

Identification et caractérisation fonctionnelle de nouveaux *single nucleotide polymorphisms* dans le gène anti-myxovirus *MxA* humain

Identification and functional characterization of new SNPs
in the human myxovirus resistance *MxA* gene

Xác định các đa hình đơn nucleotide mới của gen kháng
virus MxA người và các đặc tính của chúng



Tam TRAN THI DUC

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Vétérinaires
Année académique 2011-2012

*«Certains jours, nous nous sentons tels des étrangers dans ce monde.
Mais lorsque notre cœur s'ouvre, nous comprenons que notre place est précisément ici»*

Bouddha

Remerciements

La réalisation d'une thèse est le fruit d'un long travail personnel, c'est un défi qu'on se lance et ça devient un travail collectif grâce à l'aide, au soutien et aux encouragements des promoteur et co-promoteur, des collègues, de la famille et des amis. Ainsi, j'aimerais remercier celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Mes premiers remerciements vont au Professeur Freddy Coignoul, chef du service de Pathologie générale et autopsies et Vice-recteur de l'Université de Liège qui m'a accueillie au sein du département de Morphologie et Pathologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège.

Je remercie très sincèrement mon promoteur, le Professeur Daniel Desmecht, chef du service de Pathologie systémique et autopsies pour son accueil chaleureux. Il a été l'instigateur du projet de thèse. Sa confiance, sa disponibilité, son intérêt pour mes recherches ont été indispensables à l'aboutissement de ce travail et son implication dans la rédaction et la correction de cette thèse m'a beaucoup fait progresser.

Mes plus profonds remerciements vont à ma co-promotrice, le Docteur Anne Cornet, qui m'a guidée avec tellement de sollicitude tout au long de ce travail. Elle m'a apporté une aide inestimable en me formant à la biologie moléculaire et en étant très attentive à l'évolution de cette recherche.

Je remercie également les membres de mon comité d'accompagnement, le Professeur Etienne Thiry et le Docteur Thierry van den Berg pour leurs conseils et leurs encouragements.

Je remercie également le Professeur Marie-Louise Scippo, chef du service des Analyses des Denrées alimentaires pour m'avoir permis de faire des mesures de bioluminescence avec l'aide d'Anne-Sophie Remacle que je remercie vivement pour la manipulation du luminomètre. Je remercie le Professeur Frédéric Farnir, chef du service de Biostatistique et Bioinformatique appliquées aux sciences vétérinaires et le Docteur Charles Michaux pour leur disponibilité et leur aide dans le domaine des analyses statistiques. Merci à Céline Lam de la plate-forme génomique du GIGA-Research pour avoir réalisé les séquençages.

Je remercie les Professeurs Nadine Antoine et Luc Grobet, chefs des services d'Histologie et d'Embryologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire qui ont encadré mon DEA. Je remercie les membres du service d'Histologie, Vinciane Toppets, Maryse Minne, Céline Tonus, Christian Lakaye, Fabien Ectors, Joëlle Piret pour leur soutien et leurs encouragements.

Merci aux membres, passés et présents, des services de Pathologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire pour les bons moments passés ensemble, Amélie, Annabelle, Aurore, Benoît, Calixte, Christine, Déborah, Dominique, Els, Etienne, François, Hoang, Hussein, Laurent, Karine, Nam, Marie-Pierre, Martin, Mutien, Michel, Michaël, Nidal, Sandra, Sandy, Stéphanie, Thierry, Thomas, Tomás et Vanessa.

Je remercie également mes collègues de bureau, Jérôme Willems, Michaël Sarlet, Patrick Stiernet, Sébastien Brouwers, Soumya Pastoret pour leur aide, leurs conseils pour l'avancement de mon travail et surtout pour avoir partagé d'excellents moments pendant ces 4 années et particulièrement toi, Sébastien, pour ton aide précieuse dans le domaine de la culture cellulaire.

Un très grand merci à Carine Garot et Nathalie Guillaume pour leur aide administrative.

Merci à Alexandre Frankinet, stagiaire de la Haute Ecole de la Province de Liège qui a travaillé avec moi pour le séquençage de certains échantillons d'ADN.

J'ai bénéficié de l'aide active de Safia Tennah et du Docteur Nassim Moula qui m'ont rapporté des échantillons à analyser d'Algérie et de République Démocratique du Congo. Je leur exprime toute ma reconnaissance.

Je remercie les étudiants belges, camerounais, chinois, français, libyens, nigériens, rwandais et vietnamiens et qui ont accepté de participer à cette étude.

J'exprime ma plus profonde gratitude aux Professeurs Pham Van Tu et Do Duc Viet du service d'Anatomie et d'Histologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université Agronomique de Hanoï pour avoir accepté que je fasse cette thèse malgré la surcharge de travail que ça leur a occasionné.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien financier octroyé par le Ministre de l'Education Nationale et de la Formation Professionnelle du Vietnam.

Je remercie ma famille, mes parents, ma belle-mère, mes sœurs, belles-sœurs, frères, beaux-frères pour l'affection qu'ils m'ont témoigné durant ces 4 années et je remercie infiniment Tham et Hoa qui s'occupent de ma fille Hoàng Anh depuis que je séjourne en Belgique pour ma thèse.

Merci à mon mari Hoàng qui, par amour, m'a accompagné dans mon séjour en Belgique.

Merci à ma fille Hoàng Anh qui a eu le courage de supporter que 10 000 kilomètres nous séparent pendant toutes ces années. Elle a toujours été mon soleil. C'est grâce à la webcam que je l'ai vue grandir. Je suis très fière d'elle.

Je remercie mes amis et amies qui, où qu'ils soient dans le monde, m'ont toujours encouragée et soutenue moralement.

Je dédie ma thèse

à ma famille

à Hoàng

à Hoàng Anh

... et à une petite vie qui grandit en moi

Table des matières

Remerciements	3	
Table des matières	5	
Liste des abréviations	6	
Résumé	8	
Summary	11	
Tóm tắt	12	
Les GTPases Mx — revue de la littérature	15	
I. Introduction	17	
II. Caractéristiques structurales des protéines Mx	18	
III. Organisation génomique et contrôle de l'expression aux loci Mx	28	
IV. Diversité allélique aux loci Mx	36	
V. Caractéristiques fonctionnelles des protéines Mx	41	
VI. Expression pathologique des protéines Mx	67	
VII. Bibliographie	69	
Contributions personnelles	133	
Etude 1	Detection of new biallelic polymorphisms in the human MxA gene. (Tran Thi Duc T. <i>et al.</i> , Mol Biol Rep 2012, 39, 8533-8)	134
Etude 2	Functional characterization of new allelic polymorphisms identified in the promoter region of the human <i>MxA</i> gene (Tran Thi Duc T. <i>et al.</i> , Int J Immunogenetics 2012, <i>in press</i>)	147
Discussion générale	163	
Perspectives	167	

Liste des abréviations

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNdb	Acide désoxyribonucléique double brin
AP-1	Activator Protein-1, activateur
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
boMx	Bovine Mx protein, Protéine Mx bovine
CID	Central Interactive Domain, domaine interactif central
cm	Centimètre
ddNTP	Didésoxynucléotide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Désoxynucléotide
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acetic Acid
ENSEMBL	Système bio-informatique d'annotation automatique de génomes
g	Force de gravité
GED	GTPase Effector Domain
GIGA	Groupe interdisciplinaire de génoprotéomique appliquée
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Hydrolase de guanosine triphosphate
HCV	Hepatitis C virus, virus de l'hépatite C
HEK-293	Human Embryonic Kidney-293, cellules embryonnaires rénales humaines -293

huMx	Humain Mx protein, protéine Mx humaine
IFN	Interféron
IL6	Interleukine 6
ISRE	Interferon Sensitive Response Element
kDa	kiloDalton
L	Litre
luc	Luciférase
LZ	Leucine zipper, triplet leucine
MD	Middle Domain, domaine central
mL	millilitre
mM	millimolaire
mol	mole
muMx	Mx murine protein, protéine Mx murine
Mx	Myxovirus
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
pb	Paire de bases (1kb = 1000pb)
SAS	Self Assembly Sequence, séquence d'autoassemblage
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, polymorphisme nucléotidique

Résumé

Le gène *MxA* humain code pour la protéine MxA humaine qui exerce une activité antivirale. Les études génétiques menées jusqu'à présent sur le gène *MxA* ont été systématiquement orientées vers une recherche de variations alléliques dans un contexte pathologique et ce principalement sur un échantillonnage de taille réduite et pratiqué au départ d'une population d'origine asiatique. Ces études ont toutefois démontré que certaines variations nucléotidiques du gène, principalement localisées au niveau du promoteur, pouvaient influencer le taux de production des protéines MxA.

Dans ce contexte, il était intéressant de réaliser une analyse sur une cohorte constituée de plusieurs centaines d'individus d'origines diverses afin de déterminer si d'autres polymorphismes que ceux déjà connus en -123 et -88 pourraient être identifiés et de vérifier si ceux-ci seraient susceptibles d'avoir un impact sur la production et/ou l'activité de la protéine MxA.

Lors de la réalisation de la première partie de mon travail, j'ai d'abord commencé par récolter et extraire l'ADN génomique (ADNg) de 267 étudiants volontaires d'origine africaine, asiatique et européenne. A partir de ces ADNg, une amplification systématique de différents fragments du gène *MxA* a été réalisée par PCR.

Mon étude s'est plus particulièrement focalisée sur la région promotrice ainsi que sur les dix-sept exons du gène. Après vérification de la qualité des fragments amplifiés, les produits de PCR ont été purifiés et séquencés.

Une analyse minutieuse, par comparaison des séquences obtenues, m'a permis de recenser plusieurs variations nucléotidiques connues et, surtout, d'identifier de nouveaux polymorphismes.

Plus précisément, mon analyse m'a permis d'identifier un total de dix-huit polymorphismes dont quatorze étaient répertoriés antérieurement dans les banques de données internationales. Parmi les quatre nouveaux polymorphismes que j'ai détectés, les deux premiers sont situés aux positions -309 (C/G) et -101 (G/A) de la région promotrice et pourraient théoriquement affecter l'expression du gène *MxA*. Les deux suivants, qui se situent aux positions +15523 (G/A) et +15561 (G/A) de l'exon 10 se suivent et sont localisés dans la région codante du gène *MxA* humain, ils conduisent aux substitutions suivantes : la glycine 255 est remplacée par l'acide glutamique et la valine 268 est remplacée par la méthionine. Ces substitutions sont localisées dans la région N-terminale de la protéine *MxA* et pourraient théoriquement en affecter la fonction antivirale.

La deuxième partie de mon travail concerne l'impact des nouveaux SNPs que j'ai identifiés dans la région promotrice du gène sur les modalités du contrôle de son expression. Cet aspect est très important en raison du profil biologique de la protéine *MxA*. En effet, les protéines *Mx* sont inductibles par les interférons (IFN) de type I et III et elles appartiennent à la superfamille des larges GTPases de haute masse moléculaire. Ces GTPases particulières s'apparentent aux dynamines, protéines dont l'étude a démontré l'implication dans l'invagination des membranes cellulaires et dans le trafic vésiculaire. Une propriété majeure des protéines *Mx* est leur fonction antivirale. Plusieurs isoformes de ces protéines sont capables d'inhiber le cycle vital d'un large spectre de virus à ARN, tels ceux de la famille des *Orthomyxoviridae*, des *Paramyxoviridae*, des *rhodoviridae* et des *Bunyaviridae* et sont, de ce fait, des composants importants de la réponse immunitaire innée.

En raison de l'implication directe des gènes *Mx* dans la réponse cellulaire interféron-dépendante, les études menées antérieurement sur le gène *MxA* humain ont systématiquement été orientées vers une recherche de variations alléliques dans un contexte pathologique. Ces études, ciblant plus spécialement une partie du promoteur du gène, ont, le plus souvent, été menées dans le but de corrélérer la réponse d'un individu porteur d'un polymorphisme particulier au traitement à l'interféron alpha. La réponse aux interférons des patients porteurs de polymorphismes alléliques est affectée du simple fait de la présence de ces variations. Le portage de certains allèles peut, en médecine humaine, conférer une résistance contre une maladie virale.

Lors de la réalisation de la deuxième partie de mon travail, la contribution au contrôle de l'expression des trois variations nucléotidiques situées aux positions -309, -101 et +20 sur le gène *MxA* humain a été examinée via un système de gène-rapporteur (luciférase). Mes résultats montrent que, à côté du rôle joué par deux polymorphismes déjà connus situés aux positions -123A et -88T, l'allèle présent à chacune des trois positions précitées affecte significativement le taux d'expression.

Nos résultats permettent d'améliorer la justesse des génotypages qui sont actuellement prescrits en clinique pour prédire la réactivité des patients infectés par l'hépatite C aux interférons de type I.

Il serait intéressant de poursuivre notre étude sur un plus grand nombre d'individus de la population africaine, notamment parce qu'il n'est pas impossible que l'inventaire des variants existant dans cette population reste incomplet. De même, il serait intéressant d'étudier l'influence sur l'activité antivirale des deux nouveaux polymorphismes localisés aux positions +15523 (G/A) et +15561 (G/A) de la région codante du gène *MxA* puisqu'ils causent deux substitutions dans la séquence protéique de la protéine *MxA*.

Les nouveaux polymorphismes que nous avons détectés pourraient aussi permettre de découvrir de nouvelles associations entre prévalence de maladies virales spécifiques, manifestations cliniques, pronostic vital et nouveaux variants alléliques du gène *MxA*.

