

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Klára Vochyánová

Interakce chřipkového viru s buněčnými obrannými mechanismy

Interaction of Influenza virus with cell defence mechanisms

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Alena Morávková, PhD.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5.5.2011

Podpis

Poděkování: Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce RNDr. Aleně Morávkové, PhD. za cenné rady, pečlivé korektury, trpělivost při čtení a celkovou pomoc při psaní práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Radku Neumitkovi za pomoc s úpravou obrázků.

Obsah:

Seznam použitých zkratek.....	Str.4
Abstrakt.....	Str.6
Úvod.....	Str.7
1. Biologie chřipkového viru.....	Str.8
2. NS1 ovlivňuje signální dráhy vedoucí k aktivaci imunitní odpovědi.....	Str.10
2.1. NS1 je antagonist interferonu.....	Str.10
2.2. NS1 ovlivňuje PI3K/Akt dráhu.....	Str.15
2.3. NS1 ovlivňuje aktivaci PKR kinázy.....	Str.16
2.3.1. Aktivace PKR dsRNA.....	Str.18
2.3.2. Aktivace PKR PACT dráhou.....	Str.19
2.3.3. Inhibice PKR proteinem NS1.....	Str.19
2.4. NS1 ovlivňuje dráhu 2'-5' oligoadenylátsyntetázy/Rnázy L.....	Str.20
2.5. NS1 inhibuje maturaci dendritických buněk.....	Str.21
3. NS1 ovlivňuje RNA interferenci.....	Str.23
4. NS1 ovlivňuje procesování pre-mRNA a export mRNA z jádra.....	Str.25
4.1. Inhibice sestřihu a procesování hostitelských mRNA.....	Str.26
4.2. Inhibice exportu z jádra.....	Str.27
4.3. Inhibice translace.....	Str.28
4.4. Exkluzivní exprese virových proteinů.....	Str.29
Závěr.....	Str.30
Seznam literatury.....	Str.31

Seznam použitých zkratk:

2'-5' OAS	2'-5' oligoadenylát syntetáza
CARD	kaspázová aktivační doména
CPSF	specifický štěpící a polyadenylující faktor
CTD	terminální karboxy doména
dsRBM	dsRNA vazebný motiv
dsRNA	dvouřetězcová RNA
eiF2(4)	eukaryotický iniciační translační faktor 2 (4)
IFN	interferon
IFNAR	interferon- α/β receptor
I κ B	inhibitor NF κ B
IKK	kináza I κ B
IRF	interferon regulatory factor
ISGF3	interferonem stimulovaný genový faktor 3
ISRE	interferonem stimulovaný element
JAK/STAT	Janus kináza/ signální přenašeč a aktivátor transkripce
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MAVS	mitochondriální anti-virové signální proteiny
MHC II	hlavní histokompatibilní komplex II
miRNA	mikro RNA
NF κ B	jaderný transkripční faktor vázající se na promotory RNA polymerázy II
NS1	nestruturní protein 1
NXF1	jaderný faktor pro export RNA
PAB II	poly(A)-vazebný protein II
PACT	p53 asociovaný buněčný protein
PERK	PKR-endoplazmatické retikulum příbuzná kináza
PIP ₂	fosfatidyl-inositol-4,5-bisfosfát

PIP ₃	fosfatidyl-inositol-3,4,5-trisfosfát
PI3k	fosfatidyl-inositol 3 kináza
PKR	protein kináza R
pre-mRNA	prekurzor mRNA
PRD	pozitivně regulační doména
RdRp	RNA dependentní RNA polymeráza
RIG-I	retinovou kyselinou indukovaný gen I
RISC	silencing komplex indukovaný RNA
RNAi	RNA interference
RPN	ribonukleoprotein
RSAR	antivirová odpověď založená na RNA-silencingu
siRNA	malé interferující RNA
snRNA	malé jaderné RNA
ssRNA	jednořetězcová RNA
TLR	Toll-podobné receptory
UBE1	ubikvitin aktivující enzym
UPR	odpověď při nesložení proteinů
UTR	nepřekládaná oblast

Abstrakt:

Infekce chřipkovým virem patří mezi nejaktuálnější problémy dnešní doby. Unikátní schopnost tohoto viru silně inhibovat imunitní odpověď buněk na mnoha úrovních a jeho pandemický potenciál z něj činí předmět zájmu mnoha vědeckých skupin. Chřipkový virus používá k inhibici imunitní odpovědi především protein NS1. Protein NS1 je jednak schopen vázat se na RNA, a maskovat jí před rozpoznáním buněčnými senzory a dalšími proteiny. Protein NS1 obsahuje také katalytickou doménu. Pomocí této domény interaguje s mnoha buněčnými proteiny, zasahuje do signální transdukce a zajišťuje tak úspěch celé infekce. Protein NS1 je jedním z hlavních nástrojů patogenicity chřipkového viru a zaslouží si patřičnou pozornost.

Abstract:

Influenza virus infection is one of the most current problems nowadays. Its unique ability to strongly inhibit cell immune response on many different levels and its pandemic potential make it a subject of interest of many research groups. The Influenza virus uses mainly NS1 protein to inhibit the immune response. NS1 protein is able, on one hand, to bind RNA and mask it against recognition by cellular sensors and other proteins. On the other hand, NS1 protein possesses a catalytic domain. Using this domain it interacts with many cellular proteins, interferes with signal transduction and guarantees successful infection. NS1 protein is one of principal pathogenicity instruments of the Influenza virus and it deserves appropriate attention.

Klíčová slova: chřipkový virus, interferony, RNA interference, NS1

Key words: Influenza virus, interferons, RNA interference, NS1

Úvod:

Chřipkový virus (influenza virus), je schopen napadat člověka, ale i široké spektrum dalších savců a ptáků. Způsobuje běžné, avšak ne zcela banální onemocnění – chřipku. Chřipka lidstvo provázela v průběhu celých dějin, poprvé byla popsána pravděpodobně už v roce 412 př.n.l. Hippokratem (Hoehling, 1961 – převzato z Knipe a Howley, 2007). V moderních dějinách, v průběhu 20. století, způsobila několik pandemií. Nejvýznamnější z nich proběhla v roce 1918, tzv. španělská chřipka, a vyžádala si desítky milionů životů po celém světě (Horimoto a Kawaoka, 2001). I běžná sezónní chřipka má však po celém světě na svědomí každoročně statisíce životů. Nejohroženější jsou malé děti, starší lidé a chronicky nemocní pacienti - chřipka zatěžuje organismus a může způsobit zhoršení symptomů chronické nemoci, případně usnadnit propuknutí další infekce, například zápalu plic (Rothberg et al., 2008).

Úspěšnost chřipkového viru spočívá v efektivním úniku imunitnímu systému. Aby bylo možné infekci chřipkovým virem překonat, je v organismu nutné nastolit adaptivní imunitní odpověď a produkci neutralizujících protilátek (Graham et al., 1994). Chřipkový virus je schopen mutacemi měnit své povrchové antigeny a tím znovu a znovu neutralizujícím protilátkám unikat. Z toho důvodu je vakcína proti chřipce účinná vždy jen jednu sezonu, poté je třeba ji přizpůsobit nově zmutovanému subtypu viru (Carrat a Flahault, 2007). Vzhledem k závažnosti a aktuálnosti hrozby pandemií chřipky je potřeba vytvářet nové vakcíny a protivirové přípravky. Abychom našli přípravek, který bude účinný v inhibici chřipkového viru nezávisle na jeho schopnosti častých mutací, je nutné zkoumat mechanismy infekce chřipkovým virem na molekulární úrovni. Jedině detailní poznání mechanismů, kterými chřipka překonává buněčné obranné systémy, nás může dovést k objevení látky účinné na všechny subtypy chřipkového viru.

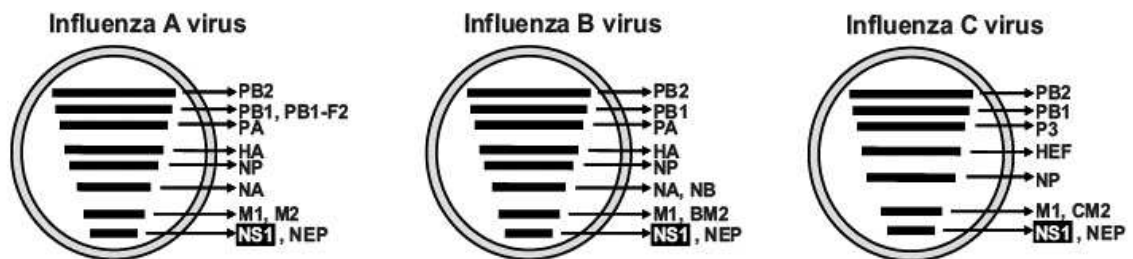
Tato práce se zaměřuje na shrnutí aktuálních poznatků o mechanismech používaných chřipkovým virem k úniku před imunitní odpovědí.

1. Biologie chřipkového viru

Virus chřipky patří mezi obalené RNA viry, do čeledi *Orthomyxoviridae*. Genom je segmentovaný, tvoří ho jednovláknová RNA (single-strand RNA, ssRNA) s negativním smyslem. Existují tři typy – influenza A, influenza B, influenza C. Influenza A je nejintenzivněji zkoumána, především kvůli svému potenciálu způsobovat epidemie. Viry influenza B a C vykazují některé odlišnosti ve struktuře a životním cyklu. Ve své práci se zaměřuji na virus influenza A. Pokud jsou k dané problematice známy významné odlišnosti u viru influenza B a C, jsou v textu zmíněny.

Chřipkový virus napadá především epitelové buňky dýchacího traktu, je však schopen infikovat i makrofágy nebo dendritické buňky. Infekce buňky chřipkovým virem začíná adsorpcí viru na kyselinu sialovou na povrchu buňky pomocí hemaglutininu. Do buňky se virus dostává nejčastěji klathrinem zprostředkovanou endocytózou. Pro uvolnění viru do cytoplasmy je důležité nízké pH pozdního endosomu. Virová membrána splývá s membránou endosomu za pomoci fúzního peptidu, který je odhalen štěpením molekuly hemaglutininu za nízkého pH. Vzniklým pórem se virové ribonukleoproteiny (RNP) dostávají do cytoplasmy. Viry čeledi *Orthomyxoviridae* se jako jediné RNA viry replikují v jádře. Do jádra se RNP dostávají s využitím buněčného proteinu karyoferinu, který rozpoznává jaderné lokalizační signály na virovém proteinu NP. V jádře probíhá transkripce a replikace RNA. PB1 podjednotka RNA-polymerázy má endonukleázovou funkci a získává 5'cap struktury z hostitelských mRNA a využívá je jako primer pro transkripci. Transkribované mRNA jsou polyadenylovány a některé jsou upravovány pomocí splicingu. Translace mRNA probíhá na ribozomech v cytoplasmě, proteiny HA, NA a M2 jsou translatovány na endoplasmatickém retikulu. Nasyntetizování dostatečného množství proteinu NP zřejmě vede k přepnutí z transkripce na replikaci. Replikace probíhá přes meziproduct cRNA, která má pozitivní smysl. Nově vytvořené virové RNA tvoří opět ribonukleoproteiny a za pomoci proteinů M1 a NS2 jsou exportovány z jádra do cytoplasmy. Viry maturují a pučí z apikální membrány polarizovaných epitelových buněk. Mechanismus zabalení všech osmi potřebných segmentů genomu do virionu není dosud znám. Pučení virů napomáhá především protein M1. Znovu může docházet k vazbě kyseliny sialové hemaglutininem, proto neuraminidáza kyselinu sialovou odštěpuje a uvolňuje tak virus z buňky.

