

谷氨酰胺激活PI3K/Akt信号通路促进痘苗病毒复制

许婉彬¹ 王娇娇^{1*} 陈健华² 周秀梅¹ 王如伟³ 方玲³ 阎辉⁴

(¹浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究, 杭州 310008; ²上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市肿瘤研究所, 上海 200032; ³浙江康恩贝制药股份有限公司, 杭州 310018; ⁴浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要 谷氨酰胺(glutamine, Gln)在细胞生长和代谢过程中起重要作用, 能够激活磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路。多种病毒能通过PI3K/Akt信号通路维持细胞生存和抑制细胞凋亡, 维持病毒的感染。为了探讨Gln在痘苗病毒(vaccinia virus strain western reserve, WR)感染人肺癌细胞A549过程中的调控作用及其潜在机制, 该文通过蛋白免疫印迹(Western blot)检测PI3K/Akt信号通路蛋白质磷酸化水平, 流式细胞术检测细胞阳性率, 结晶紫染色检测WR滴度, 实时定量PCR(quantitative Real-time PCR, qPCR)检测WR基因E3L和A46R mRNA水平。结果显示, Gln处理后PI3K/Akt信号通路蛋白质磷酸化水平显著升高。抑制PI3K/Akt信号通路后, 细胞阳性率显著降低($P<0.05$), WR滴度显著降低($P<0.05$), WR基因E3L和A46R mRNA水平显著降低($P<0.05$)。该研究结果表明, Gln通过激活PI3K/Akt信号通路从而促进A549细胞中WR的复制。

关键词 谷氨酰胺; 痘苗病毒; PI3K/Akt信号通路; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

Glutamine Activates PI3K/Akt Signaling Pathway to Promote Replication of Vaccinia Virus

Xu Wanbin¹, Wang Jiaojiao^{1*}, Chen Jianhua², Zhou Xiumei¹, Wang Ruwei³, Fang Ling³, Yan Hui⁴

(¹Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310008, China;

²Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200032, China;

³Zhejiang Conba Pharmaceutical Co., Ltd, Hangzhou 310018, China;

⁴Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract Glutamine (Gln) plays an important role in cell growth and metabolism. It can activate phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. A variety of viruses can maintain cell survival through the PI3K/Akt signaling pathway, and inhibit cell apoptosis and maintain the virus infection. This study mainly investigated the role of Gln in the process of vaccinia virus strain western reserve (WR) infection and its potential mechanism. The protein levels of PI3K/Akt signaling pathway were measured by Western blot. The cell positive rate was determined by flow cytometry. The WR titer was assessed by crystal violet dyeing test. The mRNA levels of gene E3L and A46R were determined by qPCR (quantitative Real-time PCR). The results showed that Gln significantly promoted the levels of proteins in PI3K/Akt signaling pathway. Compared with normal Gln group, PI3K/Akt signaling pathway inhibitors significantly reduced

收稿日期: 2017-03-24 接受日期: 2017-05-27

康恩贝-浙理工中美院士工作站项目(批准号: 116129A4J14365)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843181, E-mail: jiaojwang@163.com

Received: March 24, 2017 Accepted: May 27, 2017

This work was supported by the CONBA-Zhejiang Science and Technology University-Sino-American Academician Center (Grant No.116129A4J14365)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843181, E-mail: jiaojwang@163.com

网络出版时间: 2017-07-24 11:46:41

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170724.1146.008.html>

the cell positive rate, the titer and the mRNA levels of *E3L* and *A46R* ($P<0.05$). The results showed that glutamine could promote the WR replication by activating PI3K/Akt signaling pathway in A549 cell.

