



评述

应答流感病毒感染的宿主信号途径研究进展

代新宪^{①†}, 张丽姝^{①†*}, 洪涛^②

① 北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044;

② 中国疾病预防控制中心病毒病预防与控制研究所, 北京 100052

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: lshzhang@bjtu.edu.cn

收稿日期: 2010-09-10; 接受日期: 2010-09-16

国家自然科学基金(批准号: 30700696)资助项目

摘要 一系列广泛的宿主细胞信号转导通路可以被流感病毒感染激活. 一些信号转导通路引起宿主细胞的先天免疫应答来抵抗流感病毒, 而一些其他的信号转导通路却是流感病毒实现高效复制所必需的. 本文综述了宿主细胞中由流感病毒感染引起的胞内信号转导, 包括宿主模式识别受体(PRRs)相关信号, PKC, Raf/MEK/ERK 和 PI3K/Akt 信号, 同时对上述信号通路的下游具体效应进行了总结. 这些效应包括宿主细胞对流感病毒的识别, 流感病毒的吸附及入侵, 流感病毒核蛋白的输出, 病毒蛋白的翻译控制, 流感病毒引起的宿主细胞凋亡. 对流感病毒引起的细胞信号转导的研究有助于更加清晰地认识病毒与宿主的相互作用, 也是寻找新的抗病毒靶点和新的抗病毒策略的基础.

关键词流感病毒
病毒与宿主相互作用
信号转导
宿主模式识别受体
病毒增殖
翻译控制
细胞凋亡
磷脂酰肌醇-3-激酶信号通路

流感病毒每年造成大量的死亡和经济损失, 是公共健康的巨大挑战之一. 流感病毒是基因组高度变异的病毒, 快速变异的新毒株可以逃避机体针对已有毒株的免疫. 每年为应对季节性流感而制造的流感疫苗很难保证对当季流行的所有毒株均产生保护作用. 新发毒株(如 2009 年 H1N1 甲型流感病毒)的出现往往使人们手足无措. 在被流感病毒感染的细胞中, 在病毒复制的不同时期会激活一系列的细胞信号转导通路来应对病毒复制. 其中有的信号通路是免疫系统重要的抗病毒信号. 还有一些对于病毒的高效复制是必需的. 因此, 在这些细胞信号转导级联中可能存在合适的靶点作为抗病毒的新策略.

通常宿主细胞中由病毒感染引起的细胞信号所包含的分子可以分为 3 个层次: 细胞膜表面受体、细

胞浆中以激酶为主的信号转接分子及细胞核内的转录因子. 当宿主细胞被流感病毒感染时, 流感病毒的蛋白及核酸可以被细胞膜上或者细胞内特异性的受体识别并启动细胞内一系列的信号转导过程.

1 流感病毒组分识别与宿主先天免疫应答

1.1 依赖双链 RNA 的蛋白激酶(PKR)及下游信号

PKR 最初由于其磷酸化翻译起始因子 eIF2 的能力而被发现, 在控制细胞的生长和分化的过程中发挥作用^[1]. 它可以被干扰素、双链 RNA、细胞因子和外界压力激活. 因此, PKR 是一个应对类似病毒双链 RNA 等细胞压力的前哨激酶^[2]. 最近的研究表明, 乙型流感病毒的 NP 蛋白也可以激活 PKR, 并且引起抗

病毒反应^[3]。在病毒感染时, 激活的 PKR 磷酸化 eIF2, 并使细胞和病毒蛋白合成受到抑制^[4,5]。利用 PKR 功能缺失小鼠, Balachandran 等人^[6]证实 PKR 可通过辅助干扰素的产生而抑制流感病毒复制, 说明 PKR 是先天免疫的组成部分。PKR 在流感病毒诱导的细胞凋亡过程中也发挥了作用。流感病毒感染可以诱导 Fas 表达量的增加, 在细胞中转染催化结构域含有一个点突变的 PKR 抑制了流感病毒诱导的 Fas 表达上调, 并且增强了宿主细胞对病毒感染诱发的细胞凋亡的抵抗作用^[7]。在小鼠的成纤维细胞中过表达 PKR 使细胞对流感病毒诱发的细胞凋亡更加敏感。相应地, 表达 PKR 显性负突变(dominant negative)体的细胞可以完全抵抗由流感病毒诱发的细胞凋亡^[8]。为了逃避宿主的抗病毒效应, 甲型流感病毒的 NS1 蛋白可以与双链 RNA 结合或者直接与 PKR 结合以阻止 PKR 的活化^[9,10]。

