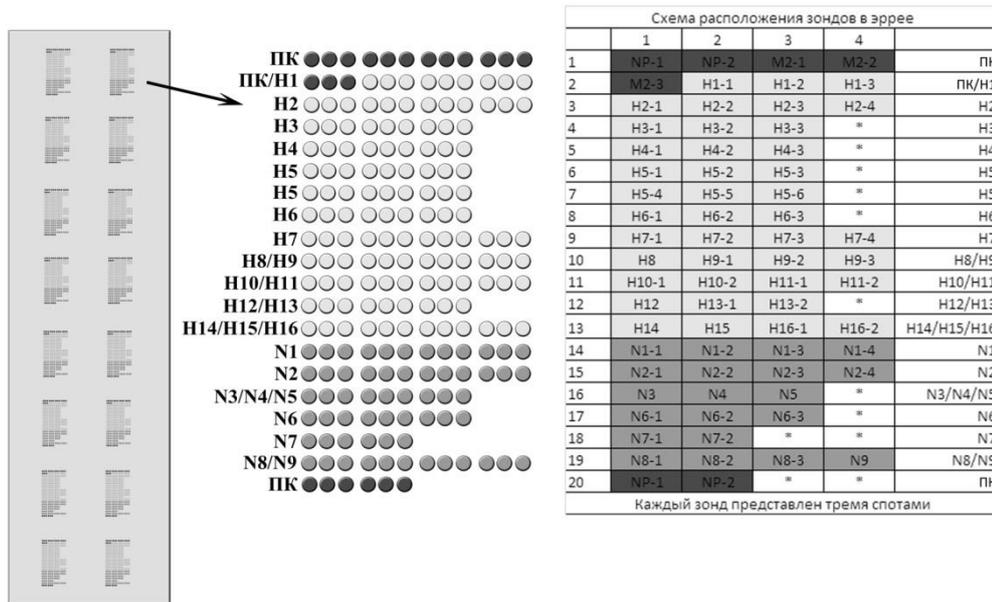


Рисунок 3.36 – Схема модельного биочипа «IAVchip» для субтипирования ВГА

*H* — гемагглютинин, *N* — нейраминидаза, *ПК* — положительный контроль.  
Диаметр спота – 200 нм.

### 3.4.1.2. Разработка метода флуоресцентного мечения вирусной РНК для гибридизации на микрочипе

Большинство известных способов получения флуоресцентно меченых молекул РНК или ДНК, содержащихся в используемой для гибридизации с микрочипом пробе, основано на стандартных методах молекулярной биологии и различных химических реакциях (рисунок 3.37). Существует два подхода к мечению исследуемых проб. В первом случае в процессе получения кДНК-копий исследуемой РНК методом обратной транскрипции напрямую встраивают флуоресцентно меченый дезоксинуклеотидтрифосфат (рисунок 3.37А). При непрямом мечении в кДНК сначала встраивают реактивную группу (обычно первичный амин), после чего отдельной реакцией через нее конъюгируют флуоресцентную метку. При недостаточном количестве исследуемой РНК в образце дополнительно используют процедуру амплификации. При этом следует учитывать тот факт, что относительное содержание нуклеиновых кислот в пробах

должно оставаться неизменным. Выбор типа амплификации для получения меченого продукта определяется также типом нанесенного на чип зонда. В случае, если на биочипе иммобилизована (-)-РНК, для гибридизации необходимо получить меченую (+)-РНК. Для усиления сигнала используют ПЦР амплификацию кДНК, полученной из исходной РНК (рисунок 3.37Б), или же *in vitro* транскрипцию для получения большего количества РНК из исходной РНК-пробы в процессе гибридизации с Т7 или Т3 промоторами с последующим синтезом РНК соответствующей полимеразой (рисунок 3.37В). Существует также метод непосредственного мечения молекул РНК, который заключается в процессе ковалентного присоединения флуорофора к остаткам гуанина (рисунок 3.37Г).

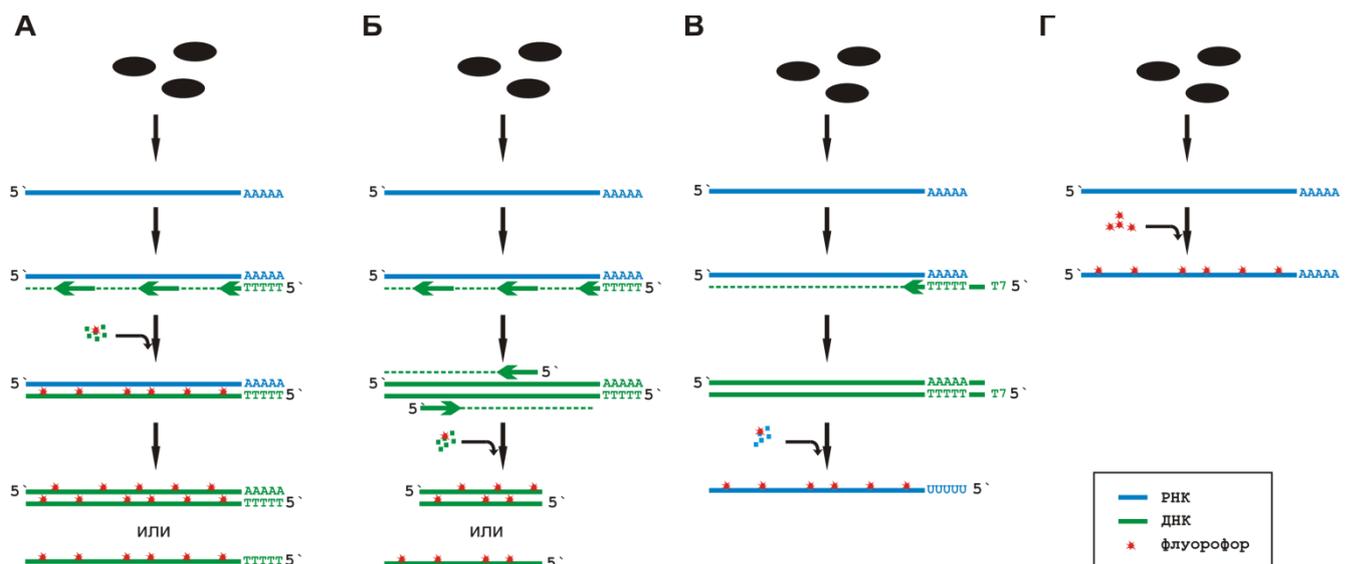


Рисунок 3.37 – Различные варианты флуоресцентного мечения РНК

*А* – обратная транскрипция. *Б* – обратная транскрипция, совмещенная с полимеразной цепной реакцией. *В* – *in vitro* транскрипция. *Г* – прямое флуоресцентное мечение.

Наиболее часто флуоресцентное мечение РНК-проб ВГА основано на использовании ферментов, осуществляющих синтез кДНК на матрице исходных вРНК или мРНК. Комбинирование двух или нескольких ферментативных

реакций, как в случае одностадийной ОТ-ПЦР, позволяет существенно расширить применимость метода получения флуоресцентной пробы. Следует учитывать, что при использовании нескольких ферментов, в частности, при проведении ПЦР со специфическими праймерами, достаточно сложно проводить количественную оценку реакции. Избежать стадии амплификации не представляется возможным, так как в случае диагностического микрочипа необходимо детектировать даже чрезвычайно малые количества молекул вирусных РНК.

Общим недостатком большинства предложенных ранее подходов для субтипирования ВГА с помощью биологических микрочипов является использование специфических для каждого геномного сегмента пар праймеров, что заметно усложняет процедуру подготовки пробы. Для решения этой проблемы при подготовке флуоресцентно меченых вирусных кДНК мы использовали амплификацию геномных РНК-сегментов с помощью универсальных для всех подтипов ВГА праймеров. На данный способ был получен патент RU2480525 «Способ флуоресцентного мечения кДНК вируса гриппа типа А». Известно, что 3'- и 5'-концевые последовательности всех восьми сегментов геномной РНК ВГА образуют высоко гомологичные неидеальные инвертированные повторы [129]. Использование универсальных праймеров, комплементарных этим участкам, обеспечивает амплификацию всех геномных сегментов ВГА в одной реакции (рисунок 3.38). Праймеры получили название MBTuni и имеют следующие последовательности: MBTuni-12 — 5'-ACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG-3' и MBTuni-13 — 5'-ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG-3'. Эти праймеры были подобраны и применены для мультисегментной [390] и полноразмерной амплификации каждого сегмента [147]. Было также показано, что с помощью праймеров MBTuni можно амплифицировать сегменты различных подтипов ВГА, выделенных из разных организмов (свиньи, птицы, лошади) [390].

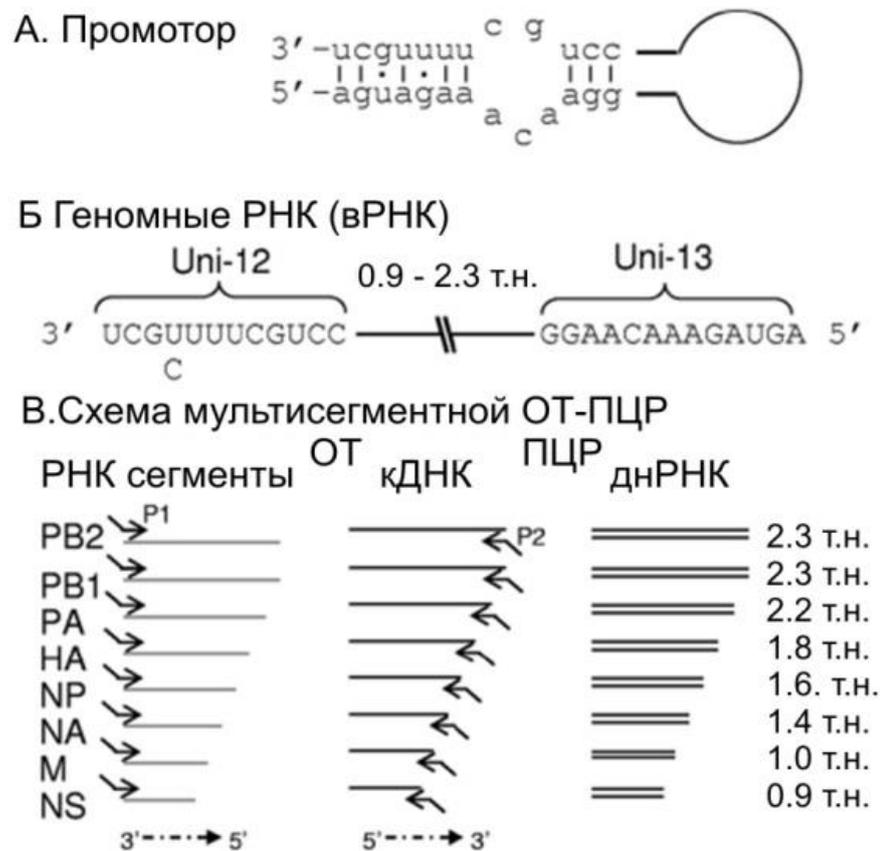


Рисунок 3.38 – Структура консервативных концевых участков геномных сегментов ВГА

*А* — спаривание частично комплементарных концов геномных (–)-РНК с образованием структуры «сковорода с ручкой», выступающей в качестве промотора транскрипции вирусных мРНК. *Б* — консервативные последовательности (Uni-12 и Uni-13) концевых участков геномных сегментов РНК ВГА. *В* — схема комплементарного спаривания прямого и обратного МВТuni праймеров с геномными сегментами ВГА, указаны длины получаемых ампликонов.

Условия проведения одностадийной мультисегментной ОТ-ПЦР (М-ОТ-ПЦР) с универсальными МВТuni праймерами, описанные в работе [390], экспериментально адаптировали к введению в реакцию флуоресцентно меченых дезоксинуклеотидтрифосфатов. Амплификацию проводили с применением набора SuperScript III One-Step Quantitative RT-PCR System («Invitrogen», США). Для проверки реакции амплификации использовали штаммы ВГА трех подтипов:

*A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1)* (6:2 реассортант на основе *A/PR/8/34 (H1N1)*), *A/Moscow/10/99(H3N2)* и *A/New Caledonia/10/99(H1N1)*, накопленные на клетках MDCK (рисунок 3.39). Введение в реакционную смесь флуоресцентно меченого дезоксинуклеотидтрифосфата Cy5-dCTP сильно изменяет стандартные условия проведения реакции, поэтому на основании анализа продуктов амплификации мы подобрали его оптимальную концентрацию (20 мкМ) и температурный режим проведения реакции. Прямое встраивание Cy5-dCTP проводили непосредственно в процессе ОТ-ПЦР.

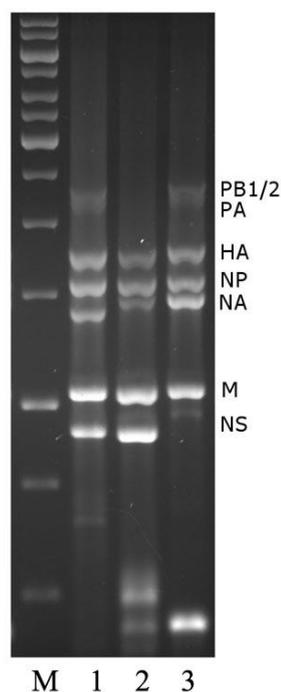


Рисунок 3.39 – Электрофоретическое разделение М-ОТ-ПЦР продуктов, полученных с помощью универсальных MBTuni праймеров к концевым участкам геномных сегментов вирусов гриппа А

1 – *A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)*, 2 – *A/Moscow/10/99 (H3N2)*, 3 – *A/New Caledonia/10/99 (H1N1)*. М — маркер длин фрагментов ДНК (250-5000 п.н.)

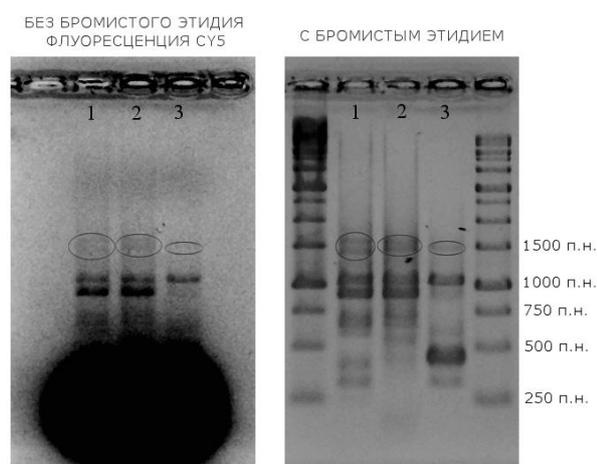


Рисунок 3.40 – Электрофоретическое разделение флуоресцентно меченых М-ОТ-ПЦР продуктов, полученных с помощью универсальных MBTuni праймеров к концевым участкам геномных сегментов вируса гриппа А.

Слева – детекция флуоресценции на KODAK Image station 2000R в отсутствие бромистого этидия. Справа – окрашивание бромистым этидием. 1 – *A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)*, 2 – *A/duck/Singapore/2/97 (H5N3)* 3 – *A/New Caledonia/10/99(H1N1)*. Крайние дорожки – маркер длин фрагментов ДНК (250-5000 п.н).

Эффективность встраивания Cy5-dСТР в процессе амплификации проверяли методом электрофоретического разделения в 1 % агарозном геле без бромистого этидия. Детекцию флуоресцентно меченых продуктов осуществляли на KODAK Image station 2000R с использованием фильтра для Cy5 CWL670NM («Rochester», США). Интенсивность флуоресценции была пропорциональна содержанию Cy5-dСТР в кДНК ВГА. Данные, представленные на рисунке 3.40, показывают, что лучше всего видны М-ОТ-ПЦР продукты генов *NS* и *M*. Продукты, соответствующие генам *HA* и *NA*, видны значительно хуже. В нижней половине геля наблюдается избыток невстроившихся флуоресцентно меченых нуклеотидов в виде тёмного пятна, что затрудняет анализ ПЦР-продуктов. Анализ этого же геля после окрашивания бромистым этидием показал наличие

соответствующих зон во всех анализируемых пробах. Вместе с тем, как будет показано далее, неравномерность амплификации геномных сегментов ВГА не оказывает значимого влияния на процесс гибридизации флуоресцентно меченых кДНК с микрочипом.

### 3.4.1.3. Проверка специфичности олигонуклеотидного микрочипа

Для оценки специфичности тест-системы «IAVchip» использовали 14 изолятов ВГА, предоставленных Лабораторией эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России: шесть полностью охарактеризованных штаммов ВГА: (1) A/Victoria/3/75 (H3N2), (2) A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1), (3) A/Brisbane/59 (H1N1), (4) A/swine/1976/31 (H1N1), (5) A/Brisbane/10/07 (H3N2) и (6) A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>); два неохарактеризованных штамма: (7) А (H2N2) и (8) А (H1N1); четыре частично субтипированных штамма: (9) А/Н6\_51с, (10) А/Н3\_402, (11) А/Н3\_111 и (12) А/Н9\_121; два штамма неопределённого подтипа: (13) А/У\_63 и (14) А/Х.

Из 250 мкл аллантаоисной жидкости выделяли тотальную РНК, флуоресцентно меченую кДНК получали методом М-ОТ-ПЦР с MBTuni праймерами в соответствии протоколом, описанным в разделе «Материалы и методы». Результаты гибридизации полученных флуоресцентно меченых проб с микрочипом «IAVchip» (рисунок 3.41) позволили сделать вывод о специфическом связывании с зондами на биочипе. При этом достоверно значимый уровень флуоресценции наблюдали только для спотов, соответствующих специфическим подтипам ВГА. В качестве достоверных значений флуоресценции использовали медианные значения интенсивностей флуоресценции спотов за вычетом величины флуоресценции фона. Диаграммы, отражающие величины интенсивности флуоресценции зондов биочипа после гибридизации, представлены на рисунке 3.42. Каждая колонка соответствует средней интенсивности флуоресценции трех точек.

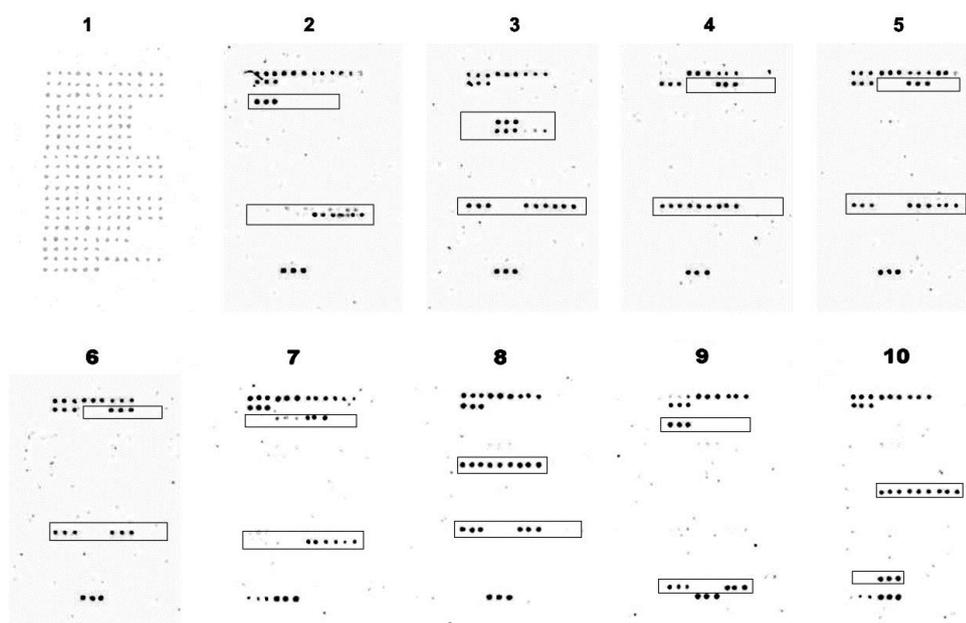


Рисунок 3.41 – Флуоресцентное сканирование биочипа «IAVchip» после гибридизации с Cy5-кДНК пробами, соответствующих штаммов ВГА

*1 – результат рассеивающего сканирования субэрея до гибридизации; 2 – A/Vic/3/75 (H3N2); 3 – A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1); 4 – A/Brisbane/59 (H1N1); 5 – A/swine/1976/31 (H1N1); 6 – A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>); 7 – неохарактеризованный штамм А (H2N2); 8, 9, 10 – частично субтипированные штаммы A/H6\_51c, A/H3\_402 и A/H9\_121. Приведено инвертированное изображение.*

Анализ полученных данных показывает, что достоверно значимый уровень флуоресценции наблюдается только для спотов, соответствующих подтипу вируса, а также спотов, предназначенных для типирования вируса гриппа в пробе пациента. Для всех остальных зондов интенсивности флуоресценции находятся на примерно одинаковом уровне и сопоставимы с погрешностью. Подтип всех исследованных штаммов определили корректно. Кроме того, в результате эксперимента провели субтипирование ранее не охарактеризованных штаммов ВГА подтипов H6N1, H3N8 и H9N7.

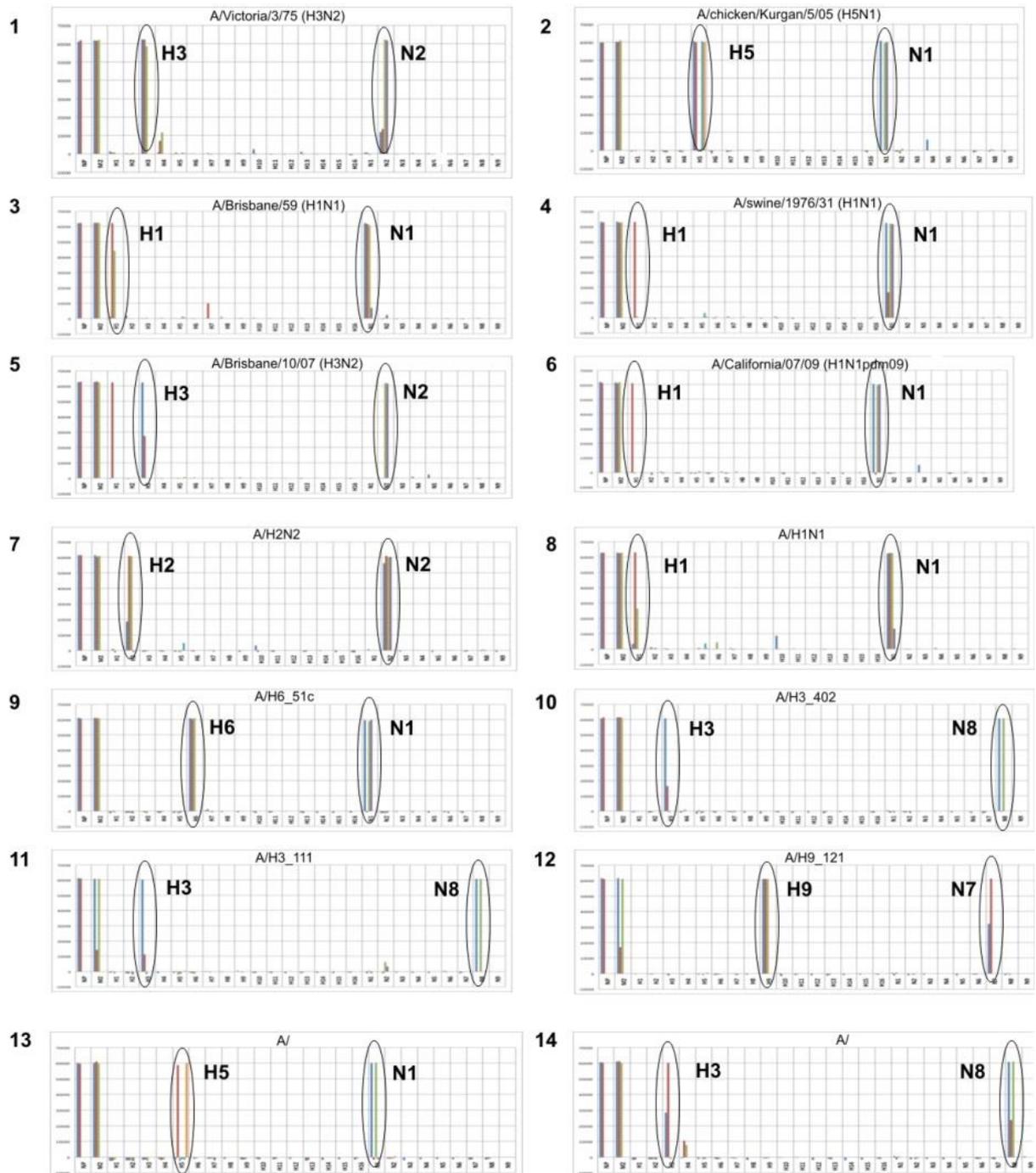


Рисунок 3.42 – Диаграммы относительных значений интенсивности флуоресценции спотов субэреев микрочипа после гибридизации с Cy5-кДНК пробами 1 – A/Victoria/3/75 (H3N2); 2 – A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1); 3 – A/Brisbane/59 (H1N1); 4 – A/swine/1976/31 (H1N1); 5 – A/Brisbane/10/07 (H3N2); 6 – A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>); 7, 8 – неохарактеризованные штаммы A (H2N2) и A/H1N1; 9, 10, 11, 12 – частично субтипированные штаммы A/H6\_51c, A/H3\_402, A/H3\_111 и A/H9\_121; 13, 14 – штаммы неопределённого подтипа A/Y\_63 и A/X. По оси X – подтипы HA и NA. По оси Y – относительная интенсивность флуоресценции.

На следующем этапе провели проверку специфичности тест-системы «IAVchip» с пробами ВГА, охарактеризованных ранее методами ОТ-ПЦР и иммуноферментного анализа в РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК. Всего отобрали 50 штаммов ВГА человека и животных, принадлежащих к 14 разным подтипам. На рисунках 3.43 и 3.44 представлены результаты анализа для выборки из 12 штаммов разных подтипов ВГА.