Keywords Gln; WR; PI3K/Akt signaling pathway; mTOR

谷氨酰胺(glutamine, Gln)是细胞生长所必需的氮源,能够促进细胞生长^[1-2]。细胞中,哺乳动物雷帕霉素蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)谷氨酰胺代谢存在多种复杂调控关系,同位素标记等研究证明,Gln能够激活体内mTOR信号通路^[3]。痘苗病毒(vaccinia virus strain western reserve, WR)具有一系列逃逸宿主抗病毒反应的机制,能够利用宿主细胞的蛋白质合成机制来合成其自身复制所需要的蛋白质^[4-5]。研究表明,WR感染细胞时,病毒的高效复制依赖于Gln。在Gln缺失的环境下,病毒复制能力显著下降,而且Gln代谢抑制剂会阻碍病毒蛋白质合成^[6]。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路在WR感染过程中起着至关重要的作用,病毒通过激活PI3K来刺激mTOR分子,失活真核翻译起始因子4E结合蛋白1(eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, 4E-BP1),促进帽状结合复合物起始因子的形成,促进翻译起始^[7],合成病毒复制所必需的蛋白质。

PI3K可被Ras信号通路以及一些生长因子及细胞因子激活。胞外受体与配体结合后,经信号转导激活PI3K,活化的PI3K催化磷脂酰肌醇磷酸化而生成PI-3,4,5-P₃,招募下游的Akt到细胞膜上。PI-3,4,5-P₃激活磷脂酰肌醇依赖性激酶-1(phosphatidylinositol kinase-1, PLK-1),在PLK-2的存在下,激活Akt^[8]。mTOR是PI3K/Akt信号通路的重要底物之一,是一种丝/苏氨酸激酶,也是重要的信号调节分子,最初是在啤酒酵母中作为雷帕霉素的靶分子被发现的^[9]。根据结构和功能的不同,mTOR可以分为两种不同的形式,即mTORC1和mTORC2。研究表明,谷氨酰胺对mTORC1的激活作用对细胞的生长、增殖和代谢是必要的^[10]。mTOR在PI3K/Akt信号通路中位于Akt的下游,主要功能是调节基因的转录翻译。活化的mTORC1可以通过磷酸化p70S6K及4E-BP1来调节mRNA的翻译起始。活化的Akt可以直接磷酸化mTOR或者通过失活结节硬化症蛋白质复合物2(tuberous sclerosis complex 2, TSC2),阻止对小G蛋白Rheb的负调控,增强mTOR的激活^[11-13]。哺乳动物细

胞中,异源二聚体TSC2是mTOR的抑制因子^[14],因此在TSC2异常的细胞中,mTOR和其下游效应物被激活,使细胞不断生长^[13]。

4E-BP1是哺乳动物真核翻译的负调控因子,与翻译起始因子eIF-4E(eukaryotic translation initiation factor-4E)的mRNA帽状结构相结合阻止其翻译,抑制翻译的起始。mTORC1磷酸化4E-BP1,使其与eIF-4E的mRNA相解离,促进翻译复合物的形成,促进(帽结构依赖性)翻译的起始^[15]。核糖体40S小亚基蛋白S6(ribosomal protein S6, RPS6)可以促进mRNA的翻译,而p70S6K是S6蛋白激酶,能够磷酸化S6蛋白,调节mRNA翻译起始^[16-18]。

本研究结果表明,Gln对WR复制的影响与PI3K/Akt信号通路有关,Gln通过激活PI3K/Akt信号通路增强WR的复制能力。本研究为抗病毒药物的设计提供了新的潜在分子靶点,也有助于病毒感染引起的肿瘤的预防和治疗。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞和病毒 人肺癌细胞株(A549细胞)及人胚肾细胞株(293A细胞)购自美国菌种保藏中心(American type culture collection, ATCC)。野生型痘苗病毒WR来自本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清FBS和GLN⁻DMEM培养基购自Gibco公司;BSA购自AMRESCO公司;IP细胞裂解液和SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;抑制剂Akt1/2 kinase inhibitor购自Sigma公司;Protease Inhibitor Cocktail购自Reche公司;ReverTra Ace Qpcr RT Kit购自TOYOBO公司;抑制剂LY294002(PI3K inhibitor)和Rapamycin(FRAP/Mtor inhibitor),抗体Phospho-eIF4E(Ser209)、Phospho-Akt(Ser473)、Phospho-eIF2 α (Ser51)、Phospho-4E-BP1(Thr37/46)、Phospho-p70S6 Kinase(Thr389)、Phospho-S6 Ribosomal Protein(Ser235/236)、Total Akt、Actin及二抗均购自Cell Signaling公司;蛋白质定量试剂盒(Lowry法)购自Bio-Rad公司;血液基因组DNA提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司;

