

# STRUKTUR DAN PERANAN GENOM SEGMENT 7 (PROTEIN MATRIKS) DAN SEGMENT 8 (NONSTRUKTURAL) DALAM SIKLUS HIDUP DAN VIRULENSI VIRUS INFLUENZA

N.L.P. INDI DHARMAYANTI

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Makalah diterima 12 Maret 2010 – Revisi 27 Mei 2010)

## ABSTRAK

Protein matriks (M) dan nonstruktural (NS) adalah segmen terkecil dari genom virus influenza. Sekuen pendek *non-coding* yaitu sekuen nukleotida 11 – 13 pada ujung 5' dan nukleotida 9 – 11 pada ujung 3' sangat *conserved* diantara tujuh atau delapan segmen RNA dari genom dan sangat mirip diantara virus influenza A, B dan C. Protein matriks (M1) virus influenza adalah komponen yang penting dari virion dan berperan penting dalam beberapa aspek *dalam* replikasi virus, mulai *dari* masuknya virus dan *uncoating* sampai penyusunan dan *budding* dari partikel virus, sedangkan fungsi dari protein NS1 pada semua influenza A adalah sebagai antagonis respon imun inang. NS1 adalah protein multifungsi yang diantaranya adalah melakukan kegiatan regulasi temporal sintesis RNA, mengontrol *splicing* RNA virus, peningkatan translasi mRNA virus, regulasi morfogenesis partikel virus, supresi respon imun dan apoptosis inang, aktivasi phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dan keterlibatan dalam patogenesis. Pada tulisan ini dibahas tentang peranan dari dua protein yang dikode oleh segmen 7 dan 8 dari genom virus influenza yaitu protein matriks dan nonstruktural. Tujuan dari tulisan ini adalah untuk lebih memahami sifat dari virus influenza yang berkaitan dengan virulensi dan patogenisitas virus selain protein hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA).

**Kata kunci:** Virus influenza, protein matriks, protein nonstruktural

## ABSTRACT

### THE STRUCTURE AND ROLE OF SEGMENT 7 (MATRIX PROTEIN) AND SEGMENT 8 (NON STRUCTURAL) IN THE LIFE CYCLE AND VIRULENCE OF INFLUENZA VIRUS

Matrix (M) and Non Structural (NS) proteins are smallest segments of influenza virus genome. The noncoding sequences at each end include the sequences of 11 – 13 nucleotides at the 5' ends and 9 – 11 nucleotides at the 3' end which are highly conserved between seven or eight different RNA segments and very similar for A, B and C *influenza* viruses. Protein of M1 is an essential structural component of the virion and participates in other steps during the replication of influenza virus. During early viral infection, dissociation of M1 from RNP is required for entry of viral RNP into the cytoplasm of the host cell. On the other hand, NS1 is a multifunctions protein that performs a plethora of activities, which may additionally contribute toward efficient virus replication and virulence during infection. The role of NS1 are temporal regulation of viral RNA synthesis, control of viral mRNA splicing, enhancement of viral mRNA translation, regulation of virus particle morphogenesis, suppression of host immune/apoptotic responses, activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K); and involvement in strain-dependent pathogenesis. This paper reviews the structure and role of two proteins i.e. Matrix and Nonstructural to understand the character of influenza virus especially in virulence and pathogenesis *ability of virus other than* hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) protein as known.

**Key words:** Influenza virus, matrix protein, non structural protein

## PENDAHULUAN

Virus influenza adalah virus yang mempunyai materi genetik RNA untai tunggal berpolaritas negatif dengan genom bersegmen. Virus influenza A dan B mempunyai delapan segmen, sedangkan virus influenza C mempunyai tujuh segmen (McGEOCH *et al.*, 1976; DESSELBERGER *et al.*, 1980). Segmen-segmen tersebut adalah PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M dan NS (BETAKOVA *et al.*, 1996; BRASSARD *et al.*, 1996).

Protein *matriks* (M) dan *non structural* (NS) adalah segmen terkecil yang mengkode hanya satu produk gen. Sekuen pendek *non-coding* yaitu sekuen nukleotida 11 – 13 pada ujung 5' dan nukleotida 9 – 11 pada ujung 3' sangat *conserved* diantara tujuh atau delapan segmen RNA dari genom dan sangat mirip diantara virus A, B dan C (SKEHEL *et al.*, 1978; DESSELBERGER *et al.*, 1980; STOECKLE *et al.*, 1987). Tulisan ini bertujuan untuk membahas tentang biologi molekuler, fungsi dan sifat biologi dari dua segmen

terkecil dari virus influenza ini yaitu matriks dan nonstruktural, sehingga dapat diketahui peranan protein ini dalam mempengaruhi virulensi dan keganasan virus influenza.

## STRUKTUR DAN FUNGSI PROTEIN MATRIKS

Gen M virus influenza terdiri dari 1.027 basa dan mengkode dua protein yaitu protein M1 dan M2 diturunkan oleh *splicing* mRNA (ALLEN *et al.*, 1980; LAMB, 1989). *Open reading frame* (ORF) dimulai dari nukleotida ke-26 sampai 740 (gen M1) yang mengkode protein M1, sedangkan nukleotida 26 – 51 dan 740 – 1004 memisah dari *reading frame* +1 (gen M) yang mengkode protein M2. Protein M1 (panjangnya 252 asam amino) adalah komponen mayoritas dari partikel virus yang berfungsi dalam penyusunan dan *budding* virus (CHOPPIN *et al.*, 1972). Protein M2 mempunyai 97 asam amino adalah protein *transmembran* dengan peran yang belum diketahui dalam replikasi virus (LAMB *et al.*, 1985).

### Protein M1

Protein matriks (M1) virus influenza adalah partikel protein virus yang *paling banyak jumlahnya* dan berperan penting dalam beberapa aspek dari replikasi virus, *mulai dari* masuknya virus dan *uncoating* sampai penyusunan dan *budding* dari partikel virus (LAMB dan KRUG, 2001; NAYAK dan HUI, 2003). Struktur N terminus (aa 2 – 164) dari M1 telah ditentukan dengan kristalisasi, difraksi X-ray, *circular dichroism* dan *tritium bombardment* (SHA dan LUO, 1997; SHISHKOV *et al.*, 1999, ARTZ *et al.*, 2001; HARRIS *et al.*, 2001). M1 terdiri dari dua domain yang berbeda yaitu N dan M, yang terdiri dari heliks dan *loop*. Beberapa domain spesifik pada protein M1 adalah domain *lipid-binding*, domain *RNA-binding*, domain *transcription inhibition*, *nuclear localization signal* (NLS) dan sebuah motif *putative zinc finger-binding* (WAKEFIELD dan BROWNLEE, 1989). Motif *putative zinc finger-binding* motif M1 (<sup>148</sup>CATCEQIADSQHRSH<sup>162</sup>) (WAKEFIELD dan BROWNLEE, 1989) terletak pada C terminus heliks 9 (H9) dan diperpanjang sampai loop 9 (L9) (SHA dan LUO, 1997; ARZT *et al.*, 2001; HARRIS *et al.*, 2001). Sekuen asam amino yang terlibat dalam *zinc binding* adalah yang menunjukkan motif *Cys-Cys-His-His (CCHH)* *zinc finger* yang khas adalah (CX<sub>2-4</sub>CX<sub>2-15</sub>HX<sub>2-6</sub>H, dan X adalah residu asam amino) (IUCHI, 2001). Protein CCHH *zinc finger* terdiri dari bermacam-macam *famili* protein atau *RNA binding* dan berfungsi untuk regulasi transkripsi (TAKATSUJI, 1998; IUCHI, 2001).