Genom chřipkového viru je tvořen 8 segmenty (influenza A a B) kódujícími 10 proteinů nebo 7 segmenty (influenza C) kódujícími 9 proteinů (viz obr. 1). Tři největší segmenty influenza A viru kódují tři největší proteiny – podjednotky RNA-dependentní-RNA-polymerázy (RdRp). Další tři segmenty kódují vždy po jednom proteinu – hemagglutinin, neuraminidázu a nukleoprotein. Poslední dva segmenty kódují každý dva proteiny vznikající z jediného genu rozlišeným splicingem – M1, M2 proteiny a NS1, NS2 proteiny.



Obr.1: Schéma segmentovaného genomu influenzy A, influenzy B, influenzy C. Viry se liší počtem segmentů i sekvencemi aminokyselin v jednotlivých proteinech. Převzato z Garcia-Sastre (2005), upraveno.

RNA polymeráza je tvořena dvěma bazickými (PB1, PB2) a jednou kyselou (PA) podjednotkou. PB1 podjednotka funguje jako endonukleáza a získává 5' cap struktury z hostitelských mRNA. PB2 podjednotka se účastní transkripce. Specifická funkce PA podjednotky zatím nebyla objasněna. Hemagglutinin je trimetrický tyčinkovitý protein zanořený C-koncem do virové membrány. Jeho hlavní funkcí je vazba na receptor na povrchu buňky a splynutí virové membrány s membránou endosomu, potřebný je zřejmě i při maturaci virionů a pučení z buňky. Neuraminidáza je glykosylovaný transmembránový protein, jehož N-konec je orientován do virionu. Nukleoprotein NP má pozitivní náboj, váže virovou RNA a obsahuje jaderné lokalizační signály. Jeho funkcí je zřejmě doprava nukleoproteinů do jádra. M1 protein je ve virionu umístěn přímo pod membránou. Jeho hlavní funkcí je tvorba nově syntetizovaných RPN, jejich export z jádra, maturace virionů a pučení. M2 protein je iontový kanál vysoce specifický pro H^+ ionty. Jeho funkcí je okyselení prostředí viru pumpováním H^+ iontů z lumen pozdního endosomu, čímž napomáhá rozvolnění virionu před vstupem do cytoplasmy a také štěpení hemagglutininu. Protein NS2 je schopný vázat protein M1 i virové ribonukleoproteiny a zajišťuje export nově

syntetizovaných genomů z jádra do cytoplasmy. Protein NS1 (non-structural protein 1) má dvě domény, C-koncová doména je efektorová, váže nejrozličnější cílové proteiny, N-koncová doména váže dvouřetězcovou RNA (dsRNA) s vysokou afinitou a ssRNA s nižší afinitou. Jeho funkcí je ovlivnění imunitní odpovědi buňky na různých úrovních.

Chřipkové viry jsou identifikovány pomocí jejich typu, organismu, ze kterého byly izolovány, místa jejich izolace a pořadí a roku izolace. U viru influenza typu A se navíc uvádí subtyp hemagglutininu a neuraminidázy. Tyto dva proteiny jsou významné z hlediska imunitní odpovědi, protože jsou vystaveny na povrchu viru a fungují jako antigeny. Chřipkový virus používá dva mechanismy jejich obměny, čímž uniká imunitní odpovědi. Prvním mechanismem je antigenní drift, jde o obměnu několika aminokyselin v sekvenci HA nebo NA v ne vazebném místě. Tím se změní antigen bez změny vazebné funkce a protilátky se na nový typ proteinu nemohou vázat a neutralizovat ho. Druhým mechanismem je antigenní shift. Ten představuje velkou změnu antigenu HA nebo NA a tím vznik nového subtypu viru. Nový subtyp je geneticky odlišný a vzniká vysoké riziko epidemie u imunologicky naivní populace. Antigenní shift se typicky děje přeuspořádáním proteinů mezi dvěma typy virů, často z různých organismů (Knipe a Howley, 2007).

Mimo změnu povrchových antigenů ale chřipkový virus ovládá celou řadu dalších mechanismů, s jejichž pomocí uniká imunitnímu dozoru. Za většinu z nich zodpovídá virový protein NS1.

2. NS1 ovlivňuje signální dráhy vedoucí k aktivaci imunitní odpovědi

2.1. NS1 je antagonist interfeonu

Interferony (IFN) jsou proteiny produkované v buňce jako první vlna a vlastní základ protivirové obrany. Mezi interferony typu I patří interferon α , β (Garcia-Sastre, 2001). IFN- α se v buňce vyskytuje v různých subtypech - IFN α 1a, IFN α 2b, IFN α 4b a další (Nyman et al., 1998). Jednotlivé subtypy se liší svou úlohou při infekci. IFN- β je v buňce přítomen v jediném subtypu. IFN- γ je produkován lymfocytárními buňkami jako odpověď na cytokiny (Garcia-Sastre, 2001), chřipkový virus s jejich indukci neinterferuje. Interferony α , β jsou exprimovány jako

odpověď na infekci virem v buňce, v případě viru chřipky je jejich transkripce spouštěna buněčnými proteiny aktivovanými dsRNA. Aby se virus úspěšně replikoval, musí překonat tuto první vlnu imunitní odpovědi (Garcia-Sastre, 2001). U chřipkového viru je tato funkce zajišťována především proteinem NS1.

Aktivace exprese interferonu v buňce probíhá pomocí různých drah a děje se na úrovni aktivace transkripce genů pro interferon. Na počátku jedné z drah stojí TLR (Toll-like receptors) proteiny. Pro rozpoznání chřipkového viru jsou podstatné dva proteiny z této rodiny, TLR3 a TLR7 (Schmolke a Garcia-Sastre, 2010). Oba tyto proteiny jsou přítomny v membráně endosomů a rozeznávají jako antigen virovou nukleovou kyselinu. Protein TLR3 váže dsRNA a dále aktivuje například transkripční faktor NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) nebo protein IRF3 (interferon regulatory factor 3) (Guillot et al., 2005). Protein IRF3 je v buňce konstitutivně exprimován neaktivní a v reakci na infekci virem je fosforylován buněčnými kinázami a translokuje se do jádra (Lin et al., 1998). V jádře se váže se na enhancerové oblasti PRDI a PRDIII (positive regulatory domains) v promotoru IFN a spouští expresi IFN- α/β z promotoru IFNA a IFNB (Schafer et al., 1998).

Chřipkový virus se brání aktivaci exprese IFN- α/β výše popsanou drahou na úrovni proteinu IRF3. Protein NS1 při infekci zabraňuje aktivaci proteinu IRF3 v odpovědi na přítomnost virové RNA. Tato funkce proteinu NS1 přímo souvisí s jeho schopností vázat dsRNA jeho N-koncovou doménou. Virus s mutantním proteinem NS1, neschopným vázat RNA, má nulovou schopnost inhibice IRF3. Úspěšná inhibice IRF3 se odráží i ve snížení exprese IFN- α/β (Talon et al., 2000). Talon et al. (2000) také zmiňuje možnost podpůrné funkce PKR (protein kinase R) při aktivaci dráhy TLR3 a IRF3. Protein NS1 je schopen inhibovat PKR (viz kapitola 2.3), což by také mohlo vést ke snížené aktivaci IRF3.

Protein TLR7 patří také mezi Toll-like receptory umístěné v endosomu, jako antigen rozeznává ssRNA. Aktivovaný protein TLR7 dále aktivuje například také transkripční faktor NF κ B nebo protein IRF7 (interferon regulatory factor 7). Protein IRF7 je další z aktivátorů exprese interferonu. Je aktivován též fosforylací a poté se translokuje do jádra a váže se na oblasti PRD v promotoru IFN (Schmolke a Garcia-Sastre, 2010). Na rozdíl od IRF3, není v buňce konstitutivně exprimován, je produkován až jako odpověď na IFN (Sato et al., 2000). Reaguje tedy na virovou infekci se zpožděním, v pozdní fázi indukce interferonu. Celá tato

dráha funguje jako pozitivní zpětná vazba indukce interferonu (Schmolke a Garcia-Sastre, 2010). Protein IRF7 má poměrně velmi krátký poločas života. Vyskytuje se v buňce vždy nejvýše okolo jedné hodiny, na rozdíl od IRF3, ten je naopak velmi stabilní (Sato et al., 2000). Interakce dráhy TLR7 a IRF7 s infekcí chřipkového viru zatím nebyla objevena (Schmolke a Garcia-Sastre, 2010). Vzhledem k pozdní aktivaci této dráhy při infekci je pravděpodobné, že její inhibice není pro chřipkový virus podstatná. Zdá se, že tato dráha nebrání úspěšné infekci.

Dalším spouštěčem interferonové odpovědi, paralelní drahou k signalizaci přes TLR a IRF, je retinoic acid-inducible gene I (RIG-I). Jde o protein se dvěma CARD (caspase activation recruitment domain) doménami vázajícími kaspázy na N-konci a helikázovou doménou na C-konci. RIG-I je aktivován vazbou dsRNA na svou C-koncovou doménu a poté, za spotřeby ATP, indukuje expresi IFN (Yoneyama et al., 2004). RIG-I aktivuje mitochondriální anti-virové signální proteiny (MAVS) lokalizované ve vnější mitochondriální membráně, k nim patří proteiny IPS-1, VISA a Cardiff. Proteiny MAVS aktivují buněčné kinázy TANK-binding kinase a I κ B kinase (IKK) (Seth et al., 2005), které dále aktivují IRF-3 a NF κ B, což jsou aktivátory transkripce interferonu (Sharma et al., 2003).

Protein NS1 váže dsRNA chřipkového viru pomocí své N-koncové domény, bez sekvenční specifity. Virová dsRNA je tedy zřejmě proteinem NS1 obalena (Hatada a Fukuda, 1992) a není přístupná pro helikázovou doménu proteinu RIG-I. Protein NS1 navíc inhibuje aktivaci proteinu RIG-I i v případě, kdy dsRNA není v buňce přítomna. Tomu odpovídá i skutečnost, že v přítomnosti NS1 je snížena exprese IFN- α/β a také proteinů indukovaných interferonem. Pro inhibici spuštění exprese interferonu přes protein RIG-I je nezbytná jen N-koncová doména proteinu NS1 a její RNA-vazebná funkce. Při experimentech s mutantním proteinem NS1 s chybějící C-koncovou doménou byla inhibice aktivace RIG-I stejně úspěšná, jako s divokým typem proteinu. Mechanismus těchto inhibic zatím nebyl prozkoumán (Guo et al., 2007).