Summary

The interferon-inducible human MxA protein plays an important role in innate defense against an array of viruses. One might expect allelic diversity at the *MxA* locus to influence the timing and magnitude of its expression or even the range of viruses whose biological cycle is inhibited by the encoded product. Here we have collected 267 samples of genomic DNA from three distinct populations (European, Asian, and African) and have systematically sequenced the promoter of the *MxA* gene and its 17 exons in order to inventory its allelic variants. Fifteen single-nucleotide polymorphisms were detected, four of which had never been identified before. Two of these, located in the promoter (at positions -309 and -101 respectively), might affect the MxA expression pattern. The other two result in substitutions (Gly255Glu and Val268Met) in the protein's N-terminal region that might directly affect its antiviral function.

We then examined the three single nucleotide polymorphism sites (-309, -101 and +20) for their ability to alter *MxA* gene promoter-driven reporter expression. We show that, besides the previously reported role of -123A and -88T, the presence of -101G is equally important. Moreover, when a promoter construct carries these three critical nucleotides, a first additional positive effect is conferred by a C at position -309 and, in this latter case, a second additional effect is produced by a A at position +20. This finding is clinically useful to improve prediction of IFN-responsiveness in patients not only with viral diseases for which type-I IFN therapy is used.

Tóm tắt

Gen MxA (Myxovirus) của người mã hóa protein tương ứng là MxA có khả năng kháng virus. Cho đến nay, những nghiên cứu về di truyền trên gen MxA của người chủ yếu được theo định hướng về sự đa dạng alen của gen này trong các trường hợp bệnh lí, hầu hết các công trình nghiên cứu trên đối tượng người có nguồn gốc châu Á. Những kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng có sự đa dạng về axit nucleic của gen, chủ yếu được tìm thấy ở đoạn promoter, những thay đổi này có ảnh hưởng đến hoạt động của protein MxA.

Dựa trên những định hướng đó, thật lí tưởng để nghiên cứu trên một tập hợp số lượng mẫu lớn đến hàng trăm cá thể khác nhau để xem nếu có thể phát hiện ra được các đột biến mới, bên cạnh hai đột biến tại các vị trí -123 và -88 đã được tìm ra từ các tác giả trước và nghiên cứu sự tác động của những thay đổi trình tự các nucleotide này có tác động như thế nào đến sự sản xuất cũng như sự hoạt động của protein MxA.

Trong phần đầu của nghiên cứu này, chúng tôi bắt đầu bằng việc thu thập và triết tách ADN của 267 sinh viên khỏe mạnh tham gia một cách tự nguyện, họ có nguồn gốc từ các chủng tộc châu Phi, châu Á và châu Âu. Từ ADN triết tách được, phản ứng PCR cho phép khuếch đại những đoạn chính xác của gen MxA.

Nghiên cứu của chúng tôi được đặc biệt tập trung vào vùng promoter và 17 exon của gen MxA người. Sau khi kiểm tra chất lượng của sản phẩm khuếch đại bằng kit của nhà sản xuất, sản phẩm của phản ứng PCR trên sẽ được làm sạch và tiến hành xác định trình tự nucleotide thông qua phản ứng giải trình tự ADN (sequencing).

Qua phân tích và so sánh trình tự gen, chúng tôi đã xác định được nhiều những đa hình đơn nucleotide (SNP) đã được biết tới trước đây và những đột biến mới.

Chúng tôi đã tiến hành phân tích 18 đoạn của gen MxA người. Kết quả cho thấy, có tổng cộng 18 đa hình đơn nucleotide được tìm thấy trong nghiên cứu, trong đó có 14 đa hình đơn nucleotide đã được các tác giả trước đây tìm ra và 4 lần đầu tiên được chúng tôi phát hiện. Với 4 đa hình đơn nucleotide mới này, hai đa hình đơn nucleotide đầu nằm ở vị trí -309 (G/C) và -101 (G/A), chúng thuộc phần promoter của gen MxA, cả hai đều có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen. Hai đa hình đơn nucleotide sau nằm ở vị trí +15523 (G/A) và +15561 (G/A), chúng thuộc exon 10, đoạn mã hóa của gen MxA người, dẫn đến sự thay thế của các axit amin : glycine ở vị trí 255 sẽ được thay thế bằng axit glutamic, và valine sẽ được thay thế bởi methionin ở vị trí 268. Những thay đổi axit amin trên nằm ở đoạn N-terminal của protein MxA. Những đột biến này có thể trực tiếp ảnh hưởng đến khả năng kháng virus của protein này.

Trong phần thứ hai của nghiên cứu nhằm làm sáng tỏ rằng hoạt động, chức năng của protein Mx khi có mặt của interferon nhóm 1 và nhóm 3. Protein Mx thuộc họ GTP có trọng lượng phân tử lớn, thuộc họ dynamin. Khi nhắc đến protein Mx chính là nhắc đến chức năng chống virus hữu hiệu, thuộc dạng miễn dịch bẩm sinh. Một số đồng dạng của protein này có khả năng ức chế sự nhân lên của nhiều virus có cấu tạo dạng ARN, chẳng hạn như họ *Orthomyxoviridae* và họ *Bunyaviridae*. Cụ thể, khi người bị nhiễm virus, protein MxA sẽ tích tụ trong tế bào chất của tế bào và triển khai hoạt động kháng virus, nó được coi như một chìa khóa trong đáp ứng miễn dịch bẩm sinh.

Do các gen Mx khi tham gia vào đáp ứng miễn dịch tế bào đều phụ thuộc vào sự hiện diện của interferon, chính vì thế các nghiên cứu di truyền của gen MxA người là hệ thống định hướng nghiên cứu đột biến alen trong các ca bệnh. Các nghiên cứu về gen MxA của người chủ yếu về đoạn promoter của gen, cụ thể là nghiên cứu mối liên quan giữa bệnh nhân mang một đa hình đơn nucleotide đặc biệt. Kết quả của sự đáp ứng miễn dịch trong quá trình điều trị bởi interferon thường phụ thuộc vào vị trí các đột biến. Vì vậy, trong y học, chỉ số về đột biến gen là thông điệp quan trọng làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh do virus gây ra cho con người.

Cụ thể, nghiên cứu của chúng tôi nhằm xem việc kết hợp của ba đột biến gen ở các vị trí -309, -101 và +20 của gen MxA người có làm thay đổi giá trị biểu hiện của protein MxA với sự có

mặt của interferon. Kết quả cho thấy rằng, bên cạnh vai trò của hai đột biến ở vị trí -123A và -88T đã được nghiên cứu bởi các tác giả đi trước, sự hiện diện của đột biến tại -101G mà chúng tôi tìm thấy trong phần đầu của nghiên cứu cũng có vai trò quan trọng trong biểu hiện protein MxA. Hơn nữa, phân tích biểu hiện của gen luciferase khi gen này chứa đoạn promoter và exon 1 của MxA người thấy luciferase cho giá trị cao hơn khi có sự hiện diện của đột biến ở vị trí -309C và +20A. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi giúp ích trong việc dự đoán kết quả đáp ứng miễn dịch khi điều trị cho bệnh nhân nhiễm virus bằng interferon nhóm I và nhóm III.

LES GTPases MX
REVUE DE LA LITTÉRATURE

Les GTPases Mx

I. INTRODUCTION

II. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES PROTEINES Mx

II.1. Les protéines MX sont des GTPases

II.2. Les protéines MX sont des dynamines

II.3. Les spécificités structurales des protéines Mx antivirales

III. ORGANISATION GENOMIQUE & CONTROLE DE L'EXPRESSION AUX LOCI Mx

III.1. Le locus Mx murin

III.2. Le locus Mx humain

III.3. Le locus Mx bovin

III.3. Le locus Mx porcine

IV. DIVERSITE ALLELIQUE AUX LOCI Mx

IV.1. Diversité allélique aux loci Mx murins

IV.2. Polymorphisme allélique aux loci Mx bovins

IV.3. Polymorphisme allélique au locus Mx de la poule

IV.4. Polymorphisme allélique aux loci Mx porcins

IV.5. Polymorphisme allélique aux loci Mx humains

V. CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DES PROTEINES Mx

V.1. Trafic intracellulaire et remodelage membranaire

V.2. Signalisation Ca²⁺-dépendante

V.3. Régulation de la motilité et de l'invasivité

V.4. Activité antivirale

VI. EXPRESSION PATHOLOGIQUE DES PROTEINES Mx

VI.1. Anémie de Fanconi

VI.2. *Alopecia areata*

VI.3. Panencéphalite sclérosante subaiguë

VII. BIBLIOGRAPHIE

I. INTRODUCTION

En 1962, Jean Lindemann et ses collègues découvrent, fortuitement, que la souche consanguine de souris de laboratoire « A2G » résiste à des doses de virus influenza A typiquement létales pour les autres souches de souris (1). Ce phénotype de résistance est dénommé *myxovirus resistance* et l'acronyme correspondant, *Mx*, et ses variantes $Mx^{+/+}$, $Mx^{+/-}$ et $Mx^{-/-}$, sont créés. Le croisement direct entre souches de souris sensibles et souches de souris résistantes et le phénotypage de la progéniture en F1 et en F2, permettent de mettre en évidence un mode de transmission autosomal et dominant du phénotype Mx^+ (2). Le criblage de différentes souches de souris consanguines démontre ensuite que ce trait de résistance est plutôt exceptionnel, seules les souches consanguines A2G et SL/NiA le manifestent (3, 4, 5).

Vers la fin des années 1970, on constate que l'expression du phénotype de résistance dépend de la présence concomitante des interférons de type I (6, 7). Par exemple, une comparaison par électrophorèse en deux dimensions des lysats protéiques issus de macrophages stimulés aux interférons de type I ou des lysats protéiques issus de cellules embryonnaires infectées provenant de souris résistantes avec des lysats protéiques en provenance de macrophages non stimulés ou en provenance de cellules embryonnaires infectées de souris sensibles démontre la présence d'une protéine de 72 kDa dans les deux premiers cas et son absence dans les deux suivants (8). Peu après, ladite protéine *Mx* est localisée dans le noyau des cellules de souris résistantes et stimulées aux interférons de type I (9, 10).

L'essor de la biologie moléculaire pendant les années 1980 a permis la découverte des gènes encodant les protéines *Mx*, d'abord chez la souris (11) et, ensuite, chez toutes les espèces examinées. Les techniques de clonage du cDNA ont ensuite été mises en œuvre pour exprimer ces protéines dans d'autres lignées cellulaires. Ce faisant, de nouvelles préparations expérimentales ont vu le jour qui autorisaient le testage des fonctions des protéines *Mx* dans des conditions standardisées, notamment les fonctions antivirales (12).

II. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES PROTEINES Mx

En comparant les séquences primaires en acides aminés des différentes protéines Mx, on constate que leur structure présente des constantes, notamment un motif tripartite de liaison au GTP et une signature « dynamine » (Fig. 1). Les protéines qui agrègent le GTP jouent un rôle important lors de nombreux processus cellulaires. Elles participent à la biosynthèse de certaines protéines, à la transduction des signaux cellulaires, au transport vésiculaire et au contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire (13). On peut donc, a priori, supposer que les protéines Mx pourraient exercer l'une ou l'autre de ces fonctions. En prenant en considération leurs fonctions et leurs homologues de structure, on peut classer les protéines liant le GTP en cinq superfamilles parmi lesquelles on trouve la superfamille dite des « GTPases de haute masse moléculaire », dont les dynamines font partie (14). A l'origine, les dynamines ont été décrites comme étant capables de lier les microtubules (15). Ultérieurement, une fonction de substrat pour la protéine kinase C (PKC) au niveau du tissu neuronal a été suspectée (16), de même qu'une participation au processus de l'endocytose. Cette dernière fonction a été mise en évidence grâce à l'homologie de séquences du gène *shibire* de la drosophile et des gènes encodant les dynamines (17, 18). L'étude du comportement de la mouche *shibire* renforce la théorie selon laquelle l'homologue mammalien du gène *shibire* participerait, au niveau de la membrane plasmique, à la formation des vésicules enrobées de clathrine (19, 20, 21). A l'heure actuelle, les dynamines apparaissent comme étant une famille conservée de protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires tel que le remodelage membranaire, le trafic vésiculaire et la division des organelles et des cellules (22, 23, 24).

La sous-famille des protéines dites *dynamamin-like* appartient à la famille des dynamines. Ces protéines *dynamamin-like* sont caractérisées par : (a) une masse moléculaire élevée (60-100 kDa), (b) un motif tripartite de liaison au GTP, (c) un domaine intermédiaire et (d) un domaine effecteur GTPase, autrefois défini comme étant le domaine *coiled-coil*. Contrairement aux membres « classiques » de la famille des dynamines, ces protéines sont exemptes de : (a) un domaine *pleckstrin-homology* (PH) situé entre le domaine GTPase et le domaine intermédiaire et (b) un domaine riche en arginine traditionnellement situé au niveau de l'extrémité carboxy-terminale.

En considérant les différentes fonctions des membres de la sous-famille des protéines dites *dynamamin-like*, on peut effectuer un classement en quatre groupes (25, 26) : (a) les protéines participant au transport vésiculaire (par exemple VPS1p chez la levure *S. cerevisiae* et dyn-1 chez le nématode *C. elegans*), (b) les protéines impliquées dans la division mitochondriale (par exemple Dnm1P et Mdm1 chez *S. cerevisiae* ou DRP-1 chez *C. elegans* ou encore Drp1/DLPI-OPA1 chez l'ensemble des vertébrés (29-35)), (c) les protéines appartenant au groupe des dynamines végétales (par exemple la phragmoplastin/PDL, ADL1, ADL2a, ADL2b et ADL3 chez le *brassicaceae* *A. thaliana* (36-41) et (d) les protéines induites par les interférons (par exemple les protéines Mx, les p47-guanylate-binding proteins ou les p-67-guanylate-binding proteins (42-45)).

