

# **Genetiska studier på fågelinfluensa**

**Maria Ehrenberg**

**Handledare: Mikael Berg**  
**Inst. för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap**  
**Biträdande handledare: Siamak Zohari**  
**Inst. för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap**

---

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Examensarbete 2007:32**  
**Fakulteten för veterinärmedicin och**  
**husdjursvetenskap**

**ISSN 1652-8697**

**Uppsala 2007 Veterinärprogrammet**



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>SAMMANFATTNING .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUKTION.....</b>	<b>3</b>
<b>Bakgrund.....</b>	<b>3</b>
<b>Syfte.....</b>	<b>3</b>
<i>Klassificering.....</i>	<i>3</i>
<i>Uppbyggnad och genom hos influensa A .....</i>	<i>4</i>
<i>NS1-segmentet .....</i>	<i>4</i>
<i>Bakgrund.....</i>	<i>4</i>
<i>Viktiga motiv hos NS1-segmentet.....</i>	<i>5</i>
<i>Matrix-segmentet.....</i>	<i>5</i>
<b>MATERIAL OCH METODER.....</b>	<b>6</b>
<b>Insamling av virus .....</b>	<b>6</b>
<b>Virusisolering och typning .....</b>	<b>6</b>
<b>Preparation av genmaterial.....</b>	<b>7</b>
<i>Extraktion av viralt RNA.....</i>	<i>7</i>
<i>Preparation av cDNA.....</i>	<i>7</i>
<i>Genamplifiering .....</i>	<i>8</i>
<b>Förberedelser inför sekvensering.....</b>	<b>8</b>
<i>Enzymrening.....</i>	<i>8</i>
<i>Primer.....</i>	<i>9</i>
<i>DNA sekvensering.....</i>	<i>9</i>
<b>Sekvensbestämning och fylogenetiska studier.....</b>	<b>9</b>
<b>RESULTAT .....</b>	<b>10</b>
<b>Fylogenetiska analyser .....</b>	<b>10</b>
<i>Lågpatogena virussubtyper.....</i>	<i>10</i>
<i>Högpatogeta H5N1 .....</i>	<i>13</i>
<b>Analys av proteinsekvenser i NS1-proteinet.....</b>	<b>15</b>
<i>Lågpatogena virussubtyper.....</i>	<i>15</i>
<i>Högpatogeta H5N1 .....</i>	<i>17</i>
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>18</b>
<b>TACK .....</b>	<b>20</b>
<b>REFERENSER.....</b>	<b>21</b>

## ABSTRACT

In the spring of 2006 we had our first outbreak of avian influenza of highly pathogenic H5N1 (HPAI) among wild birds in Sweden. This disease have impact on poultry industries world wide. Sporadically the virus infects other species than birds and we now know it can even cause fatal infection of humans. There are not yet any confirmed cases of transmission of the disease between humans though a suspected case in an Indonesian family is under investigation. If a mutation occurs that changes the pathogenicity and host affinity to humans we are at a risk of a new pandemia, perhaps like the Spanish flu in 1918-1920. To understand the underlying genetical mechanisms it is important to study the genome of different subtypes of Avian influenza virus (AIV). The aim of this study was to characterize a selected number of AIV isolated from wild birds and minks to see if there are different genetic variants among species. AIV are influenza A viruses and belong to the *Orthomyxoviridae* family. Influenza A have linear, negative, single-stranded RNA genome consisting of 8 segments. This study focuses on the non structural (NS1) protein because its ability to antagonize the host innate immunity, especially the expression of interferons and Matrix-protein which is important for ribonucleo-protein (RNP) transport and budding. Thirteen low pathogenic AI (LPAI) and 10 HPAI isolates were characterized in terms of subtypes, viral RNA was extracted, cDNA for NS1 and Matrix genes were synthesized, PCR amplified and sequenced. The nucleotide sequences were translated to amino acids and analyzed phylogenetically and the amino acids were compared to public sequences downloaded from National Center for Biotechnology Information (NCBI). We found that two H5N3 and one H10N7 differed significantly from other LPAI in both cladograms and proteinsequences. The cladograms were also different when comparing NS1 and M to each other. HPAI was more homologous as a group, had aspartic acid in pos 92, alanine in 149 and deletions in 80-84. These three LPAI-isolates that differed belong to allele B. The different gene segments in this study clearly show that these genes have different origin or evolve differently.

## SAMMANFATTNING

Våren 2006 hade Sverige sitt första utbrott av fågelinfluensa med högpatogen H5N1 (HPAI) bland vilda fåglar. Denna sjukdom orsakar stora förluster inom fjäderfänäringen i hela världen. Virusets kan även drabba andra arter sporadiskt och vi vet nu att det även kan orsaka dödlig sjukdom hos människa. Ännu finns inga konfirmerade fall av HPAI-smitta mellan människor, men ett misstänkt fall i en indonesisk familj håller på att utredas. Om en mutation ändrar virusets patogenicitet och affinitet för humanceller, finns risk för att en pandemi kan uppstå. Spanska sjukan mellan 1918-1920 används som ett skrämmande exempel. För att förstå de underliggande genetiska mekanismerna är det viktigt att studera genomerna hos olika aviära influensavirus (AIV). Målet med denna studie är att karaktärisera ett antal AIV isolerade från vilda fåglar och mink för att se om det finns genetiska varianter mellan arter. AIV är ett influensa A-virus och tillhör familjen *Orthomyxoviridae*. Influenza A har ett linjärt, negativt, enkelsträngat RNA-genom som består av 8 segment. Denna studie fokuserar på "nonstructural" (NS1) -genen pga dess förmåga att inhibera immunsvaret mot virus via nedreglering av interferonproduktionen och Matrix-genen som är en viktig del i ribonucleoprotein (RNP) -transport och virusavknoppning. Tretton lågpatogena AI (LPAI) och 10 HPAI-isolat karaktäriserades med avseende på subtyp, viralt RNA extraherades, cDNA för NS1 och Matrix syntetiserades, PCR amplifierades och sekvenserades. Nukleotidsekvenserna översattes till aminosyror och analyserades fylogenetiskt och jämfördes med sekvenser som laddades ner från National Center for Biotechnology Information (NCBI). Vi fann att två H5N3 och ett H10N7-isolat skiljde sig signifikant från övriga LPAI-virus, både fylogenetiskt och i sina proteinsekvenser. Tydliga skillnader syntes även när man jämförde cladogram över NS1- och Matrix-generna med varandra. HPAI var mer homogen som grupp, hade aspartat på pos 92, alanin på pos 149 och deletioner mellan 80-84 i aminosyrasekvenserna. Dessa aminosyror har i tidigare studier visats sig viktiga. De tre annorlunda LPAI-isolaten tillhörde allel B. Analysen av de olika gensegmenten i denna studie visar tydligt att dessa gener har olika ursprung eller har utvecklats olika.

## INTRODUKTION

### Bakgrund

Sverige hade under våren 2006 sitt första utbrott av fågelinfluensa (AI) orsakad av den högpatogeta formen av H5N1-virus (HPAI). Influensa på fågel är dock ingen ny sjukdom. Sjöfågel, framförallt, änder, fungerar som reservoar för lågpatogeta former av AI-virus. Vilda fåglar som kommer i kontakt med tamfågel anses kunna sprida viruset. Det har länge varit känt att lågpatogeta AI (LPAI) -virus kan mutera och bli högpatogeta hos infekterade tamhöns. Numera sprids HP H5N1 även i den vilda fågelpopulationen och har visat sig kunna orsaka fatala sjukdomsutbrott bland dessa arter (Olsen *et al*, 2006). Sporadiska fall då däggdjursarter, t ex mink (Berg *et al*, 1990), katt, val och säl, infekteras av aviära influensavirus sker emellanåt. Även människa kan smittas. Sedan utbrottet i Hong Kong 1997 har ett större antal människor infekterats av HP H5N1, varav flera med dödlig utgång (Capua & Alexander, 2003). Ännu har man inte kunnat påvisa smittspridning mellan människor, men ett fall med flera sjuka i en indonesisk familj är under utredning. Alla som drabbats har på något sätt haft mycket nära kontakt med smittade fjäderfä. Influensavirus har en stor förmåga att mutera och skulle detta ske så att smittan kan överföras mellan människor, befarar man en pandemi. I dessa sammanhang drar man ofta paralleller till Spanska sjukan, som orsakade tiotals miljoner dödsfall, hos framförallt yngre människor, mellan åren 1918-1920. I Sverige är än så länge AIV först och främst ett hot för fjäderfänäringen. För att förhindra vidare spridning i drabbade områden måste, om smittan når tamfåglar, stora mängder fjäderfä avlivas vilket orsakar stora ekonomiska förluster och personliga tragedier.

