

Construction of Stable Expression Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Hep-2 Cell and Characteristics of the Cell in RSV Infection

Qian Liu^{1,2*}, Wenkuan Liu³, Aiping You³, Duo Xu³

¹Scientific Research Center, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

²Dongguan Institute of Pediatrics, Dongguan Children's Hospital, Dongguan Eighth People's Hospital, Dongguan Guangdong

³State Key Laboratory of Respiratory Diseases, National Clinical Research Center for Respiratory Disease, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Institute of Respiratory Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong

Email: *qianliu_ln@163.com

Received: Sep. 2nd, 2019; accepted: Sep. 13th, 2019; published: Sep. 20th, 2019

Abstract

Objective: To construct stable expressing respiratory syncytial virus M2-1 protein Hep-2 cells and analyze the characteristics of the cell in RSV infection. **Methods:** M2-1 eukaryotic expression plasmid was constructed and transfected into Hep-2 cells. The stable expression cell was screened by G418, identified by RT-PCR, qRT-PCR and Western blot. Cell proliferation was analyzed using MTT assay. The characteristics of Hep-2 and the constructed cell in RSV infection were analyzed by observing the state of the cells, the emergence of cytopathic effect (CPE), and the yield of RSV genomic RNA. **Results:** Hep-2 2F5 with stable expression respiratory syncytial virus M2-1 protein was obtained in this study. The growth rate of the cell is higher than that of the original Hep-2 cell. Hep-2 2F5 and Hep-2 were both infected with RSV with titer of 1000 - 10⁻² TCID₅₀ (E1 - E6). Under the titer of 1000 TCID₅₀ (E1), both cells developed CPE, but more obvious in Hep-2 2F5 cell; under the titer of 100 - 10 TCID₅₀ (E2 - E3), the CPE developed earlier and more obvious in Hep-2 2F5 than Hep-2; Under the titer of 1 - 0.1 TCID₅₀ (E4 - E5), Hep-2 2F5 cells developed a small amount of CPE, however, no CPE found in Hep-2. After 12 h infection at E1 - E4 titer, the mean value of RSV genome in Hep-2 2F5 cells was higher than that in Hep-2 cells, and no RSV virus nucleic acid was detected in both cells 12 h post infection with RSV at E5 - E6 titer. With prolongation of infection time, RSV genome content in Hep-2 was higher than that in Hep-2 2F5 under the titer of E1 - E2. Under the titer of E4 or higher, the proliferation of RSV in Hep-2 2F5 was better than in Hep-2. **Conclusion:** Hep-2 2F5 cell with stable expression respiratory syncytial virus M2-1 protein was successfully constructed. The cell is more sensitive in RSV infection, and in the case of low titer virus infection, the CPE developed earlier, and the viral nucleic acid content was higher comparing to Hep-2.

*通讯作者。

Keywords

Respiratory Syncytial Virus, M2-1 Protein, Stable Expression Cell, Infection Characteristics

呼吸道合胞病毒M2-1蛋白Hep-2细胞稳定表达株的构建及其在呼吸道合胞病毒感染中的特点

刘倩^{1,2*}, 刘文宽³, 游爱萍³, 许多³

¹广东药科大学附属第一医院, 科学研究中心, 广东 广州

²东莞市第八人民医院(东莞市儿童医院), 东莞市儿科研究所, 广东 东莞

³呼吸疾病国家重点实验室, 国家呼吸系统疾病临床医学研究中心, 广州医科大学, 广州呼吸健康研究院, 广州医科大学附属第一医院, 广东 广州

Email: *qianliu_ln@163.com

收稿日期: 2019年9月2日; 录用日期: 2019年9月13日; 发布日期: 2019年9月20日

摘要

目的: 构建稳定表达呼吸道合胞病毒(RSV) M2-1蛋白的Hep-2细胞, 并分析稳定表达细胞株RSV感染的特点。**方法:** 构建M2-1真核表达质粒, 转染至Hep-2细胞。通过G418筛选阳性单克隆; RT-PCR、qRT-PCR以及Western blot鉴定, 最终得到稳定表达株。通过MTT法分析细胞增殖特征; 通过分析不同浓度RSV病毒感染Hep-2细胞与所构建的稳定表达株细胞后在状态、细胞病变(CPE)出现时间以及RSV基因组核酸产量分析比较RSV在两种细胞中的感染特点。**结果:** 获得一株稳定表达M2-1蛋白的细胞Hep-2 2F5。该株细胞的生长速度高于原始细胞株。采用1000~10⁻² TCID₅₀ (E1~E6)的病毒滴度对Hep-2 2F5与Hep-2两种细胞进行感染发现, 1000 TCID₅₀ (E1)的滴度下, 两种细胞均产生病变, 但Hep-2 2F5细胞产生的病变更明显; 100~10 TCID₅₀ (E2~E3)滴度下RSV感染两种细胞, Hep-2 2F5细胞产生的病变更早且更明显; 1~0.1 TCID₅₀ (E4~E5)滴度下RSV感染两种细胞, Hep-2 2F5细胞产生少量病变, Hep-2则无明显病变。E1~E4滴度下攻毒12 h后, RSV在Hep-2 2F5细胞中的核酸定量平均值高于Hep-2细胞, E5~E6滴度下攻毒12 h两细胞均未检测到RSV病毒核酸; 随着时间延长, E1~E2滴度感染后的Hep-2中RSV含量高于Hep-2 2F5, 在E4滴度及以下, RSV在Hep-2 2F5中的增殖优于Hep-2。**结论:** 成功构建稳定表达M2-1蛋白的Hep-2 2F5细胞株。该细胞株在RSV感染中更具敏感性, 低滴度病毒感染的情况下, 更早产生CPE效应, 且病毒核酸的含量也较Hep-2高。

