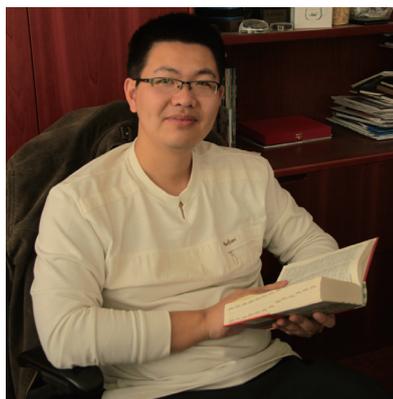


DOI: 10.13376/j.cbbls/2015071

文章编号: 1004-0374(2015)05-0539-10



施一, 中国科学院北京生命科学研究院副研究员, 硕士生导师, 中科院卢嘉锡青年人才奖获得者, 中科院卓越青年科学家项目获得者。中国免疫学会青年工作委员会委员, 中国微生物学会病毒学专业委员会青年工作委员会委员。中国科学院北京生命科学研究院比较与进化免疫学课题组(课题组长为高福院士)主要研究方向: 利用结构生物学技术等手段研究细胞免疫识别的分子基础与病原微生物跨种间传播的分子机制, 以及免疫相关分子的起源、结构基础与进化规律, 进而阐明机体免疫系统和病原的相互进化关系。同时研究表位呈递、T细胞表面受体与配体的相互作用及其识别规律, 天然免疫受体与其配体, 细胞因子与其受体的相互作用, 以及天然免疫感受器(innate immune sensor)识别核酸的分子机制。

禽流感病毒跨种传播的分子机制

张蔚¹, 施一^{1,2*}

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

2 中国科学院北京生命科学研究院, 北京100101)

摘要: 流感病毒是目前危害人类健康的主要病原微生物之一, 不但造成了巨大的经济损失, 而且影响着社会的稳定。除了偶尔出现的流感大暴发, 每年都有不少人死于季节性流感。尤其是2013年在中国暴发的H7N9禽流感疫情, 目前感染人数已超过600例, 死亡人数超过200人, 病毒已经在中国定居, 每年冬春季都会出现病例。流感病毒的天然宿主是禽类, 而禽流感病毒如何突破种间屏障去感染人, 是病毒学家一直关心的重要科学问题。主要描述了病毒受体结合特性影响跨种传播的分子机制, 包括H1、H2、H3、H5、H6、H7、H9、H10等不同亚型流感病毒受体结合特性转变的结构基础, 为流感病毒防控提供重要的理论基础。

关键词: 禽流感; 受体结合特性; 跨种传播机制; 晶体结构

中图分类号: Q939.4; R373.1 文献标志码: A

Molecular mechanisms on interspecies transmission of avian influenza viruses

ZHANG Wei¹, SHI Yi^{1,2*}

(1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology,
Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China;

2 Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Influenza virus is one of the major pathogenic microbes, which poses a threat to human health, and causes tremendous economic loss, affecting social stability. In addition to occasional flu pandemic, there are still

收稿日期: 2015-05-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2013CB531502, 2014CB542503); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31402196, 31400636)

*通信作者: E-mail: shiyi@im.ac.cn

many people died of seasonal flu. Especially, in 2013, novel avian H7N9 influenza viruses infected more than 600 people with death of more than 200 people. The avian H7N9 influenza viruses have been established in China, and cause human infections in winter and spring each year. The natural reservoir of influenza viruses are wild birds, and how the avian influenza viruses break through the species barrier to infect humans is an important scientific question. Here we describe the molecular mechanisms on interspecies transmission determined by receptor binding properties of the viruses, and the structural basis of divergent HA subtype viruses including H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9 and H10. This information could provide an important theoretical basis for the prevention and control of influenza viruses.

Key words: avian influenza virus; receptor binding property; interspecies transmission; crystal structure

流感病毒 (influenza virus) 是引起流行性感 (influenza) 的人畜共患传染病病原, 在分类学上属于正黏病毒科 (*Orthomyxoviridae*), 为有囊膜、多形态、分节段的单股负链 RNA 病毒。流感病毒根据病毒核蛋白 (nucleoprotein, NP) 和基质蛋白 (matrix protein, M1) 抗原性的不同, 可分为甲型 (A)、乙型 (B) 和丙型 (C) 三种。其中 A 型流感病毒由于抗原性变化最大, 其危害也最大, 在动物和人群中广泛分布, 常常以流行形式出现, 曾引起数次世界性流感大流行。能引起禽类感染的禽流感病毒均为 A 型流感病毒。

A 型流感病毒在温血动物中广泛存在, 能感染野鸟、家禽、猪、猫、马、老虎、鲸鱼、海豹、蝙蝠和人类。A 型流感病毒的基因组由 8 个负链 RNA 片段组成, 目前已能编码 16 种蛋白^[1]。A 型流感病毒根据表面抗原血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 抗原性和基因特性的不同, 又可分为多个亚型。二者可诱导具有亚型特异性的免疫反应, 因此在同一亚型的病毒之间可以产生免疫保护, 但在不同亚型的病毒之间只能产生部分交叉保护或没有保护。目前, A 型流感病毒可分为 18 个 HA 亚型 (H1~H16 均能在野生水禽中分离到; 而 H17 和 H18 的基因组则分离自蝙蝠体内, 其 HA 不具有常规流感病毒 HA 的功能, 也未能成功包装出完整病毒粒子) 和 11 个 NA 亚型 (N1~N9 分离自野生水禽, N10 和 N11 来自蝙蝠源流感样病毒基因组)^[2-5]。

为了实现跨种传播, A 型流感病毒需要改变其宿主嗜性以适应新的宿主类型, 而在这一过程中, 无论是病毒自身蛋白还是宿主因子都起到重要的作用^[6-7]。流感病毒的高变异率是病毒实现跨种传播的遗传学基础, 病毒变异的主要机制有两个。(1) 基因突变 (mutation), 也叫抗原漂移 (antigenic drift)。由于流感病毒的 RNA 聚合酶缺乏校对功能, 病毒