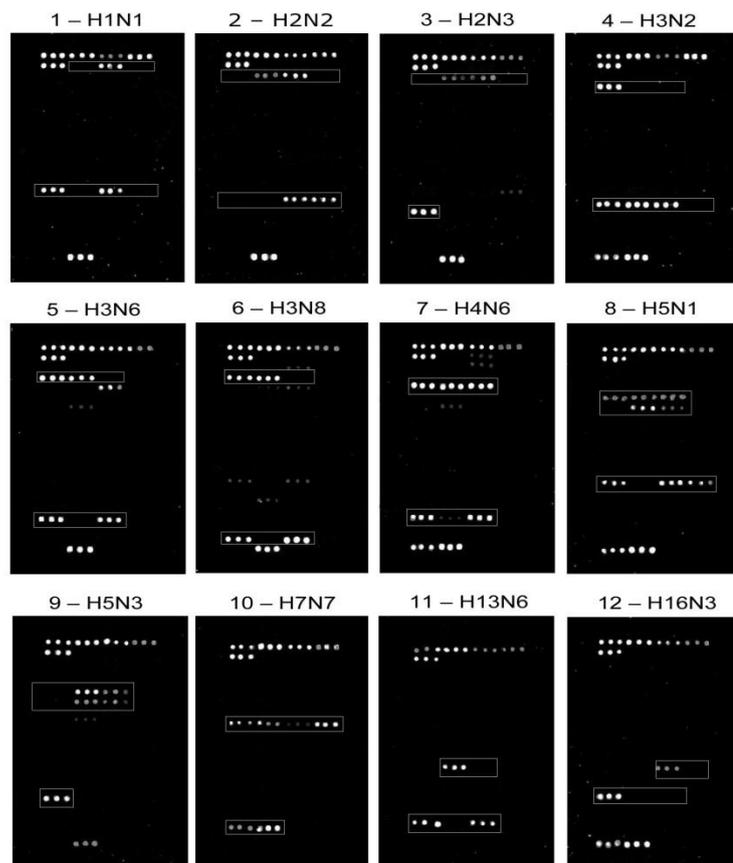


Рисунок 3.43 – Результаты сканирования микрочипов «IAVchip» после проведения гибридационного анализа флуоресцентно меченых проб, полученных из штаммов различных подтипов ВГА

1 – *A/duck/Alberta/35/76 (H1N1)*; 2 – *A/серебристая чайка/Атырау/2186/07 (H2N2)*; 3 – *A/duck/Germany/215/73 (H2N3)*; 4 – *A/Samara/68/08 (H3N2)*; 5 – *A/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04(H3N6)*; 6 – *A/лошадь/Отар/764/07(H3N8)*; 7 – *A/duck/Czechoslovakia/56(H4N6)*; 8 – *A/домашний гусь/Павлодар/1/05(H5N1)*; 9 – *A/tern/South Africa/59(H5N3)*; 10 – *A/Almaty/331/06(H7N7)*; 11 – *A/черноголовый хохотун/Атырау/284/02(H13N6)*; 12 – *A/серебристая чайка/Атырау/2216/07(H16N3)*.

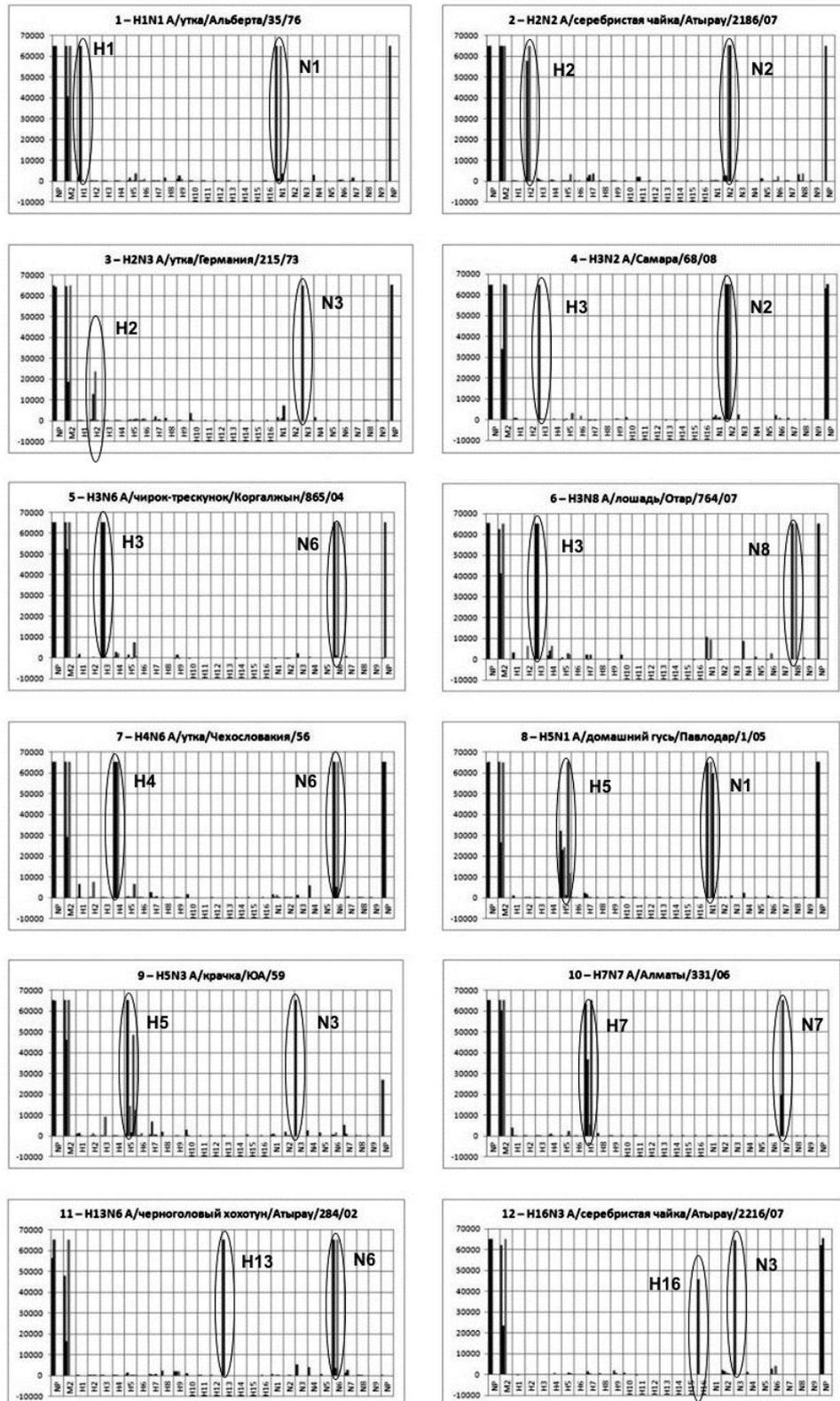


Рисунок 3.44 – Гистограммы величин интенсивностей флуоресценции зондов по результатам обсчета данных после обработки изображения флуоресценции точек (см. рисунок 3.43)

По результатам сканирования микрочипов после проведения гибридационного анализа с флуоресцентно мечеными пробами ВГА с помощью разработанной нами программы MArrAnalyzer определили величины интенсивности флуоресценции зондов и построили соответствующие гистограммы. Для большинства образцов достоверно значимый уровень флуоресценции наблюдали только для точек, соответствующих специфическим подтипам ВГА, тогда как величины интенсивности флуоресценции для всех остальных точек находились на значительно меньшем уровне или были сопоставимы с погрешностью. Из анализируемых 50 штаммов 5 определялись неоднозначно. Так, например, несмотря на то, что штамм A/duck/Germany/215/73 (H2N3) (рисунок 3.44, №3) достоверно был отнесен к НА второго подтипа, величина интенсивности флуоресценции набора зондов, характеризующих данный подтип, была значительно ниже, чем у положительных контролей. В случае более высоких значений неспецифической флуоресценции субтипирование этого штамма было бы затруднено. Кроме того, для некоторых однозначно субтипированных штаммов на фоне высокого специфического сигнала наблюдали и незначительную неспецифическую флуоресценцию. Однако более тонкий подбор условий гибридизации позволит в дальнейшем минимизировать неспецифический сигнал.

Таким образом, разработанная тест-система позволила однозначно субтипировать 59 из 64 исследованных образцов ВГА, принадлежащих 14 подтипам. Кроме того, в РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК была проведена апробация микрочипа «IAVchip» на 185 вирус-содержащих образцах человека, животных и птиц [316]. «IAVchip» показал более высокую диагностическую эффективность (99.45%) в ранней диагностике ВГА в сравнении с ПЦР в режиме реального времени (98.38%) и ОТ-ПЦР (96.22%). Диагностическая чувствительность «IAVchip» (100%) превосходила таковую у ОТ-ПЦР (95.95%) и ПЦР в режиме реального времени (97.96%) в пределах

оцененных доверительных интервалов. «IAVchip» и ПЦР в режиме реального времени показали одинаковую диагностическую специфичность (98.85%), в то время как диагностическая специфичность ОТ-ПЦР составила 96.40%. Таким образом, «IAVchip» имеет неоспоримое преимущество перед ПЦР методами в скорости диагностики и идентификации ВГА и позволяет проводить одновременную детекцию и субтипирование десятков образцов в одном эксперименте в течение 8-10 часов.

### **3.4.2. Разработка мультиплексных методов анализа экспрессии цитокинов человека, характеризующих протекание гриппозной инфекции**

#### **3.4.2.1. Олигонуклеотидный микрочип для анализа экспрессии цитокинов**

При создании микрочипа для анализа экспрессии цитокинов (рисунок 3.45) использовали методические подходы, примененные при разработке тест-системы «IAVchip» [178, 316, 347]. Все стадии разработки подробно представлены в работе [6]. Ключевое отличие между биочипами для анализа экспрессии цитокинов и субтипирования ВГА состояло в способе подготовки флуоресцентно меченой кДНК для гибридизации.

Как отмечалось ранее, большинство известных способов получения флуоресцентно меченых молекул РНК или ДНК, содержащихся в используемой для гибридизации с микрочипом пробе, основано на методе обратной транскрипции мРНК с добавлением в реакционную смесь флуоресцентно меченого дезоксинуклеотидтрифосфата. В случае малого количества мРНК в образце дополнительно применяют процедуру амплификации в процессе *in vitro* транскрипции. При этом относительное содержание нуклеиновых кислот в исследуемых пробах остается неизменным, что позволяет проводить количественный анализ исходных транскриптов. В работе использовали оба подхода к получению флуоресцентно меченой кДНК, но, к сожалению, ни один из них не позволил добиться удовлетворительного результата. В случае мечения

кДНК в процессе обратной транскрипции чувствительность метода оказалась слишком низкой, что недопустимо, так как для диагностического микрочипа необходимо детектировать даже чрезвычайно малые количества целевой мРНК цитокинов. В случае *in vitro* транскрипции не удалось подобрать оптимальные условия проведения реакций, которые позволили бы получить воспроизводимые результаты при гибридизации микрочипа с пробами.

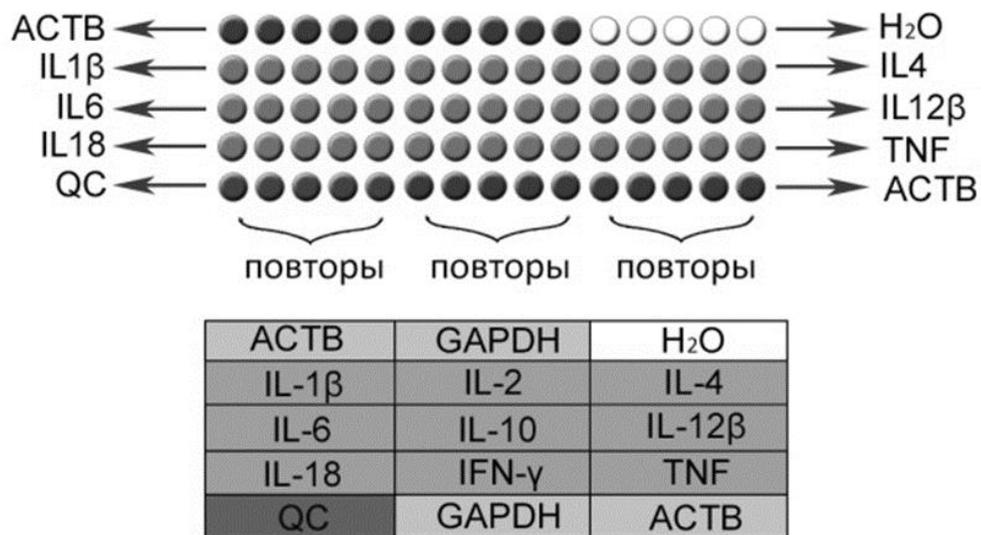


Рисунок 3.45 – Схема лабораторного образца олигонуклеотидного микрочипа для анализа уровня экспрессии мРНК цитокинов IL1β, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12β, IL18, IFNγ и TNFα человека [8]

*ACTB* и *GAPDH* – гены «домашнего хозяйства».

По этой причине остановились на качественном анализе экспрессии цитокинов с применением метода ОТ-ПЦР для флуоресцентного мечения кДНК. Помимо невозможности проведения количественного анализа общим недостатком выбранного подхода для подготовки флуоресцентно меченых кДНК является использование специфических для каждого гена пар праймеров, что заметно усложняет процедуру подготовки пробы.

Метод апробировали для анализа экспрессии цитокинов в эпителиальных клетках A549, инфицированных вирусом A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>) в дозе 1 MOI [7]. Паттерны экспрессии цитокинов определяли через 8, 24 и 48 часов после заражения. Репликация вируса в клетках была подтверждена методом ОТ-ПЦР. С помощью олигонуклеотидного микрочипа в контрольных клетках A549 выявили мРНК цитокинов IL1 $\beta$ , IL6 и IL18. Заражение клеток вирусом A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>) приводило к активации транскрипции генов *IL4*, *IL10* и *TNF $\alpha$*  (рисунок 3.46). Интересно, что, несмотря на обнаружение в клетках мРНК этих цитокинов на всех сроках после заражения, во внеклеточной среде методом ИФА обнаружили только секретируемый TNF $\alpha$ . Возможно, это связано с тем, что происходит блокирование трансляции и/или секреции IL-4 и IL-10.

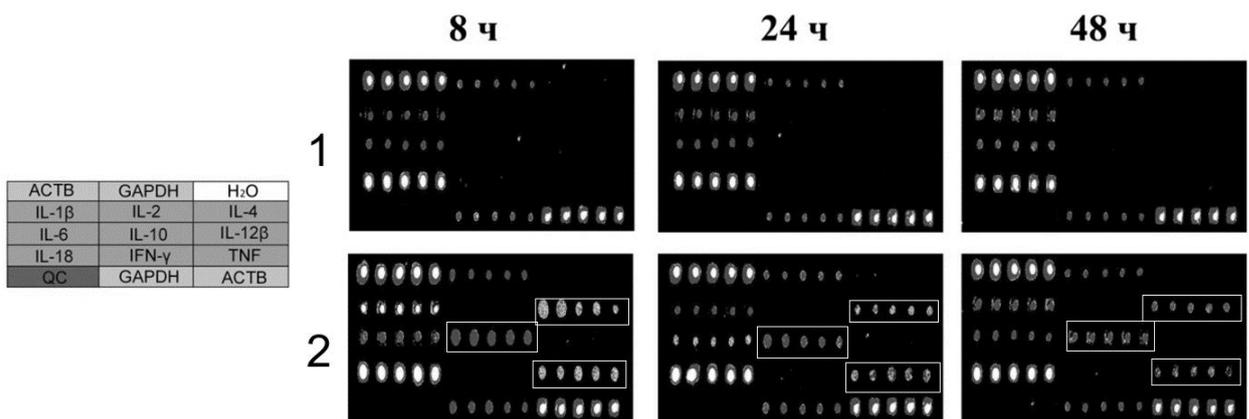


Рисунок 3.46 – Продукция мРНК цитокинов в (1) контрольных клетках A549 и (2) клетках, инфицированных вирусом A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>), через 8, 24 и 48 часов после заражения

*Представлены результаты гибридизации проб, подготовленных методом мультиплексной ОТ-ПЦР, с олигонуклеотидным микрочипом.*

Недостатком примененного способа получения флуоресцентно меченой пробы является необходимость проведения индивидуальной ПЦР для каждого цитокина. Процесс пробоподготовки можно оптимизировать, используя мультиплексную ПЦР, однако не всегда возможно подобрать праймеры и условия

реакции, позволяющие проводить амплификацию нескольких кДНК в одной реакционной смеси.

Полученные результаты дают основание полагать, что разработанный биочип с используемым методом ОТ-ПЦР для подготовки флуоресцентной пробы подходит только для качественного анализа уровня экспрессии цитокинов, поэтому далее был применен другой подход – количественная мультиплексная ОТ-ПЦР.

#### **3.4.2.2. Разработка метода мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для анализа экспрессии цитокинов**

Для количественного определения мРНК цитокинов IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL10, IL12 $\beta$ , IL18, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  человека разработали тест-систему, основанную на методе мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (мПЦР). Тест-система состоит из трех наборов реакций, каждый из которых позволяет количественно выявлять три мРНК цитокинов-мишеней и одну мРНК эндогенного контроля [259]. Для нормализации уровней экспрессии мРНК цитокинов в качестве эндогенного контроля использовали ген «домашнего хозяйства», кодирующий глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (GAPDH). Оригинальные последовательности праймеров и TaqMan зондов [259], содержащих различные флуоресцентные метки на 5'-конце, подобрали к белок-кодирующим областям генов цитокинов.

Мультиплексные реакции оптимизировали в процессе выполнения работы [259]. Разработанная мПЦР тест-система позволила получать стабильные хорошо воспроизводимые результаты количественной оценки мРНК цитокинов и удовлетворяла всем необходимым требованиям для проведения анализа уровней экспрессии с использованием  $\Delta\Delta C_t$  метода.

Для определения количественной динамики образования мРНК цитокинов аналогично п. 3.1.2.1 использовали клетки A549, инфицированные вирусом

A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>). Результаты представлены на рисунке 3.47. мРНК IL1 $\beta$ , IL6 и IL18 наблюдали как в инфицированных, так и в незагрязнённых клетках. При этом инфицирование клеток приводило к значительному (на 2 порядка) увеличению числа транскриптов IL1 $\beta$  через 24 и 48 часов. На всех сроках после заражения наблюдали незначительное (в 2-3 раза) повышение уровня мРНК IL6, уровень мРНК IL18 не изменялся.

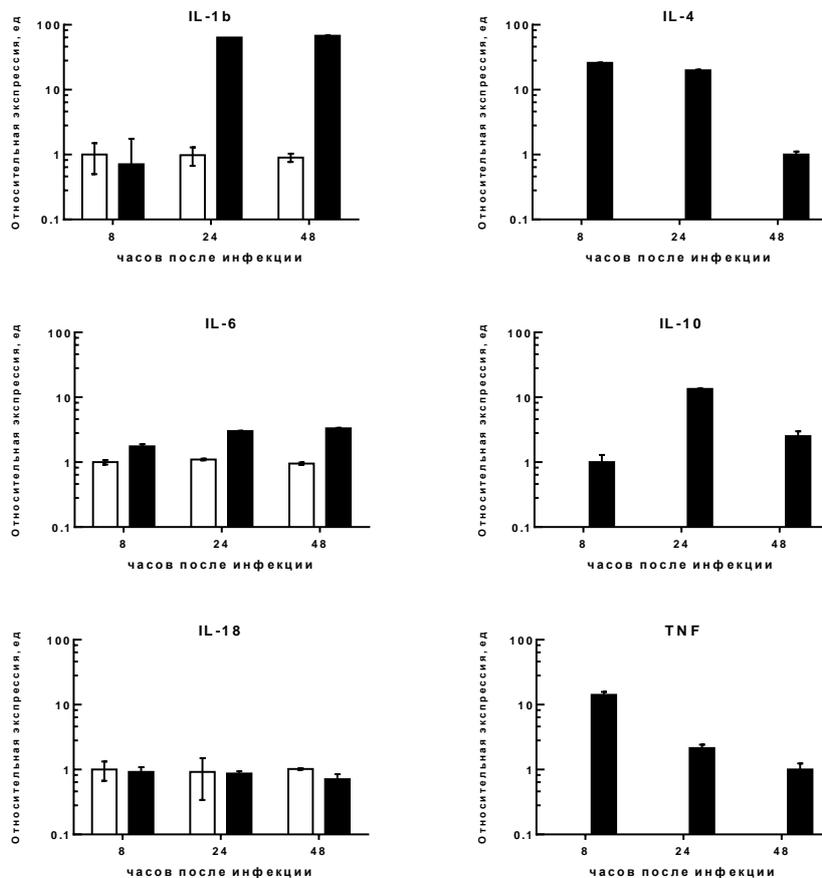


Рисунок 3.47 – Уровни мРНК цитокинов в контрольных клетках A549 (□) и клетках, инфицированных ВГА A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>) (■), через 8, 24 и 48 часов после заражения

*На диаграмме представлены средние относительные уровни экспрессии, рассчитанные для трёх биологических повторов,  $\pm$  О.С.*

Вирус A/California/07/09 (H1N1<sub>pdm09</sub>) индуцировал в клетках A549 образование мРНК IL4, IL10 и TNF $\alpha$ , не выявляемых в контрольных клетках.

Через 8 часов после заражения наблюдали максимальный уровень мРНК IL4 и TNF $\alpha$ , после чего происходило их плавное снижение. мРНК IL10 детектировали через 8 часов после инфекции, через 24 часа наблюдали максимум экспрессии этого гена, а к 48 часам происходило снижение уровня мРНК. При этом уровень экспрессии IL10 был низкий и наблюдался спорадически в разных экспериментах.

Таким образом, методом мПЦР получили результаты, качественно совпадающие с результатами анализа на микрочипе. Вместе с тем, было показано, что для ряда цитокинов, таких как IL6 и IL1 $\beta$  наблюдается увеличение уровня экспрессии мРНК в ответ на заражение вирусом.

### **3.4.2.3. Клиническая апробация мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для анализа экспрессии цитокинов**

Далее провели клиническую апробацию мПЦР тест-системы, используя сыворотки крови пациентов с диагнозом ОРВИ. Пробы брали у пациентов с клиническими проявлениями ОРВИ в рамках утвержденного Министерством здравоохранения Российской Федерации протокола клинической апробации «Клиническая апробация диагностической тест-системы для оценки потенциала патогенности вирусов гриппа и ОРВИ по цитокиновому профилю, прогноза развития тяжелых и осложненных форм инфекции», проводимой на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Клиническое исследование проводилось в период эпидемического подъема заболеваемости ОРВИ в 2016-2017 годы. Исследование было выполнено на биологических образцах, полученных от 136 пациентов, 103 из которых были с клиническими проявлениями ОРВИ. Общая длительность исследования для каждого пациента составила 7–8 дней, что соответствует средней длительности лечения неосложнённой лёгкой и среднетяжёлой форм ОРВИ.

Для определения уровня мРНК цитокинов забор крови у пациентов проводили дважды — на 3–4 день от начала заболевания (пик выработки

цитокинов у больных ОРВИ) и 7–8 день (контрольная точка). По результатам первичного ОТ-ПЦР-скрининга у 56 пациентов была диагностирована ОРВИ, из них у 19 была найдена риновирусная инфекция, у 14 человек выявлен грипп А, у 6 — РС-вирус, у 6 — вирус парагриппа, у 6 — метапневмовирусная инфекция, у 2 человек был диагностирован коронавирус, у 2 — бокавирус и у 1 человека грипп В. У 47 человек с использованием наборов ОРВИ-скрин («Амплисенс») и Influenza virus A/B-FL (CDC) не удалось детектировать возбудителей вирусной этиологии, они составили группу пациентов с острыми респираторными заболеваниями (ОРЗ) невирусной этиологии. При сравнительном анализе из группы пациентов с ОРВИ отдельно выделили группу пациентов с лабораторно подтвержденным гриппом А. Именно для этой группы проводили исследование уровня цитокинов по сравнению с здоровыми добровольцами, пациентами с ОРЗ невирусной этиологии и пациентами с ОРВИ за исключением гриппа А.

Методом мОТ-ПЦР были исследованы относительные уровни экспрессии следующих генов: *IL10*, *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *TNFA*, *IFN*, *IL18* и *IL6*. Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 6 с использованием теста непараметрических критериев Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при значении  $p < 0,05$ . Было проведено попарное сравнение уровней экспрессии цитокинов в первой временной точке у четырёх вышеприведенных групп пациентов (рисунок 3.48).

По сравнению со здоровыми добровольцами у пациентов больных гриппом А на 3–4 день после начала болезни была повышена экспрессия мРНК цитокинов *IL10*, *IL18*, *IL1β*, *TNFα* и *IL6*. В случае цитокинов *IL2*, *IL4* и *IFNγ* изменения уровней мРНК были статистически недостоверными и мало отличались от значений, измеренных в группе здоровых добровольцев.