关键词

呼吸道合胞病毒, M2-1蛋白, 稳定表达细胞株, 感染特点

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)可在世界范围内引起婴幼儿、老年人、免疫受抑者严重的下呼吸道感染[1] [2], 且可造成院感爆发[3] [4], 具有较高的致病率和死亡率[5] [6]。

病毒分离培养是鉴定病毒感染的“金标准”, 同时针对病毒的防控预警、临床诊治、药物研发、疫苗研制等方面研究均需要分离培养的单克隆毒株, 然而分离培养效率低下严重制约了病毒性疾病的各项研究。

M2-1 由 RSV 基因组编码, 前期研究表明 M2-1 是一种重要的转录延长因子, 可提高转录效率, 增加全长 mRNA 产量, 且体外实验证实其对 RNA 序列没有特异性要求[6] [7]。本研究利用 Hep-2 细胞构建稳定表达 RSV M2-1 蛋白的细胞株, 以期获得在细胞增殖速度及 RSV 易感性高于原始细胞株的新细胞, 为 RSV 临床病毒样本的分离培养提供备选细胞株。

2. 材料与方方法

2.1. 病毒与细胞株

本研究中使用的 RSV Long 株(VR26)、人喉癌上皮细胞 Hep-2 (CCL-23)均为本研究室保存。

2.2. 主要试剂

本研究使用胎牛血清、RPMI 1640 培养基、0.25%胰酶-EDTA、PBS 均来自 Gibco 公司; G418 购自 sigma 公司; RT-PCR 相关试剂以及转染试剂 Lipofectamine 2000 购 Thermo Fisher Scientific 公司; 逆转录 PCR 试剂及荧光定量 PCR 检测试剂购自 TAKARA 公司; Taqman 荧光定量 PCR 试剂购自广州呼研所医药科技有限公司; M2-1 单克隆抗体购置 Abcam 公司; pcDNA3.1(+)载体由本研究室保存。

2.3. pcDNA3.1-M2-1 真核表达载体构建

本研究从 RSV Long 株中通过 RT-PCR 获得 M2-1 基因, 并通过 BamHI、XbaI 酶切、连接、测序鉴定等操作将其克隆至 pcDNA3.1(+) (5428 bp)质粒中获得 pcDNA3.1-M2-1 (5957 bp)。

正向引物: 5'-AAAGGATCCATGTCACGAAGGAATCCTTGCA-3'

反向引物: 5'-AAATCTAGATCAGGTAGTATCATTATTTTTGGCATG-3'

G418 耐受性分析

将细胞均匀铺到 24 孔板中(10^5 个细胞/孔), 细胞培养液为含终浓度 100、200、300、400、500、600、700、800、900 $\mu\text{g/ml}$ G418 的培养基, 于 37°C 5% CO_2 环境中培养 10~14 天, 以细胞全部死亡的最低浓度作为 G418 筛选浓度, 稳定细胞系维持浓度减半。

2.4. 稳定表达株筛选

将 pcDNA3.1-M2-1 载体转染至 Hep-2 细胞, G418 筛选 14 天, 得到抗性克隆。有限稀释法得到单细胞悬液, 继续使用 G418 筛选, 得到疑似阳性克隆。

2.5. 荧光 PCR 鉴定 M2-1 的转录情况

分别配制检测 Hep-2 2F5 和 Hep-2 RNA 的 RSV M2-1 和内参 GAPDH 的 mRNA 的 qRT-PCR 25 μl 反应体系, 使用下列引物序列及反应条件分析 M2-1 的转录情况。

反应条件如下: 42°C 5 min; 95°C 10 sec; 95°C 5 sec、 60°C 30 sec (读值)循环 40 个; 熔解 95°C 15 sec、 60°C 30 sec、 95°C 15 sec (读值)。

2.6. Western Blot 分析 M2-1 蛋白表达情况

培养 Hep-2 2F5 及 Hep-2 细胞(60 mm 培养皿)各一皿,使用 SDS 裂解液充分裂解细胞;充分裂解后,13000 rpm 离心 5 min,加入 6× SDS PAGE 上样缓冲液,100℃水浴 5 min,用于 SDS-PAGE 蛋白电泳;使用抗 RSV M2-1 单克隆抗体及抗 GAPDH 单克隆抗体进行 Hep-2F5 及 Hep-2 中 M2-1 (分子量约 22 KD)和内参 GAPDH (分子量约 36 KD)的蛋白表达检测。

