

## АНТИВИРУСНИ ЕФЕКТИ НА ИНТЕРФЕРОНИТЕ.

### 2. ИНДУЦИРАНИ ОТ ИНТЕРФЕРОНА ПРОТЕИНИ С ПРЯК АНТИВИРУСЕН ЕФЕКТ

М. Василев и Ж. Василева

Вътрешна клиника, УБ „Лозенец” – София

## ANTIVIRAL EFFECTS OF INTERFERON:

### 2. INTERFERON INDUCED ANTIVIRAL PROTEINS

M. Vasilev and Zh. Vasileva

Internal Diseases Clinic, University Hospital „Lozenets” – Sofia

<b>Резюме:</b>	В първата част на обзора разглеждаме накратко историята на откриването на интерфероните, механизмите на индуцирането на секрецията им от рецепторите за чужди НК, известните досега интерферони и техните рецептори, а във втората част – биологията на антивирусното действие на стимулирани от IFN гени MxA, ISG 15, PKR и OAS-RNAase L.
<b>Ключови думи:</b>	интерферони, -алфа, -бета, -омега, -лямбда, вроден имунитет, антивирусен имунитет, MxA протеини, ISG 15, PKR, OAS, RNAase L
<b>Адрес за кореспонденция:</b>	Д-р Милен Василев, Вътрешна клиника, УБ „Лозенец”, ул. „Козяк” № 1, 1407 София, e-mail: milen_vassilev@hotmail.com
<b>Summary:</b>	In the first part, we review briefly the history of IFN discovery, the mechanisms of IFN induction and secretion, the known IFN molecules and their receptors. In the second part, we review the molecular biology of the known ISGs with proven antiviral effects – MxA protein, ISG 15, PKR and OAS-RNAase L.
<b>Key words:</b>	interferon types, alpha, beta, gamma, omega, lambda, innate immunity, antiviral immunity, MxA protein, ISG 15, PKR, OAS-RNAase L
<b>Address for correspondence:</b>	Milen Vasilev, M. D., Internal Diseases Clinic, University Hospital „Lozenets”, 1, Koziak Str., Bg 1407 – Sofia, e-mail: milen_vassilev@hotmail.com

Вирусите са най-многобройните и най-разнообразните патогени на Земята. Разпознаването на заразяването с вируси се базира на разпознаване на уникални за вируса нуклеинови киселини (НК). Тъй като структурните разлики между вирусните и човешките НК са минимални, разпознаването на „модела на патогена” (PAMP) става в специализирани компартменти и чрез активиране на нуклеазите, които участват в отстраняването на собствените НК от екстрацелуларните течности и лизозомите [8, 56, 80].

Рецепторите, които осъществяват връзка между разпознаването на вирусните структури и активирането на секрецията на тип I IFN, бяха разгледани в първата част на този обзор. Две взаимно допълващи се рецепторни системи са отговорни за откриването на вирусите. Едната се състои от цитоплазмени протеини, които установяват вирусни НК, като се свързват с тях и с това се предизвиква активиране на синтеза и секрецията на интерферон. Другата система се

състои от членовете на семейството на TLR, които откриват вирусните НК в ендозомите на специализираните „стражеви” клетки [69]. Индуцираните по този начин гени на интерфероните след това водят до синтез и секреция на интерфероните, които са три типа (тип I, II III) с по няколко субтипа. Те упражняват биологичното си действие чрез свързване с разположени по повърхността на клетките рецептори. Активирането на рецепторите на интерфероните води до индукция на Interferon stimulated genes (ISGs) – стимулирани от интерфероните гени.

#### ISGs – МОЛЕКУЛНИ МЕХАНИЗМИ НА АНТИВИРУСНОТО ДЕЙСТВИЕ

ISGs са разнообразна група от над 300 гена, които осъществяват биологичните и терапевтични ефекти на IFN [17, 18]. На фиг. 1 са представени схематично идентифицираните досега ISGs. По-нататък разглеждаме само ISGs с доказан антивирусен ефект.



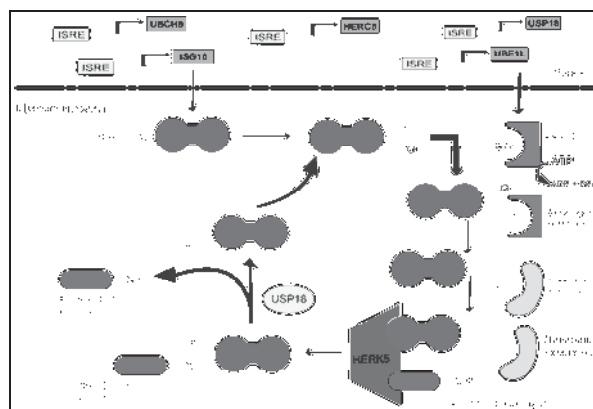
Фиг. 1. Схематично представяне на броя и функциите на ISGs идентифицирани с microarray [17]