Transkripční aktivátor interferonu, protein NF κ B je v buňce přítomen v neaktivní formě, vázán na inhibitor I κ B (inhibitor of NF κ B). Při virové infekci, nebo jiném stresovém podnětu, je inhibitor I κ B fosforylován kinázou IKK. Tím se uvolní vazba inhibitoru na NF κ B a ten může aktivovat transkripci interferonu. I κ B je poté ubiquitinylován a degradován v proteasomu

(Karin a Ben-Neriah, 2000). Protein NS1 chřipkového viru je schopen zabraňovat aktivaci NF- κ B během infekce chřipky i během infekce jiných virů. Mutantní virus chřipky, bez proteinu NS1, není inhibice NF κ B schopen vůbec. Protein NS1 inhibuje funkci NF κ B opět nejspíše vazbou virové dsRNA a její ochranou před rozpoznáním v buňce. V aktivaci NF κ B se uplatňuje také kináza PKR, kterou protein NS1 úspěšně inhibuje (viz kapitola 2.3)(Wang et al., 2000). Inhibice aktivace proteinu NF κ B je zřejmě výsledkem inhibice drah předcházejících jeho aktivaci (RIG-I, IRF3, PKR). Na druhé straně, transkripční aktivátor NF κ B zároveň aktivuje dráhy vedoucí k navození apoptózy v buňce. Bylo prokázáno, že pro úspěšnou propagaci viru chřipky je navození apoptózy v buňce potřebné. Proto úplná inhibice proteinu NF κ B není pro chřipkový virus výhodná (Wurzer et al., 2004).

Interferon funguje především jako signál pro okolní buňky, pro navození antivirového stavu v tkáni (Krug et al., 2003). Interferony jsou sekretované proteiny, které se váží na povrchové receptory IFNAR (interferon- α/β receptor) okolních buněk. V těchto buňkách se navozuje antivirový stav. Vazba IFN- α/β na povrchové receptory buněk IFNAR spouští dráhu JAK/STAT (Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription)(Platanias, 2005). Tato dráha indukuje v jádře formaci komplexu ISGF-3 (interferon stimulated gene factor 3), který se váže na protein ISRE (interferon stimulated response element) a ten spouští expresi protivirových proteinů (Darnell et al., 1994 – převzato z Wathélet et al., 1998).

Protein NS1 chřipkového viru je schopen inhibovat indukci IFN- β , a to jak při infekci chřipkou, tak při infekci jinými viry. Exprese IFN- β je zásadní drahou, která při nedostatečné inhibici znamená neúspěšnou infekci. Různé kmeny chřipkových virů influenza A jsou schopny různě silné inhibice exprese IFN- β . Některé kmeny jsou dokonce citlivější na produkci IFN- α , než IFN- β . NS1 protein je, mimo jiné, schopen blokovat indukci proteinu ISRE zatím neznámým mechanismem (Hayman et al., 2006).

Protein NS1 je schopen blokovat nejen indukci exprese interferonu, ale také imunitní mechanismy interferonem spouštěné. Mezi interferonem stimulované proteiny patří například protein p38, MAP kinázy (mitogen-activated protein kinase), PI3 kináza (phosphatidyl-inositol 3 kinase), ISG15 (Interferon stimulated gene 15), 2'-5'oligoadenylátsyntetáza a další. Tyto proteiny mají za úkol různými mechanismy zamezit množení a šíření viru dál do organismu – zastavují buněčnou translaci, aktivují imunitní

system (Platanias, 2005). Virus chřipky vyvinul specifické mechanismy tlumící účinek některých z těchto proteinů (viz kapitoly 2.2, 2.4). Virus influenza A navíc tlumí nesespecificky účinek všech proteinů tím, že zadržuje buněčné mRNA v jádře a brání jejich posttranskripčním úpravám (viz kapitola 4)(Kim et al., 2002).

Protein ISG15 patří mezi proteiny silně stimulované interferonem. Jde o takzvaný ubikvitinu podobný (ubiquitin like) protein, kovalentně se váže na různé proteiny svým C-koncem a navádí je k degradaci do proteasomu. Vazba proteinu ISG15 k proteinům je aktivována UBE1 (ubiquitin-activating enzyme 1) proteinem, což je protein podobný E1 enzymu aktivujícímu vazbu ubikvitinu. Protein NS1 viru influenza B brání právě aktivaci proteinu ISG15 UBE1 proteinem. Pro tuto funkci je nezbytná N-koncová část proteinu NS1, která obsahuje celou N-koncovou doménu s RNA-vazebnou funkcí a část C-koncové efektorové domény (Yuan a Krug, 2001). NS1 protein viru influenza B váže protein ISG15 pomocí smyčky na N-konci. Tato smyčka je v tomto proteinu NS1 ve dvou kopiích, jeden protein NS1 tedy pravděpodobně může vázat dva proteiny ISG15. Protein NS1 viru influenzy A tuto smyčku na N-konci nemá, a také protein ISG15 neváže (Krug et al., 2003). V buňkách infikovaných virem influenzy B se protein ISG15 vyskytuje neaktivní, není schopen vázat buněčné proteiny. Protein NS1 viru influenzy A nemá schopnost inhibovat aktivaci proteinu ISG15, ale brání už expresi tohoto proteinu výše zmíněným nesespecifickým mechanismem (viz kapitola 4)(Yuan a Krug, 2001).

Vazba interferonu na okolní buňky a navození antivirového stavu v tkáni je většinou fatální pro propagaci chřipkového viru v organismu. Právě díky navození antivirového stavu v okolních buňkách imunita překonává infekci. Snaha o inhibici této dráhy je pro chřipkový virus nutností. Pro inhibici interferonové dráhy proteinem NS1 na různých úrovních je zásadní vazba dsRNA a tedy N-koncová doména proteinu. Ta je zvláštní svojí strukturou dimerického řetízku složeného ze šesti helixů, což je motiv, který se nenachází u žádného jiného proteinu vázajícího RNA (Krug et al., 2003). C-koncová doména proteinu funguje jako efektorová doména a její význam pro antagonismus interferonu není příliš velký. Při ztrátě C-koncové domény proteinu NS1 viru influenza B se jeho antagonistická funkce neztrácí, jen se výrazně snižuje (Dauber et al., 2006).

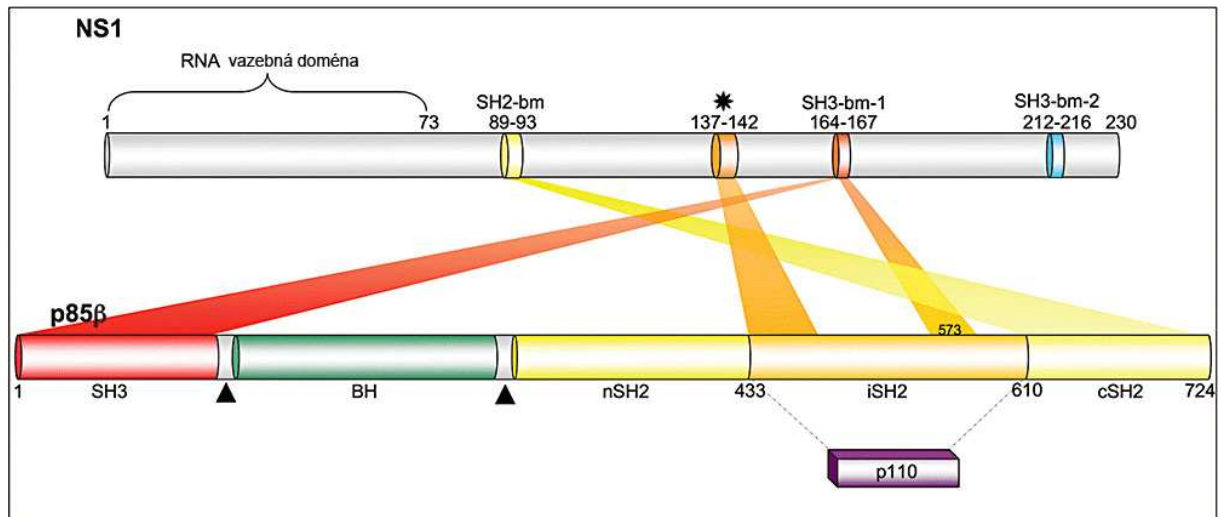
2.2. NS1 ovlivňuje PI3k/Akt dráhu

Dráha PI3 kinázy ovlivňuje mnoho buněčných dějů od buněčného přežití přes proliferaci buňky po imunitní odpověď při zánětu (Cantley, 2002). PI3 kináza je heterodimerní enzym tvořený katalytickou podjednotkou p110 a regulační podjednotkou p85. Vazba podjednotky p85 k p110 inhibuje její katalytickou aktivitu (Yu et al., 1998). Regulační podjednotka p85 nese dvě domény SH2 (Src homology domain 2), jednu doménu SH3 (Src homology domain 3) a další domény schopné vázat proteiny (Okkenhaug a Vanhaesebroeck, 2001). Aktivovaná PI3 kináza je schopna fosforylovat proteiny i lipidy. Jedním z jejích substrátů je fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂), který je fosforylován na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃), který v buňce funguje jako druhý posel (Toker a Cantley, 1997). PIP₃ dále způsobuje fosforylaci proteinu Akt, který je ve fosforylované formě aktivní a ovlivňuje další signální dráhy. Mezi nejvýznamnější funkce proteinu Akt patří jeho inhibice apoptózy zainhibováním kaspázy 9 pomocí fosforylace (Ehrhardt et al., 2007a).

Dráha PI3 kinázy fosforylující membránový fosfolipid PIP₂ je řazena mezi dráhy protivirové obrany. Signalizace fosfolipidem PIP₃ vede k aktivaci transkripčního faktoru IRF-3 a expresi IFN-β. Při inhibici PI3 kinázy však nečekaně dochází ke snížení titru chřipkového viru (Ehrhardt et al., 2006). Protein NS1 viru influenza A je schopen během infekce aktivovat PI3 kinázu a zajistit tak aktivaci proteinu Akt (Ehrhardt a Ludwig, 2009). Během přirozené infekce se tak množství aktivované PI3 kinázy a fosforylovaného proteinu Akt zvyšuje (Shin et al., 2007b). Aktivovaný protein Akt pravděpodobně svou antiapoptotickou funkcí pomáhá propagaci viru influenza A (Shin et al., 2007c). Při inaktivaci viru UV zářením k aktivaci PI3 kinázy nedochází, aktivace dráhy tedy souvisí s biologickými funkcemi viru v buňce, nejen s jeho strukturou (Shin et al., 2007b). Tato dráha je příkladem zneužití původně obranné dráhy ve prospěch viru (Ehrhardt et al., 2006). Na rozdíl od viru influenza A, NS1 protein viru influenza B není schopen vazby s PI3 kinázou a ani jiné aktivace proteinu Akt. Zdá se, že virus influenza B pro svou úspěšnou propagaci nevyžaduje potlačení apoptózy dráhou PI3 kinázy/Akt (Ehrhardt et al., 2007b).

Při interakci proteinu NS1 s PI3 kinázou se neuplatňuje jeho N-koncová doména vázající RNA, dostačující je jeho C-koncová katalytická doména (Hale et al., 2008)(viz obr.2). V sekvenci proteinu NS1 se vyskytují dva polyprolinové motivy, které mohou tvořit α-helixy

schopné vazby na SH3 doménu PI3 kinázy. Podobné polyprolinové motivy lze nalézt i u jiných proteinů účastnících se signálních drah spojených s PI3 kinázou. U proteinu NS1 lze navíc nalézt i motiv podobný SH2 doméně (Shin et al., 2007a), který naznačuje možnost vazby domény SH2 v proteinu PI3 kinázy. Shin et al. (2007c) za využití delečních mutant kinázy PI3 došel k závěru, že vazby s polyprolinovými motivy proteinu NS1 se účastní pouze SH3 doména podjednotky p85 PI3kinázy situovaná blíže N-konci proteinu.