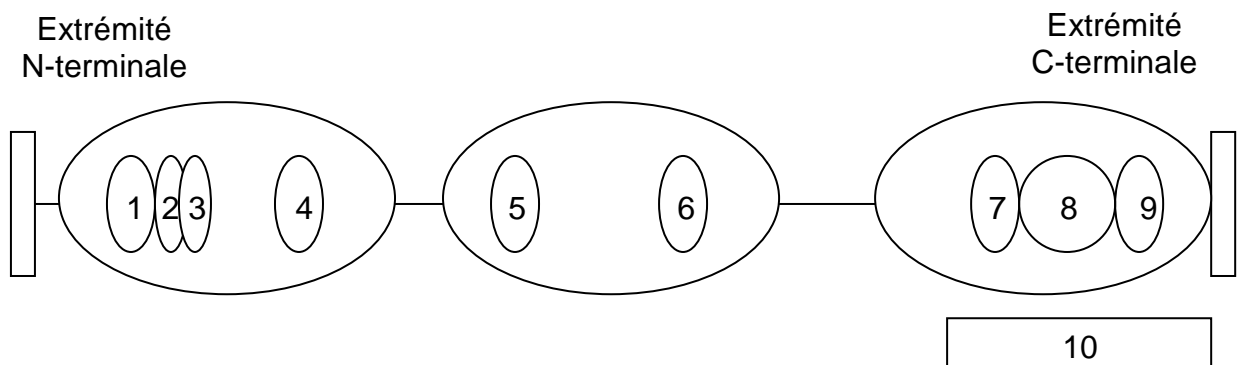
II.1. Les protéines Mx sont de volumineuses GTPases

Les membres de cette superfamille sont caractérisés par : (a) une masse moléculaire élevée, (b) une séquence consensus *GTP-binding* tripartite et (c) un mécanisme commun d'hydrolyse du GTP (46, 47). Les protéines Mx sont caractérisées par (a) une masse moléculaire variant entre 70 et 80 kDa (48), (b) un site de liaison au GTP consistant en une séquence tripartite fortement conservée GXXXXGKST/T, DXXG et T/NKXD (X= acide aminé quelconque) situé au niveau de l'extrémité amino-terminale (50), (c) une affinité relativement faible pour le GTP et (d) une activité GTPasique étroitement dépendante de la concentration en substrat.

La protéine murine Mx1 et la protéine humaine MxA sont aptes à hydrolyser le GTP en GDP ; vu la valeur K_m de la réaction d'hydrolyse du GTP, il est probable qu'il faille une concentration élevée en substrat pour atteindre une vitesse de réaction maximale. La constante de dissociation, K_d , de la protéine MxA pour le GDP est cinq fois plus importante que pour le GTP. Ceci suggère qu'après hydrolyse du GTP, le GDP nouvellement formé est rapidement remplacé par une nouvelle molécule de GTP. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'évaluer la corrélation entre cette activité enzymatique et l'activité antivirale. Lorsqu'une mutation fait disparaître le motif consensus de liaison au GTP, l'activité antivirale est abolie. Cette observation suggère que la liaison et/ou l'hydrolyse du GTP sont cruciales pour l'activité antivirale des protéines Mx (51, 52, 53). Des expériences ultérieures *in vitro* ont démontré que la liaison du GTP est plus importante que son hydrolyse pour l'exercice de la fonction antivirale (54). Comme le bon fonctionnement des GTPases de masse moléculaire

élevée est régulé par un changement conformationnel induit par la liaison du GTP ou du GDP, on peut supposer qu'il en va de même pour les protéines Mx.

Figure 1. — Présentation « caricaturale » de la structure des protéines Mx en général.



- | | |
|------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1) Motif de liaison au GTP | 6) Domaine d'interaction inter- et intramoléculaire |
| 2) Motif de liaison au GTP | 7) Motif leucine zipper 1 |
| 3) Motif de liaison au GTP | 8) Signal de localisation nucléaire |
| 4) Signature des dynamines | 9) Motif leucine zipper 2 |
| 5) Domaine d'auto-assemblage | 10) <i>GTPase Effector Domain</i> (GED) |

II.2. Les protéines Mx sont des dynamines

Les protéines dites « *dynamin-like* » ont été découvertes grâce à l'homologie de séquence de leur domaine GTPase et de leur domaine intermédiaire avec les séquences des domaines homologues dans les dynamines (55). Cependant, les protéines *dynamin-like* sont exemptes (a) du domaine pleckstrin et (b) du domaine riche en arginine, domaines habituellement présents dans les dynamines typiques. La présence de deux petits segments (résidus 650-680 et résidus 710-740) adoptant une conformation dite en *coiled-coil* permet de supposer que le domaine C-terminal des dynamines (GED pour *GTPase Effector Domain*) est doté de facultés d'assemblage (56, 57). D'ailleurs l'interaction entre ce GED et le domaine GTPase démontre que les segments *coiled-coil* sont bien impliqués dans des interactions protéine-protéine (58, 59, 60, 61). En fait, chez les dynamines, le GED favorise un auto-assemblage en oligomères qui exacerbe l'activité GTPasique ; on peut donc définir le GED comme étant un domaine activateur de la GTPase (62, 63, 64).

Une analyse de séquence de l'extrémité C-terminale de plusieurs protéines Mx révèle la présence systématique de motifs en *coiled coil*, dits *leucine zipper* (65). On sait que des motifs de cette nature sont, entre autres, responsables de la dimérisation de nombreux facteurs de transcription et d'autres protéines de régulation (66). La figure 2 permet de constater une forte conservation de cette séquence entre espèces, ce qui suggère un rôle fonctionnel important (67). En 1992, Melen et ses collaborateurs démontrent que les motifs *leucin zipper* interviennent dans l'oligomérisation des protéines Mx (68). Comme les protéines Mx forment des agrégats tant *in vivo* qu'*in vitro*, leur purification s'avère difficile (69, 70). De ce fait, la question de l'importance fonctionnelle de la formation d'oligomères reste posée (71). A l'heure actuelle, certains auteurs postulent qu'un rôle important est joué par le domaine d'auto-assemblage situé au niveau de l'extrémité amino-terminale des protéines Mx (72). D'autres mettent en avant l'implication de l'extrémité carboxy-terminale pour la formation de liens homotypiques (73, 74, 75, 76, 77). En 1999, Di Paolo et collaborateurs proposent le modèle suivant pour expliquer l'implication du motif *leucin zipper* dans l'oligomérisation de la protéine Mx : le repliement en arrière de la région C-terminale, avec son motif leucine zipper (région 1), sur son domaine proximal d'interaction (région 2) favoriserait l'interaction homotypique de la protéine Mx avec une deuxième protéine Mx ; cette association est

favorisée par le domaine d'interaction intermoléculaire (région 3) de la deuxième protéine Mx. Puisque le domaine d'interaction intermoléculaire (région 3) de la première protéine Mx n'est pas impliqué dans la formation des dimères, celui-ci peut interagir avec une troisième protéine Mx et la formation d'oligomères devient possible (78, 79, 80) (Fig. 3), y compris pour générer d'importants d'agrégats constitués de plus de 30 protéines (81). L'examen des structures oligomériques, par microscopie électronique, révèle une forme en anneau, en bâton ou encore en spirale (82, 83).

L'extrémité carboxy-terminale de la protéine Mx comporterait également un domaine impliqué dans l'activation de l'activité GTPasique (85-90). Il semble donc que le GED des membres de la famille des dynamines et celui des membres de la sous-famille des protéines *dynamine-like*, agirait comme une protéine activatrice de l'activité GTPase (GAP) (91) ; ainsi, plusieurs séries d'hydrolyse de GTP pourraient être entreprises sans intervention de facteurs auxiliaires. Dans ce contexte, le modèle proposé postule que le repliement en arrière précité soit suivi par une interaction de ce domaine GTPase accessoire avec le site tripartite servant à la liaison du GTP qui se trouve dans le domaine N-terminal, ce qui formerait le centre actif de l'enzyme (87).

Les protéines Mx sont classées au sein de la famille des protéines *dynamine-like*, puisqu'elle ne possède pas, entre autres, de domaine PH (92). Celui-ci favorise, chez les dynamines, la liaison au phosphatidylinositol 4,5-biphosphate qui est cruciale pour la localisation membranaire et pour l'intervention des dynamines dans l'endocytose récepteur-dépendante (93). Ainsi, les dynamines classiques sont capables de s'oligomériser et sont aptes à lier des membranes lipidiques (94, 95, 96). Pourtant, DLP1, un membre de la famille des protéines *dynamine-like* et donc exempt de domaine PH, préserve sa capacité de liaison aux membranes lipidiques (97). C'est ainsi que l'on cherche à savoir si les protéines Mx, malgré l'absence du domaine PH, présentent également une faculté de liaison aux membranes lipidiques. En 2002, il a été prouvé, *in vitro*, que la protéine MxA, malgré l'absence du domaine PH, conserve une faculté de liaison et de tubulation des liposomes artificiels (98).

Figure 2. — Conservation absolue des *leucine zippers* dans les protéines Mx

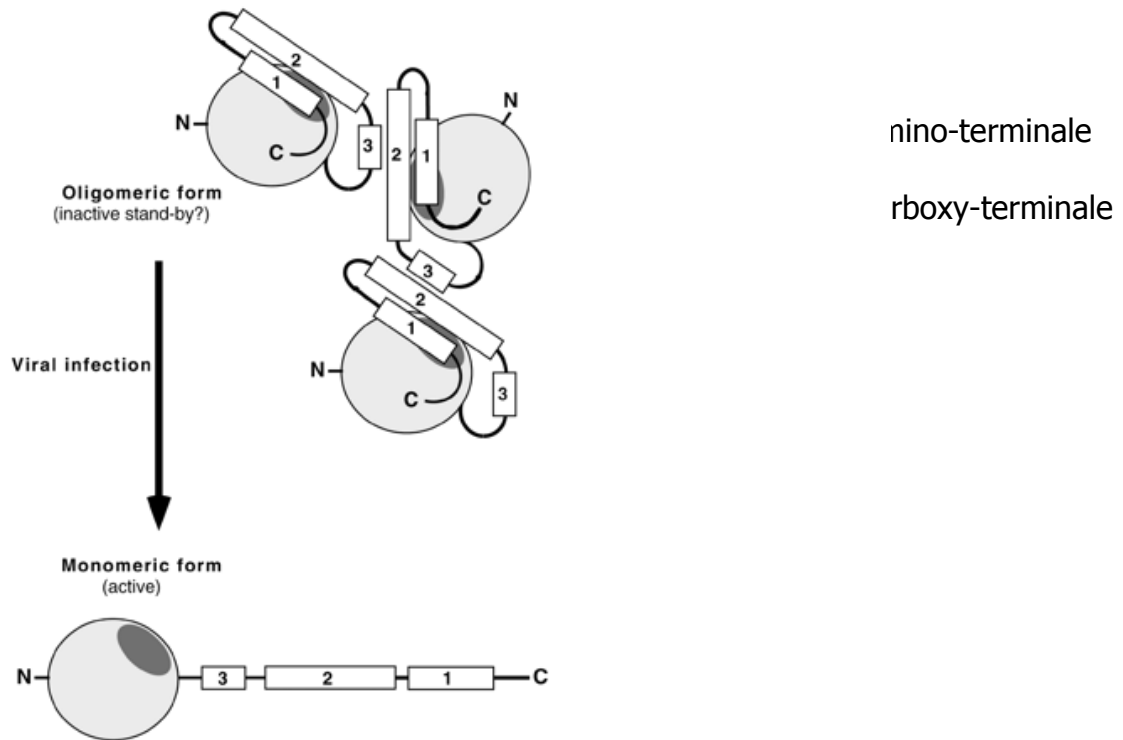
		Leucine zipper 1																										
Position	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g							
MX1 murin	Q	I	P	L	I	I	Q	Y	F	I	L	K	T	F	G	E	E	I	E	K	M	M	L	Q	L	L	Q	D
MX2 murin	H	V	P	L	I	I	Q	Y	F	I	L	K	M	F	A	E	R	L	Q	K	G	M	L	Q	L	L	Q	D
MX1 rat	Q	I	P	L	I	I	Q	Y	S	I	L	Q	T	F	G	Q	E	M	E	K	A	M	L	Q	L	L	Q	D
MX2 rat	H	I	P	L	I	I	Q	Y	F	I	L	K	M	F	A	E	K	L	Q	K	G	M	L	Q	L	L	Q	D
MX3 rat	H	I	P	L	I	I	Q	Y	F	I	L	K	M	F	A	E	K	L	Q	K	G	M	L	Q	L	L	Q	D
MX canard	Q	I	P	L	I	I	L	S	A	V	L	H	D	F	G	D	N	L	Q	S	S	M	L	H	L	L	Q	E
MX poule	Q	I	P	L	I	I	L	S	T	V	L	H	D	F	G	N	Y	L	Q	S	S	M	L	H	L	L	Q	G
MXA humain	H	I	P	L	I	I	Q	F	F	M	L	Q	T	Y	G	Q	Q	L	Q	K	A	M	L	Q	L	L	Q	D
MXB humain	Q	I	P	F	I	I	Q	Y	F	M	L	R	E	N	G	D	S	L	Q	K	A	M	M	Q	I	L	Q	E
MX1 porcin	H	I	P	L	I	I	Q	F	F	I	L	R	T	F	G	Q	Q	L	Q	K	S	M	L	Q	L	L	Q	N
MX1 bovin	H	I	I	L	I	I	Q	F	F	V	L	R	T	Y	G	E	Q	L	K	K	S	M	L	Q	L	L	Q	D
MX mouton	H	I	P	L	I	I	Q	F	F	V	L	R	T	Y	G	E	Q	L	K	K	S	M	L	Q	L	L	Q	D
MX chien	H	I	P	L	I	I	Q	Y	F	I	L	Q	V	Y	G	Q	K	L	Q	N	G	M	L	Q	L	L	Q	D