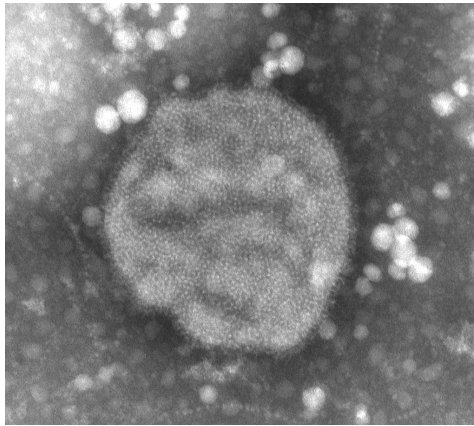
För att kunna förstå vad som orsakar den förändrade patogeniciteten och affiniteten måste man studera genmaterialet hos olika fågelinfluensavirus.

### Syfte

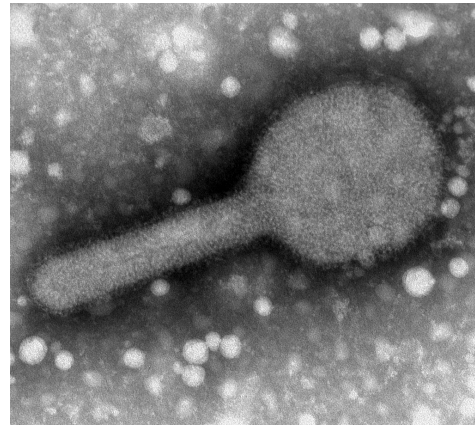
Syftet med denna studie är att karaktärisera ett antal aviära influensavirus från Sverige för att se om det finns olika genetiska varianter mellan virus som isolerats från olika fågelarter samt mink. Aviärt influensavirus (AIV)

### Klassificering

AIV är ett influensavirus typ A och tillhör familjen Orthomyxoviridae som består av fem genera: Influensavirus A, B, C, Thogotovirus och Isavirus. Namnet Orthomyxo- kommer av grekiskans orthos som betyder rak, rät, riktig och myxa med betydelsen slem. Virionens storlek varierar mellan 80-120 nm i diameter. Alla influensavirus är försedda med hölje och har ett negativt, enkelsträngat RNA-genom, som är uppdelat i segment. Antalet segment varierar mellan olika genera: Influenta A och B har åtta segment (tab.1) medan influenza C har sju. Influenta A-virus är vidare uppdelade i subtyper beroende på vilken antigenicitet deras hemagglutinin (HA)- och neuraminidas (NA)-molekyler har. Man har identifierat 16 HA-subtyper (H1, H2 o s v) och nio NA-subtyper (N1, N2 o s v) (Fouchier *et al*, 2005).



*Influenza virion, subtyp H5N2.*



*H5N2 virion under avknoppning.*

### **Uppbyggnad och genom hos influensa A**

Virionens yttre består av ytantigener, HA och NA samt Matrixprotein 2 (M2) som utgör jonkanaler genom membranet. Inuti virionen återfinns ribonukleoproteiner (RNP) bestående av RNA-segment och nukleoprotein (NP) samt tre polymerasproteiner (PA, PB1, PB2). Matrixprotein 1 (M1) fungerar vid transport av RNP ut ur nukleus liksom nukleärt exportprotein (NEP). Dessutom stabiliserar Matrix inre delen av virushöljet. NS1 är ett non-strukturellt protein som inverkar på interferoner (IFN) ur värdcellsförsvaret (tab.1).

*Tabell 1. Genom och proteinkodnings-egenskaper hos influensa A virus*

Segment	Polypeptid	Nukleotider	Aminosyror	Huvudsaklig betydelse för
1	PB2	2341	759	RNA-transkriptas, värdspektra
2	PB1	2341	757	RNA-transkriptas, endonukleas
3	PA	2333	716	RNA-transkriptas, replikation
4	HA	1778	566	=Ytantigen. Ytreceptorbindning, fusion
5	NP	1565	498	Bildning av ribonukleoprotein
6	NA	1413	454	=Ytantigen. Neuraminidasaktivitet, -inhibering
7	M1	1027	252	RNP transport ut ur nukleus
	M2		97	Jon-kanalaktivitet
8	NS1	890	230	Nonstructural protein. Interferon-antagonist
	NEP (NS2)			121

### **NS1-segmentet**

#### *Bakgrund*

Genomet hos virus inom influensa typ A består av 8 enkelsträngade RNA segment. NS, det minsta segmentet, kodar för två olika proteiner: NS1 och NEP (NS2), vilka bildas genom splicing av transkriberat NS-mRNA så att ett extra mRNA bildas. NS1 och NEP har endast de 10 första aminosyrorerna i aminos-terminalen gemensamt (Ludwig *et al*, 1991). Man har identifierat två olika grupper av NS1-gener: allel A och allel B, den sistnämnda är stabil och har

funnits mycket länge hos fågel. Troligen har en NS1-gen överförs till en human virusstam och anpassat sig, för att runt år 1900 återförs till en aviär stam. Den humana NS1-genen har fortsatt att förändras medan den aviära har hållit sig stabil (Scholtissek & von Hoyningen-Huene, 1980; Treanor *et al*, 1989). Virus med olika NS-gener rekombinerar lätt och det är därför anmärkningsvärt att två så olika stammar kan samexistera under lång tid. NS-genernas sekvenser har troligen motiv som styr förmågan till rekombination (Ludwig *et al*, 1991). IFN inducerar antivirala effekter t ex dubbelsträngat RNA (dsRNA) -aktiverat proteinkinase (PKR). Flera olika virus har utvecklat strategier för att inhibera PKR-aktiviteten. Influenza A anses motverka PKR bl. a genom att NS1 blockerar dsRNA-medierad aktivering av PKR genom att binda till dsRNA (Bergmann *et al*, 2000). NS1 inhiberar även värdcellens polyadenylering av mRNA genom att interagera med Cleavage and Polyadenylation specificity Factor (CPSF) och på detta sätt stänga av värdcellens proteinsyntes (Nemeroff *et al*, 1998). Dessutom har NS1 förmågan att binda till Poly (A)-binding protein II (PABII) vilket gör att export av mRNA (med Poly(A)) ur nukleus inhiberas (Qiu & Krug, 1994). En annan funktion hos NS1 är att detta protein kan förhindra transport inuti nukleus genom att inhibera splicing av pre-mRNA (Fortes *et al*, 1994).

#### *Viktiga motiv hos NS1-segmentet*

NS1 består av 124-237 aminosyror och kan binda till både enkel- och dubbelsträngat RNA men affiniteten för dsRNA är högre (Hatada & Fukuda, 1992). Det är visat att aminosyrorna på position 38 och 41 påverkar bindningen till dsRNA: Arginin på pos 38 påverkar den elektrostatiske bindningen och lysin på pos 41 bestämmer affiniteten (Wang *et al*, 1999). Aminosyra 215-237 är bindningsställe för CPSF och aminosyror runt 186 för PABII. Dessa båda proteiner medverkar vid bildning av cellulärt mRNA och transport av värdcellens mRNA från nukleus. NS1 inhiberar således både bildning och transport av cellulärt mRNA (Li *et al*, 2001). Utbyte av glutaminsyra till aspartaminsyra på position 92 har visat sig påverka mekanismen för inhibering av interferoner och tumörnekros faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Hur mekanismen påverkas är dock ännu inte känt (Seo *et al*, 2002). NS1 protein med alanin på pos 149 kan motverka inducering av interferon i kycklingägg. De H5N1 som har valin istället för alanin har visat sig vara oförmögna till replikation i kycklingägg men varit mycket patogena för andfåglar. Det behövs bara substitution i en enda nukleotid för att detta skifte av aminosyra ska kunna uppstå (Li *et al*, 2006). Export ur nukleus signaleras mellan 137-146.

#### **Matrix-segmentet**

Matrixgenen är en av de två influensa A-gener (se även NS) som kodar för två olika proteiner, M1 och M2, där M1 är ett odelat transkript medan M2 är delat. M1 ansvarar för avknoppning av nya virioner (budding) och bildar viruslika partiklar som släpps ut i mediet *in vitro* (Gomez-Puertas *et al*, 2000). Detta protein fungerar dessutom som brygga mellan viral nukleär exportfaktor (NEP) och komponenter i vRNP-komplexet (t ex PA) och behövs för export av dessa komplex ut ur nukleus (Hara *et al*, 2003). M2 är ett membranprotein och fungerar som pH-aktiverad jonkanal som släpper in protoner i virionen vid uncoating (Pinto *et al*, 1992) och reglerar intracellulärt pH. Detta är viktigt för att förhindra konformationsändringar av intracellulärt kluvet HA (Takeuchi och Lamb, 1994).