Obr.2: Model vazebných možností proteinu NS1 chřipkového viru a podjednotky p85β PI3 kinázy. N-koncová doména proteinu NS1 nemá pro vazbu význam, důležité jsou naopak domény SH2 a SH3 na C-koncové doméně. Naznačeno je místo vazby podjednotky p110 na p85β. Převzato z Ehrhardt a Ludwig (2009), upraveno.

Další dopady dráhy PI3 kinázy/Akt na infekci chřipkovým virem nejsou zatím zcela objasněny. Poznatky se rozcházejí v místě účinku na infekci i v čase po infekci. PI3 kinázová/Akt dráha by mohla například regulovat vstup viru do buňky a jeho transport do endosomu ve velmi časně fázi infekce (Ehrhardt et al., 2006) nebo regulovat skládání viru v pozdní fázi infekce (Zhirnov a Klenk, 2007).

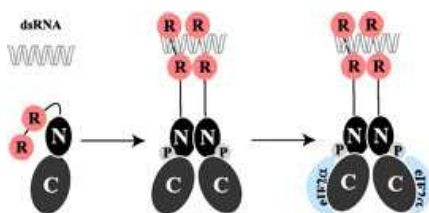
2.3. NS1 ovlivňuje aktivaci PKR kinázy

PKR je serin/threoninová protein kináza, efektor IFN-β, ovlivňující mnoho buněčných drah. V buňkách je PKR konstitutivně exprimována v neaktivní formě, při aktivaci se autofosforyluje na Thr451 a vytvoří homodimer (Williams, 1999)(viz obr.3). Aktivace PKR

probíhá jako důsledek signalizace růstovými faktory, TLR, stresové signalizace nebo přítomností dsRNA v buňce (Garcia et al., 2006).

Po aktivaci se PKR angažuje v pozitivní zpětné vazbě IFN- β (viz kapitola 2.1), v inhibici transkripce, ovlivňuje translaci, aktivaci apoptózy, ovlivňuje buněčný růst, buněčnou diferenciaci a další procesy (Garcia et al., 2006). Ovlivnění transkripce probíhá pomocí přímé vazby PKR ke komplexu IKK, který je schopen fosforylovat I κ B - inhibitor transkripčního faktoru NF κ B. Kináza PKR aktivuje IKK komplex, dochází k uvolnění I κ B z NF κ B a následně k expresi stresem indukovaných genů (Gil et al., 2000). Inhibice translace proteinem PKR probíhá jako fosforylace translačního aktivátoru eIF2 (eucaryotic initiation factor 2)(viz obr.3) na jeho α podjednotce. Fosforylace na eIF2 α znemožňuje jeho konformační změnu (Garcia et al., 2006) - výměnu na něm vázaného GDP za GTP (Hinnebusch, 2000) - a tak i aktivaci translace, což vede k atenuaci celé buněčné translace. Virové mRNA tvoří výjimku z inhibice translace zřejmě díky specifickému motivu na 5' konci (viz kapitola 4.4)(Burgui et al., 2003). Existují i další kinázy fosforylující α podjednotku eIF2, například kináza PERK (pancreatic endoplasmic reticulum eIF2alpha kinase) nacházející se v lumen endoplasmatického retikula. Tyto další kinázy jsou také indukovány IFN- β a jsou také schopny inhibovat translaci (Barber, 2005). Nejsou však významné při infekci chřipkovým virem, alespoň doposud nebyla objevena interakce s infekcí.

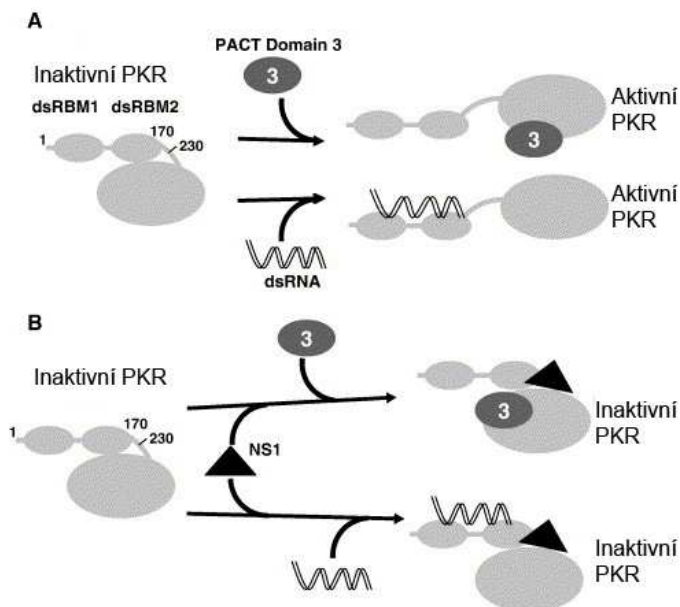
Z uvedených faktů vyplývá, že PKR je asi nejdůležitější dráhou protivirové obrany a viry se musí s jejím působením vypořádat. Influenza virus používá k obraně proti PKR protein NS1. Protein NS1 je schopen inhibovat PKR zřejmě dvěma odlišnými způsoby – přímou vazbou PKR (Min et al., 2007) a interakcí s proteinem p58^{IPK} (Mellville et al., 1999)(viz kapitola 2.3.3). Inhibice PKR pomocí proteinu NS1 je úspěšná při obou hlavních způsobech aktivace PKR – přítomností dsRNA a proteinem PACT (p53 associated cellular protein-testes derived).



Obr.3: Aktivace PKR vazbou dsRNA, následuje autofosforylace kinázy, dimerizace a fosforylace translačního aktivátoru eIF2. Převzato z Garcia et al. (2006).

2.3.1. Aktivace PKR dsRNA

Obecným signálem při virové infekci spouštějícím buněčné obranné mechanismy je přítomnost dsRNA v buňce. Dvojřetězcová RNA je také schopna aktivovat PKR, přičemž důležitější se zdá dvojřetězcová struktura dané RNA, než sekvence nukleotidů (Nanduri et al., 2000). Pro úspěšnou aktivaci je zapotřebí dsRNA delší než 30 bp (Manche et al., 1992). V aktivaci se uplatňuje srovnatelně virová RNA i laboratorně připravená mini-vRNA (model virové RNA)(Hatada et al., 1999). V inaktivní formě je v proteinu PKR jeho N-koncová doména v kontaktu s C-koncovou doménou. dsRNA se váže na dsRNA-vazebné motivy (dsRBM) situované na N-konci PKR, to vede k uvolnění C-konce (viz obr.4)(Nanduri et al, 2000). C-konec má katalytickou funkci, dochází k autofosforylaci a tvorbě homodimerů z PKR (Li et al., 2006).



Obr.4: A. Vazbou dsRNA nebo proteinu PACT dojde k zrušení vazby mezi N- a C-koncovými doménami dsRBM1 a dsRBM2 v PKR, což vede k její aktivaci. B. Při infekci chřipkovým virem dochází k vazbě proteinu NS1 do oblastí PKR zodpovědných za vazbu N-a C-konce a k aktivaci nedochází. Převzato z Li et al. (2006), upraveno.

Protein NS1 je schopen zabraňovat aktivaci PKR pomocí dsRNA. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1, protein NS1 má doménu schopnou vázat dsRNA. Tato skutečnost nastiňuje možnost, že by protein NS1 svou vazbou mohl ochraňovat dsRNA před rozeznáním PKR (Lu et al., 1995). Ukázalo se však, že afinita proteinu NS1 k dsRNA je nižší než afinita PKR k dsRNA (Chien et al., 2004). Také byla prokázána inhibice PKR deleční mutantou NS1 proteinu

neschopnou vázat RNA. Navíc byla potvrzena vazba mezi proteinem NS1 a PKR *in vitro* a *in vivo* (Li et al., 2006)(viz kapitola 2.3.3).

2.3.2. Aktivace PKR PACT dráhou

Druhou významnou dráhou aktivující PKR kinázu je signalizace přes protein PACT. Protein PACT je tvořen třemi doménami a pomocí domény 3 se přímo váže k PKR. Vazba je lokalizována na C-koncovou doménu PKR, ta se oddělí od N-koncové domény a může proběhnout autofosforylace a aktivace PKR (viz kapitola 2.3.1)(viz obr.4). Protein PACT je schopen svou doménou 1 a 2 vázat dsRNA, což by nastiňovalo možnost aktivace PKR v důsledku přítomnosti dsRNA v buňce. Ukázalo se však, že je to právě a pouze doména 3, která je nezbytná a dostačující pro aktivaci PKR proteinem PACT (Peters et al., 2001).

Protein NS1 je i v tomto případě schopen aktivaci PKR zabránit. Bylo pozorováno, že je schopen vazby s proteinem PACT, tato vazba však překvapivě není nezbytná k inhibici PKR. NS1 protein i v tomto případě inhibuje kinázu PKR přímou vazbou na ni (Li et al., 2006).

2.3.3. Inhibice PKR proteinem NS1

Protein NS1 je schopen inhibovat PKR přímou vazbou na jejích 230 N-koncových aminokyselin (Li et al., 2006). Tato vazba zabraňuje autofosforylaci a aktivaci PKR a byla pozorována *in vitro* i *in vivo*. Pro vazbu PKR jsou nezbytné aminokyseliny 123-127 proteinu NS1. Při mutaci v této oblasti nedochází k inhibici PKR proteinem NS1, což má za následek významné snížení titru viru v buňce, avšak ne jeho úplnou atenuaci. Při infekci virem s mutantou NS1 proteinu, upravenou v aminokyselinách 123-127, se navíc projevuje deregulace syntézy virových mRNA v čase. Neobjevuje se obvyklá počáteční syntéza proteinu NS1 a NEP a pozdější zvýšení syntézy, ale už od počátku infekce běží syntéza všech proteinů ve velkém. Tento jev souvisí opět pouze s aktivovanou PKR, bez přítomnosti PKR se ani s mutovaným proteinem NS1 časová deregulace neprojevuje (Min et al., 2007).

Další drahou, kterou zřejmě chřipkový virus využívá pro inhibici PKR, je dráha buněčného proteinu p58^{IPK}. Tento proces není ještě zcela objasněn a některým autory ani pozorován nebyl (Min et al., 2007). Protein p58^{IPK} je protein inhibující PKR a tedy i fosforylaci translačního aktivátoru eIF2. Protein p58^{IPK} je schopen inhibovat i další interferonem indukované kinázy, které inhibují buněčnou translaci přes eIF2 protein (PERK a další). Aktivace p58^{IPK} je zajišťována například během signální dráhy spouštěné špatně složenými proteiny produkovanými v buňce (unfolded protein response, UPR)(Van Huizen et al., 2003). Chřipkový virus je zatím neznámým mechanismem schopen aktivace p58^{IPK}, ten se potom váže na C-koncovou katalytickou doménu PKR a znemožňuje tak její autofosforylaci a aktivaci (Goodman et al., 2007).