Figure 2. — Conservation absolue des *leucine zippers* dans les protéines Mx, suite

Leucine Zipper 2																						
Position	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	
MX1 murin	K	K	F	L	K	R	R	L	L	R	L	D	E	A	R	Q	K	L	A	K	F	
MX2 murin	R	K	F	L	K	E	R	L	A	R	L	A	Q	A	R	R	R	L	A	K	F	
MX1 rat	K	K	F	L	K	R	R	L	L	R	L	D	E	A	Q	R	K	L	A	K	F	
MX2 rat	R	R	F	L	K	E	R	L	A	R	L	A	Q	A	Q	R	R	L	A	K	F	
MX3 rat	R	R	F	L	K	E	R	L	A	R	L	A	Q	A	Q	R	R	L	A	K	F	
MX canard	R	N	Y	L	S	G	R	V	N	R	L	S	K	A	Y	Q	C	L	K	D	F	
MX poule	Q	K	L	L	T	S	R	I	S	H	L	N	K	A	Y	Q	Y	L	V	D	F	
MXA humain	R	K	F	L	K	E	R	L	A	R	L	T	Q	A	R	R	R	L	A	Q	F	
MXB humain	R	R	I	F	K	E	R	I	Y	R	L	T	Q	A	R	H	A	L	C	Q	F	
MX1 porcin	R	K	F	L	K	E	R	L	M	R	L	T	Q	A	R	R	R	L	A	K	F	
MX1 bovin	R	K	F	L	K	E	R	L	E	R	L	T	R	A	R	Q	R	L	A	K	F	
MX mouton	R	K	F	L	K	E	R	L	E	R	L	S	R	A	R	Q	R	L	A	K	F	
MX chien	R	K	F	L	K	E	R	L	A	R	L	A	Q	A	R	R	R	L	A	K	F	

Le tableau consiste en un alignement des séquences en acides aminés caractéristiques des motifs *leucin zipper* de l'extrémité carboxy-terminale des protéines Mx. Les motifs *leucin zipper* 1 et 2 sont représentés avec les positions des acides aminés importants pour l'hélice amphipatique.

Figure 3. — Modèle d'interaction Mx-Mx impliquant l'extrémité carboxy-terminale



D'après Di PAOLO C., HEFTI H.P., MELI M., LANDIS H., PAVLOVIC J. 1999. Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA is a prerequisite for its oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 32071-32078.

II.3. Les spécificités structurales des protéines Mx antivirales

Certaines versions alléliques des protéines Mx sont des effecteurs de l'immunité innée qui protègent l'organisme contre les agressions virales (99). L'intégrité de l'extrémité amino-terminale, du domaine interactif central et de l'extrémité carboxy-terminale est indispensable à l'exercice de cette fonction antivirale. Par exemple, la fonction antivirale dépend de la faculté de l'extrémité N-terminale d'agrèger le GTP (100-104) et l'empêchement de la réplication du virus Thogoto suppose la présence de l'intégralité du domaine central interactif (105-107). La plupart des auteurs s'accordent cependant pour dire que le support matériel direct de la fonction antivirale est le GED (108). Etrangement, cette extrémité C-terminale est peu conservée (109) mais il en va de même lorsqu'on compare les séquences C-terminales des dynamines en général (110). Dans le cas des dynamines « non-Mx », un lien direct a déjà été établi entre GED spécifiques, localisation subcellulaire et fonctions spécifiques (110, 111). Il est donc possible que le GED des protéines Mx ait évolué parallèlement à un ou plusieurs virus spécifiques de l'espèce considérée (112).

Le Tableau I répertorie les différentes expériences de mutagenèse dirigée du GED qui ont été réalisées jusqu'ici et leur effet sur l'activité antivirale. Ces travaux montrent que la plupart des altérations du matériel génétique peuvent causer une perte complète de l'activité antivirale, y compris les mutations ponctuelles, ce qui suggère que l'exercice d'une fonction antivirale donnée est soumise à des contraintes structurales précises (113-115).

Tableau I — Inventaire des mutations connues qui invalident la fonction antivirale

Protéine MX	Mutation	Variant MX	Localisation subcellulaire	Activité anti-virale
1) MXA humaine	Position 645- deuxième motif leucine zipper - échange d'un acide glutamique par une arginine	MXA E645R	Cytoplasme	Maintien de l'activité anti-influenza associé à une perte de l'activité anti-VSV (ref. 116))
2) MX1 murine	Position 614- signal de localisation nucléaire- échange d'un acide glutamique par une arginine	MX1 E614R	Cytoplasme	Perte de l'activité anti- influenza (ref. 117, 118)
	Position 619-deuxième motif leucine zipper perturbation de l'hélice α - échange d'une leucine par une proline	MX1 L691P	Noyau	Perte de l'activité anti- virale (ref. 119)
3) MX1 poule	Position 631-échange d'une sérine par une arginine	MX1 S631N	Cytoplasme	Perte de l'activité anti- VSV (ref. 120)
4) MX2 rat	Position 588 – échange d'une arginine par une cystéine; en position 630 échange d'une lysine par une histidine	MX2 R588C	Cytoplasme	Perte de l'activité anti- VSV (ref. 121)
		MX2 H630K		
5) MX3 rat	Position 588- échange d'une cystéine par une arginine; en position 630- échange d'une lysine par une histidine	MX3 C588R	Cytoplasme	Restauration partielle de l'activité anti-VSV (ref. 121)
		MX3 K630H		
6) MX1 porcin	Position nucléotidique 2064- délétion de 11 pb induisant un allongement de 23 aa	MX1	Cytoplasme	Perte partielle de l'activité anti-influenza (ref. 122, 123)

III. ORGANISATION GENOMIQUE & CONTROLE DE L'EXPRESSION AUX LOCI *Mx*

Le transcrit *Mx1* murin et la protéine murine *Mx1* correspondante ont été décrits les premiers. Rapidement, il est apparu que le pool de transcrits *Mx* de la souris était constitué des produits de transcription de deux gènes distincts, notés *Mx1* et *Mx2*. Depuis, des séquences génomiques homologues ont été décrites dans toutes les espèces testées (124, 125), par exemple une espèce de poisson (126), *Rattus norvegicus* (127), *Homo sapiens* (128, 129), *Bos taurus* (130), *Ovis aries* (131), *Equus caballus* (132, 133), *Canis familiaris* (134), *Felis catus* (135) et *Sus scrofa* (136). Le tableau I répertorie les codes d'accès aux séquences génomiques concernées. L'organisation génomique complète des gènes *Mx1* et *Mx2* murins (137, 138), *MxA* humain (139), *Mx1* porcine (140) et *Mx1* bovin (141) est publiée. L'expression des gènes *Mx* est subordonnée à la présence d'interférons de type 1 (142, 143, 144, 145, 146), comme le confirme la présence d'un ou de plusieurs motifs de type GAAAN₁₋₂GAA(C/G) dans les promoteurs correspondants, motifs dits « interferon stimulated response element » en raison de leur sensibilité aux interférons α/β (147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154). Certains promoteurs sont pourvus de deux ISREs (*Mx1* murine, *Mx1* porcine, *MxA* humaine) tandis que d'autres n'en comptent qu'un seul (*Mx1* bovine, *Mx* de la poule, *Mx* de la truite arc-en-ciel) (155). En outre, certains promoteurs incluent des motifs « ISRE-like » composés de deux tétramères GAAA séparés par plus de deux nucléotides (156, 157, 158). Les fonctions exactes de ces séquences ne sont pas formellement établies mais on suppose qu'elles sont responsables de la modulation fine du taux de transcription du gène *Mx* correspondant (159). De tels motifs sont présents au sein du promoteur des gènes *Mx2* murin, *MxA* humain, *Mx1* bovin et *Mx1* porcine. Dans certains cas, les promoteurs *Mx* montrent l'une ou l'autre singularité ; par exemple l'absence des boîtes TATA et CCAAT chez l'homme, le porc ou les bovins (160, 161, 162, 163) ou la présence du motif TATA sans motif CCAAT chez la truite arc-en-ciel et chez la souris (164, 165). Enfin, on trouve parfois des motifs régulateurs plus proximaux, comme le premier intron du gène *MxA* humain qui influence significativement le taux d'expression de la protéine correspondante (166) ou un élément ISRE-like dans le premier intron du gène *Mx1* bovin qui pourrait également contrôler le taux d'expression de la protéine *Mx1* bovine (167). Sur un plan cinétique, l'accumulation des ARNm *Mx* est rapide et transitoire. Un pic est atteint dès la huitième heure après une exposition aux interférons de type I et le niveau basal est restauré 24 à 48 heures après la stimulation. Au pic, les ARNm

Mx peuvent représenter jusque 0,1% de l'ARN polyadénylé total. La concentration en protéine *Mx* correspondante atteint un maximum 24 à 48 heures après la stimulation mais son niveau basal, très faible, n'est restauré que plusieurs jours après en raison d'une demi-vie relativement longue (>48 heures) (173). Ce profil d'expression particulier explique pourquoi les protéines *Mx* sont de bons biomarqueurs de la présence d'interférons de type 1 (174, 175). Notons que, par contre, l'interféron gamma et les autres cytokines ne semblent pas influencer significativement le taux d'expression des gènes *Mx* (169-172).

III.1. Le locus *Mx* de la souris

Historiquement, le système *Mx* a été découvert chez la souris à la suite de la mise en évidence fortuite de la résistance innée de la souche consanguine de souris A2G à des doses de virus influenza A typiquement létales pour les autres souris de laboratoire (176). Ce trait de résistance aux Orthomyxovirus a été baptisé *Mx*⁺ (177). Plus tard, une corrélation a pu être établie entre ce trait de résistance innée et l'expression inductible par les interférons de type 1 d'une protéine de ~72.5 kDa (178).

L'essor de la biologie moléculaire pendant les années 1980 a permis ensuite la découverte de deux gènes distincts encodant deux protéines *Mx* distinctes, notées *Mx1* et *Mx2* (11). Les techniques de clonage du cDNA ont ensuite été mises en œuvre pour exprimer ces protéines dans d'autres lignées cellulaires. Ce faisant, de nouvelles préparations expérimentales ont vu le jour qui autorisaient le testage des fonctions des protéines *Mx* dans des conditions standardisées, notamment les fonctions antivirales (12). De tels protocoles expérimentaux ont permis de démontrer que l'expression de la protéine *Mx1* de la souche A2G était nécessaire et suffisante pour produire le phénotype *Mx*⁺ (183). Inversement, l'expression de la *Mx1* provenant de cDNAs dérivés des souches sensibles n'altéraient pas le cycle biologique des virus influenza *in vitro* et une analyse approfondie a montré que les allèles *Mx* correspondants étaient altérés soit par des mutations ponctuelles, soit par une délétion, qui conduisaient à une interruption trop rapide de la traduction, donc à la synthèse d'une *Mx1* tronquée de son extrémité carboxy-terminale (179, 180, 181).

Le gène *Mx1*

Les deux gènes *Mx* de la souris sont localisés sur le bras distal du chromosome 16 (184, 185, 186). Le gène *Mx1* est constitué de 14 exons étalés sur un segment chromosomique long de 55 000 paires de bases, lesquels sont censés encoder une protéine de 631 acides aminés (187). Le premier intron est long de 30 000 bases et sépare l'exon 1 non codant long de 29 paires de bases (début de l'UTR5') de l'exon 2 contenant successivement (de 5' en 3') la suite et la fin de la séquence non codante (fin de l'UTR5'), le codon *start* et le début de la séquence codante. Cette dernière est interrompue par 12 introns. La longueur des différents exons varie entre 77 et 258 bases. Le dernier exon, qui code pour les 76 acides aminés carboxy-terminaux, est composé de 1339 bases et inclut l'ensemble de la région 3' non traduite (UTR3'). Des *Northern blots* réalisés au départ des transcrits extraits de cellules Mx^+ et de sondes $Mx1^+$ -spécifiques révèlent une bande de 3,5 kb, ce qui correspond bien au transcrit attendu (199). La région du promoteur du gène *Mx1* de la souris comporte cinq séquences de type GAAANN (ou son complément inverse). Les motifs de ce type sont présents dans tous les gènes dont la transcription est stimulée par les interférons ou par les virus. Dans le promoteur *Mx1* de la souris, comme dans tous les promoteurs inductibles par la présence des interférons de type I, ces éléments sont arrangés en tandem, ce qui donne une suite de base du type purine-GAAAN(N/-)GAAA(C/G)-pyrimidine (ou son complément inverse) baptisée *interferon sensitive response element* (ISRE) (200). Lorsque la protéine *Mx1* de la souris est exprimée, on la met en évidence exclusivement dans le noyau où sa répartition topographique génère un aspect visuel « en points », voire finement granulaire (188, 189). Les fins granulés « *Mx* » sont juxtaposés à des structures subnucléaires dynamiques dont la composition, le nombre et la taille varient au long du cycle cellulaire et dépendent de divers stimuli, les PLM-NB (*promyelocytic leukemia protein-nuclear bodies*, 190, 191, 192). Il est intéressant de noter que certains composants des PLM-NB sont modifiés par SUMOylation (193-197) et qu'une publication suggère que la *Mx1* de la souris interagit avec la machinerie de SUMOylation (198).

