

УНИКАЛЬНАЯ БИПОЛЯРНАЯ АРХИТЕКТУРА ГЕНОВ В РНК-ГЕНОМЕ ВИРУСА ГРИППА А

© 2020 О.П. Жирнов^{1,2}

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского,
123098 Москва, Россия; электронная почта: zhirnov@inbox.ru

² Русско-немецкая академия медицинских и биотехнологических наук,
121205 Москва, Сколково, Россия

Поступила в редакцию 06.11.2019

После доработки 22.12.2019

Принята к публикации 22.12.2019

Геном вируса гриппа А состоит из 8 сегментов одноцепочечной РНК негативной полярности. Посредством классической негативно-полярной стратегии восьмой сегмент NS кодирует анти-интерфероновый белок NS1 (27 кДа) и белок ядерного экспорта NEP (14 кДа). В сегменте NS обнаружена дополнительная открытая рамка, имеющая позитивную полярность прямой трансляции вирионной РНК для третьего белка (NSP8 – negative strand protein; 18–25 кДа у различных штаммов). Обнаруженная локализация трех и более разнополярных генов на одном участке одноцепочечной молекулы РНК представляется уникальным для биосферы типом экономичной геномной архитектуры. Анализ *in silico* геномов вирусов гриппа, циркулирующих среди людей и животных, показал, что ген *NSP8* сформировался у вируса гриппа А ~100 лет назад («юный» ген) и имеет высокую эволюционную изменчивость. Получены данные, подтверждающие возможность экспрессии гена *NSP8* в организме инфицированных животных, что укрепляет концепцию о биполярной (амбисенс) стратегии генома вируса гриппа А. Обнаруженная высокая изменчивость белка NSP8 наводит на мысль о том, что этот «юный» ген находится в стадии оптимизации своей функции, и после накопления мутаций и перехода их количества в новое функциональное качество зрелого белка NSP8 возникнет полноценный биполярный вирус гриппа, который может приобрести новые непредсказуемые и угрожающие для человека и животных свойства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус гриппа, стратегия генома, ген *NSP*, амбисенс-вирусы, структура генов.

DOI: 10.31857/S0320972520030148

Вирус гриппа А имеет липидную оболочку (оболочечный вирус). Его геном состоит из 8 сегментов одноцепочечной РНК с размерами $(0,9–3,2) \times 10^3$ нуклеотидных оснований. Сегменты РНК имеют негативную полярность, так как не транслируются рибосомами, но транскрибируются вирусной полимеразой с образованием матричных РНК, с которых транслируются вирусные белки (рис. 1, а, б). У некоторых вирусных сегментов транскрипция сопряжена со сплайсингом мРНК, а трансляция происходит с различных AUG кодонов и со сдвигом трансляционной рамки. В результате геном вируса гриппа А обеспечивает синтез 16 уникальных вирусных белков по негативно-полярному пути [1, 2]. Наименьший сегмент NS вируса гриппа кодирует по негативному пути два вирусных белка: неструктурный антиинтерфероно-

вый белок (NS1), выполняющий функцию супрессора интерферона, и белок ядерного экспорта (NEP), регулирующий ядерный экспорт вирусных рибонуклеопротеидов в инфицированных клетках. мРНК для белка NEP претерпевает сплайсинг, приводящий к сдвигу рамки трансляции относительно гена *NS1* (рис. 1, а).

У подавляющего большинства штаммов вируса гриппа А человека геномная РНК сегмента NS имеет протяженную открытую рамку трансляции (OPT) в позитивной ориентации (рис. 1, а) [3–9]. Эту рамку обозначили, как ген белка негативной цепи сегмента 8 (NSP8) (negative strand protein; segment 8) [4, 5]. Наличие протяженной трансляционной рамки в геномной NS РНК вируса, содержащей инициаторный AUG, терминирующий UGA, и структурированную на 5' конце зону, имеющую элементы, характерные для IRES [10], предполагает, что геномная NS РНК может проявлять свойства матричной РНК и транслироваться с образованием протяженного белка NSP8. Следует отметить,

Принятые сокращения: HA – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; NS1 – антиинтерфероновый белок; NEP – белок ядерного экспорта; NSP8 – белок негативной цепи сегмента 8; OPT – открытая рамка трансляции.