Valet av segment att studera grundades till stor del på förmågan hos det multifunktionella NS1-proteinet att inhibera IFN och förändra patogeniciteten samt Matrix inblandning i den viktiga RNP transporten och avknoppning av nya virioner. Detta protein är relativt konservativt och förändras därför inte lika mycket.

## MATERIAL OCH METODER

### Insamling av virus

Av olika influensavirus från vilda fåglar som använts i denna studie är 8 stycken insamlade vid Ottenby fågelstation på Ölands södra udde, som en del i ett övervakningsprogram som Jordbruksverket organiserat. Proverna är tagna med kloaksvabb eller från färsk spillning och förvarade i transportmedium vid -70 °C. Transportmediet bestod av Hanks balanserade saltlösning kompletterad med 10% glycerol, penicillin (200 U/ml), streptomycin (200 U/ml), polymyxin B sulfat (100 U/ml), gentamycin (250 U/ml) och nystatin (50 U/ml) (från ICN, Zoetermeer, Nederländerna). Två prover var tagna från kliniskt sjuka fåglar som insänts till SVA. Virusisolat från 1949, -84 samt -88 var erhållna från virologavdelningen på SVA. De tio HPAI-virus som använts i studien isolerades från nio döda fåglar och en mink under vår-vintern 2006, då vissa delar av Sverige drabbades av fågelinfluensa (tab.2).

### Virusisolering och typning

Isolering av virus från de olika fåglarna och mink utfördes i säkerhetslaboratorium nivå 3 (BSL-3) på SVA. Proverna tinades, blandades i lika mängd fosfatbuffrad koksaltlösning med antibiotika, inkuberades 20 min i rumstemperatur (rt) och centrifugerades vid 1500 g i 15 min. Supernatanten inokulerades (0,2 ml/ägg) i allantois i 4 dagar gamla specific pathogene free (SPF) embryonerade kycklingägg (Swayne *et al*, 1998). Efter tre dagars inkubering i 37 °C testades hemagglutinerings (HA) enligt standardmetoder. Subtyperna identifierades genom konventionell HA-inhibering (HI) (Office Internationale des Epizooties, 2004) samt neuraminidas-inhibering (NI) (Aymard *et al*, 1973) med subtyps-specifika antisera (tab.2a och 2b).

Tabell 2a. Analyserade virusisolat

Subtyp	Art	Identitet	Årtal
H2N3	Gräsand	S90-568	2003
H3N2	Mås	IF 60	2000
H4N6	Gräsand	S90-780	2003
H4N6	Gräsand	S90-754	2003
H5N3	Gräsand	S90-436	2005
H5N3	Gräsand	1174	2005
H6N2	Gräsand	S8-012	2003
H7N7	Gräsand	S90-735	2003
H10N8	Gräsand	S90-229	2003
H12N5	Gräsand	S90-820	2003
H10N4	Mink	Mink 84	1984
H10N4	Sångsvan	Wisling Swan	1988
H10N7	Tamkyckling	Ch/Germany	1949

Tabell 2b. Forts. Analyserade virusisolat

Subtyp	Art	Identitet	Årtal
HP H5N1	Berguv	V618	2006
"	Vigg	V685	"
"	Vigg	V686	"
"	Vigg	V789	"
"	Spov	V820	"
"	Knölsvan	V827	"
"	Kanadagås	V828	"
"	Kanadagås	V978	"
"	Mink	V907	"
"	Anka	Gässhult	"

## Preparation av genmaterial

### Extraktion av viralt RNA

200 µl infekterad allantoisvätska blandades med 500 µl Trizol® i märkta, 1,5 ml eppendorff-rör. Ett rör per isolat. Dessa fick stå i rumstemperatur i 10 min. Därefter tillsattes 250µl kloroform/prov. Proverna mixades för att sedan stå 5 min i rumstemperatur. Detta upprepades en gång. Efter det centrifugerades de i 10 min med 12000 rpm och 4°C. Supernatanterna fördes över i nya rör med 500 µl iskall propanol, mixades och centrifugerades 10 min med 10000 rpm och 4°C. Supernatanterna avlägsnades och 500 µl iskall etanol tillsattes i rören och centrifugerades enligt ovan. Detta moment upprepades men med 5 min centrifugering varefter supernatanterna avlägsnades och RNA-pelletsen i rören fick lufttorka. Allt arbete skedde i dragskåp med proverna på is.

### Preparation av cDNA

RNA konverterades till cDNA av full längd med reverse transcriptase. En Master-mix för PCR-1 bereddes enligt tabell 3.

Tabell 3. Master-mix för PCR-1

Ingrediens	Mängd, µl/prov
ddH <sub>2</sub> O	3
Random hexamere primers (50µM)	2
5xRT buffert	4
0,1M DTT	2
dNTP's (10nM)	1
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2
Rnase inhibitor	1
Reverse transcriptase	1
Totalt	16

RNA i de torra rören löstes i 8 µl H<sub>2</sub>O. 5 µl av denna lösning överfördes i nya, mindre eppendorff-rör med Master-mix för PCR-1. Amplifiering av cDNA skedde med PCR: 42°C i 45 min, 60°C i 15 min följt av 95°C i 10 min. Proverna förvarades i

kylskåp vid 4°C alternativt frys vid -70°C om de inte genast skulle användas till nästa steg.

### **Genamplifiering**

Vid amplifiering av cDNA användes genspecifika primers för NS1 respektive Matrix. 2 µl cDNA sattes till rör med 24 µl Master-mix för PCR-2 som bereddes enligt tabell 4.

*Tabell 4. Master-mix för PCR-2*

Ingrediens	Mängd, µl/prov
H <sub>2</sub> O (Super Q)	18,2
10xRT buffert	2,4
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,4
dNTP's (10nM)	0,6
Primer (forward)	0,6 (0,3)
Primer (reverse)	0,6 (0,3)
taqPolymeras	0,2
Totalt	25

Thermoprofil för PCR-2 visas i tabell 5.

*Tabell 5. Thermoprofil för PCR-2*

Temp, °C	95	56	72	Upprepas 29 gånger. Därefter 72°C i 420 s.
Tid, s	120	60	90	

Kontroll av PCR-produkterna gjordes med gel-elektrofores. En kammare förbereddes innan en 2 % agarosgel tillverkades genom att blanda 2 g Agaros Typ II-Sigma med 100 ml 0,5x TBE-buffert. Blandningen värmdes försiktigt i mikrovågsugn till en klar lösning. Ethidiumbromid tillsattes, 2 µl/100 ml buffert, och kammaren fylldes till lagom nivå med gellösning och fick stå och stelna, detta skedde i dragskåp. Proverna förbereddes genom att blanda 2µl buffert med 8 eller 5 µl PCR-produkt (beroende på om hel eller halv mängd primer använts). Markör i form av 1 µl Massruler ladder användes i första brunnen. 8 eller 5 µl prov tillsattes i efterföljande brunnar. Elektrofores kördes med 130 V och 90 A i 60 min. PCR-produkterna visualiserades med UV ljus.

### **Förberedelser inför sekvensering**

#### **Enzymrening**

PCR-produkt som körts med halva mängden primers användes. Rören med prover samt alla tillsatser hölls hela tiden på is. Till den kvarvarande mängden efter att 5 µl använts till elektrofores, d v s 20 µl, sattes 5 µl enzymlösning ExoSapIt varefter reaktionerna skedde i Thermocycler vid 37°C i 30 min och 95°C i 10 min.

### **Primer**

3 µl enzymrenad PCR-produkt blandades därefter med 3 µl av en lösning bestående av: 1,6 µl NS1 respektive Matrix primer (Cybergene AB) (1µM), forward eller reverse samt 1,4 µl Super Q.