Le gène *Mx2*

Chez la souris toujours, les *Northern blots* mettent systématiquement en évidence un deuxième transcrite inductible par des interférons de type I. En effet, une sonde spécifique du cDNA *Mx1* s'hybride aussi à un ARNm de 2,5 kb. Le transcrite ainsi révélé provient du gène *Mx2*. Les gels issus de *Northern blotting* montrent toujours une bande épaisse autour de 2,5 kb, ce qui est compatible avec la présence de deux signaux de polyadénylation. En alignant les cDNAs *Mx1* et *Mx2*, on révèle une identité de séquence de 73%. Bizarrement et à l'instar de ce qui est observé pour le gène *Mx1*, la plupart des souches consanguines de laboratoire sont porteuses d'une mutation ponctuelle dans le gène *Mx2* qui en décale le cadre de lecture et génère une protéine *Mx2* inactive. Chez les souris sauvages au contraire, l'allèle qui conduit à une protéine *Mx2* fonctionnelle est fréquent (201). Comme le gène *Mx1*, le gène *Mx2* est composé de 14 exons supposés encoder une protéine de 655 acides aminés (202). A l'exception des extrémités 5' et 3' du cDNA, la similarité des deux gènes est frappante, elle témoigne probablement d'une duplication ancestrale. La région du promoteur du gène *Mx2* est située entre les nucléotides -578 et +1. L'analyse de la région met en évidence, entre les nucléotides -97 et -53, une séquence proximale ISRE-like. Ce motif, comme précisé ci-dessus, permet de prédire que l'induction de l'expression du gène est subordonnée à la présence d'interférons de type I (203) et, de fait, le patron temporel d'expression et le contrôle de l'expression de la protéine *Mx2* sont les mêmes que ceux de la protéine *Mx1*. Lorsque la protéine *Mx2* de la souris est exprimée en cellules 3T3, on la met en évidence exclusivement dans le cytoplasme (202).

III.2. Le locus *Mx* humain

L'exposition de cellules humaines à des interférons de type I induit l'expression de plusieurs nouvelles protéines. L'immunoprécipitation de celles-ci avec des anticorps anti-*Mx1* de souris révèle la présence de protéines humaines homologues. L'utilisation du cDNA *Mx1* de la souris comme sonde d'hybridation permet de mettre deux types de cDNAs humains *Mx* en évidence. L'analyse des séquences montre que les ARNm correspondants sont issus de la transcription de deux gènes *Mx* humain différents qui ont été baptisés *MxA* et *MxB*. La similarité de séquence entre les protéines *Mx* humaines murines est située entre 56 et 77%. La

comparaison des séquences dévoile aussi une très grande ressemblance entre la protéine Mx2 murine et la protéine MxA humaine (204). Une analyse par *Western blotting* met en évidence la présence de deux protéines MxB (209). Le contexte nt-3/nt+4 (CACATGT) du premier codon *start* n'est pas idéal pour l'initiation de la traduction, ce qui explique qu'elle commence également à partir du second codon *start*, d'où les deux protéines identifiables après migration en gel. La protéine MxA est identifiable exclusivement dans le noyau. Le patron d'expression est plus complexe pour la MxB. Elle est souvent localisée exclusivement dans le cytoplasme mais, dans certaines cellules (macrophages, par exemple), on l'observe tant dans le cytoplasme que dans le noyau. Un signal de localisation nucléaire a d'ailleurs été identifié dans l'extrémité N-terminale (208). Les gènes MxA et MxB sont localisés sur le bras long du chromosome humain 21 (205, 206).

Promoteur

Les éléments consensus ISRE-like attendus sont bien présents au niveau du promoteur (216). L'analyse du promoteur montre : (a) l'existence de trois éléments ISRE (au cours des expériences de transfection, on démontre une activité au moins pour les deux éléments proximaux [217, 218]), (b) trois éléments possibles de réponse à l'IL-6 (CTGGA), (c) un site potentiel de liaison au NF κ B et (d) un site potentiel de liaison au facteur Sp1 (219). L'élément ISRE proximal semble être indispensable à l'induction de la transcription par les interférons α , alors que le deuxième élément stimule vraisemblablement l'inductibilité générale du promoteur (220). La région promotrice montre un site polymorphique (nucléotide -88) localisé au sein d'une séquence consensus ressemblant aux éléments ISRE. Ce SNP affecte l'expression de MxA (221, 222). Le premier intron comporte vraisemblablement un stimulateur de transcription supplémentaire pouvant influencer le taux d'expression (226).

Interactome

Des études d'interaction entre protéines décrivent une protéine MxA capable de lier des structures du cytosquelette (210). Cependant, l'utilisation d'agents perturbateurs du cytosquelette n'altère pas la distribution intracellulaire de la protéine MxA ; ceci permet d'émettre l'hypothèse d'une interaction transitoire entre la protéine et les éléments du

cytosquelette *in vivo* (211). Des techniques d'immunofluorescence et de fractionnement subcellulaire mettent en évidence une association de la protéine MxA avec le réticulum endoplasmique lisse. Étonnamment, la microscopie électronique démontre que l'expression d'une MxA mutante va de pair avec une prolifération substantielle du réticulum endoplasmique lisse. Ainsi, il semble que la protéine humaine soit impliquée dans le remodelage de ce compartiment membranaire (212, 213). L'analyse par immunofluorescence révèle également une colocalisation de la protéine MxA avec des marqueurs des endosomes, des lysosomes et du *cis* Golgi ; ceci est un indicateur fort pour une association supplémentaire avec ces organelles (214). L'analyse, par *Western Blot*, des différents échantillons obtenus par centrifugation différentielle démontre qu'approximativement 30% des protéines MxA sont retrouvées dans la fraction microsomale et 70% dans le surnageant post-microsomal (215).

III.3. Le locus Mx bovin

L'observation primordiale de protéines Mx-like dans l'espèce bovine a été réalisée en cellules MDBK (*Madin-Darby bovine kidney*) où une stimulation par les interférons α ou β induit l'expression cytoplasmique de deux protéines reconnues par un antisérum anti-MxA qui sont absentes dans les cellules de contrôle non traitées (227, 228). Plus tard, deux cDNAs codants pour deux protéines Mx1 différentes (Mx1 et Mx1a) ont été isolés à partir d'une librairie génomique, ils correspondent à deux variants de splicing. Les deux cadres de lecture encodent une protéine de 654 acides aminés (Mx1) et une autre de 648 acides aminés (Mx1a), dont les masses moléculaires prédites sont de 75,5 (Mx1) et 74,7 kDa pour (Mx1a). La similarité de séquence en acides aminés entre les protéines Mx1 ovine, humaine, murine et bovine est respectivement de 93%, 73% et de 63%.

Le locus *Mx1* bovin est localisé sur le chromosome bovin 1 (229, 230). L'analyse du gène *Mx1* bovin révèle une organisation en 15 exons étalés sur 60 kb et interrompus par 14 introns. La région codante s'étend des nucléotides 8-10 (ATG) localisés au sein du troisième exon jusqu'aux nucléotides 2290-2310 (TGA) situés au niveau du quinzième exon. Les 77 acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale et l'ensemble de l'UTR-3' sont encodés par le dernier exon long de 630 pb (231).

Le promoteur du gène *Mx1* bovin affiche plusieurs sites de liaison putatifs pour des cytokines et d'autres facteurs de transcription. Ainsi, au sein de cette séquence (340 nucléotides en amont du site de début de transcription), on décrit : (a) un motif ISRE, (b) un élément ISRE-like, (c) un site de liaison pour le NF κ B, (d) deux sites de liaison pour l'IL-6, (e) deux sites de liaison pour le SP1 et (f) cinq boîtes riches en GC. Comme d'autres promoteurs inductibles par les interférons, celui-ci montre également des stretches de type GAAA (232-234). D'autre part, le promoteur *Mx1* bovin est caractérisé par l'absence de boîte TATA et par l'absence de boîte CCAAT (235). Comme attendu, le promoteur *Mx1* bovin peut être induit par les interférons de type I. Tout comme l'élément ISRE-like du promoteur *MxA* humain, il est possible que l'élément ISRE-like du promoteur *Mx1* bovin n'intervient pas dans le contrôle de l'expression de la protéine Mx1 bovine. Cependant, des analyses informatiques ont révélé l'existence d'un deuxième motif ISRE-like situé au sein du premier intron ; celui-ci pourrait donc jouer le rôle d'un stimulateur de transcription et ainsi influencer le taux d'expression de la protéine Mx1 bovine.

La séquence nucléotidique et la séquence en acides aminés du deuxième gène/protéine bovin(e)s ont été rapportées, cependant leurs caractéristiques restent actuellement encore non étudiées (236).

III.4. Le locus Mx porcine

Le locus *Mx1* porcine est localisé sur le chromosome 13 et code pour une protéine de 663 acides aminés (237). L'utilisation de sondes spécifiques du cDNA *Mx1* murin a permis de mettre en évidence deux transcrits homologues chez le porc (238). Une analyse par *Northern blot* des ARNs totaux obtenus à partir de cellules traitées aux interférons de type I, révèle la présence d'un ARN de 2,5 kb alors qu'aucun signal d'hybridation n'est mis en évidence dans les préparations obtenues à partir des cellules de contrôle non traitées (239). De même, des lymphocytes circulants exposés aux interférons de type I et immunomarqués par un sérum polyclonal anti-Mx murine contiennent deux protéines dont la masse moléculaire apparente vaut 73 et 76 kDa. Ensuite, deux cDNAs *Mx* porcins de nature différente ont été décrits ; ils diffèrent par leur patron de restriction et ont été baptisés *Mx1* et *Mx2*. Les différences entre les

cDNA porcins *Mx1* et *Mx2* sont telles que l'on a d'emblée suggéré qu'ils proviennent de la transcription de deux gènes distincts (240).

Le gène *Mx1* porcine est constitué de 15 exons et s'étend sur environ 25 kb ; la séquence codante est composée de 13 exons. Le cDNA *Mx1* est long de 2 537 pb suivies par une queue poly-(A). Les 77 acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale ainsi que l'ensemble de l'UTR-3' sont encodés par le dernier exon, lequel s'étend sur 677 pb (241). Le cadre de lecture est étalé entre le codon *start* (position 101) et le codon *stop* (position 2090). L'UTR-3' consiste en 446 pb, montre un signal de polyadénylation et un motif AUUUA jouant probablement un rôle dans la stabilité de l'ARNm (242). L'UTR-5', quant à lui, comporte l'ensemble du premier et du deuxième exon ainsi qu'une partie du troisième (243). La séquence en acides aminés, déduite à partir du cDNA *Mx1* consiste en une suite de 663 acides aminés qui correspond à une protéine dont la masse moléculaire calculée est de 75,6 kDa (244).

Le cDNA *Mx2* consiste en 2 680 pb, dont une ORF longue de 2 136 pb (AB258432) dont on peut déduire qu'elle encode une protéine de 711 acides aminés. Le gène *Mx2* porcine consiste en 14 exons, les codons *start* et *stop* étant respectivement présents sur les exons 2 et 14. La *Mx2* porcine présente respectivement 69% et 68% d'identité avec les protéines *MxB* humaine et *Mx2* bovine. Par contre, on peut facilement la discriminer de la protéine *Mx1* porcine avec laquelle elle ne partage que 55% d'identité (245).

Le promoteur *Mx1* porcine est fortement stimulé par les interférons de type I, cette caractéristique va de pair avec une activité de transcription très faible, voire nulle en absence d'interférons de type I (246). Ce promoteur est caractérisé par la présence de : (a) deux motifs ISRE en position - 34 et - 80 (le deuxième motif, plus proximal, pourrait intervenir dans l'activation du gène [247, 248]), (b) un motif *ISRE-like* distal dont on trouve un équivalent dans le promoteur du gène *MxA* humain et dans le promoteur du gène *Mx2* murin (249, 250) (puisque ce motif n'a aucun rôle fonctionnel chez l'humain et chez la souris, on propose également l'absence d'une intervention sur l'expression de la protéine *Mx1* porcine), (c) l'absence d'un motif TATA, (d) l'absence d'un motif CCAAT, (e) la présence de sites

putatifs de liaison pour le NF κ B, SP1 et IL-6, (f) la présence de 3 boîtes GC-riches et (g) la présence de douze tronçons du type GAAA (251).

IV. DIVERSITE ALLELIQUE AUX LOCI *Mx*

En principe, et à l'instar des autres gènes, les gènes *Mx* doivent présenter des variations alléliques. Sachant que certaines versions de ces gènes confèrent une résistance aux maladies virales, l'inventaire du polymorphisme allélique aux loci *Mx* des animaux de rente est susceptible de permettre l'identification d'un allèle plus favorable en terme de résistance aux maladies virales et, donc, de permettre une sélection assistée des meilleurs reproducteurs. Aucun inventaire systématique des variations individuelles n'a encore été entrepris à grande échelle. Néanmoins, des variations critiques ont d'ores et déjà été identifiées.

IV.1. Diversité allélique au locus *Mx* murin

Chez la souris, la résistance aux infections par les virus influenza est contrôlée par des allèles présents au locus *Mx*, lui-même localisé sur le chromosome 16 (253, 254). L'étude du polymorphisme de ce locus chez cinq souches de souris de laboratoire a révélé la présence d'au moins 3 RFLPs (*restriction fragment length polymorphisms*). Chez la souris, ces variations génétiques peuvent être corrélée à des variations de résistances aux infections par les virus influenza (255, 256).