Motif seperti *zinc finger* ditemukan pada sejumlah protein *struktural* viral dan telah ditunjukkan *bahwa mereka* mempunyai peran penting dalam siklus hidup virus influenza (FERNANDEZ-POL *et al.*, 2001). Beberapa peristiwa yang memperkirakan motif CCHH dalam M1 yang berperan penting dalam replikasi virus adalah: (i) analisis sekuen asam amino menunjukkan bahwa motif CCHH adalah *conserved* diantara virus influenza A dan B (WAKEFIELD dan BROWNLEE, 1989); (ii) ion zinc ditemukan dalam kaitannya dengan fraksi dari molekul protein M1 virus influenza (ELSTER *et al.*, 1997); (iii) OKADA *et al.* (2003) melaporkan perubahan konformasi tergantung pH dalam struktur peptide 28-mer meliputi daerah ini dengan adanya zinc dan membuat sebuah model untuk *binding* zinc (OKADA *et al.*, 2003). Lebih lanjut, telah juga diprediksi bahwa fraksi kecil dari molekul M1 yang terikat pada zinc seperti juga berperan penting dalam *uncoating* virus pada pH asam; (iv) peptide 4 adalah peptide sintetik *zinc finger* berdasarkan sekuen M1 <sup>152</sup>EQIADSQHRSHRQMV<sup>166</sup> dan peptide 6, yang berkaitan dengan sekuen M1 yaitu <sup>148</sup>CATCEQIADSQHRSHRQMV<sup>166</sup> yang ditunjukkan sebagai *inhibitor* poten dari transkripsi virus influenza (JUDD *et al.*, 1997). Peptida 6 ditunjukkan juga menghambat CPE pada sel MDCK yang terinfeksi virus (NASSER *et al.*, 1996) dan patogenisitas mencit yang diinfeksi virus influenza (JUDD *et al.*, 1997). Studi-studi ini berimplikasi bahwa motif CCHH pada 148 – 162 dan fungsi *zinc-binding* dari motif tersebut berperan penting dalam replikasi virus.

Protein M1 *virus* influenza berperan penting dalam beberapa aspek dalam replikasi virus dan memiliki domain untuk fungsi yang spesifik dalam siklus infeksi. Beberapa tahun yang lalu, diduga adanya peran domain fungsional dari M1 dalam siklus hidup infeksi virus influenza. Namun, pada beberapa tahun terakhir ini diperlihatkan bahwa NLS dari M1 tidak mempunyai peranan yang penting pada siklus hidup virus tetapi *keduanya membentuk sebuah motif domain late (L) assembly* yang dapat menyelamatkan mutasi NLS seperti PTAP dan YPDL (HUI *et al.*, 2003).

### Protein M2 dan resistensi amantadin

*Messenger RNA* (mRNA) dari protein M2 juga ditranskripsi dari RNA segmen 7 yang diturunkan dari koliner transkrip M1 dengan *splicing*. M2 adalah protein membran yang memiliki domain *membran-spanning* yang juga menyediakan sinyal untuk transpor ke permukaan sel. Ditemukannya sejumlah besar tetramer pada permukaan sel terinfeksi dan sejumlah kecil yang ditemukan pada virion membuktikan bahwa peran M2 sebagai *ion proton channel* yang dikontrol oleh pH golgi selama sintesis hemagglutinin (HA) yang

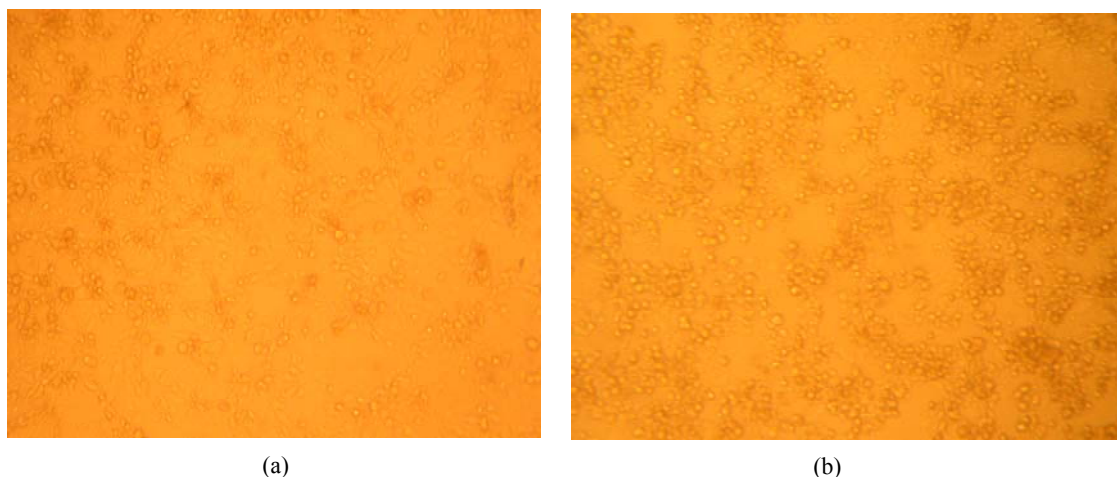
diikuti interior asidifikasi virion selama *uncoating* virus (WEBSTER *et al.*, 1992).

Analisis sensitivitas obat antara yang sensitif amantadin dan resisten amantadin pada virus menunjukkan faktor yang menentukan kepekaan terhadap amantadin dan hubungannya dengan *inhibitor* pada gen M (BELSHE *et al.*, 1988). Sebagian besar mutan resisten yang diseleksi dari pasase virus pada kultur sel dengan keberadaan obat atau resistensi yang telah terjadi pada hewan, unggas atau manusia terhadap amantadin atau rimantadin diakibatkan perubahan asam amino dalam domain transmembran M2, terutama pada residu 26, 27, 30, 31 atau 34 yang dapat berbeda posisinya pada virus yang berbeda (HAY *et al.*, 1986; BELSHE *et al.*, 1988). Pada Gambar 1 dapat dilihat sel terinfeksi virus AI sub tipe H5N1 yang resisten terhadap amantadin dengan keberadaan amantadin.

Derivat *adamantane* seperti amantadin dan rimantadin berhasil digunakan untuk pengobatan dan pencegahan infeksi virus influenza A lebih dari 30 tahun (BELSHE *et al.*, 1988; DOLIN *et al.*, 1982; TOMINACK dan HAYDEN, 1987). Obat ini dikenal sebagai *channel blockers* yang menghambat replikasi virus influenza A dengan menghambat protein M2 ion *channel* yang mencegah fusi virus dengan membran sel inang untuk melepaskan RNA virus ke sitoplasma sel terinfeksi (WANG *et al.*, 1993).

Sebagian besar virus influenza yang diisolasi di Asia Tenggara resisten terhadap amantadin dan rimantadin (LI *et al.*, 2004). Substitusi satu dari lima asam amino (posisi 26, 27, 30, 31 dan 34) dalam domain transmembran M2 diimplikasikan dengan hilangnya sensitivitas *blocker* M2 (HAY *et al.*, 1985; PINTO *et al.*, 1992).

Pada tahun 1979 – 1983, virus influenza A yang berpotensi menjadi pandemi yaitu H5, H6, H7 dan H9 belum terdeteksi adanya resistensi terhadap amantadin (ILYUSHINA *et al.*, 2005). Namun pada tahun 2000 – 2004 mulai terdeteksi adanya resistensi terhadap amantadin di wilayah Asia Tenggara yaitu sekitar 31,1% berasal dari sub tipe H5 dan 10,6% berasal dari sub tipe H9. Lebih lanjut, CHEUNG *et al* (2006) dalam penelitiannya tentang distribusi mutasi genetik yang berhubungan dengan resistensi derivat *adamantane* di antara virus yang diisolasi di Vietnam, Thailand, Kamboja, Indonesia, Hong Kong dan Cina melaporkan bahwa lebih dari 95% virus yang diisolasi dari Vietnam dan Thailand mengalami mutasi di M2 yang menunjukkan resisten terhadap derivat *adamantane*. Di Indonesia pada tahun 2006, dilaporkan sekitar 6,3% (2 dari 32 virus) dan Cina 8,9% telah mengalami resistensi terhadap amantadin. Mutasi terjadi umumnya pada motif Leu26Ile-Ser31Asn ditemukan di hampir seluruh isolat dari Vietnam, Thailand dan Kamboja. Di Indonesia, SMITH *et al.* (2006) juga menyatakan bahwa virus yang berasal dari Pulau Sumatera menunjukkan mutasi Ser31Asn pada protein M2, yang mengindikasikan bahwa virus-virus tersebut telah mengalami resistensi terhadap amantadin. HURT *et al.* (2007) menunjukkan bahwa sekitar 30% (2 dari 6 virus yang digunakan, berasal dari virus tahun 2005) menunjukkan resisten terhadap derivat *adamantane*. Pada tahun 2009, penelitian terbaru dari DHARMAYANTI *et al.* (2010) menunjukkan bahwa sepanjang tahun 2003 – 2008, terdapat sekitar 66,328% (91/146) virus AI di Indonesia telah mengalami resistensi terhadap amantadin dan sepuluh diantaranya merupakan virus dengan mutasi ganda pada V27A dan S31N.