Primers, LPAI:

NS fwd: AGC AAA AGC AGG GTG ACA AAG

NS rev: AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT TAT

Matrix fwd: ATG AGY CTT CTA ACM GAG GTC GAA ACG

Matrix rev: AGT AGA AAC AAG GTA GTT TTT TAC TC

Primers, H5N1:

NS fwd: CAA AAA CAT AAT GGA TYC CAA CAC

NS rev: ATT AAA TAA GCT GAA AMG AGA A

Matrix fwd: ATG AGY CTT CTA ACM GAG GTC GAA ACG

Matrix rev: AGT AGA AAC AAG GTA GTT TTT TAC TC

### **DNA sekvensering**

De amplifierade DNA-sekvenserna bestämdes med BigDyeTerminator (v.3.1). Till varje rör sattes sedan 11,2 µl Super Q, 2 µl BigDye och 3 µl BigDye 5xSequencing buffert varefter reaktionerna skedde i Thermocycler vid 19 uppreningar av 95°C i 20 s och 56°C i 2 min. Reaktionerna tvättades därefter med först 2 µl 0,5 M EDTA, 50 µl etanol (99 %) och 2 µl 3M natriumacetat. Rören skakades noga och centrifugerades i 20 min med 13000 rpm vid 4°C. Supernatanten avlägsnades och ny tvätt skedde med 400 µl iskall etanol (70 %). Efter skakning av rören centrifugerades de en andra gång enligt ovan, men endast i 10 min. Supernatanten avlägsnades återigen och rören fick ligga skyddat från ljus och torra några timmar. Strax innan sekvensanalysen tillsattes 13 µl formamid till varje prov och samma mängd överfördes till plattans brunnar. Plattan centrifugerades en kort stund. Analyserna utfördes med Applied Biosystem PRISM 3100 DNAanalyser.

### **Sekvensbestämning och fylogenetiska studier**

Redigering av nukleotidsekvenser, översättning till proteinsekvenser, multipla sequence alignments och bearbetning skedde i Bioedit Software v.7.0.4.1. (Hall, 1999). Fylogenetiska studier gjordes med hjälp av WinClada (K.Nixon cladestics.com) och vi använde Maximum Parsimony- samt NeighbourJoining-metoderna. Alla referenssekvenser laddades ner från Influenza Virus Resource på NCBI's hemsida (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>).

Vi valde att endast göra proteinsekvenser på NS1 då det är ett multifunktionellt protein och har flera motiv som är studerade. Skillnader i motiv på M-genen har okänd betydelse. Analyserna av NS1-segmentets proteinsekvenser koncentrerades till de positioner som är närmre studerade, se under Introduktion.



*Knölsvan*

## **RESULTAT**

### **Fylogenetiska analyser**

För de fylogenetiska studierna användes Maximum Parsimony i första hand. Denna metod jämför varje nukleotid för sig mellan de gensekvenser man har i sin "multiple alignment". Dessutom görs en analys av evolutionära skillnader i sekvenserna för att bedöma släktskapet mellan olika virusisolat. Resultatet visas i fylogenetiska träd, cladogram. För jämförelsens skull och som kontroll använde vi dessutom Neighbour Joining-metoden. Detta är en något enklare metod som utgår från proteinets ändsekvenser. Här utförs ingen analys av enstaka nukleotider eller evolutionära förändringar.

### ***Lågpatogena virussubtyper***

Vi började med att studera cladogram för NS1-proteinet hos de lågpatogena virusisolaten, med A/PR/8/34/H1N1 som rot. Man kunde tydligt se att trädet hade två huvudgrenar och att isolaten av subtyp H5N3 (S90-436 och S90-1174) samt H10N7 (chicken/Germany) hamnade i den övre, till skillnad från de övriga tio isolaten, som var placerade i den undre huvudgrenen (fig.1). Vi fortsatte sedan att titta på cladogram för Matrix-genen. Här visade det sig att alla tretton isolat befann sig på samma huvudgren (fig.2) men de hade dock skiftat plats sinsemellan, jämfört med placeringen i cladogram för NS1 (fig.3 och 4).

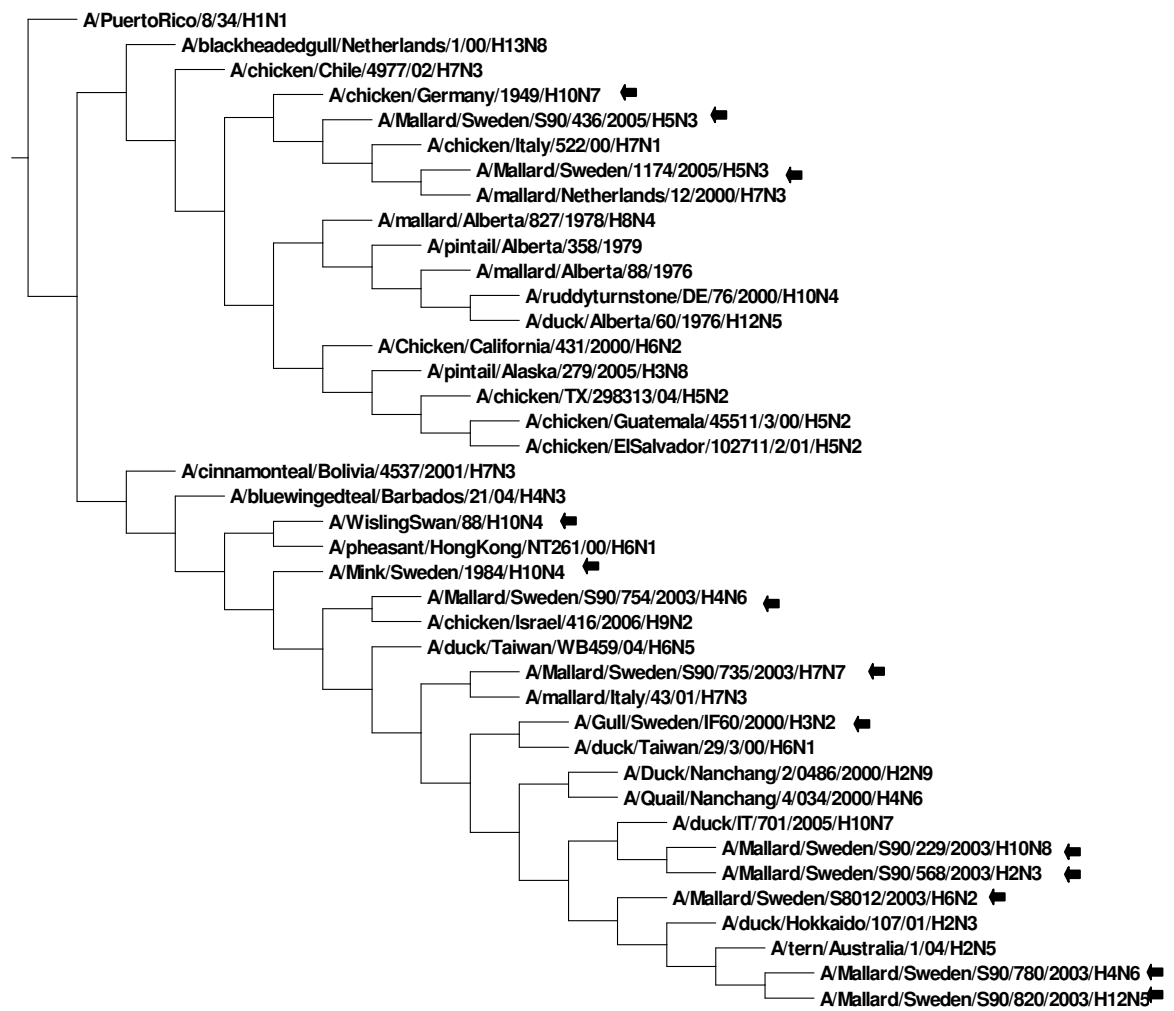


Fig. 1. Cladogram som visar släktsamband mellan NS1-protein för olika LP AIV. Isolaten som vi sekvensbestämt inom vår studie är märkta med pilar.