2.7. MTT 分析细胞增殖情况

2×10^4 个细胞/孔接种 24 孔板,每天中午 12 时每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 100 μ l,37℃孵育 4 小时;吸去孔内培养基,加入 200 μ L DMSO,室温震荡裂解 10 分钟;取 50 μ l \times 3 加入 96 孔板,于 OD490 测定吸光值。

3. 结果

3.1. M2-1 稳定表达株 Hep-2 2F5 的建立

Hep-2 细胞经 G418 耐受性实验,获取其筛选浓度为 200 μ g/ml,稳定系维持所用的浓度则减半为 100 μ g/ml。pcDNA3.1-M2-1 真核表达载体经线性化转染至 Hep-2 细胞后,经过 G418 筛选后,初步得到 2F5 和 2C6 株;经 RT-PCR 筛选,得到 2F5 株较 2C6 株具有明显的 213 bp 目标条带(图 1),后续实验都使用 Hep-2F5 株进行。

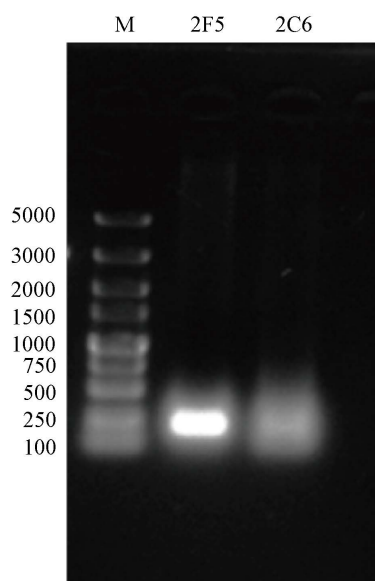


Figure 1. RT-PCR test for M2-1 gene expression of Hep-2 2F5
图 1. Hep-2 2F5 细胞 M2-1 基因表达 RT-PCR 检测

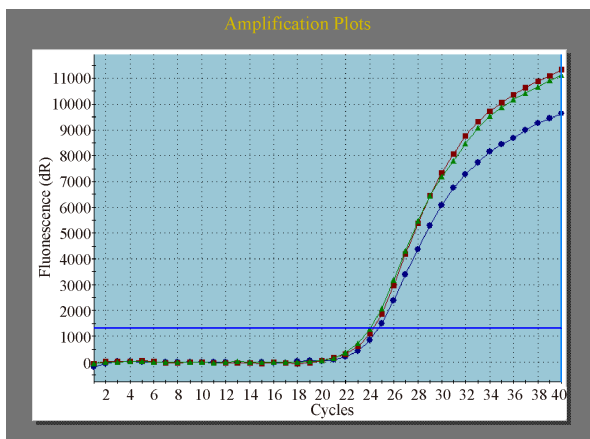
经过连续 20 代培养后,分别使用染料法 qRT-PCR (引物序列见表 1)和 Western blot 对 Hep-2 2F5 中的 M2-1 mRNA (图 2)和蛋白进行检测(图 3),证明 Hep-2 2F5 中稳定表达 M2-1,获得稳定细胞系。

3.2. Hep-2 2F5 细胞增殖速度高于 Hep-2 细胞

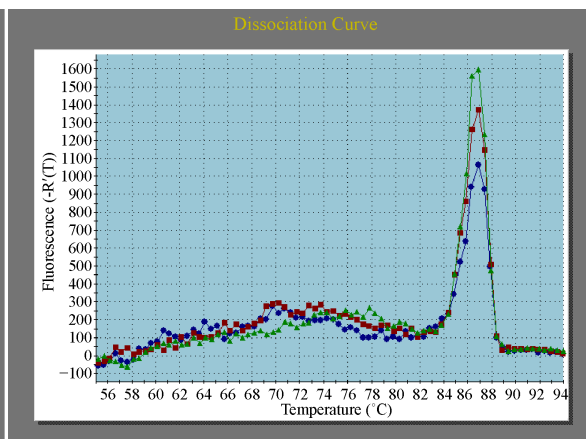
2×10^4 个细胞/孔接种 24 孔板,经过连续 6 天的培养,通过 MTT 法分析细胞的增殖情况,得到 Hep-2 2F5 细胞的生长曲线(图 4)。Hep-2 2F5 细胞的增殖速度高于 Hep-2 细胞。

Table 1. Primers for real-time PCR test
表 1. 荧光定量 PCR 检测引物序列

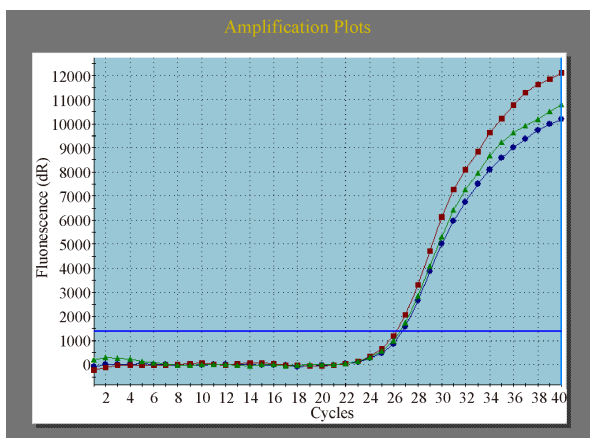
类别	引物	序列
M2-1	正向	5'-GCAGAGTTGGACAGAACAGAAGAGTAT-3'
	反向	5'-ACTATTGAGTTCAGTGAGGAGTTTGCT-3'
GAPDH	正向	5'-CGAGAGTCAGCCGCATTTTC-3'
	反向	5'-AGTAAAAAGCAGCCCTGGTGA-3'



