

## 特邀综述

**陈吉龙** 中国科学院微生物研究所研究员、研究组长、中国科学院“百人计划”入选者、博士生导师、中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室研究员、美国癌症研究协会和美国细胞生物学会会员，兼任中国科技大学博士生导师、安徽大学研究生导师、福建农林大学客座教授。长期从事病毒感染的信号通路、抗病毒免疫机制、病毒感染与肿瘤发生等领域的科研工作。在国内外重要学术刊物上发表论文近 50 篇，申请专利两项，主编专著一本（高等教育出版社，ISBN: 7-04-005107-9），其中 SCI 论文 30 余篇，包括在国际核心学术刊物 Blood、Nature Cell Biology、Nature Chemical Biology、Oncogene、J Cell Biol、PNAS、Neoplasia、J Biol Chem、Mol Biol Cell 等杂志上发表了高水平研究论文。



## 甲型流感病毒蛋白和遗传物质在宿主细胞质内顺向转运过程及其机制

池晓娟<sup>1,2</sup>, 王松<sup>2</sup>, 黄一帆<sup>1</sup>, 陈吉龙<sup>2</sup>

1 福建农林大学动物科学学院动物医学系, 福建 福州 350002

2 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

池晓娟, 王松, 黄一帆, 等. 甲型流感病毒蛋白和遗传物质在宿主细胞质内顺向转运过程及其机制. 生物工程学报, 2012, 28(9): 1021-1030.

Chi XJ, Wang S, Huang YF, et al. Mechanism underlying the anterograde transport of the influenza A virus transmembrane proteins and genome in host cytoplasm. Chin J Biotech, 2012, 28(9): 1021-1030.

**摘要:** 流感病毒的蛋白和基因组在宿主细胞内能否正确地转运到相关部位, 直接影响到病毒颗粒的形态发生。流感病毒跨膜蛋白 (HA、NA 和 M2) 主要通过宿主细胞的运输膜泡实现转运, 而宿主细胞的蛋白转运机器参与了这一过程。新合成的流感病毒核糖核蛋白复合物 (vRNPs) 出核后, 通过与活化的 Rab11 相结合, 聚集于邻近微管组织中心 (MTOC) 的胞内体。然后以运输小膜泡的形式, 沿着 MTOC 的微管网络向细胞膜方向转运。跨膜蛋白和基因组在细胞质内的转运受一些宿主因子的调控, 如 ARHGAP21 和小 G 蛋白 Cdc42 能够调节 NA 蛋白向细胞膜转运, Rab11 协助 vRNPs 从 MTOC 向细胞膜转运。文中主要讨论新合成的流感病毒跨膜蛋白和遗传物质在宿主细胞质内的顺向转运 (Anterograde transport) 过程与调控。

**关键词:** 甲型流感病毒, 跨膜蛋白, 基因组, 宿主因子, 顺向转运

**Received:** June 16, 2012; **Accepted:** July 12, 2012

**Supported by:** China National Key Technology R&D Program (No. 2009BA183B01-8), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB534004).

**Corresponding author:** Yifan Huang. Tel: +86-591-83789305; Fax: +86-591-83768251; E-mail: zjhyfang@163.com

Jilong Chen. Tel: +86-10-64807300; Fax: +86-10-64807980; E-mail: chenjl@im.ac.cn

国家科技支撑项目 (No. 2009BA183B01-8), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB534004) 资助。

# Mechanism underlying the anterograde transport of the influenza A virus transmembrane proteins and genome in host cytoplasm

Xiaojuan Chi<sup>1,2</sup>, Song Wang<sup>2</sup>, Yifan Huang<sup>1</sup>, and Jilong Chen<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Medicine, College of Animal Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