2.4. NS1 ovlivňuje dráhu 2'-5' oligoadenylátsyntetázy/Rnázy L

2'-5' oligoadenylátsyntetáza (2'-5'OAS) je protein indukovaný přítomností IFN-β a aktivovaný vazbou dsRNA, která se v buňce vyskytuje při virové infekci (Justensen et al., 2000). Protein se skládá z velké katalytické N-koncové domény a menší C-koncové domény, obě domény jsou propojeny pomocí motivu helix-smyčka-helix a drží je pospolu N-konec proteinu. 2'-5'OAS váže jako prostetické skupiny kovové ionty, je schopna vázat obě vlákna dsRNA do kladně nabitého žlábků a její aktivní místo je nabitě záporně (Hartmann et al., 2003).

V buňce se 2'-5'OAS vyskytuje ve třech izoformách lišících se velikostí – OAS1, OAS2, OAS3 (Hartmann et al., 2003). Po aktivaci dsRNA vytváří OAS1 homotetramer o velikosti asi 180 kDa, OAS2 homodimer o velikosti asi 160 kDa a OAS3 zůstává jako monomer (Samuel, 2001).

Signalizace IFN-α, β nebo γ indukuje expresi 2'-5'OAS v neaktivní formě, ta je poté schopna vázat ssRNA a dsRNA a pouze při vazbě specifických úseků dsRNA dojde k její aktivaci (Hartmann et al., 2003). V aktivním stavu je 2'-5'OAS schopna syntetizovat 2'-5'-vázané oligoadenyláty za využití ATP. ATP je štěpeno na pyrofosfát (PPi) a adenylát je připojován na 2'OH konec vznikajícího oligoadenylátu (Sarkar et al., 1999). Vznikají struktury ppp(A2'p)nA, zkráceně označované jako 2-5 oligoadenyláty (Samuel, 2001), o dvou až třiceti

jednotkách (Sarkar et al., 1999). Vzniklé oligoadenyláty mají jedinou funkci, aktivují RNázu L, přítomnou v buňce v neaktivní formě. RNáza L může být aktivována pouze 2-5 oligoadenyláty, po aktivaci dimerizuje a degraduje buněčné mRNA, rRNA a také virové RNA od 3' konce (Samuel, 2001).

Chřipkový virus je schopen bránit se degradaci svých RNA pomocí proteinu NS1. Pro inhibici dráhy 2'-5'OAS/RNázy L je zásadní funkcí schopnost vazby dsRNA NS1 proteinem. Protein NS1 chrání virovou dsRNA svou vazbou a tak nemůže být aktivována 2'-5'OAS a posléze ani RNáza L. Pro dsRNA vazebnou funkci je nepostradatelný Arg38 v N-koncové doméně NS1 proteinu. Pokud je v této aminokyselině bodová mutace, NS1 protein není schopen vázat dsRNA a také je poškozen jaderný lokalizační signál proteinu. Titr chřipkového viru s bodovou mutací v Arg38 NS1 proteinu je v důsledku aktivace RNázy L tisíckrát snížen (Min a Krug, 2006).

2.5. NS1 inhibuje maturaci dendritických buněk

Dendritické buňky v organismu fungují v propojení neadaptivní a adaptivní imunitní odpovědi (Mellman a Steinman, 2001). Jejich funkcí je prezentování patogenního antigenu v lymfatických uzlinách a aktivace CD4+ T-lymfocytů. Tato aktivace vede k polarizaci lymfocytů směrem k Th1 imunitní odpovědi a produkci IFN- γ T-lymfocyty (Fernandez-Sesma et al., 2006). Aktivace adaptivní imunity je nutná pro úplné odstranění infekce chřipkovým virem (McGill et al., 2009).

Chřipkový virus napadá buňky dýchacího traktu a také dendritické buňky vyskytující se v plicích (Efferson et al., 2003; Legge a Braciale, 2003). Dendritické buňky získávají antigen viru pro prezentaci fagocytováním napadených buněk. Antigen se ale často vyskytuje i přímo v jejich cytosolu. Asi 10 % dendritických buněk prezentujících antigen při infekci chřipkovým virem je samo virem napadeno (McGill et al., 2009). Aby mohly dendritické buňky aktivovat polarizaci adaptivní imunity směrem k Th1 odpovědi, je potřeba jejich maturace a migrace do lymfatických uzlin (Mellman a Steinman, 2001).

Maturace a migrace dendritických buněk byla pozorována 18 – 48 hodin po infekci, někdy i později (McGill et al., 2009). Pravděpodobně je podpořena produkcí INF- α/β , ale inhibice IFN- α/β není dostatečná pro inhibici maturace (Fernandez-Sesma et al., 2006). Maturace se projevuje produkcí chemokinů a chemokinových receptorů potřebných pro migraci dendritických buněk do lymfatických uzlin. Dále se zvyšuje produkce proteinu MHCII (major histocompatibility complex II) a dalších proteinů potřebných pro prezentaci antigenu – CD-86, CD-80, CD-40 (Mellman a Steinman, 2001). Nematurované dendritické buňky nejsou schopny aktivovat T-lymfocyty a celou adaptivní imunitní Th1 odpověď (McGill et al., 2009).

Virus chřipky je schopen se bránit aktivaci Th1 imunitní odpovědi na úrovni inhibice maturace dendritických buněk pomocí proteinu NS1. Jak již bylo popsáno, protein NS1 je účinným inhibítozem interferonové odpovědi, tato jeho funkce ovšem pro inhibici maturace dendritických buněk nedostačuje (McGill et al., 2009). Protein NS1 inhibuje expresi genů souvisejících s maturací na úrovni aktivace transkripce. Inhibuje expresi chemokinů, chemokinových receptorů, prozánětlivých cytosinů, jako je chemokin (C-C motiv) receptor 7, macrophage inflammatory protein 1 beta, interleukin 12 p35, interleukin 39 p19 a dalších. Samotný protein NS1 je schopen inhibovat maturaci dendritických buněk i během infekce jiným virem než chřipkou (Fernandez-Sesma et al., 2006).

Pro inhibici maturace dendritických buněk je zásadní C-konec proteinu NS1. Chřipkový virus s NS1 proteinem deletovaným na C-konci není této inhibice schopen. Dendritické buňky infikované deletovaným proteinem jsou naopak velice úspěšnými antigen prezentujícími buňkami a velmi dobře aktivují T-lymfocyty a produkci IFN- γ . Takto deletovaný NS1 protein navíc není schopen interferovat s drahami RelA proteinu, IRF-3 transkripčního aktivátoru nebo c-Jun kinázy, což jsou dráhy podporující maturaci dendritických buněk. Delece na C-konci v proteinu NS1 nejspíše znemožňuje jeho dimerizaci, která je potřebná pro jeho aktivitu v inhibici transkripce vybraných proteinů. Schopnost aktivovat imunitní odpověď a nízká patogenita dělají z této mutanty nadějného adepta na virovou vakcínu (Haye et al., 2009).

3. NS1 ovlivňuje RNA interferenci

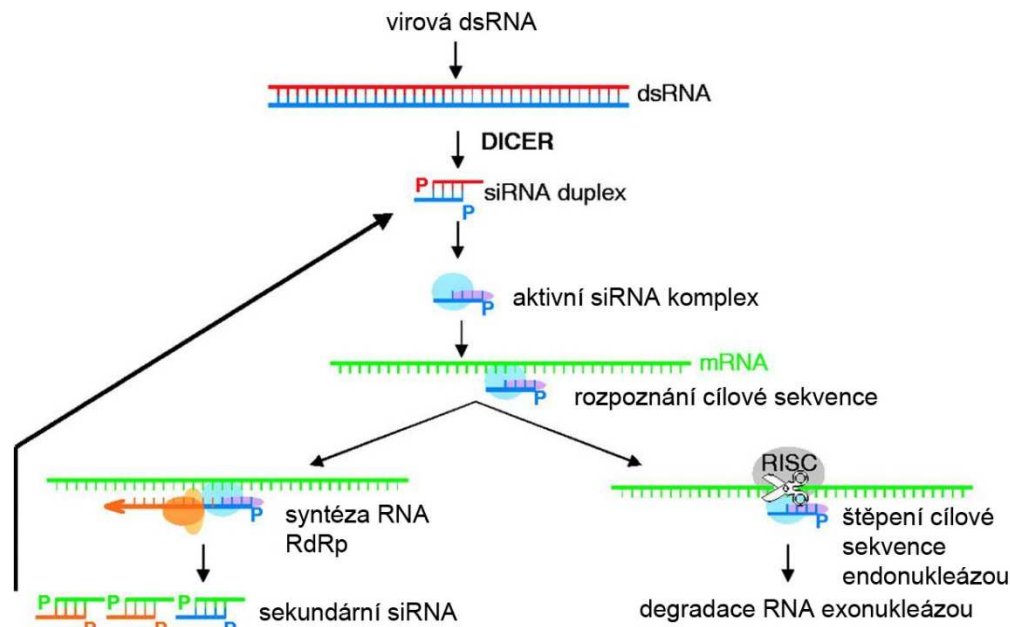
RNA interference (RNAi) představuje hlavní obranu buňky proti invazivním nukleovým kyselinám. RNAi se uplatňuje jako obrana proti virové infekci (McManus, 2004), u nematod byla pozorována i funkce v regulaci transpozonů (Ketting et al., 1999). Jde vlastně o sekvenčně specifickou degradaci RNA buněčnými endonukleázami, spouštěnou přítomností dsRNA v buňce (Waterhouse et al., 2001). Při infekci chřipkovým virem tvoří RNAi jen jakousi záložní obranu, která se projeví jen při neúspěšné obraně interferonem (Matskevich a Moelling, 2007).

Pro RNAi jsou potřebné RdRp, vyskytující se u RNA virů. RdRp jsou schopny syntetizovat vlákno RNA podle RNA předlohy a vytvářet tak intermediát dsRNA, která je substrátem pro endonukleázu Dicer. Dicer štěpí dsRNA na 21 – 25 nukleotidů dlouhé siRNA (small interfering RNA). Ty se dále inkorporují do nukleoproteinového komplexu RISC (RNA induced silencing complex) velkého 250-500 kDa (Ahluquist, 2002). Komplex RISC na základě komplementarity s obsaženou siRNA vyhledává a štěpí mRNA v buňce (Hammond et al., 2001)(viz obr.5). Výskyt siRNA v buňce vždy značí probíhající RNA silencing, a tedy virovou infekci nebo jinou invazi nukleových kyselin. siRNA nikdy nejsou přítomny v klidovém stavu (Hamilton a Baulcombe, 1999).

RNAi byla nejprve objevena a podrobněji zkoumána u rostlin, hmyzu a hub. Bylo zjištěno, že mechanismus RNAi u těchto organismů je obdobný a funguje jako imunitní obrana genomu (Plasterk, 2002). Viry jsou často schopny bránit se degradaci svých RNA mechanismy inhibujícími RNAi. Chřipkový virus je schopen inhibovat RNAi v rostlinách a v *Drosophila* pomocí proteinu NS1 (Li et al., 2004). Protein NS1 funguje jako RNA silencing supresor (Delgadillo et al., 2004).