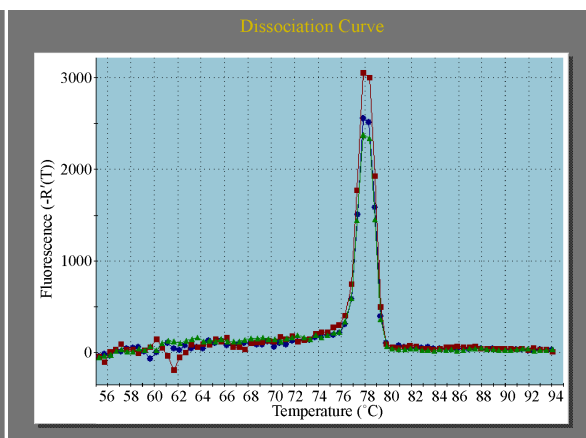
HEP2-2F5-GAPDH-扩增曲线



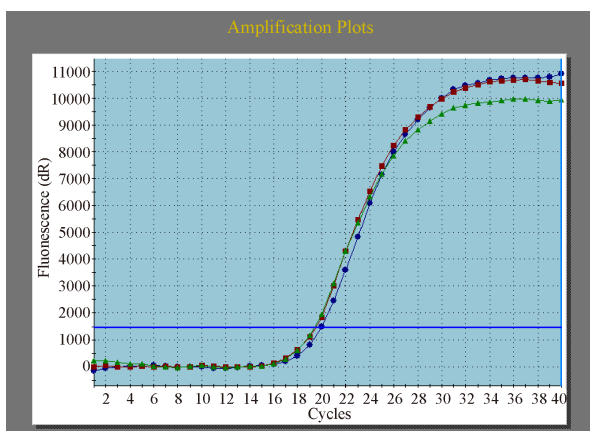
HEP2-2F5-GAPDH-熔解曲线



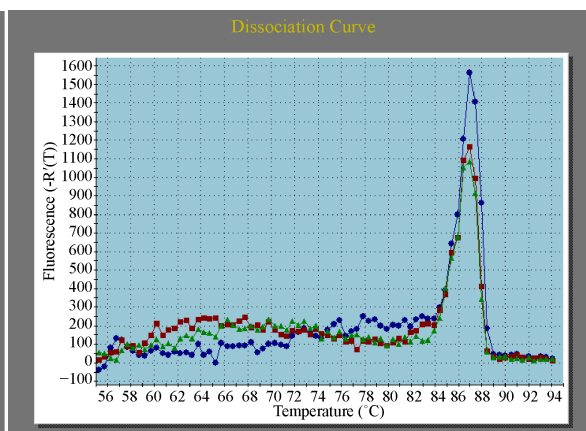
HEP2-2F5-M2-1-扩增曲线



HEP2-2F5-M2-1-熔解曲线



HEP2-GAPDH-扩增曲线



HEP2-GAPDH-熔解曲线

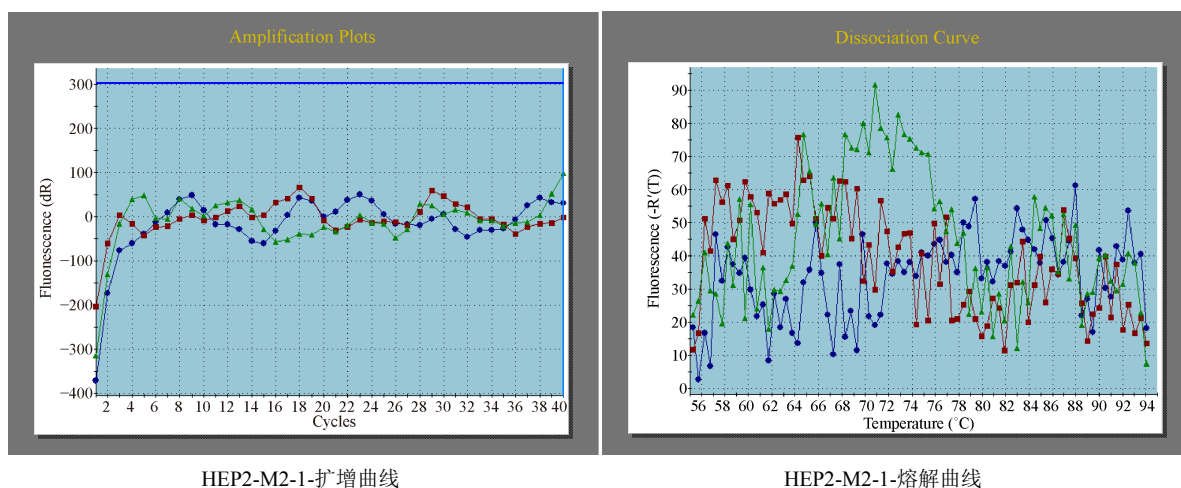


Figure 2. Real-time PCR test for M2-1 mRNA of Hep-2 2F5 cell
图 2. 荧光定量 PCR 检测 Hep-2 2F5 细胞表达的 M2-1 mRNA