<sup>2</sup> CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Influenza virus assembly requires the completion of viral protein and vRNP transport to the assembly site at the plasma membrane. Therefore, efficient regulation of intracellular transport of the viral proteins and vRNPs to the surface of the host cell is especially important for virus morphogenesis. Influenza A virus uses the machineries of host cells to transport its own components including ribonucleoproteins (vRNPs) and three transmembrane proteins hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA) and matrix 2 protein (M2). It has been shown that newly synthesized vRNPs are associated with active form of Rab11 and accumulate at recycling endosomes adjacent to the microtubule organizing center (MTOC) following nuclear export. Subsequently, they are transported along the microtubule network toward the plasma membranes in cargo vesicles. The viral transmembrane proteins are translated on the rough endoplasmic reticulum and transported to the virus assembly site at the plasma membrane. It has been found that several host factors such as ARHGAP21 and GTPase Cdc42 are involved in regulation of intracellular trafficking of influenza A virus transmembrane proteins including NA. In this review, we will highlight the current knowledge about anterograde transport and its regulation of the influenza A virus transmembrane proteins and genome in the host cytoplasm.

**Keywords:** influenza A virus, transmembrane proteins, genome, host factor, anterograde transport

甲型流感病毒由3个主要的亚病毒成分组成：  
1) 三种跨膜蛋白，包括血凝素 (Hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 和基质蛋白 2 (Matrix protein 2, M2)；2) 中间层基质蛋白 M1；3) 内部螺旋形的核糖核蛋白 (vRNP)<sup>[1]</sup>。流感病毒利用宿主细胞的复制机制，完成自身组分的合成和转运<sup>[2]</sup>。病毒首先通过囊膜上的 HA 糖蛋白与宿主细胞表面的唾液酸受体相结合<sup>[3]</sup>，吸附于宿主细胞表面，再通过内吞作用进入细胞内。然后 H<sup>+</sup>经 M2 离子通道进入病毒粒子内，使病毒内部的 pH 值由中性变为酸性。此时，HA

的构象发生改变，形成  $\alpha$  螺旋，暴露融合肽，使病毒与宿主细胞相互融合，将病毒的内部组分释放出来<sup>[4]</sup>。vRNP 和 M1 进入细胞核，开始病毒基因组的转录与复制过程。编码病毒蛋白的 mRNAs 经由 NXF1/TAP (Nuclear RNA export factor 1) 作用出核<sup>[5]</sup>。病毒的 HA、NA 和 M2 蛋白在粗面内质网中翻译，又经高尔基体向细胞膜的病毒包装位点处转运。另一方面，病毒基因组 RNA 与核蛋白 (Nucleoprotein, NP) 形成 vRNP 复合物，经 CRM1 介导出核，在这一过程中病毒蛋白 M1、NP 和非结构蛋白 NS2 发挥重要作

用<sup>[6-10]</sup>。新合成的 vRNPs 以及其他病毒蛋白出核后也向特定的病毒包装位点转移,各组分之间发生有序的相互作用,开启病毒粒子的包装和出芽过程。病毒粒子的形态发生需要各组分准确的转运到相应的包装位点和正确的分类排序。在某种程度上,这一过程有赖于宿主细胞转运机制的精确时空调控作用。以下将主要阐述新合成的流感病毒跨膜蛋白和基因组在宿主细胞质内的顺向转运过程及其机制,有助于我们更加深入地了解流感病毒的致病机制,为抗流感药物的设计提供参考依据。

## 1 跨膜蛋白的转运过程

流感病毒的 HA、NA 和 M2 这 3 个跨膜蛋白在宿主细胞的粗面内质网核糖体内合成。然后,它们被转运到高尔基体,并由高尔基体反面网络状结构 (TGN) 出高尔基体,再由各自的运输小泡向细胞膜运输<sup>[11]</sup>。流感病毒的跨膜蛋白根据顶端分选信号 (Apical sorting signals) 在细胞膜上有序地分类排列<sup>[12]</sup>,其中 M2 的分选信号仍不完全清楚。流感病毒的跨膜蛋白在宿主细胞质内顺向转运过程中经过不断的糖基化等修饰,HA 和 NA 被折叠和糖基化后,HA 组装成三聚体,NA 和 M2 则组装成四聚体。

### 1.1 HA 的转运过程

HA 是典型的 I 型糖蛋白,它是流感病毒最主要的表面糖蛋白,其三聚体的头部含有 3 个受体结合位点。它与唾液酸受体的结合,是流感病毒吸附于宿主细胞的关键步骤。因此,HA 是流感病毒不可缺失的部分,必须准时并且准确地转运到包装位点,进入子代病毒粒子。