### ISG15

Един от най-изтъкнатите представители на стимулираните от интерфероните гени, индуцирани по време на вирусна инфекция и последващата я индукция на интерферон, е 17 kDa протеин ISG15. Генът е клониран още преди 20 год. [10], но детайлното проучване на антивирусните му функции започна наскоро. ISG15 беше открит скоро след убиквитините и хомологията му с тях беше моментално открита [46]. Убиквитинирането на протеините регулира много аспекти на имунитета, включително трансдукцията на сигнала, например при активирането на NF- $\kappa$ B или при адаптивния имунитет, като например инициацията на имунния толеранс [45]). Като се има предвид голямата важност на убиквитинирането в имунния отговор, вероятно не е изненадващо, че съществува регулиран от интерфероните убиквитиноподобен отговор. За този процес, осъществяван от ISG, е въведен терминът ISGylation (фиг. 2). ISG15 се експресира като прекурсор от 165 аминокиселини, който впоследствие се процесира, за да се експонира C-терминално разположената последователност LRLRGG [57].

Досега са открити 158 предполагаеми таргетни протеина за ISG15 [25, 72, 81]. Много от тези субстрати са важни за реализирането на отговора на интерфероните, измежду тях са компонентите от сигналния път JAK1 и STAT1, PRR (pattern recognition receptors – рецептори, разпознаващи молекулни модели на патогените) като RIG-I и антивирусните ефекторни протеини MxA, PKR и RnaseL [81].

Мишките, при които ISG15 е инактивиран, имат по-висока чувствителност към вирусите на грипа А и В, Синдбис (SV), херпес симплекс вирус 1 (HSV-1) и мишите  $\gamma$ -херпесвируси [43, 59]. *In vitro* експерименти показват, че ISG15 има роля при осъществяването на резистентност към вируса Ебола [48].



Фиг. 2. Механизъм на действие на ISG15. ISG15, с главния активиращ E1 ензим UBE1L, и множество E2-носеци ензими (на фигурата е показан примерът с UBCH8) и E3-лигазите (показани с примера на HERC5) се индуцират координирано от IFN чрез ISRE последователности в техния съответен промотер. E1, E2 и E3 протеините последователно катализират конюгирането на ISG15 към множество протеинни субстрати и така модулират плеiotропни клетъчни отговори, които потискат продукцията на вирусите. Този процес (ISGylation) се регулира обратимо от протеазите (тук е даден пример с USP18), които също се индуцират от IFN (по [64])

### MxA протеини

Интерфероните индуцират няколко хидролизиращи ГТФ протеина. Този клас протеини участват в образуването на конформационни промени в мембраните, органогенезата и цитокинезата. Досега са идентифицирани четири семейства: на p47 гуанилат свързващите протеини (p47 GBP guanylate-binding proteins), на p65 гуанилат свързващите протеини (GBP guanylate-binding proteins), на много големите индуцируеми ГТФ хидролизиращи ензими (VLIG the very large inducible GTPases) и на Mx протеините, които дават на клетката резистентност към вирусите [47]. От тях само Mx протеините имат добре характеризирана роля за антивирусната защита и показват стриктна зависимост от присъствието на тип I и тип III интерфероните [32].

Участващите в семейството на Mx GTPases, което се състои от MxA и MxB при хората и Mx1 и Mx2 при мишките, са идентифицирани като антивирусни въз основа на наблюдението, че чувствителността на инбредните мишки към грипните вируси (ортомиксовируси) се дължи на мутации в Mx локуса на хромозома 16 [31, 44]. Резистентността на мишките към инфекцията с вируса на грипа може да бъде възстановена с възстановяване на експресията на Mx1 чрез трансфекция с активен Mx1 ген [44]. Конститутивната експресия на човешкия еквивалент (MxA) на мишия (Mx1) в мишки, при които няма рецептор за тип I IFN (IFNAR knock-out mice), осигурява пълна резистентност към иначе фаталните инфекции с Тогото (Thogoto virus), Лак-

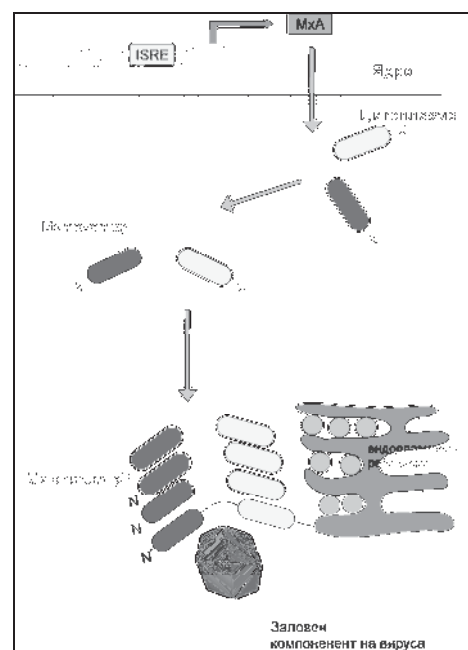
рос (LaCrosse Virus) и Semliki Forest (SFV) [6] вируси.