**Gambar 1.** (a) Sel MDCK diinfeksi virus resisten amantadin A/Ck/WestJava/SMI-Biot/08 dengan penambahan amantadin (4µg/ml); (b) diinfeksi virus resisten amantadin A/Ck/West Java/ SMI-Biot/08 dengan penambahan amantadin (8 µg/ml)

**Sumber:** DHARMAYANTI (2009)

## Struktur dan fungsi protein non struktural (NS)

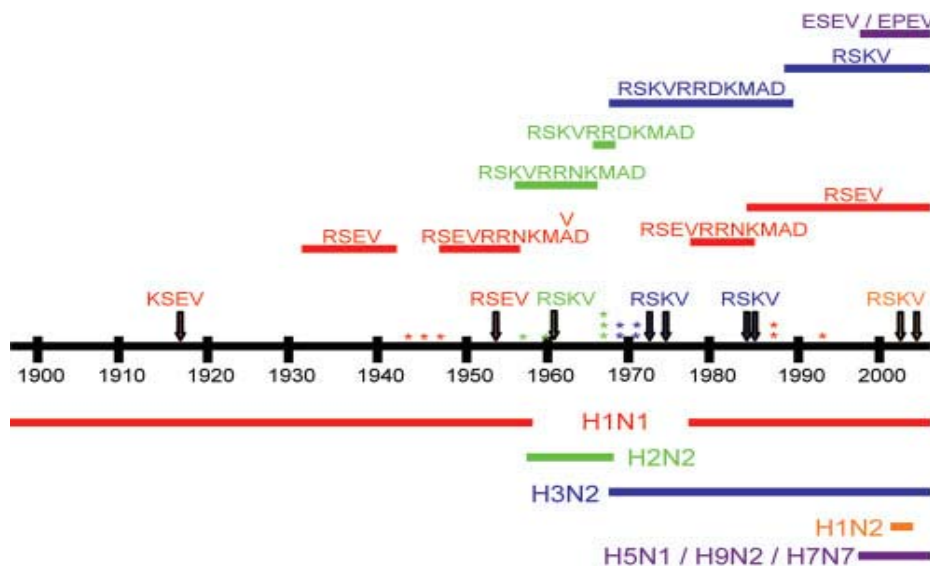
Untuk membatasi penyebaran virus, sel yang terinfeksi oleh virus biasanya mempunyai mekanisme yang kuat dan respon antivirus yang luas (RANDALL dan GOODBOURN, 2008). Oleh karena itu, untuk bertahan hidup di alam, virus influenza mengembangkan beberapa mekanisme untuk mengelak terhadap pertahanan yang telah dibuat inang. Beberapa strategi yang **strain-spesifik**, antara lain dengan peningkatan kecepatan replikasi (GRIMM *et al.*, 2007; KUROKAWA *et al.*, 1999), atau penurunan sensitivitas efektor antivirus sel inang (DITTMANN *et al.*, 2008). Protein NS1 pada semua influenza A adalah sebagai antagonis respon imun inang. (EGOROV *et al.*, 1998; GARCIA-SASTRE *et al.*, 1998; KOCHS *et al.*, 2007). Li *et al* (2006b) menyatakan dalam penelitiannya bahwa NS1 berkontribusi terhadap virulensi virus influenza.

Virus influenza mutan yang tidak mengekspresikan NS1, hanya menunjukkan patogenisitas yang tinggi pada mencit yang kekurangan mediator antivirus seperti STAT1 (GARCIA-SASTRE *et al.*, 1998), atau protein kinase yang diaktifkan dsRNA, PKR (BERGMANN *et al.*, 2000; KOCHS *et al.*, 2007). NS1 adalah protein multifungsi yang diantaranya adalah melakukan kegiatan regulasi temporal sintesis RNA, mengontrol *splicing* RNA virus, peningkatan translasi mRNA virus, regulasi morfogenesis partikel virus, supresi respon imun dan apoptosis inang, aktivasi phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dan keterlibatan dalam patogenesis yang **intensitasnya** tergantung strain.

## Sintesis dan biokimia NS1

Protein NS1 virus influenza A adalah komponen bukan struktural dari virion, tetapi protein ini diekspresikan pada level yang sangat tinggi pada sel terinfeksi (KRUG dan ETKIND, 1973; PALESE dan SHAW, 2007). Protein NS1 dikode oleh *collinear* mRNA yang berasal dari segmen 8 vRNA, sebagai hasil *splicing* pada sintesis *nuclear export protein* mRNA (NEP, sebelumnya diistilahkan NS2) (INGLIS *et al.*, 1979; LAMB dan CHOPPIN, 1979). Potongan mRNA kedua jenis protein ini menggunakan 56 nukleotida pada ujung 5' secara bersama dan menghasilkan NS1 serta NEP berbagi 10 N-terminal asam amino (LAMB dan LAI, 1980). Pada sel terinfeksi, jumlah potongan NEP mRNA hanya kira-kira 10% dari NS1 mRNA yang belum terpotong (LAMB *et al.*, 1980). Seperti dijelaskan di bawah ini, regulasi *splicing* dikontrol oleh protein NS1 virus sendiri (GARAIGORTA dan ORTIN, 2007) dan mungkin merupakan mekanisme untuk autoregulasi protein dalam sel terinfeksi.

Protein NS1 memiliki strain-spesifik dengan panjang 230 – 237 asam amino (aa), dan diperkirakan mempunyai massa molekul sekitar 26 kDa (PALESE dan SHAW, 2007). Secara alami terjadi pemotongan protein NS1 pada C-terminal (~ 15 – 30 aa) (SUAREZ dan PERDUE, 1998). Pada tahun 1940-an, analisis sekuen menunjukkan bahwa protein NS1 dengan panjang 230 aa dan kemudian meningkat sekitar tujuh asam amino pada virus manusia H1N1 (Gambar 2).



**Gambar 2.** Sekuen asam amino C-terminal protein NS1 virus influenza manusia

Diagram skematik yang menggambarkan asam amino C-terminal residu 227 – 230/237 protein NS1 protein dari virus influenza pada manusia yang diisolasi sejak tahun 1918

**Sumber:** disadur dari HALE *et al.* (2008b)

Sirkulasi virus influenza A pada manusia ditunjukkan sesuai dengan waktu. Warna-warna merepresentasikan sub tipe yang bersirkulasi: merah, H1N1; hijau, H2N2; biru, H3N2; jingga, H1N2; dan ungu virus H5N1/H9N2/H7N7 pada manusia yang berasal dari unggas. Sekuen C-terminal dari asam amino 227 diperlihatkan pada Gambar 2 sesuai waktu dengan isolat yang pertama kali diisolasi pada tahun 1918 dengan sekuen KSEV. Pada akhir 1940, protein NS1 mengalami perpanjangan tujuh asam amino (RRNKMAD) dan perpanjangan ini terpelihara pada semua sub tipe influenza virus pada manusia dan kemudian hilang pada saat terjadinya ko-sirkulasi antara virus H1N1 dan H3N2 pada akhir 1980. Sepanjang waktu ini sejumlah influenza yang diisolasi memiliki pemendekan C-terminal protein NS1 yang ditunjukkan dengan tanda asterik. Virus yang diturunkan dari spesies unggas memiliki sekuen ESEV dan EPEV pada sekuen konsensus PDZ domain ligand (PL).

Ekstensi asam amino ini ditemukan pada virus manusia H1N1, H2N2 dan H3N2 sampai tahun 1980-an, dan ketika virus H3N2 dan H1N1 keduanya bersirkulasi bersama, virus kehilangan ekstensi ini melalui mekanisme reversi. Adanya ekstensi dan mengapa ekstensi tersebut kemudian hilang, tidak sepenuhnya jelas, meskipun secara fungsional diimplikasikan dalam *nuclear* dan *nucleolar localization* dari NS1 (MELEN *et al.*, 2007). Interaksi antara NS1 C-terminus dengan berbagai protein selular, seperti poly (A)-binding protein I (PABPI) dan protein yang mengandung PDZ domain, sepertinya juga masih belum jelas.