RNA 复制或转录为 mRNA 时容易出错而引起突变, 流感病毒每个核苷酸在每个复制周期中的突变率为 $5 \times 10^{-4} \sim 8 \times 10^{-3}$, 与其他 RNA 病毒的突变率相似^[8]。人流感病毒可以通过 HA 和 NA 基因上抗体识别位点的突变来逃逸宿主的免疫反应, 禽流感病毒则通过 HA 和 PB2 等基因的点突变获得对哺乳动物的适应能力。(2) 基因重配 (reassortment), 也叫抗原转移 (antigenic shift)。当两个或两个以上具有不同遗传背景的病毒粒子同时感染一个宿主细胞时, 8 个基因片段可以随机互换重新组合, 通过基因重配理论上可以产生 2^8 种抗原性和毒力有差异的新毒株^[9]。通过基因重配, 往往能产生许多新亚型的流感病毒毒株。

1 流感病毒的生命周期

流感病毒的基本生命周期包括以下几个阶段: 病毒表面的 HA 蛋白识别和结合宿主细胞表面的唾液酸受体, 吸附到细胞表面^[10]; 经内吞作用进入细胞^[11], 在内吞体中低 pH 值引发 HA 构象改变, 使病毒囊膜和内吞体膜发生融合^[10]; 离子通道蛋白 M2 介导病毒脱衣壳, 病毒基因组释放到细胞质中, 并进一步被运送至细胞核内; 病毒的 RNA 聚合酶复合体以 vRNA 为模板, 合成病毒 mRNA, mRNA 出核转录出病毒蛋白质; 病毒 RNA 在细胞核内复制, 新合成的 vRNA 与 NP 及聚合酶复合物组装成 vRNP, 在 M1 和核输出蛋白 (nuclear export protein, NEP, 也称为 NS2) 帮助下出核, 与其他病毒蛋白质在包装信号的调控下完成病毒颗粒的组装^[12-13]; 病毒颗粒在细胞质膜表面出芽, NA 切除与 HA 结合的唾液酸受体, 帮助子代病毒颗粒释放^[14-15]。

流感病毒的 HA 特异性识别并结合宿主细胞表面的 N-乙酰神经氨酸 (唾液酸, SA) 受体, 是启动病毒感染与复制周期的第一步, 也是决定流感病毒能否侵染宿主细胞的首要因素^[16]。不同宿主来源的

流感病毒与宿主细胞唾液酸受体的结合由唾液酸糖苷键连接方式的特异性决定。

2 宿主细胞的受体类型

流感病毒结合的细胞表面受体是末端为唾液酸的糖脂或糖蛋白^[17-19]。糖蛋白通常含有两种类型的糖基化修饰: *N*-糖基化和 *O*-糖基化。*N*-连接糖基化的糖链通过天冬酰胺的自由氨基连接于多肽链上, 而 *O*-连接糖基化的糖链则连接在多肽链的丝氨酸或苏氨酸的羟基的氧原子上。*N*-连接糖、*O*-连接糖和糖脂具有不同的核心结构^[7]。然而, 对受体结合特异性起决定作用的是末端唾液酸与糖链连接方式差异导致的特定的结构特征, 而不是糖链核心结构的差异。流感病毒结合的宿主受体最末端通常都是固定的 3 个多糖: 第一位的唾液酸(SA1)、第二位的半乳糖(Gal2)和第三位的 *N*-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc3)^[20]。唾液酸的 C2 位碳原子可以与次末端半乳糖的 C3 或 C6 位碳原子结合, 形成 α -2,3 或 α -2,6 连接糖苷键, 不同的连接方式使得受体糖链的空间构象差异很大。

流感病毒对唾液酸受体的识别和结合具有偏好性, 禽流感病毒偏好性结合 α -2,3 连接的唾液酸受体, 而人流感病毒则倾向于结合 α -2,6 连接的唾液酸受体^[21-22]。传统观念认为禽类的肠道上皮细胞主要分布着 α -2,3 受体^[23], 而人类的上呼吸道上皮细胞主要存在 α -2,6 受体^[24], 因此禽流感病毒感染人的先决条件是 HA 蛋白受体结合位点发生突变, 获得结合 α -2,6 受体的能力。近些年来, 一些研究改变了这种观点。2006 年 3 月, Kawaoka 和 Kuiken 两个研究组分别在 *Nature* 和 *Science* 杂志上发表了他们的研究结果, 发现在人类的下呼吸道上皮细胞、肺泡和肺巨噬细胞上均存在 α -2,3 受体^[25-26], 禽流感病毒感染只要达到一定的量, 就有可能深入下呼吸道和肺部, 从而感染人类, 这也就解释了为什么大多数禽流感病毒感染者都具有禽类直接接触史。2007 年 2 月, Nicholls 等^[27]的研究发现, H5N1 流感病毒能体外感染鼻咽和扁桃腺等不表达 SA α -2,3Gal 受体的呼吸道上皮细胞, 表明这些上皮细胞可能有其他结合位点或辅助受体的存在。尽管如此, 禽流感病毒要实现有效的人际传播, 乃至引起人类大流行, 仍需获得 α -2,6 受体的结合能力^[7,16,28]。