AceQqPCR SYBR Green Master Mix购自TIANGEN公司; Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit(A-10235)购自Thermo Fisher Scientific公司; TRLzon Reagent购自Cwbiotech公司; WR抗体Rabbit anti Vaccinia Virus Antibody(1 mL)购自Aviva Systems Biology公司。

1.1.3 主要仪器 常规的PCR仪购自MJ Research公司; 荧光定量PCR仪购自Bio-Rad公司; 生物发光影像分析仪购自FUJIFILM公司; 共聚焦荧光倒置显微镜购自Olympus公司; 超速冷冻离心机购自Beckman公司。

1.2 方法

1.2.1 Western blot A549细胞铺6孔板, 贴壁后加10感染复数(multiplicity of infection, MOI)的WR株, 感染48 h后裂解并收集细胞。用试剂盒进行蛋白质定量, 然后加入5×蛋白质上样缓冲液, 100 °C加热5 min, 用10% SDS-PAGE分离蛋白质样品, 湿转法转至PVDF膜。5% BSA室温封闭30 min, 一抗4 °C孵育过夜, 洗膜后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗于室温孵育1 h, 再次洗膜后加显影液, 在凝胶成像系统上摄片并分析。

1.2.2 实时定量PCR(quantitative Real-time PCR, qPCR) 提取细胞总RNA并逆转录成cDNA, 荧光定量PCR检测痘病毒WR早期基因*E9L*、*E3L*及晚期基因*A46R*的表达^[19]。*E9L*上游引物序列: 5'-ATG GAT GTT CGG TGC ATT AA-3', 下游引物序列: 5'-GCA TTA AAT GGA GGA GGA GA-3'。*E3L*上游引物序列: 5'-GCA GAG ATT GTG TGT GCG GCT ATT-3', 下游引物序列: 5'-GGT GAC AGG GTT AGC ATC TTT CCA-3'。*A46R*上游引物序列: 5'-CAG GGA AAC GGA TGT ATA-3', 下游引物序列: 5'-TGT GTT ACA GAA TCA TAT AAG G-3'。

1.2.3 草酸铵结晶紫染色计算病毒滴度 (Gln⁻WR⁺)对照组: 不加Gln只加WR处理; (Gln⁺WR⁺)实验组: Gln饥饿2 h的A549细胞经WR感染并补充Gln; (WR⁺)实验组: Gln正常培养的A549细胞经WR感染; (Gln⁺WR⁺LY, Gln⁺WR⁺Rap)实验组: Gln正常培养的A549细胞经WR感染6~7 h后再加抑制剂处理。WR感染24 h收取病毒, 并经10倍梯度稀释加入6孔板铺好的293A细胞中, 于37 °C、5% CO₂条件下培养48 h后, 用结晶紫染色, 计数空斑数量并计算病毒滴度(病毒滴度=2倍的空斑数×病毒稀释倍数)。

1.2.4 共聚焦免疫荧光显微镜检测 A549细胞接种

于爬片上, 于12孔板(每孔10⁵个A549细胞)中培养。隔夜贴壁后感染50 MOI WR病毒, 4 °C放置1 h。细胞爬片置于共聚焦专用培养皿里, 4 °C预冷的冰PBS洗净后, 用4%多聚甲醛室温固定, 0.5% Triton X-100试剂覆盖细胞10 min。5% BSA室温封闭30 min。痘病毒抗体(1:200)4 °C避光孵育过夜。绿色荧光二抗Goat anti-rabbit IgG(H&L)(1:200)室温避光孵育1 h。0.1% Tween及PBS清洗后, 使用特异性一抗和红色荧光二抗标记CD147膜蛋白。通过DAPI染核并清洗后, 避光条件下加入防荧光淬灭封片剂。用共聚焦免疫荧光显微镜观察并拍照。

1.2.5 流式细胞术检测 A549细胞接种于6孔板(每孔3×10⁵个A549细胞)中培养。隔夜贴壁后加药处理, 1 h后感染50 MOI经Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit (A-10235)标记的WR病毒, 4 °C避光放置1 h。多聚甲醛室温固定15 min后用PBS冲洗, 然后收集贴壁细胞, 并用枪头尽量吹打, 散开成单个细胞, 清洗并离心、悬浮、吹散。最后, 流式细胞仪绿色通道检测细胞膜表面荧光强度。