Analisis filogenetik sekuen asam amino NS1 juga menunjukkan bahwa protein NS1 dapat dibagi menjadi dua kelompok besar, awalnya dikenal sebagai alela A dan B (TREANOR *et al.*, 1989; LUDWIG *et al.*, 1991). Sejumlah protein NS1 dari virus avian influenza bersama dengan semua virus influenza dari manusia, babi dan kuda disebut sebagai alel A, sedangkan alel B khusus untuk virus unggas. Tingkat homologi di dalam alel adalah 93 – 100%, namun homologi di antara alel sedikitnya sekitar 62%. Ketika virus rekombinan manusia mengandung alel B protein NS1 digunakan untuk menginfeksi *squirrel monkey*, terdapat penurunan kemampuan virus dalam melakukan replikasi pada saluran pernafasan dibandingkan dengan virus jenis-liar (WT) (TREANOR *et al.*, 1989). Hal ini memperlihatkan bahwa alel A protein NS1 protein memiliki keuntungan jika bereplikasi pada mamalia. Analisis lebih lanjut mengungkapkan bahwa alel A protein NS1 berada terus di bawah tekanan seleksi untuk melakukan mutasi, sedangkan pada alel B tidak mengalami hal demikian (LUDWIG *et al.*, 1991).

Alel B kemungkinan mewakili versi *archaic* dari protein ini dan setelah berada dalam populasi virus influenza manusia dengan melalui *reassortment*, NS1

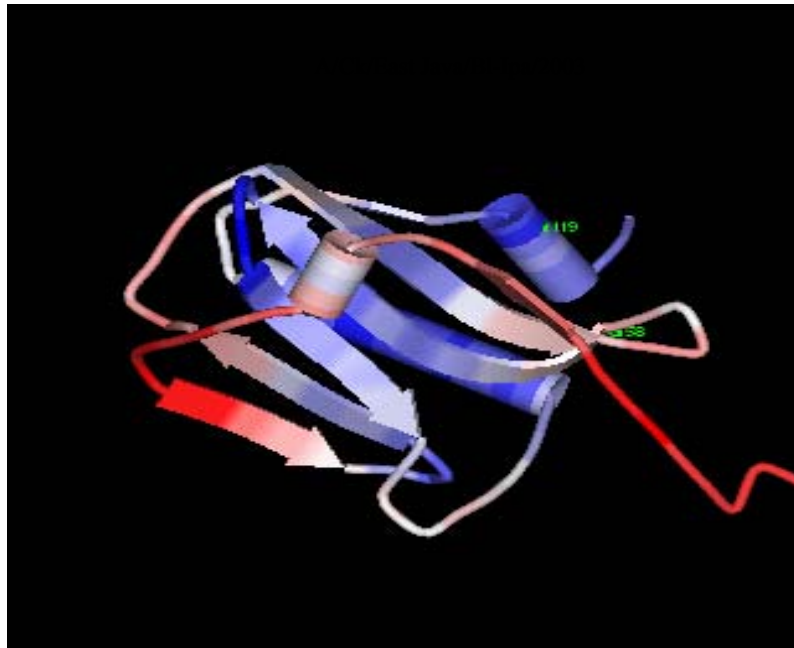
berada di bawah tekanan seleksi yang kuat untuk bermutasi. Besarnya tingkat evolusi diantara dua alel mungkin menunjukkan bahwa terdapat hambatan fungsi nyata dari protein NS1 diantara spesies inang. Signifikansi alel NS1 dalam virulensi dan patogenisitas virus influenza belum sepenuhnya jelas, namun sebagian besar virus influenza HPAI yang diisolasi dari manusia memiliki alel A dari protein NS1 (ZOHARI *et al.*, 2008).

### Struktur protein NS1

NS1 terbagi menjadi dua domain fungsional yang berbeda yaitu: sebuah N-terminal *RNA-binding domain* (residu 1 – 73), yang secara *in vitro* mengikat dengan afinitas rendah ke beberapa spesies RNA secara berurutan secara independen (CHIEN *et al.*, 2004; HATADA dan FUKUDA, 1992; QIAN *et al.*, 1995); dan C-terminal '*effector*' domain (residu 74 – 230), yang secara dominan memperantarai interaksi protein sel dengan inang, tetapi juga secara fungsional menstabilisasi *RNA-binding domain* (WANG *et al.*, 2002).

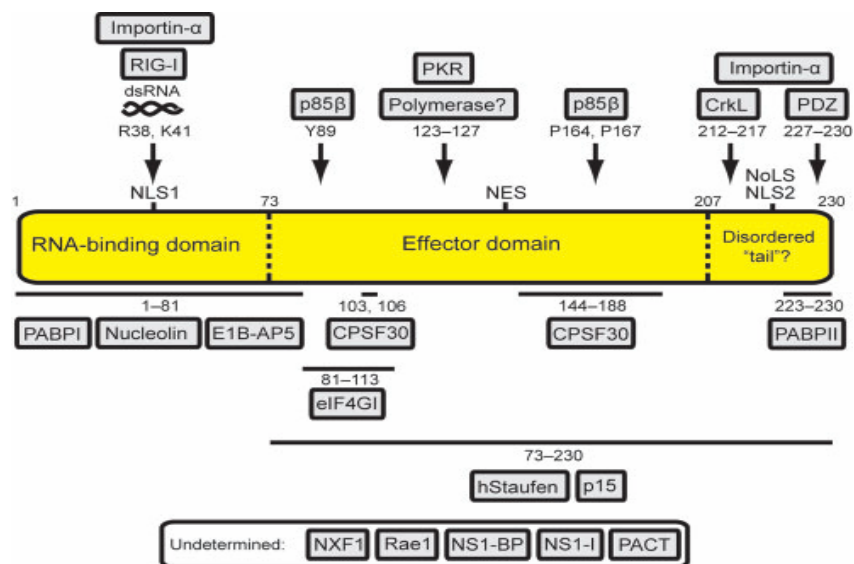
*RNA-binding domain* adalah simetris homodimer dengan masing-masing monomer yang terdiri dari tiga- $\alpha$  helik (CHIEN *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1997). Hal ini juga dibuktikan pada Gambar 3 menunjukkan bahwa hasil dari visualisasi tiga dimensi protein NS1 dari virus A/Ck/East Java/BL-IPA/2003 terdiri dari tiga heliks (DHARMAYANTI, 2009). Studi kristalografi menunjukkan bahwa domain C-terminal *effector* pada protein NS1 virus influenza manusia dan unggas (residu 74 – 230) (Gambar 4) dapat melakukan homodimerisasi secara independen, dengan masing-masing monomer yang terdiri dari tujuh  $\beta$ -strand dan tiga  $\alpha$ -helik (BORNHOLDT dan PRASAD, 2006; HALE *et al.*, 2008a).

Gambar 4 menunjukkan bahwa protein NS1 (berwarna kuning) mempunyai panjang asam amino 230 – 237 tergantung dari *strain*. Dua puluh asam amino pada asam amino C-terminal ~20 merupakan protein nonstruktural. NS1 terdiri dari dua *nuclear localization sequences* (NLS1 dan NLS2), dan sebuah *nuclear export sequence* (NES). Residu yang terlibat dalam *RNA-binding* (Arg-38 [R38] dan Lys-41[K41]) diimplikasikan dalam penghambatan OAS/RNase L, Jun N terminal kinase, dan RIG-I. Lebih lanjut, NS1 mengandung *binding sites* untuk *poly(A)-binding protein I* (PABPI), p85b, *importin-a*, *nucleolin*, NS1-BP, eIF4GI, *hStaufen*, NS1-I, PKR, PACT, CPSF30, *poly(A) -binding protein II* (PABPII), Crk/CrkL, domain PDZ, viral polimerase, dan komponen seluler mRNA *nuclear export machinery* (E1B-AP5, p15, NXF1, dan Rae1). Interaksi NS1 dengan *nucleolin*, dan NS1-I (17b-oestradiol dehydrogenase precursor protein) (WOLFF *et al.*, 1996) sejauh ini belum banyak dikarakterisasi.



**Gambar 3.** Visualisasi prediksi tiga dimensi protein NS1 dari virus A/Ck/East Java/BL-IPA/2003

**Sumber:** DHARMAYANTI (2009)



**Gambar 4.** Representasi skematik protein NS1 dan protein yang berinteraksi dengannya

**Sumber:** HALE *et al.* (2008b)

## NS1 membatasi aktivitas PKR dan OAS

NS1 dapat secara langsung menghambat fungsi dua protein antivirus sitoplasma yaitu 2'-5'-*oligoadenylate synthetase* (OAS) (MIN dan KRUG, 2006), dan *dsRNA-dependent serine/threonine protein kinase* R (PKR) (MIN *et al.*, 2007). OAS/RNase L dan PKR merupakan kunci *regulator* dari proses transkripsi dan translasi virus, tetapi berperan juga dalam pertahanan awal seperti induksi IFN- $\beta$  dan respon apoptosis inang (GARCIA *et al.*, 2006; SILVERMAN, 2007). OAS diaktifkan oleh dsRNA, diduga merupakan produk dari replikasi virus, dan polimerisasi ATP menjadi rantai 2'-5' oligoadenylate. Rantai ini menyebabkan dimerisasi dan aktivasi laten RNase, RNase L, yang menghambat replikasi virus dengan degradasi RNA (SILVERMAN, 2007). Data menunjukkan bahwa fungsi utama NS1 *RNA-binding* domain adalah keluarnya OAS untuk berinteraksi dengan dsRNA, sehingga penghambatan ini merupakan strategi antivirus inang (MIN dan KRUG, 2006). Peran RNase L dalam menambah produksi IFN- $\beta$  (SILVERMAN, 2007), kemungkinan inaktivasi OAS yang diperantarai NS1 juga berkontribusi terhadap supresi sintesis IFN- $\beta$  (DONELAN *et al.*, 2003; TALON *et al.*, 2000).