И двата човешки Mx протеина са кодирани върху хромозома 21 в район, сингенен на мишата хромозома 16 [2, 36]. Човешките протеини и мишите Mx1 са цитоплазмени, а мишият Mx2 е нуклеарен. Смята се, че тази разлика в експресията позволява антивирусната активност да се осъществява в различните компартменти [33]. Човешкият MxA има антивирусна активност, която е насочена и към цитозолни, и към нуклеарни вируси. Човешкият MxB протеин няма антивирусна активност и не са известни биологичната му роля и функция. Смята се, че участва в регулирането на транспорта на протеини във и от ядрото [39].

Вирусите, чувствителни на антивирусното действие на Mx протеините, са Orthomyxoviruses, Paramyxoviruses, Rhabdoviruses, Togaviruses и Bunyaviruses. Човешкият MxA протеин потиска всички родове на семейството Bunyaviridae (Orthobunyavirus, Hantavirus, Phlebovirus и Dugbe virus) [4]. Членовете на други вирусни семейства, като клинично значимите Coxsackie, Picornaviridae и HBV (Hepadnaviridae) също са чувствителни на MxA [13, 29]. Генетичните проучвания при хора показват, че полиморфизми в промотера на MxA корелират с увеличена чувствителност към вируса на хепатит С (HCV) [34], хепатит В (HBV) [71] и вируса на морбили, като последният случай е свързан с по-голяма честота на възникване на субакутен склерозиращ паненцефалит [74].

Mx протеинът се експресира в хепатоцитите, ендотелните и имунните клетки, включително моноцитите, плазмацитонидните и миелоидните DCs [21]. Mx протеините имат относително голям аминотерминален ГТП хидролизиращ домен (*N-terminal GTPase domain*), централен взаимодействащ домен (*central interacting domain – CID*) и карбокситерминален левцинов-цип домен (*C-terminal leucine zipper – LZ*). За разпознаване на таргетните вирусни структури са необходими и *CID*, и *LZ* домените. Основната мишена на Mx протеините са вирусните нуклеокапсиди [41]. Тъй като се разполагат в гладкия ендоплазмен ретикулум, Mx протеините могат ефективно да регулират процесите на екзоцитоза и трафика на везикули. Те залавят важни компоненти от вирусите и по този начин спират вирусната репликация на ранен етап (фиг. 3) [1]. MxA и Mx1 се свързват със субединиците на вирусната полимераза на вируса на грипа PB2 и така блокират транскрипцията [75]. Това е мощен антивирусен механизъм, който ефективно предотвратява генерирането на вирусни мутанти, резистентни на Mx протеините. Открити са и контрамерките,

които вирусите предприемат срещу MxA протеина. Повечето от описаните механизми, използвани от вирусите, за да заобиколят антивирусното действие (*viral escape*), са насочени срещу сигналната каскада на IFN: напр. високовирулентните щамове на вируса на грипа увеличават репликационната си активност, като по този начин „надбягват“ IFN отговор [30]. Промотерът на HBV *precore/core* протеина (HBcAg) взаимодейства с MxA промотера, като предотвратява експресията на MxA гена [20]. West Nile virus (WNV) образува заблуждаващи мембранны структури, като по този начин „скрива“ репликацията си [35].



**Фиг. 3. Механизъм на действие на MxA.** След активирането на интерфероновия рецептор от тип I IFN експресията на MxA протеина се индуцира то ISRE в промотора на гена. Протеинът се натрупва в цитоплазмата по вътрешклетъчните мембрани на ендоплазмения ретикулум (ER) като олигомери посредством взаимодействие между LZ и CID домените. При заразяване на клетката с вирус мономерите се свързват с вирусните нуклеокапсиди и другите вирусни компоненти и така ги залавят и след това ги насочват за разграждане [64]

За разлика от ISG15 и Mx, олигоаденилат синтетаза-РНК-аза L и PKR се експресират конститутивно в повечето клетки. Тази конститутивна експресия може да се амплифицира от интерфероните.

#### **OAS – RNAaseL (олигоаденилат синтетаза-РНК-аза L)**

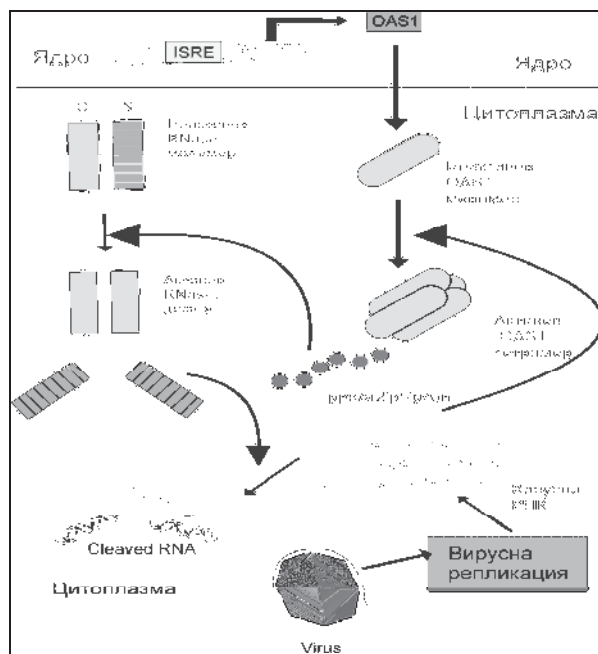
Олигоаденилат синтетазите са открити като индуцирани от интерфероните протеини, които водят до образуването на нискомолекулни инхибитори на синтеза на протеини (транслацията) в безклетъчна система. OAS катализират по-

