

Влияние единичных аминокислотных замен в гемагглютинине вируса гриппа В/Флорида/04/2006 ямагатской эволюционной линии на антигенные и рецепторсвязывающие свойства

Е. В. Сорокин[#], Т. Р. Царева, А. А. Соминина, М. М. Писарева, А. Б. Комиссаров, А. А. Кошелева

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

[#]Для корреспонденции: Евгений Сорокин, e-mail: esorokin@rambler.ru

DOI: 10.18527/2500-2236-2016-3-1-25-30

Ключевые слова: вирус гриппа В, гемагглютинин, рецепторсвязывающие свойства, моноклональные антитела, эскейп-мутанты.

Получена 4 Апреля 2016

Принята к печати 20 Апреля 2016

Опубликована 24 Мая 2016

АННОТАЦИЯ

Известно, что рецептором для проникновения в клетку хозяина для вирусов гриппа А и В служат углеводные цепи, терминированные остатками нейраминовой кислоты. Тип связи между сиаловой кислотой (sialic acid, SA) и соседним остатком галактозы (Gal) является одной из главных характеристик, определяющих тип рецептора. Вирусы гриппа узнают на поверхности клетки SA α 2-3Gal- или SA α 2-6Gal-структуры. Птичьи изоляты вирусов гриппа А связываются с SA α 2-3-сиалированными цепями, тогда как вирусы гриппа А человека – с SA α 2-6Gal. Рецепторсвязывающая специфичность вирусов гриппа В изучена мало, однако известно, что вирусы разновидности Ямагата преимущественно узнают олигосахариды, терминированные SA α 2-6Gal, тогда как вирусы генетической линии Виктория узнают оба типа сиалозидов. Используя четыре вируснейтрализующих моноклональных антитела (монАТ): 10F4, 8H11, 8H3 и 9A3, – мы получили эскейп-мутанты вируса гриппа В/Флорида/04/2006 ямагатской линии. При анализе последовательности гемагглютинина (HA) выявлено, что HA эскейп-мутантов, индуцированных монАТ 10F4, 8H11, 8H3 и 9A3, несут следующие единичные аминокислотные замены: 40Tyr→His, 85His→Tyr, 202Asn→Lys и 242Ser→Arg соответственно. Показано, что замены 202Asn→Lys и 242Ser→Arg приводят к изменению рецепторсвязывающей специфичности вируса. Полученные данные имеют важное значение для понимания роли отдельных аминокислотных остатков HA в формировании рецепторсвязывающих свойств вирусов гриппа В ямагатской эволюционной линии, что позволяет прогнозировать возможные пути эволюции этих вирусов.

Influence of single amino acid substitutions in the hemagglutinin on antigenic and receptor-binding properties of influenza virus B/Florida/04/2006 of Yamagata-like evolutionary lineage

Evgeniy V. Sorokin[#], Tatyana R. Tsareva, Anna A. Sominina, Maria M. Pisareva, Andrey B. Komissarov, Anna A. Kosheleva

Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russian Federation

[#] Corresponding author: Evgeniy Sorokin, e-mail: esorokin@rambler.ru

Keywords: influenza B virus, hemagglutinin, receptor-binding properties, monoclonal antibody, escape mutants.