3 HA 蛋白

HA 是病毒粒子表面丰度最高的蛋白, 具有识

别并结合宿主细胞表面特异性唾液酸受体的功能, 同时也具有使病毒囊膜与细胞内吞体膜融合的活性。此外, HA 是流感病毒的主要抗原, 诱导中和抗体产生, HA 也是流感病毒毒力的最主要决定因子^[10]。在电镜下, HA 蛋白呈现为 $140\text{\AA} \times 40\text{\AA}$ 的刺突状结构。每个病毒粒子表面有 400~600 个 HA 分子。HA 前体蛋白(HA0)属于 I 型跨膜糖蛋白, 含有大约 550 个氨基酸, 其 N 端为信号肽, 跨膜区靠近 C 端, 连接有一个短的细胞质尾巴。HA0 被宿主细胞的蛋白酶裂解成以二硫键相连的两条多肽链 HA1 和 HA2, 三个单体 HA1-HA2 分子形成一个相对分子质量约 220 kD 的同源三聚体 HA。裂解作用对于病毒融合是必不可少的, HA0 和 HA 都能和受体结合, 但是带有 HA0 的病毒没有融合活性, 不引起感染。

最早解析的 HA 的晶体结构是 H3 亚型的 HA, 即 1981 年 Skehel 和 Wiley 研究组解析的 A/Aichi/2/68 (H3N2)HA 分子的晶体结构^[29]。HA 三聚体分子的胞外区长约 135\AA , 由远膜端的球形头部和近膜端的纤维状茎部组成, 球形的头部完全由 HA1 残基组成, 主要是 β -片层结构, 是一个 8 股 Swiss-roll 或者 jelly-roll 型结构。纤维状的茎部既含有 HA1 的残基, 又含有 HA2 的残基。3 个 76\AA 长螺旋形成一个三重卷曲螺旋, 在其 N 末端紧密靠拢(螺旋间的距离为 10\AA)。3 个螺旋彼此相互扭转, 形成左手超螺旋, 最终在最靠近病毒囊膜的地方向外散开(螺旋间的距离为 22\AA)。3 个短螺旋以反平行的方式靠拢在长螺旋旁, 并且围绕着长螺旋扭转。HA2 的 N 端埋藏在长螺旋之间, 使得疏水的融合肽埋藏在三聚体结构的内部。三聚体的结构主要是由纤维状的茎部维持的, 而球状头部之间的结合很松散。这个结构的获得使人们对 I 型囊膜蛋白的结构有了初步的了解。

流感病毒的受体结合位点位于 HA 分子远膜端的一个浅的、凹陷的口袋, 其底部由一系列保守氨基酸组成, 包括 Y98、W153、H183 和 Y195(H3 排序); 侧面由三个保守的二级结构元件构成, 包括 190-螺旋(HA1 188~190)、130-环(HA1 134~138)和 220-环(HA1 221~228)。唾液酸与所有已知结构的 HA 的结合模式都是相似的, 即与 130-环和底部的 Y98 形成数个保守的氢键, 与 W153、H183 和 Y195 通过范德华力作用, 而受体糖链的其他部分则与 220-环和 190-螺旋相互作用^[28]。 α -2,3 受体通常采取伸展构象与 HA 结合, 其糖链从 220-环向外

延伸；而 α -2,6受体则常常采取折叠构象，其糖链会拐弯走向190-螺旋。在所有已经解析的HA-受体复合物晶体结构中， α -2,3受体大多采取反式构象(trans conformation)，SA1与Gal2连接处亲水的糖苷氧原子面向220-环；而 α -2,6受体则大多采取顺式构象(cis conformation)，使 α -2,6连接处疏水的C6碳原子朝向220-环。为了适应 α -2,3和 α -2,6受体的不同构象，HA受体结合位点的氨基酸也需要发生相应的变化：当与 α -2,3受体结合时，需要亲水的氨基酸残基；而与 α -2,6受体结合时则需要疏水的氨基酸残基^[28]。因此，HA受体结合位点的氨基酸改变引起的受体结合特异性的改变，是流感病毒发生跨种传播的分子基础。

4 H1、H2和H3亚型流感病毒跨种传播分子机制

迄今为止，能感染人类并引起人类流感大流行或季节性流感的A型流感病毒仅有H1N1、H2N2和H3N2亚型的流感病毒，从溯源上来说，人流感病毒都来源于禽流感病毒。

对于H2和H3亚型的禽流感病毒而言，HA蛋白上的Q226L和G228S突变(H3排序)是改变受体特异性实现跨种传播的关键^[30]。含有Q226和G228的禽流感病毒HA偏好性结合 α -2,3和 α -2,6唾液酸受体，而含有L226和S228的人流感病毒HA则特异性结合 α -2,6受体^[31]。从结构上看，L226提供的疏水环境有利于 α -2,6受体的结合，而不利于 α -2,3受体的结合，同时S228与SA1之间形成一个氢键，增加了HA对 α -2,6受体的亲和力^[20,32]。此外，H2亚型禽流感HA的N186能够与Gal2形成氢键，可能是使H2亚型禽流感病毒初步获得 α -2,6受体结合能力的关键^[32](具有S186的H3亚型禽流感的HA则不能形成这个氢键，与 α -2,6受体的结合能力也较弱)。

对于H1亚型病毒来说，190和225位氨基酸在受体结合特异性的决定中起关键作用。H1亚型禽流感病毒的HA主要为E190和G225，能够结合 α -2,3和 α -2,6受体，而H1亚型人流感病毒的HA为D190和D225，只结合 α -2,6受体^[31]。从结构上看，H1亚型HA蛋白通过D190和D225氨基酸残基与 α -2,6受体的糖环形成氢键相互作用，并且由于D225和K222的盐桥相互作用使得220-环柔性下降，不利于 α -2,3受体的结合；而G225由于不能和K222形成盐桥，导致220-环比较柔性，从而使

得Q226能够向前移动1.56Å，与 α -2,3受体的Gal2形成三个氢键^[33]；Gamblin等^[34]报道190E能够通过两个水分子抬高Q226的侧链，使得Q226能与 α -2,3受体的Gal2糖环相互作用。