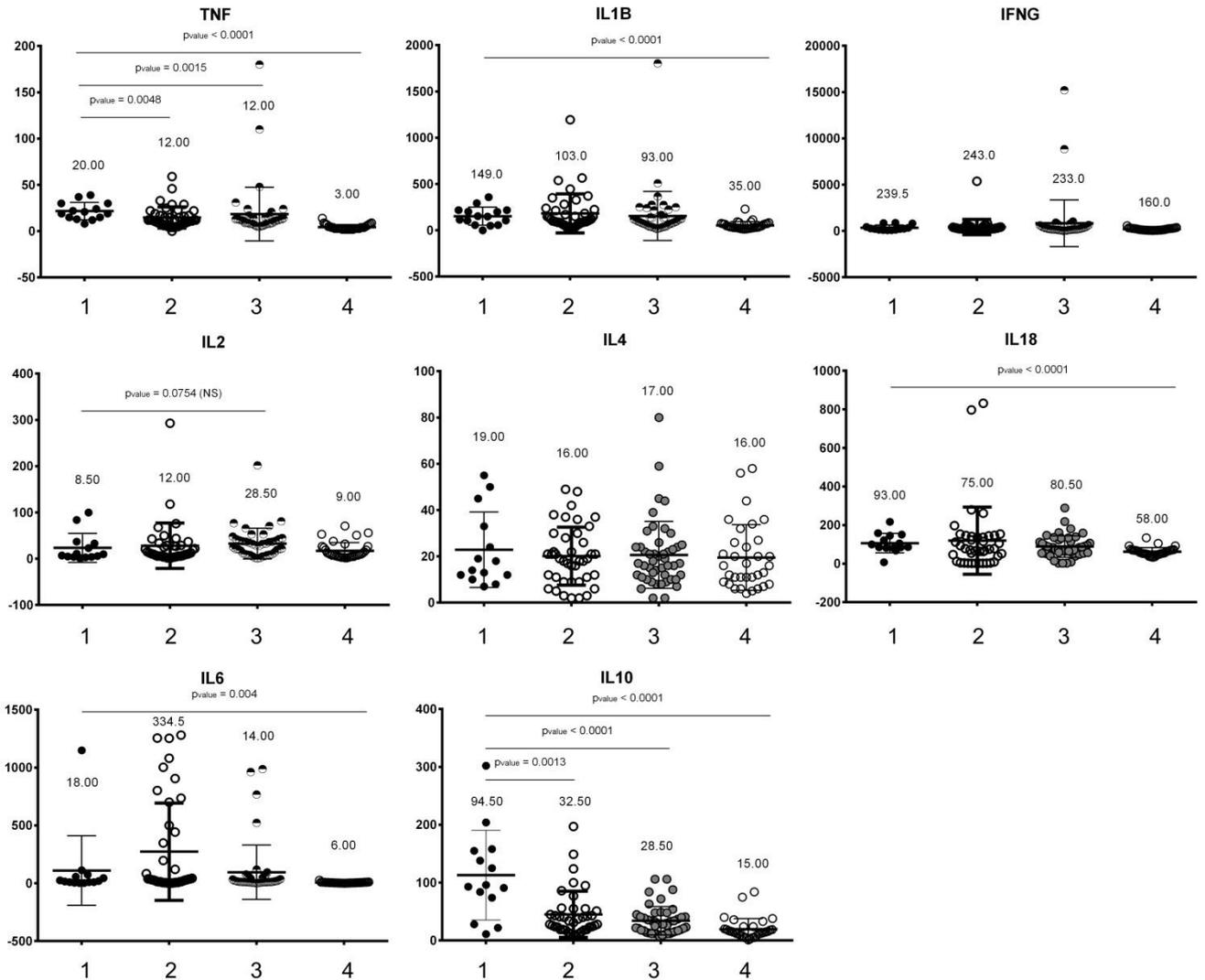


Рисунок 3.48 – Уровень мРНК цитокинов IL10, IL1B, IL2, IL4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL18 и IL6 у пациентов с лабораторно подтвержденным гриппом А (1), с лабораторно подтвержденной ОРВИ (кроме гриппа А) (2), с ОРЗ, у которых вирус не выявлен (3) и здоровых доноров (4)

*При сравнении использовали U-критерий Манна — Уитни.*

Попарное сравнение между анализируемыми группами пациентов показало, что в случае цитокинов IL10 и TNF $\alpha$  значения экспрессии у пациентов с диагнозом грипп А были значимо выше, чем в группах пациентов с ОРВИ негриппозной этиологии и ОРЗ.

Также с использованием критерия Вилкоксона было проведено сравнение уровней экспрессии мРНК цитокинов в парных точках, взятых от пациентов на 3–4 и 7–8 дни после начала болезни (рисунок 3.49). В случае пациентов с диагнозом «грипп», наблюдалось значимое снижение уровней цитокинов IL1 $\beta$ , IL10 и TNF $\alpha$  к 7–8 дню по сравнению с 3–4 днём болезни.

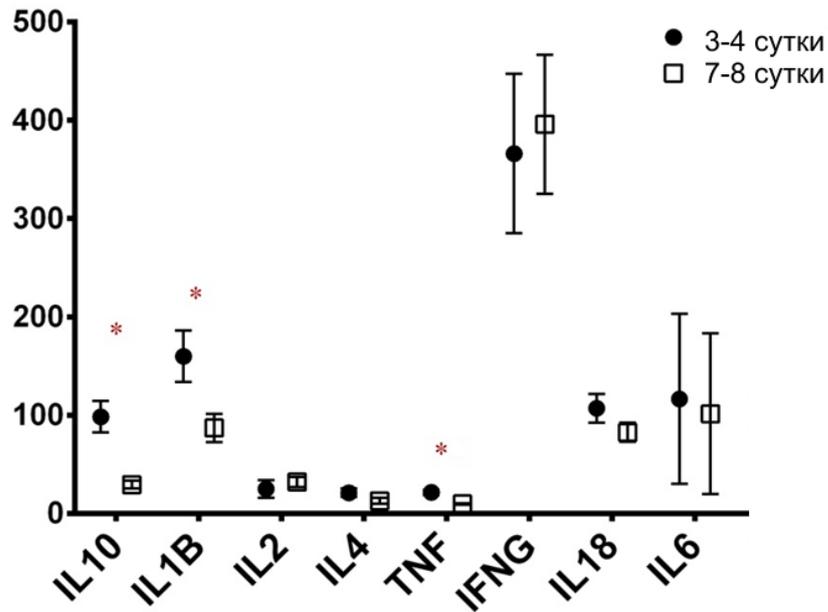


Рисунок 3.49 – Уровень мРНК цитокинов IL10, IL1 $\beta$ , IL2, IL4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL18 и IL6 у пациентов с ОРЗ, вызванных гриппом А, на 3-4 и 7-8 сутки после начала болезни

По оси ординат – относительная экспрессия, ед. При сравнении использовали критерий Вилкоксона, звездочкой отмечены группы, в которых наблюдается достоверное отличие ( $p = 0.0003$ ).

В заключение стоит отметить, что цитокиновый баланс при любом инфекционном процессе имеет ключевое значение, предопределяющее исход и течение заболевания. Детальное исследование взаимосвязи потенциала патогенности возбудителей ОРВИ и их способности стимулировать экспрессию цитокинов на уровне белка и мРНК является перспективной темой для поиска

воспалительных маркеров, позволяющих проводить характеристику протекания заболевания и прогнозирования его исхода.

### **Заключение по разделу 3.4.**

В процессе выполнения данного раздела работы были разработаны две тест-системы. Первая тест-система, «IAVchip», выполнена на основе олигонуклеотидного микрочипа и предназначена для определения и субтипирования ВГА человека и животных. Для флуоресцентного мечения вирусной нуклеиновой кислоты использовали метод одностадийной ОТ-ПЦР с универсальными праймерами MBTuni к концевым участкам геномных сегментов ВГА. Данный метод является универсальным для всех подтипов ВГА и позволяет при необходимости проводить скрининг не только по *HA* и *NA*, но и по всем остальным генам ВГА. При анализе 64-х штаммов ВГА человека и животных, принадлежащих к 14-ти различным подтипам, однозначно определили подтип ВГА 59 образцов, а также субтипировали три штамма ВГА, которые ранее не смогли идентифицировать классическими методами. В РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК была успешно проведена апробация тест-системы «IAVchip» на 185 вирус-содержащих образцах человека, животных и птиц [77]. Таким образом, мы доказали специфичность созданного микрочипа и возможность его применения в клинической практике.

Вторая тест-система предназначена для анализа уровня мРНК IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL10, IL12 $\beta$ , IL18, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  человека и представляет собой набор мПЦР. Продемонстрировали, что тест-система позволяет проводить специфический мультиплексный анализ мРНК цитокинов с чувствительностью от 20 фМ. мПЦР тест-система была применена для анализа цитокинового ответа на клеточной культуре, инфицированной ВГА, и в дальнейшем успешно применена на практике в рамках утвержденного Министерством здравоохранения Российской Федерации протокола клинической апробации. Были выявлены следующие закономерности.

По сравнению со здоровыми добровольцами при ОРВИ, вызванной ВГА, в лейкоцитах происходит увеличение уровня мРНК IL10, IL18, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL6. При этом по сравнению с группами пациентов с ОРВИ негриппозной этиологии и ОРЗ невирусной этиологии при ВГА инфекции наблюдали достоверное повышение уровня мРНК IL10 и TNF $\alpha$  на 3–4 день после начала болезни. В случае пациентов с диагнозом «грипп», наблюдалось значимое снижение уровней цитокинов IL1 $\beta$ , IL10 и TNF $\alpha$  к 7–8 дню по сравнению с 3–4 днями болезни.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление геномных и постгеномных технологий не только расширило понимание молекулярных механизмов патогенеза вирусных инфекций, но позволило по новому сформулировать подходы, используемые в их диагностике и лечении. Первая часть работы была посвящена поиску новых подходов к созданию лекарственных соединений для лечения гриппа. В настоящее время отсутствуют этиотропные препараты для лечения многих постоянно встречающихся (респираторные вирусы, энтеровирусы, ротавирусы, вирусы клещевого энцефалита) и вновь возникающих (флавивирусы Денге и Зика, коронавирусы острого респираторного и Ближневосточного респираторного синдромов, филовирусы Эбола и Марбург) вирусных инфекций. Одна из возможных стратегий их лечения связана с поиском и применением препаратов широкого спектра действия, концепция которых впервые была представлена в 1970-х годах с открытием рибавирина, ингибирующего синтез вирусных РНК или ДНК. В доклинических исследованиях рибавирин показал эффективность в отношении многих вирусных инфекций, однако в клинических исследованиях его эффект был невелик. Недавно были разработаны многообещающие аналоги нуклеотидов и нуклеозидов нового поколения. Например, синтетический аналог аденозина ВСХ4430 и нуклеозидный аналог Т-705 (фавипиравир) ингибируют *in vitro* и *in vivo* репликацию РНК-содержащих вирусов девяти семейств, включая коронавирусы, флавивирусы, вирусы гриппа. По причине существенного разнообразия аминокислотных последовательностей и пространственных структур вирусных белков дизайн препаратов направленного спектра действия широкого применения редко выполним. В настоящее время только для одного класса молекул, ингибиторов нуклеозидов, имеются удовлетворительные результаты в клинических исследованиях.

Другой стратегией разработки противовирусных препаратов является использование в качестве мишени клеточных факторов. Хозяйские белки или сигнальные пути, задействованные в жизненном цикле многих вирусов, являются чрезвычайно привлекательными мишенями для противовирусных препаратов широкого спектра действия, обладая при этом более высоким генетическим барьером к возникновению устойчивости. Наиболее перспективными представителями данного класса соединений являются ингибиторы циклофилина А DEB025 (алиспоривир) и SCY-635. Эти соединения, нарушая фолдинг белка и усиливая врожденный иммунный ответ, ингибируют *in vitro* и *in vivo* разные группы РНК- и ДНК-содержащих вирусов, в том числе вирус гепатита С, вирус Денге, ВИЧ, вирус гриппа, коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома. Перспективной мишенью широкого спектра действия является  $\alpha$ -глюкозидаза эндоплазматического ретикулума (ЭР), обеспечивающая правильный фолдинг гликопротеинов многих оболочечных вирусов. В качестве конкурентного субстрата для  $\alpha$ -глюкозидазы испытывали иминосакхара, такие как целгозивир, однако их клинические исследования пока остаются не очень успешными.

Кроме того, использование клеточных мишеней для терапии вирусных инфекций дает одно очень важное преимущество, которое заключается в возможности переориентации уже применяемых препаратов, направленных на функции организма хозяина. Это существенно сокращает время разработки и стоимость внедрения новых противовирусных препаратов. Например, одобренные противораковые препараты эрлотиниб и сунитиниб являются ингибиторами клеточных циклин G ассоциированной киназы (GAK) и AP2-ассоциированной киназы 1 (AAK1), которые задействованы в регуляции вирусного траффика при вхождении, сборке и высвобождении многих неродственных вирусов. Соответственно для этих препаратов была показана противовирусная активность в отношении вируса гепатита С, некоторых флавивирусов, вируса Эбола и ВИЧ.

Учитывая вышеприведенные тенденции в области разработки противовирусных лекарственных препаратов нового поколения, в работе был использован ставший уже общепринятым подход, заключающийся в поиске ключевых клеточных факторов, задействованных в развитии ВГА инфекции. Для этого была использована клеточная модель ВГА инфекции с использованием эпителиальных клеток A549. Отличительной особенностью нашей модели было то, что мы использовали рекомбинантные ВГА wtNS1 и  $\Delta$ NS1, отличающиеся по гену NS1, кодирующему многофункциональный неструктурный белок NS1, выполняющий функцию антогониста IFN ответа и отвечающий за взаимодействия с множеством клеточных факторов. Сравнение профилей экспрессии таких вирусов в рамках используемой клеточной модели позволило выявить ключевые клеточные мРНК и miРНК, задействованные клеткой в подавлении вирусной инфекции и реализации иммунного ответа, а также самим вирусом в подавлении этого ответа и репродукции. Выявленные ключевые мРНК и miРНК, в первую очередь связанные с геном и белком NS1, были исследованы в качестве потенциальных мишеней для противовирусной терапии. В частности, было показано, что в случае ВГА инфекции ген NS1 играет роль в активации HSF-опосредованного каскада, включающего ряд белков теплового шока. Среди них HSPA5 (GRP78), HSPA1B, HSPA1A, DNAJB1, BAG3, задействованных в регуляции и активации белков теплового шока, играющих важную роль в регуляции фолдинга, конформации, сборки и сортировки белков. Интересно, что в литературе описаны примеры выключения белков теплового шока в случае ВГА инфекции.

При анализе интерактома белка GRP78 обратили внимание на клеточный фермент ПДИ, играющую ключевую роль в фолдинге белков, катализируя образование внутримолекулярных S-S связей. Хотя уровень мРНК ПДИ не меняется при ВГА инфекции, этот белок играет важную роль в правильном фолдинге цистеин-содержащих белков. Он был изучен в заключительной части

работы. Кроме того, обнаружили, увеличение уровня транскриптов некодирующих РНК SNAR: G1, H, F, B2, G2, D и A3, ассоциированных с противовирусным ядерным фактором NF90. Анализ экспрессии клеточных miРНК выявил активацию при ВГА инфекции ряда miРНК (let-7a, miR-210, miR-503, miR-1260b, miR-615, miR-940, miR-29c, miR-194, miR-24, miR-125b, miR-16, miR-6797), преимущественно ассоциированных с реализацией противовирусного иммунного ответа. Эти клеточные гены и продукты их экспрессии, а также ген NS1 ВГА были выбраны в качестве мишеней для противовирусной терапии. Следует отметить, что полученная и охарактеризованная клеточная модель ВГА инфекции может быть использована и для изучения механизмов действия уже известных или новых молекул, для которых показана противовирусная активность в отношении вирусов гриппа. Данный подход был применен автором при изучении механизма действия меглюмина акридонацетата, для которого были показаны новые, ранее не известные механизмы активации клеточных каскадов (данные не опубликованы).

Важным вопросом является, как подбирать препараты, направленные на клеточные гены. Хорошо если ингибитор выбранного белка уже известен, но это бывает редко. Поэтому мы выбрали подход, позволяющий проводить рациональный дизайн препаратов – технологию siРНК. Терапия с использованием молекул РНК, к которым помимо siРНК относят также miРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, аптамеры, синтетические мРНК и CRISPR–Cas9, обладает целым рядом преимуществ перед традиционными малыми молекулами и препаратами на основе белков. siРНК могут быть направлены на любой ген с высокой специфичностью. В отличие от белковых молекул дизайн и синтез siРНК является простым процессом, так как не требует клеточных систем экспрессии, очистки и рефолдинга белка.

Применение siРНК для ингибирования экспрессии вирусных генов и защиты клеток от гриппа было описано в целом ряде работ. Наиболее

исследованными мишенями для siРНК являются гены, кодирующие белки NP, PA, PB1 и PB2, в силу их консервативности и фундаментальности выполняемых функций. Первая работа, в которой было продемонстрировано успешное применение siРНК против гриппа *in vivo*, была опубликована в 2004 году [112]. Было показано, что siРНК, направленные на гены NP и PA, в комплексе с ПЭИ обладали противовирусной активностью при внутривенном введении мышам. В другом исследовании siРНК, направленные на гены NP и PA, в липидном носителе при интраназальном введении мышам обеспечивали противовирусный эффект в отношении вирусов H5N1, H7N7 и H9N2 [334]. С тех пор был опубликован целый ряд работ по использованию siРНК против гриппа *in vitro* и *in vivo* [32], однако, ни одна из разработок так и не дошла до практического применения. Отчасти это можно объяснить тем, что, как оказалось, в целом ряде случаев индуцируемый siРНК противовирусный эффект был вызван врожденным иммунным ответом, а не ингибированием экспрессии вирусных генов. Выявление иммуностимулирующих мотивов и химические модификации молекул siРНК привели к тому, что в настоящее время стало возможно проводить дизайн siРНК с минимальным иммуностимулирующим эффектом. Наиболее значимым препятствием на пути к практическому применению РНК-интерференции для лечения гриппа является доставка siРНК в цитоплазму клеток-мишеней. В процессе миллиардов лет эволюции выработались механизмы защиты, которые препятствуют попаданию в клетки чужеродных молекул РНК. Несмотря на огромный терапевтический потенциал, именно доставка остается серьезным препятствием для клинического применения терапевтических siРНК. Вектор для доставки или носитель, должен обеспечивать преодоления вышеупомянутых барьеров, способствуя проникновению с клетки и обеспечивая защиту молекул siРНК. Существует несколько подходов к доставке молекул siРНК: вирусные векторы, липидные частицы (катионные липосомы, твердые липидные наночастицы, твердые наноструктурированные липидные носители, липидоиды и

pH-чувствительные липиды), полимерные носители (хитозан, декстран, поли-молочно-ко-гликолевая кислота, ПЭИ и РАМAM-дендример), и пептиды (поли-L-лизин, проникающие в клетку пептиды, и pH-чувствительные пептиды). Примечательно, что в случае доставки в легкие по причине сниженной нуклеазной активности возможна эффективная доставка немодифицированной голой РНК, хотя механизм преодоления ею внеклеточного и внутриклеточного барьеров остается непонятным.

В работе для доставки siРНК использовали гибридные микрокапсулы, для которых в Отделе молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России была показана эффективная доставка противовирусных siРНК *in vitro* [332]. Показали, что инкапсулированные в гибридные микрокапсулы анти-NS siРНК обладают значимым противовирусным эффектом *in vitro*. В результате проведенного скрининга выбрали перспективную для дальнейших исследований *in vivo* молекулу NS-777, которая обладает сопоставимой с озельтамивиром противовирусной активностью в отношении ВГА разных подтипов: H1N1, H1N1<sub>pdm09</sub>, H3N2, H5N2 и H7N9. В проводимых в Отделе молекулярной биологии вирусов работах была продемонстрирована противовирусная активность целого ряда siРНК, направленных на гены PA и NP ВГА. Перспективным выглядит создание коктейля из противовирусных siРНК, направленных на разные гены ВГА. Это позволит увеличить противовирусную эффективность препарата, снизить вероятность возникновения лекарственной устойчивости, а также избежать артефактов, связанных с несовпадением последовательности siРНК и мишенного участка в гене.

Кроме того, был апробирован новый подход к поиску противовирусных молекул, основанный на применении синтетических siРНК, компенсирующих снижение уровня экспрессии клеточных miРНК под действием вирусного заражения. Для этого методом NGS было изучено изменение профиля экспрессии пула клеточных miРНК клеток A549 в условиях заражения вирусами wtNS1 и

$\Delta NS1$  и определены miРНК мишени для компенсаторной терапии. Высокоэффективное (сопоставимое с озельтамивиром) ингибирование репликации ВГА *in vitro* было достигнуто при использовании коктейля синтетических аналогов клеточных miРНК let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194. Такой подход, с одной стороны, является более сложным, так как происходит регуляция клеточных путей, что может вылиться в различные нежелательные побочные эффекты. С другой стороны, вероятность возникновения устойчивости будет значительно ниже, чем при использовании siРНК против быстро эволюционирующих вирусных генов. Следует также отметить, что данные miРНК играют важную роль не только в жизненном цикле ВГА, но и других вирусов, что делает возможным создание на основе компенсаторных siРНК противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Вместе с тем помимо инновационных подходов к разработке лекарственных средств, традиционные низкомолекулярные соединения занимают большую долю рынка. В заключительной части работы мы изучали возможный механизм действия соединений ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, заключающийся в окислении цистеинов в белках, и, в частности, в ПДИ.

Для целого ряда вирусов показано, что ингибиторы ПДИ могут обладать противовирусным действием. Рассмотрели три соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, отличающиеся по составу боковых групп. Методами масс-спектрометрии было убедительно продемонстрировано, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины эффективно окисляют SH группы в цистеинсодержащих пептидах, являющихся фрагментами НА ВГА и двух активных центров ПДИ. При этом выяснили, что их окисляющая способность отличается на порядок. Наиболее активным соединением из рассмотренных была натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, наименее – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат. Интересно, что полученные данные совпадают с данными,

полученными методом молекулярного докинга 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с активными центрами ПДИ, а также данными ингибирования ферментативной активности ПДИ *in vitro*. Следует отметить, что ранее в других исследованиях на модели летальной пневмонии у мышей некоторые соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов продемонстрировали весьма умеренную активность. Такой результат можно объяснить слабым вкладом ПДИ в жизненный цикл ВГА. Показали, что при ВГА инфекции уровень экспрессии ПДИ в клетках A549 не изменяется. Кроме того, по данным литературы в эпителиальных клетках, являющихся основным местом репликации ВГА, ПДИ локализована в эндоплазматическом ретикулуме и, вероятно, не вносит существенный вклад процессы вхождения вирусных частиц или сборки вирионов потомства в отличие, например, от вирусов Западного Нила или ВИЧ. Для них, в частности, была показана ключевая роль в жизненном цикле. При этом эффективность ингибирования будет определяться вкладом ПДИ в жизненный цикл вируса и ее клеточной локализацией. В частности, в работах [73, 74] было показано, что ПДИ играет важную роль в жизненном цикле вируса Денге, будучи локализованной на клеточной поверхности и взаимодействуя с вирусным белком NS1. По этой причине оценили противовирусную активность соединения натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата в отношении вируса Денге *in vivo* и получили многообещающие результаты. Интересно будет в дальнейшем оценить активность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении различных флавивирусов. Вместе с тем, очевидно, что число цистеин-содержащих белков в клетках велико, поэтому нельзя исключать и наличие других мишеней помимо ПДИ. Не вызывает сомнения, что мишень 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов – клеточная, что объясняет широкий спектр противовирусной активности. Интересным является и тот факт, что ПДИ задействована в различных клеточных процессах и может быть

использована как мишень для лечения не только вирусных, но и других патологий [15].

Во второй части работы представлены новые подходы для быстрой и эффективной мультиплексной диагностики вирусных инфекций, в частности, гриппа с использованием микрочипов. Именно технология экспрессионных микрочипов, которая появилась и получила распространение на рубеже 1990-2000-х годов, внесла большой вклад в развитие геномных и постгеномных методов анализа. В отличие от традиционных методов молекулярной диагностики микрочипы позволяют в рамках одного анализа специфически определять все известные и вновь возникающие в процессе генетического дрейфа и/или реассортации подтипы ВГА [76]. В литературе описаны различные варианты олигонуклеотидных и кДНК микрочипов для типирования и субтипирования вирусов гриппа [67, 89, 100, 176, 191, 193, 281, 289]. Все представленные в этих работах микрочипы обладали одним общим существенным недостатком – использованием мультиплексных реакций амплификации вирусных РНК, заметно усложняющих процедуру подготовки пробы. Для решения этой проблемы мы впервые предложили использовать метод амплификации геномных сегментов РНК с помощью универсальных праймеров, комплементарных консервативным концевым областям всех геномных сегментов ВГА [390]. Использование таких праймеров позволило унифицировать процедуру подготовки пробы для анализа на биочипе и избавиться от необходимости использования подтип- и/или сегмент-специфических мультиплексных праймеров, что значительно упростило процесс проведения самого анализа [349].

В рамках научно-исследовательских работ по проекту «Разработка новых методов и средств раннего выявления и дифференциальной детекции возбудителей опасных инфекционных болезней», выполненного по заказу РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК (Казахстан) данный подход был успешно применен для создания диагностического

олигонуклеотидного микрочипа «IAVchip», предназначенного для субтипирования ВГА [178, 347]. С помощью полученного чипа смогли однозначно субтипировать образцы ВГА человека и животных, принадлежащих 14 разным подтипам. Кроме того, в РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК была проведена апробация микрочипа «IAVchip» на 185 вирус-содержащих образцах человека, животных и птиц [316]. «IAVchip» показал более высокую диагностическую эффективность (99.45%) в ранней диагностике ВГА в сравнении с ОТ-ПЦР в режиме реального времени (98.38%) и ОТ-ПЦР (96.22%). Диагностическая чувствительность «IAVchip» (100%) превосходила таковую у ОТ-ПЦР (95.95%) и ОТ-ПЦР в режиме реального времени (97.96%) в пределах оцененных доверительных интервалов. «IAVchip» и ОТ-ПЦР в режиме реального времени показали одинаковую диагностическую специфичность (98.85%), в то время как диагностическая специфичность ОТ-ПЦР составила 96.40%. При этом «IAVchip» имеет неоспоримое преимущество перед ОТ-ПЦР методами в скорости диагностики и идентификации ВГА и позволяет проводить одновременную детекцию и субтипирование десятков образцов в одном эксперименте в течение 8-10 часов.