ABSTRACT

Influenza A and B viruses use sialylated oligosaccharide chains expressed on the surface of a host cell as the cell entry receptors. Type of the bond between sialic acid (SA) and neighboring galactose residue (Gal) is one of the main characteristics that define the type of receptor. Influenza viruses recognize SA α 2-3Gal- or SA α 2-6Gal-structures on the surface of the cells. The Yamagata-like virus strains are predominantly bound to α 2,6-sialylated glycans, while Victoria-like strains are bound to both α 2,3- and α 2,6-sialylated glycans. However, the receptor-binding specificity of influenza B viruses has not been characterized enough. In this study, we selected escape mutants of influenza B/Florida/04/2006 strain (Yamagata-like lineage) using monoclonal antibodies (mAb) to hemagglutinin (HA). Analysis of the amino acid sequences of mAb-induced escape-mutants revealed the single amino acid substitutions 40Tyr→His, 85His→Tyr, 202Asn→Lys and 242Ser→Arg in 10F4-, 8H11-, 8H3- and 9A3-induced HA variants, correspondingly. It was shown that the single amino acid substitutions 202Asn→Lys and 242Ser→Arg alter the receptor-binding specificity of the influenza B virus. These findings are important for the understanding of the influence of individual amino acid residues in HA on the receptor-binding properties of influenza B Yamagata-like lineage viruses and allow us to predict the possible ways of their evolution.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа В циркулируют преимущественно в человеческой популяции и с периодичностью в 2–3 года вызывают эпидемии. Заболевание протекает в тяжелой форме и иногда со смертельным исходом. Первичным звеном в развитии инфекции является связывание гликопротеина вируса гриппа – гемагглютинина (НА) – с экспрессированными на поверхности хозяйской клетки углеводными цепями, которые терминируются остатками нейрамининовой кислоты. Чаще всего это Neu5Ac, хотя встречаются и другие модификации – все они объединены под общим названием «сиаловые кислоты» (sialic acid, SA). Известно, что вирусы гриппа А птиц преимущественно имеют сродство к углеводам с α 2-3 гликозидной связью между SA и соседним остатком галактозы (Gal), тогда как вирусы гриппа А человека взаимодействуют преимущественно с SA α 2-6Gal-цепями [1-4]. Рецепторсвязывающая специфичность вирусов гриппа А детально изучена и считается одним из факторов патогенности [5, 6]. Что касается вирусов гриппа В, то данных по рецепторсвязывающей специфичности НА этих вирусов крайне мало [7-9]. Хотя все вирусы гриппа В объединяют в один род, с начала 1980-х годов наметился дивергентный характер их эволюции с формированием двух антигенно отличных эволюционных линий, родоначальниками которых были признаны референс-вирусы В/Виктория/2/1987 и В/Ямагата/16/1988 [10]. В настоящее время установлено, что В/Ямагата-подобные штаммы связываются преимущественно с SA α 2-6Gal-олигосахаридами, тогда как рецепторы викторианской линии включают как SA α 2-6-, так и SA α 2-3-терминированные цепи [11].

Данное исследование посвящено анализу влияния отдельных аминокислотных замен в тяжелой цепи НА на рецепторсвязывающие свойства вируса гриппа В/Флорида/04/2006 ямагатской эволюционной линии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моноклональные антитела

Моноклональные антитела (монАТ) к вирусам гриппа В получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа по методу [12] в нижеследующей модификации. Мышей линии BALB/c иммунизировали внутрибрюшинно 70 мкг очищенного ультрацентрифугированием вируса гриппа В/Флорида/04/2006. Через 3 месяца мышей бустировали очищенной фракцией поверхностных гликопротеинов этого же вируса (15 мкг). Через 3 суток проводили гибридизацию спленоцитов иммунных мышей с клетками мышинной миеломы линии PxAg.653 в соотношении 10:1 в присутствии 50%-ного раствора ПЭГ-2 000 в среде Игла (DMEM). При первичном тестировании клонов использовали традиционный метод ИФА: анализируемую культуральную жидкость вносили в лунки планшетов, сенсibilизированных

фракцией поверхностных гликопротеинов вируса гриппа В/Флорида/04/2006, с последующей детекцией прореагировавших монАТ пероксидазным конъюгатом к IgG мыши (1/10000) («Sigma», США). Отобранные по показателям специфической активности клоны гибридом, культивируемые в среде НАТ, подвергали 5-кратному реклонированию. Стабильные клоны-продуценты монАТ криоконсервировали или использовали для получения асцитов.

Реакция гемагглютинации

Реакцию гемагглютинации (РГА) проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ. К двукратным разведениям каждого варианта вируса в 50 мкл 0.1 М фосфатно-солевого буфера (PSB) добавляли 50 мкл 0.5%-ной суспензии эритроцитов кур. Титром вируса считали максимальное разведение, при котором наблюдалась агглютинация эритроцитов. При анализе рецепторсвязывающих свойств в РГА использовали 1%-ную суспензию эритроцитов морской свинки и 1%-ную суспензию эритроцитов лошади.