HA 在核糖体内翻译后,又在氨基末端信号的促进下,生成多肽链。随后移入粗面内质网腔内,再进入高尔基体加工修饰。在这个过程中,HA 发生一系列的共翻译修饰和翻译后修饰:在粗面内质网中,HA 附加上 N-糖苷侧链碳水化合物;在高尔基体内,重装寡糖和通过蛋白水解酶作用将 HA 前体裂解成 HA1 和 HA2。过表达高尔基体微管相关蛋白 210 (GMAP-210) 会阻碍 HA 从内质网向高尔基体的顺向运输<sup>[13]</sup>。最后,HA 由 TGN 运输到细胞膜表面,GTP 结合蛋白参与该过程<sup>[14]</sup>。例如,小 G 蛋白 Rab6 会调控 HA 在 TGN 的转运,表现为抑制其顺向转运或正向调节其逆向运输<sup>[15]</sup>。

关于 HA 自身结构的研究显示,位于 HA 跨膜区 (TMD) 中间部分的氨基酸序列对 HA 向细胞膜转运的顶端分选 (蛋白质分选) 有重要作用,外质部分对脂筏结合有重要作用。相关研究发现,损耗宿主细胞的胆固醇后,野生型 HA 进入脂筏的能力减弱,但在顶端和基底外侧部的分类排列不受影响。研究发现,HA 跨膜区的 520 和 521 位氨基酸突变后,在脂筏存在时,HA 突变体向细胞膜表面的转运受抑制。而将宿主细胞胆固醇损耗后,该 HA 突变体则能随意的转运<sup>[16]</sup>。由此可见,HA 进入脂筏是其顶端分选的必要条件,但非充分条件。可能在 HA 顶端分选排列时,它的跨膜区还要结合其他蛋白或者脂类。另外,删除 HA 的胞质区尾部能减弱 HA 与脂筏的连接,但对其顶端转运 (Apical transport) 无影响<sup>[17]</sup>。Brewer 和 Roth 发现在 MDCK 细胞中,经突变的 HA (Cys543→Tyr543) 不会向细胞膜的顶端部位转运,而是直接转运至基底膜,但它在胞内的运

输以及在细胞表面的表达均不受影响<sup>[18]</sup>。

HA 出高尔基体的 TGN 后,经胞吐通路向细胞膜上转运。除小 G 蛋白 Rab 外,目前还不清楚其他宿主因子参与调控这一过程的情况。早期的研究显示抗小窝蛋白 1 (Caveolin-1) 抗体会抑制 HA 在 MDCK 细胞中的转运<sup>[19]</sup>。然而, Manninen 等在观察敲除 caveolin-1 的 MDCK 细胞和正常 MDCK 细胞内 HA 向细胞膜表面转运时,发现两者并无明显差异。因此,他们认为, caveolin-1 不是 HA 向细胞膜表面有效转运所必需的宿主因子<sup>[20]</sup>。对于两种研究得出的不同结果, Scheiffle 等认为,可能是因为 caveolin-1 抗体与高分子量的 caveolin-1 寡聚物结合后,使顶端转运出现空间障碍,导致 HA 的转运受抑制。至于 HA 是否还受到其他宿主因子的调控了解甚少,有待进一步研究。

## 1.2 NA 的转运过程

流感病毒粒子出芽后,由于 HA 与宿主细胞表面的唾液酸相互作用,病毒粒子仍然附着在细胞膜上。所以,病毒粒子的有效释放需要依赖于 NA 蛋白的活性。NA 为糖苷外切酶,可以从  $\alpha$ -糖苷键上去除唾液酸残基,使病毒粒子脱离宿主细胞受体而释放<sup>[21]</sup>。Calder 等研究发现,NA 聚集在出芽病毒粒子的某单一位点上<sup>[22]</sup>,反映了 NA 在病毒粒子从细胞表面释放过程中起重要作用。另外,也有一些研究结果显示 NA 参与流感病毒的形态发生及出芽过程<sup>[1,23-24]</sup>。由此可见,有效地将 NA 转运到细胞膜表面是子代流感病毒颗粒的形态发生、出芽和成功地从感染细胞中释放的重要前提条件。