лимеризирането на АТФ в аденозини олигомери чрез 2', 5'-фосфодиестерни връзки [38, 61]. Тези уникални 2', 5'-олигомери специфично активират латентна форма на цитоплазмения ензим RNaseL (L – latent), който разгражда цитоплазмените РНК [15]. Така OAS заедно с RNaseL представлява антивирусен защитен механизъм за отстраняване на РНК. OAS протеините имат нискостепенна конститутивна експресия и могат да играят роля на рецептори за разпознаването на патогените, като откриват присъствието на двРНК в цитоплазмата. Деградираната от RNaseL РНК може да активира други цитоплазмени PRR (pattern recognition receptors), като RIG-I и MDA5, което води до индукция на гените на интерфероните. Това обяснява наблюдението, че клетките, в които има дефицит на RNaseL, показват значително намалена продукция на IFN- $\beta$  поради намаляване на силата на сигнала, подаван от тези PRR [49].

Активираната от 2', 5'-олигоданилата RNaseL се експресира като 80 kDa протеин с два киназоподобни домена (PUG и STYKc) и осем анакиринни повторения (ankyrin repeats) [67]. Ензимът се експресира конститутивно като неактивен мономер. Автоинхибицията на ензима се отменя при свързването на 2', 5'-олигомерите, генерирани от OAS протеини с анакиринните последователности, и последващата я хомодимеризация [52]. Димеризираният ензим е активен и деградира еврРНК (фиг. 4) [22, 76].

Поради схващането, че действат по общ път чрез RNaseL, антивирусните ефекти на OAS протеините са изследвани при мишки с инактивирана RNaseL [82]. При тях се установява увеличена чувствителност към РНК вируси от семействата Picornaviridae, Reoviridae, Togaviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Flaviviridae и Retroviridae [67]. Антивирусният ефект на RNaseL срещу ДНК вирусите не е напълно изяснен. Има някои ДНК вируси, които в жизнения си цикъл синтезират двРНК и те могат потенциално да индуцират появата на 2', 5'-олигомери. Това обаче се наблюдава рядко, вероятно поради кодирани от вирусите инхибиращи фактори, какъвто е случаят с E3L протеин на варицелния вирус (Vaccinia virus) [77]. Пряката роля на OAS в антивирусната защита при хората (без участието на RNaseL) се подчертава от генетичните проучвания, които показват полиморфизми в сплайсинг-мястото (splice-acceptor site) на OAS1 гена. Тази точкова мутация води до две изоформи на ензима, които имат различни активности, и те са корелирани с антивирусния отговор при ваксиниране срещу жълта треска [11]. Наскоро стана ясно, че OAS протеините имат

допълнителни антивирусни функции, които не зависят от активирането на RNaseL. Точният механизъм още не е напълно проучен. Точковите полиморфизми SNP (single nucleotide polymorphisms) в усилващото сплайсинга място в OAS1 корелират с чувствителността към WNV [78].



**Фиг. 4. Механизъм на антивирусния ефект на OAS1-RNaseL.** OAS се експресира конститутивно в ниски нива и се индуцира от тип I интерфероните. Протеинът се натрупва в цитоплазмата като неактивни мономери. При активиране от вирусната двРНК ензимът олигомеризира до (в случая с OAS1) образуването на тетрамер, който синтезира 2', 5'-олигоданилати. Те от своя страна активират конститутивно експресирания RNaseL. Свързването на 2', 5' олигоданилатите към RNaseL води до димеризиране на мономерите чрез подобни на кинази домени, които след това деградираат клетъчните и вирусните РНК (по [64])

Интересно е, че капацитетът за възприемане на GTP като субстрат подсказва възможността за потенциална роля на OAS в РНК сплайсинга. В този процес ензимът генерира 2', 5'-фосфодиестерна връзка между гуанозина в 5'-края на един интрон и аденозина в 3'-края на сплайсинг-сигнала в междинния продукт на сплайсинга [68].