1.2.6 统计学处理 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。实验数据用均数±标准差表示, 两样本均数比较采用*t*检验, *P*<0.05为差异显著, *P*<0.01为差异极显著。

2 结果

2.1 Gln调节A549中Akt信号通路的表达

图1结果显示, WR⁻及Gln⁻条件下, FBS⁺处理组促进翻译起始的蛋白p70S6K及RPS6磷酸化水平差异不明显, 说明FBS不能上调蛋白质合成从而不能促进病毒复制。其次, WR⁻条件下, Gln⁺处理组中Akt及p70S6K、RPS6磷酸化水平明显升高, 而总的Akt水平未见明显变化, 表明Gln能够激活Akt/mTOR信号。另外, Gln⁻及FBS⁻条件下, WR⁺组Akt及p70S6K、RPS6磷酸化水平升高, 表明WR也能够增强PI3K/Akt信号。Gln⁺处理组与WR⁺组相比较, Gln对PI3K/Akt信号通路蛋白质磷酸化的增强效果更明显, 而与WR⁺Gln⁺处理组相比差异不明显, 表明Gln对PI3K/Akt信号通路的激活具有主导作用。

2.2 抑制剂降低疫苗病毒WR株对Akt信号通路的激活作用

为了进一步分析WR与PI3K/Akt信号通路关系, 我们选择mTOR抑制剂雷帕霉素(rapamycin, Rap)、

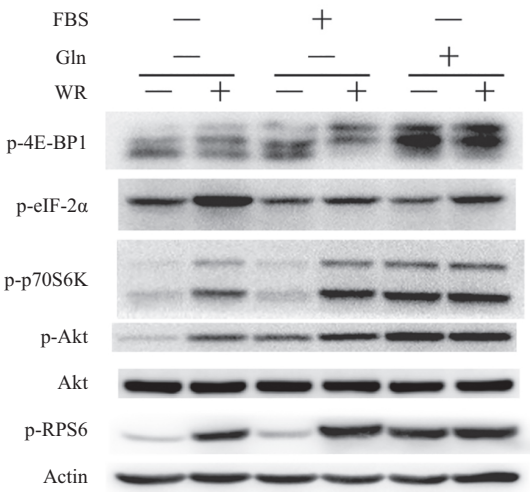


图1 Gln调节A549中Akt信号通路蛋白质磷酸化水平

Fig.1 Gln altered the levels of phosphorylated proteins in Akt signaling pathway in A549