Le variant de type I est mis en évidence chez les souches de souris capables de produire une protéine *Mx1* fonctionnelle. Cet allèle est constitué de 14 exons et produit, en réponse à une stimulation par les interférons α et β , un ARNm de 3,3 kb codant pour une protéine de 72 kDa (257, 258).

Les deux autres types de RFLPs ont été mis en évidence chez les souches de souris susceptibles aux infections par les virus influenza, ils sont incapables de synthétiser une protéine *Mx1* fonctionnelle (259-262). Le variant de type II produit, après une activation par les interférons de type I, une faible quantité d'un ARNm homologue aux ARNm *Mx* (263). Au sein de la région codante, il manque un bloc de 424 nucléotides (absence des exons 9-11)

qui donne lieu à un décalage du cadre de lecture (264). En plus, la séquence codante en amont de la délétion diffère de celle de l'allèle de type I par le changement de six nucléotides dont cinq restent silencieux, le cinquième donnant lieu à la substitution Met-584-Thr (265). Ce variant de type II est le plus fréquent parmi les souches consanguines de souris de laboratoire. Les souris possédant le variant de type III sont également incapables de produire une protéine Mx1 fonctionnelle et sont, en conséquence, susceptibles aux infections par les virus influenza (266). Après stimulation par les interférons de type I, les cellules de ces souris produisent un ARNm apparemment homologue de l'ARNm Mx1 classique puisqu'affichant la taille attendue (267). Cependant, l'analyse de séquence met en évidence trois différences majeures entre le variant de type I et le variant de type III : (a) une mutation ponctuelle qui change le codon AAA (lysine en position 389) en TAA (codon stop), (b) une mutation ponctuelle qui convertit l'acide glutamique en position 12 en lysine et (c) l'inclusion d'un exon supplémentaire de 72 nucléotides dans la région 5' non codante. En plus, on décrit 12 substitutions nucléotidiques dont les six localisées dans la région codante sont silencieuses et dont les six autres sont localisées au sein de l'extrémité 3' non codante (268). Ce variant allélique *Mx1* de type III présente donc une mutation qui empêche la synthèse d'une protéine Mx1 complète de 72 kDa. L'analyse de la séquence du cDNA prédit une forme tronquée où manquent presque 40% de la région de l'extrémité carboxy-terminale (269). Le criblage de nombreuses souches de souris de laboratoire montre que la résistance aux infections par les virus influenza n'est présente que chez quelques souches consanguines de souris de laboratoire, celles dérivées des souches sauvages A2G et SL/NiA (270-272) et, plus récemment, Cast/Ei. Les versions alléliques fonctionnelles sont donc essentiellement trouvées parmi les souches de souris sauvages. Bien que ces dernières ne soient pas des hôtes naturels des virus influenza A, la protéine Mx1 doit jouer un rôle. Ainsi, il est fort probable que la réponse Mx1 cible un pathogène propre aux rongeurs autre que les virus influenza A ou les virus influenza B.

La séquence *Mx2* murine est fort proche de la séquence *Mx1* ; les deux gènes sont en effet localisés au même endroit sur le chromosome 16 (273). La majorité des souris de laboratoire n'expriment pas de transcrite *Mx2*. Certaines (rares) souches consanguines de souris de laboratoire synthétisent bien un ARNm *Mx2* mais l'ORF correspondante est interrompue par un résidu cytosine surnuméraire en position 1366 qui impose un décalage du cadre de lecture.

Ainsi, le gène *Mx2* de la grande majorité des souches consanguines de souris de laboratoire est non fonctionnel aussi (274). Par contre, la région codante de l'ARNm *Mx2* des souches de souris sauvages NJL (*Mus musculus musculus*) et SPR (*Mus spretus*) diffère de celle des souches de souris de laboratoire par l'absence d'une alanine en position 1367 qui supprime un codon stop prématuré et donne lieu à un transcrit capable d'encoder une protéine *Mx2* de 656 acides aminés (274). Un immunomarquage permet de mettre en évidence une localisation cytoplasmique sous forme de points pour cette protéine *Mx2* (275). D'autre part, elle exerce une activité antivirale contre le VSV et contre les hantavirus mais se révèle inactive contre les infections par les virus influenza (276, 277).

IV.2. Le polymorphisme au niveau du locus *Mx* bovin

En 1988, Ellinwood et collaborateurs (278) ont cloné le cDNA *Mx* d'un bovin croisé Angus-Gelbvieh (Genbank accession nos. AFO47692 et U88329). Ce faisant, ils ont mis en évidence un variant *Mx1* avec une délétion de 18 pb en position 171 dont ils ont suggéré qu'il s'agissait d'un variant d'épissage (279, 280). Grâce à l'élaboration d'un système permettant la mise en place d'une expression inductible de la protéine bovine *Mx1*, Baise et collaborateurs décrivent en 2004 une protection contre le VSV (281). Nakatsu et collaborateurs classifient (2004), en fonction des substitutions nucléotidiques, les variants du cDNA *Mx1* bovin en deux génotypes : (a) le génotype I avec une délétion au sein de l'UTR-3' et (b) le génotype II avec différentes insertions. Afin de déterminer l'activité antivirale des différents variants, des cellules 3T3 sont transfectées de manière permanente avec l'un ou l'autre génotype et ensuite infectées avec le VSV. Ainsi, on a démontré que les cellules exprimant la protéine *Mx1* bovine sont significativement moins souvent infectées que les cellules n'exprimant pas la protéine *Mx1* bovine. On peut en déduire que le variant d'épissage exerce également une activité antivirale.

Le cDNA *Mx2* bovin (2381 pb) code pour une protéine de 710 acides aminés, les données de séquence sont disponibles au numéro d'accès AF355147. En comparant le cDNA *Mx2* dans 11 races bovines, on met en évidence 17 substitutions nucléotidiques générant huit variants alléliques (283). Seize substitutions sont localisées dans la séquence codante, 14 sont silencieuses et deux donnent lieu à un changement d'acide aminés (Gly-302-Ser et Ile-354-

Val) (282). Lorsque l'on compare le cDNA *Mx2* du buffle d'eau (2 400 pb ; région codante [285-2427] ; 710 acides aminés ; numéro d'accèsion GenBank EF052266) avec le cDNA *Mx2* bovin, on met en évidence 46 substitutions nucléotidiques dont 34 sont silencieuses et 12 induisent un changement d'acide aminé. De plus, il existe une insertion supplémentaire de 9 pb au niveau de l'UTR-5' (284). Des études fonctionnelles ont été entreprises en cellules 3T3 pour comparer l'activité anti-VSV de plusieurs variants, elles ont débouché sur la mise en évidence de la supériorité d'un des variants alléliques bovins (285).

IV.3. Le polymorphisme au niveau du locus Mx de la poule

La séquence complète du cDNA *Mx1* de poule a été déterminée dans la race White Leghorn (286). Plus tard, en analysant cette séquence chez 15 races de poules différentes, on a mis en évidence 25 substitutions nucléotidiques dont 14 sont responsables d'un changement en acides aminés. Ainsi, le cDNA *Mx1* de la poule peut être qualifié de très polymorphe. Afin de décrire l'activité anti-influenza de ces différents allèles, des cellules 3T3 ont été transfectées de manière stable avec ces différents cDNA *Mx1* de poule. De cette manière, on a pu associer une activité anti-influenza et anti-VSV à certains allèles (287). Une première tentative d'explication avançait le changement en acide aminé en position 631 (Ser vers Asp) comme étant déterminant pour une réponse anti-virale positive ou négative (288). Cependant, une deuxième étude examinant la-dite substitution n'a pas pu reproduire les mêmes réponses et déconseille vivement une sélection visant à augmenter la fréquence de l'allèle Asp631 des populations de volailles (289) comme le suggérait la première équipe (290).

IV.4. Le polymorphisme au niveau du locus Mx porcin

Le cDNA *Mx1* porcin complet est isolé et séquencé pour la première fois en 1992 par Müller et collaborateurs (291). L'implication de l'extrémité carboxy-terminale dans la fonction anti-virale de la protéine Mx était alors décrite à plusieurs reprises. Afin de mettre en évidence des variants du gène *Mx1* porcin potentiellement (dys)fonctionnels, l'exon 14 a été séquencé dans différentes races porcines. Ainsi, 2 allèles majeurs ont pu être mis en évidence : (a) poMx1 α , correspondant à l'allèle décrit par Müller et collaborateurs en 1992 et (b) poMx1 β , correspondant à un allèle caractérisé par une délétion de 11 pb (2063-2074) induisant un

changement du cadre de lecture et donnant lieu à une protéine Mx1 porcine avec une extrémité carboxy-terminale allongée de 23 acides aminés (292). Des études supplémentaires mettent en évidence l'existence d'allèles supplémentaires ; cependant, l'effet anti-viral n'a seulement été testé pour deux d'entre eux (293 ; 294). Ainsi, Asano *et al.* (2002) décrivent une activité anti-VSV similaire pour les deux allèles poMx1 α et poMx1 β . Cependant, en 2007, Palm et collaborateurs associent une plus forte activité anti-influenza A à l'allèle poMx1 α (295).

V. LES FONCTIONS DES PROTEINES MX

Au sein de la superfamille des GTPases de haute masse moléculaire, les protéines Mx sont classées dans la sous-famille des protéines *dynamine-like*. On associe plusieurs rôles aux protéines Mx.

V.1. La protéine MxA participe au trafic et au remodelage membranaire

► *Rétention du matériel endocyté dans les cellules exprimant la protéine MxA*

Les dynamines accomplissent différentes fonctions importantes parmi lesquelles on peut citer leur intervention sur le trafic membranaire ainsi que leur intervention sur différents autres processus de transport cellulaire. Les dynamines sont décrites comme étant capables de former des hélices autour du col des vésicules naissantes contribuant ainsi à leur scission de la membrane parentale (296). Ainsi, les dynamines interviennent lors de l'endocytose par récepteur-dépendante. Les protéines Mx font partie de la sous-famille des protéines *dynamine-like*. A ce titre, il n'est donc pas étonnant que Jiatiani *et al.* décrivent une intervention de la protéine MxA dans les processus de trafic ayant lieu lors de l'endocytose (297). Dans les cellules exprimant la protéine MxA, ces chercheurs ont pu observer une rétention du matériel endocyté. Ceci est en accord avec des observations précédentes décrivant la rétention des cargo viraux dans des cellules infectées et exprimant la protéine MxA (298). En plus de ces études, d'autres décrivent des modifications dans la distribution des marqueurs membranaires endosomaux/lysosomaux comme, par exemple, le récepteur du mannose-6-phosphate ou encore le Lamp-1 (299). De plus, les résultats d'essais de co-immunoprécipitation ou encore de *pull-down* indiquent une interaction des protéines MxA avec les dynamines. Cette interaction interfère fort probablement avec les processus de transport cellulaire habituellement régulés par les dynamines (300).

► *La protéine MxA adhère aux, et tubule les liposomes in vitro et est localisée au niveau du réticulum endoplasmique lisse*

Une faculté commune à toutes les dynamines consiste en leur prédisposition à s'auto-assembler pour former des structures ressemblant à des anneaux ; cette aptitude semble être indispensable pour leur intervention lors du remodelage membranaire (301-304). Une autre caractéristique importante des dynamines consiste en leur capacité de lier et de tubuler les lipides, comme par exemple au moment de la scission des vésicules naissantes (305, 306). Les protéines MxA, tout comme d'autres membres de la famille des dynamines, s'auto-assemblent pour former des structures oligomériques de masse moléculaire importante ressemblant à des structures en forme de racine ou à des structures en forme d'anneau (307-312) ; cette forme oligomérique pourrait induire la réorganisation des membranes associées (313). Néanmoins, l'association entre l'oligomérisation et la fonction antivirale n'est pas encore élucidée, ceci d'autant plus qu'il a été rapporté qu'une protéine MxA incapable de s'auto-assembler préserve sa capacité d'inhibition de la réplication du virus Thogoto (314, 315). Des essais de cosédimentation montrent que la protéine MxA est capable de s'associer, *in vitro*, à des lipides. En plus, lorsqu'on associe la protéine MxA à des liposomes sphériques de phosphatidylsérine, on assiste à la formation de tubes longs et souvent ramifiés (316). Par analogie, certains auteurs en sont venus à supposer que la protéine MxA interagit avec des compartiments membranaires subcellulaires *in vivo*, dont certains sont évidemment des lieux de réplication virale (317, 318). En accord avec cette hypothèse, on rapporte une colocalisation de la protéine MxA avec des marqueurs du réticulum endoplasmique lisse, AMF-R et Syntaxine_17 (319, 320, 321). En utilisant, lors d'études en microscopie électronique, des anticorps reconnaissant β' -COP-I, une sous-unité du manteau COP-I localisé au niveau du compartiment intermédiaire entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, on met en évidence une association entre ce compartiment intermédiaire et les protéines MxA (322). Des études ultérieures montrent que l'expression d'une MxA mutante provoque une expansion du réticulum endoplasmique, d'où l'hypothèse que la protéine MxA soit un acteur du trafic membranaire vers le, ou à partir du réticulum endoplasmique, ce qui expliquerait qu'une forme mutante altère les flux membranaires normaux et cause une expansion démesurée du réticulum endoplasmique lisse (323). La faculté de fragmentation des membranes lipidiques des dynamines dépend de l'hydrolyse du GTP (324, 325) ; à

l'inverse de ceci, il a été démontré, *in vitro*, que l'hydrolyse du GTP associé à la protéine MxA n'induit pas de vésiculation membranaire. Au contraire, il semblerait que l'hydrolyse du GTP lié à la protéine MxA influence la dynamique des flux entre sous-compartiments du réticulum endoplasmique lisse (326, 327).