Jak bylo zmíněno dříve, protein NS1 je schopen vázat dsRNA pomocí aminokyselin 1 – 73 na své N-koncové doméně. Pro vazbu dsRNA je nepostradatelný arginin na pozici 38, potřebné jsou i další bazické aminokyseliny a především schopnost proteinu NS1 dimerizovat. Protein NS1 je schopen vázat virovou RNA a tím ji pravděpodobně chránit před štěpením endonukleázou Dicer. Při ztrátě schopnosti dimerizace nebo schopnosti vazby RNA se schopnost inhibice RNAi proteinem NS1 výrazně snižuje (Wang et al., 1999). Protein NS1

je dále schopen vázat siRNA (Delgadillo et al., 2004). Je možné, že je schopen siRNA vychytávat a inhibovat jejich inkorporaci do komplexu RISC (Bucher et al., 2004). V buňkách *Drosophily* funguje protein NS1 jako supresor RSAR (RNA-silencing based antiviral response) odpovědi. Také pro tuto inhibici je také nezbytná vazba RNA proteinem NS1 (Li et al., 2004).



Obr.5: Molekulární kroky při RNA interferenci. Endonukleáza Dicer štěpí dsRNA a inkorporuje ji do komplexu RISC, který sekvenčně specificky degraduje RNA. siRNA se mohou využít i pro tvorbu dalších siRNA a pro pozitivní zpětnou vazbu RNAi. Převzato z Plasterk (2002), upraveno.

Obrana chřipkového viru je navíc směřována také přímo na endonukleázu Dicer. Během infekce chřipkovým virem se postupně množství mRNA pro Dicer i množství samotného proteinu v buňce snižuje. Toto snižování je v porovnání s jinými buněčnými proteiny a mRNA značně vyšší, jde tedy o mechanismus specifický na inhibici RNAi. Inhibice Diceru na úrovni mRNA a proteinu nenastává při infekci virem inaktivovaným UV zářením, je tedy potřebná biologická aktivita viru. Přesnější mechanismus inhibice zatím nebyl objasněn (Matskevich a Moelling, 2007).

Mechanismy RNAi se u savců značně liší v porovnání s rostlinami a bezobratlými živočichy. Při experimentu s reportérovými geny nebyl NS1 protein schopen inhibovat RNAi. Protein NS1 není schopen zabránit umlčení RNA pomocí RNAi v savčích buňkách (Kok a Jin, 2006). V savčích buňkách je však RNAi spíše záložní obranou drahou, hlavní obranu proti viru

zajišťuje interferonová odpověď (Matskevich a Moelling, 2007), proti níž má chřipkový virus rozvinuté inhibiční mechanismy (viz kapitola 2).

V savčích buňkách jsou kromě siRNA produkovány další malé RNA, mezi nimi i microRNA (miRNA). Tyto miRNA fungují v regulaci genové exprese, přímo i nepřímo. Některé viry samy kódují nějakou miRNA a tím regulují buněčné dráhy (Cullen, 2006). Žádná miRNA kódovaná chřipkovým virem zatím nebyla objevena. Během infekce chřipkovým virem je však spektrum produkováných miRNA v buňce upraveno, virus je tak zřejmě záměrně reguluje. Mechanismus regulace zatím nebyl objasněn (Li et al., 2010).

4. NS1 ovlivňuje procesování pre-mRNA a export mRNA z jádra

Virus influenza A je schopen ovlivňovat dráhy v infikované buňce nejen inhibicí imunitní odpovědi. Influenza A využívá mechanismy, kterými nescificky snižuje veškerou buněčnou expresi. Jedním z této skupiny mechanismů je degradace hypofosforylované RNA polymerázy II. Hypofosforylovaný stav, který bývá někdy navozen při virových infekcích, souvisí s menším počtem fosfátových skupin vázaných na doménu CTD (carboxy terminal domain). Snížení poločasu života hypofosforylované RNA polymerázy II při infekci chřipkovým virem je zajišťována virovou polymerázou, pravděpodobně podjednotkou PA (Rodriguez et al., 2007). Také syntéza virových mRNA, vyžadující jako primery pro virovou polymerázu 5'cap struktury odstřižené z hostitelských mRNA (viz kapitola 1), způsobuje degradaci značného množství hostitelských mRNA (Krug et al., 1989 – převzato z Chen et al., 1999).

Další mechanismy, související s inhibicí buněčné exprese, jsou zajišťovány proteinem NS1. Patří k nim inhibice sestřihu hostitelských pre-mRNA (precursor mRNA)(Wang a Krug, 1998)(viz kapitola 4.1), inhibice exportu hostitelských mRNA z jádra (Satterly et al., 2007)(viz kapitola 4.2) a inhibice translace hostitelských mRNA (Katze et al., 1986)(viz kapitola 4.3). Navíc protein NS1 zajišťuje exkluzivní expresi virových proteinů (Zürcher et al., 2000)(viz kapitola 4.4).

4.1. Inhibice sestřihu a procesování hostitelských mRNA

Sestřih v buňkách probíhá v jádře v okrscích nazvaných speckles (Chen et al., 1999). Probíhá na spliceosomech, strukturách vytvořených z proteinů a více druhů snRNA (small nuclear RNA)(Wang a Krug, 1998). Existují různé typy sestřihu podle sestřihové sekvence, virus influenza A interferuje se sestřihem GU-AG a AT-AC (Wang a Krug, 1998). Protein NS1 je schopen inhibovat sestřih v jádře bez inhibice tvorby spliceosomu (Fortes et al., 1994) a bez rozrušování struktury speckles (Chen et al., 1999), pouze vazbou na snRNA. Vazba snRNA proteinem NS1 neprobíhá, pokud je nějakým způsobem inhibováno vytváření spliceosomů (Wang a Krug, 1998). Účinek inhibice je kvantitativní - čím více proteinu NS1 se v buňce vyskytuje, tím efektivnější je inhibice sestřihu (Lu et al., 1994), může dojít až k dokonalému zainhibování (Wang a Krug, 1998).

Pro vazbu snRNA s NS1 proteinem je podstatná jeho N-koncová doména a schopnost vazby RNA, při ztrátě této schopnosti není protein NS1 v inhibici sestřihu úspěšný (Garaigorta a Ortin, 2007). Při sestřihu typu GU-AG je protein NS1 schopen vázat U6 snRNA a inhibovat tak vytváření komplexu mezi U6 a U2 snRNA nebo U6 a U4 snRNA. Inhibice tvorby těchto komplexů je pro neúspěch sestřihu dostatečná. Protein NS1 váže U6 snRNA ve struktuře „stem bulge“, záměna jakékoli aminokyseliny v této struktuře vazbu ničí. Při sestřihu typu AT-AC váže protein NS1 U6atac snRNA, analog U6 snRNA v GU-AG sestřihu. Tato vazba probíhá ve stejné oblasti proteinu NS1, ale je asi pětikrát slabší než vazba s U6 snRNA. Vazbou U6atac snRNA se zabraňuje vytváření komplexu mezi U6atac snRNA a U4atac snRNA, což je také dostačující pro inhibici celého sestřihu (Wang a Krug, 1998).

Zajímavostí je, že na rozdíl od inhibiční funkce proteinu NS1 influenzy A při sestřihu, NS1 protein influenzy C funguje spíše jako aktivátor sestřihu. Byl prokázán jeho pozitivní vliv na sestřih virových pre-mRNA ze segmentu 7 (NS1 a NEP protein) a 8 (M1 a M2 protein). Celkově je jeho funkce v sestřihu, v porovnání s NS1 proteinem influenzy A viru, podpůrná (Muraki et al., 2010).

K dalším úpravám pre-mRNA v jádře, před exportem do cytoplasmy, patří štěpení na 3'konci a syntéza poly(A) koncové sekvence. Pro štěpení pre-mRNA jsou nezbytné dvě sekvence – 10-30 bp „upstream“ od místa štěpení sekvence AAUAAA a „downstream“ od

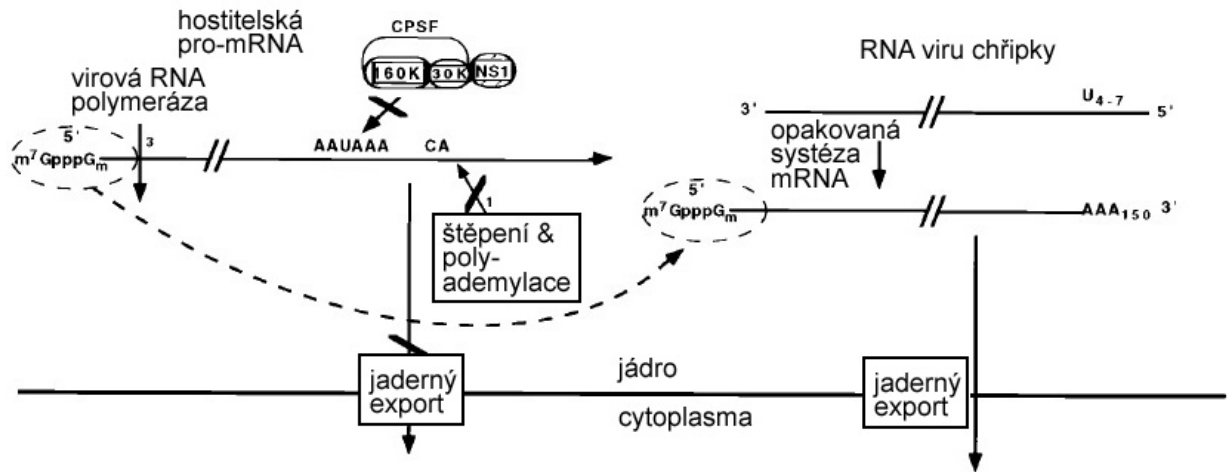
místa štěpení sekvence bohatá na nukleotidy G a U. Do místa AAUAAA se váže protein CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor), jde o endonukleázu provádějící štěpení (Keller et al., 1991). Protein NS1 je schopen vázat protein CPSF svojí efektorovou doménou (Nemeroff et al., 1998), nezbytná je pro tuto vazbu oblast okolo aminokyseliny 186 (Li et al., 2001). Protein NS1 se váže na jednu ze čtyř podjednotek CPSF, označovanou 30kDa CPSF. Při vazbě proteinu NS1 se hostitelské pre-mRNA nemohou na CPSF navázat. Vazba NS1 s CPSF probíhá během infekce a má za následek neúspěšné štěpení pre-mRNA (viz obr.6). To je pro chřipkový virus výhodné, protože neštěpené pre-mRNA nemohou být prodlouženy o poly(A)-konec a exportovány z jádra (Nemeroff et al., 1998).

Po štěpení pre-mRNA probíhá prodloužení poly(A) sekvence na 3'konci pre-mRNA, ta má před tímto krokem okolo 10 adenosin fosfátů (Noah et al., 2003). Toto prodloužení provádí hostitelská poly(A) polymeráza a je zprostředkováno poly(A) binding proteinem II (PAB II) (Barabino a Keller, 1999). Protein PAB II, a tedy i celá syntéza poly(A) konce, je lokalizován v oblasti speckles v jádře (Chen et al., 1999). Protein NS1 váže protein PAB II oblastí mezi aminokyselinami 223-237 ve své C-koncové oblasti (Li et al., 2001). Protein PAB II se při infekci chřipkovým virem nachází rovnoměrně v celé nukleoplasmě, je vyvazován ze speckles. Proteiny PAB II a CPSF navíc mohou být vázány a inhibovány jediným proteinem NS1 najednou (Chen et al., 1999).