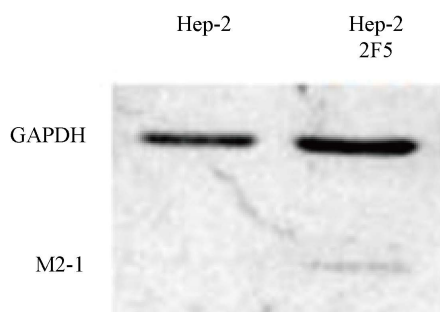


Figure 3. Western Blot test for M2-1 protein expression of Hep-2 2F5 cell
图 3. Western blot 检测 Hep-2 2F5 细胞表达的 M2-1 蛋白

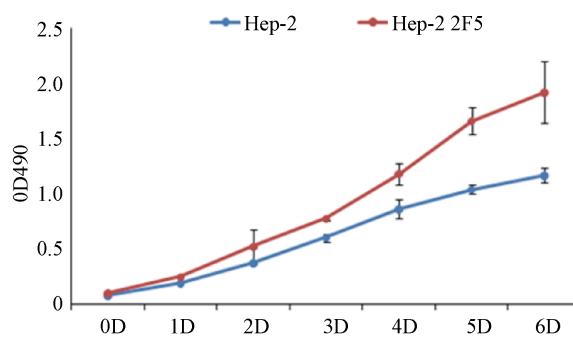


Figure 4. The growth curve of Hep-2 2F5 detected by MTT assay
图 4. MTT 法检测 Hep-2 2F5 生长曲线

3.3. Hep-2 2F5 感染 RSV 的特征分析

为了分析改造细胞对 RSV 感染与增殖特性，实验设计了使用从 1000 TCID₅₀ (E1) (RSV 核酸定量为 1.2×10^6 copies/ml) 到 10^{-2} TCID₅₀ (E6) 6 个梯度的病毒感染实验，时间分 0 h、12 h、1 天(1 D)、2 天、3 天、4 天、5 天。通过实验观察，细胞增殖方面在细胞培养 24 h 和 36 h 可见 Hep-2 2F5 要明显快于 Hep-2

(图 5), 而细胞在培养总时间至 5 天(4 D 接种病毒 + 24 h 贴壁时间)时产生气泡样的空泡, 并在第 6 天(5 D 接种病毒 + 24 h 贴壁时间)更明显(图 6)。

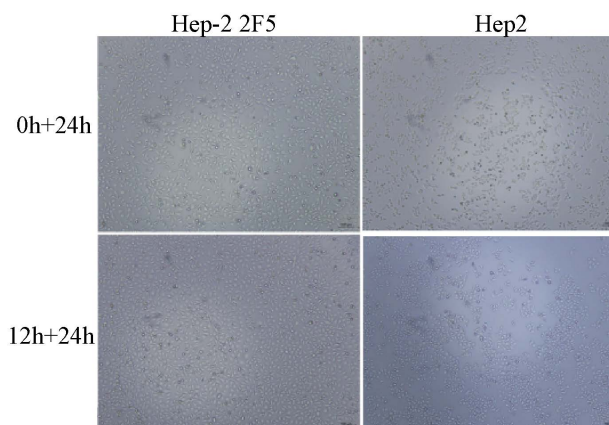


Figure 5. Culture Hep-2 2F5 and Hep-2 cell for 24 h and 36 h (Optical microscope, 200 \times)

图 5. Hep-2 2F5 与 Hep-2 培养 24 h、36 h 的细胞增殖。可见光镜下(200 \times)

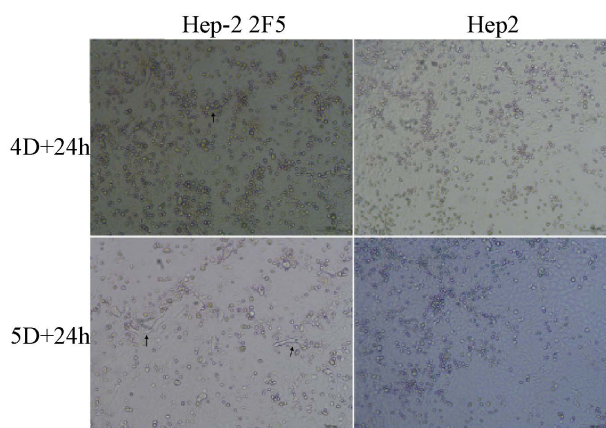


Figure 6. The vacuoles developed in Hep-2 2F5 cell after 5 and 6 days culture (Optical microscope, 200 \times)

图 6. Hep-2 2F5 培养 5 天和 6 天产生的空泡。可见光镜下(200 \times)

在感染 RSV 中, 1000 TCID₅₀ (E1) (RSV 核酸定量约 1.2×10^6 copies/ml) RSV 接种时, Hep-2 2F5 与 Hep-2 都能在 1 天内产生 CPE, 但前者 CPE 更加明显(图 7)。较低滴度下 RSV 感染两种细胞时, 攻毒两天时间后, Hep-2 2F5 产生 CPE 的时间比原始细胞早且明显(E2~E3), 而在 E4 及更低浓度下, Hep-2 未发现 CPE, 而 E5 下 Hep-2 2F5 仍可见少量 CPE (图 8)。