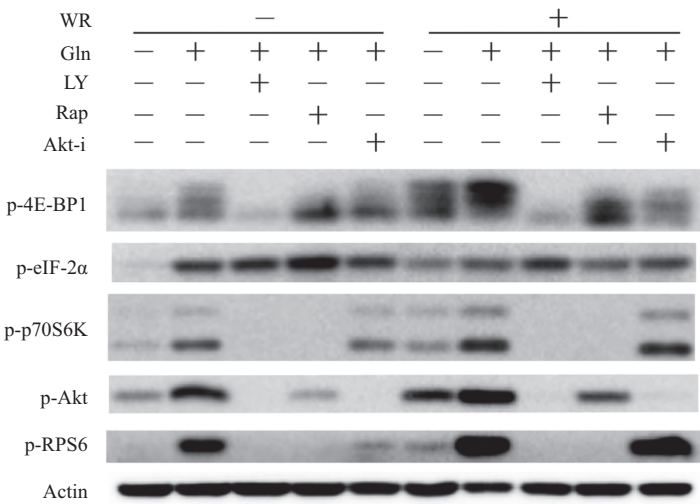


图2 不同抑制剂对WR的影响

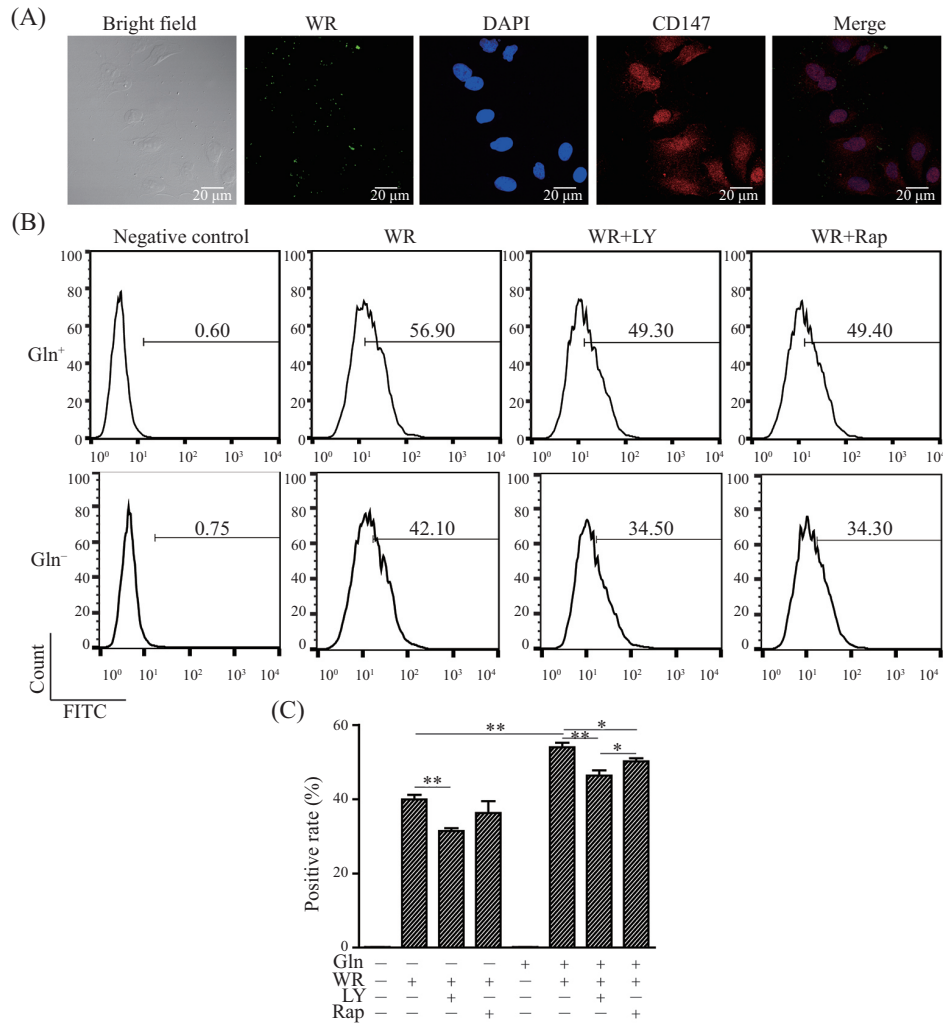
Fig.2 Effect of different inhibitions on WR

PI3K特异性抑制剂(LY294002, LY)及Akt抑制剂(Akt-inhibitor, Akt-i)来抑制PI3K/Akt信号通路。图2显示, WR⁻组中, 抑制剂LY、Rap及Akt-i处理组与Gln⁺单独处理组相比较, Akt及p70S6K、RPS6磷酸化水平显著降低。此外, Gln⁺处理后, 与WR⁻组相比较, WR⁺条件下Akt及p70S6K、RPS6磷酸化水平显著升高, 而抑制剂LY及Rap处理组中Akt及p70S6K、RPS6蛋白磷酸化水平显著降低。这说明, WR感染能够激活PI3K/Akt信号通路, 而PI3K/Akt信号通路的抑制剂则会抑制这种激活作用, 提示PI3K/Akt信号通路在WR调节细胞蛋白合成中起着重要作用。