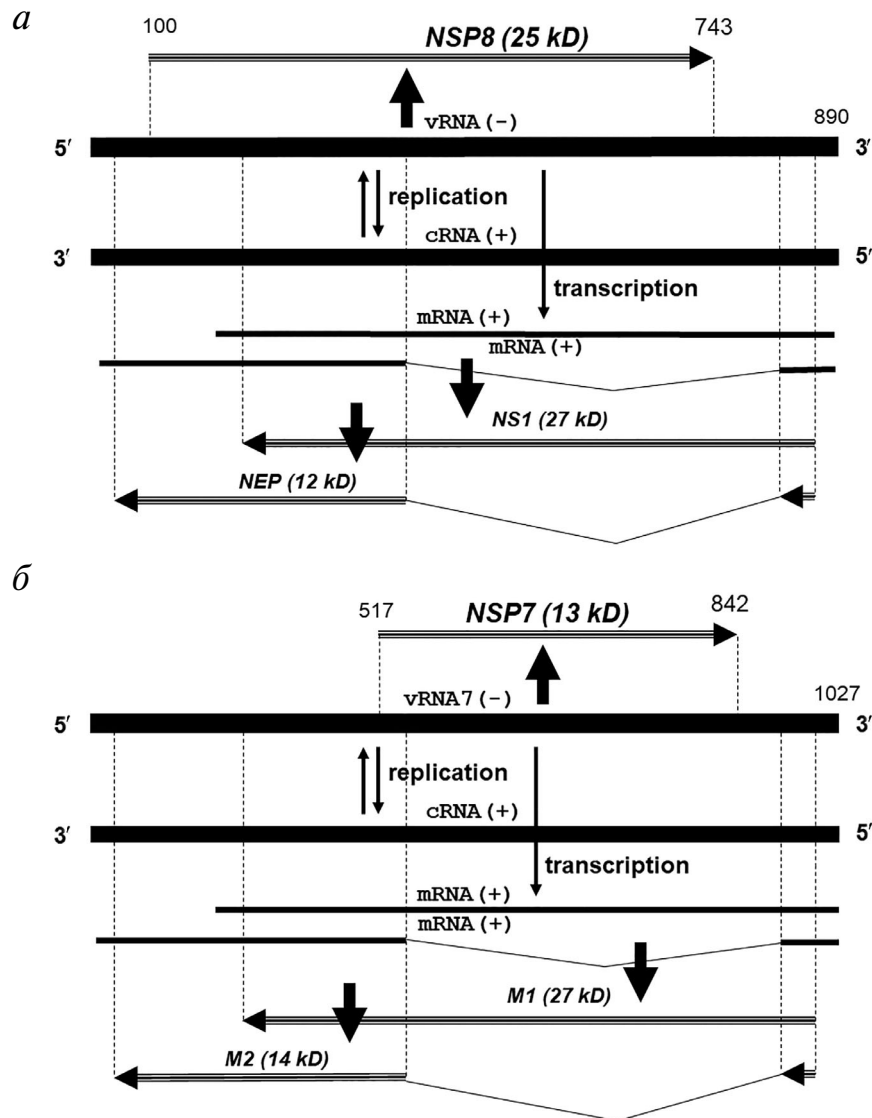


Рис. 1. Схема архитектуры генов в сегментах 7 (М) и 8 (NS) РНК вируса гриппа А. Показана локализация генов в сегменте NS (а) и М (б) (GenBank ac.n. CY121121.1 и CY121118.1 соответственно) вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2). Цифрами обозначены позиции нуклеотидов от 5'-конца вирионной vRNA. vRNA – вирионная RNA отрицательной полярности; cRNA – комплементарная RNA (репликативная форма) положительной полярности. Экзоны генов для белков NS1, NEP и NSP8 показаны стрелками. Ломаной линией показана зона сплайсинга mRNA гена NEP

что отсутствие стоп-кодонов в гене *NSP8* вирусов гриппа человека не обусловлено простым структурным запретом их появления в результате возможного сцепленного повреждения генов *NS1* и/или *NEP*. На это указывает, в частности, наличие множественных стоп-кодонов, не повреждающих гены *NS1* и *NEP* в теле гена *NSP8*, как у подавляющего большинства вирусов гриппа А птиц и других животных [5], так и присутствие стоп-кодонов в гене *NSP8* у пандемического вируса гриппа А человека H1N1pdm09 (см. ниже). Более того, колокализация генов в вирусной РНК сегмента NS выстроена так, что третий нуклеотид кодона в рамке трансляции *NSP8* совпадает с 3-м и 2-м нуклеотидами в ко-

донах рамок трансляции *NS1* и *NEP* соответственно (рис. 1, а). Это дает свободу синонимичных замен в положении 3 гена *NSP8* без повреждения гена *NS1*. Примечательно, что ОПТ гена *NSP8* у вирусов гриппа А человека сформировалась лишь ~100 лет назад, т.е. этот ген можно считать «юным» в плане его эволюционного развития. Это наблюдение было сделано на основании филогенетического сравнения нуклеотидных последовательностей РНК сегмента NS известных вирусов гриппа А человека и животных методом мультиметрического алгоритма (см. Suppl. в статье Zhirnov et al. [5]).