Кроме того, перспективной виделась возможность на одном микрочипе определять не только сами вирусы, но и их чувствительность к противовирусным препаратам, идентифицировать сайты патогенности, характеризующие протекание заболевания клеточные маркеры, и даже однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в геноме человека, определяющие предрасположенность к тяжелому течению заболевания. Частично такая идея была реализована в рамках выполнения ГК 16.522.12.2011 «Разработка многопараметрической тест-системы для диагностики сезонного гриппа», выполняемого Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Научным центром клинической и экспериментальной медицины

Сибирского отделения РАМН, ООО «БИОЧИП-ИМБ» и ООО «ИмДи». Разработанная тест-система «Биогрипп» позволяла проводить идентификацию РНК вируса гриппа в мазках из зева и полости носа, определять его тип (А или В) и подтип (для ВГА), а также проводить молекулярный анализ генетических маркеров, характеризующих степень патогенности ВГА и их устойчивость к основным противовирусным препаратам. В частности, биочип позволял выявлять мутации в генах, кодирующих белки М2 (S31N, V27A, L26F, и A30T) и NA (H274Y), которые приводят к развитию устойчивости к производным адамантана и ингибиторам нейраминидазы [145].

При диагностике гриппа, помимо идентификации и характеристики самого вирусного агента, необходимо понимать иммунный ответ на этот вирус для прогнозирования тяжести заболевания. В связи с этим были разработаны экспериментальные образцы тест-систем для оценки мРНК цитокинов. В частности, биочип для анализа цитокинов обладал чувствительностью, сопоставимой с методом ОТ-ПЦР, однако он позволял проводить лишь качественную оценку цитокинов и требовал проведения отдельных ОТ-ПЦР для каждого из цитокинов [8]. В связи с этим использовали более традиционный подход – мультиплексную ОТ-ПЦР в режиме реального времени, позволяющую проводить чувствительный количественный анализ мРНК цитокинов [259]. Данная тест-система была апробирована в рамках протокола клинической апробации «Клиническая апробация диагностической тест-системы для оценки потенциала патогенности вирусов гриппа и ОРВИ по цитокиновому профилю, прогноза развития тяжелых и осложненных форм инфекции», проводимой на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

В процессе разработки диагностических микрочипов, однако, возникло множество трудностей. Первая, заключалась в невозможности отказа от проведения мультиплексных реакций амплификации со специфическими праймерами без потери чувствительности. В ряде случаев эту проблему можно

было решить, используя универсальные праймеры, как мы сделали в случае чипа для субтипирования ВГА. В некоторых случаях можно было использовать мультиплексные реакции ПЦР. Вместе с тем, следует признать, что идея создания универсального олигонуклеотидного микрочипа, позволяющего определять все вышеперечисленные параметры при диагностике гриппа, так и осталась в полной мере нереализованной. В настоящее время перспектива сложных диагностических многопараметрических олигонуклеотидных чипов, позволяющих анализировать экспрессию множества различных генов, а также SNP, является сомнительной, особенно после того, как появились методы секвенирования нового поколения (NGS), которые существенно упростили анализ полных вирусных геномов и представляют собой более перспективную платформу для мультиплексной молекулярной диагностики. Примечательно, что предложенный в работе метод флуоресцентного мечения кДНК с использованием универсальных праймеров был успешно адаптирован для подготовки библиотек вирусных кДНК для полногеномного секвенирования ВГА на секвенаторе MiSeq («Illumina», США). Вместе с тем, технология биологических микрочипов осталась актуальна для решения частных задач, а сами разработки сместились в область диагностических белковых чипов. Полученный в процессе выполнения данной части работы методический задел был применен автором для создания белковых микрочипов для диагностики ОРВИ и клеточных маркеров протекания заболевания (Государственный контракт Минобрнауки России № 14.604.21.0180 по теме: Разработка многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ для детекции и прогноза тяжести течения острых респираторных инфекций). Разрабатываемый «ТОРИ-ТЕСТ» направлен на выявление антигенов вирусов, вызывающих острые респираторные заболевания, а также анализ клеточных маркеров, которые позволяют предсказать развитие ОРДС и бактериальных осложнений. «ТОРИ-ТЕСТ» не имеет аналогов в мире.

В заключении следует отметить, что применение геномных и постгеномных технологий в вирусологии существенно расширило возможности создания новых методов диагностики, профилактики и лечения вирусных инфекций. Представленные в работе результаты являются заделом для новых направлений исследований, которые уже реализуются в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

## ВЫВОДЫ

1) Ген NS всех циркулирующих в настоящее время штаммов ВГА человека происходит от общего предка – гена NS пандемического ВГА 1918 года, при этом большинство структурных и функциональных доменов кодируемого этим геном белка NS1 оставались консервативными в процессе эволюции ВГА человека. Наблюдаемая консервативность NS1 и данные о том, что делеция открытой рамки считывания NS1 в гене NS существенно снижает уровень репликации и степень патогенности ВГА, делают этот белок перспективной мишенью для терапии гриппа.

2) Модель ВГА инфекции, в которой используются клеточная линия карциномы легкого человека A549 и два рекомбинантных ВГА, содержащих полноразмерную и укороченную открытую рамку считывания NS1 в гене NS, позволяет проводить анализ механизмов взаимодействия между ВГА и инфицируемой клеткой, и определять клеточные факторы, за активацию которых отвечает открытая рамка считывания NS1.

3) ВГА вызывает в эпителиальных клетках A549 NS1-зависимую активацию экспрессии генов HSPA5, HSPA1B, HSPA1A, DNAJB1 и BAG3, задействованных в HSF1-зависимом ответе на тепловой шок. Белки, участвующие в регуляции фолдинга и сборки вирусных белков, могут быть мишенями для противовирусной терапии.

4) Синтетические siРНК, направленные на выключение экспрессии гена NS ВГА, обладают сопоставимой с озельтамивиром противовирусной активностью *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов (H1N1, H1N1pdm09, H3N2, H5N2 и H7N9).

5) Применение коктейля синтетических компенсаторных аналогов клеточных miРНК let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194, уровень экспрессии которых

снижается под действием вирусного заражения, вызывает эффективное (сопоставимое с озельтамивиром) ингибирование репликации ВГА *in vitro*.

6) Соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов катализируют образование дисульфидных связей в цистеин-содержащих пептидных фрагментах активных центров ПДИ человека. Окислительная способность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении цистеинов зависит от строения заместителей и может объяснять их противовирусную активность.

7) Тест-система «IAVchip» позволяет проводить диагностику ВГА человека и животных по 16 подтипам гемагглютинина и 9 подтипам нейраминидазы. Используемый в тест-системе метод одностадийной мультисегментной ОТ-ПЦР с единственной парой универсальных праймеров позволяет получать флуоресцентно меченые кДНК копии восьми геномным сегментов всех возможных подтипов ВГА человека и животных.

8) Тест-система на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени позволяет количественно выявлять мРНК IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL10, IL12 $\beta$ , IL18, IFN $\gamma$  и TN- $\alpha$  в клетках крови пациентов с диагнозом ОРЗ.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность первому научному консультанту диссертационной работы Академику РАН, д.б.н., профессору Киселеву Олегу Ивановичу за переданный бесценный опыт и поданные идеи для работы, а также проф. д.б.н Пучковой Людмиле Валентиновне за помощь в завершении работы. Благодарю за помощь и поддержку в организации работы к.б.н. Грудинина Михаила Павловича. Благодарю за всестороннюю помощь всех сотрудников Отдела молекулярной биологии вирусов, особенно, Сергея Клотченко, Марину Плотникову, Владимира Егорова, Александру Бродскую, а также всех сотрудников ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, участвовавших в выполнении работы. Выражаю признательность за ценные консультации д.б.н. Егорову Андрею Юрьевичу, д.б.н. Скворцову Алексею Николаевичу; за помощь в организационных вопросах – Марине Дмитриевой. Благодарю за любовь, терпение, поддержку и понимание свою семью - жену Екатерину Елпаеву, сыновей Дмитрия и Евгения и мою маму Галину Алексеевну.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ВГА – вирус гриппа А

вРНК – вирусная однонитевая (–)-РНК

вРНП – вирусный рибонуклеопротеин

днРНК – двунитевая РНК

ИФ – иммунофлуоресцентный тест

ИФА – иммуно-ферментный анализ

квРНК – короткие вирусные РНК

кРНК – РНК, комплементарная (–)-РНК

кРНП – рибонуклеопротеин, образованный кРНК

кРНП рибонуклеопротеиновый комплекс, содержащий кРНК

ЛПС – липополисахарид

мПЦР – мультиплексная полимеразная цепная реакция

мРНП – рибонуклеопротеин, образованный мРНК

онРНК – однонитевая РНК

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

ОРИ – острая респираторная инфекция

ОРС – открытая рамка считывания

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭИ – полиэтиленимин

РГ – радиальный гемолиз

РНКаза L – рибонуклеаза L

РНК-полимераза – РНК-зависимая РНК-полимераза вируса гриппа А

РНП - рибонуклеопротеин

РНП – рибонуклеопротеиновый комплекс, содержащий вРНК

РТГА – реакция торможения гемагглютинации  
СПбПУ – Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
ТИД<sub>50</sub> – тканевая инфекционная доза 50  
ЦПД – цитопатическое действие  
ЭЭБ – эпителиально-эндотелиальный барьер  
АСЕ – ангиотензин-конвертирующий фермент  
АСТВ – β-актин  
ADAR1 – днРНК-специфическая аденозин-дезаминаза  
АМПК – аденозин-5`-монофосфат-активируемая протеинкиназа  
ANP32 – член А семейства кислых обогащенных лейцином ядерных фосфопротеинов 32  
APCS – компонент сывороточного амилоида Р  
СВС – кЭп-связывающий комплекс  
СОХ – циклооксигеназа  
CPSF30 – 30 кДа субъединица фактора специфического расщепления и полиаденилирования  
CRM1 – белок поддержания хромосом 1 (экспортин 1)  
CSF1 – колониестимулирующий фактор 1  
СТД – большая субъединица клеточной РНК-полимеразы II  
DDX21 – DEAD-бокс РНК геликаза 2  
DHX9 – DEAD/DEAH-бокс РНК геликаза 9  
ED – С-концевой эффекторный домен NS1  
EIF2α – α-субъединица эукариотического фактора инициации трансляции  
FAM46A – член А семейства белков со сходной последовательностью  
GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа  
GO – генная онтология  
НА – гемагглютинин  
HSC70 – родственный белкам теплового шока белок 70

HSF1 – транскрипционный фактор теплового шока 1  
HSP27 – белок теплового шока 27  
IFI6, 44, 27, 35 – индуцируемые интерфероном белки 6, 44, 27, 35  
IFIT1, 2, 3, 5 – содержащие тетратрикопептидные повторы белки 1, 2, 3, 5  
IFITM – IFN-индуцируемые трансмембранные белки  
IFN – интерферон  
IFNAR – рецептор IFN I типа  
IPS-1 – митохондриальный белок стимулятор промотора IFN $\beta$   
IRAK-1 – IL1R-ассоциированная киназа 1  
ISG – стимулируемые интерфероном гены  
I $\kappa$ B – ингибитор NF- $\kappa$ B  
MAVS – митохондриальный противовирусный сигнальный белок  
MBL2 – манноза-связывающий лектин 2  
MCM – комплекс поддержания минихромосомы  
MDCK – клеточная линия почек собаки  
miРНК – микроРНК  
MOI – множественность заражения  
MX – IFN-индуцируемая ГТФаза резистентности к ортомиксовирусам  
NA – нейраминидаза  
NEP – белок экспорта в ядро  
NES – сигнал ядерного экспорта  
NF90 – ядерный фактор 90  
NF $\kappa$ B – ядерный фактор «каппа-би»  
NLR – NOD-подобный рецептора  
NLRP3 – инфламмосома  
NLS1 – сигнал ядерной локализации  
NoLS – сигнал ядрышковой локализации  
NOS2 – NO-синтаза 2

NP – нуклеопротеин  
NS1 – неструктурный белок 1  
NS1-BP – NS1-связывающим белком  
NXF1/TAP – фактор ядерного экспорта РНК  
OAS – 2'-5'-олигоаденилатсинтаза  
PABPI – поли(А)-связывающий белок I  
PABPII – поли(А)-связывающий белок II  
PACT – активатор PKR  
PAFR – рецептор тромбоцит-активирующего фактора  
pDC – плазмацитоидные дендритные клетки  
PDZ-связывающий мотив  
PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа  
PKR – протеинкиназа R  
PKR – РНК-активируемая протеинкиназа  
PolII – клеточная РНК-полимераза II  
PPAR – рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами  
PRKD2 – серин/треониновая протеин-киназа D2  
PRPF19 – фактор процессинга пре-мРНК 19  
PRR – паттерн-распознающий рецептор  
RBD – N-концевой РНК-связывающий домен NS1  
RIG-I – индуцируемый ретиноидной кислотой ген 1  
RLR – RIG-I-подобный рецептор  
S1P – сфингозин-1-фосфат  
SA – сиаловая кислота  
siРНК – малая интерферирующая РНК  
SK1 – сфингозин киназа 1  
SLC16A1 – транспортер монокарбоксилата 1 $\alpha$   
SOCS – супрессоры цитокинового сигналинга

ST3GAL1 – ST3  $\beta$ -галактозамид- $\alpha$ -2,3-сиалилтрансфераза 1

ST6GAL1 – ST6  $\beta$ -галактозамид- $\alpha$ -2,6-сиалилтрансфераза 1

TLR3, 7, 8 – Toll-подобные рецепторы 3, 7, 8

TNF $\alpha$  – фактор некроза опухолей  $\alpha$

TRIM22, 25 – содержащий трипартитный мотив белок 22, 25

wtNS1 – вирус гриппа А, содержащий полноразмерный ген NS

$\alpha$ 2,3-SA –  $\alpha$ 2,3-сиаловая кислота

$\alpha$ 2,6-SA –  $\alpha$ 2,6-сиаловая кислота

$\Delta$ NS1 – вирус гриппа А, содержащий укороченный ген NS

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Артемьев Г.А.Триазавирин – противовирусный препарат нового поколения / Г. А. Артемьев, В. П. Бондарев, С. В. Борисевич, А. В. Васин, Е. К. Воинков, С. А. Главатских, Э. Г. Деева, В. В. Егоров, О. Н. Забелина, К. А. Загородникова, А. В. Иванова, М. Н. Иванцова, О. И. Киселев, К. В. Кожихова, А. Н. Козицина, Н. И. Коновалова, Д. С. Копчук, С. К. Котовская, С. Я. Логинова, В. А. Максимов. – Екатеринбург, 2016. – 257 с.
2. Васин А.В. Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека / А. В. Васин, А. В. Петрова-Бродская, М. А. Плотникова, В. Б. Цветков, С. А. Клотченко // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62. – № 6. – С. 246–258.
3. Горшков А.Н. РНК-интерференция и патогенез вируса гриппа А / А. Н. Горшков, А. В. Петрова, А. В. Васин // Цитология. – 2017. – Т. 59. – № 8. – С. 515–533.
4. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1v-2009 / О. И. Киселев. – М.: Издательство «Димитрейд График Групп» , 2011. – 164 с.
5. Петрова-Бродская А.В. Сравнение эффективностей ингибирования вируса гриппа А *in vitro* комплексами малых интерферирующих РНК с производными хитозана, полиэтиленимином и гибридными микрокапсулами на основе полиаргинина с неорганическими компонентами / А. В. Петрова-Бродская, А. Б. Бондаренко, А. С. Тимин, М. А. Плотникова, М. В. Афанасьев, А. А. Семенова, К. И. Лебедев, А. Н. Горшков, М. Ю. Горшкова, В. В. Егоров, С. А. Клотченко, А. В. Васин // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62. – № 6. – С. 259–265.
6. Плотникова М.А. Мультиплексные методы определения вирус-индуцированной экспрессии цитокинов на основе микрочипов и ПЦР / М. А. Плотникова. – 2014.

7. Плотникова М.А. Сравнение Паттерна Экспрессии мРНК Цитокинов в Эпителиальных Клетках А-549, Инфицированных Вирусами Гриппа А/Н1N1pdm09, А/Н3N2 и А/Н5N1 / М. А. Плотникова, А. В. Васин, С. А. Клотченко, Т. Д. Смирнова, Д. М. Даниленко, В. В. Егоров, А.-П. С. Шурыгина, О. И. Киселев // Цитокины и Воспаление. – 2013. – Т. 12. – № 1–2. – С. 57–65.
8. Плотникова М.А. Олигонуклеотидный Биочип для Определения Профиля Экспрессии Генов Цитокинов Человека / М. А. Плотникова, А. В. Васин, Е. Ю. Марочкина, С. А. Клотченко, Е. А. Романовская-Романько, А.-П. С. Шурыгина, В. В. Егоров, О.И. Киселев // Цитокины и Воспаление. – 2011. – Т. 10. – № 2. – С. 5–9.
9. Abagyan R. ICM - A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation / R. Abagyan, M. Totrov, D. Kuznetsov // J. Comput. Chem. – 1994. – V. 15. – № 5. – P. 488–506.
10. Ablasser A. Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes / A. Ablasser, H. Poeck, D. Anz, M. Berger, M. Schlee, S. Kim, C. Bourquin, N. Goutagny, Z. Jiang, K. A. Fitzgerald, S. Rothenfusser, S. Endres, G. Hartmann, V. Hornung // J. Immunol. – 2009. – V. 182. – № 11. – P. 6824–33.
11. Alamares-Sapuay J.G. Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 is required for nuclear export of the ribonucleoprotein of influenza A virus / J. G. Alamares-Sapuay, L. Martinez-Gil, S. Stertz, M. S. Miller, M. L. Shaw, P. Palese // J. Virol. – 2013. – V. 87. – № 10. – P. 6020–6.
12. Alame M.M. Peramivir: A Novel Intravenous Neuraminidase Inhibitor for Treatment of Acute Influenza Infections / M. M. Alame, E. Massaad, H. Zaraket // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7.

13. Alexopoulou L. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 / L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell // *Nature*. – 2001. – V. 413. – № 6857. – P. 732–8.
14. Alfonso R. CHD6 chromatin remodeler is a negative modulator of influenza virus replication that relocates to inactive chromatin upon infection / R. Alfonso, T. Lutz, A. Rodriguez, J. P. Chavez, P. Rodriguez, S. Gutierrez, A. Nieto // *Cell. Microbiol.* – 2011. – V. 13. – № 12. – P. 1894–906.
15. Ali Khan H. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles / H. Ali Khan, B. Mutus // *Front. Chem.* – 2014. – V. 2. August – P. 70.
16. Allen I.C. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA / I. C. Allen, M. A. Scull, C. B. Moore, E. K. Holl, E. McElvania-TeKippe, D. J. Taxman, E. H. Guthrie, R. J. Pickles, J. P.-Y. Ting // *Immunity*. – 2009. – V. 30. – № 4. – P. 556–65.
17. Andeweg A.C. Virogenomics: the virus-host interaction revisited / A. C. Andeweg, B. L. Haagmans, A. D. Osterhaus // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2008. – V. 11. – № 5. – P. 461–466.
18. Ando T. The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes / T. Ando, S. Yamayoshi, Y. Tomita, S. Watanabe, T. Watanabe, Y. Kawaoka // *Nat. Microbiol.* – 2016. – V. 1. – № 8. – P. 16062.
19. Aragón T. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus / T. Aragón, S. de la Luna, I. Novoa, L. Carrasco, J. Ortín, A. Nieto // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – V. 20. – № 17. – P. 6259–68.
20. Arnautova Y.A. A new force field (ECEPP-05) for peptides, proteins, and organic molecules / Y. A. Arnautova, A. Jagielska, H. A. Scheraga // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – V. 110. – № 10. – P. 5025–44.

21. Arranz R. The structure of native influenza virion ribonucleoproteins / R. Arranz, R. Coloma, F. J. Chichón, J. J. Conesa, J. L. Carrascosa, J. M. Valpuesta, J. Ortín, J. Martín-Benito // *Science*. – 2012. – V. 338. – № 6114. – P. 1634–7.
22. Asaka M.N. Polycomb repressive complex 2 facilitates the nuclear export of the influenza viral genome through the interaction with M1 / M. N. Asaka, A. Kawaguchi, Y. Sakai, K. Mori, K. Nagata // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 33608.
23. Avalos R.T. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells / R. T. Avalos, Z. Yu, D. P. Nayak // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – № 4. – P. 2947–58.
24. Ayllon J. The NS1 protein: a multitasking virulence factor / J. Ayllon, A. García-Sastre // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2015. – V. 386. – P. 73–107.
25. Baas T. Integrated Molecular Signature of Disease: Analysis of Influenza Virus-Infected Macaques through Functional Genomics and Proteomics / T. Baas, C. R. Baskin, D. L. Diamond, A. Garcia-Sastre, H. Bielefeldt-Ohmann, T. M. Tumpey, M. J. Thomas, V. S. Carter, T. H. Teal, N. Van Hoeven, S. Proll, J. M. Jacobs, Z. R. Caldwell, M. A. Gritsenko, R. R. Hukkanen, D. G. Camp, R. D. Smith, M. G. Katze // *J. Virol.* – 2006. – V. 80. – № 21. – P. 10813–10828.
26. Baas T. SARS-CoV virus-host interactions and comparative etiologies of acute respiratory distress syndrome as determined by transcriptional and cytokine profiling of formalin-fixed paraffin-embedded tissues / T. Baas, J. K. Taubenberger, P. Y. Chong, P. Chui, M. G. Katze // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2006. – V. 26. – № 5. – P. 309–17.
27. Backer R.A. A central role for Notch in effector CD8(+) T cell differentiation / R. A. Backer, C. Helbig, R. Gentek, A. Kent, B. J. Laidlaw, C. X. Dominguez, Y. S. de Souza, S. E. van Trierum, R. van Beek, G. F. Rimmelzwaan, A. ten Brinke, A. M. Willemsen, A. H. van Kampen, S. M. Kaech, J. M. Blander, K. van Gisbergen, D. Amsen // *Nat Immunol.* – 2014. – V. 15. – № 12. – P. 1143–1151.

28. Bailey C.C. Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice / C. C. Bailey, I.-C. Huang, C. Kam, M. Farzan // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8. – № 9. – P. e1002909.
29. Ballarín-González B. Clinical translation of RNAi-based treatments for respiratory diseases / B. Ballarín-González, T. B. Thomsen, K. A. Howard // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2013. – V. 3. – № 1. – P. 84–99.
30. Bao Y. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information / Y. Bao, P. Bolotov, D. Dernovoy, B. Kiryutin, L. Zaslavsky, T. Tatusova, J. Ostell, D. Lipman // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – № 2. – P. 596–601.
31. Baranovich T. The Hemagglutinin Stem-Binding Monoclonal Antibody VIS410 Controls Influenza Virus-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome / T. Baranovich, J. C. Jones, M. Russier, P. Vogel, K. J. Szretter, S. E. Sloan, P. Seiler, J. M. Trevejo, R. J. Webby, E. A. Govorkova // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2016. – V. 60. – № 4. – P. 2118–31.
32. Barik S. SiRNA for influenza therapy / S. Barik // *Viruses.* – 2010. – V. 2. – № 7. – P. 1448–1457.
33. Bassaganya-Riera J. PPAR-gamma activation as an anti-inflammatory therapy for respiratory virus infections / J. Bassaganya-Riera, R. Song, P. C. Roberts, R. Hontecillas // *Viral Immunol.* – 2010. – V. 23. – № 4. – P. 343–52.
34. Bavagnoli L. The PDZ-ligand and Src-homology type 3 domains of epidemic avian influenza virus NS1 protein modulate human Src kinase activity during viral infection / L. Bavagnoli, W. G. Dundon, A. Garbelli, B. Zecchin, A. Milani, G. Parakkal, F. Baldanti, S. Paolucci, R. Volmer, Y. Tu, C. Wu, I. Capua, G. Maga // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 11. – P. 1–12.
35. Bekerman E. Infectious disease. Combating emerging viral threats / E. Bekerman, S. Einav // *Science.* – 2015. – V. 348. – № 6232. – P. 282–3.
36. Belser J.A. DAS181, A Novel Sialidase Fusion Protein, Protects Mice from Lethal Avian Influenza H5N1 Virus Infection / J. A. Belser, X. Lu, K. J. Szretter,

- X. Jin, L. M. Aschenbrenner, A. Lee, S. Hawley, D. H. Kim, M. P. Malakhov, M. Yu, F. Fang, J. M. Katz // *J. Infect. Dis.* – 2007. – V. 196. – № 10. – P. 1493–1499.
37. Bentley D.L. Coupling mRNA processing with transcription in time and space / D. L. Bentley // *Nat. Rev. Genet.* – 2014. – V. 15. – № 3. – P. 163–75.
38. Bodian D.L. Inhibition of the fusion-inducing conformational change of influenza hemagglutinin by benzoquinones and hydroquinones / D. L. Bodian, R. B. Yamasaki, R. L. Buswell, J. F. Stearns, J. M. White, I. D. Kuntz // *Biochemistry.* – 1993. – V. 32. – № 12. – P. 2967–78.
39. Bodrossy L. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics / L. Bodrossy, A. Sessitsch // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2004. – V. 7. – № 3. – P. 245–254.
40. Bornholdt Z. a X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. / Z. a Bornholdt, B. V. V. Prasad // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2006. – V. 13. – № 6. – P. 559–560.
41. Boulo S. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes / S. Boulo, H. Akarsu, R. W. H. Ruigrok, F. Baudin // *Virus Res.* – 2007. – V. 124. – № 1–2. – P. 12–21.
42. Braakman I. Protein folding in the endoplasmic reticulum / I. Braakman, D. N. Hebert // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – V. 5. – № 5. – P. a013201.
43. Brass A.L. The IFITM Proteins Mediate Cellular Resistance to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus, and Dengue Virus / A. L. Brass, I. C. Huang, Y. Benita, S. P. John, M. N. Krishnan, E. M. Feeley, B. J. Ryan, J. L. Weyer, L. van der Weyden, E. Fikrig, D. J. Adams, R. J. Xavier, M. Farzan, S. J. Elledge // *CeBrass, A. L., Huang, I. C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feel. E. M., Ryan, B. J., Weyer, J. L., van der Weyden, L. other authors. (2009). IFITM Proteins Mediat. Cell. Resist. to Infl. A H1N1 Virus, West Nile Virus.* – 2009. – V. 139. – № 7. – P. 1243–1254.
44. Breneman C.M. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide

- conformational analysis / C. M. Breneman, K. B. Wiberg // *J. Comput. Chem.* – 1990. – V. 11. – № 3. – P. 361–373.
45. Brun-Buisson C. Early corticosteroids in severe influenza A/H1N1 pneumonia and acute respiratory distress syndrome / C. Brun-Buisson, J.-C. M. Richard, A. Mercat, A. C. M. Thiébaud, L. Brochard, REVA-SRLF A/H1N1v 2009 Registry Group // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – V. 183. – № 9. – P. 1200–6.
46. Budd A. Increased survival after gemfibrozil treatment of severe mouse influenza / A. Budd, L. Alleva, M. Alsharifi, A. Koskinen, V. Smythe, A. Müllbacher, J. Wood, I. Clark // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – V. 51. – № 8. – P. 2965–8.
47. Byrd-Leotis L. The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase / L. Byrd-Leotis, R. D. Cummings, D. A. Steinhauer // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 18. – № 7. – P. 1541.
48. Carey M.A. Pharmacologic inhibition of COX-1 and COX-2 in influenza A viral infection in mice / M. A. Carey, J. A. Bradbury, Y. D. Reboloso, J. P. Graves, D. C. Zeldin, D. R. Germolec // *PLoS One.* – 2010. – V. 5. – № 7. – P. e11610.
49. Carrillo B. The influenza A virus protein NS1 displays structural polymorphism / B. Carrillo, J.-M. Choi, Z. A. Bornholdt, B. Sankaran, A. P. Rice, B. V. V. Prasad // *J. Virol.* – 2014. – V. 88. – № 8. – P. 4113–22.
50. Chaipan C. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin / C. Chaipan, D. Kobasa, S. Bertram, I. Glowacka, I. Steffen, T. S. Tsegaye, M. Takeda, T. H. Bugge, S. Kim, Y. Park, A. Marzi, S. Pöhlmann // *J. Virol.* – 2009. – V. 83. – № 7. – P. 3200–11.
51. Chartrand C. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis / C. Chartrand, M. M. G. Leeflang, J. Minion, T. Brewer, M. Pai // *Ann. Intern. Med.* – 2012. – V. 156. – № 7. – P. 500–11.
52. Chase G. Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture / G. Chase, T. Deng, E. Fodor, B. W. Leung, D. Mayer, M. Schwemmle, G. Brownlee // *Virology* – 2008. – V. 377. – № 2. – P. 431–9.