1.2 Toll 样受体(TLRs)及下游信号

TLRs 是必需细胞膜糖蛋白, 在细胞浆内具有重要的同源结构域, 在早期宿主防御过程中对入侵病原发挥重要作用^[11]。目前的研究显示, 哺乳动物的 TLR 家族包含 11 个成员。在 TLR 家族中, TLR3/7/8 参与病毒性病原的识别并介导 I 型干扰素的产生^[12], 其中 TLR3 负责双链 RNA 的识别, 而 TLR7/8 负责单链 RNA 的识别。TLR 家族信号级联有数量众多的下游信号分子, 其中包括 MyD88, TRIF 等。通过这些下游信号分子, TLR 信号可以激活 NF- κ B 并调节 β 干扰素等基因的表达。激活的 TLR3 通过 TRIF 激活 β 干扰素信号通路使 I κ B 激酶 TBK-1 和 IKK ϵ 的表达量增加, 进而使 IRF-3 磷酸化并同时激活 IKK2 和 NF- κ B。而激活的 TLR7 则通过 MyD88 使 IRF-7 磷酸化^[13,14]。有证据表明, 在肺上皮细胞中, 流感病毒感染使 TLR3 表达上调, 并且 TLR/TRIF 信号通路对于由双链 RNA 和流感病毒感染引起的 NF- κ B 和 IRF/ISRE 的激活是必需的^[15]。流感病毒感染大大地增加了 p38, JNK 和 ERK1/2 的磷酸化, 并促进白细胞介素-8 和 RANTES 的表达量增加^[16]。此外, 多项研究也提示 MAPK 信号, 特别是 p38 和 JNK, 是抗流感先天免疫应答的一部分, 并且可以启动一些抗病毒和促炎性细胞因子基因的表达^[17-19]。近期研究发现, MAPK 激酶 RSK2 也在宿主细胞的抗病毒反应中发挥作用。RSK2 基因沉默增强了流感病毒聚合酶的活性, 并且使流感病毒增殖水平升高, 同时使 NF- κ B 和 β

干扰素依赖基因的启动子活性减弱^[20]。也有一些体内实验显示, 流感病毒感染上调了 TLR2 的表达水平, 但是其具体功能还不清楚^[21,22]。另外, TLR 信号可以被激活转录因子-3(ATF-3)负调控。使用半致死剂量的流感病毒 PR8 株感染 ATF-3 基因敲除小鼠, 与正常小鼠相比, ATF-3 基因敲除小鼠体重恢复明显受到影响, 并且在感染后 5 个月, ATF-3 基因敲除小鼠具有较高效价的流感病毒血清中和抗体^[23]。

1.3 维甲酸诱导基因 I 样受体(RLRs)及下游信号

RLRs 是另外一类主要的负责识别 RNA 病毒的受体系统。它由 3 个成员构成: RIG-I, MDA5 和 LGP2。RIG-I 和 MDA5 都是重要的细胞内病毒 RNA 感受器并且在抗病毒免疫应答中发挥重要作用。RIG-I 和 MDA5 分别识别不同的病毒 RNA, 在转接蛋白 MAVS 的辅助下, 它们诱导 IRF3/7 和 NF- κ B 激活并且启动干扰素的产生和促炎性细胞因子的分泌^[24-27]。在人肺上皮细胞中, RIG-I 被证实为由甲型流感病毒引起的抗病毒细胞因子表达的中心调节因子, 它可以同时介导 I 型干扰素依赖的抗病毒反应和促炎症反应^[28]。在甲型流感病毒感染的肺上皮细胞中过表达 RIG-I 和 MDA5 使 β 干扰素依赖基因转录显著增强, 而显性负突变(dominant negative)型的 RIG-I 则抑制了甲型流感病毒诱导的 β 干扰素依赖基因的转录^[29]。这些结果表明, RIG-I 和 MDA5 参与了甲型流感病毒诱导的宿主抗病毒免疫应答。 α 干扰素和肿瘤坏死因子 α 可以增强 TLR 和 RIG-I 等信号通路组分的表达, 并使抗病毒细胞因子的表达增强。

1.4 流感病毒非结构蛋白与先天免疫应答

流感病毒感染宿主细胞后, 引起干扰素基因表达等宿主免疫应答。同时流感病毒也进化出了逃避宿主免疫应答的策略。在该过程中, 流感病毒的非结构蛋白发挥重要作用。

NS1 是流感病毒最重要的一个非结构蛋白, 主要作用是抑制干扰素表达和影响干扰素诱导的下游效应^[30]。通常认为, NS1 通过与双链 RNA 结合以阻止 PRRs 对双链 RNA 的识别^[9,10,31]。但最近发现, NS1 更倾向与病毒单链 RNA 暴露的 5'三磷酸基团结合, 而这种暴露的 5'三磷酸可以被 PRRs 识别^[32]。据报道, 甲型流感病毒的 NS1 蛋白还可以直接与 RIG-I 结合而干扰病毒 RNA 的识别, 进而使 β 干扰素的合成受

到抑制^[33~35]. NS1 蛋白还可以特异性地抑制泛素连接酶 TRIM25 介导的 RIG-I 泛素化而抑制 RIG-I 通路的信号转导^[36]. 此外, 流感病毒的 NS1 蛋白还可以与 mRNA 转录、加工和翻译相关分子发生作用并抑制 I 型干扰素的产生^[37].