5 高致病性H5N1禽流感病毒跨种传播分子机制

近年来，H5N1高致病性禽流感在家禽中常有暴发，造成巨大的经济损失，并偶尔传给人类，在局部地区引起集中感染或散发病例。人感染H5N1流感病毒后的典型症状为肺炎和高细胞因子血症，死亡率很高^[35]。目前，WHO累计报告人感染H5N1高致病性禽流感病毒确诊病例已有600多例，其中死亡率高达59%。值得庆幸的是，回溯性的流行病学调查表明，大部分H5N1亚型流感病毒感染者都有禽类接触史，目前还没有足够的证据表明H5亚型流感病毒已经获得结合 α -2,6受体的能力^[36-38]。然而，近几年的一些研究表明，在实验室环境下，有可能制造出能够特异性结合 α -2,6受体并能在哺乳动物间通过空气传播的H5N1突变体病毒^[39-42]。2012年，Kawaoka课题组报道在H5N1流感病毒A/Vietnam/1203/2004的HA蛋白上引入N158D、N224K、Q226L和T318I突变，并与2009大流感H1N1流感病毒的其余7个片段包装出的H5N1病毒能够在模式动物雪貂中通过空气传播^[40]。同年，Fouchier课题组报道了将H5N1病毒A/Indonesia/5/2005人工引入HA Q226L和G228S突变及PB2 E627K突变后，在雪貂中连续传代，最终得到可以在雪貂中通过空气途径传播的突变体病毒(HA最终具有H110Y、T160A、Q226L和G228S突变)^[39]。这两组研究的共同点是都在H5N1病毒的HA蛋白上引入了Q226L突变。2013年，本课题组及Skehel课题组分别解析了这两种野生型及突变体H5N1病毒的HA蛋白与受体复合物的晶体结构，揭示了H5亚型流感病毒跨种传播的分子机制^[43-45]。结构研究表明，L226残基产生的疏水环境使突变体H5亚型HA蛋白能够结合 α -2,6受体，而不利于 α -2,3受体的结合，这与H2和H3亚型人流感病毒HA蛋白选择性结合 α -2,6受体的原理一致。研究还发现， α -2,3受体和 α -2,6受体类似物在与野生型A/Indonesia/5/2005病毒HA蛋白结合时都采取了反式构象，而在与突变体HA结合时都转变成顺式构象^[45]。另外，无论是N158D突变还是T160A突变，其结果都是使HA受体结合位点附近的158位缺失

了一个N-糖基化位点,从而增加了对 α -2,6受体的亲和力;而T318I和H110Y突变则是通过增加HA的热稳定性,使病毒更适应于空气传播。T318I突变能够稳定HA蛋白的融合肽在HA单体中的位置,而H110Y突变则是通过与相邻HA单体形成氢键来提高HA三聚体的稳定性。

6 H7N9禽流感病毒跨种传播分子机制

2013年2月,在我国安徽和上海等地出现了一种新型的人感染H7N9禽流感病毒,截至2015年2月23日,已经造成571例人类感染,并导致212例死亡。动物传播实验表明,H7N9病毒能够在雪貂间发生有效的接触传播,但空气传播能力很有限^[46-49]。

受体结合实验表明,H7N9病毒仍然保留强结合 α -2,3受体的能力,但大多数毒株已经获得了一定的结合 α -2,6受体的能力。本课题组分别从病毒水平和蛋白质水平检测了此次H7N9流感暴发事件中的两个不同的分支病毒,流行毒株安徽株(A/Anhui/1/2013)(安徽1)和早期分离的上海株(A/Shanghai/1/2013)(上海1)的受体结合特性,发现安徽1株既能结合 α -2,3受体,又能结合 α -2,6受体(但对 α -2,3受体的亲和力更高),而上海1株却偏好性地结合 α -2,3受体^[50]。这充分解释了安徽1株由于获得 α -2,6受体的结合能力,使得该毒株具备感染人的能力。

上海1株和安徽1株的HA蛋白在一级序列上仅有8个氨基酸的差异,其中4个氨基酸差异在受体结合位点区域,包括S138A、G186V、T221P、Q226L。然而,在安徽1株的HA蛋白引入L226Q突变后,突变蛋白依然保留着双受体结合能力,这一结果表明,与H5N1病毒不同,Q226L氨基酸突变对于H7N9病毒的HA获得 α -2,6受体结合能力不是唯一关键位点,受体结合位点的其他相关氨基酸也至关重要。本课题组解析了上海1株、安徽1株及其L226Q突变的HA蛋白与受体类似物的复合体结构,发现安徽1株结合位点区域的4个突变(S138A、G186V、T221P、Q226L)共同创造了一个疏水性环境,使得安徽1株的受体结合位点220环附近区域比上海1株具有更大的疏水性,易于与 α -2,6受体结合。即使发生了L226Q突变后,其他3个疏水氨基酸依然提供了足够的疏水环境来维持 α -2,6受体的结合。该研究还首次观察到了 α -2,3受体在与HA结合时具有两种构象:在与安徽1株突

变体HA结合时, α -2,3受体呈现出经典的反式构象;而在与上海1株HA的复合物结构中, α -2,3受体却采取了不常见的顺式构象。尽管这两个蛋白的226位都是Q, α -2,3受体却能够以不同的构象(其HA与受体相互作用的细节也不同)稳定存在^[50]。前人研究表明,在溶液状态下, α -2,3受体可以以顺式或反式构象存在,而 α -2,6受体主要以顺式构象存在^[51-53]。这表明在流感病毒跨种传播的机制研究中, α -2,3受体和 α -2,6受体的不同构象也是影响受体结合特性的重要因素之一。

目前认为此次暴发的H7N9禽流感病毒具备有限的人际传播能力,这可能是由于H7N9病毒仍然具备强结合 α -2,3受体的能力,而人呼吸道上有很多带 α -2,3受体的黏液素束缚住了病毒的扩散^[24],从而使得H7N9病毒无法有效传播。然而,H7N9病毒还在不断的演变当中^[54],某些突变病毒一旦丧失强结合 α -2,3受体能力,而继续保留 α -2,6受体的结合能力,就有可能引发流感大流行(当然,这种自然选择或许永远不会出现)。因此,监测H7N9病毒的演化,尤其是可能引起跨种传播的关键氨基酸的变异,对于流感大流行的预警具有重要意义。