Реакция торможения гемагглютинации

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Пятьдесят микролитров вирусной суспензии, содержащей 4 гемагглютинирующие единицы (ГАЕ) вируса, вносили в каждую лунку планшета с раститрованными монАТ (двукратные разведения монАТ в 50 мкл 0.1 М PBS) и инкубировали в течение 1 ч, после чего в каждую лунку вносили по 100 мкл 0.5%-ной суспензии куриных эритроцитов. Результат оценивали, как максимальное разведение монАТ, при котором наблюдали ингибирование РГА.

Селекция эскейп-мутантов

Для получения эскейп-мутантов использовали ранее описанный метод [13]. Образцы вируса В/Флорида/04/2006 (дикий тип) инкубировали с вирусспецифическими монАТ в течение 1 ч при 37°C, после чего вводили в куриные эмбрионы. Содержание вируса в аллантоисной жидкости оценивали в РГА. Пробы, содержащие эскейп-мутанты вируса, подвергали клонированию методом предельных разведений, после чего исследовали их антигенные свойства в РТГА с панелью монАТ.

Секвенирование

РНК вируса гриппа В выделяли с помощью набора QIAamp Viral RNA MiniKit («Qiagen»). Обратную транскрипцию РНК проводили в течение 40 мин при 37°C, используя случайные гексамерные праймеры и коммерческий набор «Реверта-L» («Интерлабсервис», Россия). Для амплификации использовали полимеразу ДиаТак («Интерлабсервис», Россия). Прямое секвенирование выполняли с помощью набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) с применением генетического анализатора GA3130 («Applied Biosystems»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика использованных в исследовании моноклональных антител

В целях идентификации вируснейтрализующих эпитопов в молекуле НА вирусов гриппа В ямагатской эволюционной линии нами была разработана панель из четырех мoнАТ к вирусу гриппа В/Флорида/04/2006: 8Н3, 8Н11, 9А3 и 10F4. Полученные мoнАТ специфически ингибировали РГА вирусов ямагатской линии, не обладая ни вируснейтрализующей, ни ингибиторной активностью в отношении вирусов В викторианской линии. Согласно данным анализа вестерн-блот, все мoнАТ связывались с субъединицей НА1 (неопубликованные данные). Благодаря высокой вируснейтрализующей активности этих мoнАТ, удалось получить эскейп-мутанты вируса В/Флорида/04/2006.

Селекция и характеристика антигенных свойств эскейп-мутантов

В результате селекции вируса гриппа В/Флорида/04/2006 в присутствии каждого из указанных выше мoнАТ получено 4 эскейп-мутанта – по одному для каждого клона мoнАТ. Для идентификации специфических аминокислотных замен в составе эскейп-мутантов проведено секвенирование гена НА. Установлено, что все полученные эскейп-мутанты несли единичные аминокислотные замены. В эскейп-мутантах, отобранных с использованием мoнАТ 8Н11 и 10F4, идентифицированы соответственно аминокислотные замены His→Tyr в позиции 85 (88 – по общепринятой нумерации для Н3 НА вируса гриппа А, которая далее будет указана в скобках) и Tyr→His в позиции 40 (50), которые расположены вблизи стебля НА вируса гриппа В (Рис. 1).

Эскейп-мутант, полученный под действием мoнАТ 8Н3, нес аминокислотную замену Asn→Lys в позиции 202 (193), которая входит в состав спирали 190 [14] и формирует антигенный сайт ВВ1 [15]. Эскейп-мутант 9А3, отобранный с соответствующим мoнАТ, имел замену Ser242(227)→Arg. Этот аминокислотный остаток расположен в петле 240 и принимает участие в формировании рецепторсвязывающего кармана вируса гриппа типа В [16]. Пространственная трехмерная модель локализации иммунодоминантных эпитопов в молекуле НА построена нами на основе идентификации переменных эпитопов в составе эскейп-мутантов и опубликованных данных по кристаллической структуре молекулы НА вируса гриппа В/Яманаши/166/1998 (PDB ID: 4M40) [16] с использованием программы RasMol (версия 2.7.4.2).