Функция белка *NSP8* пока не установлена, и получены лишь первые наблюдения о том, что

при экспрессии гена *NSP8* в клетках насекомых посредством бакуловируса этот белок синтезировался в форме полноразмерного продукта гена и имел цитоплазматическую локализацию по периферии клеточного ядра [11]. Анализ *in silico* не выявляет полной гомологии белка *NSP8* с известными белками из доступных баз данных и показывает частичное сходство в первичной структуре белка *NSP8* с Q-мотивом DEAD-доменной РНК хеликазы гриба *Ceraceosorus bombacis*, паразитирующего на растениях [12], участком протеазного домена гидролаза класса С19, к которому относится убиквитин гидролаза шампиньона *Agaricus bisporus var. Burnettii* [13], трансмембранным доменом потенциал-зависимого кальциевого ионного канала одноклеточного эукариота (протиста) *Salpingoeca rosetta* [14]. Параметры обнаруженного сходства приведены в табл. 1 и показаны на рис. 2. Не исключено, что белок *NSP8* может обладать полифункциональными свойствами. Структурное сходство с рядом функциональных белков может указывать на наличие у него как сходной функции, так и ингибирующей ингибиторной активности против этих функций в организме-хозяине. Для раскрытия

функции нового класса негативно-полярных белков необходимы дальнейшие исследования.

Обнаружение нового гена у вирусов гриппа А поставило ряд важных вопросов относительно его происхождения, функции и эволюционной изменчивости. Один из принципиальных вопросов состоит в том, как мог возникнуть новый ген *NSP8* в позитивной ориентации на геномном участке, кодирующем два других гена в негативной ориентации? Появление амбиполярного гена наводит на мысль о существовании пока неизвестного закона соответствия (или правила обратного детерминирования) амбиполярных генов на одном участке молекулы РНК. Возможно, закон состоит в том, что определенный предсуществующий ген может предопределять свойства и механизм возникновения нового амбиполярного гена. При отсутствии механизма детерминирования следует допустить хаотичное накопление мутаций, ведущее к появлению нового функционально смыслового гена с последующим отбором. Вероятность такого события мала, учитывая амбиполярное перекрытие предсуществующих нескольких генов, когда изменения в одном гене ведут к изменению в сцепленных амби-

Таблица 1. Параметры сходства первичной структуры

Источник аминокислотной последовательности белка <i>NSP8</i>	Участок сравнения в белке <i>NSP8</i> ¹⁾	Участок гомологии в белке сравнения ²⁾	Параметры сходства ³⁾	Функция домена в белке сравнения ³⁾	Ссылки
NS сегмент вирус гриппа A/WSN/33 (H1N1) ac.n. U13683.1	1–108 (121)	Убиквитин гидролаза (UH) 479-600 (1121)	E: 6.1e-1, ид.: 31%, поз.: 46%	спасение белков от протеосомальной деградации в клетках посредством отщепления убиквитина	[14]
NS сегмент вирус гриппа A/Moscow/328/2003 (H3N2) ac.n. AAZ38747.1	8–195 (216)	α 1 субъединица потенциал-зависимого кальциевого канала G1 158-321 (2453)	E: 4.6e-1, ид.: 26%, поз.: 41%	трансмембранный транспорт ионов Ca ²⁺ , участвуют в регуляции апоптоза и аутофагии клеток, а также в канцерогенезе раковых клеток	[15, 16]
NS сегмент вирус гриппа A/Moscow/328/2003 (H3N2) ac.n. AAZ38747.1	43–120 (216)	Q-мотив DEAD РНК хеликазы 306-383 (904)	E: 2.4e-0, ид.: 33%, поз.: 47%	отвечает за связывание и гидролиз АТФ при функционировании РНК хеликазы	[13]

¹⁾ Указаны позиции аминокислот в *NSP8* на участке гомологии. В скобках указано общее количество аминокислот в белке *NSP8*.