7 H9N2亚型流感病毒跨种传播分子机制

H9N2亚型流感病毒是一种常见于家禽的低致病性的流感病毒。郭元吉等^[41]在1997~1998年首次从韶关和汕头急性呼吸道感染患者样本中分离出了H9N2亚型流感病毒^[55]。随后又有学者从广东、香港患者样本中分别分离出了H9N2病毒^[56]。2003年12月,香港再次发现1例H9N2亚型的流感患者^[57]。这些感染都只引发轻度呼吸道疾病,没有发生死亡。值得注意的是,目前流行的H9N2禽流感病毒已经普遍获得了HA的Q226L突变。近年来出现的能感染人的H7N9和H10N8禽流感病毒,其内部基因也全部来源于H9N2病毒^[58]。

目前为止,仅有一株猪源H9N2病毒的HA结构被解析^[59],这株病毒的226位为L,228位为G。 α -2,3受体和 α -2,6受体在与这株H9N2HA结合时都采用了顺式构象,而且Gal2与L226都形成氢键相互作用。然而 α -2,3受体仅有SA1和Gal2的部分糖环可见电子密度,而 α -2,6受体的5个糖环均可见清晰的电子密度,暗示着这个HA可能与 α -2,6受体的亲和力更高。跟一般的 α -2,6受体与HA结合时从190-螺旋向外延伸的走向不同,在与H9HA结合时, α -2,6受体从220-环转向190-螺旋后,

后面的糖链又往回折叠,从130-环的唾液酸上方伸出,并与受体结合位点上方的125-137环、150-环及N193形成多达11个氢键相互作用。这种变化可能是由H9 HA的N133、G135、V190和G228造成的^[59]。

8 H10N8禽流感病毒跨种传播分子机制

早在2004年,埃及就报道了首例H10N7亚型禽流感病毒感染人事件,澳大利亚在2010和2012年也先后发生了H10N7病毒感染人的病例^[60-61]。2013年12月,我国江西省出现了首例人感染H10N8禽流感病毒病例,并导致患者死亡^[62]。紧接着的2014年,江西省又发生2例人感染H10N8禽流感病毒病例,其中1人死亡。2014年5月,我国广东地区的活禽市场的野狗当中又分离出H10N8病毒^[63]。因此,H10亚型禽流感病毒跨种传播的风险也引起了很高的关注。

2014年7月,Skehel研究组率先发表了第一株感染人的H10N8病毒A/Jiangxi-Donghu/346/2013的HA晶体结构^[64],发现H10蛋白具有双受体结合特性,并且对 α -2,3和 α -2,6受体的亲和力相似(分别为1.81 mmol/L和1.39 mmol/L)。他们还同时报道了一株H10N2禽流感病毒A/mallard/Sweden/51/2002的HA蛋白的结构,发现这株H10N2病毒已经获得了 α -2,6受体的结合能力,并且其亲和力与可感染人的H7N9病毒相当,同时这株H10N2病毒还保留了很高的对 α -2,3受体的亲和力。紧接着,本课题组和Wilson课题组也先后报道了同一株H10N8病毒HA的晶体学结构,但这两项研究都显示,H10N8病毒的HA蛋白偏好性结合 α -2,3受体,对 α -2,6受体的结合很低,表明这种感染人的H10N8病毒仍然是一个典型的禽流感病毒^[61,65]。

结构分析表明, α -2,3受体和H10 HA结合时,采取的是经典的反式构象,受体结合位点的R137与220-环的G225形成了一个氢键,为 α -2,3受体的结合提供了一个良好的亲水环境,而不利于 α -2,6受体的结合^[65]。在Skehel的研究中,禽H10 HA的Q226与 α -2,6受体形成很强的氢键相互作用, α -2,6受体采用了经典的顺式构象,但其走向是往130-环方向延伸^[64],其137位为赖氨酸(K),不会与220-环发生相互作用,使得220-环比较柔性,能与 α -2,6受体相互作用;而人H10的HA由于R137与G225形成氢键,固定了220-环的位置,很可能会破坏Q226位与 α -2,6受体的相互作用而

不利于 α -2,6受体的结合^[65]。Wilson课题组也认为在人H10与 α -2,6受体的复合物结构中,虽然 α -2,6受体采取了经典的顺式构象,但其延伸方向与人H1、H3及可在雪貂中传播的H5与 α -2,6受体复合物中 α -2,6受体的延伸方向都不同,反而与人H7- α -2,6受体复合物中 α -2,6受体的延伸方向类似。这种构象与 α -2,6受体在溶液中的低能构象不同,也与经典的HA- α -2,6受体结构的伞型拓扑结构不符,因此H10的受体结合位点并不利于 α -2,6受体的结合^[61]。Wilson等还指出,虽然Skehel课题组的人H10- α -2,6受体结构中,R137的侧链与 α -2,6受体的Gal2和GlcNAc3存在可能的氢键相互作用(但该结构中R137侧链末端的电子密度不可见,因此,这种相互作用在结构中也不可见,只是推测),但在Wilson课题组的人H10- α -2,6受体结构中,R137的侧链(电子密度良好)仅与GlcNAc3有非常弱的相互作用。

突变实验显示,H10N8 HA的Q226L突变极大降低了HA对 α -2,3受体的结合,但并没有提高其对 α -2,6受体的结合能力;而G228S突变并不会改变其受体结合特性,只有Q228L/G228S双突变提升了H10 HA对 α -2,6受体的亲和力,但并没有降低对 α -2,3受体的结合(仅为ELISA结果,在使用糖点阵法检测时,显示双突变与两种受体都不结合),因此并没有转变H10 HA的受体结合嗜性。同样,G225D突变及E190D/G225D双突变也未能转变H10 HA的受体结合嗜性。可见,H10亚型流感病毒很可能采用不同的分子机制来实现跨种传播^[61]。