Полученные эскейп-мутанты проанализированы в перекрестной РТГА с использованием панели мoнАТ (Табл. 1). Установлено, что все полученные эскейп-мутанты полностью утратили способность взаимодействовать с гомологичными мoнАТ. Важно заметить, что эскейп-мутанты 8Н3, 8Н11 и 10F4 сохранили родительский фенотип связывания с гетерологичными

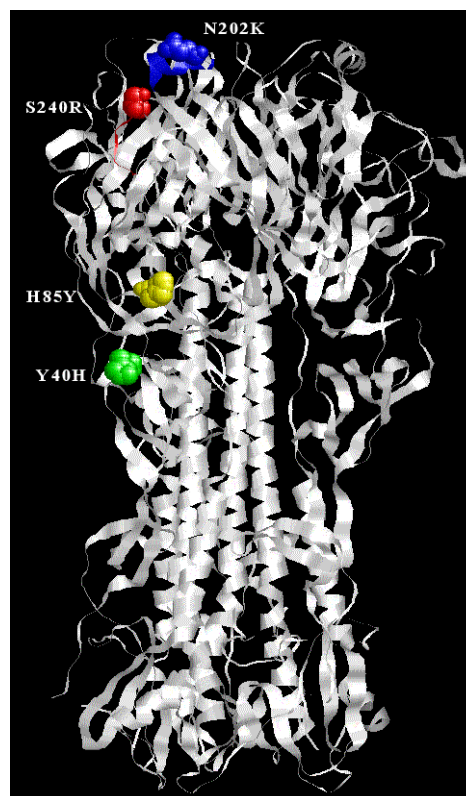


Рис. 1. Локализация аминокислотных замен в молекуле НА эскейп-мутантов вируса гриппа В/Флорида/04/2006 ямагатской линии (спираль 190 выделена на рисунке синим цветом, петля 240 – красным).

мoнАТ (Табл. 2). Вместе с тем, эскейп-мутант 9А3, кроме приобретенной устойчивости к гомологичному мoнАТ, потерял способность взаимодействовать с гетерологичным мoнАТ 8Н3. Аналогичный феномен описан в литературе [17]. Из 8 вариантов эскейп-мутантов (V1–V8) вируса В/Осака/983/97 викторианской линии, которые были отобраны с мoнАТ 10В8, два, V3 и V8, с заменой Lys→Thr в позиции 203 (202 по нумерации НА ямагатской линии и 193 по нумерации Н3 НА), потеряли способность взаимодействовать с гетерологичным мoнАТ 8Е6. В то же время эскейп-мутанты M1 и M2 с заменой Pro→Ser в позиции 241 (240 по НА ямагатской линии и 225 по Н3 НА), селекционированные с мoнАТ 8Е6, взаимодействовали с гетерологичным мoнАТ 10В8. Авторы предположили, что аминокислотный остаток в позиции 203 (202/193) входит в состав или находится вблизи эпитопа мoнАТ 8Е6.

Рецепторсвязывающая специфичность эскейп-мутантов

Недавно показано, что штаммы вирусов гриппа В ямагатской линии взаимодействуют преимущественно с SAα2-6Gal-содержащими углеводными цепями, тогда как викторианские изоляты узнают оба типа сиалозидов [11]. С целью исследовать влияние отдельных аминокислотных остатков НА на рецепторсвязывающую специфичность вируса мы проанализировали относительную активность полученных

Таблица 1. Взаимодействие эскейп-мутантов с моноклональными антителами 8НЗ, 8Н11, 9А3 и 10F4 в РТГА

Вирусы	Титр монАТ в РТГА ^а				Аминокислотные замены в НА
	8НЗ	8Н11	9А3	10F4	
В/Флорида/04/2006	20480	160	5120	320	-
Эскейп-мутант 8НЗ	20	80	2560	160	202Asn→Lys
Эскейп-мутант 8Н11	20480	< 20	2560	160	85His→Tyr
Эскейп-мутант 9А3	< 20	80	< 20	160	242Ser→Arg
Эскейп-мутант 10F4	20480	160	2560	< 20	40Tyr→His

^а Представленные значения – максимальное разведение монАТ, при котором еще наблюдается ингибирование РГА.