NA 是 II 型跨膜糖蛋白。Kundu 等通过对

NA 跨膜区的研究,首次证明了其跨膜区在蛋白质分选和脂筏结合中的作用<sup>[25]</sup>。NA 跨膜区中数个肽段含有蛋白极性运输的信号。Nayak 实验室研究发现,位于 NA 跨膜区的 19 个氨基酸(aa 9-27)能够充分介导 NA 向细胞膜运输,跨膜区的序列对于 NA 与脂筏结合也有重要作用。虽然这些序列有重叠部分,但是它们作用不同,不会相互影响<sup>[26]</sup>。后来,Barman 等对 NA 跨膜区进行深入研究,发现 NA 跨膜区的 aa11-13、aa23-26 和 aa32-35 在 NA 向细胞膜极性运输中起重要作用<sup>[27]</sup>。

关于 NA 在宿主细胞内转运过程中是否受到宿主因子调控的研究报道很少。最近,我们研究发现,分布于宿主细胞质的小 G 蛋白 Cdc42 在有活性状态下,能促进 NA 蛋白向细胞膜上运输,而 Cdc42 特异的 GTP 酶激活蛋白 ARHGAP21 则会抑制该过程,从而影响流感病毒复制<sup>[28]</sup>。我们研究还发现,流感病毒感染导致了 ARHGAP21 表达水平的下调,从而使 Cdc42 活性升高,有利于 NA 蛋白向细胞膜上转运<sup>[28]</sup>。

## 1.3 M2 的转运过程

M2 除了具有离子通道功能,目前不少研究证实 M2 可与胆固醇结合<sup>[29-30]</sup>,但是当病毒的其他蛋白不表达时,M2 则定位于细胞膜的无脂筏区域<sup>[31]</sup>。Chen 等<sup>[32]</sup>和 Rossman 等<sup>[29]</sup>推测 M1 与 M2 结合会募集 M2 于富含脂筏的病毒出芽位点,然后结合胆固醇,使 M2 稳定地结合在出芽位点,随后成为子一代病毒粒子的结构成分。最近研究发现,位于 M2 胞内区尾部的两亲性螺旋(Amphipathic helix)插入细胞膜,改变出芽部位细胞膜的弯曲度,使其断裂,以利于病毒出芽。



含有 17 个氨基酸的高度保守的 M2 两亲性螺旋位于正在出芽的病毒粒子的颈部,为细胞膜断裂所必需,参与完成病毒出芽的最后步骤<sup>[33]</sup>。另有报道,HA、NA、M1 和 M2 蛋白的活性可能可以循序地调试细胞膜的弯曲度而调控病毒出芽过程<sup>[34]</sup>。

一些研究探讨了新合成的 M2 在宿主细胞质内的转运过程。Rossman 等通过敲除 Rab11 观察 M2 蛋白转运是否受影响。结果发现, M2 在细胞表面的数量减少了 40%<sup>[33]</sup>,证明 Rab11 在 M2 向细胞膜转运过程中起重要作用。有趣的是, M2 蛋白高表达时会减慢 HA 跨膜糖蛋白通过高尔基体的转运速率。用金刚烷胺处理后, HA 的转运不受影响,推测 HA 在高尔基体内的转运延迟是由于有活性的 M2 蛋白使高尔基体与细胞质的 pH 值平衡,而不是因为胞内转运机器的饱和<sup>[35]</sup>。

## 2 vRNPs 的转运过程

vRNPs 是由 8 条独立的 vRNA 片段、聚合酶 (PB2、PB1、PA) 及 NP 蛋白组成。vRNPs 从病毒粒子中释放,并随后进入细胞核,在核内复制产生新的 vRNPs 是一个极其复杂的过程。而关于该过程的研究成果也很多,可参见相关报道<sup>[36-40]</sup>。而这里主要阐述新合成的 vRNPs 从细胞质运输到细胞膜上的顺向转运过程。

新合成的 vRNPs 先聚集在微管组织中心 (MTOC) 附近,然后依靠 NP 的蛋白质分选靶向活性,向细胞膜方向运输<sup>[41]</sup>。因为 NS2 在 M1 上的结合位点遮盖了 M1 的核定位信号 (NLS),所以,可以防止 vRNPs 再次进入细胞核。同样,