²⁾ Указаны позиции аминокислот в белке сравнения на участке гомологии. В скобках указано общее количество аминокислот в белке сравнения.

³⁾ Параметры сходства определены на основании попарного сравнения первичных структур белков в программе UniProt (рис. 2). Указаны величины E (мера количества ожидаемых совпадений в случайной базе данных), процент идентичных (ид.) и позитивных (поз.) аминокислотных позиций в сравниваемых участках белков. Позитивные аминокислотные замены – обозначают позиции, в которых идентифицированы замены на аминокислоты со сходными свойствами. Белки сравнения: трансмембранный домен субъединицы альфа-1/G1 потенциал-зависимого кальциевого ионного канала типа T (α 1/G1) одноклеточного эукариота *Salpingoeca rosetta* (ID: F2U5C1), участок протеазного домена убиквитин гидролаза (UH) типа С19 шампиньона *Agaricus bisporus var. Burnettii* (ID: K5Y1E3), Q-мотив DEAD РНК хеликазы растительного гриба *Ceraceosorus bombacis* (ID: A0A0P1BHD7).

<i>a</i>	NSP	8	FQLFLVCSLLQSAIISLQTFDLAVLAIIFRFC-FGVSGGPPFSSLLLOANLCRFLFLETRTVLSF	66
			FQ + V+LL I L + LA+L +F FC FG+ G + +L Q L V S	
	$\alpha 1/G1$	158	FQSLQLLVALLLDIIPLMGS--LAILTFLFCTFGLVGVQMWKGLRQRCYDNLTAHFVPST	215
	NSP	67	HSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSN-TMVSSRSKITLKFANMMFF	125
			H++PP T CP PSSV N T ++ S IT	
	$\alpha 1/G1$	216	HATPPWTHYICGAPDFTCP-----PPSSVVGGFNVTTTTTSSITASV-----	262
	NSP	126	SMAIWSILMQRGPSTFCGLISMNQFLDNSSIVMSVIYREAGVETMVILSASSDSSFRIFSTICF	195
			+ A+ + R P+ F +S DN +I + +++ +ET + A+ + ++ I F	
	$\alpha 1/G1$	263	-VDAFPVCAARAPNPFAGAVS---FDNIAIACNTVFQVITLETWGNIMAAVOK AHSFWAFIYF	321
<i>б</i>	NSP	1	QANLCRDSETRTVLLFHS----SPPMRTPTAFLT---SSSVCPGREGSGEISPTIVPSSVK	54
			++ + E++++ L HS SP M P F+ SSS G SG+ SP+I PSS	
	UH	479	ESEVVHAGESQSIISLQHSASSPKMANPIPFMNGLSSTSGSASSGQFSPSI-PSSSF	537
	NSP	55	ALSNIRVSSRSKITLKFASMMFL-----SMAIWSILIQRGPATFCLGMSMNQCLDISS	108
			L N + RS ++L S L + A + +QR PA L +S N C+ +S	
	UH	538	RLPNHVGNHRSAMSLDQNPSTRLPAEANHTGGTYNAGASSLQRRPAMVRLSISQNVCTIFNS	600

Рис. 2. Частичное сходство первичной структуры белка NSP8 с белком кальциевого ионного канала (*a*) и убиквитин гидролазы (*б*). Первичную структуру белка NSP8 вируса гриппа A/Moscow/328/2003 (H3N2) (ac.n. AAZ38747.1) (*a*) и A/WSN/33 (H1N1) (ac.n. U13683.1) (*б*) анализировали в программе UniProt (<https://www.uniprot.org/blast/>) с матриксом BLOSUM-62 с брешами в режиме 250 обратных сравнений. Параметры сходства (E – мера количества ожидаемых совпадений в случайной базе данных, процент идентичных (ид.) и позитивных (поз.) аминокислотных позиций в сравниваемых участках белков) приведены в табл. 1. Цифры на рисунке показывают позиции аминокислот в соответствующих бел-

полярных генах. В этом случае изменчивость и отбор мутаций должны быть взаимосвязаны сразу в трех вирусных генах: *NSI*, *NEP* и *NSP8*.

Возможно, что амбисенс стратегия имеет место и в других сегментах РНК вируса гриппа А. Об этом свидетельствуют протяженные ОПТ, которые обнаружены в сегментах PB1, PB2, PA, NP и M (рис. 1, б). Белковые продукты перечисленных вирусных ОПТ пока не идентифицированы в биологических системах, однако данные *in silico* указывают на трансмембранные свойства ионных каналов у выявленных гипотетических продуктов указанных позитивно-полярных генов [4, 7]. Присутствие серии амбисенс генов во многих сегментах РНК подразумевает наличие у вируса гриппа А человека и животных универсального механизма, позволяющего реализовать в клетках-мишенях как негативно-, так и позитивно-полярную стратегию генома.