2.3 抑制剂LY、Rap对WR吸附能力的影响

多种病毒能通过PI3K/Akt信号通路维持细胞

存活, 维持病毒的感染。为了探讨PI3K/Akt信号通路对WR的影响作用, 我们利用流式细胞术检测抑制PI3K/Akt信号通路前后WR吸附的细胞阳性率变化。共聚焦显微镜免疫荧光检测结果显示, 感染2 h后WR吸附在A549细胞表面上(图3A)。同样地, 感染2 h后流式细胞术检测结果发现, Gln⁺条件下抑制剂处理前后吸附WR的细胞比例发生改变, LY处理组(46.50%±2.52%)及Rap处理组(50.23%±1.35%)细胞阳性率显著低于WR处理组(54.10%±2.42%), 差异具有统计学意义($P<0.05$)(图3B和图3C)。WR感染条件下, Gln⁺处理组(54.10%±2.42%)细胞阳性率显著高于Gln⁻处理组(39.90%±2.11%), 差异具有统计学意义($P<0.01$)。此结果提示, PI3K/Akt信号通路可能对WR吸附细胞有调控作用。



A: 共聚焦免疫荧光显微镜检测WR的吸附能力, CD147标记细胞质膜; B: 流式细胞术检测Gln及不同抑制剂对WR吸附A549细胞的影响; C: 统计学分析细胞的阳性率, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

A: detection of WR adsorbability by confocal immunofluorescence microscopy. Cell membrane were labeled by CD147; B: effects of different inhibitors on WR binding A549 cell by flow cytometry; C: cell positive rate was analysed by statistics, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$.