9 H6N1亚型禽流感病毒跨种传播分子机制

2013年6月,在台湾发现了全球首例人类感染H6N1亚型禽流感病毒病例。从患者体内所分离的病毒基因序列显示,此病毒为一典型的低致病性禽流感病毒,与台湾本土家禽中的H6N1病毒株非常接近,其跨种传播的分子机制成为世界科学家所关注的焦点。

1972年以来,H6N1亚型禽流感病毒感染已在台湾家禽中流行,病毒在台湾家禽之间的流行具有独特的基因谱系,不同于香港和中国大陆东南部的流行。因此,台湾分离的H6N1亚型病毒可以作为研究病毒进化的良好对象。本课题组通过分析台湾地区所有H6N1亚型流感病毒的HA蛋白中决定受体结合特性的关键性氨基酸位点,发现其变化规律先后为186P-190E-226Q-228G、186P-190V-226Q-228S、

186L-190V-226Q-228S^[66]。之后,选取相对应的代表性毒株 A/duck/Taiwan/0526/72、A/chicken/Taiwan/A2837/2013 和 A/Taiwan/2/2013,表达其可溶性 HA 蛋白 (Duck H6N1HA、Chicken H6N1HA 和 Human H6N1HA),并且通过反向遗传学技术拯救出相应病毒,从蛋白质和病毒水平上对其受体结合特性进行了研究。结果显示,Duck H6N1HA 只结合 α -2,3 受体,Chicken H6N1HA 和 Human H6N1HA 可同时结合两种受体,但 Chicken H6N1HA 偏好结合 α -2,3 受体,Human H6N1HA 偏好结合 α -2,6 受体,病毒水平结果与此相一致。由此,本课题组提出台湾地区的 H6N1 亚型流感病毒按其受体结合特性变化,可分为两个不同的主要时期,即早期为 α -2,3 受体结合期,后期为双受体结合期,而这次人感染 H6N1 则偏好结合 α -2,6 受体。

为了鉴定决定 H6N1 亚型流感病毒 HA 蛋白受体结合特性发生转变的关键性氨基酸位点,通过点突变实验,本课题组证实 186、190、228 位氨基酸在 H6N1 亚型流感病毒的受体结合特性转变中发挥了重要的作用,E190V/G228S 双突变可使 H6N1 亚型流感病毒获得 α -2,6 受体结合能力,而 P186L 突变可使其偏好性结合 α -2,6 受体。

本课题组认为目前大部分 H6N1 亚型的流感病毒仍保持着高水平地结合 α -2,3 受体的能力,这可能限制了其在人体内有效的复制和传播,但其对人类的生命安全还是会造成一定威胁,正如新型 H7N9 流感病毒一样,尤其是当 H6N1 亚型病毒与 H9N2 亚型流感病毒发生基因重配后,可能会引起新的流感大暴发。更为重要的是,这次人感染 H6N1 禽流感病毒偏好性结合 α -2,6 受体,表明其在受体结合特性上已与人流感病毒类似,如果加上其他的基因变异,极有可能引发大流行。

10 影响跨种传播的其他重要蛋白质

PB2 是病毒 RNA 聚合酶复合物的组成成分,直接调控 vRNA 的复制水平。PB2 的 E627K 突变被广泛证明与禽流感病毒对哺乳动物的适应性相关^[67-70]:通常,禽流感病毒 PB2 为 E627,而人流感病毒为 K627,可在雪貂中传播的 H5N1 突变型病毒以及 2013 年在我国爆发的 H7N9 病毒都具有 E627K 突变^[39,42,71-72]。PB2 的 627 突变并不影响病毒的细胞嗜性,而是通过影响病毒在不同宿主中的复制能力来决定宿主特异性^[73]。PB2 的 E627K 突变使禽流感病毒能在更低的温度下进行复制,从而更

适应于在哺乳动物尤其是人类间传播,因为人的上呼吸道温度通常是 33℃,远远低于禽类的肠道温度(约 41℃)^[70,74]。627 位氨基酸位于 PB2 蛋白 C-末端区同名的“627 结构域”,该区域被认为与 importin- α 结合相关^[75]。从已经解析的晶体结构可以看到,E627K 突变改变了“627 结构域”表面携带的电荷特性(从带正电荷变成带负电荷)^[75-76],可能通过阻碍 PB2 与哺乳动物细胞中抑制性因子的结合,使病毒能在哺乳动物细胞中复制^[77-78]。

研究发现,2009 年甲型流感大流行的 H1N1 病毒的 PB2 为 E627,在结构上与 627 位氨基酸相邻的 G590S/Q591R 双突变能起到 E627K 的代偿作用,为“627 结构域”的表面提供足够的负电荷,从而有利于该病毒在哺乳动物细胞中的复制^[76]。PB2 的 D701N 突变也被证明与禽流感病毒对哺乳动物的适应性有关^[37,79-80],并且使用了与 E627K 突变不同的分子机制^[81],可能影响了 PB2 对不同亚型的 importin- α 的选择^[78,82]。此外,PB2 的 271、526、588、636 位氨基酸突变,以及 PB1 的 375 位氨基酸和 PA 的 85、186、336、552 等氨基酸位点也被认为与跨种传播相关^[78,83]。

NA 的主要功能是帮助新生病毒粒子从细胞表面释放,避免病毒粒子的相互聚集,其在细胞内的表达量和酶活力,甚至某些结合特性都会影响病毒的释放和扩大感染^[84];NA 茎区的长度影响它对不同底物的酶解效率,从而改变宿主范围^[85]。