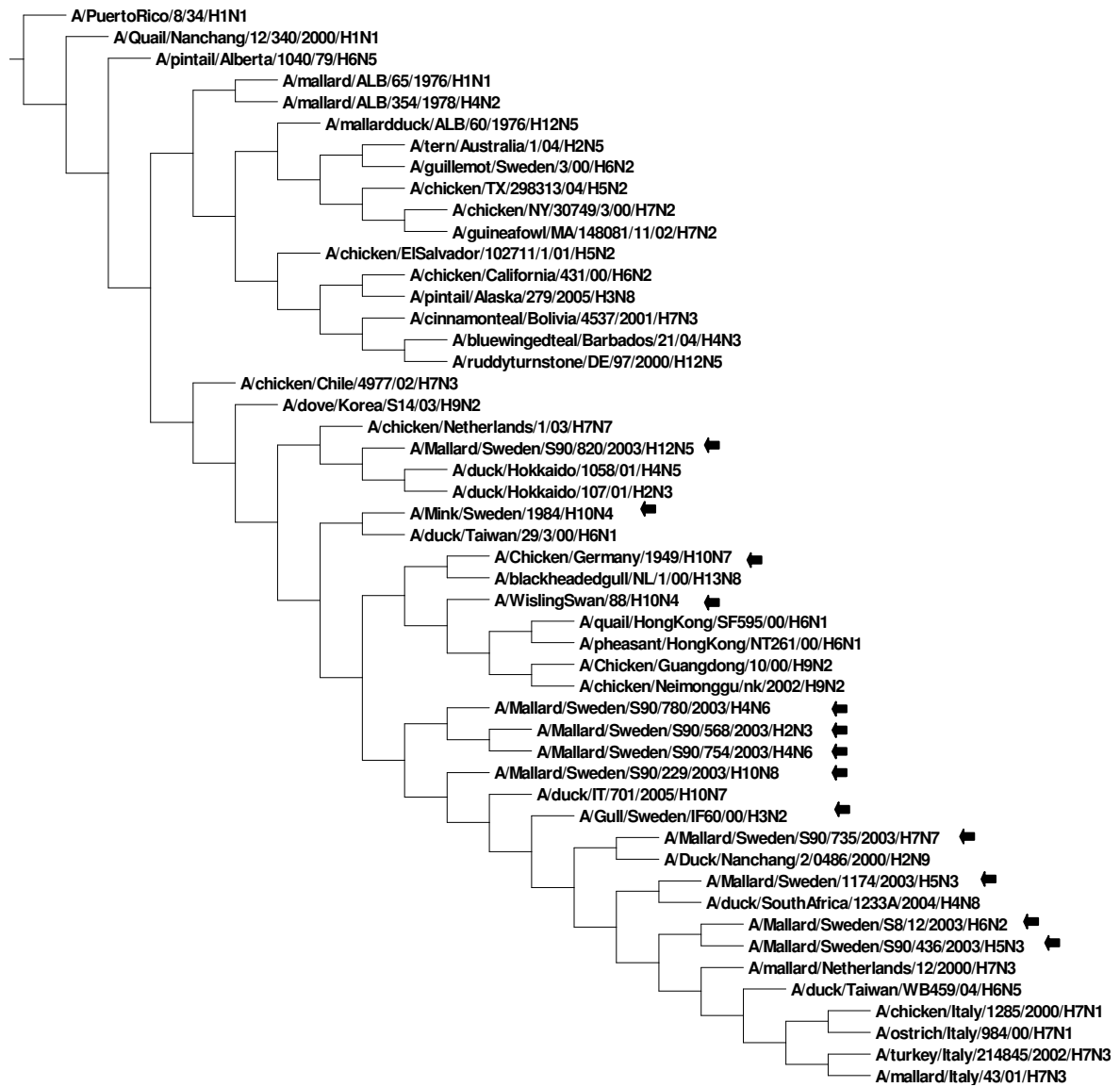


Fig. 2. Cladogram som visar släktsamband mellan Matrix-protein för olika LP AIV. Isolaten i vår studie är märkta med pilar.

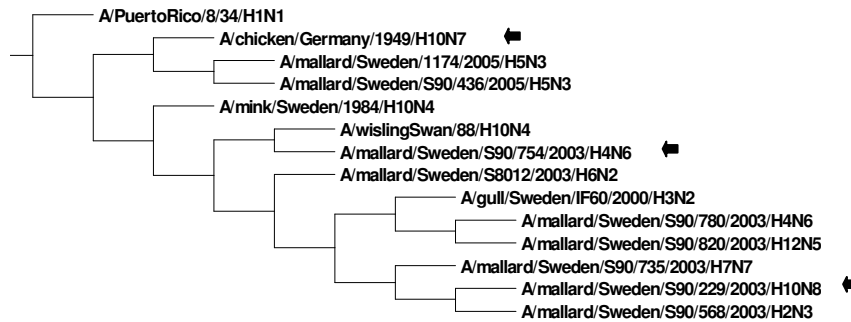


Fig. 3. Cladogram som visar släktsamband mellan NS1-protein för olika LP AIV. Pilarna markerar tre exempel på isolat som byter grenplacering i fig. 4, Matrix.

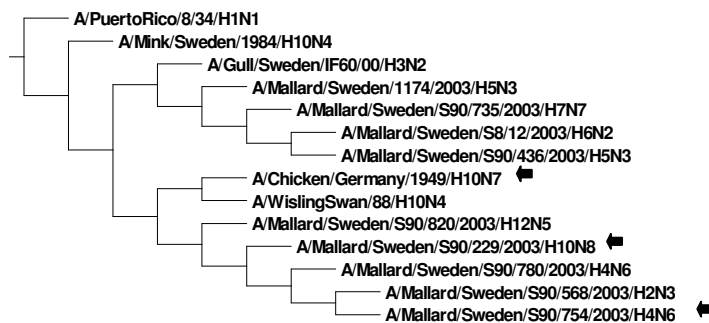


Fig. 4. Cladogram som visar släktsamband mellan Matrix-protein för olika LP AIV. Pilarna markerar tre exempel på isolat som bytt grenplacering jämfört med NS1 i fig.3.

(Rättelse: Isolat 1174 och S90-436 är isolerade år 2005, inte 2003 som det står i figur 4.)

### Högpatorgena H5N1

Vi fortsatte sedan med att studera cladogram över NS1-proteinet hos de högpatorgena H5N1-isolaten med A/chicken/HK/258/97 som rot. Här visade det sig att våra tio isolat hamnade på en och samma gren, tillsammans med två tyska isolat hämtade från NCBI's Genbank. I grenen ovanför, med närmast besläktade virusisolat, kommer alla från Nigeria (fig.5). Samma uppdelning visade sig också i cladogram för Matrix-genen (fig.6). Vid jämförelse mellan cladogram för NS1 respektive Matrix syns, hos H5N1, liknande skifte av platser som hos de lågpatorgena subtyperna. (fig.5 och fig.6, nedersta grenen i respektive cladogram).



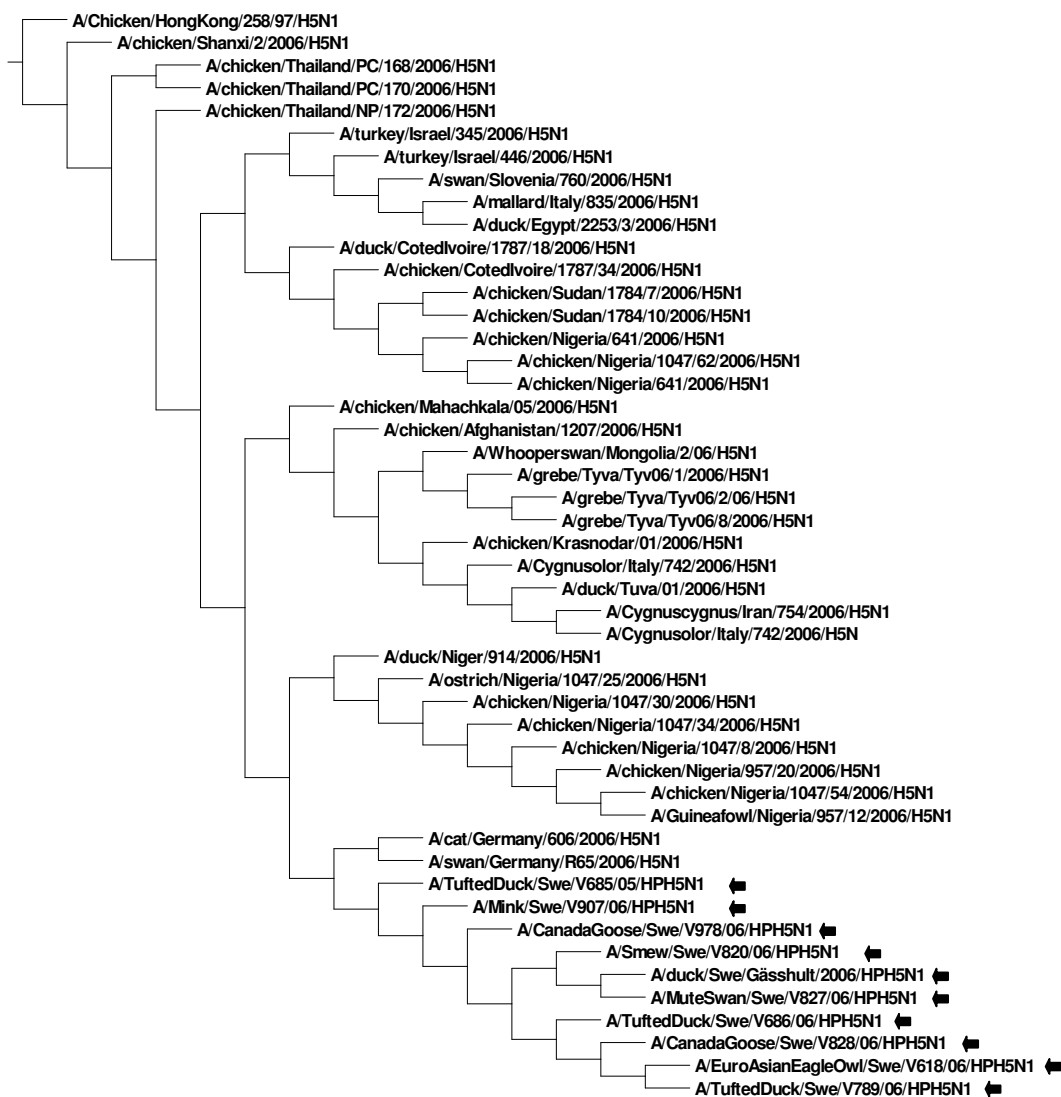


Fig. 5. Cladogram som visar släktsamband mellan NS1-protein för HP H5N1. Isolaten i vår studie är märkta med pilar.