E1-E4 攻毒 12 h 后 RSV 在 Hep-2 2F5 和 Hep-2 两种细胞中的核酸定量平均值分别为 3.41×10^5 和 1.34×10^5 (E1) (图 9(a))、 4.91×10^4 和 1.27×10^4 (E2) (图 9(b))、 2.09×10^2 和 1.45×10^2 (E3) (图 9(c))、10 和 23 copies/ml (E4) (图 9(d)), E5~E6 在 12 h 未检测到 RSV 病毒核酸(图 9(e)、9(f))。随着时间延长, 高浓度 E1~E2 的 Hep-2 中 RSV 含量高于 Hep-2 2F5, 在 E4 及之后 RSV 在 Hep-2 2F5 中的增殖优于 Hep-2 (图 9)。通过对细胞中 RSV 核酸的定量, Hep-2 2F5 在 E1~E2 之间 RSV 含量低于 Hep-2; 在低浓度 E3-E6 中则总体高于 Hep-2 (图 9)。

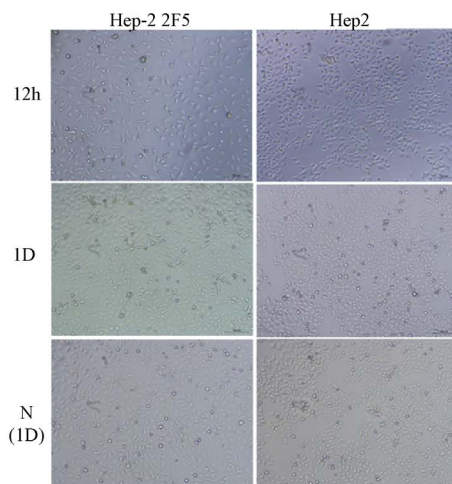


Figure 7. Development of CPE of Hep-2 2F5 and Hep-2 with RSV infection for 12 hours and 1 day under the titer of 1000 TCID₅₀ (Optical microscope, 200×), N: Hep-2 2F5 and Hep-2 cells without RSV infection

图 7. Hep-2 2F5 与 Hep-2 感染 1000 TCID₅₀ RSV 后 12 h 和 1 天的 CPE。可见光镜下(200×), N 为未加病毒的细胞对照

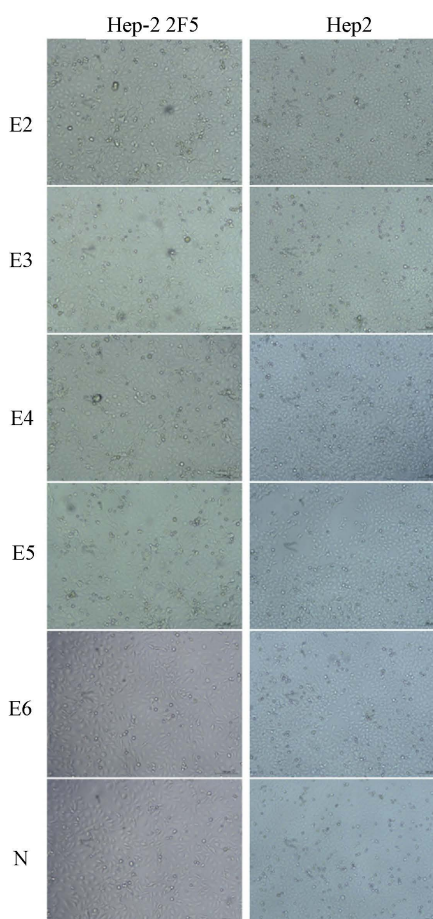


Figure 8. Development of CPE of Hep-2 2F5 and Hep-2 with RSV infection for 2 days under the titer of 100 TCID₅₀ (E2) to 10⁻² TCID₅₀ (E6) (Optical microscope, 200×), N: Hep-2 2F5 and Hep-2 cells without RSV infection

图 8. Hep-2 2F5 与 Hep-2 感染 100TCID₅₀ (E2)至 10⁻² TCID₅₀ (E6) RSV 后 2 天的 CPE。可见光镜下(200×), N 为未加病毒的细胞对照