PB1-F2 蛋白是流感病毒另外一个重要的非结构蛋白. 目前的研究显示, PB1-F2 可以影响流感病毒诱导的细胞凋亡, 同时对于流感病毒的毒力有重要影响. 但是对于 PB1-F2 的具体功能特别是其分子机制还知之甚少. PB1-F2 蛋白定位于宿主细胞的线粒体内膜与外膜之间, 使宿主细胞对于流感病毒诱导的细胞凋亡更加敏感^[38]. 在单核细胞中, PKC 介导的 PB1-F2 磷酸化可以增强病毒感染诱导的细胞凋亡^[39]. 导致这种凋亡增强的原因可能是 PB1-F2 蛋白可以和线粒体膜蛋白 ANT3 和 VDAC1 发生作用, 在线粒体膜上形成孔状结构, 从而使细胞色素 C 通过该孔状结构释放^[40]. 在体内实验中, 已经证实 PB1-F2 蛋白对于流感病毒的毒力比较重要^[41,42]. PB1-F2 蛋白可以使发生感染的肺部细胞因子水平升高, 这可能是 PB1-F2 蛋白与 PB1 相互作用导致病毒聚合酶活性升高并使病毒 RNA 在细胞内大量堆积所致^[43].

2 蛋白激酶 C(PKC)与流感病毒入侵

PKCs 是一个可以被许多细胞内信号激活的丝氨酸/苏氨酸激酶家族, 已有实验证实, PKCs 参与了许多生理过程^[44]. 早期的研究证明, PKCs 对于包膜病毒受体介导的内吞作用是必需的^[45]. 当流感病毒感染细胞时, 病毒 HA 快速地激活 PKC^[46,47]. 使用 PKC 的特异抑制剂可以阻止病毒的内吞并抑制流感病毒的复制^[48]. 表达磷酸化缺失突变型 PKC 的细胞也出现了相似结果^[49]. 还有大量的证据表明, PKC 和钠离子运输之间存在密切联系^[47,50~52], 这个过程对于维持内吞体中的低 pH 环境非常重要. 以上结果提示, PKC 在流感病毒进入细胞的内吞过程中发挥重要作用.

3 Raf/MEK/ERK 信号通路与病毒 RNP 输出

ERK/MAPK 信号转导通路是多种细胞外信号从细胞表面传导到细胞内的重要传递者, 介导了细胞内的多种病理生理过程. 外界刺激通过 Raf/MEK/ERK

通路可对细胞代谢或细胞程序性死亡进行调节, 并由此影响细胞的分化和增殖^[53]. 病毒 RNP 的组装和输出是流感病毒的生活周期中十分重要的步骤. 流感病毒的 M1 蛋白和培养环境温度是影响病毒 RNP 组装和输出的重要因素^[54,55]. 流感病毒 HA 蛋白在细胞膜上堆积并且与细胞膜上脂筏结构紧密结合, 这样便激活了 PKC α , 并且引起 MAPK 信号的激活和流感病毒核蛋白的输出^[56]. 流感病毒 HA 在细胞膜上的堆积可以随着流感病毒聚合酶活性的增强而增加, 继而导致 MAPK 信号上调及更加高效的病毒 RNP 输出, 这样便保证了流感病毒的高效增殖^[57]. 不断增加的研究结果证实, Raf/MEK/ERK 信号对于流感病毒的增殖是必需的^[58,59]. 流感病毒感染导致 Raf/MEK/ERK 信号激活, 阻断 Raf 信号使流感病毒 RNP 在细胞核内滞留并抑制了流感病毒增殖^[59]. 可见, 流感病毒至少可以在两个层次来促进自身 RNP 的出核, 即通过 M1 蛋白促进 RNP 的装配并维持其稳定性, 并且同时激活相关信号通路来促进病毒 RNP 的出核.

4 流感病毒与蛋白表达调控

流感病毒感染宿主细胞后即可有效地抑制宿主蛋白合成. 首先流感病毒切割宿主前体 mRNA 形成引物以起始病毒基因转录, 同时选择性地翻译病毒 mRNA^[60,61]. 流感病毒 RNA 的 5'非翻译区序列列在这个过程中起关键作用^[62]. 流感病毒的 NS1 蛋白还可以通过转录后途径影响宿主前体 mRNA 的加工和剪接, 这样便导致宿主前体 mRNA 在细胞核内滞留而无法进入胞浆完成翻译过程^[63,64]. 有研究表明, 流感病毒的 NS1 蛋白通过提高病毒蛋白的翻译起始率来促进病毒 mRNA 的选择性翻译^[65~68], 该过程依赖于 NS1 蛋白与病毒 mRNA 的 5'端保守序列的结合能力. eIF4F 的亚基 eIF4GI 和 PABP1 都是 NS1 实现对蛋白翻译进行控制的靶分子^[69,70]. NS1 蛋白促使病毒 mRNA 的翻译起始效率上调, 是由于 NS1 将 eIF4F 特异地招募至病毒 mRNA 的 5'端非翻译区, 使翻译起始倾向于病毒 mRNA. 帽子结合蛋白 eIF4E 是真核翻译起始复合物 eIF4F 的一个组分, 在流感病毒感染导致的宿主蛋白翻译抑制过程中发挥重要作用, 这种调控作用可能不是在其阻遏蛋白 4E-BP-1 的参与下实现的^[71]. 另外, 在翻译水平, 流感病毒可以通过干扰素途径使 eIF2 α 磷酸化并且导致宿主蛋白翻译受