**PKR (eIF-2 киназа)**

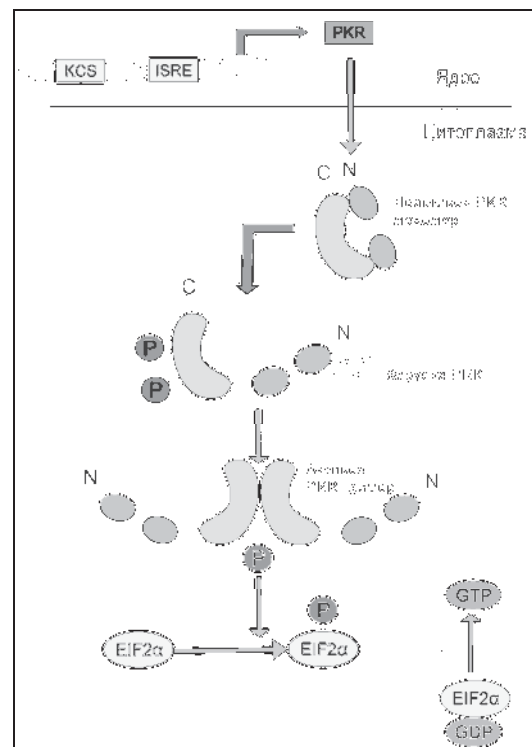
PKR (другото име – eIF2 $\alpha$ K2) е серин/треонин киназа, която се индуцира от интерферон и се активира от двРНК. Активираният ензим катализира фосфорилирането на алфа-субединицата на еукариотния инициализиращ фактор 2 (eIF2), което води до спиране на синтеза на протеини. Подобно на OAS, PKR първоначално е идентифицирана като регулатор на антивирусния отговор чрез изследване на синтеза на про-

теини в безклетъчни лизати от третирани с интерферон и двРНК клетки [38, 51]. PKR принадлежи на малко семейство от протеинкинази, които реагират на стресовите фактори от околната среда, като регулират синтеза на протеини. Другите членове на това семейство са eIF2 $\alpha$ K1 (eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  kinase 1 – еукариотен инициращ транслацията фактор киназа 2 $\alpha$  киназа 1, известен и като HRI), EIF2 $\alpha$ K3 (известен и под името PERK) и EIF2 $\alpha$ K4 (известна и под името GCN2). Членовете на това семейство кинази фосфорилират eIF2 $\alpha$ , което спира транслацията, и с това позволяват на клетката да реконфигурира експресията на гените си. Много от антивирусните и антипролиферативни активности на PKR се дължат на фосфорилирането на eIF2 $\alpha$ . Структурата на комплекса eIF2 $\alpha$  и PKR говори против наличието на алтернативни субстрати [16]. Има обаче много биологични и биохимични доказателства за наличието и на други мишени за фосфорилиране от PKR, но последиците от фосфорегулирането на други протеини от PKR все още не са изследвани. Освен регулирането на протеините чрез фосфорилиране PKR модулира и сигналните пътища на клетката. PKR конститутивно се експресира в тъканите на базално ниво и се индуцира от тип I и тип III IFN [5]. При нормални условия PKR е неактивен мономер и киназният домен в аминокотерминалния край на протеина е пространствено скрит (неактивен) [23, 55]. Репресията му се премахва от активиращи лиганди като вирусни РНК, полианионни молекули като хепарин [24] или церамид [63], белтъчни активатори [61], които водят до промяна в конформацията, позволяваща свързване на АТФ към С-терминалния киназен домен. Киназният домен се състои от две части, които поотделно регулират взаимодействието между протеиновите мономерни и субстрата.

Активният ензим се състои от хомодимер, ориентиран паралелно „гръб до гръб“, като активните места на ензима са насочени навън [16]. Димеризацията предизвиква и се нуждае от автофосфорилиране на няколко ключови аминокиселинни остатъка [19, 62, 73]. Активацията води и до фосфорилиране на EIF2 $\alpha$  и спиране на транслацията (фиг. 5).

Доказано е, че РНК вирусите могат пряко да активират PKR посредством два РНК свързващи мотива (RBM – RNA binding motifs), разположени в аминокотерминалния край на PKR. Всички тествани досега RBM могат да свързват двРНК независимо от нуклеотидната ѝ последователност и като разпознават специфични структури от висок порядък. Така PKR, подобно на системата

OAS/RNaseL, играе роля на PRR. За активирането на PKR са необходими по-дълги последователности от типичните свързващи RBM, които са само 16 нуклеотидни двойки [54], двРНК, по-дълга от 30 нуклеотидни двойки, активира PKR най-ефективно. Едноверижни РНК от 47 бази с ограничена третична структура също могат да активират киназата, ако имат 5'-трифосфати [53]. Тъй като повечето клетъчни РНК имат 5'-монофосфати, това позволява на PKR специфично да разпознава само таргетните вирусни РНК.



**Фиг. 5. Механизъм на действие на PKR.** PKR се експресира конститутивно, освен това се индуцира от тип I IFN чрез координиран контрол от KCS и ISRE елементи в промотера. Киназата акумулира и в ядрото, и в цитоплазмата като активен мономер. PKR се активира директно от вирусните РНК и от няколко други лиганда, като напр. церамид или протеинния активатор PACT. Когато PKR се активира, мономерите се фосфорилират и димеризират, за да образуват активния ензим. Активираният PKR регулира няколко вътреклетъчни сигнализационни пътя по механизъм, който не е напълно охарактеризиран, но критичната функция на PKR е потискането на транслацията чрез фосфорилиране на eIF2 $\alpha$  (по [64]).