图3 Gln对WR的吸附能力的影响

Fig.3 Effect of Gln on WR adsorptivity

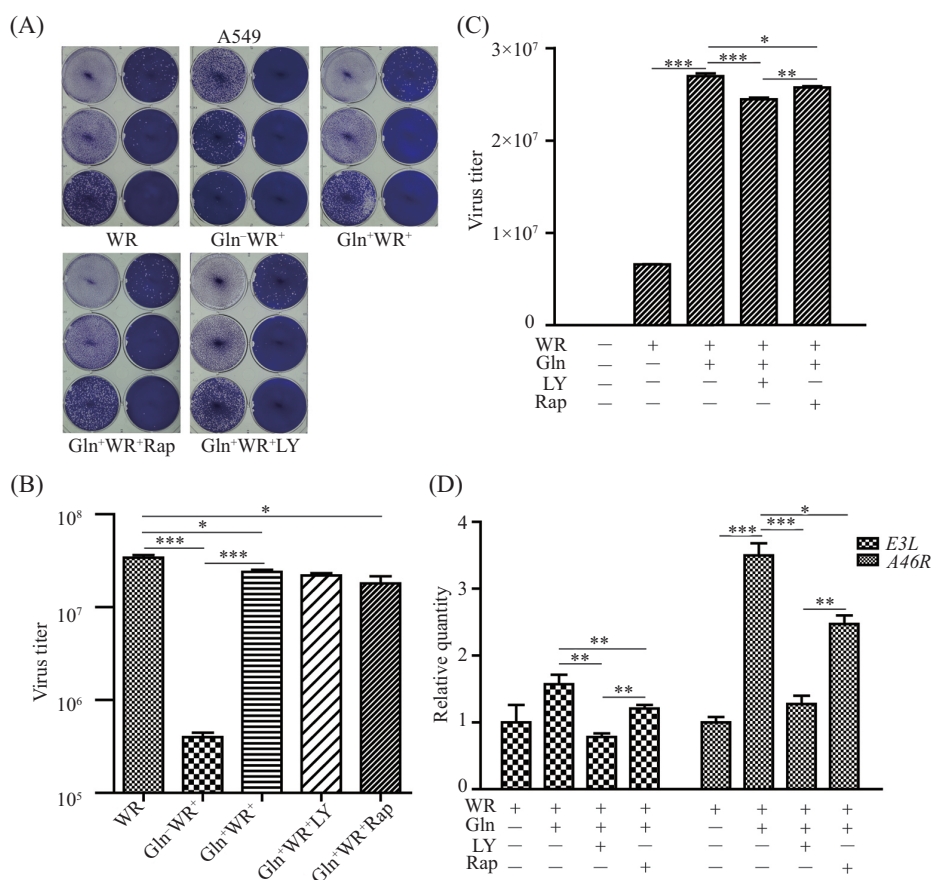
2.4 Gln对WR在A549中复制的影响

结晶紫染色实验结果显示, Gln饥饿条件下WR滴度下降极显著($P<0.001$), (Gln⁺WR⁺)处理组WR滴度也显著降低($P<0.05$), 但与对照组(Gln⁻WR⁺)相比较, WR滴度极显著升高($P<0.001$)。与(WR⁺)处理组相比较, 抑制剂处理组(Gln⁺WR⁺LY, Gln⁺WR⁺Rap)WR滴度也显著降低($P<0.05$)(图4A和图4B)。为了进一步证明Akt信号通路对WR的影响, 以WR早期转录基因E9L为参照, 绝对定量WR的滴度, 与其他处理组相比较, (Gln⁺WR⁺)处理组病毒滴度显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 说明扩增效率最高(图4C)。以GAPDH作为内参, qPCR定量WR早、晚期转录基因mRNA水平的改变, 结果显示, 两个抑制剂处理组

中E3L mRNA水平较(Gln⁺WR⁺)处理组极显著下降($P<0.01$), 两个抑制剂处理组中A46R mRNA水平较(Gln⁺WR⁺)处理组显著下降($P<0.05$), 表明Akt信号通路抑制剂能够影响WR转录基因E3L和A46R mRNA水平, 降低WR基因转录水平(图4D)。此结果表明, Akt信号通路对WR的复制有调控作用, Gln也能够影响WR复制, 而Gln能够激活Akt信号通路, 提示Gln能够调控Akt信号通路从而影响WR复制。

3 讨论

当外界刺激PI3K激活, 使Akt富集并被激活, 活化mTORC1并导致4E-BP1和p70S6K的高度磷酸化, 促进了细胞内蛋白质的合成^[20]。α亚基真核起始因



A: 结晶紫染色检测WR在A549细胞中的复制能力; B: WR滴度统计分析, $n=3$; C: 实时定量PCR以E9L基因mRNA表达水平为标准绝对定量WR滴度, $n=4$; D: 实时定量PCR相对定量E3L和A46R mRNA水平, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: detection of WR replication in A549 cell by crystal violet assay; B: WR virus titer analysis of the statistics, $n=3$; C: detection of WR titer with E9L mRNA level using qPCR, $n=4$; D: detection of E3L and A46R mRNA level using qPCR, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图4 Gln对WR复制能力的影响
Fig.4 Effect of Gln on WR replication

子2(α subunit of eukaryotic initiation factor 2, eIF-2 α)是真核细胞翻译起始因子, 被磷酸化后会引起翻译受阻, 抑制蛋白质合成。在病毒感染, 营养缺乏等刺激下, 胞内eIF-2 α 会被激活, 而E3L表达产物会通过各种方式降低eIF-2 α 磷酸化, 从而促使翻译起始, 能抵御细胞自身的防御机制^[21]。Gln作为外界刺激能够激活PI3K/Akt信号通路。人乳头瘤病、人疱疹病毒潜伏感染期间能够激活PI3K/Akt信号通路, 维持细胞生存, 从而有利于病毒复制和蛋白质合成^[22-23]。那么Gln与WR增殖有关系么? 本研究以A549细胞为实验对象, 探讨Gln对细胞中WR复制的影响。

首先, Western blot检测细胞内PI3K/Akt信号通路蛋白质磷酸化水平。实验结果显示, Gln存在时A549细胞中Akt信号通路蛋白质磷酸化水平升高, 说明了Gln能够激活Akt信号通路。WR感染时, A549细胞中Akt蛋白质磷酸化水平升高, 而这一现

象被Akt信号通路抑制剂所抑制。研究发现, 信号通路抑制剂LY处理会抑制4E-BP1的失活, 破坏eIF-4F复合体的形成^[7]。我们的实验结果表明, Rap也能抑制WR引起的4E-BP1的失活。

接着, 我们采用流式细胞术探究PI3K/Akt信号通路与WR吸附的关系, 发现PI3K/Akt信号通路抑制剂显著降低细胞阳性率, 表明Akt信号通路受到抑制会降低WR的吸附能力。通过病毒滴度检测来说明PI3K/Akt信号通路与WR吸附复制的关系, 补充Gln的(Gln⁺WR⁺)处理组比正常(WR⁺)组的病毒滴度显著降低; 抑制剂处理后病毒滴度也显著降低, 提示Gln会影响病毒吸附, 进而影响其复制; 抑制PI3K/Akt信号通路也会减弱WR吸附能力。