到抑制^[72,73]。

在流感病毒感染的各个时相, 不同病毒蛋白的表达效率不同。比如, 在感染早期 NP 和 NS1 大量合成, 而 HA, NA 及 M1 的合成则受到抑制^[74~76], 这可能反映出不同病毒蛋白在流感病毒生活周期中发挥的不同作用。但是这种调控的具体机制还不明确。

5 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路与流感病毒感染的关系

PI3K/Akt 信号通路是重要的促存活信号通路^[77,78], 也在其他广泛的生理过程中发挥作用。当 PI3K 被上游信号激活后, 可以催化细胞膜上的 PIP2 生成 PIP3, 而 PIP3 可以将胞浆中的 PDK-1 和 Akt 招募至细胞膜, 然后 PDK-1 完成对 Akt 的磷酸化, PI3K/Akt 信号通路则被激活^[79]。近期研究表明, 在急性和持续性感染中病毒可通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制病毒感染诱导的细胞凋亡以延长病毒复制时间^[80]。在被甲型流感病毒感染的细胞中, 流感病毒蛋白 NS1 可以直接与 PI3K 的 p85 β 调节亚基结合继而造成 PI3K 依赖的 Akt 磷酸化^[81~86]。Akt 可以直接磷酸化 caspase9 并抑制该凋亡蛋白酶的活化。另一个凋亡调控分子糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)也可以被 Akt 磷酸化并失活。Akt 信号通路的激活还可以通过 p53 依赖的方式保护细胞避免快速凋亡。在被甲型流感病毒感染的猴肾细胞 CV-1 和狗肾细胞 MDCK 中, 流感病毒感染早期, Akt 磷酸化, p53 的磷酸化及其在细胞核内的堆积持续在较低水平, 但是在病毒感染晚期(感染后 17~20 h), Akt 和 p53 的磷酸化都明显上升^[87]。近期有研究报道, 在流感病毒感染的细胞中, PI3K/Akt 信号通路通过 ASK1 来负调控 JNK 信号, 继而抑制了 JNK 依赖的由 Bax 介导的宿主细胞凋亡^[88]。

PI3K/Akt 信号通路除了可以通过抑制宿主细胞凋亡以支持病毒高效复制, 似乎还通过其他方式影响甲型流感病毒的感染增殖^[80,89]。在发现甲型流感病毒的 NS1 蛋白可以激活 PI3K/Akt 信号通路之前, 就有报道称 PI3K 可以被病毒的双链 RNA 激活并导致转录因子 IRF-3 的激活^[90]。阻断 PI3K 信号通路抑制了 IRF-3 的二聚化, 同时也降低了依赖于 IRF-3 的基因启动子的活性。另外, PI3K 似乎还参与调节了病毒入侵的极早期步骤。在 A549 细胞中, PI3K/Akt 信

号通路以一种不依赖流感病毒吸附和内吞的方式激活, 使用 PI3K 特异抑制剂可以显著地抑制病毒 RNA 的合成和病毒蛋白的表达^[91]。因为 PI3K/Akt 信号通路里包括许多与细胞存活、增殖、分化、侵袭和凋亡相关的下游信号分子, 所以阻断 PI3K/Akt 信号通路造成的流感病毒复制抑制可能是各种因素的综合作用, 进一步集中于该信号通路下游分子的研究是有必要的。

6 病毒与宿主相互作用的复杂性

流感病毒感染引起的宿主信号转导是一个非常复杂的网络(图 1), 并且一些信号分子在应对流感病毒感染时可能发挥多重作用, 单纯确定一个信号分子是促进还是抑制流感病毒的增殖十分困难。NF- κ B 通常被认为是一个影响 I 型干扰素和其他抗病毒细胞因子分泌的关键转录因子^[6,15,92~96], 但是它的适度激活却是流感病毒感染的先决条件^[97]。根据报道, NF- κ B 信号通路可以调节流感病毒 RNA 的合成, 敲除 p65 降低了流感病毒的复制水平并抑制了病毒 RNA 的合成^[98]。更令人惊讶的是, NF- κ B 依赖的 TRAIL 和 Fas/FasL 的表达对于流感病毒的高效复制是必需的^[99]。另外, 病毒 RNA 识别受体 RIG-I 对于抗病毒细胞因子的产生非常重要^[29,100~102], 却也参与了由 SOCS1 和 SOCS3 介导的对先天免疫应答的负调控^[103]。而且, RIG-I/MAVS 信号通路还可以激活 caspase3, 提示 RIG-I 具有在先天免疫应答调控之外的作用^[104]。