Някои други свързани с патогените молекули, като липополизахариди (LPS), които са лиганди за TLR4, могат също да активират PKR [37]. Това вероятно става непряко с участието на друг протеин. До момента са открити три протеинови активатора на PKR. PKR взаимодейства със семейството на адапторните протеини TRAF [tumour-necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor], които са интегрална част от TLR сигнализационните вътреклетъчни пътища

[27]. Протеинният акиватор на PKR – PACT (protein activator of PKR) реагира на индуциращите стрес молекули, като водороден прекис, церамид и цитокини (IFN $\gamma$ , IL-3 и TNF) [60]. Последните от активирането на PKR от PACT в контекста на антивирусния отговор още не са изяснени. PKR може да бъде активирана и от каспазите (caspase-3, caspase-7 и caspase-8) чрез отцепване на потискащия аминотерминален край. Това води до генериране на постоянно активен, трункиран киназен домен [26, 65].

Създадени са трансгенни мишки, при които има свръхекспресия на човешка PKR [42]. Те имат увреден антивирусен отговор; по-чувствителни са на инфекция с VSV [7, 70], вируса на грипа и Bunyavera-вирусна инфекция [9]. Експериментите върху ембрионални фибробласти от мишки с инактивиран PKR ген показват, че PKR участва в протекцията срещу инфекции с голям брой РНК вируси, измежду които HCV [58], HDV [12], WNV [66], HIV-1 [51], SV [28], EMCV (encephalomyocarditis virus) [79] и вируса на болестта крак-ръка (FMDV) [14], а също така и срещу някои ДНК вируси, като HSV-1 [3]. Както и при MxA и OAS1, генетичният анализ на човешките популации показва, че полиморфизми в гените и промотерите корелират с изхода от инфекцията с HCV [40].

### ЗАКЛЮЧИТЕЛНИ БЕЛЕЖКИ

През последните години се постигна значителен напредък в разбирането за мястото, където е интегрирана системата на тип I интерфероните в имунитета. Секрецията им се предизвиква от специализирани цитоплазмени или мембранни сензори. Те активират секрецията на различни интерферони тип I, като вероятно решението кой от тях да се секретира, се определя от контекста на взаимодействието клетка-тъкан-вирус. Секретираният на мястото на инфекцията интерферон води до появата в неинфектираните клетки на протеини, които ги правят нечувствителни на заразяване с вируси, заедно с това интерфероните водят и до зреене на фагоцитите и трансформирането им в зрели антиген-представящи дендритни клетки. Дендритните клетки, които са фагоцитирали вируси или апоптозни телца, секретират тип I интерферон, който достига по кръвообращението до всички клетки в тялото и предизвиква в тях антивирусно състояние. Той е причината за грипоподобния синдром при вирусните инфекции. Това създава пречка пред генерализирането на вирусната инфекция и дава време за възникване на адаптивния имунитет с появата на цитотоксични Т-лимфоцити и анти-

ло-секретиращи В-лимфоцити, които елиминират окончателно заразените клетки и циркулиращите в извънклетъчните течности вируси. Така интерфероните осъществяват връзката между вродегия и адаптивния имунитет.

Антивирусното състояние, предизвиквано от индуцираните от интерферона гени (ISG), се дължи на появата в клетките на протеини, които увреждат жизнения цикъл на вирусите, като разграждат РНК (системата OAS-RNaseL), спират транслацията (PKR) и блокират вътреклетъчния трафик на вирусните нуклеопротеини (MxA). Същите тези молекули са и причината за антипролиферативния и антитуморния ефект на тип I интерфероните.

Ефектът на интерфероните върху имунокомпетентните клетки, или т.нар. имуномодулиращ ефект, и ролята им в патогенезата на вирусните, аутоимунните и неопластичните заболявания е обект на следващ обзор.

### Библиография

1. Accola, M. A. et al. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. – *J. Biol. Chem.*, **277**, 2002, № 24, 21829-21835.
2. Aebi, M. et al. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. – *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1989, № 11, 5062-5072.
3. Al-khatib, K. et al. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR and the murine 2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent RNase L are required for IFN-beta-mediated resistance against herpes simplex virus type 1 in primary trigeminal ganglion culture. – *Virology*, **313**, 2003, № 1, 126-135.
4. Andersson, I. et al. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. – *J. Virol.*, **78**, 2004, № 8, 4323-4329.
5. Ank, N. et al. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. – *J. Virol.*, **80**, 2006, № 9, 4501-4509.
6. Arnheiter, H. et al. Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. – *Cell*, **62**, 1990, № 1, 51-61.
7. Balachandran, S. et al. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. – *Immunity*, **13**, 2000, № 1, 129-141.
8. Barton, G. M., J. C. Kagan et R. Medzhitov. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. – *Nat. Immunol.*, **7**, 2006, № 1, 49-56.
9. Bergmann, M. et al. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. – *J. Virol.*, **74**, 2000, № 13, 6203-6206.
10. Blomstrom, D. C. et al. Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence. – *J. Biol. Chem.*, **261**, 1986, № 19, 8811-8816.
11. Bonnevie-Nielsen, V. et al. Variation in antiviral 2',5'-oligoadenylate synthetase (2'5'AS) enzyme activity is controlled by a single-nucleotide polymorphism at a splice-acceptor site in the OAS1 gene. – *Am. J. Hum. Genet.*, **76**, 2005, № 4, 623-633.