Таблица 2. Рецепторсвязывающие свойства эскейп-мутантов вируса гриппа В/Флорида/04/2006

Вирус	Титр РГА			Аминокислотные замены в НА
	Куриные эритроциты ^а	Эритроциты морской свинки ^б	Эритроциты лошади ^в	
В/Флорида/04/2006	128	128	≤ 2	-
Эскейп-мутант 8НЗ	128	64	64	202Asn→Lys
Эскейп-мутант 8Н11	128	128	< 2	85His→Tyr
Эскейп-мутант 9А3	128	64	8–16	242Ser→Arg
Эскейп-мутант 10F4	64	64	< 2	40Tyr→His

^а Углеводные цепи терминированы как SAα2-3Gal, так и SAα2-6Gal.

^б Углеводные цепи преимущественно терминированы SAα2-6Gal.

^в Преобладают SAα2-3Gal-цепи.

эскейп-мутантов по отношению к эритроцитам различных видов животных (Табл. 2). Известно, что структуры сиалированных олигосахаридных цепей, экспрессированных на поверхности эритроцитов кур, морских свинок и лошадей, отличаются, прежде всего, по типу связи между остатком SA и Gal [18].

Как видно из Табл. 2, вирус дикого типа В/Флорида/04/2006 практически не взаимодействует с эритроцитами лошади, в отличие от эритроцитов морской свинки и кур, что позволяет предполагать преимущественное связывание этого штамма с α2,6-сиалированными цепями. Аналогичным образом вели себя эскейп-мутанты 8Н11 (85His→Tyr) и 10F4 (40Tyr→His). Однако мутант 8НЗ, с заменой 202Asn→Lys, приобрел способность активно взаимодействовать с эритроцитами лошади, на которых экспрессированы преимущественно SAα2-3Gal-терминированные олигосахариды. Ранее показано [19], что большинство аминокислотных остатков, окружающих рецепторсвязывающий карман НА вируса гриппа В, идентичны у штаммов ямагатской и викторианской эволюционных линий, за исключением нескольких позиций: 163, 198, 202 и 203 (нумерация для вирусов гриппа викторианской линии); при этом потенциальный сайт N-гликозилирования при Asn163 отсутствует в НА вирусов ямагатской разновидности. Кроме того, отрицательно заряженный Glu198, нейтральный Ala202 и положительно заряженный остаток Lys203 у вирусов викторианской линии, расположенные в спирали 190, заменены соответственно на остатки Lys197, Lys201 и Asn202 у вирусов ямагатской линии. Предполагается, что эти четыре аминокислотных остатка могут играть важную роль в специфичности узнавания сиалированных цепей [11]. Как видно из Табл. 2, замена Asn на Lys в позиции 202 (203 для