7 讨论

流感病毒是一种在广泛人群中广泛传播的具有严重危害的病毒。由于流感病毒基因组的高度变异, 用于季节性流感疫苗的研发费用越来越高。一些流感病毒的变异毒株对于常规的抗流感制剂产生抗性。近年, 高致病性禽流感病毒和 H1N1 甲型流感病毒等变异毒株成为人们面临的新问题。在被流感病毒感染的宿主细胞中, 病毒激活的信号通路有两个主要功能: 介导宿主自身的抗病毒反应或支持流感病毒在宿主细胞内的有效复制。在宿主抗病毒反应信号通路中, PRRs 介导的病毒 RNA 的识别及其下游信号

发挥最关键的作用. 这个过程使一系列的激酶活化和一些重要的转录因子活化并激活抗病毒基因的表达, 其中包括干扰素和其他众多细胞因子. 除了病毒 RNA 之外, 一些病毒的结构蛋白也可以通过抗病毒信号通路来激活先天免疫应答. 另一方面, 流感病毒可以利用宿主细胞的信号转导为自身的高效增殖服务. 这种现象几乎发生在病毒生活周期的各个阶段. 例如, 激活的 PKC 对流感病毒的入侵十分重要, Raf-MEK-ERK 信号通路对于病毒 RNP 的输出也是必需的. 流感病毒的 NS1 蛋白激活若干信号通路保证自身的高效复制, 这其中包括压制宿主先天免疫应答, 提高病毒 mRNA 合成, 增加病毒蛋白表达和调节宿主细胞的凋亡等.

研究流感病毒引起的细胞信号转导过程中一个重要的问题, 是在研究过程中通常使用肿瘤或永生

化细胞系作为研究对象. 由于细胞内部的生理生化性质已经发生改变, 可能导致体外研究和动物实验的结果不一致. 流感病毒激起的宿主细胞信号转导非常复杂, 许多信号分子在不同的条件下发挥的作用不同, 并且信号通路间还可能产生交叉影响, 按照信号通路或对单个分子进行研究难以在整体上把握流感病毒与宿主的相互作用, 引入基于基因组、转录组、蛋白质组及生物信息学的系统性研究方法可能有助于从总体上解读流感病毒的感染过程. 最近有研究组使用大规模的 RNAi 筛选的策略对影响甲型流感病毒的宿主基因进行筛查, 取得了一些新发现^[105,106]. 现有的研究结果在帮助人们理解流感病毒与宿主间的相互作用的同时, 提供了潜在的治疗靶点. 将来更多信号通路的细节会被阐明, 并且新的信号分子和新的信号通路可能被发现.