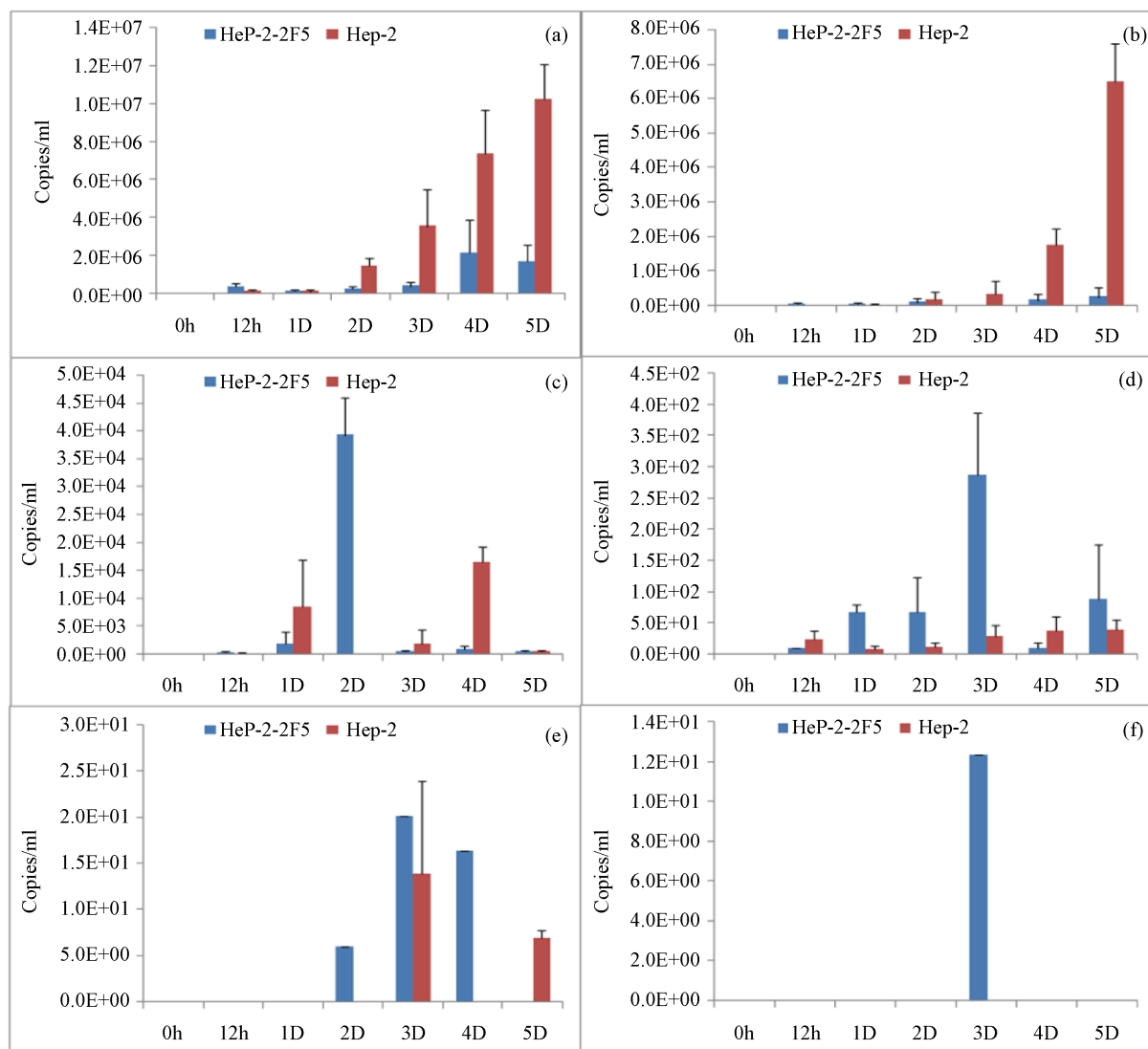


Figure 9. Detection of virus proliferation after Hep-2 2F5 infection with RSV virus by real-time PCR. (a)-(f): RSV nucleic acid content of cells with RSV infection for 0 to 5 days under the titer of 1000 TCID₅₀ (E1)~10⁻² TCID₅₀ (E6) titer testing with real-time PCR. *Only one sample detected in total three parallels

图 9. 荧光定量 PCR 检测 Hep-2 2F5 感染 RSV 病毒后病毒增殖情况。(a)-(f): 1000 TCID₅₀ (E1)~10⁻² TCID₅₀ (E6) 六个梯度 RSV 感染细胞 0~5 天后使用荧光定量 PCR 检测结果细胞中 RSV 核酸含量; *三个平行孔实验只一孔检出

4. 讨论

RSV 是一个世界范围内引起婴幼儿严重下呼吸道感染的最常见的病原体[1] [2], 全球每年有约四百万儿童受其感染, 具有较高的致病率和死亡率[3] [4] [5]。M2-1 蛋白是由 RSV 基因组 M2 基因的第一个开放阅读框编码, 全长 194aa [6] [7] [8]。M2-1 蛋白与核蛋白 N、磷酸化蛋白 P 和大聚合酶复合体 L 形成螺旋核衣壳结构与 RSV 基因组紧密结合[9] [10]。对于 M2-1, 以往的研究主要集中在转录调控方面。M2-1 蛋白与核蛋白 N、磷酸化蛋白 P 和大聚合酶复合体 L 形成螺旋核衣壳结构与 RSV 基因组紧密结合[10] [11] [12]。

M2-1 被命名为转录抗终止因子(transcription antitermination factor), 其抗终止作用主要体现在两个方面[8]: 1) M2-1 可以促进单顺反子全长 mRNA 的合成(intragenic antitermination)主要体现在 M2-1 存在的

情况下,长基因的转录产物全长 mRNA 的产量明显增加;2) M2-1 还可以促进多顺反子的通读(polycistronic readthrough), 其功能体现在 M2-1 存在的情况下, 帮助 RNA 聚合酶跳过转录终止点(Gene-End signal)继续转录。