V.2. La protéine MxA est impliquée dans le signallement du Ca²⁺-dépendant

De nombreuses fonctions cellulaires sont régulées par la concentration intracellulaire en Ca²⁺ [Ca²⁺]_i comme par exemple : (a) la croissance cellulaire, (b) la différenciation, (c) la concentration ou encore (d) la sécrétion. La sous-famille des TRPC (*transient receptor potential canonical*) consiste en des canaux à cations perméables au calcium, donc impliqués dans les mécanismes d'augmentation du [Ca²⁺]_i (328, 329). Une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium se fait en réponse à un stimulus activant la phospholipase C. Cette activation induit l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en deux messagers secondaires, notamment le 1,4,5-triphosphate (IP₃) et le diacylglycerol. IP₃ active le récepteur au niveau du réticulum endoplasmique et induit une première phase d'augmentation du [Ca²⁺]_i qui est donc la conséquence d'une libération de calcium à partir du pool intracellulaire. La deuxième phase d'augmentation du [Ca²⁺]_i implique la rentrée du calcium à partir du pool extracellulaire (330). Les complexes TRPC fonctionnels sont aussi bien des homo- que des hétérotétramères et chaque sous-unité TRPC comporte des domaines qui, typiquement, interagissent avec d'autres protéines (331). Ces sous-unités TRPC possèdent, au niveau de leur extrémité N-terminale, des régions dites en « rouleau enroulé » (*coiled coil*) ainsi qu'une région hyperconservée composée de trois ou quatre ARDs (*ankyrin-like repeat domains*) (332). Il a été démontré que l'extrémité C-terminale de la protéine MxA interagit non seulement avec le deuxième domaine ARD des TRPC1, -3, -4, -5, -6 et -7, mais stimule aussi l'activité du TRPC-6 (333). La liaison du GTP à la protéine MxA semble être importante pour la modulation de l'activité du TRPC6, mais pas l'activité GTPasique (334). Ainsi, on ne peut pas exclure une implication de la protéine MxA dans le trafic cellulaire dépendant des TRPC. Donc, la protéine MxA pourrait être considérée comme étant une nouvelle protéine régulatrice impliquée dans la signalisation calcium-dépendante. Cependant, des études ultérieures seront nécessaires pour définir le mécanisme d'action exact (335).

V.3. Les protéines Mx – des GTPases dotées d’une activité régulatrice de la motilité

► *La protéine MxA adhère à la tubuline, inhibe la motilité cellulaire in vitro et le potentiel métastatique in vivo.*

Le clone PC-3M de la lignée de carcinome prostatique humain PC-3 est extrêmement agressive. Cette lignée présente une lésion chromosomique qui a entraîné l’excision des gènes encodant la protéine MxA. Lorsqu’une MxA exogène est exprimée dans ce clone PC-3M, sa motilité et son invasivité s’effondrent in vitro. D’autre part, lorsque ce clone exprime la protéine MxA de manière stable, le nombre de métastases hépatiques diminue significativement après injection intrasplénique. Mieux encore, une surexpression de protéine MxA exogène dans des cellules de mélanome malin en inhibe aussi la mobilité et l’invasivité. En coimmunoprécipitation, une association MxA/tubuline a été démontrée et ce lien moléculaire est mis en relation avec l’effet de la protéine MxA sur la motilité et l’invasivité (336).

V.4. Les protéines Mx – des GTPases dotées d’une activité anti-virale

Même si plusieurs rôles ont été associés à la protéine MxA humaine, la seule fonction Mx-dépendante largement acceptée par l’ensemble de la communauté scientifique consiste en son activité antivirale. Ici, il convient de préciser que certaines isoformes seulement exercent une activité antivirale. Le mécanisme d’action exact n’est pas encore élucidé, mais plusieurs hypothèses solides sont avancées. Schématiquement, les auteurs décrivent/postulent une interaction entre certaines protéines virales et les homo-oligomères Mx (337, 338) ou une interaction directe entre protéines Mx actives et certaines structures cellulaires, cette dernière hypothèse ayant été émise suite à l’observation d’une activité antivirale dépendante du type cellulaire exprimant la protéine Mx étudiée (341, 342, 343).

L’activité antivirale d’une protéine Mx a été décrite pour la première fois grâce à la découverte d’un phénotype de résistance : certaines souches de souris de laboratoire survivent à des doses de virus influenza A murinisé typiquement mortelles pour d’autres souches de

souris. Par après, de nombreuses études ont été publiées décrivant l'activité antivirale d'une protéine Mx donnée contre l'un ou l'autre virus. Prises ensemble, ces études suggèrent un profil type quant aux virus Mx-sensibles : posséder un génome fait d'un simple brin d'ARN de polarité négative. Ainsi, on peut citer une activité antivirale de la protéine Mx contre la famille (a) des *Orthomyxoviridae* (Influenza A, Thogoto virus Dori- et Batkenvirus) (344, 345, 346), (b) des *Rhabdoviridae* (VSV virus [virus de la stomatite vésiculeuse]) (347, 348), (c) des *Paramyxoviridae* (virus de la rougeole et parainfluenza virus humain type 3) (349, 350, 351), et (d) des *Bunyaviridae* (virus de la fièvre du vallée de Rift, virus Lacrosse, virus Dugbe, virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, virus Hantaan, Puumula-et Tulavirus) (352, 353, 354, 355, 356, 357). A l'heure actuelle cependant, ce profil-type a tendance à s'estomper depuis qu'il est démontré que l'activité antivirale des protéines Mx concerne également d'autres familles de virus, par exemple (a) les *Togaviridae* (Semliki Forest virus) (358, 359), (b) les *Picornaviridae* (Coxsackievirus B4) (360), (c) les *Hepadnaviridae* (virus de l'hépatite B) (361) et (d) les *Birnaviridae* (virus de la nécrose pancréatique infectieuse) (362).

Avant d'aborder l'inventaire des isoformes Mx ayant démontré une activité antivirale, le lecteur trouvera dans le « Tableau II » qui suit un recensement des différentes familles de virus dont au moins un membre est inhibé par au moins une protéine Mx. Les caractéristiques biologiques fondamentales de chacune des huit familles sont jointes, de même que quelques références-clé.

Virus	Génome	Entrée cellulaire	Lieu de multiplication	Références
<i>Orthomyxoviridae</i>	ARN simple brin, segmenté de polarité négative	<ol style="list-style-type: none"> 1. Endocytose dépendante de la clathrine 2. Endocytose dépendante de la cavéoline 3. Endocytose dépendante de la clathrine et de la cavéoline 	Cytoplasme/noyau	1, 2, 3, 4
<i>Rhabdoviridae</i>	ARN simple brin, non segmenté de polarité négative	<ol style="list-style-type: none"> 1. Endocytose dépendante de clathrine 	Cytoplasme	5, 6, 7, 8, 9
<i>Paramyxoviridae</i>	ARN simple brin, non segmenté de polarité négative	<ol style="list-style-type: none"> 1. Endocytose dépendante de cavéoline 2. Fusion directe avec la membrane plasmique 	Cytoplasme	10, 11
<i>Bunyaviridae</i>	ARN simple brin, segmenté de polarité négative	<ol style="list-style-type: none"> 1. Endocytose dépendante de clathrine 	Cytoplasme	12, 13

Virus	Génome	Entrée cellulaire	Lieu de multiplication	Référence
<i>Togaviridae</i>	ARN simple brin, linéaire, non segmenté de polarité positive	1. Endocytose dépendante de clathrine	Cytoplasme	14,15
<i>Picornaviridae</i>	ARN simple brin, linéaire, non segmenté de polarité positive	1. Endocytose dépendante de clathrine 2. Internalisation dépendante de <i>lipid-rafts</i>	Cytoplasme	16,17,18,19
<i>Hepadnaviridae</i>	ADN partiellement à double brin, circulaire, non segmenté	1. Endocytose dépendante de clathrine	Cytoplasme/noyau	20,21
<i>Birnaviridae</i>	ARN double brin segmenté	1. Endocytose dépendante de clathrine	Cytoplasme	22

Les références insérées dans ce tableau sont directement disponibles ci-dessous.

1. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. 2003. SIECZARSKI S., WHITTAKER G.R., *Traffic*, 4, 333-343
2. Caveola as an additional route for influenza virus endocytosis in MDBK cells. 2004. NUNES –CORREIA I., EULALIO A., NIR S., PEDROSO de LIMA M.C. *Cell Mol Biol Lett.*, 9, 47-60
3. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. 2004. NEUMANN G., BROWNLEE G.G., FODOR E., KAWAOKA Y. *Curr Top Microbiol Immunol*, 283, 121-143
4. Influenza virus can enter and infect cell in the absence of clathrin-mediated endocytosis. 2002. SIECZKARSKI S.B., WHITTAKER G.R. *J Virol*, 76, 10455-10464
5. Transcription and replication of Rhabdoviruses. 1987. BANERJEE A.A. *Microbiological Reviews*, 51, 67-87
6. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. 2003. SIECZARSKI S., WHITTAKER G.R., *Traffic*, 4, 333-343
7. Visualization of intracellular transport of vesicular stomatitis virus nucleocapsids in living cells. 2006. NAYAK D.D., ZHOU Y., PATTNAIK A.K. *Journal of Virology*, 80, 6368-6377
8. Cell fusion by Semliki Forest, influenza and vesicular stomatitis viruses. 1981. WHITE J., MATLIN K., HELENIUS A. *J Cell Biol*, 89, 674-679
9. The pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. 1982. MATLIN K.S., REGGION H., HELENIUS A., SIMONS K. 1982. *J Mol Biol*, 156, 609-631
10. Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. 2007. CANTIN C., HOLGUERA J., FERRAIRA L., VILLAR E., MUNOZ-BARROSO I. *J Gen Virol.*, 88, 559-569
11. Fusion promotion by a paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase protein: pH modulation of receptor avidity of binding sites I and II. 2007. PALERMO L.M., POROTTO M., GREENGARD O., MOSCONA A. *J Virol.*, 81, 9152-9161

12. Bunyaviridae: Genom organisation and replication strategies. 1991. BOULOY M. *Adv. Viurs Res.*, 40, 235-275
13. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor mediated endocytosis. 2002. JIN M., PARK J., LEE S., PARK B., SHIN J., SONG K.-J., AHN T.I., HWANG S.Y., AHN B.Y., AHN K. *Virology*, 291, 60-69
14. Togaviridae: the viruses and their replication, In: *Fields Virology* (4th Edition). Knipe D.M., Howley P.M., (Eds) Lippincott Williams and Willkins, PA, USA, 895-916 (2001)
15. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. 2003. SIECZARSKI S., WHITTAKER G.R., *Traffic*, 4, 333-343
16. Lipid raft microdomains: key sites for Coxsackievirus A9 infectious cycle. 2003. TRIANTAFILOU K., TRIANTAFILOU M. *Virology*, 317, 1, 128-135
17. Lipid-raft-dependent Coxsackie B4 internalization and rapid targeting to the Golgi. 2004. TRIANTAFILOU K., TRIANTAFILOU M. *Virology*, 326, 6-19
18. Plasma membrane microdomains: organization, function, and trafficking. 2004. LANDE A.J., PRIOR I.A. *Molecular Membrane Biology*, 21, 193-205
19. Internalization and trafficking mechanisms of Coxsackie virus B3 in HeLa cells. 2005. CHUNG S.K., KIM J.Y., KIM I.B., PARK S.I., PARK K.H., NAM J.H. *Virology*, 333, 31-40
20. pH-independent entry and sequential endosomal sorting are major determinants of hepadnaviral infection in primary hepatocytes. 2006. FUNK A., MHAMDI M., HOHENBERG H., WILL H., SIRMA H. *Hepatology*, 44, 685-693
21. Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection. 2000. Breiner M.K., SCHALLER H. *J Virol.*, 74, 2203-2209
22. Infectious pancreatic necrosis virus (IPVN) does not require acid compartments for entry into cells. 1997. ESPIOZA J.C., KUZNAR J. *Archives of Virology*, 142, 2303-2308

► Les protéines Mx1 et Mx2 de la souris

La protéine Mx1 de la souris fut découverte grâce à son activité anti-influenza (363). Plus tard, des croisements entre souches de souris résistantes et souches de souris sensibles établissent le rôle important de la protéine Mx pour ce phénotype de résistance. Ensuite, après l'établissement de lignées cellulaires appropriées, on a démontré, *in vitro*, que la protéine Mx1 de souris, à elle seule, est capable d'inhiber la multiplication des virus influenza A. D'autres membres de la famille des *Orthomyxoviridae* sont également sensibles à cette protéine murine : (a) le virus Thogoto (364), (b) le virus Dhori (365) et (c) le virus Batken (366). Par contre, la protéine Mx1 murine n'exerce aucune activité antivirale vis-à-vis de virus d'autres familles. Parmi les souches consanguines de souris de laboratoire, une mutation responsable d'un décalage du cadre de lecture induit l'expression d'une protéine Mx2 non fonctionnelle. Cependant, chez certaines souches de souris sauvages, une protéine Mx2 fonctionnelle est exprimée dans le cytoplasme ; celle-ci inhibe la multiplication du virus de la stomatite vésiculeuse (367, 368) et du virus Hantan (369).