痘苗病毒基因E3L是非常保守的早期转录基因, 其编码的E3L蛋白是一种重要的毒力蛋白, 通常能够抑制宿主阻断病毒感染的防御机制^[21,24-26]。A46R

是痘苗病毒晚期转录基因,也是病毒逃逸宿主免疫的关键^[27]。PCR实验结果显示,Gln缺失处理组病毒滴度和LY及Rap处理组病毒滴度显著降低;Gln缺失处理组和LY及Rap处理组E3L及A46R mRNA水平也显著降低($P<0.05$),说明了Gln和Akt信号通路抑制剂能影响WR的复制能力。

综上所述,本研究发现,在A549细胞中Gln通过激活Akt信号通路,从而促进WR的复制。为深入研究Gln和WR感染的关系,从分子水平上认识病毒感染机制提供了新的方向。

参考文献 (References)

- Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Fleischman R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem* 1956; 218(2): 607-16.
- Eagle H, Oyama VI, Levy M. Amino acid requirements of normal and malignant human cells in tissue culture. *Arch Biochem Biophys* 1957; 67(2): 432-46.
- Zhai Y, Sun Z, Zhang J, Kang K, Chen J, Zhang W. Activation of the TOR signalling pathway by glutamine regulates insect fecundity. *Sci Rep* 2015; 5: 10694.
- Katsafanas GC, Moss B. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell Host Microbe* 2007; 2(4): 221-8.
- Walsh D, Arias C, Perez C, Halladin D, Escandon M, Ueda T, *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28(8): 2648-58.
- Fontaine KA, Camarda R, Lagunoff M. Vaccinia virus requires glutamine but not glucose for efficient replication. *J Virol* 2014; 88(8): 4366-74.
- Zaborowska I, Walsh D. PI3K signaling regulates rapamycin-insensitive translation initiation complex formation in vaccinia virus-infected cells. *J Virol* 2009; 83(8): 3988-92.
- Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: A key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 16): 2903-10.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991; 253(5022): 905-9.
- Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, *et al.* Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 2009; 136(3): 521-34.
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 1997; 16(12): 3693-704.
- Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(8): 4240-5.
- Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 2002; 4(9): 658-65.
- Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Dai N. Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296(4): E592-602.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 913-63.
- Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN. TOR controls translation initiation and early G₁ progression in yeast. *Mol Biol Cell* 1996; 7(1): 25-42.
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 2005; 123(4): 569-80.
- Meyuhas O, Kahan T. The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1849(7): 801-11.
- Willis KL, Langland JO, Shisler JL. Viral double-stranded RNAs from vaccinia virus early or intermediate gene transcripts possess PKR activating function, resulting in NF-kappaB activation, when the K1 protein is absent or mutated. *J Biol Chem* 2011; 286(10): 7765-78.
- Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F, *et al.* Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab* 2008; 7(5): 456-65.
- Zhang P, Jacobs BL, Samuel CE. Loss of protein kinase PKR expression in human HeLa cells complements the vaccinia virus E3L deletion mutant phenotype by restoration of viral protein synthesis. *J Virol* 2008; 82(2): 840-8.
- Dawson CW, Trammountanis G, Eliopoulos AG, Young LS. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* 2003; 278(6): 3694-704.
- Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol* 2002; 76(1): 220-31.
- Elde NC, Child SJ, Eickbush MT, Kitzman JO, Rogers KS, Shendure J, *et al.* Poxviruses deploy genomic accordions to adapt rapidly against host antiviral defenses. *Cell* 2012; 150(4): 831-41.
- Willis KL, Patel S, Xiang Y, Shisler JL. The effect of the vaccinia K1 protein on the PKR-eIF2alpha pathway in RK13 and HeLa cells. *Virology* 2009; 394(1): 73-81.
- Lynch HE, Ray CA, Oie KL, Pollara JJ, Petty IT, Sadler AJ, *et al.* Modified vaccinia virus Ankara can activate NF-kappaB transcription factors through a double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-dependent pathway during the early phase of virus replication. *Virology* 2009; 391(2): 177-86.
- Stack J, Haga IR, Schroder M, Bartlett NW, Maloney G, Reading PC, *et al.* Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* 2005; 201(6): 1007-18.