НА викторианской линии) повлияла на рецепторсвязывающие свойства НА, по-видимому, расширив репертуар рецепторов. Так, в отличие от вируса дикого типа, эскейп-мутант 8НЗ связывается с эритроцитами лошади (преимущественно α2-3-сиалированные цепи), сохранив при этом родительский фенотип агглютинации эритроцитов морской свинки (преимущественно α2-6-сиалированные цепи). Необходимо отметить, что и дикий тип В/Флорида/04/2006, и все эскейп-мутанты в положениях 197 (198 викторианской линии) и 201 (202 викторианской линии) содержат характерные для штаммов ямагатской линии остатки Lys. Ранее показано, что штамм ямагатской линии В/Виктория/504/2000, рецепторами которого служат олигосахариды, терминированные SAα2-6Gal, при адаптации к росту в куриных эмбрионах приобрел замены 141Gly→Glu, 162Arg→Met и 196Asp→Tyr. В результате рецепторная специфичность НА адаптированного вируса изменилась – в репертуар его рецепторов вошли и SAα2-3Gal-содержащие олигосахариды [7]. Анализ последовательности НА вируса В/Флорида/04/2006 и всех эскейп-мутантов показал, что в этих положениях никаких изменений не произошло и все полученные эскейп-мутанты несли Gly141, Arg162 и Asp196, так же как и дикий тип вируса, использованный для селекции. Кроме того, мы установили, что ни штамм дикого типа В/Флорида/04/2006, ни какой-либо из полученных эскейп-мутантов не имели замены в позиции 95 (Phe), которая играет важную роль в формировании рецепторсвязывающего кармана и обуславливает более низкую, по сравнению с вирусом гриппа А (Tyr98), аффинность вируса гриппа В к рецепторам [20].

Еще один эскейп-мутант, 9А3, так же как и 8НЗ, приобрел способность взаимодействовать

с эритроцитами лошади. Эскейп-мутант 9А3 несет аминокислотную замену 242(227)Ser→Arg в составе петли 240. Петля 240 и спираль 190 расположены на удаленном от мембраны участке молекулы HA и формируют вершину и левую кромку рецепторсвязывающего кармана HA вирусов гриппа В. Переориентация боковых цепей в петле 240 может сильно изменять антигенные свойства этого региона [16]. Между остатками Ser 242(227) и Pro 240(225) существует водородная связь, и, вероятно, замена Ser на Arg в положении 242 приводит к ее нарушению, что влияет не только на антигенные, но и на рецепторсвязывающие свойства HA. Тот факт, что эскейп-мутант 9А3 потерял способность взаимодействовать с моНАТ 8Н3, также подтверждает предположение о взаимном влиянии аминокислотных остатков, входящих в петлю 240 и спираль 190.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования показано, что аминокислотные замены в молекуле HA, появившиеся вследствие ускользания вируса гриппа В/Флорида/04/2006 от нейтрализующего действия моНАТ 8Н3, 8Н11, 9А3 или 10F4, не только влияют на антигенные свойства, но и могут изменять рецепторную специфичность вируса. Так, появление Lys в позиции 202 (вместо Asn) молекулы HA, по-видимому, расширяет спектр узнаваемых вирусом рецепторов – кроме эритроцитов, в гликом которых входят преимущественно SAα2-6Gal-звенья (морской свинки), появляется взаимодействие и с эритроцитами, на поверхности которых экспрессированы главным образом SAα2-3Gal-цепи. Аминокислотный остаток в позиции 242 (замена Ser на Arg) также может влиять на репертуар рецепторов вируса гриппа В/Флорида/04/2006.