53. Chase G.P. Influenza virus ribonucleoprotein complexes gain preferential access to cellular export machinery through chromatin targeting / G. P. Chase, M.-A. Rameix-Welti, A. Zvirbliene, G. Zvirblis, V. Götz, T. Wolff, N. Naffakh, M. Schwemmler // *PLoS Pathog.* – 2011. – V. 7. – № 9. – P. e1002187.
54. Chassey B. de 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 / B. de Chassey, A. Aublin-Gex, A. Ruggieri, L. Meyniel-Schicklin, F. Pradezynski, N. Davoust, T. Chantier, L. Tafforeau, P. E. Mangeot, C. Ciancia, L. Perrin-Cocon, R. Bartenschlager, P. Andre`, V. Lotteau // *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9. – № 7. – P. e1003440.
55. Chen W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death / W. Chen, P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink, J. W. Yewdell // *Nat. Med.* – 2001. – V. 7. – № 12. – P. 1306–12.
56. Chen Z. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery / Z. Chen, Y. Li, R. M. Krug // *EMBO J.* – 1999. – V. 18 – № 8. – P. 2273–83.
57. Cheng A. Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus / A. Cheng, S. M. Wong, Y. A. Yuan // *Cell Res.* – 2009. – V. 19. – № 2. – P. 187–95.
58. Chien C. 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 / C. Chien, Y. Xu, R. Xiao, J. M. Aramini, P. V Sahasrabudhe, R. M. Krug, G. T. Montelione // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – № 7.– P. 1950–62.
59. Chutiwitoonchai N. NXT1, a Novel Influenza A NP Binding Protein, Promotes the Nuclear Export of NP via a CRM1-Dependent Pathway / N. Chutiwitoonchai, Y. Aida // *Viruses.* – 2016. – V. 8. – № 8.

60. Clercq E. De Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years / E. De Clercq, G. Li // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2016. – V. 29. – № 3. – P. 695–747.
61. Collin E. a. Cocirculation of Two Distinct Genetic and Antigenic Lineages of Proposed Influenza D Virus in Cattle / E. a. Collin, Z. Sheng, Y. Lang, W. Ma, B. M. Hause, F. Li // *J. Virol.* – 2015. – V. 89. – № 2. – P. 1036–1042.
62. Collins P.J. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants / P. J. Collins, L. F. Haire, Y. P. Lin, J. Liu, R. J. Russell, P. A. Walker, J. J. Skehel, S. R. Martin, A. J. Hay, S. J. Gamblin // *Nature.* – 2008. – V. 453. – № 7199. – P. 1258–61.
63. Corti D. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins / D. Corti, J. Voss, S. J. Gamblin, G. Codoni, A. Macagno, D. Jarrossay, S. G. Vachieri, D. Pinna, A. Minola, F. Vanzetta, C. Silacci, B. M. Fernandez-Rodriguez, G. Agatic, S. Bianchi, I. Giacchetto-Sasselli, L. Calder, F. Sallusto, P. Collins, L. F. Haire, N. Temperton, J. P. M. Langedijk, J. J. Skehel, A. Lanzavecchia // *Science.* – 2011. – V. 333. – № 6044. – P. 850–6.
64. Cruz A.T. Performance of a rapid influenza test in children during the H1N1 2009 influenza a outbreak / A. T. Cruz, G. J. Demmler-Harrison, A. C. Caviness, G. J. Buffone, P. A. Revell // *Pediatrics* – 2010. – V. 125. – № 3. – P. e645-50.
65. Darwish I. Immunomodulatory therapy for severe influenza / I. Darwish, S. Mubareka, W. C. Liles // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2011. – V. 9. – № 7. – P. 807–22.
66. Das K. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus / K. Das, L.-C. Ma, R. Xiao, B. Radvansky, J. Aramini, L. Zhao, J. Marklund, R.-L. Kuo, K. Y. Twu, E. Arnold, R. M. Krug, G. T. Montelione // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – V. 105. – № 35. – P. 13093–8.
67. Dawson E.D. Identification of A/H5N1 Influenza Viruses Using a Single Gene Diagnostic Microarray / E. D. Dawson, C. L. Moore, D. M. Dankbar, M. Mehlmann,

- M. B. Townsend, J. A. Smagala, C. B. Smith, N. J. Cox, R. D. Kuchta, K. L. Rowlen // *Anal. Chem.* – 2007. – V. 79. – № 1. – P. 378–384.
68. Deng T. Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication / T. Deng, F. T. Vreede, G. G. Brownlee // *J. Virol.* – 2006. – V. 80. – № 5. – P. 2337–48.
69. Dewar M.J.S. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model / M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart // *J. Am. Chem. Soc.* – 1985. – V. 107. – № 13. – P. 3902–3909.
70. Diebold S.S. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA / S. S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis e Sousa // *Science.* – 2004. – V. 303. – № 5663. – P. 1529–31.
71. Dittmann J. Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase / J. Dittmann, S. Stertz, D. Grimm, J. Steel, A. García-Sastre, O. Haller, G. Kochs // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – № 7. – P. 3624–31.
72. Dittmann M. A serpin shapes the extracellular environment to prevent influenza a virus maturation / M. Dittmann, H. H. Hoffmann, M. A. Scull, R. H. Gilmore, K. L. Bell, M. Ciancanelli, S. J. Wilson, S. Crotta, Y. Yu, B. Flatley, J. W. Xiao, J. L. Casanova, A. Wack, P. D. Bieniasz, C. M. Rice // *Cell.* – 2015. – V. 160. – № 4. – P. 631–643.
73. Diwaker D. Potential roles of protein disulphide isomerase in viral infections / D. Diwaker, K. P. Mishra, L. Ganju // *Acta Virol.* – 2013. – V. 57. – P. 293–304.
74. Diwaker D. Protein Disulfide Isomerase Mediates Dengue Virus Entry in Association with Lipid Rafts / D. Diwaker, A. Mishra Reprint, K. P. E-mail: kmpmgi@rediffmail.com, L. Ganju, S. B. Singh // *Viral Immunol.* – 2015. – V. 28. – № 3. – P. 153–160.

75. Dobin A. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner / A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T. R. Gingeras // *Bioinformatics*. – 2013. – V. 29. – № 1. – P. 15–21.
76. Dwyer D.E. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection / D. E. Dwyer, D. W. Smith, M. G. Catton, I. G. Barr // *Med. J. Aust.* – 2006. – V. 185. – № 10. Suppl. – P. S48–53.
77. Egorov A. Transfectant Influenza A Viruses with Long Deletions in the NS1 Protein Grow Efficiently in Vero Cells / A. Egorov, S. Brandt, S. Sereinig, J. Romanova, B. Ferko, D. Katinger, A. Grassauer, G. Alexandrova, H. Katinger, A. T. Muster // *J. Virol.* – 1998. – V. 72 – № 8. – P. 6437–6441.
78. Egorov A. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells / A. Egorov, S. Brandt, S. Sereinig, J. Romanova, B. Ferko, D. Katinger, a Grassauer, G. Alexandrova, H. Katinger, T. Muster // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – № 8. – P. 6437–41.
79. Ehrhardt C. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway / C. Ehrhardt, S. Ludwig // *Cell. Microbiol.* – 2009. – V. 11. – № 6. – P. 803–71.
80. Ehrhardt C. Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling / C. Ehrhardt, R. Seyer, E. R. Hrinčius, T. Eierhoff, T. Wolff, S. Ludwig // *Microbes Infect.* – 2010. – V. 12. – № 1. – P. 81–87.
81. Ehrhardt C. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses / C. Ehrhardt, T. Wolff, S. Pleschka, O. Planz, W. Beermann, J. G. Bode, M. Schmolke, S. Ludwig // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 7. – P. 3058–67.
82. Ekiert D.C. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses / D. C. Ekiert, R. H. E. Friesen, G. Bhabha, T. Kwaks, M. Jongeneelen, W. Yu, C. Ophorst, F. Cox, H. J. W. M. Korse, B. Brandenburg, R. Vogels, J. P. J. Brakenhoff, R. Kompier, M. H. Koldijk, L. A. H. M. Cornelissen, L. L. M.

- Poon, M. Peiris, W. Koudstaal, I. A. Wilson, J. Goudsmit // *Science*. – 2011. – V. 333. – № 6044. – P. 843–50.
83. Elbashir S.M. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs / S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl // *Genes Dev.* – 2001. – V. 15. – № 2. – P. 188–200.
84. Elliott M. Zanamivir: from drug design to the clinic / M. Elliott // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* – 2001. – V. 356. – № 1416. – P. 1885–1893.
85. Engel D.A. The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target / D. A. Engel // *Antiviral Res.* – 2013. – V. 99. – № 3. – P. 409–416.
86. Engelhardt O.G. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II / O. G. Engelhardt, M. Smith, E. Fodor // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – № 9. – P. 5812–8.
87. Everitt A.R. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza / A. R. Everitt, S. Clare, T. Pertel, S. P. John, R. S. Wash, S. E. Smith, C. R. Chin, E. M. Feeley, J. S. Sims, D. J. Adams, H. M. Wise, L. Kane, D. Goulding, P. Digard, V. Anttila, J. K. Baillie, T. S. Walsh, D. A. Hume, A. Palotie, Y. Xue, V. Colonna, C. Tyler-Smith, J. Dunning, S. B. Gordon, GenISIS Investigators, MOSAIC Investigators, R. L. Smyth, P. J. Openshaw, G. Dougan, A. L. Brass, P. Kellam // *Nature*. – 2012. – V. 484. – № 7395. – P. 519–23.
88. Ferko B. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes / B. Ferko, J. Stasakova, J. Romanova, C. Kittel, S. Sereinig, H. Katinger, A. Egorov // *J. Virol.* – 2004. – V. 78. – № 23. – P. 13037–45.
89. Fesenko E.E. Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus / E. E. Fesenko, D. E. Kireyev, D. A. Gryadunov, V. M. Mikhailovich, T. V. Grebennikova, D. K. L'vov, A. S. Zasedatelev // *Influenza Other Respi. Viruses*. – 2007. – V. 1. – № 3. – P. 121–129.

90. Fodor E. The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication / E. Fodor // *Acta Virol.* – 2013. – V. 57. – № 2. – P. 113–22.
91. Forterre P. The Virocell Concept / P. Forterre // *eLS.* – 2012. – P. 1–6.
92. Fournier E. A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments / E. Fournier, V. Moules, B. Essere, J. C. Paillart, J. D. Sirbat, C. Isel, A. Cavalier, J. P. Rolland, D. Thomas, B. Lina, R. Marquet // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40. – № 5. – P. 2197–2209.
93. Fredericksen B.L. The host response to West Nile Virus infection limits viral spread through the activation of the interferon regulatory factor 3 pathway / B. L. Fredericksen, M. Smith, M. G. Katze, P.-Y. Shi, M. Gale // *J. Virol.* – 2004. – V. 78. – № 14. – P. 7737–47.
94. Freed E. *Fields Virology* / E. Freed, M. Martin – 2013. – P. 453–490.
95. Frisch M.J. *Gaussian 09.* – 2009.
96. Fujiyoshi Y. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy / Y. Fujiyoshi, N. P. Kume, K. Sakata, S. B. Sato // *EMBO J.* – 1994. – V. 13. – № 2. – P. 318–326.
97. Furuta Y. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor / Y. Furuta, B. B. Gowen, K. Takahashi, K. Shiraki, D. F. Smee, D. L. Barnard // *Antiviral Res.* – 2013. – V. 100. – № 2. – P. 446–454.
98. Gabriel G. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus / G. Gabriel, A. Herwig, H.-D. Klenk // *PLoS Pathog.* – 2008. – V. 4 – № 2. – P. e11.
99. Gack M.U. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I / M. U. Gack, R. A. Albrecht, T. Urano, K.-S. Inn, I.-C. Huang, E. Carnero, M. Farzan, S. Inoue, J. U. Jung, A. García-Sastre // *Cell Host Microbe.* – 2009. – V. 5. – № 5. – P. 439–49.

100. Gall A. Rapid haemagglutinin subtyping and pathotyping of avian influenza viruses by a DNA microarray / A. Gall, B. Hoffmann, T. Harder, C. Grund, R. Ehricht, M. Beer // *J. Virol. Methods.* – 2009. – V. 160. – № 1–2. – P. 200–205.
101. Gallacher M. Cation currents in human airway epithelial cells induced by infection with influenza A virus / M. Gallacher, S. G. Brown, B. G. Hale, R. Fearn, R. E. Olver, R. E. Randall, S. M. Wilson // *J. Physiol.* – 2009. – V. 587. – № Pt 13. – P. 3159–73.
102. Galligan J.J. The human protein disulfide isomerase gene family / J. J. Galligan, D. R. Petersen // *Hum. Genomics.* – 2012. – V. 6. – № 1. – P. 6.
103. Gao H.-N. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection / H.-N. Gao, H.-Z. Lu, B. Cao, B. Du, H. Shang, J.-H. Gan, S.-H. Lu, Y.-D. Yang, Q. Fang, Y.-Z. Shen, X.-M. Xi, Q. Gu, X.-M. Zhou, H.-P. Qu, Z. Yan, F.-M. Li, W. Zhao, Z.-C. Gao, G.-F. Wang, L.-X. Ruan, W.-H. Wang, J. Ye, H.-F. Cao, X.-W. Li, W.-H. Zhang, X.-C. Fang, J. He, W.-F. Liang, J. Xie, M. Zeng, X.-Z. Wu, J. Li, Q. Xia, Z.-C. Jin, Q. Chen, C. Tang, Z.-Y. Zhang, B.-M. Hou, Z.-X. Feng, J.-F. Sheng, N.-S. Zhong, L.-J. Li // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – V. 368. – № 24. – P. 2277–85.
104. Gao S. Interaction of NS2 with AIMP2 facilitates the switch from ubiquitination to SUMOylation of M1 in influenza A virus-infected cells / S. Gao, J. Wu, R.-Y. Liu, J. Li, L. Song, Y. Teng, C. Sheng, D. Liu, C. Yao, H. Chen, W. Jiang, S. Chen, W. Huang // *J. Virol.* – 2015. – V. 89. – № 1. – P. 300–11.
105. García-Sastre A. Antiviral response in pandemic influenza viruses // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – V. 12. – № 1. – P. 44–47.
106. García-Sastre A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente / A. García-Sastre, C. A. Biron // *Science.* – 2006. – V. 312. – № 5775. – P. 879–82.
107. García-Sastre A. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems / A. García-Sastre, A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese, T. Muster, A. Garcia-Sastre, A. Egorov, D. Matassov,

- S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese, T. Muster // *Virology*. – 1998. – V. 252. – № 2. – P. 324–330.
108. Garozzo A. N-acetylcysteine synergizes with oseltamivir in protecting mice from lethal influenza infection / A. Garozzo, G. Tempera, D. Ungheri, R. Timpanaro, A. Castro // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2010. – V. 20. – № 2. – P. 349–54.
109. Garten R.J. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans / R. J. Garten, C. T. Davis, C. A. Russell, N. J. Cox // *Science*. – 2009. – V. 325. – № 5937. – P. 197–201.
110. Gasteiger J. A new model for calculating atomic charges in molecules / J. Gasteiger, M. Marsili // *Tetrahedron Lett.* – 1978. – V. 19. – № 34. – P. 3181–3184.
111. Gaydos J.C. Swine influenza A outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976 / J. C. Gaydos, F. H. Top, R. A. Hodder, P. K. Russell // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – V. 12. – № 1. – P. 23–28.
112. Ge Q. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference / Q. Ge, L. Filip, A. Bai, T. Nguyen, H. N. Eisen, J. Chen // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2004. – V. 101. – № 23. – P. 8676–8681.
113. Geiler J. N-acetyl-l-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus / J. Geiler, M. Michaelis, P. Naczek, A. Leutz, K. Langer, H.-W. Doerr, J. Cinatl // *Biochem. Pharmacol.* – 2010. – V. 79. – № 3. – P. 413–420.
114. Geiss G.K. Global impact of influenza virus on cellular pathways is mediated by both replication-dependent and -independent events / G. K. Geiss, M. C. An, R. E. Bumgarner, E. Hammersmark, D. Cunningham, M. G. Katze // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – № 9. – P. 4321–4331.
115. Geiss G.K. Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays / G. K. Geiss, R. E. Bumgarner, M. C. An, M. B.

- Agy, A. B. van 't Wout, E. Hammersmark, V. S. Carter, D. Upchurch, J. I. Mullins, M. G. Katze // *Virology*. – 2000. – V. 266. – № 1. – P. 8–16.
116. Geiss G.K. Gene expression profiling of the cellular transcriptional network regulated by alpha/beta interferon and its partial attenuation by the hepatitis C virus nonstructural 5A protein / G. K. Geiss, V. S. Carter, Y. He, B. K. Kwieciszewski, T. Holzman, M. J. Korth, C. A. Lazaro, N. Fausto, R. E. Bumgarner, M. G. Katze // *J. Virol.* – 2003. – V. 77. – № 11. – P. 6367–75.
117. Geiss G.K. 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 / G. K. Geiss, M. Salvatore, T. M. Tumpey, V. S. Carter, X. Wang, C. F. Basler, J. K. Taubenberger, R. E. Bumgarner, P. Palese, M. G. Katze, A. García-Sastre // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – V. 99. – № 16. – P. 10736–41.
118. Glaser L. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity / L. Glaser, J. Stevens, D. Zamarin, I. A. Wilson, A. García-Sastre, T. M. Tumpey, C. F. Basler, J. K. Taubenberger, P. Palese // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – № 17. – P. 11533–6.
119. Goffic R. Le Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia / R. Le Goffic, V. Balloy, M. Lagranderie, L. Alexopoulou, N. Escriou, R. Flavell, M. Chignard, M. Si-Tahar // *PLoS Pathog.* – 2006. – V. 2. – № 6. – P. e53.
120. Golebiewski L. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions / L. Golebiewski, H. Liu, R. T. Javier, A. P. Rice // *J. Virol.* – 2011. – V. 85. – № 20. – P. 10639–10648.
121. Goodman A.G. The cellular protein P58IPK regulates influenza virus mRNA translation and replication through a PKR-mediated mechanism / A. G. Goodman, J. A. Smith, S. Balachandran, O. Perwitasari, S. C. Proll, M. J. Thomas, M. J. Korth,

- G. N. Barber, L. A. Schiff, M. G. Katze // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 5. – P. 2221–30.
122. Gorin A.B. Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux / A. B. Gorin, P. A. Stewart // *J. Appl. Physiol.* – 1979. – V. 47. – № 6. – P. 1315–24.
123. Goto H. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus / H. Goto, Y. Kawaoka // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – V. 95. – № 17. – P. 10224–8.
124. Graaf M. de Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis / M. de Graaf, R. A. Fouchier // *EMBO J.* – 2014. – V. 33. – № 8. – P. 823–841.
125. Grandea A.G. Human antibodies reveal a protective epitope that is highly conserved among human and nonhuman influenza A viruses / A. G. Grandea, O. A. Olsen, T. C. Cox, M. Renshaw, P. W. Hammond, P.-Y. Chan-Hui, J. L. Mitcham, W. Cieplak, S. M. Stewart, M. L. Grantham, A. Pekosz, M. Kiso, K. Shinya, M. Hatta, Y. Kawaoka, M. Moyle // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107. – № 28. – P. 12658–63.
126. Greenspan D. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein / D. Greenspan, P. Palese, M. Krystal // *J. Virol.* – 1988. – V. 62. – № 8. – P. 3020–6.
127. Grek C. Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis / C. Grek, D. M. Townsend // *Endoplasmic Reticulum Stress Dis.* – 2014. – V. 1. – № 1.
128. Gu W. Influenza A virus preferentially snatches noncoding RNA caps / W. Gu, G. R. Gallagher, W. Dai, P. Liu, R. Li, M. I. Trombly, D. B. Gammon, C. C. Mello, J. P. Wang, R. W. Finberg // *RNA.* – 2015. – V. 21. – № 12. – P. 2067–75.

129. Gulyaev A.P. Influenza virus RNA structure: unique and common features / A. P. Gulyaev, R. A. M. Fouchier, R. C. L. Olsthoorn // *Int. Rev. Immunol.* – 2010. – V. 29. – № 6. – P. 533–556.
130. Gupta P. Preclinical pharmacokinetics of MHAA4549A, a human monoclonal antibody to influenza A virus, and the prediction of its efficacious clinical dose for the treatment of patients hospitalized with influenza A / P. Gupta, A. V. Kamath, S. Park, H. Chiu, J. Lutman, M. Maia, M.-W. Tan, M. Xu, L. Swem, R. Deng // *MAbs.* – 2016. – V. 8. – № 5. – P. 991–7.
131. Hale B.G. Conformational plasticity of the influenza A virus NS1 protein / B. G. Hale // *J. Gen. Virol.* – 2014. – V. 95. – № Pt 10. – P. 2099–105.
132. Hale B.G. Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain / B. G. Hale, W. S. Barclay, R. E. Randall, R. J. Russell // *Virology.* – 2008. – V. 378. – № 1. – P. 1–5.
133. Hale B.G. Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling / B. G. Hale, D. Jackson, Y.-H. Chen, R. A. Lamb, R. E. Randall // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – V. 103. – № 38. – P. 14194–9.
134. Hale B.G. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase activation by the influenza A virus NS1 protein / B. G. Hale, P. S. Kerry, D. Jackson, B. L. Precious, A. Gray, M. J. Killip, R. E. Randall, R. J. Russell // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107. – № 5. – P. 1954–9.
135. Hale B.G. CDK/ERK-mediated phosphorylation of the human influenza A virus NS1 protein at threonine-215 / B. G. Hale, A. Knebel, C. H. Botting, C. S. Galloway, B. L. Precious, D. Jackson, R. M. Elliott, R. E. Randall // *Virology.* – 2009. – V. 383. – № 1. – P. 6–11.
136. Hale B.G. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses / B. G. Hale, R. E. Randall, J. Ortin, D. Jackson // *J. Gen. Virol.* – 2008. – V. 89. – № 10. – P. 2359–2376.

137. Hale B.G. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein / B. G. Hale, J. Steel, R. A. Medina, B. Manicassamy, J. Ye, D. Hickman, R. Hai, M. Schmolke, A. C. Lowen, D. R. Perez, A. García-Sastre // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – № 14. – P. 6909–22.
138. Halgren T.A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94 / T. A. Halgren // *J. Comput. Chem.* – 1996. – V. 17. – № 5–6. – P. 490–519.
139. Hastings J.C. Anti-influenza virus activities of 4-substituted 2,4-dioxobutanoic acid inhibitors / J. C. Hastings, H. Selnick, B. Wolanski, J. E. Tomassini // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1996. – V. 40. – № 5. – P. 1304–7.
140. Hause B. Characterization of a novel influenza virus strain in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family / B. Hause, E. Collin, R. Liu, B. Huang, Z. Sheng, W. Lu // *MBio.* – 2014. – V. 5. – № 2. – P. 1–10.
141. Haussecker D. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development / D. Haussecker // *J. Control. Release.* – 2014. – V. 195. – P. 49–54.
142. Heer A.K. TLR signaling fine-tunes anti-influenza B cell responses without regulating effector T cell responses / A. K. Heer, A. Shamshiev, A. Donda, S. Uematsu, S. Akira, M. Kopf, B. J. Marsland // *J. Immunol.* – 2007. – V. 178. – № 4. – P. 2182–91.
143. Heikkinen L.S. Avian and 1918 Spanish influenza A virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling / L. S. Heikkinen, A. Kazlauskas, K. Melén, R. Wagner, T. Ziegler, I. Julkunen, K. Saksela // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283. – № 9. – P. 5719–27.
144. Herfst S. Introduction of virulence markers in PB2 of pandemic swine-origin influenza virus does not result in enhanced virulence or transmission / S. Herfst, S. Chutinimitkul, J. Ye, E. de Wit, V. J. Munster, E. J. A. Schrauwen, T. M. Bestebroer, M. Jonges, A. Meijer, M. Koopmans, G. F. Rimmelzwaan, A. D. M. E.