Второй важный вопрос связан с высокой вариабельностью белка NSP у вирусов гриппа А человека. Наши исследования показывают, что белок NSP имеет высокую вариабельность, которая близка таковой у наиболее изменчивых гликопротеидов гемагглютинаина (HA) и нейраминидазы (NA), расположенных на поверхнос-

ти вирионов и являющихся главной мишенью для противовирусных факторов специфического иммунитета организма-хозяина (табл. 2). При этом два других негативно-полярных гена, *NSI* и *NEP*, в сегменте NS имеют более низкую степень вариабельности [17]. Возможны два объяснения такого различия. Во-первых, белок NSP8 может локализоваться на поверхности вирионов или инфицированных клеток, подобно HA и NA, и поэтому служить мишенью воздействия факторов врожденного и специфического иммунитета организма-хозяина, провоцирующих его повышенную изменчивость. Во-вторых, белок NSP, будучи молодым вирусным продуктом, может находиться в стадии оптимизации уровня экспрессии и своей функции по отношению к вирусным или клеточным партнерам, что и обуславливает его приспособительную изменчивость к данным партнерам. Результаты сравнительного анализа первичной структуры сегмента NS вирусов гриппа А субтипа H3N2, показывающие высокое содержание несинонимичных мутаций в гене *NSP8* ($dN/dS > 1,5$) по сравнению с генами *NSI* и *NEP* ($dN/dS \leq 1$) (табл. 3), полностью согласуются с объяснением о повышенной изменчивости гена *NSP8* и нали-

Таблица 2. Коэффициенты эволюционной изменчивости белков вируса гриппа А/Н3N2 за период 1968–2018 гг.

Вирусные белки	Молекулярная масса белка (Да)	Общее количество проанализированных последовательностей	Количество выявленных замен в белке	Коэффициент вариабельности (КВ)*
PВ1	86 000	13 215	23	0,05
НА	75 000	19 639	139	0,4
NA	56 000	17 147	114	0,4
M1	27 000	16 145	12	0,09
NS1	27 000	13 847	34	0,25
NEP	12 000	13 739	5	0,08
NSP8	25 000	14 331	38	0,35

* Коэффициент вариабельности (КВ) определяли по количеству аминокислотных замен в отдельном вирусном белке у штаммов вируса гриппа человека А/Н3N2 за период 1968–2018 гг. КВ рассчитывали как общее количество аминокислотных замен за один год в расчете на 100 аминокислот в каждом белке [17]. Использовали данные GenBank. Вирусные белки: PВ1 – субъединица вирусной полимеразы; НА – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; M1 – внутренний матрикс вириона; NS1 – антиинтерфероновый белок; NEP – белок ядерного эксперта; NSP8 – белок негативной цепи сегмента 8.

чии фактора(ов) позитивной селекции (адаптации) в его эволюции [18]. Количественное накопление мутаций в ходе эволюции вируса может привести к качественному скачку в его функциональной активности. В этом случае может появиться новая разновидность вируса гриппа с неожиданными и непредсказуемыми свойствами, что таит угрозу для людей и животных. Изучение нового гена и раскрытие функции возникшего белка NSP8 позволит нейтрализовать возможность такой угрозы либо методами вакцинопрофилактики против данного белка, либо разработкой лекарственных ингибиторов данного белка или его гена.

С предположением о приспособительной изменчивости коррелирует динамика эволюции сегмента NS пандемического вируса гриппа человека H1N1pdm09, который вызвал у людей пандемию «мексиканского» гриппа в 2009 году [19]. Этот штамм вируса гриппа А, представляющий тройной реассортант вирусов гриппа человека, свиней и птиц, мигрировал к человеку из природного ареала и имел сегмент NS птичьего типа, лишённого полноценного гена *NSP*, в теле которого обнаруживалось 2 стоп-кодона. Однако в ходе прошедшей 10-летней эволюции вируса H1N1pdm09 в популяции людей этот ген утратил 1 стоп-кодон и сейчас увеличил непрерывную протяженность гена *NSP* до 240 н.о. Логично ожидать, что в ближайшее десятилетие при дальнейшей циркуляции и сохранении вируса в популяции людей вирус утратит оставшийся стоп-кодон и сформирует полноценный ген *NSP*, что при его дальнейшей оптимизации может придать вирусу неожиданные и опасные для человека свойства.