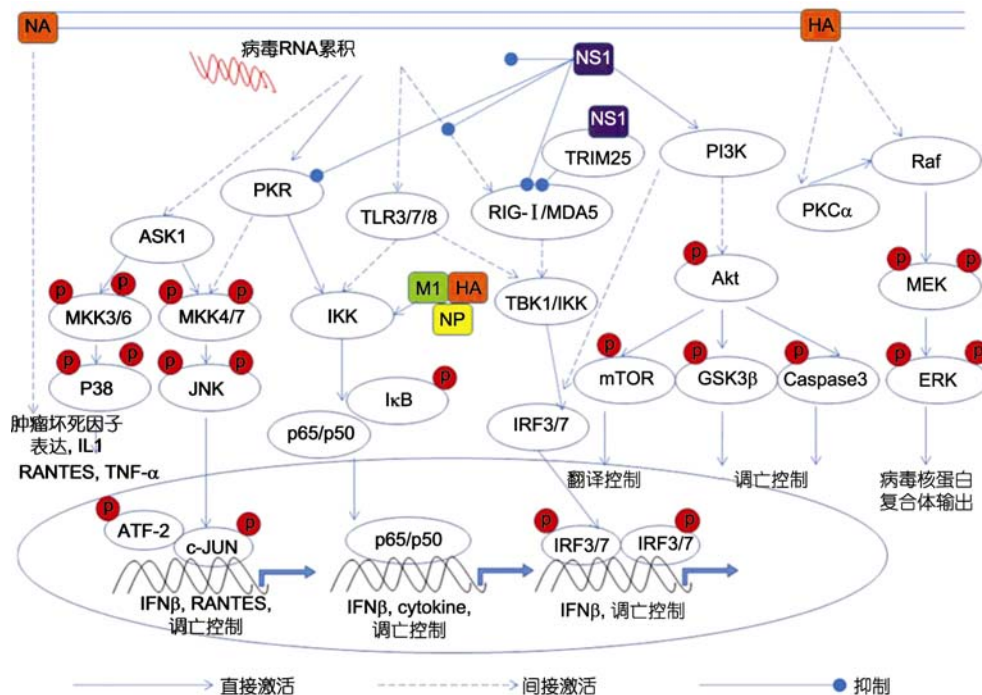


图 1 流感病毒诱导的宿主细胞信号转导

Akt: 蛋白激酶 B(PKB); ATF: 激活转录因子; ASK: 凋亡信号调节激酶; ERK: 细胞外信号调节激酶; GSK3β: 糖原合成激酶 3β; HA: 血凝素; IFN: 干扰素; IκB: κB 抑制蛋白; IRF: 干扰素调节因子; JNK: c-Jun 氨基端激酶; M1: 流感病毒基质蛋白 1; MDA5: 黑色素瘤分化相关抗原 5; MKK: 丝裂原蛋白活化激酶激酶; mTOR: 雷帕霉素靶蛋白; NA: 神经氨酸酶; NP: 核蛋白; NS1: 非结构蛋白 1; PI3K: 磷脂酰肌醇-3-激酶; PKC: 蛋白激酶 C; PKR: 蛋白激酶 R; Raf: Raf 激酶; RIG-I: 维甲酸诱导基因-I; TBK: TANK 结合激酶; TLR: Toll 样受体; TNF: 肿瘤坏死因子; TRIM: Tripartite 结构域

参考文献

- 1 Proud C G. PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20: 241—246
- 2 Williams B R. PKR: a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, 1999, 18: 6112—6120
- 3 Dauber B, Martinez-Sobrido L, Schneider J, et al. Influenza B virus ribonucleoprotein is a potent activator of the antiviral kinase PKR. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000473
- 4 Balachandran S, Barber G N. PKR in innate immunity, cancer, and viral oncolysis. *Methods Mol Biol*, 2007, 383: 277—301
- 5 Garcia M A, Meurs E F, Esteban M. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie*, 2007, 89: 799—811
- 6 Balachandran S, Roberts P C, Brown L E, et al. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity*, 2000, 13: 129—141
- 7 Takizawa T, Ohashi K, Nakanishi Y. Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection. *J Virol*, 1996, 70: 8128—8132
- 8 Balachandran S, Roberts P C, Kipperman T, et al. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol*, 2000, 74: 1513—1523
- 9 Li S, Min J Y, Krug R M, et al. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology*, 2006, 349: 13—21
- 10 Lu Y, Wambach M, Katze M G, et al. 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*, 1995, 214: 222—228
- 11 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 335—376
- 12 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4: 499—511
- 13 Diebold S S, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 2004, 303: 1529—1531
- 14 Lund J M, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 5598—5603
- 15 Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem*, 2005, 280: 5571—5580
- 16 Kujime K, Hashimoto S, Gon Y, et al. p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 2000, 164: 3222—3228
- 17 Lee D C, Cheung C Y, Law A H, et al. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1. *J Virol*, 2005, 79: 10147—10154
- 18 Maruoka S, Hashimoto S, Gon Y, et al. ASK1 regulates influenza virus infection-induced apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307: 870—876
- 19 Mizumura K, Hashimoto S, Maruoka S, et al. Role of mitogen-activated protein kinases in influenza virus induction of prostaglandin E2 from arachidonic acid in bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33: 1244—1251
- 20 Kakugawa S, Shimojima M, Goto H, et al. The MAPK-activated kinase RSK2 plays a role in innate immune responses to influenza virus infection. *J Virol*, 2009, 83: 2510—2517
- 21 Kajiya T, Orihara K, Hamasaki S, et al. Toll-like receptor 2 expression level on monocytes in patients with viral infections: monitoring infection severity. *J Infect*, 2008, 57: 249—259
- 22 Lee R M, White M R, Hartshorn K L. Influenza A viruses upregulate neutrophil toll-like receptor 2 expression and function. *Scand J Immunol*, 2006, 63: 81—89
- 23 Whitmore M M, Iparraguirre A, Kubelka L, et al. Negative regulation of TLR-signaling pathways by activating transcription factor-3. *J Immunol*, 2007, 179: 3622—3630
- 24 Barral P M, Sarkar D, Su Z Z, et al. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther*, 2009, 124: 219—234
- 25 Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20: 17—22
- 26 Yoneyama M, Fujita T. RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth FR*, 18: 545—551
- 27 Fujita T, Onoguchi K, Onomoto K, et al. Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie*, 89: 754—760
- 28 Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, et al. Cutting edge: influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol*, 2007, 178: 3368—3372