- Osterhaus, D. R. Perez, R. A. M. Fouchier // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – № 8. – P. 3752–8.
145. Heydarov R.N. Identification of genetic determinants of influenza A virus resistance to adamantanes and neuraminidase inhibitors using biological microarray / R. N. Heydarov, E. E. Fesenko, B. L. Shaskolskiy, S. A. Klotchenko, A. V. Vasin, S. V. Titov, E. I. Dementieva, a. S. Zasedatelev, V. M. Mikhailovich, O. I. Kiselev // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2015. – V. 460. – № 1. – P.4–8.
146. Hidari K.I.P.J. Influenza virus utilizes N-linked sialoglycans as receptors in A549 cells / K. I. P. J. Hidari, M. Yamaguchi, F. Ueno, T. Abe, K. Yoshida, T. Suzuki // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – V. 436. – № 3. – P. 394–9.
147. Hoffmann E. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses / E. Hoffmann, J. Stech, Y. Guan, R. G. Webster, D. R. Perez // *Arch. Virol.* – 2001. – V. 146. – № 12. – P. 2275–2289.
148. Hoffmann E. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids / E. Hoffmann, R. G. Webster // *J. Gen. Virol.* – 2000. – V. 81. – № Pt 12. – P. 2843–7.
149. Horimoto T. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate / T. Horimoto, A. Takada, K. Fujii, H. Goto, M. Hatta, S. Watanabe, K. Iwatsuki-Horimoto, M. Ito, Y. Tagawa-Sakai, S. Yamada, H. Ito, T. Ito, M. Imai, S. Itamura, T. Odagiri, M. Tashiro, W. Lim, Y. Guan, M. Peiris, Y. Kawaoka // *Vaccine.* – 2006. – V. 24. – № 17. – P. 3669–76.
150. Hutchinson E.C. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture / E. C. Hutchinson, P. D. Charles, S. S. Hester, B. Thomas, D. Trudgian, M. Martinez-Alonso, E. Fodor // *Nat Commun.* – 2014. – V. 5. May. – P. 4816.
151. Hutchinson E.C. Genome packaging in influenza A virus / E. C. Hutchinson, J. C. von Kirchbach, J. R. Gog, P. Digard // *J. Gen. Virol.* – 2010. – V. 91. – № 2. – P. 313–328.

152. Ichinohe T. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses / T. Ichinohe, H. K. Lee, Y. Ogura, R. Flavell, A. Iwasaki // *J. Exp. Med.* – 2009. – V. 206. – № 1. – P. 79–87.
153. Ichinohe T. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel / T. Ichinohe, I. K. Pang, A. Iwasaki // *Nat. Immunol.* – 2010. – V. 11. – № 5. – P. 404–10.
154. Ikematsu H. Laninamivir octanoate: a new long-acting neuraminidase inhibitor for the treatment of influenza / H. Ikematsu, N. Kawai // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2011. – V. 9. – № 10. – P. 851–7.
155. Imai H. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets / H. Imai, K. Shinya, R. Takano, M. Kiso, Y. Muramoto, S. Sakabe, S. Murakami, M. Ito, S. Yamada, M. T. Q. Le, C. A. Nidom, Y. Sakai-Tagawa, K. Takahashi, Y. Omori, T. Noda, M. Shimojima, S. Kakugawa, H. Goto, K. Iwatsuki-Horimoto, T. Horimoto, Y. Kawaoka // *PLoS Pathog.* – 2010. – V. 6. – № 9. – P. e1001106.
156. Itzstein M. von The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors / M. von Itzstein // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2007. – V. 6. – № 12. – P. 967–74.
157. Ives J.A.L. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo / J. A. L. Ives, J. A. Carr, D. B. Mendel, C. Y. Tai, R. Lambkin, L. Kelly, J. S. Oxford, F. G. Hayden, N. A. Roberts // *Antiviral Res.* – 2002. – V. 55. – № 2. – P. 307–17.
158. Iwasaki A. Innate immunity to influenza virus infection / A. Iwasaki, P. P. S. Pillai // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – V. 14. – № 5. – P. 315–28.
159. Jackson D. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity / D. Jackson, M. J. Hossain, D. Hickman,

- D. R. Perez, R. A. Lamb // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – V. 105. – № 11. – P. 4381–6.
160. Jiao P. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice / P. Jiao, G. Tian, Y. Li, G. Deng, Y. Jiang, C. Liu, W. Liu, Z. Bu, Y. Kawaoka, H. Chen // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – № 3. – P. 1146–54.
161. Jorba N. Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication / N. Jorba, R. Coloma, J. Ortín // *PLoS Pathog.* – 2009. – V. 5. – № 5. – P. e1000462.
162. Josset L. Moving H5N1 studies into the era of systems biology / L. Josset, J. Tisoncik-Go, M. G. Katze // *Virus Res.* – 2013. – V. 178. – № 1. – P. 151–167.
163. Kallewaard N.L. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes / N. L. Kallewaard, D. Corti, P. J. Collins, U. Neu, J. M. McAuliffe, E. Benjamin, L. Wachter-Rosati, F. J. Palmer-Hill, A. Q. Yuan, P. A. Walker, M. K. Vorlaender, S. Bianchi, B. Guarino, A. De Marco, F. Vanzetta, G. Agatic, M. Foglierini, D. Pinna, B. Fernandez-Rodriguez, A. Fruehwirth, C. Silacci, R. W. Ogrodowicz, S. R. Martin, F. Sallusto, J. A. Suzich, A. Lanzavecchia, Q. Zhu, S. J. Gamblin, J. J. Skehel // *Cell.* – 2016. – V. 166. – № 3. – P. 596–608.
164. Karpenko I. Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1,2,4-triazine-derived inhibitor of influenza A and B virus replication / I. Karpenko, S. Deev, O. Kiselev, V. Charushin, V. Rusinov, E. Ulomsky, E. Deeva, D. Yanvarev, A. Ivanov, O. Smirnova, S. Kochetkov, O. Chupakhin, M. Kukhanova // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – V. 54. – № 5. – P. 2017–2022.
165. Kash J.C. Global host immune response: pathogenesis and transcriptional profiling of type A influenza viruses expressing the hemagglutinin and neuraminidase genes from the 1918 pandemic virus / J. C. Kash, C. F. Basler, A. García-Sastre, V. Carter, R. Billharz, D. E. Swayne, R. M. Przygodzki, J. K. Taubenberger, M. G. Katze, T. M. Tumpey // *J. Virol.* – 2004. – V. 78. – № 17. – P. 9499–9511.

166. Kash J.C. Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis / J. C. Kash, D. M. Cunningham, M. W. Smit, Y. Park, D. Fritz, J. Wilusz, M. G. Katze // *J. Virol.* – 2002. – V. 76. – № 20. – P. 10417–26.
167. Kash J.C. Global suppression of the host antiviral response by Ebola- and Marburgviruses: increased antagonism of the type I interferon response is associated with enhanced virulence / J. C. Kash, E. Mühlberger, V. Carter, M. Grosch, O. Perwitasari, S. C. Proll, M. J. Thomas, F. Weber, H.-D. Klenk, M. G. Katze // *J. Virol.* – 2006. – V. 80. – № 6. – P. 3009–20.
168. Kash J.C. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus / J. C. Kash, T. M. Tumpey, S. C. Proll, V. Carter, O. Perwitasari, M. J. Thomas, C. F. Basler, P. Palese, J. K. Taubenberger, A. García-Sastre, D. E. Swayne, M. G. Katze, A. Garcia-Sastre, D. E. Swayne, M. G. Katze // *Nature.* – 2006. – V. 443. – № 7111. – P. 578–581.
169. Kato-Maeda M. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts / M. Kato-Maeda, Q. Gao, P. M. Small // *Cell. Microbiol.* – 2001. – V. 3. – № 11. – P. 713–719.
170. Kato H. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response / H. Kato, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, S. Akira // *Immunity.* – 2005. – V. 23. – № 1. – P. 19–28.
171. Katoh K. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability / K. Katoh, D. M. Standley // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – V. 30. – № 4. – P. 772–780.
172. Katze M.G. Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics / M. G. Katze, J. L. Fornek, R. E. Palermo, K.-A. Walters, M. J. Korth // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – V. 8. – № 8. – P. 644–654.

173. Katze M.G. Lost in the world of functional genomics, systems biology, and translational research: Is there life after the Milstein award? / M. G. Katze, M. J. Korth // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2007. – V. 18. – № 5–6. – P. 441–450.
174. Kaufmann A. Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system / A. Kaufmann, R. Salentin, R. G. Meyer, D. Bussfeld, C. Pauligk, H. Fesq, P. Hofmann, M. Nain, D. Gemsa, H. Sprenger // *Immunobiology.* – 2001. – V. 204. – № 5. – P. 603–13.
175. Kesimer M. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense / M. Kesimer, M. Scull, B. Brighton, G. DeMaria, K. Burns, W. O’Neal, R. J. Pickles, J. K. Sheehan // *FASEB J.* – 2009. – V. 23. – № 6. – P. 1858.
176. Kessler N. Use of the DNA Flow-Thru Chip, a Three-Dimensional Biochip, for Typing and Subtyping of Influenza Viruses / N. Kessler, O. Ferraris, K. Palmer, W. Marsh, A. Steel // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – V. 42. – № 5. – P. 2173–2185.
177. Kido H. Proteases essential for human influenza virus entry into cells and their inhibitors as potential therapeutic agents / H. Kido, Y. Okumura, H. Yamada, T. Q. Le, M. Yano // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – V. 13. – № 4. – P. 405–14.
178. Klotchenko S.A. Oligonucleotide microarray for subtyping of influenza A viruses // *J. Phys. Conf. Ser.* – 2012. – V. 345. – № 5. – P. 12041.
179. Kochs G. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein / G. Kochs, A. García-Sastre, L. Martínez-Sobrido // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 13. – P. 7011–21.
180. Komadina N. A Historical Perspective of Influenza A(H1N2) Virus / N. Komadina, J. McVernon, R. Hall, K. Leder // *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – V. 20. – № 1. – P. 6–12.
181. Koszalka P. Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial / P. Koszalka, D. Tilmanis, A. C. Hurt // *Influenza Other Respi. Viruses.* – 2017. – V. 11. – № 3. – P. 240–246.

182. Krauss S. Influenza virus isolation / S. Krauss, D. Walker, R. G. Webster // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – V. 865. – P. 11–24.
183. Kuiken T. Pathology of human influenza revisited / T. Kuiken, J. K. Taubenberger // *Vaccine.* – 2008. – V. 26. Suppl 4. – P. D59-66.
184. Kumar H. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses / H. Kumar, T. Kawai, H. Kato, S. Sato, K. Takahashi, C. Coban, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. J. Ishii, O. Takeuchi, S. Akira // *J. Exp. Med.* – 2006. – V. 203. – № 7. – P. 1795–803.
185. Kuo R.-L. Influenza A virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells / R.-L. Kuo, R. M. Krug // *J. Virol.* – 2009. – V. 83. – № 4. – P. 1611–6.
186. Kuznetsova I. Adaptive mutation in nuclear export protein allows stable transgene expression in a chimaeric influenza A virus vector / I. Kuznetsova, A.-P. S. Shurygina, B. Wolf, M. Wolschek, F. Enzmann, A. Sansyzybay, B. Khairullin, N. Sandybayev, M. Stukova, O. Kiselev, A. Egorov, M. Bergmann // *J. Gen. Virol.* – 2014. – V. 95. – № Pt 2. – P. 337–49.
187. Landeras-Bueno S. The splicing factor proline-glutamine rich (SFPQ/PSF) is involved in influenza virus transcription / S. Landeras-Bueno, N. Jorba, M. Pérez-Cidoncha, J. Ortín // *PLoS Pathog.* – 2011. – V. 7. – № 11. – P. e1002397.
188. Law G.L. Systems virology: host-directed approaches to viral pathogenesis and drug targeting / G. L. Law, M. J. Korth, A. G. Benecke, M. G. Katze // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – V. 11. – № 7. – P. 455–66.
189. Lee Y.-A. Binding of meso-tetrakis(N-methylpyridium-4-yl)porphyrin to triplex oligonucleotides: evidence for the porphyrin stacking in the major groove / Y.-A. Lee, J.-O. Kim, T.-S. Cho, R. Song, S. K. Kim // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125. – № 27. – P. 8106–7.

190. Lee Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density / Lee, Yang, Parr // *Phys. Rev. B. Condens. Matter.* – 1988. – V. 37. – № 2. – P. 785–789.
191. Li J. Typing and Subtyping Influenza Virus Using DNA Microarrays and Multiplex Reverse Transcriptase PCR / J. Li, S. H. U. Chen, D. H. Evans // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – V. 39. – № 2. – P. 696–704.
192. Li T. NF90 is a novel influenza A virus NS1-interacting protein that antagonizes the inhibitory role of NS1 on PKR phosphorylation / T. Li, X. Li, W. F. Zhu, H. Y. Wang, L. Mei, S. Q. Wu, X. M. Lin, X. Q. Han // *FEBS Lett.* – 2016. – P. 2797–2810.
193. Li X. Detection and subtyping of influenza A virus based on a short oligonucleotide microarray / X. Li, X. Qi, L. Miao, Y. Wang, F. Liu, H. Gu, S. Lu, Y. Yang, F. Liu // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – V. 65. – № 3. – P. 261–270.
194. Li Y. Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85 $\beta$ , but not the p85 $\alpha$ , subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity / Y. Li, D. H. Anderson, Q. Liu, Y. Zhou // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283. – № 34. – P. 23397–23409.
195. Li Y. The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo / Y. Li, Z. Y. Chen, W. Wang, C. C. Baker, R. M. Krug // *RNA.* – 2001. – V. 7. – № 6. – P. 920–31.
196. Li Y. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein / Y. Li, Y. Yamakita, R. M. Krug // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – V. 95. – № 9. – P. 4864–9.
197. Lim J.J. Two Phase 1, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single-Ascending-Dose Studies To Investigate the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of an Anti-Influenza A Virus Monoclonal Antibody, MHAA4549A, in Healthy Volunteers / J. J. Lim, R. Deng, M. A. Derby, R. Larouche, P. Horn, M. Anderson, M. Maia, S. Carrier, I. Pelletier, T. Burgess,

- P. Kulkarni, E. Newton, J. A. Tavel // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2016. – V. 60. – № 9. – P. 5437–44.
198. Lin C.-H. NEUROLOGIC MANIFESTATIONS IN CHILDREN WITH INFLUENZA B VIRUS INFECTION / C.-H. Lin, Y.-C. Huang, C.-H. Chiu, C.-G. Huang, K.-C. Tsao, T.-Y. Lin // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2006. – V. 25. – № 11. – P. 1081–1083.
199. Liu H. The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble / H. Liu, L. Golebiewski, E. C. Dow, R. M. Krug, R. T. Javier, A. P. Rice // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – № 21. – P. 11164–74.
200. Liu J. Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein / J. Liu, P. A. Lynch, C. Y. Chien, G. T. Montelione, R. M. Krug, H. M. Berman // *Nat. Struct. Biol.* – 1997. – V. 4. – № 11. – P. 896–9.
201. Liu Q. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy / Q. Liu, Y. Zhou, Z. Yang // *Cell. Mol. Immunol.* – 2016. – V. 13. – № 1. – P. 3–10.
202. Liu S.Y. Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol / S. Y. Liu, R. Aliyari, K. Chikere, G. Li, M. D. Marsden, J. K. Smith, O. Pernet, H. Guo, R. Nusbaum, J. A. Zack, A. N. Freiberg, L. Su, B. Lee, G. Cheng // *Immunity.* – 2013. – V. 38. – № 1. – P. 92–105.
203. Liu Y. DNA binding and photocleavage properties and apoptosis-inducing activities of a ruthenium porphyrin complex [(Py-3')TPP-Ru(phen)<sub>2</sub>Cl]Cl and its heterometallic derivatives / Y. Liu, T. Chen, Y.-S. Wong, W.-J. Mei, X.-M. Huang, F. Yang, J. Liu, W.-J. Zheng // *Chem. Biol. Interact.* – 2010. – V. 183. – № 3. – P. 349–56.
204. Llompart C.M. Specific residues of PB2 and PA influenza virus polymerase subunits confer the ability for RNA polymerase II degradation and virus

- pathogenicity in mice / C. M. Llompart, A. Nieto, A. Rodriguez-Frandsen // *J. Virol.* – 2014. – V. 88. – № 6. – P. 3455–63.
205. Long J.-X. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene / J.-X. Long, D.-X. Peng, Y.-L. Liu, Y.-T. Wu, X.-F. Liu // *Virus Genes.* – 2008. – V. 36. – № 3. – P. 471–8.
206. Long J.S. Species difference in ANP32A underlies influenza A virus polymerase host restriction / J. S. Long, E. S. Giotis, O. Moncorgé, R. Frise, B. Mistry, J. James, M. Morisson, M. Iqbal, A. Vignal, M. A. Skinner, W. S. Barclay // *Nature.* – 2016. – V. 529. – № 7584. – P. 101–4.
207. Loveday E.-K. Human microRNA-24 modulates highly pathogenic avian-origin H5N1 influenza A virus infection in A549 cells by targeting secretory pathway furin / E.-K. Loveday, S. Diederich, J. Pasick, F. Jean // *J. Gen. Virol.* – 2015. – V. 96. – № Pt 1. – P. 30–9.
208. Ma-Lauer Y. Virus-host interactomes - Antiviral drug discovery / Y. Ma-Lauer, J. Lei, R. Hilgenfeld, A. Von Brunn // *Curr. Opin. Virol.* – 2012. – V. 2. – № 5. – P. 614–621.
209. Maillard P. V. Antiviral RNA interference in mammalian cells / P. V. Maillard, C. Ciaudo, A. Marchais, Y. Li, F. Jay, S. W. Ding, O. Voinnet // *Science.* – 2013. – V. 342. – № 6155. – P. 235–8.
210. Marc D. Influenza virus non-structural protein NS1: Interferon antagonism and beyond / D. Marc // *J. Gen. Virol.* – 2014. – V. 95. – P. 2594–2611.
211. Marc D. The RNA-binding domain of influenzavirus non-structural protein-1 cooperatively binds to virus-specific RNA sequences in a structure-dependent manner / D. Marc, S. Barbachou, D. Soubieux // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – № 1. – P. 434–449.
212. Marcos-Villar L. Influenza Virus and Chromatin: Role of the CHD1 Chromatin Remodeler in the Virus Life Cycle / L. Marcos-Villar, A. Pazo, A. Nieto // *J. Virol.* – 2016. – V. 90. – № 7. – P. 3694–707.

213. Marión R.M. Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo / R. M. Marión, T. Zürcher, S. de la Luna, J. Ortín // *J. Gen. Virol.* – 1997. – V. 78. – № Pt 10. – P. 2447–51.
214. Marston H.D. Emerging Viral Diseases: Confronting Threats with New Technologies / H. D. Marston, G. K. Folkers, D. M. Morens, A. S. Fauci // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – V. 6. – № 253. – P. 253ps10-253ps10.
215. Matrosovich M. Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding / M. Matrosovich, H.-D. Klenk // *Rev. Med. Virol.* – 2003. – V. 13. – № 2. – P. 85–97.
216. Matrosovich M. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors / M. Matrosovich, T. Matrosovich, J. Carr, N. A. Roberts, H.-D. Klenk // *J. Virol.* – 2003. – V. 77. – № 15. – P. 8418–25.
217. Matrosovich M. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals / M. Matrosovich, A. Tuzikov, N. Bovin, A. Gambaryan, A. Klimov, M. R. Castrucci, I. Donatelli, Y. Kawaoka // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – № 18. – P. 8502–12.
218. Matthay M.A. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment / M. A. Matthay, R. L. Zemans // *Annu. Rev. Pathol.* – 2011. – V. 6. – P. 147–63.
219. McAuley J.L. Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease / J. L. McAuley, M. D. Tate, C. J. MacKenzie-Kludas, A. Pinar, W. Zeng, A. Stutz, E. Latz, L. E. Brown, A. Mansell // *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9. – № 5. – P. e1003392.
220. McCullers J.A. Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor / J. A. McCullers, J. E. Rehg // *J. Infect. Dis.* – 2002. – V. 186. – № 3. – P. 341–50.

221. Melén K. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes / K. Melén, L. Kinnunen, R. Fagerlund, N. Ikonen, K. Y. Twu, R. M. Krug, I. Julkunen // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 11. – P. 5995–6006.
222. Memoli M.J. In vivo evaluation of pathogenicity and transmissibility of influenza A(H1N1)pdm09 hemagglutinin receptor binding domain 222 intrahost variants isolated from a single immunocompromised patient / M. J. Memoli, T. Bristol, K. E. Proudfoot, A. S. Davis, E. J. Dunham, J. K. Taubenberger // *Virology.* – 2012. – V. 428. – № 1. – P. 21–9.
223. Michaelis M. Glycyrrhizin exerts antioxidative effects in H5N1 influenza A virus-infected cells and inhibits virus replication and pro-inflammatory gene expression / M. Michaelis, J. Geiler, P. Naczek, P. Sithisarn, A. Leutz, H. W. Doerr, J. Cinatl // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 5. – P. e19705.
224. Min J.-Y. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis / J.-Y. Min, S. Li, G. C. Sen, R. M. Krug // *Virology.* – 2007. – V. 363. – № 1. – P. 236–43.
225. Moeller A. Organization of the influenza virus replication machinery / A. Moeller, R. N. Kirchdoerfer, C. S. Potter, B. Carragher, I. A. Wilson // *Science.* – 2012. – V. 338. – № 6114. – P. 1631–4.
226. Morens D.M. The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future / D. M. Morens, J. K. Taubenberger, H. A. Harvey, M. J. Memoli // *Crit. Care Med.* – 2010. – V. 38. – № 4. – P. e10–e20.
227. Morris D.E. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics / D. E. Morris, D. W. Cleary, S. C. Clarke // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8. JUN. – P. 1–17.
228. Mühlbauer D. Influenza virus-induced caspase-dependent enlargement of nuclear pores promotes nuclear export of viral ribonucleoprotein complexes / D. Mühlbauer, J. Dzieciolowski, M. Hardt, A. Hocke, K. L. Schierhorn, A. Mostafa, C. Müller,

- C. Wisskirchen, S. Herold, T. Wolff, J. Ziebuhr, S. Pleschka // *J. Virol.* – 2015. – V. 89. – № 11. – P. 6009–21.
229. Mulliken R.S. Electronic Population Analysis on LCAO–MO Molecular Wave Functions. I / R. S. Mulliken // *J. Chem. Phys.* – 1955. – V. 23. – № 10. – P. 1833–1840.
230. Muslimov A. Mesenchymal stem cells engineering: microcapsules assisted gene transfection and magnetic cell separation / A. Muslimov, A. S. Timin, A. Petrova, O. Epifanovskaya, A. Shakirova, K. Lepik, A. Gorshkov, E. Il'inskaja, A. Vasin, B. Afanasyev, B. Fehse, G. B. Sukhorukov // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2017. – acsbiomaterials.7b00482.
231. Nakajima K. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950 / K. Nakajima, U. Desselberger, P. Palese // *Nature.* – 1978. – V. 274. – № 5669. – P. 334–9.
232. Narasaraju T. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis / T. Narasaraju, M. K. Sim, H. H. Ng, M. C. Phoon, N. Shanker, S. K. Lal, V. T. K. Chow // *Microbes Infect.* – 2009. – V. 11. – № 1. – P. 2–11.
233. Nayak D.P. Influenza virus morphogenesis and budding / D. P. Nayak, R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou, S. Barman // *Virus Res.* – 2009. – V. 143. – № 2. – P. 147–161.
234. Nayak D.P. Assembly and budding of influenza virus / D. P. Nayak, E. K.-W. Hui, S. Barman // *Virus Res.* – 2004. – V. 106. – № 2. – P. 147–65.
235. Nemeroff M.E. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs / M. E. Nemeroff, S. M. Barabino, Y. Li, W. Keller, R. M. Krug // *Mol. Cell.* – 1998. – V. 1. – № 7. – P. 991–1000.

236. Neumann G. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1 / G. Neumann, M. T. Hughes, Y. Kawaoka // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – № 24. – P. 6751–8.
237. Nicchitta C. V. Re-evaluating the role of heat-shock protein-peptide interactions in tumour immunity / C. V. Nicchitta // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – V. 3 – № 5. – P. 427–32.
238. Nicholls J.M. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract / J. M. Nicholls, M. C. W. Chan, W. Y. Chan, H. K. Wong, C. Y. Cheung, D. L. W. Kwong, M. P. Wong, W. H. Chui, L. L. M. Poon, S. W. Tsao, Y. Guan, J. S. M. Peiris // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13. – № 2. – P. 147–9.
239. Noah D.L. 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 / D. L. Noah, K. Y. Twu, R. M. Krug // *Virology.* – 2003. – V. 307. – № 2. – P. 386–95.
240. Noda T. Packaging of influenza virus genome: Robustness of selection / T. Noda, Y. Kawaoka // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2012. – V. 109. – № 23. – P. 8797–8798.
241. Noda T. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles / T. Noda, H. Sagara, A. Yen, A. Takada, H. Kida, R. H. Cheng, Y. Kawaoka // *Nature.* – 2006. – V. 439. – № 7075. – P. 490–2.
242. Noda T. Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus / T. Noda, Y. Sugita, K. Aoyama, A. Hirase, E. Kawakami, A. Miyazawa, H. Sagara, Y. Kawaoka // *Nat. Commun.* – 2012. – V. 3. – 639.
243. Noronha J.M. Influenza virus sequence feature variant type analysis: evidence of a role for NS1 in influenza virus host range restriction / J. M. Noronha, M. Liu, R. B. Squires, B. E. Pickett, B. G. Hale, G. M. Air, S. E. Galloway, T. Takimoto, M. Schmolke, V. Hunt, E. Klem, A. García-Sastre, M. McGee, R. H. Scheuermann // *J. Virol.* – 2012. – V. 86. – № 10. – P. 5857–66.