12. Chen, C. W. et al. The double-stranded RNA-activated kinase, PKR, can phosphorylate hepatitis D virus small delta antigen at functional serine and threonine residues. – *J. Biol. Chem.*, 277, 2002, № 36, 33058-33067.
13. Chieux, V. et al. Inhibition of coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein. – *Virology*, 283, 2001, № 1, 84-92.
14. Chinsangaram, J., M. Koster et M. J. Grubman. Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. – *J. Virol.*, 75, 2001, № 12, 5498-5503.
15. Clements, M. J. et C. M. Vaquero. Inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA in reticulocyte lysates: evidence for activation of an endoribonuclease. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 1978, № 1, 59-68.
16. Dar, A. C., T. E. Dever et F. Sicheri. Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. – *Cell*, 122, 2005, № 6, 887-900.
17. de Veer, M. J. et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. – *J. Leukoc. Biol.*, 69, 2001, № 6, 912-920.
18. Der, S. D. et al. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1998, № 26, 15623-15628.
19. Dey, M. et al. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. – *Cell*, 122, 2005, № 6, 901-913.
20. Fernandez, M., J. A. Quiroga et V. Carreno. Hepatitis B virus downregulates the human interferon-inducible MxA promoter through direct interaction of precore/core proteins. – *J. Gen. Virol.*, 84, 2003, № 8, 2073-2082.
21. Fernandez, M. et al. In vivo and in vitro induction of MxA protein in peripheral blood mononuclear cells from patients chronically infected with hepatitis C virus. – *J. Infect. Dis.*, 180, 1999, № 2, 262-267.
22. Floyd-Smith, G., E. Slattery et P. Lengyel. Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate-dependent endonuclease. – *Science*, 212, 1981, № 4498, 1030-1032.
23. Gelev, V. et al. Mapping of the auto-inhibitory interactions of protein kinase R by nuclear magnetic resonance. – *J. Mol. Biol.*, 364, 2006, № 3, 352-363.
24. George, C. X. et al. Characterization of the heparin-mediated activation of PKR, the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase. – *Virology*, 221, 1996, № 1, 180-188.
25. Giannakopoulos, N. V. et al. Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336, 2005, № 2, 496-506.
26. Gil, J. et M. Esteban. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. – *Oncogene*, 19, 2000, № 32, 3665-3674.
27. Gil, J. et al. TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. – *Mol. Cell. Biol.*, 24, 2004, № 10, 4502-4512.
28. Gorchakov, R. et al. PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shutoff during Sindbis virus infection. – *J. Virol.*, 78, 2004, № 16, 8455-8467.
29. Gordien, E. et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. – *J. Virol.*, 75, 2001, № 6, 2684-2691.
30. Grimm, D. et al. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 2007, № 16, 6806-6811.
31. Haller, O. et al. Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice. – *J. Exp. Med.*, 149, 1979, № 3, 601-612.
32. Haller, O. et al. Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus. – *Nature*, 283, 1980, № 5748, 660-662.
33. Haller, O. et al. Tick-borne thogoto virus infection in mice is inhibited by the orthomyxovirus resistance gene product Mx1. – *J. Virol.*, 69, 1995, № 4, 2596-2601.
34. Hijikata, M., Y. Ohta et S. Mishiro. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt-88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. – *Intervirology*, 43, 2000, № 2, 124-127.
35. Hoenen, A. et al. West Nile virus-induced cytoplasmic membrane structures provide partial protection against the interferon-induced antiviral MxA protein. – *J. Gen. Virol.*, 88, 2007, № 11, 3013-3017.
36. Horisberger, M. A. et al. cDNA cloning and assignment to chromosome 21 of IFI-78K gene, the human equivalent of murine Mx gene. – *Somat. Cell Mol. Genet.*, 14, 1988, № 2, 123-131.
37. Hsu, L. C. et al. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. – *Nature*, 428, 2004, № 6980, 341-345.
38. Kerr, I. M., R. E. Brown et A. G. Hovanessian. Nature of inhibitor of cell-free protein synthesis formed in response to interferon and double-stranded RNA. – *Nature*, 268, 1977, № 5620, 540-542.
39. King, M. C., G. Raposo et M. A. Lemmon. Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2004, № 24, 8957-8962.
40. Knapp, S. et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. – *Genes. Immun.*, 4, 2003, № 6, 411-419.
41. Kochs, G. et O. Haller. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1999, № 5, 2082-2086.
42. Ladiges, W. et al. Expression of human PKR protein kinase in transgenic mice. – *J. Interferon Cytokine Res.*, 22, 2002, № 3, 329-334.
43. Lenschow, D. J. et al. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. – *J. Virol.*, 79, 2005, № 22, 13974-13983.
44. Lindenmann, J. Inheritance of resistance to influenza virus in mice. – *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 116, 1964, 506-509.
45. Liu, Y. C., J. Penninger et M. Karin. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. – *Nat. Rev. Immunol.*, 5, 2005, № 12, 941-952.
46. Loeb, K. R. et A. L. Haas. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. – *J. Biol. Chem.*, 267, 1992, № 11, 7806-7813.
47. MacMicking, J. D. IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. – *Trends Immunol.*, 25, 2004, № 11, 601-609.
48. Malakhova, O. A. et D. E. Zhang. ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. – *J. Biol. Chem.*, 283, 2008, № 14, 8783-8787.
49. Malathi, K. et al. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. – *Nature*, 448, 2007, № 7155, 816-819.
50. Meurs, E. et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. – *Cell*, 62, 1990, № 2, 379-390.
51. Nagai, K. et al. Induction of CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication by mutants of the