NP 通过与丝状肌动蛋白结合,将 vRNPs 滞留在细胞质内<sup>[42]</sup>。

研究发现, Rab11 参与 vRNPs 从 MTOC 向细胞膜转运的过程。Rab11 是 Rab 小分子 GTPase 家族的一个亚家族成员,主要位于再循环胞内体 (Recycling endosomes, RE)、TGN 和质膜上,它能调节部分蛋白和囊泡在这些细胞器之间的转运过程<sup>[43-44]</sup>。Rab 家族大约有 80 个成员,其中 Rab5 和 Rab7 等也被报道参与流感病毒成分的转运过程<sup>[45-46]</sup>。Rab5A 可促进病毒从细胞表面内吞进入早期胞内体的转运过程, Rab7 则作用于晚期胞内体转运<sup>[47]</sup>。Rab11 与流感病毒之间的关系曾于 1998 年就有报道,不论是干扰 Rab11 表达还是过表达 GDP 分解抑制物 (GDI) 都不会影响流感病毒 HA 向细胞膜运输<sup>[44]</sup>。而 Rab11 对 vRNP 转运的调控作用是近几年才报道的。Eisfeld 等利用 NP 的单克隆抗体结合免疫荧光法在 A549 细胞中定位识别 vRNP,发现 vRNPs 在细胞质转运过程的每一个阶段都与 Rab11A 在一起。通过抑制 Rab11A 的表达或者高表达显性失活的 Rab11A 突变体,发现 vRNP 在细胞核周边区域大量滞留,而在细胞膜上却几乎不聚集<sup>[48]</sup>。Amorim 等也报道,有活性的 Rab11 与 vRNP 相互作用的效率比失活的 Rab11 与之作用的效率高十倍<sup>[49]</sup>。最新的研究报道指出,新合成的 vRNP 通过病毒 RNA 聚合酶与 Rab11 相互作用,然后定位于含有活性 Rab11 (GTP-bound Rab11) 的再循环胞内体中,最后沿着微管向细胞膜转运<sup>[50]</sup>。Amorim 之前也报道说明, vRNP 在细胞质中的转运过程需要依赖于微管的作用<sup>[49]</sup>。

值得注意的是, vRNP 的聚集区域不在细胞

膜上,而在其附近。所以,Rab11A可能把vRNP传输到细胞膜附近区域后就与vRNP分开,不会同vRNP一起进入病毒粒子。这一猜想与之前Shaw的研究结果相一致。Shaw等在纯化后的流感病毒粒子中并未发现Rab11A<sup>[51]</sup>。Rab11在流感病毒粒子出芽时也发挥重要作用,当Rab11的表达量减少时,病毒粒子的释放量也随之减少<sup>[52]</sup>。此外,Eisfeld等研究揭示,细胞内HIV Rev结合蛋白(HIV Rev-binding protein, HRB)能够促进流感病毒vRNPs从细胞核周边区域向细胞膜转运。HRB能与NEP(即NS2)在细胞核周围相互作用,所以他们认为,NEP对该转运过程可能也有贡献<sup>[53]</sup>。

由此可见,vRNP从细胞核到细胞膜的转运过程中需要多种宿主细胞成分和细胞结构参与,包括Rab11、HRB、MTOC、再循环胞内体等。然而,vRNP转运的详细机制以及是否还需要其他因素的协助仍待深入研究。

### 3 小结

综上,我们对流感病毒的跨膜蛋白和基因组在宿主细胞质内的顺向转运过程已经有了一定的认识。跨膜蛋白HA、NA和M2的mRNA在NXF1/TAP的作用下,进入粗面内质网开始翻译并进行修饰,又在高尔基体中进一步修饰,然后它们分别以三聚体或四聚体的形式向细胞膜上的病毒颗粒包装位点转运。期间,Cdc42、Rab11分别参与NA和M2的转运。最后它们依靠各自跨膜区上分选信号和锚定信号的调节,在病毒包装位点有序排列,最终进入病毒粒子。新合成的vRNPs通过CRM1介导从核孔复合体(NPC)出