244. Obenauer J.C. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates / J. C. Obenauer, J. Denson, P. K. Mehta, X. Su, S. Mukatira, D. B. Finkelstein, X. Xu, J. Wang, J. Ma, Y. Fan, K. M. Rakestraw, R. G. Webster, E. Hoffmann, S. Krauss, J. Zheng, Z. Zhang, C. W. Naeve // *Science*. – 2006. – V. 311. – № 5767. – P. 1576–80.
245. Oh D.Y. MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells / D. Y. Oh, I. G. Barr, J. A. Mosse, K. L. Laurie // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – V. 46. – № 7. – P. 2189–94.
246. Oldstone M.B.A. Dissecting influenza virus pathogenesis uncovers a novel chemical approach to combat the infection / M. B. A. Oldstone, J. R. Teijaro, K. B. Walsh, H. Rosen // *Virology*. – 2013. – V. 435. – № 1. – P. 92–101.
247. Onomoto K. Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity / K. Onomoto, M. Jogi, J.-S. Yoo, R. Narita, S. Morimoto, A. Takemura, S. Sambhara, A. Kawaguchi, S. Osari, K. Nagata, T. Matsumiya, H. Namiki, M. Yoneyama, T. Fujita // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – № 8. – P. e43031.
248. Osterholm M.T. Preparing for the next pandemic / M. T. Osterholm // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – V. 352. – № 18. – P. 1839–42.
249. Palese P. Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action / P. Palese, R. W. Compans // *J. Gen. Virol.* – 1976. – V. 33. – № 1. – P. 159–63.
250. Palese P. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase / P. Palese, K. Tobita, M. Ueda, R. W. Compans // *Virology*. – 1974. – V. 61. – № 2. – P. 397–410.
251. Pasieka T.J. Functional genomic analysis of herpes simplex virus type 1 counteraction of the host innate response / T. J. Pasieka, T. Baas, V. S. Carter, S. C. Proll, M. G. Katze, D. A. Leib // *J. Virol.* – 2006. – V. 80. – № 15. – P. 7600–12.

252. Peng X. Virus-host interactions: from systems biology to translational research / X. Peng, E. Y. Chan, Y. Li, D. L. Diamond, M. J. Korth, M. G. Katze // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2009. – V. 12. – № 4. – P. 432–8.
253. Perez J.T. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication / J. T. Perez, A. Varble, R. Sachidanandam, I. Zlatev, M. Manoharan, A. García-Sastre, B. R. TenOever // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107. – № 25. – P. 11525–30.
254. Perreira J.M. IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses // *J. Mol. Biol.* – 2013. – V. 425. – № 24. – P. 4937–4955.
255. Pietro A. Di TRIM22 inhibits influenza A virus infection by targeting the viral nucleoprotein for degradation / A. Di Pietro, A. Kajaste-Rudnitski, A. Oteiza, L. Nicora, G. J. Towers, N. Mechti, E. Vicenzi // *J. Virol.* – 2013. – V. 87. – № 8. – P. 4523–4533.
256. Plant E.P. Influenza Virus NS1 Protein Mutations at Position 171 Impact Innate Interferon Responses by Respiratory Epithelial Cells / E. P. Plant, N. A. Ilyushina, F. Sheikh, R. P. Donnelly, Z. Ye // *Virus Res.* – 2017.
257. Pleschka S. A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus / S. Pleschka, R. Jaskunas, O. G. Engelhardt, T. Zürcher, P. Palese, A. García-Sastre // *J. Virol.* – 1996. – V. 70. – № 6. – P. 4188–92.
258. Pleschka S. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade / S. Pleschka, T. Wolff, C. Ehrhardt, G. Hobom, O. Planz, U. R. Rapp, S. Ludwig // *Nat. Cell Biol.* – 2001. – V. 3. – № 3. – P. 301–5.
259. Plotnikova M.A. Development of a multiplex quantitative PCR assay for the analysis of human cytokine gene expression in influenza A virus-infected cells / M. A. Plotnikova, S. A. Klotchenko, A. V. Vasin // *J. Immunol. Methods.* – 2016. – V. 430. – P. 51–55.
260. Poon L.L. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template /

- L. L. Poon, D. C. Pritlove, E. Fodor, G. G. Brownlee // *J. Virol.* – 1999. – V. 73. – № 4. – P. 3473–6.
261. Powell M.J.D. Restart procedures for the conjugate gradient method / M. J. D. Powell // *Math. Program.* – 1977. – V. 12. – № 1. – P. 241–254.
262. Prasso J.E. Postviral Complications: Bacterial Pneumonia / J. E. Prasso, J. C. Deng // *Clin. Chest Med.* – 2017. – V. 38. – № 1. – P. 127–138.
263. Rajput R. Small interfering RNA targeting the nonstructural gene 1 transcript inhibits influenza A virus replication in experimental mice / R. Rajput, M. Khanna, P. Kumar, B. Kumar, S. Sharma, N. Gupta, L. Saxena // *Nucleic Acid Ther.* – 2012. – V. 22. – № 6. – P. 414–22.
264. Ramos E.L. Efficacy and safety of treatment with an anti-m2e monoclonal antibody in experimental human influenza / E. L. Ramos, J. L. Mitcham, T. D. Koller, A. Bonavia, D. W. Usner, G. Balaratnam, P. Fredlund, K. M. Swiderek // *J. Infect. Dis.* – 2015. – V. 211. – № 7. – P. 1038–44.
265. Read E.K.C. Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export / E. K. C. Read, P. Digard // *J. Gen. Virol.* – 2010. – V. 91. – № Pt 5. – P. 1290–301.
266. Reed A.E. Natural bond orbital analysis of near-Hartree–Fock water dimer / A. E. Reed, F. Weinhold // *J. Chem. Phys.* – 1983. – V. 78. – № 6. – P. 4066–4073.
267. Reed A.E. Natural population analysis / A. E. Reed, R. B. Weinstock, F. Weinhold // *J. Chem. Phys.* – 1985. – V. 83. – № 2. – P. 735–746.
268. Reed L.J. A simple method of estimating fifty percent endpoints / L. J. Reed, H. Muench // *Am. J. Epidemiol.* – 1938. – V. 27. – № 3. – P. 493–497.
269. Reich S. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase / S. Reich, D. Guilligay, A. Pflug, H. Malet, I. Berger, T. Crépin, D. Hart, T. Lunardi, M. Nanao, R. W. H. Ruigrok, S. Cusack // *Nature.* – 2014. – V. 516. – № 7531. – P. 361–6.

270. Resa-Infante P. The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication / P. Resa-Infante, N. Jorba, N. Zamarreño, Y. Fernández, S. Juárez, J. Ortín // *PLoS One*. – 2008. – V. 3. – № 12. – P. e3904.
271. Reynolds A. Rational siRNA design for RNA interference / A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall, A. Khvorova // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – V. 22. – № 3. – P. 326–30.
272. Riel D. van H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract / D. van Riel, V. J. Munster, E. de Wit, G. F. Rimmelzwaan, R. A. M. Fouchier, A. D. M. E. Osterhaus, T. Kuiken // *Science*. – 2006. – V. 312. – № 5772. – P. 399.
273. Robb N.C. The influenza A virus NS1 protein interacts with the nucleoprotein of viral ribonucleoprotein complexes / N. C. Robb, G. Chase, K. Bier, F. T. Vreede, P.-C. Shaw, N. Naffakh, M. Schwemmle, E. Fodor // *J. Virol.* – 2011. – V. 85. – № 10. – P. 5228–31.
274. Robb N.C. The accumulation of influenza A virus segment 7 spliced mRNAs is regulated by the NS1 protein / N. C. Robb, E. Fodor // *J. Gen. Virol.* – 2012. – V. 93. – № Pt 1. – P. 113–8.
275. Robb N.C. Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein / N. C. Robb, D. Jackson, F. T. Vreede, E. Fodor // *J. Gen. Virol.* – 2010. – V. 91. – № 9. – P. 2331–2340.
276. Robb N.C. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome / N. C. Robb, M. Smith, F. T. Vreede, E. Fodor // *J. Gen. Virol.* – 2009. – V. 90. – № Pt 6. – P. 1398–407.
277. Rodriguez A. Cellular human CLE/C14orf166 protein interacts with influenza virus polymerase and is required for viral replication / A. Rodriguez, A. Pérez-González, A. Nieto // *J. Virol.* – 2011. – V. 85. – № 22. – P. 12062–6.
278. Romanova J. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine / J. Romanova, B. M. Krenn, M. Wolschek, B. Ferko,

- E. Romanovskaja-Romanko, A. Morokutti, A.-P. Shurygina, S. Nakowitsch, T. Ruthsatz, B. Kiefmann, U. König, M. Bergmann, M. Sacht, S. Balasingam, A. Mann, J. Oxford, M. Slais, O. Kiselev, T. Muster, A. Egorov // *PLoS One*. – 2009. – V. 4. – № 6. – P. e5984.
279. Rosseau S. Comparative transcriptional profiling of the lung reveals shared and distinct features of *Streptococcus pneumoniae* and influenza A virus infection / S. Rosseau, A. Hocke, H. Mollenkopf, B. Schmeck, N. Suttorp, S. H. E. Kaufmann, J. Zerrahn // *Immunology*. – 2007. – V. 120. – № 3. – P. 380–91.
280. Rossignol J.F. Thiazolidines, a New Class of Anti-influenza Molecules Targeting Viral Hemagglutinin at the Post-translational Level / J. F. Rossignol, S. La Frazia, L. Chiappa, A. Ciucci, M. G. Santoro // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – № 43. – P. 29798–29808.
281. Ryabinin V.A. Universal oligonucleotide microarray for sub-typing of Influenza A virus / V. A. Ryabinin, E. V. Kostina, G. A. Maksakova, A. A. Neverov, K. M. Chumakov, A. N. Sinyakov // *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – № 4.
282. Sadler A.J. Interferon-inducible antiviral effectors / A. J. Sadler, B. R. G. Williams // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – V. 8. – № 7. – P. 559–68.
283. Salomon R. Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection / R. Salomon, E. Hoffmann, R. G. Webster // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – V. 104. – № 30. – P. 12479–81.
284. Schneider J. Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: Do they play a role in viral mRNA export? / J. Schneider, T. Wolff // *Vaccine*. – 2009. – V. 27. – № 45. – P. 6312–6316.
285. Schoggins J.W. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity / J. W. Schoggins, D. A. MacDuff, N. Imanaka, M. D. Gainey, B. Shrestha, J. L. Eitson, K. B. Mar, R. B. Richardson, A. V. Ratushny, V. Litvak, R. Dabelic, B. Manicassamy, J. D. Aitchison, A. Aderem, R. M. Elliott,

- A. García-Sastre, V. Racaniello, E. J. Snijder, W. M. Yokoyama, M. S. Diamond, H. W. Virgin, C. M. Rice // *Nature*. – 2014. – V. 505. – № 7485. – P. 691–5.
286. Schrauwen E.J.A. Determinants of virulence of influenza A virus / E. J. A. Schrauwen, M. Graaf, S. Herfst, G. F. Rimmelzwaan, A. D. M. E. Osterhaus, R. A. M. Fouchier // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2014. – V. 33. – № 4. – P. 479–490.
287. Schulz O. Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity / O. Schulz, A. Pichlmair, J. Rehwinkel, N. C. Rogers, D. Scheuner, H. Kato, O. Takeuchi, S. Akira, R. J. Kaufman, C. Reis e Sousa // *Cell Host Microbe*. – 2010. – V. 7. – № 5. – P. 354–61.
288. Seki M. Expression and DNA microarray analysis of a platelet activating factor-related molecule in severe pneumonia in mice due to influenza virus and bacterial co-infection / M. Seki, K. Kosai, A. Hara, Y. Imamura, S. Nakamura, S. Kurihara, K. Izumikawa, H. Kakeya, Y. Yamamoto, K. Yanagihara, Y. Miyazaki, H. Mukae, T. Tashiro, S. Kohno // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2009. – V. 62. – № 1. – P. 6–10.
289. Sengupta S. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization / S. Sengupta, K. Onodera // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – V. 41. – № 10. – P. 4542–4550.
290. Seo S.-U. MyD88 signaling is indispensable for primary influenza A virus infection but dispensable for secondary infection / S.-U. Seo, H.-J. Kwon, J.-H. Song, Y.-H. Byun, B. L. Seong, T. Kawai, S. Akira, M.-N. Kweon // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – № 24. – P. 12713–22.
291. Seo S.H. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses / S. H. Seo, E. Hoffmann, R. G. Webster // *Nat. Med.* – 2002. – V. 8. – № 9. – P. 950–4.
292. Seo Y.-J. Sphingosine kinase 1 serves as a pro-viral factor by regulating viral RNA synthesis and nuclear export of viral ribonucleoprotein complex upon influenza

- virus infection / Y.-J. Seo, C. J. Pritzl, M. Vijayan, K. Bomb, M. E. McClain, S. Alexander, B. Hahm // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 8. – P. e75005.
293. Sereinig S. Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4<sup>+</sup> Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge / S. Sereinig, M. Stukova, N. Zabolotnyh, B. Ferko, C. Kittel, J. Romanova, T. Vinogradova, H. Katinger, O. Kiselev, A. Egorov // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – V. 13. – № 8. – P. 898–904.
294. Shapira S.D. A Physical and Regulatory Map of Host-Influenza Interactions Reveals Pathways in H1N1 Infection / S. D. Shapira, I. Gat-Viks, B. O. V. Shum, A. Dricot, M. M. de Grace, L. Wu, P. B. Gupta, T. Hao, S. J. Silver, D. E. Root, D. E. Hill, A. Regev, N. Hacohen // *Cell*. – 2009. – V. 139. – № 7. – P. 1255–1267.
295. Sharma-Chawla N. Influenza A Virus Infection Predisposes Hosts to Secondary Infection with Different *Streptococcus pneumoniae* Serotypes with Similar Outcome but Serotype-Specific Manifestation / N. Sharma-Chawla, V. Sender, O. Kershaw, A. D. Gruber, J. Volckmar, B. Henriques-Normark, S. Stegemann-Koniszewski, D. Bruder // *Infect. Immun.* – 2016. – V. 84. – № 12. – P. 3445–3457.
296. Shaw M.L. Role of Host Genes in Influenza Virus Replication / M. L. Shaw, S. Stertz // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2017.
297. Shaw M.L. Cellular proteins in influenza virus particles / M. L. Shaw, K. L. Stone, C. M. Colangelo, E. E. Gulcicek, P. Palese // *PLoS Pathog.* – 2008. – V. 4. – № 6. – P. 1–13.
298. Shi M. Evolutionary conservation of the PA-X open reading frame in segment 3 of influenza A virus / M. Shi, B. W. Jagger, H. M. Wise, P. Digard, E. C. Holmes, J. K. Taubenberger // *J. Virol.* – 2012. – V. 86. – № 22. – P. 12411–3.
299. Shin Y.-K. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation / Y.-K. Shin, Y. Li, Q. Liu, D. H. Anderson, L. A. Babiuk, Y. Zhou // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 23. – P. 12730–9.

300. Shinya K. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway / K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai, Y. Kawaoka // *Nature*. – 2006. – V. 440. – № 7083. – P. 435–6.
301. Short K.R. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome / K. R. Short, E. J. B. V. Kroeze, R. A. M. Fouchier, T. Kuiken // *Lancet Infect. Dis.* – 2014. – V. 14. – № 1. – P. 57–69.
302. Silverman R.H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response / R. H. Silverman // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 23. – P. 12720–9.
303. Smith D.R. Inhibition of heat-shock protein 90 reduces Ebola virus replication / D. R. Smith, S. McCarthy, A. Chrovian, G. Olinger, A. Stossel, T. W. Geisbert, L. E. Hensley, J. H. Connor // *Antiviral Res.* – 2010. – V. 87. – № 2. – P. 187–94.
304. Smith G.J.D. Dating the emergence of pandemic influenza viruses / G. J. D. Smith, J. Bahl, D. Vijaykrishna, J. Zhang, L. L. M. Poon, H. Chen, R. G. Webster, J. S. M. Peiris, Y. Guan // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – V. 106. – № 28. – P. 11709–11712.
305. Soubies S.M. Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence / S. M. Soubies, C. Volmer, G. Croville, J. Loupiau, B. Peralta, P. Costes, C. Lacroux, J.-L. Guérin, R. Volmer // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – № 13. – P. 6733–47.
306. South Dakota State University New virus gets official name, influenza D / South Dakota State University // *ScienceDaily*. – 2016.
307. Spesock A. The virulence of 1997 H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins / A. Spesock, M. Malur, M. J. Hossain, L.-M. Chen, B. L. Njaa, C. T. Davis, A. S. Lipatov, I. A. York, R. M. Krug, R. O. Donis // *J. Virol.* – 2011. – V. 85. – № 14. – P. 7048–58.

308. Stamatakis A. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees / A. Stamatakis, T. Ludwig, H. Meier // *Bioinformatics*. – 2005. – V. 21. – № 4. – P. 456–463.
309. Stasakova J. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18 / J. Stasakova, B. Ferko, C. Kittel, S. Sereinig, J. Romanova, H. Katinger, A. Egorov // *J. Gen. Virol.* – 2005. – V. 86. – № Pt 1. – P. 185–95.
310. Steinbacher J.L. Adsorption and release of siRNA from porous silica / J. L. Steinbacher, C. C. Landry // *Langmuir*. – 2014. – V. 30. – № 15. – P. 4396–405.
311. Steinhauer D.A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus / D. A. Steinhauer // *Virology*. – 1999. – V. 258. – № 1. – P. 1–20.
312. Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications / J. J. P. Stewart // *J. Comput. Chem.* – 1989. – V. 10. – № 2. – P. 221–264.
313. Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters / J. J. P. Stewart // *J. Mol. Model.* – 2013. – V. 19. – № 1. – P. 1–32.
314. Subbarao E.K. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range / E. K. Subbarao, W. London, B. R. Murphy // *J. Virol.* – 1993. – V. 67. – № 4. – P. 1761–4.
315. Sugiyama K. pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis from cRNA / K. Sugiyama, A. Kawaguchi, M. Okuwaki, K. Nagata // *Elife*. – 2015. – V. 4.
316. Sultankulova K.T. Comparative Evaluation of Effectiveness of IAVchip DNA Microarray in Influenza A Diagnosis / K. T. Sultankulova, O. V Chervyakova, N. S. Kozhabergenov, K. A. Shorayeva, V. M. Strochkov, M. B. Orynbayev,

- N. T. Sandybayev, A. R. Sansyzbay, A. V Vasin // *Sci. World J.* – 2014. – V. 2014. – P. 1–11.
317. Szklarczyk D. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible / D. Szklarczyk, J. H. Morris, H. Cook, M. Kuhn, S. Wyder, M. Simonovic, A. Santos, N. T. Doncheva, A. Roth, P. Bork, L. J. Jensen, C. von Mering // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – № D1. – P. D362–D368.
318. Szretter K.J. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 influenza viruses in mice / K. J. Szretter, S. Gangappa, X. Lu, C. Smith, W.-J. Shieh, S. R. Zaki, S. Sambhara, T. M. Tumpey, J. M. Katz // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 6. – P. 2736–44.
319. Takeda M. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion / M. Takeda, G. P. Leser, C. J. Russell, R. A. Lamb // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2003. – V. 100. – № 25. – P. 14610–7.
320. Tal M.C. Mitoxosome: a mitochondrial platform for cross-talk between cellular stress and antiviral signaling / M. C. Tal, A. Iwasaki // *Immunol. Rev.* – 2011. – V. 243. – № 1. – P. 215–34.
321. Tan S.-L. Systems biology and the host response to viral infection / S.-L. Tan, G. Ganji, B. Paeper, S. Proll, M. G. Katze // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – V. 25. – № 12. – P. 1383–1389.
322. Tashiro M. Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity / M. Tashiro, P. Ciborowski, M. Reinacher, G. Pulverer, H. D. Klenk, R. Rott // *Virology.* – 1987. – V. 157. – № 2. – P. 421–30.
323. Taubenberger J.K. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation / J. K. Taubenberger, J. C. Kash // *Cell Host Microbe.* – 2010. – V. 7. – № 6. – P. 440–451.

324. Taubenberger J.K. 1918 Influenza: The mother of all pandemics / J. K. Taubenberger, D. M. Morens // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – V. 12. – № 1. – P. 15–22.
325. Terrier O. Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication / O. Terrier, C. Carron, B. De Chasse, P. Shannon // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 29006.
326. Tharakaraman K. Broadly neutralizing influenza hemagglutinin stem-specific antibody CR8020 targets residues that are prone to escape due to host selection pressure / K. Tharakaraman, V. Subramanian, D. Cain, V. Sasisekharan, R. Sasisekharan // *Cell Host Microbe.* – 2014. – V. 15. – № 5. – P. 644–51.
327. Thomas M.J. Functional gene analysis of individual response to challenge of SIVmac239 in *M. mulatta* PBMC culture / M. J. Thomas, M. B. Agy, S. C. Proll, B. W. Paeper, Y. Li, K. L. Jensen, M. J. Korth, M. G. Katze // *Virology.* – 2006. – V. 348. – № 1. – P. 242–52.
328. Thomas P.G. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1 / P. G. Thomas, P. Dash, J. R. Aldridge, A. H. Ellebedy, C. Reynolds, A. J. Funk, W. J. Martin, M. Lamkanfi, R. J. Webby, K. L. Boyd, P. C. Doherty, T.-D. Kanneganti // *Immunity.* – 2009. – V. 30. – № 4. – P. 566–75.
329. Thompson B.T. Acute Respiratory Distress Syndrome / B. T. Thompson, R. C. Chambers, K. D. Liu // *N. Engl. J. Med.* – 2017. – V. 377. – № 6. – P. 562–572.
330. Throsby M. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells / M. Throsby, E. van den Brink, M. Jongeneelen, L. L. M. Poon, P. Alard, L. Cornelissen, A. Bakker, F. Cox, E. van Deventer, Y. Guan, J. Cinatl, J. ter Meulen, I. Lasters, R. Carsetti, M. Peiris, J. de Kruif, J. Goudsmit // *PLoS One.* – 2008. – V. 3. – № 12. – P. e3942.