另外,Scholtissek 等^[86]发现 NP 基因会影响 H3N2 流感病毒的宿主特异性。陈化兰课题组利用反向遗传学技术将一株 H5N1 高致病性禽流感病毒与 2009 甲型流感大流行 H1N1 病毒的 8 个基因片段互换,组合出 100 多株重组病毒,发现人 H1N1 病毒的 PA 和 NS 基因能使禽源 H5N1 病毒通过呼吸道飞沫在豚鼠中传播,且人源的 NP、NA 和 M 基因也能增强禽流感病毒在哺乳动物间传播的能力^[41]。

11 结论

总之,随着对禽流感病毒跨种传播研究的发展,越来越多的病毒蛋白和宿主因子被发现与流感病毒的跨种传播相关,但其分子机制尚有待进一步阐明。

病毒表面蛋白对宿主受体的识别是流感病毒识别和进入宿主细胞的第一步,后续的病毒生活史也会影响病毒是否能实现跨种传播,涉及到病毒和宿主因子的相互作用。寻找病毒蛋白与宿主因子的相互作用,解析其作用机理,乃至最终描绘出清晰的

相互作用图谱, 将是禽流感跨种传播机制研究的未来发展方向。

[参 考 文 献]

- [1] Vasin AV, Temkina OA, Egorov VV, et al. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res*, 2014, 185: 53-63
- [2] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 2005, 79(5): 2814-22
- [3] Tong S, Li Y, Rivaille P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(11): 4269-74
- [4] Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 2013, 9(10): e1003657
- [5] Wu Y, Wu Y, Tefsen B, et al. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*, 2014, 22(4): 183-191
- [6] Medina RA, Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(8): 590-603
- [7] de Graaf M, Fouchier RA. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J*, 2014, 33(8): 823-41
- [8] Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y, Orthomyxoviruses [M]// Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al. *Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 1186-243
- [9] Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe*, 2010, 7(6): 440-51
- [10] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 531-69
- [11] Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect*, 2004, 6(10): 929-36
- [12] Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J*, 2000, 19(24): 6751-8
- [13] Nayak DP, Hui EK, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*, 2004, 106(2): 147-65
- [14] Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, et al. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol*, 2004, 78(22): 12665-7
- [15] Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 2011, 411(2): 229-36
- [16] Imai M, Kawaoka Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(2): 160-7
- [17] Sauter NK, Bednarski MD, Wurzburg BA, et al. Hemagglutinins from two influenza virus variants bind to sialic acid derivatives with millimolar dissociation constants: a 500-MHz proton nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*, 1989, 28(21): 8388-96
- [18] Takemoto DK, Skehel JJ, Wiley DC. A surface plasmon resonance assay for the binding of influenza virus hemagglutinin to its sialic acid receptor. *Virology*, 1996, 217(2): 452-8
- [19] Gambaryan AS, Tuzikov AB, Piskarev VE, et al. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(*N*-acetylactosamine). *Virology*, 1997, 232(2): 345-50
- [20] Eisen MB, Sabesan S, Skehel JJ, et al. Binding of the influenza A virus to cell-surface receptors: structures of five hemagglutinin-sialyloligosaccharide complexes determined by X-ray crystallography. *Virology*, 1997, 232(1): 19-31
- [21] Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, et al. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*, 1997, 233(1): 224-34
- [22] Stevens J, Blixt O, Glaser L, et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol*, 2006, 355(5): 1143-55
- [23] Ito T, Suzuki Y, Suzuki T, et al. Recognition of *N*-glycolylneuraminic acid linked to galactose by the α 2,3 linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks. *J Virol*, 2000, 74(19): 9300-5
- [24] Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res*, 1993, 29(2): 155-65
- [25] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 2006, 440(7083): 435-6
- [26] van Riel D, Munster VJ, de Wit E, et al. H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. *Science*, 2006, 312(5772): 399
- [27] Nicholls JM, Chan MC, Chan WY, et al. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat Med*, 2007, 13(2): 147-9
- [28] Shi Y, Wu Y, Zhang W, et al. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(12): 822-31
- [29] Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, 1981, 289(5796): 366-73
- [30] Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, et al. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 1994, 205(1): 17-23
- [31] Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2,