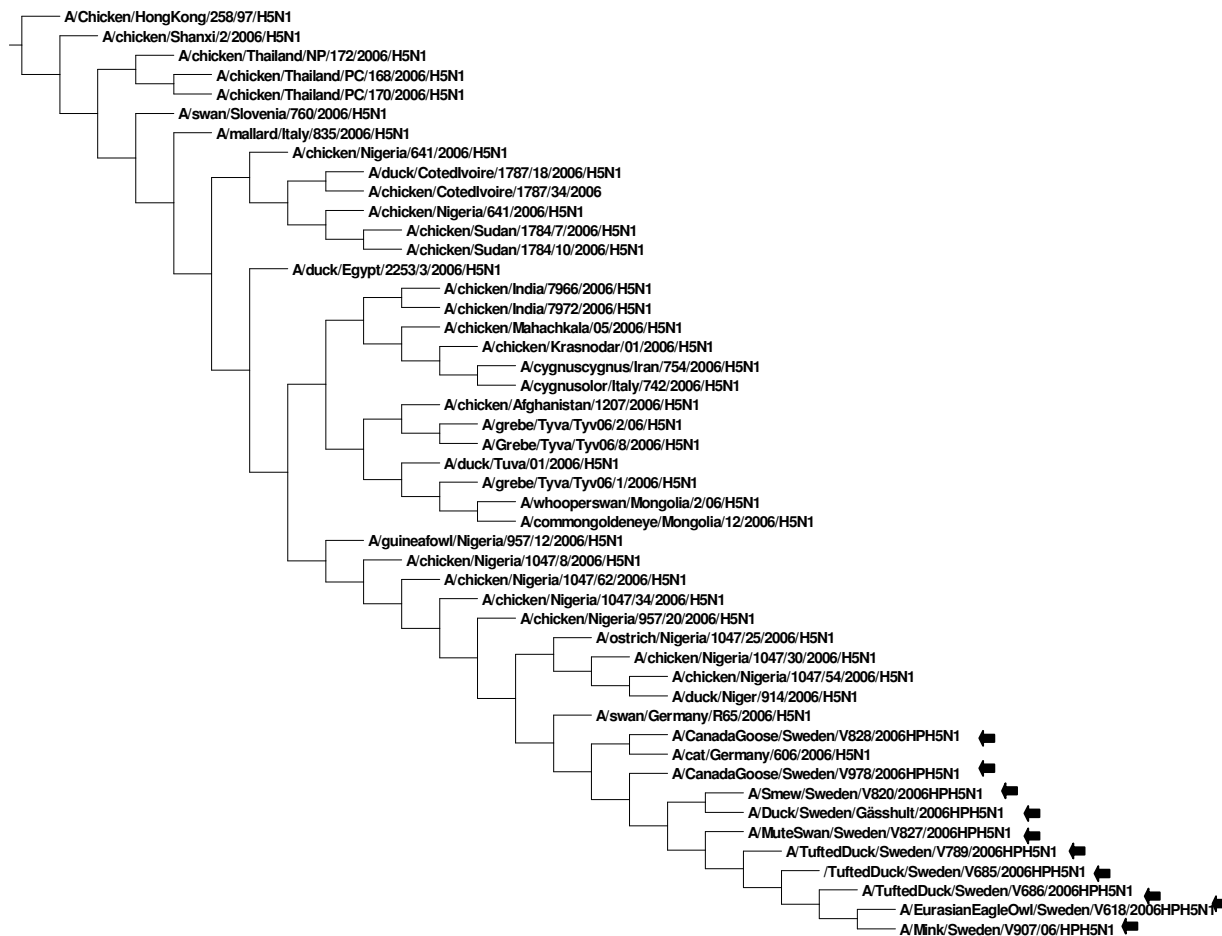


Fig. 6. Cladogram som visar släktsamband mellan Matrix-protein för HP H5N1. Isolaten i vår studie är märkta med pilar

## Analys av proteinsekvenser i NS1-proteinet

Den fylogenetiska analysen visade släktskap mellan olika subtyper, men för att kunna studera skillnaderna närmre, som möjligtvis utgör funktionella skillnader, gjordes nya "alignments" med proteinsekvenserna översatta till aminosyror.

### Lågpatogena virussubtyper

Vi fann att vid positionerna 38 (arginin), 92 (aspartamsyra) och 149 (alanin), är alla våra subtyper oförändrade jämfört med PR8 och virus från Genbank. På position 41 (lysin) har utbyte skett till arginin hos S90-1174/05/H5N3. Dessutom har motiven mellan position 137-146 förändrats hos isolaten av subtyp H5N3 (S90-436 och S90-1174) samt H10N7 (chicken/Germany) Samma mutationer syns hos flera nord- och sydamerikanska isolat hämtade från NCBI's Genbank. Likaledes har samma isolat som nämndes i texten ovan, mutationer i området runt position 186, samt i slutet av proteinsekvenserna (tab.6 och 7).

Tabell 6. Förändring av protein vid några välkarakteriserade positioner på NS1 hos LP AIV, jämfört med isolat från NCBI's Genbank

Subtyp	Identitet	Positioner						
		92	149	137-146	191-192	225	226	
H1N1	A/Puerto Rico/8/34	D	A	IFDR LETL I L	TV	T	I	
H2N3	A/mallard/Swe/S90-568/03							
H3N2	A/gull/Swe/IF60/00							
H4N6	A/mallard/Swe/S90-780/03							
H4N6	A/mallard/Swe/S90-754/03							
H5N3	A/mallard/Swe/S90-436/05			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H5N3	A/mallard/Swe/1174/05			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H6N2	A/mallard/Swe/S8-12/03							
H7N7	A/mallard/Swe/S90-735/03							
H10N8	A/mallard/Swe/S90-229/03					Q	F	
H12N5	A/mallard/Swe/S90-820/03							
H10N4	A/mink/Swe/84							
H10N4	A/wisling Swan/88							
H10N7	A/chicken/Germany/49			LFDQ LETL VS	SI	R		
H2N9	A/duck/Nanchang/2/0486/00							
H3N8	A/pintail/Alaska/279/05			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H4N3	A/bluewing teal/Barbados/21/04							
H4N6	A/quail/Nanchang/4/034/00							
H5N2	A/chicken/Guatemala/45511/3/00			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H5N2	A/chicken/TX/298313/04			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H5N2	A/chicken/ElSalvador/102711/2/01			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H5N2	A/chicken/Ibaraki/1/05			LFDQ LETL VS	SI	R		
H6N1	A/duck/Taiwan/29/3/00			N				
H6N1	A/pheasant/HongKong/NT261/00	E		N A				
H6N1	A/chicken/Taiwan/PF2/02			L				
H6N1	A/chicken/Taiwan/0408/02							
H6N1	A/quail/HongKong/SF595/00	E		N A		T	T	
H6N2	A/chicken/California/431/00			LFDQ LETL VS	SI	R	A	
H6N5	A/duck/Taiwan/WB459/04			N				
H6N?	A/redknot/NJ/828235/01							
H7N2	A/chicken/NY/30749/3/00			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H7N3	A/turkey/Italy/8000/02							
H7N3	A/turkey/Italy/214845/02							
H7N3	A/chicken/Chile/4977/02			LFDQ LETL VS	SI	R		
H7N3	A/mallard/Italy/43/01							
H7N3	A/mallard/Netherlands/12/00			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H7N3	A/cinnamon teal/Bolivia/4537/01							
H7N7	A/chicken/Germany/R28/03							
H8N4	A/mallard/Alberta/827/78			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H9N2	A/chicken/Korea/S1/03						V	
H9N2	A/duck/Shantou/1605/01			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H9N2	A/chicken/Israel/416/06			A				
H9N2	A/ostrich/Israel/1436/03							
H10N4	A/ruddy turnstone/DE/76/00			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H11N?	A/mallard/Xuyi/8/04							
H12N5	A/mallard/Alberta/60/76			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H12N5	A/ruddy turnstone/DE/97/00			G				
H?N?	A/pintail/Alberta/358/79			LFDQ LETL VS	SI	R	V	
H?N?	A/mallard/Alberta/88/76			LFDQ LETL VS	SI	R	V	