*Double strand ribonucleic acid* (dsRNA) juga terikat dan mengaktifkan PKR, melepaskan PKR *auto-inhibition* yang merupakan substrat utama untuk mengaktifkan PKR adalah *eukaryotic translation initiation factor* 2 $\alpha$  ( $\alpha$ IF2 $\alpha$ ), fosforilasi yang berperan terhadap pengurangan sintesis protein selular dan protein virus (GARCIA *et al.*, 2006). Dalam percobaan *in vitro*, menunjukkan bahwa pada awalnya mungkin juga NS1 berkompetisi dengan PKR untuk mengikat dsRNA (HATADA *et al.*, 1999; LU *et al.*, 1995). Namun, *RNA-binding* yang defek pada protein NS1 secara efisien membatasi aktivasi PKR dalam merespon dsRNA atau PACT yang merupakan sebuah pengaktif protein dari PKR (LI *et al.*, 2006a). Selain itu, NS1 juga berinteraksi dengan PKR, yang memerlukan residu 123 – 127 dari NS1 (LI *et al.*, 2006a; MIN *et al.*, 2007). Berdasarkan studi pemetaan domain, diperkirakan NS1 terikat pada daerah penghubung dalam PKR dan dengan demikian mencegah perubahan konformasi yang biasanya diperlukan untuk melepaskan PKR *auto-inhibition* (LI *et al.*, 2006a).

## NS1 dan respon apoptosis inang

Fungsi biologis apoptosis selama infeksi virus influenza A tidak begitu jelas, meskipun sering dianggap sebagai mekanisme antiviral selular yang akan membatasi replikasi virus. Virus influenza telah mengembangkan berbagai cara untuk menunda ini,

sebagai strategi pertahanan inang (EHRHARDT *et al.*, 2007; KUOKAWA *et al.*, 1999; ZHIRNOV dan KLENK, 2007; ZHIRNOV *et al.*, 2002).

Faktor pro-apoptosis selular juga menginduksi efisiensi propagasi virus influenza dan protein virus tertentu, seperti NA dan PB1-F2, yang juga mempunyai fungsi pro-apoptosis (PALESE dan SHAW, 2007). Secara keseluruhan regulasi temporal antara mekanisme pro- dan anti-apoptosis mungkin menjadi sangat penting untuk virus. Pembatasan apoptosis pada fase awal selama infeksi dapat menginduksi beberapa kejadian seperti replikasi genom, sementara meningkatkan apoptosis nantinya dapat mengakibatkan peningkatan keluarnya anakan virus. Apoptosis yang terjadi setelah virus bereplikasi kemungkinan dapat meningkatkan pembersihan fagositik dari sel terinfeksi, yang mungkin merangsang respon sitotoksik yang diperantarai oleh sel.

Peran NS1 dalam apoptosis belum sepenuhnya jelas, karena NS1 dilaporkan memiliki keduanya yaitu sebagai pro- dan anti-apoptosis (EHRHARDT *et al.*, 2007; LAM *et al.*, 2008; SCHULTZ-CHERRY *et al.*, 2001; SHIN *et al.*, 2007b; STASAKOVA *et al.*, 2005; ZHIRNOV *et al.*, 2002). Sepertinya antagonis fungsi dari NS1 ini mungkin sebagai konsekuensi dari protokol [eksperimen yang spesifik, tipe sel atau strain virus](#) yang digunakan. Hipotesis yang menarik adalah NS1 berkontribusi secara temporal terhadap tekanan pada awal apoptosis dan induksi yang lambat dari kematian sel.

Selama infeksi virus, NS1 dengan jelas menampilkan fungsi anti-apoptosis yang terkait dengan kemampuan untuk membatasi produksi dan pengaruh IFN (ZHIRNOV *et al.*, 2002). Oleh karena itu, dalam sel MDCK kompeten IFN, virus PR8 delNS1 menginduksi apoptosis lebih tinggi daripada wt PR8 (ZHIRNOV *et al.*, 2002). Namun, dalam sel Vero, yang kekurangan gen, kedua virus menginduksi apoptosis dalam tingkat yang serupa, namun lebih lambat daripada yang diamati pada sel MDCK (ZHIRNOV *et al.*, 2002). Belum diketahui fungsi sel Vero yang defek di jalur gen selain IFN $\alpha$ / $\beta$ , karena itu diduga bahwa antagonis IFN $\alpha$ / $\beta$  NS1 adalah faktor yang paling penting dalam membatasi apoptosis. Secara katalitik aktif, PKR dilaporkan berperan dalam apoptosis selama infeksi virus influenza (TAKIZAWA *et al.*, 1996). Pengikatan langsung dan penghambatan PKR oleh NS1 juga dapat mengakibatkan tekanan pada kematian sel. Hal yang sama mungkin berlaku untuk inhibisi yang diperantarai NS1 yaitu pro-apoptosis OAS/RNase L (MIN dan KRUG, 2006), atau jalur JNK/AP-1 (LUDWIG *et al.*, 2002). Seperti yang telah dijelaskan, aktivasi dari jalur sel-inang PI3K digambarkan sebagai metode tambahan dari NS1 yang mungkin membatasi induksi apoptosis (EHRHARDT *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2007a; ZHIRNOV dan KLENK, 2007).

### Protein NS1 dalam deregulasi sitokin dan virulensi

Pertama kali dilaporkan infeksi virus influenza H5N1 (HPAI) pada manusia di tahun 1997 yang menyebabkan infeksi pada 18 individu dengan enam diantaranya meninggal dunia (SUBBARAO *et al.*, 1998). Virus yang bertanggung jawab atas kejadian tersebut merupakan pemicu yang kuat dari sitokin pro-inflamatori, terutama TNF- $\alpha$  (CHEUNG *et al.*, 2002), dan infeksi virus yang dicirikan dengan *hypercytokinaemia* dan sindrom reaktif *haemophagocytic* (TO *et al.*, 2001). Berdasarkan analisis pada virus influenza manusia, protein NS1 virus H5N1 dapat menurunkan tingkat induksi sitokin pro-inflamatori, dan spekulasinya adalah datangnya penyakit tergantung pada keseimbangan produksi sitokin pro-inflamatori dan kemampuan NS1 untuk mengatasi hal tersebut (HYLAND *et al.*, 2006). Penelitian SEO *et al.* (2002) menunjukkan bahwa virus letal H5N1 (HK/97) telah resisten terhadap efek antiviral IFN dan TNF- $\alpha$  (SEO *et al.*, 2002) dan resistensi ini membutuhkan asam amino asam glutamat pada posisi 92 dari NS1. Introduksi protein NS1 dari virus HK/97 ke dalam virus influenza manusia memungkinkan virus rekombinan melakukan replikasi dengan adanya sitokin, sedangkan virus wt, atau virus rekombinan virus dengan asam aspartat pada posisi 92, virus tidak dapat bereplikasi sama sekali. Virus rekombinan ini juga meningkatkan patogenisitas pada babi. SEO *et al.* (2002) dalam studinya juga menunjukkan bahwa *hypercytokinaemia* yang terkait dengan virus HK/97 kemungkinan disebabkan oleh respon sitokin inang yang sangat besar dalam melawan virus yang sangat resisten terhadap sitokin. Hal berbeda dengan hasil HYLAND *et al.* (2006), pada mencit yang diinfeksi dengan PR8 rekombinan yang mengkode protein NS1 virus HK/97 menyebabkan tingginya tingkat sitokin/kemokin dan menurunkan sitokin inflamatori (IL-10) (LIPATOV *et al.*, 2005).