- and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*, 2000, 74(18): 8502-12
- [32] Liu J, Stevens DJ, Haire LF, et al. Structures of receptor complexes formed by hemagglutinins from the Asian influenza pandemic of 1957. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(40): 17175-80
- [33] Zhang W, Shi Y, Qi J, et al. Molecular basis of the receptor binding specificity switch of the hemagglutinins from both the 1918 and 2009 pandemic influenza A viruses by a D225G substitution. *J Virol*, 2013, 87(10): 5949-58
- [34] Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*, 2004, 303(5665): 1838-42
- [35] de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, 2006, 12(10): 1203-7
- [36] Stevens J, Blixt O, Chen LM, et al. Recent avian H5N1 viruses exhibit increased propensity for acquiring human receptor specificity. *J Mol Biol*, 2008, 381(5): 1382-94
- [37] Gao Y, Zhang Y, Shinya K, et al. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog*, 2009, 5(12): e1000709
- [38] Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, et al. Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathog*, 2011, 7(5): e1002068
- [39] Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*, 2012, 336(6088): 1534-41
- [40] Imai M, Watanabe T, Hatta M, et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*, 2012, 486(7403): 420-8
- [41] Zhang Y, Zhang Q, Kong H, et al. H5N1 hybrid viruses bearing 2009/H1N1 virus genes transmit in guinea pigs by respiratory droplet. *Science*, 2013, 340(6139): 1459-63
- [42] Linster M, van Boheemen S, de Graaf M, et al. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell*, 2014, 157(2): 329-39
- [43] Lu X, Shi Y, Zhang W, et al. Structure and receptor-binding properties of an airborne transmissible avian influenza A virus hemagglutinin H5 (VN1203mut). *Protein Cell*, 2013, 4(7): 502-11
- [44] Xiong X, Coombs PJ, Martin SR, et al. Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus. *Nature*, 2013, 497(7449): 392-6
- [45] Zhang W, Shi Y, Lu X, et al. An airborne transmissible avian influenza H5 hemagglutinin seen at the atomic level. *Science*, 2013, 340(6139): 1463-7
- [46] Richard M, Schrauwen EJ, de Graaf M, et al. Limited airborne transmission of H7N9 influenza A virus between ferrets. *Nature*, 2013, 501(7468): 560-3
- [47] Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, et al. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*, 2013, 501(7468): 551-5
- [48] Zhang Q, Shi J, Deng G, et al. H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet. *Science*, 2013, 341(6144): 410-4
- [49] Zhu H, Wang D, Kelvin DJ, et al. Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs. *Science*, 2013, 341(6142): 183-6
- [50] Shi Y, Zhang W, Wang F, et al. Structures and receptor binding of hemagglutinins from human-infecting H7N9 influenza viruses. *Science*, 2013, 342(6155): 243-7
- [51] Breg J, Kroon-Batenburg LM, Strecker G, et al. Conformational analysis of the sialyl $\alpha(2\text{---}3/6)$ *N*-acetylglucosamine structural element occurring in glycoproteins, by two-dimensional NOE 1H-NMR spectroscopy in combination with energy calculations by hard-sphere exo-anomeric and molecular mechanics force-field with hydrogen-bonding potential. *Eur J Biochem*, 1989, 178(3): 727-39
- [52] Poppe L, Stuike-Prill R, Meyer B, et al. The solution conformation of sialyl- $\alpha(2\text{---}6)$ -lactose studied by modern NMR techniques and Monte Carlo simulations. *J Biomol NMR*, 1992, 2(2): 109-36
- [53] Sabesan S, Bock K, Paulson JC. Conformational analysis of sialyloligosaccharides. *Carbohydr Res*, 1991, 218: 27-54
- [54] Cui L, Liu D, Shi W, et al. Dynamic reassortments and genetic heterogeneity of the human-infecting influenza A (H7N9) virus. *Nat Commun*, 2014, 5: 3142
- [55] 郭元吉, 李建国, 程小雯, 等. 禽H9N2亚型流感病毒能感染人的发现. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 2(13): 105-8
- [56] Peiris M, Yuen KY, Leung CW, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet*, 1999, 354(9182): 916-7
- [57] Butt KM, Smith GJ, Chen H, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(11): 5760-7
- [58] Liu D, Shi W, Gao GF. Poultry carrying H9N2 act as incubators for novel human avian influenza viruses. *Lancet*, 2014, 383(9920): 869
- [59] Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, et al. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20): 11181-6
- [60] Arzey GG, Kirkland PD, Arzey KE, et al. Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(5): 814-6
- [61] Zhang H, de Vries RP, Tzarum N, et al. A human-infecting H10N8 influenza virus retains a strong preference for avian-type receptors. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(3): 377-84
- [62] Chen H, Yuan H, Gao R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet*, 2014, 383(9918): 714-21
- [63] Su S, Qi W, Zhou P, et al. First evidence of H10N8 avian influenza virus infections among feral dogs in live poultry

- markets in Guangdong province, China. *Clin Infect Dis*, 2014, 59(5): 748-50
- [64] Vachieri SG, Xiong X, Collins PJ, et al. Receptor binding by H10 influenza viruses. *Nature*, 2014, 511(7510): 475-7
- [65] Wang M, Zhang W, Qi J, et al. Structural basis for preferential avian receptor binding by the human-infecting H10N8 avian influenza virus. *Nat Commun*, 2015, 6: 5600
- [66] Wang F, Qi J, Bi Y, et al. Adaptation of avian influenza A (H6N1) virus from avian to human receptor-binding preference. *EMBO J*, 2015 [Epub ahead of print]
- [67] Almond JW. A single gene determines the host range of influenza virus. *Nature*, 1977, 270(5638): 617-8
- [68] Subbarao EK, London W, Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol*, 1993, 67(4): 1761-4
- [69] Hatta M, Gao P, Halfmann P, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, 2001, 293(5536): 1840-2
- [70] Massin P, van der Werf S, Naffakh N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *J Virol*, 2001, 75(11): 5398-404
- [71] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med*, 2013, 368(20): 1888-97
- [72] Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses. *Lancet*, 2013, 381(9881): 1926-32
- [73] Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(6): 881-6
- [74] Hatta M, Hatta Y, Kim JH, et al. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog*, 2007, 3(10): 1374-9
- [75] Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, et al. Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog*, 2008, 4(8): e1000136
- [76] Yamada S, Hatta M, Staker BL, et al. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog*, 2010, 6(8): e1001034
- [77] Manz B, Schwemmler M, Brunotte L. Adaptation of avian influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier. *J Virol*, 2013, 87(13): 7200-9
- [78] Cauldwell AV, Long JS, Moncorge O, et al. Viral determinants of influenza A virus host range. *J Gen Virol*, 2014, 95(Pt 6): 1193-210
- [79] Steel J, Lowen AC, Mubareka S, et al. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog*, 2009, 5(1): e1000252
- [80] Gabriel G, Dauber B, Wolff T, et al. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(51): 18590-5
- [81] Zhou B, Pearce MB, Li Y, et al. Asparagine substitution at PB2 residue 701 enhances the replication, pathogenicity, and transmission of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67616
- [82] Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, et al. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(3): 229-33
- [83] Song W, Wang P, Mok BW, et al. The K526R substitution in viral protein PB2 enhances the effects of E627K on influenza virus replication. *Nat Commun*, 2014, 5: 5509
- [84] Goto H, Wells K, Takada A, et al. Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus. *J Virol*, 2001, 75(19): 9297-301
- [85] Castrucci MR, Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol*, 1993, 67(2): 759-64
- [86] Scholtissek C, Burger H, Kistner O, et al. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology*, 1985, 147(2): 287-94