Tabell 7. Förändring av protein vid några välkaraktäriserade positioner på NS1 hos LP AIV

Subtyp	Identitet	Positioner					
		92	149	137-146	191-92	225	226
H1N1	<i>A/Puerto Rico/8/34</i>	D	A	IFDR LETL IL	TV	T	I
H2N3	A/mallard/Swe/S90-568/03						
H3N2	A/gull/Swe/IF60/00						
H4N6	A/mallard/Swe/S90-780/03						
H4N6	A/mallard/Swe/S90-754/03						
H5N3	A/mallard/Swe/S90-436/05			LFDQ LETL VS	SI	R	V
H5N3	A/mallard/Swe/1174/05			LFDQ LETL VS	SI	R	V
H6N2	A/mallard/Swe/S8-12/03						
H7N7	A/mallard/Swe/S90-735/03						
H10N8	A/mallard/Swe/S90-229/03					Q	F
H12N5	A/mallard/Swe/S90-820/03						
H10N4	A/mink/Swe/84						
H10N4	A/wisling Swan/88						
H10N7	A/chicken/Germany/49			LFDQ LETL VS	SI	R	

### Högpatogeta H5N1

Vid analys av de högpatogeta isolaten kunde man se att samtliga våra H5N1 virusisolat hade samma proteinsekvenser (utom en vigg som hade en substitution av lysin till glutamin i position 108). Alla har lysin på position 41 och alanin på 149. Referensvirus *A/chicken/97* hade glutaminsyra på position 92 medan våra isolat hade aspartamsyra istället. Mellan 137-146 hade det skett mutationer i tre positioner och likaså var det förändringar i motiven runt 186 samt i slutet av sekvenserna (tab.8). Alla H5N1 hade deletioner mellan positionerna 80-84.

När vi jämförde de båda minkisolaten med respektive grupps fågelisolat syns ingen påfallande skillnad.

Vid jämförelse mellan proteinsekvenserna för de två olika H5N1-isolaten, syntes skillnader endast i ett fåtal aminosyror i början av NS1-segmentet.

Tabell 8. Förändring av protein vid några välkaraktäriserade positioner på NS1 hos HP H5N1

Identitet, A/	Positioner					
	92	149	137-146	187-190	227-230	
<i>Chicken/HongKong/97</i>	E	A	IFNR LEAL	WNNN	EPEV	
Eagle owl/Swe/V618/06	D	A	IYDR LETL	WNDN	ESKV	
Tufted duck/Swe/V685/06	D	A	IYDR LETL	WNDN	ESKV	
Tufted duck/Swe/V686/06	D	A	IYDR LETL	WNDN	ESKV	
Tufted duck/Swe/V789/06	D	A	IYDR LETL	WNDN	ESKV	
Smew/Swe/V820/06	D	A	IYDR LETL	WNDN	ESKV	
Mute swan/Swe/V827/06	D	A	IYDR LETL	WNDN	ESKV	
Can.goose/Swe/V828/06	D	A	IYDR LETL	WNDN	ESKV	
Can.goose/Swe/V978/06	D	A	IYDR LETL	WNDN	ESKV	
Mink/Swe/V907/06	D	A	IYDR LETL	WNDN	ESKV	

## DISKUSSION

NS-genen hos influensavirus är uppdelad i två grupper, allel A (grupp A) och allel B (grupp B). Dessa grupper har utvecklats parallellt till två genetiska linjer (Scholtissek & von Hoyningen-Huene, 1980) med 20-30 % skillnad i nukleotidsekvenser (Treanor *et al.*, 1989). Grupp B består troligen av en gammal version av NS-genen som funnits bland fåglar i årtionden. Efter "reassortement" med ett humant influensavirus utsattes NS1-proteinet för ett starkt selektionstryck för att anpassas till de övriga generna hos det nya viruset (Gammelin *et al.* 1990; Gorman *et al.* 1990). Man antar att det omkring sekelskiftet 1900 skedde en återöverföring av en human NS-gen till en aviär influensastam. Det humana NS1-proteinet fortsatte att förändras medan det aviära stannade upp i sin utveckling efter anpassningen till det aviära genomet. Det är anmärkningsvärt att två olika grupper av NS-gener kan samexistera då det visats att virus med olika NS-gener lätt rekombinerar till livskraftiga nya stammar (Scholtissek & von Hoyningen-Huene, 1980; Treanor *et al.*, 1989). Influensavirus NS-gensekvenser har troligen motiv som styr förmågan till rekombination (Ludwig *et al.* 1991). Vid analys av denna studies cladogram över NS1-proteinet hos LPAI-subtyperna visade det sig att H10N7 och de två H5N3 isolaten inte hamnade i samma gren som de övriga. Med anledning av att de hamnade i nära anslutning till kända isolat ur grupp B, kunde vi dra slutsatsen att även våra tre utstickare tillhörde denna grupp. Detta visades ytterligare genom att göra nya cladogram med fler olika isolat från grupp B samt att även göra en fylogenetisk analys med en NeighbourJoining. (Denna metod jämför proteiner i ändsekvenserna till skillnad från Maximum Parsimony, som gör jämförelser mellan varje nukleotid samt även gör en evolutionär analys som visar släktskapet.) Influensavirus i grupp B isolerades först på den amerikanska kontinenten, och har bara hittats hos fågel (utom ett speciellt fall från häst), vilket gör att vårt resultat kan tolkas som att fåglars flyttvägar och geografiska utbredning spelar en stor roll för evolutionen hos influensa A-virus (von Hoyningen-Huene & Scholtissek, 1983). Det hade varit intressant att jämföra dessa tre isolat med ytterligare flera isolat ur grupp B från olika delar av världen, för att kunna dra vidare slutsatser.

Vid jämförandet av cladogram för NS1 och Matrix förväntades att de skulle överensstämma med varandra, vilket de dock inte gjorde. Flera isolat har helt bytt gren vilket visades inom både den lågpatogena och högpatogena gruppen. Detta tyder på att NS- och Matrixgener har olika ursprung eller att mutationer sker med olika frekvens och till viss del oberoende av varandra, d v s evolutionen verkar separat, inom respektive proteinsekvens. Influensavirus har ett mutationsbenäget segmenterat genom, där baspar lätt byter plats, byts ut eller faller bort, framförallt i de yttre ändarna av segmenten. Först och främst kan man tänka sig att de olika gensegmenten har byts ut genom "reassortment" vid olika tillfällen. Ludwig *et al.* (1991) har visat att vissa genprodukter (NS- och polymerasproteiner) direkt, eller indirekt, har samevolverat ur en artspecifik synvinkel. För att kunna säga vilken roll Matrix-proteiner har i förhållande till andra genprodukter ur utvecklingsbiologisk synvinkel krävs vidare studier.

Om man jämför cladogram för HP H5N1 med de för den lågpatogena gruppen, ser man att våra tio H5N1 hamnar mycket nära varandra även när man använder ett stort antal av samma subtyp från NCBI's Genbank, medan det blir en större spridning mellan isolaten i gruppen med tretton olika lågpatogena virus. Denna

spridning kan förklaras med att den sistnämnda gruppen av virus är mer heterogen, med avseende på tidsaspekt och subtyper, än H5N1-gruppen som består av isolat från ett och samma sjukdomsutbrott och därför blir bilden inte helt rättvisande.

När man tittar på släktskapet mellan H5N1 som isolerats på olika platser i världen under 2006 ser man att våra svenska isolat hamnar på samma gren som tyska, vilket är naturligt då många sjöfåglar kommer i kontakt med varandra när de samlas på vissa platser. Vad som är värt att notera är att närmaste släktgren består av isolat från Nigeria och inte isolat från Ryssland, som återfinns på huvudgrenen ovanför, vilket man skulle kunna anta. Migrerande fåglar som rör sig långa sträckor kan föra med sig virustyper som inte påverkar fågelns hälsa och på så sätt stör flytten. På detta vis kan patogener spridas mellan länder och till och med kontinenter. Det finns många faktorer som styr virus överföring och geografiska spridning med hjälp av flyttfåglar t ex väderlek, tid på året och värdarternas ekologi. Flyttande fåglar flyger sällan hela sträckan till eller från häckningsplatserna utan gör flera stopp under färden. På vissa platser kan det samlas ett mycket stort antal individer av olika arter. Dessa platser spelar stor roll för spridningen av virus mellan olika arter samt mellan vilda och tama fåglar (Olsen *et al.* 2006). Vintern 2006, då Sverige hade sitt första HPAI-utbrott, var mycket lång och kall vilket medförde att stora vattenområden var istäckta och det var svårt att hitta föda för sjöfåglar. Nedsatt allmäntillstånd och stora ansamlingar av fåglar vid öppet vatten gjorde sjukdomsmottagligheten och risken för spridning mycket stor. Ingen av arterna i vår studie flyttar dock någon längre sträcka utan söker sig till närmaste öppna vatten. Därför vore det närmast till hands att dessa fåglar kommit i kontakt med fåglar österifrån som sökt sig till samma vatten och smittats därifrån. En förklaring till det nigerianska släktskapet kan vara att virus spridits med långflyttare söderifrån under föregående vår/sommar och funnits en längre tid i sjöfågelpopulationen innan sjukdomen bröt ut under den kalla årstiden. Frågan om varför ingen smitta upptäcktes under sommaren kvarstår dock. En annan väg för smittspridning är genom transport av och/eller legal/illegal införsel av fåglar och fågelprodukter. På detta sätt kan smitta spridas i motsatt riktning mot flyttfågelsträckan, eller få skjuts på vägen. Det hade varit mycket intressant att studera spridningen av HP H5N1 i tid och rum för att försöka ta reda på smittvägarna.