4.2. Inhibice exportu z jádra

Jak bylo popsáno výše, protein NS1 inhibuje sestřih a procesování hostitelských pre-mRNA. To samo o sobě stačí pro inhibici transportu mRNA z jádra do cytoplasmy, protože neupravené mRNA nemohou být exportovány (Shimizu et al., 1999)(viz obr.6). Dále byla prokázána schopnost proteinu NS1 vázat poly(A) sekvence (Qiu a Krug, 1994), což může napomáhat zastavení exportu i těch mRNA, které prošly posttranskripčními úpravami. Protein NS1 je navíc schopen vázat a inhibovat protein NXF1 (nuclear RNA export factor), který napomáhá transportu mRNA jaderným pórem. Protein NS1 váže svojí C-koncovou efektorovou doménou i další proteiny napomáhající exportu mRNA z jádra (Satterly et al.,

2007). Veškerá inhibice exportu z jádra se týká pouze mRNA, tRNA a rRNA se exportují bez omezení (Fortes et al., 1994).



Obr.6: Mechanismus inhibice exportu hostitelských mRNA vazbou proteinu NS1 na 30 kDa CPSF. Je zainhibována vazba proteinu CPSF na hostitelské mRNA, štěpení a polyadenylace, což vede k inhibici exportu mRNA z jádra. Cap struktury hostitelských mRNA jsou využívány virovou RNA polymerázou pro syntézu virových RNA. Virové RNA jsou polyadenylovány a exportovány z jádra bez inhibice. Převzato z Nemeroff et al. (1998), upraveno.

4.3. Inhibice translace

Během infekce chřipkového viru je inhibována buněčná translace na úrovni iniciace a elongace. V cytoplasmě zůstávají při infekci hostitelské mRNA asociovány s polysomy, ale proteinový produkt nepřibývá a polysomy se nezvětšují, naopak spíše zmenšují. Virus chřipky asi účinkuje především na iniciaci translace (Katze et al., 1986). Během infekce chřipkového viru je výrazně snížena aktivita podjednotky eiF-4E proteinu eiF-4F snížením její fosforylace. To vede ke zhoršení funkce proteinu eiF-4F v iniciaci translace a k inhibici translace hostitelských mRNA. Také translační iniciátor eiF2 je během infekce inhibován na úrovni fosforylace podjednotky alfa. Tato inhibice se týká pouze translace hostitelských mRNA, virové mRNA jsou translatovány neomezeně. Virové mRNA mají výhodu v iniciaci translace, a proto je zřejmě inhibice translačního iniciátoru neomezuje (viz kapitola 4.4)(Feigenblum a Schneider, 1994). Při superinfekci buněk infikovaných adenovirem a zároveň chřipkovým

virem dochází ke kompetici o iniciační translační faktor eIF2. Při této inhibici je chřipkový virus úspěšnější – jeho mRNA zůstávají asociovány s polysomy a adenovirové mRNA nejsou translatovány (Katze et al., 1986).

Na druhé straně, protein NS1 funguje jako inhibitor dráhy PKR, která vede k celkovému zastavení translace v buňce (viz kapitola 2.3). Také experimenty prováděné Salvatorem et al., 2002 naznačují, že samotný protein NS1 funguje v buňce spíše jako aktivátor translace.

4.4. Exkluzivní exprese virových proteinů

Proteiny chřipkového viru, navzdory nespecifičnosti výše popsaných mechanismů, inhibici exprese unikají (Feigenblum a Schneider, 1994). Pro tuto exkluzivní expresi je nezbytný protein NS1, byla prokázána například jeho vazba s virovými mRNA (Burgui et al., 2003). Protein NS1 dále zvyšuje expresi virových proteinů, například proteinu NP nebo proteinu M1 (Enami et al., 1994), dále reguluje například export mRNA pro protein NEP z jádra (Alonso-Caplen et al., 1992). Mechanismy těchto procesů zatím nebyly objasněny.

Role proteinu NS1 je nezbytná i v exkluzivní translaci virových proteinů. V translaci hrají roli především 5'UTR (untranslated region) úseky, které se nacházejí mezi cap strukturou a kódující oblastí mRNA. Úseky 5'UTR jsou konzervovány u všech mRNA chřipkového viru. Do těchto úseků se váže protein NS1. Pokud byly tyto úseky nahrazeny 5'UTR vyskytujícími se u buněčných mRNA, exkluzivní translace dále neprobíhala (Park a Katze, 1995). Infekce chřipkového viru ovlivňuje podjednotku proteinu eIF-4F (eucaryotic initiation factor – 4F), který funguje jako iniciační faktor translace (Feigenblum a Schneider, 1994). Protein NS1 se váže na jeho podjednotku eIF-4GI. Přestože protein NS1 i podjednotky proteinu eIF-4F jsou schopny vázat RNA, jejich interakce probíhá přímou vazbou (Aragon et al., 2000). Předpokládá se role proteinu NS1 především v iniciaci translace virových mRNA a zřejmě i souvislost s jeho schopností vázat podjednotku eIF-4GI iniciačního faktoru eIF-4F. Protein NS1 zřejmě funguje jako specifický virový iniciátor translace. (Aragon et al., 2000).

Závěr:

Protein NS1 je z imunologického hlediska naprosto nepostradatelný protein pro úspěšnou infekci chřipkovým virem. Spektrum jeho účinků v inhibici buněčné protivirové obrany je obdivuhodné, zvláště s přihlédnutím k jeho relativně malé velikosti. Protein NS1 se uplatňuje v inhibici signálních drah rozpoznávajících virovou infekci v buňce, funguje jako antagonist interferonu, inhibuje spuštění adaptivní imunity na úrovni dendritických buněk, je schopen inhibovat RNA interferenci a zasahovat do buněčné exprese na několika úrovních. Při takové šíři působení proteinu NS1 se některé jeho funkce zdají protichůdné – příkladem může být inhibice PKR, inhibující buněčnou translaci, na jedné straně a inhibice buněčné translace na úrovni iniciátoru translace na straně druhé. Při bližším zkoumání však zjistíme, že virové proteiny jsou stále úspěšně translatovány. Přestože zmíněné inhibice jsou poměrně nespecifické, virové RNA jsou ze zainhibované exprese vyloučeny a opět proteinem NS1 je zajištěna úspěšná produkce, maturace a pučení virového potomstva z buňky. Tím se ukazuje, že oba na první pohled protichůdné zásahy mají smysl.

Spektrum funkcí proteinu NS1 je nejvíce rozvinuto u viru influenza A, který je také nejúspěšnějším typem viru chřipky. Protein NS1 je příkladem maximalizace funkčnosti při infekci při relativně malé velikosti proteinu, způsobené dlouhodobou evoluční selekcí typickou pro virové proteiny.

Senam literary:

Alonso-Caplen, F. V., Nemeroff, M. E., Qiu, Y. & Krug, R. M. (1992): Nucleocytoplasmic transport: the influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA. *Genes Dev*, **6**: 255–267

Ahlquist, P. (2002): RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*, **296**: 1270–1273

Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J. a Nieto, A. (2000): Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol*, **20**: 6259–6268

Barber, G. N. (2005): The dsRNA-dependent protein kinase, PKR and cell death. *Cell Death Differ*, **12**: 563-57

Barabino, S.M. a Keller, W. (1999): Last but not least: regulated poly(A) tail formation. *Cell*, **99**: 9–11

Bucher, E., Hemmes, H., de Haan, P., Goldbach, R. a Prins, M. (2004): The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol*, **85**: 983–991

Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J. a Nieto, A. (2003): PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol*, **84**: 3263–3274

Cantley, L. C. (2002): The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*, **296**: 1655–1657

Carrat, F. a Flahault, A. (2007): Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*, **25**: 6852–6862

Chen, Z., Y. Li a Krug, R. M. (1999): Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J*, **18**: 2273-2283

Chien, C.Y. , Xu, Y. , Xiao, R., Aramini, J.M., Sahasrabudhe, P.V. , Krug, R.M. a Montelione, G.T. (2004): Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode, *Biochemistry*, **43**: 1950–1962

Cullen, B. R. (2006): Viruses and microRNAs. *Nat. Genet*, **38**: S25-S30

- Dauber, B., Schneider, J. a Wolff, T.** (2006): Double-stranded RNA binding of influenza B virus nonstructural NS1 protein inhibits protein kinase R but is not essential to antagonize production of alpha/beta interferon. *J. Virol*, **80**: 11667-11677
- Delgadillo, M. O., Saenz, P., Salvador, B., Garcia, J. A. a Simon-Mateo, C.** (2004): Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J Gen Virol*, **85**: 993–999
- Efferson, C. L., Schickli, J., Ko, B. K., Kawano, K., Mouzi, S., Palese, P., García-Sastre, A. a Ioannides, C. G.** (2003): Activation of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by human dendritic cells infected with an attenuated influenza A virus expressing a CTL epitope derived from the HER-2/neu proto-oncogene. *J. Virol*, **77**: 7411-7424
- Ehrhardt, C. a Ludwig, S.** (2009): A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Microbiol*, **11**: 863–871
- Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J. G., Schmolke, M. a Ludwig, S.** (2007a): Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol*, **81**: 3058–3067
- Ehrhardt, C., Wolff, T., a Ludwig, S.** (2007b): Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by the nonstructural NS1 protein is not conserved among type A and B influenza viruses. *J Virol*, **81**: 12097–12100
- Ehrhardt, C., Marjuki, H., Wolff, T., Nurnberg, B., Planz, O., Pleschka, S. a Ludwig, S.** (2006): Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol*, **8**: 1336–1348
- Enami, K., Sato, T. A., Nakada, S. a Enami, M.** (1994): Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J. Virol*, **68**: 1432-1437
- Feigenblum, D. a Schneider, R. J.** (1994): Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J. Virol*, **67**: 3027-3035
- Fernandez-Sesma, A., Marukian, S., Ebersole, B. J., Kaminski, D., Park, M. S., Yuen, T., Sealfon, S. C., Garcia-Sastre, A. a Moran, T. M.** (2006): Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J Virol*, **80**: 6295–6304

- Fortes, P., Beloso, A. a Ortín, J.** (1994): Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J*, **13**: 704-712
- Garaigorta, U. a Ortin, J.** (2007): Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res*, **35**: 4573–4582
- Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. a Esteban, M.** (2006): Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**: 1032–1060
- Garcia-Sastre, A.** (2005): Interferon antagonists of influenza viruses. in *Modulation of Host Gene Expression and Innate Immunity by Viruses* (Palese, P. ed.), Springer.
- Garcia-Sastre, A.** (2001): Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology*, **279**: 375–384
- Gil, J., Alcami, J. a Esteban, M.** (2000): Activation of NF- κ B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I κ B kinase complex. *Oncogene*, **19**: 1369–1378
- Goodman, A.G., Smith, J.A., Balachandran, S., Perwitasari, O., Proll, S.C., Thomas, M.J., Korth, M.J., Barber, G.N., Schiff, L.A., a Katze, M.G.** (2007): The cellular protein P58IPK regulates influenza virus mRNA translation and replication through a PKR-mediated mechanism. *J Virol*, **81**: 2221-2230
- Graham, M. B., Braciale, V. L. a Braciale, T. J.** (1994): Influenza virus-specific CD4+ T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection. *J. Exp. Med*, **180**: 1273-1282
- Guillot, L., Le Goffic, R., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., et al.** (2005): 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*, **280**: 5571–5580
- Guo, Z., Chen, L.M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., et al.** (2007): NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **36**: 263–269
- Hale, B.G., Batty, I.H., Downes, C.P., a Randall, R.E.** (2008): 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*, **283**: 1372–1380