- interferon-inducible protein kinase PKR. – *J. Virol.*, **71**, 1997, № 2, 1718-1725.
52. Nakanishi, M., Y. Goto et Y. Kitade. 2-5A induces a conformational change in the ankyrin-repeat domain of RNase L. – *Proteins*, **60**, 2005, № 1, 131-138.
  53. Nallagatla, S. R. et al. 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. – *Science*, **318**, 2007, № 5855, 1455-1458.
  54. Nanduri, S. et al. Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. – *EMBO J.*, **17**, 1998, № 18, 5458-5465.
  55. Nanduri, S. et al. A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. – *EMBO J.*, **19**, 2000, № 20, 5567-5574.
  56. Napirei, M. et al. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. – *Nat. Genet.*, **25**, 2000, № 2, 177-181.
  57. Narasimhan, J., J. L. Potter et A. L. Haas. Conjugation of the 15-kDa interferon-induced ubiquitin homolog is distinct from that of ubiquitin. – *J. Biol. Chem.*, **271**, 1996, № 1, 324-330.
  58. Noguchi, T. et al. Effects of mutation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A on interferon resistance mediated by inhibition of PKR kinase activity in mammalian cells. – *Microbiol. Immunol.*, **45**, 2001, № 12, 829-840.
  59. Osiak, A. et al. ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. – *Mol. Cell Biol.*, **25**, 2005, № 15, 6338-6345.
  60. Patel, R. C. et G. C. Sen. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. – *EMBO J.*, **17**, 1998, № 15, 4379-4390.
  61. Reboillat, D. et A. G. Hovanessian. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. – *J. Interferon Cytokine Res.*, **19**, 1999, № 4, 295-308.
  62. Romano, P. R. et al. Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. – *Mol. Cell Biol.*, **18**, 1998, № 4, 2282-2297.
  63. Ruvoilo, P. P. et al. Ceramide regulates protein synthesis by a novel mechanism involving the cellular PKR activator RAX. – *J. Biol. Chem.*, **276**, 2001, № 15, 11754-11758.
  64. Sadtler, A. J. et B. R. Williams. Interferon-inducible antiviral effectors. – *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 2008, № 7, 559-568.
  65. Saelens, X., M. Kalai et P. Vandennebe. Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. – *J. Biol. Chem.*, **276**, 2001, № 45, 41620-41628.
  66. Samuel, M. A. et al. PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. – *J. Virol.*, **80**, 2006, № 14, 7009-7019.
  67. Silverman, R. H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. – *J. Virol.*, **81**, 2007, № 23, 12720-12729.
  68. Sperling, J. et al. Possible involvement of (2'5')oligoadenylate synthetase activity in pre-mRNA splicing. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1991, № 23, 10377-10381.
  69. Stetson, D. B. et R. Medzhitov. Type I interferons in host defense. – *Immunity*, **25**, 2006, № 3, 373-381.
  70. Stojdl, D. F. et al. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. – *J. Virol.*, **74**, 2000, № 20, 9580-9585.
  71. Suzuki, F. et al. Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. – *J. Viral. Hepat.*, **11**, 2004, № 3, 271-276.
  72. Takeuchi, T. et H. Yokosawa. Detection and analysis of protein ISGylation. – *Methods Mol. Biol.*, **446**, 2008, 139-149.
  73. Taylor, D. R. et al. Autophosphorylation sites participate in the activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR. – *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1996, № 11, 6295-6302.
  74. Torisu, H. et al. Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis. – *Neurology*, **62**, 2004, № 3, 457-460.
  75. Turan, K. et al. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. – *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2004, № 2, 643-652.
  76. Wreschner, D. H. et al. Interferon action--sequence specificity of the ppp(A2'p)nA-dependent ribonuclease. – *Nature*, **289**, 1981, № 5796, 414-417.
  77. Xiang, Y. et al. Blockade of interferon induction and action by the E3L double-stranded RNA binding proteins of vaccinia virus. – *J. Virol.*, **76**, 2002, № 10, 5251-5269.
  78. Yakub, I. et al. Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection. – *J. Infect. Dis.*, **192**, 2005, № 10, 1741-1748.
  79. Young, M. C. et al. Inhibitory role of the host apoptogenic gene PKR in the establishment of persistent infection by encephalomyocarditis virus in U937 cells. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1999, № 21, 11860-11865.
  80. Yoshida, H. et al. Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. – *Nat. Immunol.*, **6**, 2005, № 1, 49-56.
  81. Zhao, C. et al. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2005, № 29, 10200-10205.
  82. Zhou, A. et al. Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. – *EMBO J.*, **16**, 1997, № 21, 6355-6363.

Постъпил за печат на 2 септември 2009 г.