核后,先通过与MTOC附近胞内体上的Rab11结合,聚集在MTOC周围,然后经微管网络向细胞膜的附近区域聚集。vRNP与Rab11二者分离后,vRNP进入病毒粒子,而Rab11返回胞内体(图1)。

### 4 展望

流感病毒颗粒的形态发生是病毒致病的关键步骤。当包装流感病毒的所需组分有序地聚集于细胞膜特定位点,为病毒的包装做好准备时,病毒开启其包装机制,包装出成熟的子一代病毒粒子。包装病毒的所需组分缺失或排列混乱时,会严重影响病毒的形态发生过程<sup>[1]</sup>。由此可见,病毒组分的转运过程必须受到严格的时间和空间调控。然而,病毒组分在宿主细胞转运过程的时空调控机理仍然所知甚少,有待于系统深入的研究。值得注意的是,病毒各组分之间还存在着微妙的平衡关系。如当HA与唾液酸之间的亲和力增强时,NA切除受体的活性就会受到阻碍,从而使病毒的释放量减少;M2表达量过高时会影响HA的转运。这些现象都暗示着,流感病毒的转运、包装和释放是极其复杂的过程,它不仅依赖于宿主细胞的转运机器,还要求自身各组分之间相互协调、作用及达到量效平衡关系。而目前我们对流感病毒这方面的研究虽然已经有了一定的基础,但是还远不够透彻,不论是病毒与宿主细胞之间,还是病毒各组分之间,都有许多未知的相互作用因素需要我们去发现。基于对流感病毒蛋白和基因组结构和功能的不断阐明,相信它们在细胞质内的转运过程及其机制也会被不断揭晓。