Ketidakseimbangan sitokin ini memerlukan Glu-92 pada NS1, hal ini konsisten dengan hasil *post mortem* individu yang meninggal pada tahun 1997 akibat wabah H5N1 HPAI. Namun, harus dicatat bahwa, walaupun virus HPAI yang diisolasi pada tahun 1997 mengandung Glu-92 pada NS1, virus H5N1 yang memiliki residu ini tidak dapat diisolasi lagi di alam dan Glu-92 belum pernah ditemukan di protein NS1 virus influenza A yang lain. Pada tahun 2008, penelitian terbaru melaporkan bahwa delesi asam amino pada posisi 80 – 84, protein NS1 meningkatkan virulensi virus H5N1 (LONG *et al.*, 2008). Namun, karena peningkatan virulensi selalu terkait dengan mutasi Glu-92 dan tidak terjadi pada virus yang mengandung Asp-92 di NS1, efek delesi ini menjadi tidak jelas. Dalam studi sebelumnya dicatat bahwa beberapa virus dengan delesi residu 191 – 195 di NS1

juga memiliki delesi residu 80 – 84 (ZHU *et al.*, 2008). Mengingat bahwa salah satu virus ini memunculkan sifat tidak patogen, sehingga sangat penting untuk menentukan peranan delesi dari 80 – 84 sebagai determinan virulensi.

### Peranan NS1 dalam sinyal sel dan virulensi

Selain mengatasi respon IFN inang dan dapat melakukan replikasi secara efisien dalam keberadaan sitokin, mekanisme lain yang dapat mempengaruhi virulensi NS1 adalah dengan *binding* dan berinteraksi dengan protein sinyal seluler. Dari skala besar analisis sekuensing teramati bahwa C-terminal dari protein NS1 virus avian influenza memiliki sekuens konsensus dari PDZ domain ligand (PL) (OBENAUER *et al.*, 2006). PDZ domain PL adalah protein-protein *recognition* yang termasuk dalam protein-protein yang mengatur berbagai penyusunan sinyal selular yang luas. Mereka secara khusus mengenali dan mengikat motif peptida pendek C-terminal yang terdiri dari 4 – 5 asam amino, yang disebut PL. PL dari protein NS1 virus influenza unggas terdiri dari residu 227 – 230, dengan sekuens ESEV atau EPEV. Sekuens C-terminal NS1 pada virus influenza manusia yang diisolasi sejak tahun 1918 dapat dilihat pada Gambar 2. Sekuens PL pada unggas tidak terdeteksi pada protein NS1 virus influenza bukan unggas, dan untuk sejumlah besar protein NS1 virus influenza pada manusia diperpanjang dengan tujuh asam amino pada C-terminal.

OBENAUER *et al.* (2006) menunjukkan bahwa protein NS1 influenza unggas dari virus 1918 mampu untuk mengikat 30 protein PDZ domain manusia, sedangkan virus pada manusia tidak dapat melakukan hal tersebut. Efek dari sekuens PL NS1 virus unggas justru terjadi pada virulensi virus influenza manusia yang baru-baru ini dilaporkan oleh JACKSON *et al.* (2008). Introduksi sekuens PL virus 1918 pada protein NS1 dari virus WSN meningkatkan virulensi virus ini pada mencit. Infeksi dengan virus yang berisi PL-*avian like* pada protein NS1 telah ditandai dengan kehilangan bobot badan yang parah, kemampuan hidup yang menurun, menurunkan MLD<sub>50</sub>, alveolitis parah dan peningkatan penyebaran virus pada paru-paru. Hasil ini mendukung hipotesis bahwa protein NS1, ketika berada dalam sel manusia, dapat berinteraksi dengan protein yang mengandung domain PDZ untuk mengganggu jalur selular dan meningkatkan virulensi.

### KESIMPULAN

Peranan dua segmen terkecil virus influenza yaitu M dan NS sangat penting dalam analisis patogenisitas dan virulensi virus influenza. Analisis sensitivitas obat antara yang sensitif amantadin dan resisten amantadin

pada virus menunjukkan faktor yang menentukan kepekaan terhadap amantadin dan hubungannya dengan inhibitor pada gen M. Protein NS1 virus influenza A adalah komponen bukan struktural dari virion, tetapi protein tersebut diekspresikan pada level yang sangat tinggi pada sel terinfeksi sehingga protein ini dapat digunakan sebagai penanda faktor virulensi baru dari virus influenza. Selain itu, protein NS1 juga dapat menunjukkan virus influenza tersebut berasal dari mamalia atau manusia atau berasal dari unggas. Semua virus influenza dari manusia, babi dan kuda disebut sebagai alel A, sedangkan alel B khusus untuk virus unggas. Pentingnya melakukan analisis kedua protein ini untuk mengetahui karakter biologis dan molekuler virus influenza secara keseluruhan, terutama virus influenza di Indonesia, selanjutnya dapat membantu dalam memprediksi perubahan karakter virus dan mewaspadai virus-virus mutasi yang kemungkinan akan lebih berbahaya bagi manusia pada masa mendatang.

#### DAFTAR PUSTAKA

- ALLEN, H., J. MCCAULEY, M. WATERFIELD and M.J. GETTING. 1980. Influenza virus RNA segment 7 has the coding capacity for two polypeptides. *Virology* 107: 438 – 442.
- ARST, S., F. BAUDIN, A. BARGE, P. TIMMINS, W.P. BURMEISTER and R.W.H. RUIGROK. 2001. Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology* 279: 439 – 446.
- BELSHE, R.B., M.H. SMITH, C.B. HALL, R. BETTS and A.J. HAY. 1988. Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection. *J. Virol.* 62: 1508 – 1512.
- BERGMANN, M., I. ROMIRER, M. SACHET, R. FLEISCHACKER, A. GARCIA-SASTRE, P. PALESE, K. WOLFF, H. PEHAMBERGER, R. JAKESZ and T. MUSTER. 2001. A genetically engineered influenza A virus with rasdependent oncolytic properties. *Cancer Res.* 61: 8188 – 8193.
- BETAKOVA, T., M.V. NERMUT and A.J. HAY. 1996. The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. *J. Gen. Virol.* 77: 2689 – 2694.
- BORNHOLDT, Z.A. and B.V. PRASAD. 2006. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 559 – 560.
- BRASSARD, D.L., G.P. LESER and R.A. LAMB. 1996. Influenza B NB glycoprotein is a component of virions. *Virology* 220: 350 – 360.
- CHEUNG, C.L., R.M. RAYNER, G.J.D. SMITH, P. WANG, T.S.P. NAIPOSPOS, J. ZHANG, K.Y. YUEN, R.G. WEBSTER, J.S.M. PEIRIS, Y. GUAN and H. CHEN. 2006. Distribution of amantadine-resistant H5N1 Avian Influenza variants in Asia. *JID* 193: 1626 – 1629.
- CHEUNG, C.Y., L.L. POON, A.S. LAU, W. LUK, Y.L. LAU, K.F. SHORTRIDGE, S. GORDON, Y. GUAN and J.S. PEIRIS. 2002. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: A mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 360: 1831 – 1837.
- CHIEN, C.Y., Y. XU, R. XIAO, J.M. ARAMINI, P.V. SAHASRABUDHE, R.M. KRUG and G.T. MONTELIONE. 2004. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: Evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry* 43: 1950 – 1962.
- CHIEN, C.Y., R. TEJERO, Y. HUANG, D.E. ZIMMERMAN, C.B. RIOS, R.M. KRUG and G.T. MONTELIONE. 1997. A novel RNA-binding motif in influenza A virus non-structural protein 1. *Nat. Struct. Biol.* 4: 891 – 895.
- CHOPPIN, P.W., R.W. COMPANS, A. SCHEILD, J. MCSHARRY, and S. LAZAROWITZ. 1972. Structure and assembly of viral membranes. In: *Membrane Research*. FOX, C.F. (Ed.). Academic Press, Inc., New York. pp. 163 – 179.
- DESSELBERGER, U., V.R. RACAINELLO, J.J. ZAZRA and P. PALASE. 1980. The 3' and 5' terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementary. *Gene* 8: 315 – 328.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I. 2009. Perubahan Genom dan Karakter Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Unggas di Indonesia. Disertasi Program Doktor Ilmu Biomedik. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 278 hlm.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., F. IBRAHIM and A. SOEBANDRIO. 2010. Amantadine resistant of Indonesian influenza H5N1 subtype virus during 2003 – 2008. *Microbiology Indonesia* 5(1): 11 – 16.
- DITTMANN, J., S. STERTZ, D. GRIMM, J. STEEL, A. GARCIA-SASTRE, O. HALLER and G. KOCHS. 2008. Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J. Virol.* 82: 3624 – 3631.
- DOLIN, R., R.C. REICHMAN, H.P. MADORE, R. MAYNARD, P.N. LINTON and J. WEBBER-JONES. 1982. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *N. Engl. J. Med.* 307: 580 – 584.
- DONELAN, N.R., C.F. BASLER and A. GARCIA-SASTRE. 2003. A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. *J. Virol.* 77: 13257 – 13266.
- EGOROV, A., S. BRANDT, S. SEREINIG, J. ROMANOVA, B. FERKO, D. KATINGER, A. GRASSAUER, G. ALEXANDROVA, H. KATINGER and T. MUSTER. 1998. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 72: 6437 – 6441.