- Hamilton, A. J. a Baulcombe, D. C.** (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**: 950–952
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. a Hannon, G. J.** (2001): Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**: 1146–1150
- Hartmann, R., Justesen, J., Sarkar, S. N., Sen, G. C. a Yee, V. C.** (2003): Crystal structure of the 2'-specific and double-stranded RNA-activated interferon-induced antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase. *Mol Cell*, **12**: 1173–1185
- Hatada, E., Saito, S. a Fukuda, R.** (1999): Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol*, **73**: 2425–2433
- Hatada, E. a R. Fukuda.** (1992): Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J. Gen. Virol*, **73**: 3325-3329
- Haye, K., Burmakina, S., Moran, T., García-Sastre, A. a Fernandez-Sesma, A.** (2009): The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J Virol*, **83**: 6849–62
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Murphy, S., McCauley, J., Goodbourn, S. a Barclay, W.** (2006): Variation in the ability of human influenza A viruses to induce and inhibit the IFN-beta pathway. *Virology*, **347**: 52–64
- Hinnebusch, A.G.** (2000): Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In: N. Sonenberg, J.W.B. Hershey and M.B. Mathews, Editors, *Translational Control of Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 185–243.
- Horimoto, T. a Kawaoka, Y.** (2001): Pandemic threat posed by avian influenza A viruses *Clin. Microbiol. Rev*, **14**: 129-149
- Justesen, J., Hartmann, R. a Kjeldgaard, N.O.** (2000): Gene structure and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family. *Cell. Mol. Life Sci*, **57**: 1593–1612
- Karin, M. a Y. Ben-Neriah.** (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol*, **18**: 621-663
- Katze, M. G., DeCorato, D. a Krug, R. M.** (1986): Cellular mRNA translation is blocked at both initiation and elongation after infection by influenza virus or adenovirus. *J. Virol*, **60**: 1027-1039

- Keller, W., Bienroth, S., Lang, K.M. a Christofori, G.** (1991): Cleavage and polyadenylation factor (CPF) specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA. *EMBO J*, **10**: 4241–4249
- Ketting, R. F., Haverkamp, T. H. , van Luenen, H. G. a Plasterk, R. H.** (1999): *mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA Interference, is a Homolog of Werner Syndrome helicase and RNaseD *Cell*, **99**: 133-141
- Kim, M. J., Latham, A. G. a Krug, R. M.** (2002): Human influenza viruses activate an interferon-independent transcription of cellular antiviral genes: outcome with influenza A virus is unique. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**: 10096-10101
- Knipe, D. M. a Howley, P. M.** (2007): *Fields Virology*, 5th Edition. Lippincott Williams and Wilkins.
- Kok, K. H. a Jin, D. Y.** (2006): Influenza A virus NS1 protein does not suppress RNA interference in mammalian cells. *J Gen Virol*, **87**: 2639–2644
- Krug, R. M., Yuan, W., Noah, D. L. a Latham, A. G.** (2003): Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*, **309**: 181-189
- Legge, K. L. a Braciale, T. J.** (2003): Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity*, **18**: 265-277
- Li, Y., Chan, E. Y., Li, J., Ni, C., Peng, X., Rosenzweig, E., Tumpey, T. M. a Katze, M. G.** (2010): MicroRNA expression and virulence in pandemic influenza virus-infected mice. *J. Virol*, **84**: 3023-3032
- Li, S., Min, J. Y., Krug, R. M. a Sen, G. C.** (2006): Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology*, **349**: 13–21
- Li, W. X., Li, H., Lu, R., Li, F., Dus, M., Atkinson, P., Brydon, E. W., Johnson, K. L., Garcia-Sastre, A. et al.** (2004): Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 1350–1355
- Li, Y., Chen, Z.Y., Wang, W., Baker, C.C. a Krug, R.M.** (2001): The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo. *RNA*, **7**: 920–931
- Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M. a Hiscott, J.** (1998): Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol*, **18**: 2986-2996

- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G. a Krug, R. M.** (1995): Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology*, **214**: 222-228
- Lu, Y., Qian, X. Y. a Krug, R. M.** (1994): The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev*, **8**: 1817-1828
- Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C. a Mathews, M. B.** (1992): Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol. Cell. Biol*, **12**: 5238-5248
- Matskevich, A. A. a Moelling, K.** (2007): Dicer is involved in protection against influenza A virus infection. *J Gen Virol*, **88**: 2627–2635
- McGill, J., Heusel, J.W. a Legge, K.L.** (2009): Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J Leukoc Biol*, **86**: 803-812
- McManus, M. T.** (2004): Small RNAs and immunity. *Immunity*, **21**: 747–756
- Mellman, I. a Steinman, R. M.** (2001): Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, **106**: 255-258
- Melville, M. W., Tan, S.-L., Wambach, M., Song, J., Morimoto, R. I. a Katze, M. G.** (1999): The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58^{IPK}, is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity. *J. Biol. Chem*, **274**: 3797-3803
- Min, J. Y., Li, S., Sen, G. C. a Krug, R. M.** (2007): A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology*, **363**: 236–243
- Min, J. Y. a Krug, R. M.** (2006): The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: 7100–7105
- Muraki, Y., Furukawa, T., Kohno, Y., Matsuzaki, Y., Takashita, E., Sugawara, K., Hongo, S.,** (2010): Influenza C virus NS1 protein upregulates the splicing of viral mRNAs. *J Virol*, **84**: 1957-66
- Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B.R. a Qin, J.** (2000): A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J*, **19**: 5567–5574

Nemeroff, M. E., S. M. Barabino, Y. Li, W. Keller, and 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

Noah, D. L., Twu, K. Y. a Krug, R. M. (2003): Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*, **307**: 386–395

Nyman, T.A., Tolo, H., Parkkinen, J. a Kalkkinen, N.(1998): Identification of nine interferon-alpha subtypes produced by Sendai virus-induced human peripheral blood leucocytes. *Biochem J*, **329**: 295–302

Okkenhaug, K. a Vanhaesebroeck, B. (2001): New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci STKE*, **65**: PE1.

Park, Y. W. a Katze, M. G. (1995): Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem*, **270**: 28433–28439

Qiu, Y. a Krug, R.M. (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

Peters, G.A., Hartmann, R. , Qin, J. a Sen, G.C. (2001): Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR, *Mol. Cell. Biol*, **21**: 1908–1920

Plasterk, R.H. (2002): RNA silencing: the genome's immune systém. *Science*, **296**: 1263–1265

Platanias, L. C. (2005): Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol*, **5**: 375-386

Rodriguez, A., Perez-Gonzalez, A. a Nieto, A. (2007): Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J. Virol*, **81**: 5315-5324

Rothberg, M. B., Haessler, S. D. a Brown, R. B. (2008): Complications of viral influenza. *Am. J. Med*, **121**: 258–264

Salvatore, M., Basler, C. F., Parisien, J. P., Horvath, C. M., Bourmakina, S., Zheng, H., Muster, T., Palese, P. a Garcia-Sastre, A. (2002): Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol*, **76**: 1206–1212

- Samuel, C.E.** (2001): Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**: 778–809
- Sarkar, S.N., Bandyopadhyay, S., Ghosh, A. a Sen, G.C.** (1999): Enzymatic characteristics of recombinant medium isozyme of 2'-5' oligoadenylate synthetase. *J. Biol. Chem.*, **274**: 1848–1855
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, T., Noguchi, S., Tanaka, N. a Taniguchi, T.** (2000): Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α / β gene induction. *Immunity*, **13**: 539–548
- Satterly, N., Tsai, P. L., van Deursen, J., Nussenzveig, D. R., Wang, Y., Faria, P. A., Levay, A., Levy, D. E. a Fontoura, B. M.** (2007): Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**: 1853–1858
- Schafer, S. L., Lin, R., Moore, P. A., Hiscott, J. a Pitha, P. M.** (1998): Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *J. Biol. Chem.*, **273**: 2714-2720
- Schmolke, M. a García-Sastre, A.** (2010): Evasion of innate and adaptive immune responses by influenza A virus. *Cellular Microbiology*, Volume **12**, Issue 7, 873–880.
- Seth, R. B., Sun, L. , Ea, C. K. a Chen, Z. J.** (2005): Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*, **122**: 669-682
- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R. a Hiscott, J.** (2003): Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, **300**: 1148-1151
- Shimizu, K., Iguchi, A., Gomyou, R. a Ono, Y.** (1999): Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. *Virology*, **254**: 213–219
- Shin, Y.-K., Liu, Q., Tikoo, S. K., Babiuk, L. A. a Zhou, Y.** (2007a): Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J Gen Virol*, **88**: 13–18
- Shin, Y. K., Liu, Q., Tikoo, S. K., Babiuk, L. A. a Zhou, Y.** (2007b): Effect of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on influenza A virus propagation. *J. Gen. Virol*, **88**: 942-950
- Shin, Y. K., Li, Y., Liu, Q., Anderson, D. H., Babiuk, L. A. a Zhou, Y.** (2007c): SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signalling pathway activation. *J Virol*, **81**: 12730–12739

- Talon, J., C. M. Horvath, R. Polley, C. F. Basler, T. Muster, P. Palese, and A. Garcia-Sastre (2000):** Activation of interferon regulatory factor 3 (IRF-3) is inhibited by the influenza A viral NS1 protein. *J. Virol*, **74**: 7989-7996
- Toker, A. a Cantley, L. C. (1997):** Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, **387**: 673-67
- Van Huizen, R., Martindale, J. L., Gorospe, M. a Holbrook, N. J. (2003):** P58^{IPK}, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2 ϵ signaling. *J. Biol. Chem*, **278**: 15558-15564
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A. a Garcia-Sastre, A. (2000):** Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF- κ B and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol*, **74**: 11566-11573
- Wang, W., Riedel, K., Lynch, P., Chien, C. Y., Montelione, G. T. a Krug, R. M. (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
- Wang, W. a Krug, R. M. (1998):** U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6 snRNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein. *RNA*, **4**: 55-64
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B. a Lough, T. (2001):** Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**: 834-842
- Wathelet, M.G., Lin, C.H., Parekh, B.S., Ronco, L.V., Howley, P.M. a Maniatis, T. (1998):** Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol. Cell*, **1**: 507-518
- Williams, B. R. (1999):** PKR: a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, **18**: 6112-6120
- Wurzer, W.J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Berberich-Siebelt, F., Wolff, T., Walczak, H., et al. (2004):** 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*, **279**: 30931-30937

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T. (2004): The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**: 730–737.

Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G. A., and Backer, J. M. (1998): Regulation of the p85/p110 Phosphatidylinositol 3'-Kinase: Stabilization and Inhibition of the p110 α Catalytic Subunit by the p85 Regulatory Subunit. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 1379–1387

Yuan, W.M. a Krug, R.M. (2001): Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J*, **20**: 362–371

Zhirnov, O. P. a Klenk, H. D. (2007): Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis*, **12**: 1419–1432

Zürcher, T., Marión, R. M. a Ortín, J. (2000): Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J. Virol*, **74**: 8781–8784