Эволюционная оптимизация гена *NSP8* может затрагивать регулирующие элементы гена. Так, например, отмечается увеличение количества AUG кодонов в стартовой зоне гена *NSP8* в ходе 50-летней эволюции вируса гриппа А человека субтипа H3N2: с одного в 1968 году до 4-х в настоящее время [5]. Увеличение количества AUG кодонов в зоне трансляционного старта может приводить к облегчению распознавания вирусной РНК факторами инициации трансляции и затем рибосомами и повышению уровня ее трансляции в инфицированной клетке-мишени. Более того, такое накопление старт-кодонов в вирусной РНК-матрице может способствовать увеличению дефектной трансляции гена *NSP8*, включая инициацию трансляции с

Таблица 3. Соотношение несинонимичных и синонимичных замен в генах *NSP8*, *NS1*, *NEP* вирусов гриппа А субтипа H3N2 за период 1968–2019 гг.

Вирусный ген	Соотношение dN/dS ¹⁾
<i>NSP8</i>	1,73
<i>NS1</i>	1,25
<i>NEP</i>	0,23

¹⁾ Соотношение несинонимичных и синонимичных мутаций (dN/dS) рассчитывали на основании данных первичной структуры сегмента NS вирусов гриппа А/Н3N2 человека из базы данных GenBank за период 1968–2019 гг. При расчете анализировали первичные последовательности соответствующих мРНК для белков NSP8, NS1, NEP. Представлены вирусные гены для белков: NS1 – антиинтерфероновый белок; NEP – белок ядерного эксперта; NSP8 – белок негативной цепи сегмента 8.

альтернативных AUG кодонов, приводящей к образованию так называемых дефектных пептидов (DRiPs), которые могут вовлекаться в регуляцию МНС-I — зависимого противовирусного иммунного ответа [20]. Однако принимая во внимание, что в бакуловирусной системе [11] и в системе трансляции *in vitro* [10] синтезировался полноразмерный и стабильный белок NSP8, идея о дефектной трансляции гена *NSP8* не кажется главным механизмом экспрессии.

Заслуживает внимания вопрос уникальности обнаруженной архитектуры биполярных генов. Локализация трех и более разнополярных генов на одном участке одноцепочечной молекулы РНК представляется уникальным типом архитектуры генов среди разнообразных организмов биосферы. Он показывает пример экономии генетической информации на уровне РНК и ее эффективной реализации для синтеза разнообразных белковых продуктов и создания максимального белкового разнообразия на единицу генетической информации в геноме РНК. Уникальность биполярной архитектуры генов в сегменте NS вируса гриппа А имеет явное отличие от амбисенс локализации генов, обнаруженной в геноме РНК флебо-, тоспо-, аренавирусов животных и тениувирисов растений [21]. В отличие от перечисленных вирусов, у которых два амбиполярных гена не перекрываются и размещены в разных участках молекулы РНК, у вирусов гриппа А человека три амбиполярных гена локализованы один над другим (так называемая «стопка») на одном участке РНК (рис. 1, а, б). При неперекрывающейся архитектуре биполярных генов их изменчивость напрямую не сцеплена между собой, и они могут изменяться независимо друг от друга.

Белковый продукт гена *NSP* пока не обнаружен в биологических системах, таких как инфицированные вирусом клеточные культуры или организм животных, но имеются данные, подтверждающие возможность экспрессии вирусного РНК-генома по позитивному пути в биологических системах. Так, полноценный белок NSP8 синтезируется в системе трансляции *in vitro* с рибосомами млекопитающих на матрице полноразмерной вирионной РНК вируса гриппа [10], а также в организме инфицированных животных удается детектировать формирование спе-

цифических иммунных лейкоцитов против данного белка или его компонентов [17, 22, 23]. Свойства NSP8, как «белка-невидимки», могут быть обусловлены низким уровнем его экспрессии, лабильностью и коротким уровнем полужизни, а также возможной тканезависимой экспрессией гена *NSP8* лишь в определенных типах клеток-мишеней, содержащих факторы, необходимые для регуляции экспрессии позитивного гена *NSP*. Дальнейшее изучение должно пролить свет на эти предположения.