- EHRHARDT, C., T. WOLFF, S. PLESCHKA, O. PLANZ, W. BEERMANN, J.G. BODE, M. SCHMOLKE and S. LUDWIG. 2007. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J. Virol.* 81: 3058 – 3067.
- ELSTER, C., K. LARSEN, J. GAGNON, R.W.H. RUIGROK and F. BAUDIN. 1997. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *J. Gen. Virol.* 78: 1589 – 1596.
- FERNANDEZ-POL, J.A., P.D. HAMILTON and D.J. KLOS. 2001. Essential viral and cellular zinc and iron containing metalloproteins as targets for novel antiviral and anticancer agents: Implications for prevention and therapy of viral diseases and cancer. *Anticancer Res.* 21: 931 – 957.
- GARAIGORTA, U. and J. ORTIN. 2007. Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleocytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res.* 35: 4573 – 4582.
- GARCIA-SASTRE, A., A. EGOROV, D. MATASSOV, S. BRANDT, D.E. LEVY, J.E. DURBIN, P. PALESE and T. MUSTER. 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252: 324 – 330.
- GARCIA, M.A., J. GIL, I. VENTOSO, S. GUERRA, E. DOMINGO, C. RIVAS and M. ESTEBAN. 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 1032 – 1060.
- GRIMM, D., P. STAEHEL, M. HUFBAUER, I. KOERNER, L. MARTINEZ-SOBRIDO, A. SOLORZANO, A. GARCIA-SASTRE, O. HALLER and G. KOCHS. 2007. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 6806 – 6811.
- HALE, B.G., W.S. BARCLAY, R.E. RANDALL and R.J. RUSSELL. 2008a. Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain. *Virology* 378: 1 – 5.
- HALE, B.G., R.E. RANDALL, J. ORTIN and D. JACKSON. 2008b. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 89: 2359 – 2376.
- HATADA, E. and R. FUKUDA. 1992. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA *in vitro*. *J. Gen. Virol.* 73: 3325 – 3329.
- HATADA, E., S. SAITO and R. FUKUDA. 1999. Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J. Virol.* 73: 2425 – 2433.
- HARRIS, A., F. FOROUHAR, S. QIU, B. SHA and M. LUO. 2001. The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology* 289: 34 – 44.
- HAY, A.J., A.J. WOLSTENHOLME, J.J. SKEHEL and M.H. SMITH. 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* 4: 3021 – 3024.
- HAY, A.J., M.C. ZAMBON, A.J. WOLSTENHOLME, J.J. SKEHEL and M.H. SMITH. 1986. Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine. *J. Antimicrob. Chemother* 8 (suppl B): 19 – 29.
- HUI, E.K.W., S. BARMAN, T.Y. YANG and D.P. NAYAK. 2003. Basic residues of the helix six domain of influenza virus M1 involved in nuclear translocation of M1 can be replaced by PTAP and YPDL late assembly domain motifs. *J. Virol.* 77: 7078 – 7092.
- HURT, A.C., P. SELLECK, N. KOMADINA, R. SHAW, L. BROWN and I.G. BARR. 2007. Susceptibility of highly pathogenic A (H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antiviral Res.* 73: 228 – 231.
- HYLAND, L., R. WEBBY, M.R. SANDBULTE, B. CLARKE and S. HOU. 2006. Influenza virus NS1 protein protects against lymphohematopoietic pathogenesis in an *in vivo* mouse model. *Virology* 349: 156 – 163.
- ILYUSHINA, N.A., E.A. GOVORKOVA and R.G. WEBSTER. 2005. Detection of amantadine-resistant variant among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. *Virology* 341: 102 – 106.
- INGLIS, S.C., T. BARRETT, C.M. BROWN and J.W. ALMOND. 1979. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3790 – 3794.
- IUCHI, S. 2001. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 625 – 635.
- JACKSON, D., M.J. HOSSAIN, D. HICKMAN, D.R. PEREZ and R.A. LAMB. 2008. A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 4381 – 4386.
- JUDD, A.K., A. SANCHEZ, D.J. BUCHER, J.H. HUFFMAN, K. BAILEY and R.W. SIDWELL. 1997. *In vivo* anti-influenza virus activity of a zinc finger peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 687 – 692.
- KOCHS, G., I. KOERNER, L. THIEL, S. KOTHLOW, B. KASPER, N. RUGGLI, A. SUMMERFIELD, J. PAVLOVIC, J. STECH and P. STAEHEL. 2007. Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35M lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens. *J. Gen. Virol.* 88: 1403 – 1409.
- KUROKAWA, M., A.H. KOYAMA, S. YASUOKA and A. ADACHI. 1999. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int. J. Mol. Med.* 3: 527 – 530.
- KRUG, R.M. and P.R. ETKIND. 1973. Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology* 56: 334 – 338.

- LAMB, R.A. 1989. The genes and proteins of the influenza viruses. *In: The influenza Viruses*. KRUG, R.M. (Ed.). Plenum Press, New York. pp. 1 – 87.
- LAMB, R.A., L.S. ZEBEDEE and C.D. RICHARDSON. 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected cell surface. *Cell*. 40: 627 – 633.
- LAMB, R.A. and R.M. KRUG. 2001. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. *In: Fields Virology*. KNIPE, D.M. and P.M. HOWLEY (Eds.). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp. 725 – 769.
- LAMB, R.A. and P.W. CHOPPIN. 1979. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4908 – 4912.
- LAMB, R.A., P.W. CHOPPIN, R.M. CHANOCK and C.J. LAI. 1980. Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 1857 – 1861.
- LAMB, R.A. and C.J. LAI. 1980. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* 21: 475 – 485.
- LAM, W.Y., J.W. TANG, A.C. YEUNG, L.C. CHIU, J.J. SUNG and P.K. CHAN. 2008. Avian influenza virus A/HK/483/97(H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells. *J. Virol.* 82: 2741 – 2751.
- LI, K.S., Y. GUAN, J. WANG, G.J.D. SMITH, K.M. XU, L. DUAN, A.P. RONOARDJO, P. PUTHAVATHANA, C. BURANATHAI, T.D. NGUYEN, A.T. ESTOEPANGESTIE, A. CHAISINGH, P. AUWARAKUL, H.T. LONG, N.T. HANH, R.J. WEBBY, L.L.M. POON, H.CHEN, K.F. SHORTRIDGE, K.Y. YUEN, R.G. WEBSTER, and J.S.M. PEIRIS. 2004. [Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. \*Nature\* 340: 209 – 213.](#)
- LI, S., J.Y. MIN, R.M. KRUG and G.C. SEN. 2006a. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* 349: 13 – 21.
- LI, Z., Y. JIANG, P. JIAO, A. WANG, F. ZHAO, G. TIAN, X. WANG, K. YU, Z. BU and H. CHEN. 2006b. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol.* 80: 11115 – 11123.
- LIU, J., P.A. LYNCH, C.Y. CHIEN, G.T. MONTELLIONE, R.M. KRUG and H.M. BERMAN. 1997. Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat. Struct. Biol.* 4: 896 – 899.
- LIPATOV, A.S., S. ANDREANSKY, R.J. WEBBY, D.J. HULSE, J.E. REHG, S. KRAUSS, D.R. PEREZ, P.C. DOHERTY, R.G. WEBSTER and M.Y. SANGSTER. 2005. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: The role of cytokines and B- and T-cell responses. *J. Gen. Virol.* 86: 1121 – 1130.
- LONG, J.X., D.C. PENG, Y.L. LIU, Y.T. WU and X.F. LIU. 2008. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes* 36: 471 – 478.
- LU, Y., M. WAMBACH, M.G. KATZE and R.M. KRUG. 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* 214: 222 – 228.
- LUDWIG, S., U. SCHULTZ, J. MANDLER, W.M. FITCH and C. SCHOLTISSEK. 1991. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology* 183: 566 – 577.
- LUDWIG, S., X. WANG, C. EHRHARDT, H. ZHENG, N. DONELAN, O. PLANZ, S. PLESCHKA, A. GARCIA-SASTRE, G. HEINS and T. WOLFF. 2002. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J. Virol* 76: 11166 – 11171.
- MCGEOCH, D., P. FELLNER and C. NEWTON. 1976. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc. Natl. Acad. Sci* 73: 3049 – 3059.
- MELEN, K., L. KINNUNEN, R. FAGERLUND, N. IKONEN, K.Y. TWU, R. KRUG and I. JULKUNEN. 2007. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: Striking differences between different virus subtypes. *J. Virol.* 81: 5995 – 6006.
- MIN, J.Y. and R.M. KRUG. 2006. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 29-59 oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 7100 – 7105.
- MIN, J.Y., S. LI, G.C. SEN and R.M. KRUG. 2007. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* 363: 236 – 243.
- NASSER, E.H., A.K. JUDD, A. SANCHEZ, D. ANASTASIOU and D.J. BUCHER. 1996. Antiviral activity of influenza virus M1 zinc finger peptides. *J. Virol.* 70: 8639 – 8644.
- OBENAUER, J.C., 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 and C.W. NAEVE. 2006. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 311: 1576 – 1580.
- OKADA, A., T. MIURA and H. TAKEUCHI. 2003. Zinc- and pH-dependent conformational transition in a putative interdomain linker region of the influenza virus matrix protein M1. *Biochemistry* 42: 1978 – 1984.
- PALESE, P. and M.L. SHAW. 2007. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. *In: Fields Virology*. 5<sup>th</sup> Ed. KNIPE, D.M. and P.M. HOWLEY (Eds.). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp. 1647 – 1689.