- 29 Matikainen S, Siren J, Tissari J, et al. Tumor necrosis factor alpha enhances influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression. *J Virol*, 2006, 80: 3515—3522
- 30 Hale B G, Randall R E, Ortin J, et al. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*, 2008, 89: 2359—2376
- 31 Talon J, Horvath C M, Polley R, et al. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol*, 2000, 74: 7989—7996
- 32 Ehrhardt C, Seyer R, Hrincius E R, et al. Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect*, 2010, 12: 81—87
- 33 Guo Z, Chen L M, Zeng H, et al. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36: 263—269
- 34 Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo Y M, et al. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, 2007, 81: 514—524
- 35 Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, et al. IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol*, 2007, 9: 930—938
- 36 Gack M U, Albrecht R A, Urano T, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*, 2009, 5: 439—449
- 37 Nemeroff M E, Barabino S M L, Li Y, et al. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular Cell*, 1998, 1: 991—1000
- 38 Conenello G M, Palese P. Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch. *Cell Host Microbe*, 2007, 2: 207—209
- 39 Mitzner D, Dudek S E, Studtucker N, et al. Phosphorylation of the influenza A virus protein PB1-F2 by PKC is crucial for apoptosis promoting functions in monocytes. *Cell Microbiol*, 2009, 11: 1502—1516
- 40 Zamarin D, García-Sastre A, Xiao X, et al. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog*, 2005, 1: e4
- 41 Zamarin D, Ortigoza M B, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol*, 2006, 80: 7976—7983
- 42 McAuley J L, Hornung F, Boyd K L, et al. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe*, 2007, 2: 240—249
- 43 Mazur I, Wurzer W J, Ehrhardt C, et al. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF- κ B-inhibiting activity. *Cell Microbiol*, 2007, 9: 1683—1694
- 44 Toker A. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci*, 1998, 3: D1134—1147
- 45 Constantinescu S N, Cernescu C D, Popescu L M. Effects of protein kinase C inhibitors on viral entry and infectivity. *FEBS Lett*, 1991, 292: 31—33
- 46 Arora D J, Gasse N. Influenza virus hemagglutinin stimulates the protein kinase C activity of human polymorphonuclear leucocytes. *Arch Virol*, 1998, 143: 2029—2037
- 47 Kunzelmann K, Beesley A H, King N J, et al. Influenza virus inhibits amiloride-sensitive Na^+ channels in respiratory epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 10282—10287
- 48 Root C N, Wills E G, McNair L L, et al. Entry of influenza viruses into cells is inhibited by a highly specific protein kinase C inhibitor. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2697—2705
- 49 Sieczkarski S B, Brown H A, Whittaker G R. Role of protein kinase C betaII in influenza virus entry via late endosomes. *J Virol*, 2003, 77: 460—469
- 50 Hoffmann H H, Palese P, Shaw M L. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. *Antiviral Res*, 2008, 80: 124—134
- 51 Lazrak A, Iles K E, Liu G, et al. Influenza virus M2 protein inhibits epithelial sodium channels by increasing reactive oxygen species. *FASEB J*, 2009, 23: 3829—3842
- 52 Sieczkarski S B, Whittaker G R. Characterization of the host cell entry of filamentous influenza virus. *Arch Virol*, 2005, 150: 1783—1796
- 53 Pleschka S. RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biol Chem*, 2008, 389: 1273—1282
- 54 Huang X, Liu T, Muller J, et al. Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology*, 2001, 287: 405—416
- 55 Sakaguchi A, Hirayama E, Hiraki A, et al. Nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein is temperature-dependently inhibited by dissociation of viral matrix protein. *Virology*, 2003, 306: 244—253