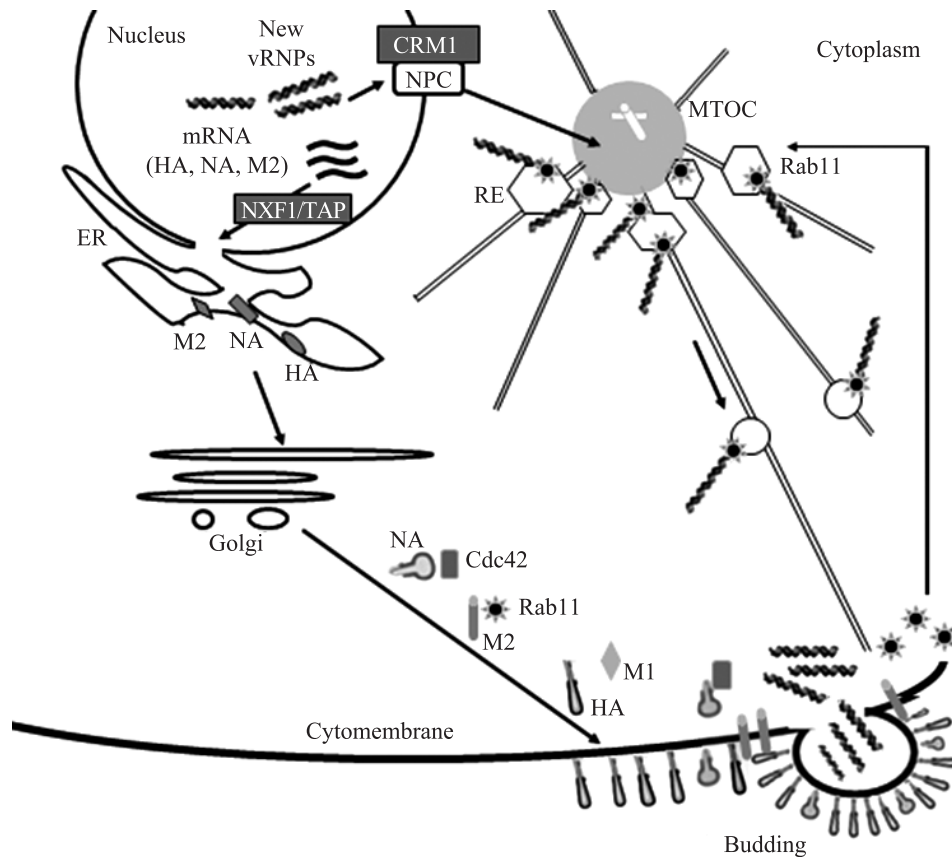


图1 流感病毒跨膜蛋白和基因组在宿主细胞质内顺向转运过程。HA、NA和M2的mRNA出核进入粗面内质网合成蛋白质。随后蛋白转运到高尔基体,进行糖基化等修饰,最后通过囊泡运输的形式向细胞膜上的病毒包装位点转运。Cdc42和Rab11分别调节NA和M2的转运过程。新合成的vRNPs经CRM1途径从NPC出核,通过与胞内体中活化的Rab11结合,聚集在MTOC区,然后该复合物经MTOC的微管转运到包装位点附近,vRNP与Rab11分开,vRNP进入病毒粒子。

Fig.1 Model of the anterograde transport of the influenza A virus transmembrane proteins and genome in host cytoplasm. HA, NA and M2 mRNAs translocate to rough endoplasmic reticulum following nuclear export. Newly synthesized proteins are modified in ER and then transported to the Golgi, where they are further modified by glycosylation and so on. Finally, these transmembrane proteins are transported to the virion budding site of apical plasma membranes. Cdc42 and Rab11 regulate the transport of NA and M2, respectively. Newly synthesized vRNPs translocate to cytoplasm from the nucleus through CRM1 pathway. Then vRNPs move to recycling endosomes carrying Rab11, and associate with Rab11 vesicles adjacent to the MTOC. The Rab11-vRNP complex is then transported to the virion budding site along the microtubule network.

## REFERENCES

- [1] Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, et al. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res*, 2009, 143(2): 147-161.
- [2] Whittaker GR. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*, 2001, 3(5): 1-13.
- [3] Ge SQ, Wang ZL. An overview of influenza A virus receptors. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37(2):

- 157–165.
- [4] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 531–569.
- [5] Read EKC, Digard P. Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export. *J Gen Virol*, 2010, 91(5): 1290–1301.
- [6] Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, et al. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol*, 2001, 75(1): 408–419.
- [7] Ma K, Roy AM, Whittaker GR. Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology*, 2001, 282(2): 215–220.
- [8] Watanabe K, Takizawa N, Katoh M, et al. Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res*, 2001, 77(1): 31–42.
- [9] Cao S, Liu XL, Yu MR, et al. A nuclear export signal in the matrix protein of influenza A virus is required for efficient virus replication. *J Virol*, 2012, 86(9): 4883–4891.
- [10] Yu MR, Liu XL, Cao S, et al. Identification and characterization of three novel nuclear export signals in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol*, 2012, 86(9): 4970–4980.
- [11] Wandinger-Ness A, Bennett MK, Antony C, et al. Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J Cell Biol*, 1990, 111(3): 987–1000.
- [12] Nayak DP, Hui EK, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*, 2004, 106(2): 147–165.
- [13] Pernet-Gallay K, Antony C, Johannes L, et al. The overexpression of GMAP-210 blocks anterograde and retrograde transport between the ER and the Golgi apparatus. *Traffic*, 2002, 3(11): 822–832.
- [14] Gravotta D, Adesnik M, Sabatini DD. Transport of influenza HA from the trans-Golgi network to the apical surface of MDCK cells permeabilized in their basolateral plasma membranes: energy dependence and involvement of GTP-binding proteins. *J Cell Biol*, 1990, 111(6Pt2): 2893–2908.
- [15] Martinez O, Schmidt A, Salamero J, et al. The small GTP-binding protein Rab6 functions in intra-Golgi transport. *J Cell Biol*, 1994, 127(6Pt1): 1575–1588.
- [16] Lin S, Naim HY, Rodriguez AC, et al. Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 1998, 142(1): 51–57.
- [17] Zhang J, Pekosz A, Lamb RA. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol*, 2000, 74(10): 4634–4644.
- [18] Brewer CB, Roth MG. A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol*, 1991, 114(3): 413–421.
- [19] Scheiffele P, Verkade P, Fra AM, et al. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol*, 1998, 140(4): 795–806.
- [20] Manninen A, Verkade P, Le Lay S, et al. Caveolin-1 is not essential for biosynthetic apical membrane transport. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(22): 10087–10096.
- [21] Gong J, Xu W, Zhang J. Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr Med Chem*, 2007, 14(1): 113–122.
- [22] Calder LJ, Wasilewski S, Berriman JA, et al. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(23): 10685–10690.
- [23] Barman S, Adhikary L, Chakrabarti AK, et al. Role of transmembrane domain and cytoplasmic tail amino acid sequences of influenza A virus neuraminidase in raft association and virus budding. *J Virol*, 2004, 78(10): 5258–5269.