Vid närmre studie av proteinsekvenserna för NS hos LPAI finner man även här att H5N3 och H10N7 är utmärkande. Man ser här också att de amerikanska Genbanksisolaten har samma sekvenssammansättningar som våra tre utstickare. Intressant att notera är att allel B upptäcktes i USA (Ludwig *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1992). Proteinsekvenser har regioner som signalerar för viktiga funktioner. Dessa regioner är högst konserverade och förändringar här leder inte så lätt till livskraftiga genotyper. Karboxyländan är dock inte konserverad alls enligt Norton *et al.* (1987). Ludwig *et al.* (1991) menar att de icke konserverade regionerna i aminoterminal-halvan av proteinet kan vara utsatt för selektionstryck.

Samtliga våra 23 (LP + HP) virusisolat har alanin på position 149. Det har nyligen påvisats att H5N1 som har valin istället för alanin är oförmögna till replikation i kycklingägg men mycket patogena för andfåglar. Det kan vara en förklaring till att det var en relativt låg dödlighet bland vilda andfåglar under utbrottet i Sverige 2006. Dock behövs det bara substitution i en enda nukleotid för att detta skifte av

aminosyra ska kunna ske. Slutsatser man kan dra ur dessa fakta är att risken för hög dödlighet hos hönsfågel är stor vid smitta med denna subtyp samt att sannolikheten för mutation till den andpatogena formen är stor.

Alla studerade H5N1 i denna studie har en deletion i 80-84. Betydelsen av detta kräver vidare studier.

Sammanfattningsvis har de högpatogena fågelinfluensaisolaten från utbrottet i Sverige vårvintern 2006, för första gången analyserats genetiskt genom denna studie. Dessutom har dessa genetiska analysresultat satts i samband med andra isolat, både av låg- respektive högpatogen variant. Denna nya kunskap kan användas både för framtida utökade epidemiologiska studier samt funktionella studier av NS1- och M-proteinerna.

Denna studie har finansierats av ett anslag från FORMAS.

### **TACK**

Jag vill tacka mina fantastiska handledare, Mikael Berg och Siamak Zohari på Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap, som gjort detta arbete till ett rent nöje. Dessutom vill jag tacka alla trevliga och hjälpsamma medarbetare på virologen. Tack!

## REFERENSER

- Aymard-Henry, M., M.T. Coleman, W.R. Dowdle, W.G. Laver, G.C. Schild & R.G. Webster. 1973. Influenza neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bull. W.H.O.* 48, 199-202.
- Berg, M., L. Englund, Izzeldin A. Abusugra, B. Klingeborn & T. Linné. 1990. Close relationship between mink influenza (H10N4) and concomitantly circulating avian influenza viruses. *Arch. Virol.* 113, 61-71.
- Bergmann, M., A. Garcia-Sastre, E. Carnero, H. Pehamberger, K. Wolff, P. Palese & T. Muster. 2000. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR mediated inhibition of replication. *J. Virol.* 74, 6203-6206.
- Capua, I. & D.J. Alexander. 2003. Human health implications of Avian Influenza Viruses and Paramyxoviruses. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 23, 1-6.
- Chen, Z., Y. Li & R.M. Krug. 1999. Influenza A virus NS1 protein targets poy(A)-binding protein II of the cellular 3V-end processing machinery. *EMBO J.* 18, 2273-2283.
- Fortes, P., A. Baleso & J. Ortín. 1994. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.* 13, 704-712.
- Fouchier, R., V. Munster, A. Wallensten, T. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. Rimmelzwaan, B. Olsen & A. Osterhaus. 2004. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* 79, 2814-2822.
- Gammelin, M., A. Altmüller, U. Reinhardt, J. Mandler, V.R. Harley, P.J. Hudson, W.M. Fitch & C. Scholtissek. 1990. Phylogenetic analysis of nucleoproteins suggests that human influenza A viruses emerged from a 19<sup>th</sup>-century avian ancestor. *Mol. Biol. Evol.* 7, 194-200.
- Gómez-Puertas, P., C. Albo, E. Pérez-Pastrana, A. Vivo & A. Portela. 2000. Influenza Virus Matrix Protein Is the Major Force in Virus Budding. *J. Virol.* 79, 11538-11547.
- Gorman, O.T., W.J. Bean, Y. Kawaoka & R.G. Webster. 1990. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J. Virol.* 64, 1487-1497.
- Guo, Y., M. Wang, Y. Kawaoka, O.T. Gorman, T. Ito, T. Saito & R.G. Webster. 1992. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology* 188, 245-255.
- Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* Oxford University Press p. 95-98. Oxford. 1999.
- Hara, K., M. Shiota *et al.* 2003. Inhibition of the protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit by viral matrix protein. *Microbiol. Immunol.* 47, 521-526.
- Hatada, E. & R. Fukuda. 1992. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J. Gen. Virol.* 73 (12), 3325-3329.
- Li, Y., Z.Y. Chen, W. Wang, C.C. Baker & M.R. Krug. 2001. The 3V-end processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron premRNA's in vivo. *RNA* 7, 920-931.
- Li, Z., Y. Jiang, P. Jiao, A. Wang, F. Zhao, G. Tian, X. Wang, K. Yu, Z. Bu & H. Chen. 2006. The NS Gene Contributes to the Virulence of H5N1 Avian Influenza Viruses. *Virol.* 22, 11115-11123.



- Ludwig, S., U. Schultz, J. Mandler, W. Fitch & M.C. Scholtissek. 1991. Phylogenetic Relationship of the Nonstructural (NS) Genes of Influenza A viruses. *Virology* 183, 566-577.
- Nemeroff, M.E., S.M. Barabino, Y. Li, W. Keller & R.M. Krug. 1998. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol. Cell* 1, 991-1000.
- Norton, G.P., T. Tanaka, K. Tobita, S. Nakada, D.A. Buonagurio, D. Greenspan, M. Krystal & P. Palese. 1987. Infectious influenza A and B virus variants with long carboxyl terminal deletions in the NS1 polypeptide. *Virology* 156, 204-213.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. 2004. Highly pathogenic avian influenza.. OIE MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS 2004, kap. 2.1.14. Office International des Epizooties, Paris, France. [www.oie.int](http://www.oie.int).
- Olsen, B., V.J. Munster, A. Wallensten, J. Waldenström, A. D. M. E. Osterhaus & R. A. M. Fouchier. 2006. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science* 312, 384-388.
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J. & Lamb, R.A. 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517-528.
- Qiu, Y. & R.M. Krug. 1994. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J. Virol.* 68, 2425-2432.
- Scholtissek, C. & V. von Hoyningen-Huene. 1980. Genetic relatedness of the gene which codes for the nonstructural (NS) protein of different influenza A strains. *Virology* 102, 13-20.
- Seo, S., E. Hoffmann & R.G. Webster. 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat. Med.* 8, 950-954.
- Swayne, D.E., D.A. Senne & C.W. Beard. 1998. Avian Influenza In A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, sid. 150-155, D. E. Swayne ed. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. 1994.
- Takeuchi, K. & Lamb, R.A. 1994. Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport. *J. Virol.* 68, 911-919.
- Treanor, J.J., M.H. Snyder, W.T. London & 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.
- von Hoyningen-Huene, V. & Scholtissek, C. 1983. Low genetic mixing between avian influenza viruses of different geographic regions. *Arch. Virol.* 76, 63-67.
- Wang, W., K. Riedel, P. Lynch, C.Y. Chien, G.T. Montelione & M.R. Krug. 1999. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA* 5, 195-205.