Необходимо подчеркнуть, что очень важно осуществлять мониторинг рецепторсвязывающих характеристик циркулирующих и вновь появляющихся штаммов вирусов гриппа как А, так и В, поскольку структура рецепторов вируса определяет его тканевой тропизм, а значит, и вирулентный фенотип [5, 6]. Так, уже показано, что пациенты, инфицированные штаммами вируса гриппа В, которые связываются не только с SAα2-6Gal-звеньями, но и с сиалозидами «птичьего» типа (SAα2-3Gal), более склонны к развитию бронхопневмонии и чаще имели симптомы поражения желудочно-кишечного тракта [11]. В целом, знание механизмов взаимодействия вирусов гриппа с хозяйской клеткой, которое напрямую связано с рецепторсвязывающими свойствами HA, дает ключ к пониманию тенденций в эволюции вируса, обусловленной изменением антигенных характеристик.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не преследуют коммерческих или финансовых интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(13), 4620-4. doi: 10.1073/pnas.0308001101
2. Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, Klimov A. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* 2006; 344(2), 432-8.
3. Rogers GN, D`Souza BL. Receptor-binding properties of human and nimal H1 influenza virus isolates. *Virology* 1989; 173, 317-322.
4. Mochalova L, Gambaryan A, Romanova J, Tuzikov A, Chinarev A, Katinger D, Katinger H, Egorov A, Bovin N. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. *Virology* 2003;313(2), 473-80.
5. Viswanathan K, Koh X, Chandrasekaran A, Pappas C, Raman R, Srinivasan A, Shriver Z, Tumpey TM, Sasisekharan R. Determinants of glycan receptor specificity of H2N2 influenza A virus hemagglutinin. *PLoS One* 2010; 5(10), e13768. doi: 10.1371/journal.pone.0013768.
6. Heider A, Mochalova L, Harder T, Tuzikov A, Bovin N, Wolff T, Matrosovich M, Schweiger B. Alterations in hemagglutinin receptor-binding specificity accompany the emergence of highly pathogenic avian influenza viruses. *J Virol* 2015; 89(10), 5395-405. doi: 10.1128/JVI.03304-14.
7. Lugovtsev VY, Smith DF, Weir JP. Changes of the receptor-binding properties of influenza B virus B/Victoria/504/2000 during adaptation in chicken eggs. *Virology* 2009; 394(2), 218-26. doi: 10.1016/j.virol.2009.08.014.
8. Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Karlsson KA. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 1997; 233(1), 224-34. doi: 10.1006/viro.1997.8580.
9. Mochalova L, Bright R, Xu X, Korchagina E, Chinarev A, Bovin N, Klimov A. Shift in oligosaccharide specificities of hemagglutinin and neuraminidase of influenza B viruses resistant to neuraminidase inhibitors. *Glycoconj J* 2010; 27(3), 321-7. doi: 10.1007/s10719-010-9280-7.
10. Shen J, Kirk BD, Ma J, Wang Q. Diversifying selective pressure on influenza B virus hemagglutinin. *J Med Virol*, 2009; 81(1), 114-24. doi: 10.1002/jmv.21335.
11. Wang YF, Chang CF, Chi CY, Wang HC, Wang JR, Su IJ. Characterization of glycan binding specificities of influenza B viruses with correlation with hemagglutinin genotypes and clinical features. *J Med Virol* 2012; 84(4), 679-85. doi: 10.1002/jmv.23219.

12. Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 1976; 6(7), 511-9. doi: 10.1002/eji.1830060713.
13. Kaverin NV, Rudneva IA, Govorkova EA, Timofeeva TA, Shilov AA, Kochergin-Nikitsky KS, Krylov PS, Webster RG. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. *J Virol* 2007; 81(23), 12911-7. doi: 10.1128/JVI.01522-07.
14. Wang Q, Cheng F, Lu M, Tian X, Ma J. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J Virol* 2008; 82(6), 3011-20. doi: 10.1128/JVI.02477-07.
15. Stray SJ, Pittman LB. Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin. *Virol J* 2012; 9, 91. doi: 10.1186/1743-422X-9-91.
16. Ni F, Kondrashkina E, Wang Q. Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin. *Virology* 2013; 446(1-2), 112-22. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.035.
17. Nakagawa N, Kubota R, Nakagawa T, Okuno Y. Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains. *J Gen Virol* 2001; 82(Pt 9), 2169-72. doi: 10.1099/0022-1317-82-9-2169.
18. Ito T, Suzuki Y, Mitnaul L, Vines A, Kida H, Kawaoka Y. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology* 1997; 227(2), 493-9. doi: 10.1006/viro.1996.8323.
19. Carbone V, Kim H, Huang JX, Baker MA, Ong C, Cooper MA, Li J, Rockman S, Velkov T. Molecular characterization of the receptor binding structure-activity relationships of influenza B virus hemagglutinin. *Acta Virol* 2013; 57(3), 313-32.
20. Ni F, Mbawuike IN, Kondrashkina E, Wang Q. The roles of hemagglutinin Phe-95 in receptor binding and pathogenicity of influenza B virus. *Virology* 2014; 450-451, 71-83. doi: 10.1016/j.virol.2013.11.038.