331. Thulasi Raman S.N. Networks of Host Factors that Interact with NS1 Protein of Influenza A Virus / S. N. Thulasi Raman, Y. Zhou // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7. May. – P. 654.
332. Timin A.S. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection / A. S. Timin, A. R. Muslimov, A. V. Petrova, K. V. Lepik, M. V. Okilova, A. V. Vasin, B. V. Afanasyev, G. B. Sukhorukov // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 102.
333. Tomassini J.E. A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses / J. E. Tomassini, M. E. Davies, J. C. Hastings, R. Lingham, M. Mojena, S. L. Raghoobar, S. B. Singh, J. S. Tkacz, M. A. Goetz // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1996. – V. 40. – № 5. – P. 1189–93.
334. Tompkins S.M. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo / S. M. Tompkins, C.-Y. Lo, T. M. Tumpey, S. L. Epstein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – V. 101. – № 23. – P. 8682–6.
335. Tong S. New world bats harbor diverse influenza A viruses / S. Tong, X. Zhu, Y. Li, M. Shi, J. Zhang, M. Bourgeois, H. Yang, X. Chen, S. Recuenco, J. Gomez, L.-M. Chen, A. Johnson, Y. Tao, C. Dreyfus, W. Yu, R. McBride, P. J. Carney, A. T. Gilbert, J. Chang, Z. Guo, C. T. Davis, J. C. Paulson, J. Stevens, C. E. Rupprecht, E. C. Holmes, I. A. Wilson, R. O. Donis // *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9. – № 10. – P. e1003657.
336. Totrov M. Protein-Ligand docking as an Energy Optimization Problem / R.B. Raffa. John Wiley & Sons, Ltd. – 2001. – P. 603–624.
337. Trifonov V. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus / V. Trifonov, H. Khiabani, R. Rabadan // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – V. 361. – № 2. – P. 115–9.
338. Tsybalova L.M. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of

- M2e / L. M. Tsybalova, L. A. Stepanova, V. V. Kuprianov, E. A. Blokhina, M. V. Potapchuk, A. V. Korotkov, A. N. Gorshkov, M. A. Kasyanenko, N. V. Ravin, O. I. Kiselev // *Vaccine*. – 2015. – V. 33. – № 29. – P. 3398–3406.
339. Tumpey T.M. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus / T. M. Tumpey, C. F. Basler, P. V Aguilar, H. Zeng, A. Solórzano, D. E. Swayne, N. J. Cox, J. M. Katz, J. K. Taubenberger, P. Palese, A. García-Sastre // *Science*. – 2005. – V. 310. – № 5745. – P.77–80.
340. Tumpey T.M. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission / T. M. Tumpey, T. R. Maines, N. Van Hoeven, L. Glaser, A. Solórzano, C. Pappas, N. J. Cox, D. E. Swayne, P. Palese, J. M. Katz, A. García-Sastre // *Science*. – 2007. – V. 315. – № 5812. – P. 655–9.
341. Turrell L. Regulation of influenza A virus nucleoprotein oligomerization by phosphorylation / L. Turrell, E. C. Hutchinson, F. T. Vreede, E. Fodor // *J. Virol.* – 2015. – V. 89. – № 2. – P. 1452–5.
342. Turrell L. The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes / L. Turrell, J. W. Lyall, L. S. Tiley, E. Fodor, F. T. Vreede // *Nat. Commun.* – 2013. – V. 4. – P. 1591.
343. Twu K.Y. The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells / K. Y. Twu, R.-L. Kuo, J. Marklund, R. M. Krug // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 15. – P. 8112–21.
344. Varga Z.T. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein / Z. T. Varga, I. Ramos, R. Hai, M. Schmolke, A. García-Sastre, A. Fernandez-Sesma, P. Palese // *PLoS Pathog.* – 2011. – V. 7. – № 6. – P. e1002067.
345. Vasin A. Phylogenetic Analysis of Six-Domain Multi-Copper Blue Proteins / A. Vasin, S. Klotchenko, L. Puchkova // *PLoS Curr.* – 2013. March 2013.
346. Vasin A. V. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure / A. V. Vasin, A. V. Petrova,

- V. V. Egorov, M. A. Plotnikova, S. A. Klotchenko, M. N. Karpenko, O. I. Kiselev // *BMC Res. Notes.* – 2016. – V. 9. – № 1. – P. 279.
347. Vasin A. V Universal diagnostic oligonucleotide microarray for subtyping of human and animal influenza A viruses / A. V. Vasin, N. T. Sandybaev, M. A. Plotnikova, S. A. Klotchenko, O. V. Cherviakova, V. M. Stochkov, É. T. Taïlakova, O. A. Temkina, A. V Brodskaia, I. A. Zabrodskaia, K. P. Nikulenkov, V. V. Egorov, Z. K. Koshemetov, A. R. Sancyzbaï, O. I. Kiselev // *Vopr. Virusol.* – 2014. – V. 58. – № 5. – P. 32–7.
348. Vasin A. V. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins / A. V. Vasin, O. A. Temkina, V. V. Egorov, S. A. Klotchenko, M. A. Plotnikova, O. I. Kiselev // *Virus Res.* – 2014. – V. 185. – P. 53–63.
349. Vasin A. V. Multisegment one-step RT-PCR fluorescent labeling of influenza A virus genome for use in diagnostic microarray applications / A. V. Vasin, N. T. Sandybaev, M. A. Plotnikova, S. A. Klotchenko, O. V. Chervyakova, V. M. Stochkov, E. T. Taylakova, E. A. Elpaeva, A. B. Komissarov, V. V. Egorov, J. K. Koshemetov, O. I. Kiselev, S. M. Mamadaliev // *J. Phys. Conf. Ser.* – 2011. – V. 291. – P. 12006.
350. Velthuis A.J.W. The role of the priming loop in influenza A virus RNA synthesis / A. J. W. Velthuis, N. C. Robb, A. N. Kapanidis, E. Fodor // *Nat. Microbiol.* – 2016. – V. 1. – № 5. – P. 1–7.
351. Velthuis A.J.W. te Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis / A. J. W. te Velthuis, E. Fodor // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2016. – V. 14. – № 8. – P. 479–493.
352. Vemula S. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans / S. Vemula, J. Zhao, J. Liu, X. Wang, S. Biswas, I. Hewlett // *Viruses.* – 2016. – V. 8. – № 4. – P. 96.

353. Ver L.S. The Cellular Factor NXP2/MORC3 Is a Positive Regulator of Influenza Virus Multiplication / L. S. Ver, L. Marcos-Villar, S. Landeras-Bueno, A. Nieto, J. Ortín // *J. Virol.* – 2015. – V. 89. – № 19. – P. 10023–30.
354. Vincent A. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research / A. Vincent, L. Awada, I. Brown, H. Chen, F. Claes, G. Dauphin, R. Donis, M. Culhane, K. Hamilton, N. Lewis, E. Mumford, T. Nguyen, S. Parchariyanon, J. Pasick, G. Pavade, A. Pereda, M. Peiris, T. Saito, S. Swenson, K. Van Reeth, R. Webby, F. Wong, J. Ciacci-Zanella // *Zoonoses Public Health.* – 2014. – V. 61. – № 1. – P. 4–17.
355. Vreede F.T. Mechanisms and functional implications of the degradation of host RNA polymerase II in influenza virus infected cells / F. T. Vreede, A. Y. Chan, J. Sharps, E. Fodor // *Virology.* – 2010. – V. 396. – № 1. – P. 125–34.
356. Vreede F.T. The role of the influenza virus RNA polymerase in host shut-off / F. T. Vreede, E. Fodor // *Virulence.* – 2010. – V. 1. – № 5. – P. 436–9.
357. Wagner R. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections / R. Wagner, M. Matrosovich, H.-D. Klenk // *Rev. Med. Virol.* – 2002. – V. 12. – № 3. – P. 159–66.
358. Wang C. Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase / C. Wang, W. Li, J. Ren, J. Fang, H. Ke, W. Gong, W. Feng, C.-C. Wang // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – V. 19. – № 1. – P. 36–45.
359. Wang D. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays / D. Wang, A. Urisman, Y. T. Liu, M. Springer, T. G. Ksiazek, D. D. Erdman, E. R. Mardis, M. Hickenbotham, V. Magrini, J. Eldred, J. P. Latreille, R. K. Wilson, D. Ganem, J. L. DeRisi // *PLoS Biol.* – 2003. – V. 1. – № 2.
360. Wang J. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers / J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes, J. L.-S. Au // *AAPS J.* – 2010. – V. 12. – № 4. – P. 492–503.

361. Wang L. Comparative influenza protein interactomes identify the role of plakophilin 2 in virus restriction / L. Wang, B. Fu, W. Li, G. Patil, L. Liu, M. E. Dorf, S. Li // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – P. 13876.
362. Wang W. 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 / W. Wang, K. Riedel, P. Lynch, C. Y. Chien, G. T. Montelione, R. M. Krug // *RNA.* – 1999. – V. 5. – № 2. – P. 195–205.
363. Wang X. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts / X. Wang, E. R. Hinson, P. Cresswell // *Cell Host Microbe.* – 2007. – V. 2. – № 2. – P. 96–105.
364. Watanabe K. Identification of Hsc70 as an influenza virus matrix protein (M1) binding factor involved in the virus life cycle / K. Watanabe, T. Fuse, I. Asano, F. Tsukahara, Y. Maru, K. Nagata, K. Kitazato, N. Kobayashi // *FEBS Lett.* – 2006. – V. 580. – № 24. – P. 5785–90.
365. Watanabe K. Nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex: Interaction of Hsc70 with viral proteins M1 and NS2 / K. Watanabe, T. Shimizu, S. Noda, F. Tsukahara, Y. Maru, N. Kobayashi // *FEBS Open Bio.* – 2014. – V. 4. – P. 683–8.
366. Watanabe K. Hsc70 regulates the nuclear export but not the import of influenza viral RNP: A possible target for the development of anti-influenza virus drugs / K. Watanabe, N. Takizawa, S. Noda, F. Tsukahara, Y. Maru, N. Kobayashi // *Drug Discov. Ther.* – 2008. – V. 2. – № 2. – P. 77–84.
367. Watanabe T. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle / T. Watanabe, S. Watanabe, Y. Kawaoka // *Cell Host Microbe.* – 2010. – V. 7. – № 6. – P. 427–439.
368. Waterhouse A.M. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench / A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, G. J. Barton // *Bioinformatics.* – 2009. – V. 25. – № 9. – P. 1189–1191.

369. Webster R.G. Evolution and ecology of influenza A viruses / R. G. Webster, W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers, Y. Kawaoka // *Microbiol. Rev.* – 1992. – V. 56. – № 1. – P. 152–79.
370. Wesson L. Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution / L. Wesson, D. Eisenberg // *Protein Sci.* – 1992. – V. 1. – № 2. – P. 227–35.
371. WHO Up to 650 000 people die of respiratory diseases linked to seasonal flu each year// News release [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/seasonal-flu/en/>.
372. Wit E. de Molecular determinants of adaptation of highly pathogenic avian influenza H7N7 viruses to efficient replication in the human host / E. de Wit, V. J. Munster, D. van Riel, W. E. P. Beyer, G. F. Rimmelzwaan, T. Kuiken, A. D. M. E. Osterhaus, R. A. M. Fouchier // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – № 3. – P. 1597–606.
373. Wu C.-Y. The SUMOylation of matrix protein M1 modulates the assembly and morphogenesis of influenza A virus / C.-Y. Wu, K.-S. Jeng, M. M.-C. Lai // *J. Virol.* – 2011. – V. 85. – № 13. – P. 6618–28.
374. Wurzer W.J. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation / W. J. Wurzer, O. Planz, C. Ehrhardt, M. Giner, T. Silberzahn, S. Pleschka, S. Ludwig // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – № 11. – P. 2717–28.
375. Xu J. Molecular phylogeny and evolutionary dynamics of influenza A nonstructural (NS) gene / J. Xu, H. A. Zhong, A. Madrahimov, T. Helikar, G. Lu // *Infect. Genet. Evol.* – 2014. – V. 22. – P. 192–200.
376. Yamayoshi S. Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus / S. Yamayoshi, M. Watanabe, H. Goto, Y. Kawaoka // *J. Virol.* – 2015. – V. 90. – № 1. – P. 444–56.
377. Yao M. Bezafibrate upregulates carnitine palmitoyltransferase II expression and promotes mitochondrial energy crisis dissipation in fibroblasts of patients with

- influenza-associated encephalopathy / M. Yao, D. Yao, M. Yamaguchi, J. Chida, D. Yao, H. Kido // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. – V. 104. – № 3. – P. 265–72.
378. Yin C. Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses / C. Yin, J. A. Khan, G. V. T. Swapna, A. Ertekin, R. M. Krug, L. Tong, G. T. Montelione // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – № 28. – P. 20584–92.
379. Yoneyama M. RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity / M. Yoneyama, T. Fujita // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2007. – V. 18. – № 5–6. – P. 545–51.
380. York A. Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell / A. York, E. Fodor // *RNA Biol.* – 2013. – V. 10. – № 8. – P. 1274–82.
381. York A. Isolation and characterization of the positive-sense replicative intermediate of a negative-strand RNA virus / A. York, N. Hengrung, F. T. Vreede, J. T. Huiskonen, E. Fodor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – V. 110. – № 45. – P. E4238-45.
382. Zenilman J.M. Phase 1 clinical trials of DAS181, an inhaled sialidase, in healthy adults / J. M. Zenilman, E. J. Fuchs, C. W. Hendrix, C. Radebaugh, R. Jura, S. U. Nayak, R. G. Hamilton, J. McLeod Griffiss // *Antiviral Res.* – 2015. – V. 123. – P. 114–9.
383. Zhang C. The NS1 protein of influenza A virus interacts with heat shock protein Hsp90 in human alveolar basal epithelial cells: Implication for virus-induced apoptosis / C. Zhang, Y. Yang, X. Zhou, Z. Yang, X. Liu, Z. Cao, H. Song, Y. He, P. Huang // *Virol. J.* – 2011. – V. 8. – № 1. – P. 181.
384. Zhang L. Systems-based candidate genes for human response to influenza infection / L. Zhang, J. M. Katz, M. Gwinn, N. F. Dowling, M. J. Khoury // *Infect. Genet. Evol.* – 2009. – V. 9. – № 6. – P. 1148–1157.

385. Zhang W.D. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction / W. D. Zhang, D. H. Evans // *J. Virol. Methods.* – 1991. – V. 33. – № 1–2. – P. 165–89.
386. Zheng B.-J. Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus / B.-J. Zheng, K.-W. Chan, Y.-P. Lin, G.-Y. Zhao, C. Chan, H.-J. Zhang, H.-L. Chen, S. S. Y. Wong, S. K. P. Lau, P. C. Y. Woo, K.-H. Chan, D.-Y. Jin, K.-Y. Yuen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – V. 105. – № 23. – P. 8091–6.
387. Zheng C. MiR-16-5p mediates a positive feedback loop in EV71-induced apoptosis and suppresses virus replication / C. Zheng, Z. Zheng, J. Sun, Y. Zhang, C. Wei, X. Ke, Y. Liu, L. Deng, H. Wang // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 16422.
388. Zheng W. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex / W. Zheng, Y. J. Tao // *FEBS Lett.* – 2013. – V. 587. – № 8. – P. 1206–1214.
389. Zhirnov O.P. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza / O. P. Zhirnov, H. D. Klenk, P. F. Wright // *Antiviral Res.* – 2011. – V. 92. – № 1. – P. 27–36.
390. Zhou B. Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin / B. Zhou, M. E. Donnelly, D. T. Scholes, K. S. George, M. Hatta, Y. Kawaoka, D. E. Wentworth, S. George, E. David // *Society.* – 2009. – V. 83. – № 19. – P. 10309–10313.
391. Zhou H. Effect on virulence and pathogenicity of H5N1 influenza A virus through truncations of NS1 eIF4GI binding domain / H. Zhou, J. Zhu, J. Tu, W. Zou, Y. Hu, Z. Yu, W. Yin, Y. Li, A. Zhang, Y. Wu, Z. Yu, H. Chen, M. Jin // *J. Infect. Dis.* – 2010. – V. 202. – № 9. – P. 1338–46.

392. Zielecki F. 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 / F. Zielecki, I. Semmler, D. Kalthoff, D. Voss, S. MaueI, A. D. Gruber, M. Beer, T. Wolff // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – № 20. – P. 10708–18.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1

Полногеномный анализ экспрессии генов клеток A549 при инфицировании их wtNS1 и ΔNS1 вирусами гриппа

Таблица 1А – Гены, транскрипция которых возросла ( $\log_2FC$  меньше -1) в клетках A549 при инфицировании вирусами wtNS1 и ΔNS1, и разница в экспрессии между которыми составила более значения  $\log_2FC$ , равного 1)

Ген	$\log_2FC$		Ген	$\log_2FC$	
	wtNS	ΔNS		wtNS	ΔNS
IFIT2	-6,84067	-8,75126	PTGER4	-1,82714	-5,14224
ACOT12	-6,8164	-5,13571	CCL2	-1,74507	-4,73243
XLOC_014338	-5,36967	-3,6671	ZC3HAV1	-1,66821	-2,74487
PPP4R1L	-5,03145	-2,65465	FAM46A	-1,64353	-2,71073
IFIH1	-3,97567	-5,03601	CXCR4	-1,61109	-4,20896
IFIT1	-3,79224	-4,76983	ATF3	-1,59365	-3,53695
IFIT3	-3,71281	-5,1085	SOCS1	-1,55414	-3,579
OASL	-3,64994	-4,79271	CXCL1	-1,52073	-4,8089
FBXW10	-3,44633	-1,82434	CFB	-1,3847	-3,29455
EGR1	-3,37218	-7,35082	IL8	-1,30433	-4,67384
CCL5	-2,78891	-4,76971	SOCS3	-1,2619	-3,71947
PLEKHA4	-2,65298	-4,46142	KLF4	-1,10521	-2,72025
IDO1	-2,21814	-5,13347	PLA2G4C	-1,04382	-2,4118
ANGPTL4	-1,8701	-2,68103	HAPLN3	-1,02252	-2,60827
GBP3	-2,21647	-3,1092	FZD4	-1,00162	-2,33624

Таблица 1Б – Гены, транскрипция которых уменьшилась ( $\log_2FC$  больше 1) в клетках A549 при инфицировании вирусом  $\Delta NS1$  и обоими типами вирусов (wtNS1 и  $\Delta NS1$ ).

$\Delta NS$		wtNS и $\Delta NS$		
Ген	$\log_2FC$	Ген	$\log_2FC$	
			wtNS	$\Delta NS$
YIF1B	1,00319	LOC100505641	1,03678	1,2921
CTSZ	1,01779	HILPDA	1,04313	1,45351
XLOC_009485	1,07345	ZNF226	1,25877	1,20492
RAB37	1,08645	NEAT1	1,31554	1,16795
ABCC5	1,14891	ZNF469	1,35749	1,17886
DDIT4L	1,16080	LFNG	1,41657	1,33371
SLC40A1	1,18413	C22orf29	1,43502	1,07170
SLITRK6	1,26411			
LOC100507212	1,29635			

Таблица 1В – Гены, транскрипция которых возросла ( $\log_2FC$  меньше -1) в клетках A549 при инфицировании вирусом  $\Delta NS1$

Ген	$\log_2FC$	Ген	$\log_2FC$	Ген	$\log_2FC$
IFNB1	-7,85454	SOD2	-2,30318	GATA6	-1,84494
IL28A	-5,94499	BCL3	-2,22454	KLF6	-1,82797
IL28B	-5,79066	EFNA1	-2,17343	NUAK2	-1,81659
IL29	-4,94966	PLAUR	-2,17225	PTGS2	-1,75753
CXCL2	-4,10412	USP43	-2,1673	RND1	-1,75306
CXCL3	-3,88602	ULBP2	-2,16585	CEBPD	-1,74711
MAP3K8	-3,6332	FST	-2,16213	CXCL5	-1,73456
PPP1R15A	-3,37502	NFE2L3	-2,15678	SNPH	-1,71159
NFKBIA	-3,33958	SERPINA3	-2,14656	DUSP1	-1,6029
ZFP36	-3,02301	SDC4	-2,05136	ZFP36L2	-1,57855
C5orf43	-2,67486	IRAK2	-2,03696	TRIM25	-1,57453
BIRC3	-2,5032	CITED2	-2,01754	RELB	-1,54885
BBC3	-2,49358	SERPINB9	-1,94703	JAK2	-1,53051
OTUD1	-2,47816	PRDM1	-1,91649	TNFAIP2	-1,5275
C15orf48	-2,35288	ISG20	-1,86817	CA8	-1,5068

Таблица 1Г – Гены, транскрипция которых возросла ( $\log_2FC$  меньше -1,5) в клетках A549 при инфицировании вирусом wtNS

Ген	$\log_2FC$	Ген	$\log_2FC$	Ген	$\log_2FC$
LAG3	-3,31768	LOC100505880	-1,44922	CREBBP	-1,15481
HEXIM1	-2,40401	GAGE2B	-1,43855	TUFT1	-1,14983
H3F3B	-2,30486	FLRT3	-1,43712	LOC728743	-1,14816
SPEF1	-2,16778	XLOC_12_014602	-1,42660	AZI2	-1,14403
CDK5R1	-1,94879	HSPA1B	-1,41351	C5orf63	-1,14038
HSPA5	-1,92124	TCAP	-1,41298	LOC147727	-1,11862
APOE	-1,90375	ARHGAP5	-1,36910	CABP5	-1,11553
SNAR-G1	-1,87054	AGER	-1,36811	PPP1R10	-1,11211
SNAR-F	-1,84096	IL11	-1,36745	APPBP2	-1,11082
IER5L	-1,83844	HSPA1A	-1,34298	BAG3	-1,10481
PHLDA1	-1,81577	NAPA	-1,32551	RND3	-1,07776
ITGA7	-1,81059	KRT86	-1,32386	EIF2S2	-1,06699
SBSN	-1,79641	DNAJB1	-1,28539	CD14	-1,06315
SNAR-H	-1,77887	FAM22F	-1,26575	ZCCHC10	-1,02889
PCF11	-1,76565	RGS2	-1,26431	TREX1	-1,02847
SNAR-B2	-1,72818	XLOC_009898	-1,26045	EPHA2	-1,01491
SNAR-G2	-1,71961	UBE2Q1	-1,2102	C17orf109	-1,01261
SNAR-D	-1,69977	TNFRSF10D	-1,19740	USP9X	-1,01215
HAMP	-1,68167	GNL1	-1,19608	PRPF4B	-1,00674
SNAR-A3	-1,56001	BRF1	-1,16872	HOTAIRM1	-1,00363
FAM120C	-1,50871	HOXB8	-1,16518	SPTSSA	-1,00285

Таблица 1Д – Гены, транскрипция которых уменьшилась ( $\log_2FC$  больше 1) в клетках A549 при инфицировании вирусами wtNS

wtNS		wtNS		wtNS	
Ген	$\log_2FC$	Ген	$\log_2FC$	Ген	$\log_2FC$
ZADH2	1,00392	PLEKHG3	1,03114	MAVS	1,12514
P2RY2	1,01201	MESDC1	1,04497	LINC00294	1,19910
AR	1,01771	KIAA1147	1,06254	GJC1	1,19967
IGFBP1	1,01861	LOC100293516	1,07066	LOC100527964	1,28675
KIAA1609	1,01964	PDCD7	1,09767	PTPN14	1,29826
SMCR7	1,02121	PHRF1	1,10444	TMEM177	1,35985
SLITRK6	1,02379	C3orf19	1,11494	PAQR5	1,44848

Олигонуклеотидные зонды для типирования и субтипирования вирусов гриппа А человека и животных, используемые в тест-система «IAVchip»

Таблица 2А – Последовательности олигонуклеотидных зондов для типирования и субтипирования вирусов гриппа А человека и животных

№	Зонд	Последовательность (5' → 3')	Длина, н.
Гемагглютинин (НА)			
1	H1-1	CAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTAG TAGAGCCGGGAGACAAAA	52
	H1-2	GGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAA TCCAGAGGTTTGTGGAGCC	55
	H1-3	GTCTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTC CAATGGGTCATTGCA	50
2	H2-1	AATTGAGCAATATGGGGGTTTATCAAATACTTGCT ATATACGCTACAGTTGCAGG	55
	H2-2	GGATGGCTCCTTGGAAATCCAGAATGTGATAGGC TTCTAAGTGTG	45
3	H3-1	TACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTA TGCCTCCCTTAGGTC	50
	H3-2	ATTCACATGGACAGGTGTCACTCAAAACGGAAGA AGTGGAGCCTGCA	47
	H3-3	TGGATTCCTTTGCCATATCATGCTTTTGTCTTTGT GTTGTTTTGCTGGGGTTCAT	56
4	H4	GCTGCACTGCTTTTAGCCTTCATTTTGTGGGCTTGT CAGAACGGAAACATC	51
5	H5-1	GCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATG	49

		GAGTCACCAATAAGG	
	H5-2	AGCACTGGCAATCATG(G/A)TAGCTGGTCTATCTT T(T/C)TGGATGTGCTCCA	56
6	H6-1	GTGTATCAAATTCTTGCCATTTATAGTACGGTATC GAGCAGCCTAGTGTTGG	52
	H6-2	AACAAAAGAATGCAAGATGGATTTCTGGATGTTT GGACATACAATGCTGA	50
7	H7	TGGTTTAGCTTCGGGGCATCATGCTTCCTTCTTCTT GCCATTGCAATGGG	50
8	H8-1	CTCTTGGCGAGCACAAATGCATACGATAGGATAT GCATTGGGTACCAATC	50
	H8-2	CAGTACAGTGGCGGCCAGTCTTTGCTTGGCAATCC TGATTGCTGG	45
9	H9	TGAAGGAACTTACAAAATCCTCACCATTTATTCGA CTGTCGCCTCATCT	49
10	H10	TCATGGGTCTTGTCTTCTTCTGTCTGAAGAATGGA AACATGCGATGCACAATCTGTATT	59
11	H11	AAAATACTGTCAATTTACAGCTGCATTGCAAGCA GTCTTGTGTTGGCAGCAATC	54
12	H12	CAAGCTTAGTTCTACTGCTCATGATTATTGGGGGT TTCATTTTCGGGTGT	50
13	H13-1	ATATACAGCTGCATTGCAAGCAGTGTTGTGCTAGT AGGACTCATACT	47
	H13-2	AGTATTGTAATGGTAGGACTCATACTTGCATTCAT CATGTGGACATG	47
14	H14	TGCATCACCCATCAAGCGATAATGAGCAAACGGA TCTCTACAAGG	45
15	H15	ATGCTATTGGACCCAGGGGATACAGTCACTTTTAC	52

		CTTCAATGGTGCATTCA	
16	H16	CCATTAGAAATGGTACCTACAATCATGAAGATTA CAAGGAAGAATCACAA	50
Нейраминидаза (NA)			
1	N1	ACTGTGGGTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTT GCCATT(T/C)ACCATTGACA	53
2	N2	ATTTTCTC(T/C)GTTGAAGGCAAAGCTGCATCAA TCGGTGCTTTTATGTGGA	51
3	N3	CAATAGTATAGTTACTTTCTGTGGACTAGACAATG AACCTGGATCGGGA	49
4	N4	TGTTAATTCTGATACCACAGGTTGGTCATGGCCCG ATGGCGCTCTGTTGC	50
5	N5	TTTTGTGGTGTTTCAAGTGAGGTCCCAGGGTGGTC CTGGGATGATGGCGCAATTCT	56
6	N6-1	CTCTGTGGATCCAAGGAGCGATTGGGATCTTGGTC (A/G/C)TGGCATGATGGAGCT	57
	N6-2	ATCTCAGCAACAGGAATGACACTATCCGTAGTAA GTCTGCTAATAGG	47
7	N7	CTATGTGGAAGCCCA(A/G/T)TCTCAGTTGGGTCCG GTTCCCTCCCCGATGGGG	51
8	N8-1	AAAGACCGGAGCCCCTATAGAАCTCTAATGAGTG TAGAAATAGGGCAATCAC	52
	N8-2	CAAGTAGCTCCATTGTGATGTGTGGAGTAGACCA TGAGATTGCCGACTG	49
	N8-3	TTGGTCATGGCACGATGGAGCTATTCTTCCCTTTG ACATCGATAAGATG	49
	N8-4	AGCAGCTCCATTGTGATGTGTGGAGTAGACCATA AAATTGCCAGTTGGT	49

9	N9-1	ATAGTATCGATGTGTTCCAGCACAGAATTCCTTGG ACAATGGAACTGGCCTGATG	55
	N9-2	GTTCCAGCACAGAATTCCTTGGACAATGGAACTG GCCTGATGGGGCTAAA	50
M2-белок			
1		ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTACCA GAAACGGATGGGAGT	49
Нуклеопротеин (NP)			
1		TCCTTTGACATGAGTAATGAAGGATCTTATTTCTT CGGAGACAATGCAG	49