- [24] Chen BJ, Leser GP, Morita E, et al. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol*, 2007, 81(13): 7111–7123.
- [25] Kundu A, Avalos RT, Sanderson CM, et al. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol*, 1996, 70(9): 6508–6515.
- [26] Barman S, Nayak DP. Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association. *J Virol*, 2000, 74(14): 6538–6545.
- [27] Barman S, Ali A, Hui EK, et al. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. *Virus Res*, 2001, 77(1): 61–69.
- [28] Wang S, Li H, Chen YH, et al. Transport of influenza virus neuraminidase (NA) to host cell surface is regulated by ARHGAP21 and Cdc42 proteins. *J Biol Chem*, 2012, 287(13): 9804–9816.
- [29] Rossman JS, Jing X, Leser GP, et al. Influenza virus M2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *J Virol*, 2010, 84(10): 5078–5088.
- [30] Schroeder C, Heider H, Möncke-Buchner E, et al. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J*, 2005, 34(1): 52–66.
- [31] Leser GP, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology*, 2005, 342(2): 215–227.
- [32] Chen BJ, Leser GP, Jackson D, et al. The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the m1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J Virol*, 2008, 82(20): 10059–10070.
- [33] Rossman JS, Jing X, Leser GP, et al. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, 2010, 142(6): 902–913.
- [34] Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 2011, 411(2): 229–236.
- [35] Sakaguchi T, Leser GP, Lamb RA. The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 1996, 133(4): 733–747.
- [36] Whittaker G, Bui M, Helenius A. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol*, 1996, 70(5): 2743–2756.
- [37] Whittaker GR, Kann M, Helenius A. Viral entry into the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 627–651.
- [38] Cros JF, Palese P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, thogoto and borna disease viruses. *Virus Res*, 2003, 95(1/2): 3–12.
- [39] Cros JF, Garcia-Sastre A, Palese P. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic*, 2005, 6(3): 205–213.
- [40] Amorim MJ, Read EK, Dalton RM, et al. Nuclear export of influenza A virus mRNAs requires ongoing RNA polymerase II activity. *Traffic*, 2007, 8(1): 1–11.
- [41] Carrasco M, Amorim MJ, Digard P. Lipid raft-dependent targeting of the influenza A virus nucleoprotein to the apical plasma membrane. *Traffic*, 2004, 5(12): 979–992.
- [42] Digard P, Elton D, Bishop K, et al. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol*, 1999, 73(3): 2222–2231.
- [43] Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, et al. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol*, 1996, 135(4): 913–924.
- [44] Chen W, Feng Y, Chen D, et al. Rab11 is required for trans-Golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol Biol Cell*, 1998, 9(11):

- 3241–3257.
- [45] Brass AL, Huang IC, Benita Y, et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*, 2009, 139(7): 1243–1254.
- [46] König R, Stertz S, Zhou Y, et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*, 2010, 463(7282): 813–817.
- [47] Sieczkarski SB, Whittaker GR. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic*, 2003, 4(5): 333–343.
- [48] Einfeld AJ, Kawakami E, Watanabe T, et al. Rab11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. *J Virol*, 2011, 85(13): 6117–6126.
- [49] Amorim MJ, Bruce EA, Read EK, et al. A rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *J Virol*, 2011, 85(9): 4143–4156.
- [50] Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, et al. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e21123.
- [51] Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, et al. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog*, 2008, 4(6): e1000085.
- [52] Bruce EA, Digard P, Stuart AD. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *J Virol*, 2010, 84(12): 5848–5859.
- [53] Einfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. Human immunodeficiency virus rev-binding protein is essential for influenza A virus replication and promotes genome trafficking in late-stage infection. *J Virol*, 2011, 85(18): 9588–9598.