我们利用 M2-1 蛋白在 RSV 基因组转录中的转录抗终止作用, 构建 M2-1 稳定表达的 Hep-2 细胞株 Hep-2 2F5。通过 RT-PCR 鉴定可确定 M2-1 的表达(图 1)。经过 20 代传代后, qRT-PCR 以及 Western blot 分析(图 2、图 3), M2-1 仍有较高的表达水平。通过显微镜观察以及细胞生长曲线的绘制, 发现 Hep-2 2F5 细胞的生长速率较 Hep-2 高(图 4、图 5)。通过病毒的灵敏性检测, 发现低 Hep-2 2F5 细胞比起原始细胞株 Hep-2 具有更高的灵敏性。较低滴度的病毒感染后, Hep-2 2F5 更早出现 CPE (图 7、图 8), 且 RSV 核酸含量高于 Hep-2, 但在高滴度病毒感染中, Hep-2 细胞中的病毒核酸量高于 Hep-2 2F5 (图 9)。

5. 小结

综上, 本研究团队成功构建稳定表达 M2-1 蛋白的 Hep-2 2F5 细胞株, 在用于 RSV 病毒培养中具有更高的灵敏度, 为 RSV 临床病毒样本的分离培养提供灵敏度更高的细胞株。

基金项目

本研究获得广东省科技计划项目(2016A020215001)、广东省自然科学基金纵向协同项目(2018A030310401)以及国家自然科学基金青年基金(31900877)的资助。

参考文献

- [1] Liu, W.K., Liu, Q., Chen, D.H., Liang, H.X., Chen, X.K., Chen, M.X., Qiu, S.Y., Yang, Z.Y. and Zhou, R. (2014) Epidemiology of Acute Respiratory Infections in Children in Guangzhou: A Three-Year Study. *PLoS One*, **9**, e96674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096674>
- [2] Ciarlito, C., Vittucci, A.C., Antilici, L., Concato, C., Di Camillo, C., Zangari, P. and Villani, A. (2019) Respiratory Syncytial Virus A and B: Three Bronchiolitis Seasons in a Third Level Hospital in Italy. *Italian Journal of Pediatrics*, **45**, 115. <https://doi.org/10.1186/s13052-019-0704-0>
- [3] Cervantes-Ortiz, S.L., Zamorano Cuervo, N. and Grandvaux, N. (2016) Respiratory Syncytial Virus and Cellular Stress Responses: Impact on Replication and Physiopathology. *Viruses*, **8**, 124. <https://doi.org/10.3390/v8050124>
- [4] Borchers, A.T., Chang, C., Gershwin, M.E. and Gershwin, L.J. (2013) Respiratory Syncytial Virus—A Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, **45**, 331-379. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8368-9>
- [5] 里奇曼. 临床病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [6] Collins, P.L., Fearn, R. and Graham, B.S. (2013) Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, 105 and Pathogenesis of Disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **372**, 3-38. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_1
- [7] Munday, D.C., Wu, W., Smith, N., Fix, J., Noton, S.L., Galloux, M., Touzelet, O., Armstrong, S.D., Dawson, J.M., Aljabr, W., et al. (2015) Interactome Analysis of the Human Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex Identifies Protein Chaperones as Important Cofactors That Promote Protein Stability and RNA Synthesis. *Journal of Virology*, **89**, 917-930. <https://doi.org/10.1128/JVI.01783-14>
- [8] Buchholz, U.J., Biacchesi, S., Pham, Q.N., Tran, K.C., Yang, L., Luongo, C.L., Skiadopoulos, H., Murphy, B.R. and Collins, P.L. (2005) Deletion of M2 Gene Open Reading Frames 1 and 2 of Human Metapneumovirus: Effects on RNA Synthesis, Attenuation, and Immunogenicity. *Journal of Virology*, **79**, 6588-6597. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6588-6597.2005>
- [9] Tran, T.L., Castagne, N., Dubosclard, V., Noinville, S., Koch, E., Moudjou, M., Henry, C., Ernard, J., Yeo, R.P. and Eleouet, J.F. (2009) The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner. *Journal of Virology*, **83**, 6363-6374. <https://doi.org/10.1128/JVI.00335-09>
- [10] Tanner, S.J., Ariza, A., Richard, C.A., Kyle, H.F., Dods, R.L., Blondot, M.L., Wu, W., Trincão, J., Trinh, C.H., Hiscox, J.A., et al. (2014) Crystal Structure of the Essential Transcription Antiterminator M2-1 Protein of Human Respiratory Syncytial Virus and Implications of Its Phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 1580-1585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317262111>

- [11] Muniyandi, S., Pangratiou, G., Edwards, T.A. and Barr, J.N. (2018) Structure and Function of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. *Subcellular Biochemistry*, **88**, 245-260. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0_11
- [12] Molina, I.G., Josts, I., Almeida Hernandez, Y., Esperante, S., Salgueiro, M., Garcia Alai, M.M., de Prat-Gay, G. and Tidow, H. (2018) Structure and Stability of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 RNA-Binding Core Domain Reveals a Compact and Cooperative Folding Unit. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, **74**, 23-30. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17017381>