Заключительный пункт, связанный с обнаружением гена *NSP8*, относится к возможному изменению классификации семейства ортомиксовирусов (Orthomyxoviridae) и выделению отдельного рода амбиполярных альфа-инфлюэнза-вирусов («*Ambisense Alfairinfluenzavirus*»). Пока прямой продукт гена *NSP8* точно не идентифицирован в биологических системах вопрос о классификации остается открытым. Вместе с тем сохранение полноценного гена *NSP8* в популяции вирусов гриппа человека в течение более 100 лет указывает на функциональную необходимость этого гена для пока гипотетической группы амбиполярных вирусов гриппа. Важно отметить, что при выраженной эволюционной изменчивости белка NSP8 не обнаруживалось возникновения терминирующих стоп-кодонов, нарушающих ген *NSP8*, что также укрепляет идею о биологической детерминированности данного гена.

Финансирование. Работа выполнена при частичной поддержке научной программой SFB 293 Немецкого научного общества (DFG).

Благодарности. Автор выражает благодарность академику РАН Георгиеву Г.П. за поддержку работы и полезные дискуссии, а также д-ру D. Anhlan (Институт вирусологии Университета г. Мюнстер, Германия) за помощь в анализе вариативности гена *NSP*.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dou, D., Revol, R., Ostbye, H., Wang, H., and Daniels, R. (2018) Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement, *Front. Immunol.*, **9**, 1581, doi: 10.3389/fimmu.2018.01581.
2. Vasin, A.V., Temkina, O.A., Egorov, V.V., Klotchenko, S.A., Plotnikova, M.A., and Kiselev, O.I. (2014) Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins, *Virus Res.*, **185**, 53–63, doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.015.
3. Baez, M., Zazra, J.J., Elliott, R.M., Young, J.F., and Palese, P. (1981) Nucleotide sequence of the influenza A/duck/Alberta/60/76 virus NS RNA: conservation of the NS1/NS2 overlapping gene structure in a divergent influenza virus RNA segment, *Virology*, **113**, 397–402.