- PINTO, L.H., L.J. HOLSINGER and R.A. LAMB. 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69: 517 – 528.
- QIAN, X.Y., C.Y. CHIEN, Y. LU, G.T. MONTELLONE and R.M. KRUG. 1995. An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. *RNA* 1: 948 – 956.
- RANDALL, R.E. and S. GOODBOURN. 2008. Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89: 1 – 47.
- SCHULTZ-CHERRY, S., N. DYBDAHL-SISSOKO, G. NEUMANN, Y. KAWAOKA and V.S. HINSHAW. 2001. Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J. Virol.* 75: 7875 – 7881.
- SEO, S.H., E. HOFFMANN and R.G. WEBSTER. 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape hosts anti-viral cytokine responses. *Nat. Med.* 8: 950 – 954.
- SHA, B. and M. LUO. 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat. Struct. Biol.* 4: 239 – 244.
- SHIN, Y.K., Q. LIU, S.K. TIKOO, L.A. BABIUK and Y. ZHOU. 2007a. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J. Gen. Virol.* 88: 13 – 18.
- SHIN, Y.K., Q. LIU, S.K. TIKOO, L.A. BABIUK and Y. ZHOU. 2007b. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signalling pathway activation. *J. Virol.* 81: 12730 – 12739.
- SHISHKOV, A.V., V.I. GOLDANSKII, L.A. BARATOVA, N.V. FEDOROVA, A.L. KSENOFONTOV, O.P. ZHIRNOV and A.V. GALKIN. 1999. The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7827 – 7830.
- SILVERMAN, R.H. 2007. Viral encounters with 29,59-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J. Virol.* 81: 12720 – 12729.
- SKEHEL, J.J. and A.J. HAY. 1978. Nucleotide sequences at the 5' termini of influenza RNAs and their transcripts. *Nucl. Acid. Res.* 56: 394 – 399.
- SMITH, G.J.D., T.S.P. NAIPOSSOS, T.D. NGUYEN, M.D. DE JONG, D. VIJAYKRISHNA, T.B. USMAN, S.S. HASSA, T.V. NGUYEN, T.V. DAO, N.A. BUI, Y.H.C. LEUNG, C.L. CHEUNG, J.M. RAYNER, J.X. ZHANG, L.J. ZHANG, L.L.M. POON, K.S. LI, V.C. NGUYEN, T.T.HIEN, J. FARRAR, R.G. WEBSTER, H. CHEN, J.S.M. PEIRIS and Y. GUAN. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350: 258 – 268.
- STASAKOVA, J., B. FERKO, C. KITTEL, S. SEREINIG, J. ROMANOVA, H. KATINGER and A. EGOROV. 2005. 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 1b and 18. *J. Gen. Virol.* 86: 185 – 195.
- STOECKLE, M.Y., M.W. SHAW and P.W. CHOPIN. 1987. Segment-specific and common nucleotide sequences in the noncoding regions of influenza B virus genome RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2703 – 2707.
- SUAREZ, D. L., M.L. PERDUE, N. COX, T. ROWE, C. BENDER, J. HUANG and D.E. SWAYNE. 1998. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J. Virol.* 72: 6678 – 6688.
- SUAREZ, D.L. and M.L. PERDUE. 1998. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res.* 54: 59 – 69.
- SUBBARAO, K., A. KLIMOV, J. KATZ, H. REGNERY, W. LIM, H. HALL, M. PERDUE, D. SWAYNE, C. BENDER, J. HUANG, M. HEMPHILL, T. ROWE, M. SHAW, X. XU, K. FUKUDA and N. COX. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279: 393 – 396.
- TALON, J., C.M. HORVATH, R. POLLEY, C.F. BASLER, T. MUSTER, P. PALESE and A. GARCIA-SASTRE. 2000. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 74: 7989 – 7996.
- TAKATSUJI, H. 1998. Zinc finger transcription factors in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 582 – 596.
- TAKIZAWA, T., K. OHASHI and Y. NAKANISHI. 1996. Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection. *J. Virol.* 70: 8128 – 8132.
- TO, K.F., P.K. CHAN, K.F. CHAN, W.K. LEE, W.Y. LAM, K.F. WONG, N.L. TANG, D.N. TSANG, R.Y. SUNG, T.A. BUCKLEY, J.S. TAM and A.F. CHENG. 2001. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J. Med. Virol.* 63: 242 – 246.
- TOMINACK, R.L. and F.G. HAYDEN. 1987. Rimantadine hydrochloride and amantadine hydrochloride use in influenza A virus infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1: 459 – 478.
- TREANOR, J.J., M.H. SNYDER, W.T. LONDON and B.R. MURPHY. 1989. The B allele of the NS gene of avian influenza viruses, but not the A allele, attenuates a human influenza A virus for squirrel monkeys. *Virology* 171: 1 – 9.
- WAKEFIELD, L. and G.G. BROWNLEE. 1989. RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic Acids Res.* 17: 8569 – 8580.

- WANG, C., K. TAKEUCHI, L.H. PINTO and R.A. LAMB. 1993. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: Characterization of the amantadine block. *J. Virol.* 67: 5585 – 5594.
- WANG, X., C.F. BASLER, B.R. WILLIAMS, R.H. SILVERMAN, P. PALESE and A. GARCIA-SASTRE. 2002. Functional replacement of the carboxyterminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. *J. Virol.* 76: 12951 – 12962.
- WEBSTER, R.G., W.J. BEAN, O.T. GORMAN, and Y. KAWAOKA. 1992. Evolution and Ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56: 152 – 179.
- WOLFF, T., R.E. O'NEILL and P. PALESE. 1996. Interaction cloning of NS1-I, a human protein that binds to the nonstructural NS1 proteins of influenza A and B viruses. *J. Virol.* 70: 5363 – 5372.
- ZHIRNOV, O.P. and H.D. KLENK. 2007. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis* 12: 1419 – 1432.
- ZHIRNOV, O. P., T.E. KONAKOVA, T. WOLFF and H.D. KLENK. 2002. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J. Virol.* 76: 1617 – 1625.
- ZOHARI, S., P. GYARMATI, P. THOREN, G. CZIFRA, C. BROJER, S. BELAK and M. BERG. 2008. Genetic characterization of the NS gene indicates cocirculation of two sub-lineages of highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype in Northern Europe in 2006. *Virus Genes* 36: 117 – 125.
- ZHU, Q., H. YANG, W. CHEN, W. CAO, G. ZHONG, P. JIAO, G. DENG, K. YU, C. YANG, Z. BU, Y. KAWAOKA and H. CHEN. 2008. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *J. Virol.* 82: 220 – 228.