- 56 Marjuki H, Alam M I, Ehrhardt C, et al. Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase Calpha-mediated activation of ERK signaling. *J Biol Chem*, 2006, 281: 16707—16715
- 57 Marjuki H, Yen H L, Franks J, et al. Higher polymerase activity of a human influenza virus enhances activation of the hemagglutinin-induced Raf/MEK/ERK signal cascade. *Viol J*, 2007, 4: 134
- 58 Ludwig S, Wolff T, Ehrhardt C, et al. MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS Letters*, 2004, 561: 37—43
- 59 Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, et al. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 301—305
- 60 Beaton A R, Krug R M. Selected host cell capped RNA fragments prime influenza viral RNA transcription *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9: 4423—4436
- 61 Krug R M. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1981, 93: 125—149
- 62 Garfinkel M S, Katze M G. Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J Biol Chem*, 1993, 268: 22223—22226
- 63 Chen Z, Li Y, Krug R M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3[prime]-end processing machinery. *EMBO J*, 1999, 18: 2273—2283
- 64 Lu Y, Qian X Y, Krug R M. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Gene Dev*, 1994, 8: 1817—1828
- 65 De La Luna S, Fortes P, Beloso A, et al. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol*, 1995, 69: 2427—2433
- 66 Enami K, Sato T A, Nakada S, et al. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol*, 1994, 68: 1432—1437
- 67 Katze M G, Decorato D, Krug R M. Cellular mRNA translation is blocked at both initiation and elongation after infection by influenza virus or adenovirus. *J Virol*, 1986, 60: 1027—1039
- 68 Park Y W, Katze M G. Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem*, 1995, 270: 28433—28439
- 69 Aragon T, De La Luna S, Novoa I, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 6259—6268
- 70 Burgui I, Aragon T, Ortin J, et al. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol*, 2003, 84: 3263—3274
- 71 Beretta L, Gingras A C, Svitkin Y V, et al. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J*, 1996, 15: 658—664
- 72 Katze M G. Regulation of the interferon-induced PKR: can viruses cope? *Trends Microbiol*, 1995, 3: 75—78
- 73 Goodman A G, Smith J A, Balachandran S, et al. The cellular protein P58IPK regulates influenza virus mRNA translation and replication through a PKR-mediated mechanism. *J Virol*, 2007, 81: 2221—2230
- 74 Hatada E, Hasegawa M, Mukaigawa J, et al. Control of influenza virus gene expression: quantitative analysis of each viral RNA species in infected cells. *J Biochem*, 1989, 105: 537—546
- 75 Shapiro G I, Gurney T Jr, Krug R M. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol*, 1987, 61: 764—773
- 76 Smith G L, Hay A J. Replication of the influenza virus genome. *Virology*, 1982, 118: 96—108
- 77 Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J*, 2008, 415: 333—344
- 78 Franke T F, Hornik C P, Segev L, et al. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, 2003, 22: 8983—8998
- 79 Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 489—501
- 80 Ji W T, Liu H J. PI3K-Akt signaling and viral infection. *Recent Pat Biotechnol*, 2008, 2: 218—226
- 81 Hale B G, Batty I H, Downes C P, et al. Binding of influenza A virus NS1 protein to the inter-SH2 domain of p85 suggests a novel mechanism for phosphoinositide 3-kinase activation. *J Biol Chem*, 2008, 283: 1372—1380
- 82 Hale B G, Jackson D, Chen Y H, et al. Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 14194—14199
- 83 Hale B G, Randall R E. PI3K signalling during influenza A virus infections. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35: 186—187
- 84 Li Y, Anderson D H, Liu Q, et al. Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85beta, but not the p85alpha, subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity. *J Biol Chem*, 2008, 283: 23397—23409
- 85 Shin Y K, Li Y, Liu Q, et al. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation. *J*

- Viol, 2007, 81: 12730—12739
- 86 Shin Y K, Liu Q, Tikoo S K, et al. 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*, 2007, 88: 13—18
- 87 Zhirnov O P, Klenk H D. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis*, 2007, 12: 1419—1432
- 88 Lu X, Masic A, Li Y, et al. The PI3K/Akt pathway inhibits influenza A virus-induced Bax-mediated apoptosis by negatively regulating the JNK pathway via ASK1. *J Gen Virol*, 91: 1439—1449
- 89 Ehrhardt C, Ludwig S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Microbiol*, 2009, 11: 863—871
- 90 Ehrhardt C, Marjuki H, Wolff T, et al. Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol*, 2006, 8: 1336—1348
- 91 Shin Y K, Liu Q, Tikoo S K, et al. Effect of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on influenza A virus propagation. *J Gen Virol*, 2007, 88: 942—950
- 92 Flory E, Kunz M, Scheller C, et al. Influenza virus-induced NF-kappaB-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase. *J Biol Chem*, 2000, 275: 8307—8314
- 93 Gern J E, French D A, Grindle K A, et al. Double-stranded RNA induces the synthesis of specific chemokines by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28: 731—737
- 94 Pahl H L, Baeuerle P A. Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B. *J Virol*, 1995, 69: 1480—1484
- 95 Severa M, Fitzgerald K A. TLR-mediated activation of type I IFN during antiviral immune responses: fighting the battle to win the war. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007, 316: 167—192
- 96 Tenover B R, Ng S L, Chua M A, et al. Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science*, 2007, 315: 1274—1278
- 97 Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, et al. Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *J Gen Virol*, 2004, 85: 2347—2356
- 98 Kumar N, Xin Z T, Liang Y, et al. NF-kappaB signaling differentially regulates influenza virus RNA synthesis. *J Virol*, 2008, 82: 9880—9889
- 99 Wurzer W J, Ehrhardt C, Pleschka S, et al. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem*, 2004, 279: 30931—30937
- 100 Berghäll H, Sirén J, Sarkar D, et al. The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect*, 2006, 8: 2138—2144
- 101 Liu P, Jamaluddin M, Li K, et al. Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *J Virol*, 2007, 81: 1401—1411
- 102 Thompson A J, Locarnini S A. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85: 435—445
- 103 Pothlichet J, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway. *J Immunol*, 2008, 180: 2034—2038
- 104 Rintahaka J, Wiik D, Kovanen P E, et al. Cytosolic antiviral RNA recognition pathway activates caspases 1 and 3. *J Immunol*, 2008, 180: 1749—1757
- 105 Karlas A, Machuy N, Shin Y, et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, 2010, 463: 818—822
- 106 König R, Stertz S, Zhou Y, et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*, 2010, 463: 813—817