4. Zhirnov, O.P., Poyarkov, S.V., Vorob'eva, I.V., Safonova, O.A., Malyshev, N.A., and Klenk, H.D. (2007) Segment NS of influenza A virus contains an additional gene NSP in positive-sense orientation, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **414**, 127–33, doi: 10.1134/s1607672907030106.
5. Zhirnov, O.P., Vorobjeva, I.V., Saphonova, O.A., Poyarkov, S.V., Ovcharenko, A.V., Anhlan, D., Malyshev, A.N., and Klenk, H.D. (2009) Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells, *J. Clin. Virol.*, **45**, 322–333, doi: 10.1016/j.jcv.2009.05.030.
6. Clifford, M., Twigg, J., and Upton, C. (2009) Evidence for a novel gene associated with human influenza A viruses, *Virology*, **6**, 198, doi: 10.1186/1743-422X-6-198.
7. Gong, Y.N., Chen, G.W., Chen, C.J., Kuo, R.L., and Shih, S.R. (2014) Computational analysis and mapping of novel open reading frames in influenza A viruses, *PLoS One*, **9**, e115016, doi: 10.1371/journal.pone.0115016.
8. Yang, C.W., and Chen, M.F. (2016) Uncovering the potential pan proteomes encoded by genomic strand RNAs of influenza A viruses, *PLoS One*, **11**, e0146936, doi: 10.1371/journal.pone.0146936.
9. Sabath, N., Morris, J.S., and Graur, D. (2011) Is there a twelfth protein-coding gene in the genome of influenza A? A selection-based approach to the detection of overlapping genes in closely related sequences, *J. Mol. Evol.*, **73**, 305–315, doi: 10.1007/s00239-011-9477-9.
10. Zhirnov, O.P., Akulich, K.A., Lipatova, A.V., and Usachev, E.V. (2017) Negative-sense virion RNA of segment 8 (NS) of influenza A virus is able to translate in vitro a new viral protein, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **473**, 122–127, doi: 10.1134/S1607672917020090.
11. Жирнов О.П., Кленк Х.Д. (2010) Интеграция гена *NSP* вируса гриппа А в геном бакуловируса и его экспрессия в клетках насекомых, *Вопросы вирусологии*, **55**, 4–8.
12. Cunningham, J.L., Bakshi, B.K., Lentz, P.L., and Gilliam, M.S. (1976) Two new genera of leaf-parasitic fungi (*Basidiomycetidae: Brachybasidiaceae*), *Mycologia*, **68**, 640–654.
13. Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doere, M., and Linder, P. (2001) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis, *Mol. Cell.*, **11**, 127–138.
14. Quesada, V., Dýřaz-Perales, A., Gutiérrez-Fernández, A., Garabaya, C., Cal, S., and López-Otín, C. (2004) Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 54–62, doi: 10.1016/j.bbrc.2003.12.050.
15. Vervliet, T., Clerix, E., Seitaj, B., Ivanova, H., Monaco, G., and Bultynck, G. (2017) Modulation of Ca²⁺ signaling by anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 proteins at the endoplasmic reticulum-mitochondrial interface, *Front. Oncol.*, **7**, 75, doi: 10.3389/fonc.2017.00075.
16. Lauren, A., and Martin-Caraballo, M. (2019) T-type calcium channels in cancer, *Cancers*, **11**, 134, doi: 10.3390/cancers11020134.
17. Zhirnov, O.P., Konakova, T.E., Anhlan, D., Ludwig, S., and Isaeva, T.I. (2019) Cellular immune response in infected mice to NSP protein encoded by the negative strand NS RNA of influenza A virus, *Microbiol. Indep. Res. J.*, **6**, 10–17, doi: 10.18527/2500-2236-2019-6-1-28-36.
18. Yang, Z., and Bielawski, J.P. (2000) Statistical methods for detecting molecular adaptation, *Trends Ecol. Evol.*, **15**, 496–503, doi: 10.1016/s0169-5347(00)01994-7.
19. York, I., and Donis, R.O. (2013) The 2009 pandemic influenza virus: where did it come from, where is it now, and where is it going? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **370**, 241–257, doi: 10.1007/82_2012_221.
20. Wei, J., and Yewdell, J.W. (2018) Flu DRiPs in MHC class I immunosurveillance, *Virology*, **514**, 162–167, doi: 10.1007/s12250-018-0061-y.
21. Nguyen, M., and Haenni, A.L. (2003) Expression strategies of ambisense viruses, *Virus Res.*, **93**, 141–150, doi: 10.1016/s0168-1702(03)00094-7.
22. Zhong, W., Reche, P.A., Lai, C.C., Reinhold, B., and Reinherz, E.L. (2003) Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire, *J. Biol. Chem.*, **278**, 45135–45144, doi: 10.1074/jbc.M307417200.
23. Hickman, H.D., Mays, J.W., Gibbs, J., Kosik, I., Magadan, J.G., Takeda, K., and Yewdell, J.W. (2018) Influenza A virus negative strand RNA is translated for CD⁸⁺ T cell immunosurveillance, *J. Immunol.*, **201**, 1222–1228, doi: 10.4049/jimmunol.1800586.

UNIQUE BIPOLAR GENE ARCHITECTURE IN THE RNA GENOME OF INFLUENZA A VIRUS

O. P. Zhirnov

¹ *Ivanovsky Institute of Virology, Gamaleya Scientific Research Center of Epidemiology and Microbiology, Russian Ministry of Health, 123098 Moscow, Russia; E-mail: zhirnov@inbox.ru*

² *Russian-German Academy of Medical and Biotechnological Sciences, 121205 Moscow, Skolkovo, Russia*

Received November 6, 2019

Revised December 22, 2019

Accepted December 22, 2019

The genome of influenza A virus consists of eight single-stranded negative-polarity RNA segments. The eighth segment (NS) encodes the anti-interferon protein NS1 (27 kDa) and the nuclear export protein NEP (14 kDa) via the classic negative-sense strategy. It also contains an additional positive-sense open reading frame can be directly translated into the negative strand protein 8 (NSP8; 18–25 kDa in different strains). The existence of three or more genes of the opposite polarity in the same locus of a single-stranded RNA appears to be a unique (“economical”) type of gene architecture in living organisms. *In silico* analysis of genomes of human and animal influenza A viruses revealed that the *NSP8* gene had emerged in the influenza A virus population about 100 years ago (“young” gene) and is highly evolutionary variable. The obtained experimental data suggest that *NSP8* gene is expressed in the infected animals, which strengthens the concept of bipolar (ambisense) strategy of the influenza A virus genome. The high variability of the NSP8 protein suggests that the “young” *NSP8* gene is in the process of functional optimization. Further accumulation of mutations may alter the functions of mature NSP8 protein and lead to the emergence of mature bipolar influenza A virus with some unexpected properties that would be threatening for humans and animals.

Keywords: influenza virus, genome strategy, *NSP* gene, ambisense viruses, gene structure