► Les protéines Mx1, Mx2 et Mx3 du rat

Chez le rat, trois protéines Mx sont exprimées : Mx1, Mx2 et Mx3. La protéine Mx1 exerce une activité antivirale contre les virus influenza A, contre le virus Thogoto (370) et contre le virus de la stomatite vésiculeuse (371). La protéines Mx2 inhibe la multiplication du virus de la stomatite vésiculeuse ainsi que celle de quelques membres de la famille des *Bunyaviridae* : (a) le virus de la fièvre de la vallée du Rift et (b) le virus La Crosse (372).

► Les protéines MxA et MxB de l'être humain

La protéine MxA inhibe de nombreux virus originaires de différentes familles ; la protéine MxB, quant à elle, n'exerce aucune activité antivirale (373). La mise en place d'une expression constitutive de la protéine MxA a permis de mettre en évidence une activité antivirale contre les virus influenza A (374, 375), le virus Thogoto (376) et les virus influenza C (377). La protéine MxA inhibe également la multiplication du virus de la stomatite vésiculeuse, un membre de la famille des *Rhabdoviridae* (378, 379, 380). Au sein

des *Bunyaviridae*, la protéine MxA humaine inhibe la multiplication du virus La Crosse (381, 382), des virus Hantaan, Tula et Puumala (383, 384), du virus de la fièvre de la vallée du Rift, du virus de la fièvre de la mouche des sables (385), du virus Dugbe (386) et du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (387). Certains membres de la famille des *Paramyxoviridae* et certains membres de la famille des *Togaviridae* (Semliki Forest virus) sont inhibés dans des préparations cellulaires plus spécifiques ; en conséquence, l'inhibition de la multiplication du virus peut dépendre du type de cellules (388, 389, 390, 391, 392). Depuis peu, on décrit une activité antivirale de la protéine MxA contre le Coxsackievirus B4 (famille des *Picornaviridae*) (393) ; ceci est une observation particulière puisque, simultanément, deux autres membres de la même famille sont insensibles à l'activité antivirale de la protéine MxA (394). Cette dernière exerce également une activité contre un virus avec un génome de type ADN, il s'agit du virus de l'Hépatite B (famille des *Hepadnaviridae*) (395, 396).

► La protéine Mx1 de la poule

La protéine Mx1 de la poule est pléomorphe (nombreuses variations alléliques). Différentes isoformes sont capables de limiter la multiplication du VSV et des virus influenza A (397).

► La protéine Mx1 du porc

Grâce à l'analyse de la séquence de l'exon 14 de la protéine Mx1 du porc, différentes isoformes ont été identifiées (398). L'activité antivirale de deux isoformes a été testée. Celles-ci inhibent le cycle de multiplication du VSV ; cependant, concernant l'inhibition de la multiplication des virus influenza A, l'une des deux isoformes démontre une activité antivirale plus importante que l'autre (399).

► Les protéines Mx1 et Mx2 des bovins

L'expression inductible de la protéine Mx1 bovine dans des cellules Vero a permis de mettre en évidence une activité inhibitrice contre le VSV (400). En présence de la protéine Mx1 bovine, on assiste également à une réduction de la production de particules infectieuses du

virus de la rage (famille des *Rhabdoviridae*) (401). Plus récemment, il a été démontré que la protéine Mx2 bovine exhibe une activité antivirale contre le VSV (402) mais pas contre les virus influenza A (Garigliany et Desmecht, résultats non publiés).

► Les protéines Mx1 et Mx2 du chien

Exprimées, les protéines canines Mx1 et Mx2 sont localisées dans le cytoplasme. L'expression stable de la protéine Mx2 dans les fibroblastes 3T3 de souris confère une activité anti-VSV, alors que l'expression de la protéine Mx1 ne confère aucune activité antivirale (403).

Dans le « Tableau III » qui suit, le lecteur trouvera un synopsis des activités antivirales des différentes isoformes *Mx* étudiées jusqu'ici, avec les références les plus pertinentes.

Tableau III : Activités antivirales des Mx mammaliennes et aviaires : résumé

Mx	Taille (aa)	Localisation subcellulaire	Activité antivirale avérée		Références
			Virus	Famille/genre	
MxA humaine	661	Cytoplasme	Influenza A	<i>Orthomyxoviridae</i> Influenzavirus A	1, 2
			Influenza B	<i>Orthomyxoviridae</i> Influenzavirus B	3
			Thogotovirus	<i>Orthomyxoviridae</i> Thogotovirus	4,5
			VSV	<i>Rhabdoviridae</i> Vesiculovirus	1,5
			La Crosse virus	<i>Bunyaviridae</i> Bunyavirus	5,6
			Hantaan virus	<i>Bunyaviridae</i> Hantavirus	5
			Puumala virus	<i>Bunyaviridae</i> Hantavirus	7
			Tula virus	<i>Bunyaviridae</i> Hantavirus	5
			Virus de la fièvre de la vallée du Rift	<i>Bunyaviridae</i> Phlebovirus	5
			virus de la fièvre de la mouche des sables	<i>Bunyaviridae</i> Phlebovirus	5
			Dugbe virus	<i>Bunyaviridae</i> Nairovirus	8
			Virus de la fièvre hémorragique du Crimée-Congo	<i>Bunyaviridae</i> Nairovirus	9
			Parainfluenza humaine de type 3	<i>Paramyxoviridae</i> Respirovirus	10, 11
			Virus de la rougeole	<i>Paramyxoviridae</i> Morbillivirus	12, 13
			Semliki Forest virus	<i>Togaviridae</i> Alphavirus	14, 15
			Coxsackievirus B4	<i>Picornaviridae</i> Entérovirus	16
Virus de l'Hépatite B	<i>Hepadnaviridae</i> Orthohepadnavirus	17			

Tableau III, suite

Mx	Taille (aa)	Localisation subcellulaire	<u>Activité antivirale avérée</u>		Référence
			Virus	Famille	
Mx1 murine	631	Noyau	Influenza A	<i>Orthomyxoviridae</i> Influenzavirus A	18, 19
			Thogotovirus	<i>Orthomyxoviridae</i> Thogotovirus	20
			Dhori virus	<i>Orthomyxoviridae</i> Thogotovirus	21
			Batken virus	<i>Orthomyxoviridae</i> Thogotovirus	22
Mx2 murine	655	Cytoplasme	VSV	<i>Rhabdoviridae</i> Vesiculovirus	23, 24
			Virus Hantaan	<i>Bunyaviridae</i> Hantavirus	25
Mx1 rat	652	Noyau	Influenza A	<i>Orthomyxoviridae</i> Influenzavirus A	26
			Thogotovirus	<i>Orthomyxoviridae</i> Thogotovirus	27
			VSV	<i>Rhabdoviridae</i> Vesiculovirus	26
Mx2 rat	659	Cytoplasme	VSV	<i>Rhabdoviridae</i> Vesiculovirus	26
			Virus de la fièvre de la vallée du Rift	<i>Bunyaviridae</i> Phlebovirus	27
			La Crosse virus	<i>Bunyaviridae</i> Bunyavirus	27

Tableau III, suite

Mx	Taille (acides aminés)	Localisation subcellulaire	<u>Activité antivirale avérée</u>		Références
			Virus	Famille	
Mx1 poule	705	Cytoplasme	Influenza A	<i>Orthomyxoviridae</i> Influenzavirus A	28
			VSV	<i>Rhabdoviridae</i> Vesiculovirus	28
Mx1 porcine	663	Cytoplasme	VSV	<i>Rhabdoviridae</i> Vesiculovirus	29
			Influenza A	<i>Orthomyxoviridae</i> Influenzavirus A	30
Mx2 canien	711	Cytoplasme	VSV	<i>Rhabdoviridae</i> Vesiculovirus	31
Mx1 bovine	654	Cytoplasme	VSV	<i>Rhabdoviridae</i> Vesiculovirus	32
			Virus de la rage	<i>Rhabdoviridae</i> Lyssavirus	33
Mx2 bovine	710	Cytoplasme	VSV	<i>Rhabdoviridae</i> Vesiculovirus	34

1. PAVLOVIC J., ZÜRCHER T., HALLER O., STAEHELI P. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J Virol*, 1990, **64**, 3370-3375.
2. FRESE M., KOCHS G., MEIER-DIETER U., SIEBLER J., HALLER O. Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus, *J Virol*, 1995, **69**, 3904-3909.
3. MARSCHALL M., ZACH A., HECHTFISCHER A., FOERST G., MEIER-EWERT H., HALLER O. Inhibition of influenza C viruses by human MxA protein. *Virus Res*, 2000, **67**, 179-188.

4. PAVLOVIC J., ARET H., HEFTI H.P., FRESE M., ROST D., ERNST B., KOLB E., STAEHELI P., Haller O. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol*, 1995, **69**, 4506-4510
5. FRESE M., KOCHS G., FELDMANN H., HERTKORN C., HALLER O. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol*, 1996, **70**, 915-923.
6. MIURA T.A., CARLSON J.O., BEATY B.J., BOWEN R.A., OLSON K.E. Expression of human MxA protein in mosquito cells interferes with LaCrosse virus replication. *J Virol*, 2001, **75**, 3001-3003
7. KANERVA M., MELEN K., VAHERI A., JULKUNEN I. Inhibition of puumala and tula hantaviruses in Vero cells by MxA protein. *Virology*, 1996, **224**, 55-62.
8. BRIDGEN A., DALRYMPLE D., WEBER F., ELLIOT R. Inhibition of Dugbe neurovirus replication by human MxA protein. *Virus Res.*, 2004, **99**, 47-50
9. ANDERSSON L., BLADH L., MOUSAVI-JAZI M., MAGNUSSON K., LUNDKVIST A., HALLER O., MIRAZIMI A. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*, 2004, **78**, 4323-4329
10. ZAHO H., DE B.P., DAS T., BANERJEE A.K. Inhibition of human parainfluenza virus-3 replication by interferon and human MxA protein. *Virology*, 1996, **220**, 330-338.
11. ATREYA P.L., KULKARNI S. Respiratory syncytial virus strain A2 is resistant to the antiviral effects of type I interferons and human MxA. *Virology*, 1999, **261**, 227-241.

12. SCHNORR J.J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., SIMON-JODICKE A., HORISBERGER M.A. ter MEULEN V. MxA –dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol.*, 1993, **67**, 4760-4768.
13. SCHNEIDER-SCHAULIES S., SCHNEIDER-SCHAULIES J., SCHUSTER A., BAYER M., PAVLOVIC J., ter MEULEN V. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J. Virol.*, 1994, **68**, 6910-6917.
14. HEFTI H.P., FRESE M., LANDIS H., DI PAOLO C., AGUZZI A., HALLER O., Pavlovic J. Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La Crosse virus and other lethal viral infections. *J Virol.*, 1999, **73**, 6984-6991.
15. LANDIS H., SIMON-JODICKE A., KLOTI A., DI PAOLO C., SCHNORR J.J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HEFTI H.P., PAVLOVIC J. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J Virol.*, 1998, **72**, 1516-1522.
16. CHIEUX V., CHEHADEH W., HARVEY J., HALLER O., WATTRÉ P., HOBER D. Inhibition of Coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein. *Virology*, 2001, **283**, 84-92.
17. GORDIEN A., ROSMORDUC O., PELTEKIAN C., GARREAU F., BRECHOT C., KREMSDORF D. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J Virol*, 2001, **75**, 2684-2691.

18. STAEHELI P., HALLER O., BOLL W., LINDENMANN J., WEISSMANN C. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, 1986, **44**, 147-158.
19. PAVLOVIC J., STAEHELI P. The antiviral potentials of Mx proteins. *J Interferon Res*, 1991, **11**, 215-219.
20. HALLER O., FRESE M., ROST D., NUTTALL P., KOCHS G. Tick-borne thogoto virus infection in mice is inhibited by the orthomyxovirus resistance gene product Mx1. *J Virol*, 1995, **69**, 2596-25601.
21. THIMME R., FRESE M., KOCHS G., HALLER O. Mx1 but not MxA confers resistance against tick-borne Dhori virus in mice. *Virology*, 1995, **211**, 296-301.
22. FRESE M., WEEBER M., WEBER F., Speth V., HALLER O. Mx1 sensitivity: Batken virus is an orthomyxovirus closely related to Dhori virus. *J Gen Virol*, 1997, **78**, 2458-2458.
23. JIN H., TAKADA A., KON Y., HALLER O., WATANABE T. Identification of the murine Mx2 gene: interferon -induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus. *J Virol*, 1999, **73**, 4925-4930.
24. ZÜRCHER T., PAVLOVIC J., STAEHELI P. Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology*, 1992, **187**, 796-800.
25. JIN H.K., YOSHIMATSU K., TAKADA A., OGINO M., ASANO A., ARIKAWA J., WATANABE T. Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication. *Arch Virol*, 2001, **146**, 41-49.

26. MEIER E., KUNZ G., HALLER O., ARNHEITER H. Activity of rt Mx proteins against a rhabdovirus. *J Virol*, 1990, **64**, 6263-6269.
27. SANDROCK M., FRESE M., HALLER O., KOCHS G. Interferon-induced rat Mx proteins confer resistance to Rift Valley fever virus and other arthropod-borne viruses. *J Interferon Cytokine Res*, 2001, **21**, 663-668.
28. KO J., JIN H., ASANO A., TAKADA A., NINOMIYA A., KIDA H., HOKIYAMA H., OHARA M., TSUZUKI M., NISHIBORI M., MIZUTANI M., WATANABE T. Polymorphism and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genom Res*, 2002, **12**, 595-601.
29. ASANO A., KO J.H., MOROZUMI T., HAMASHIMA N., Watanabe T. Polymorphisms and the antiviral property of porcine mx1 protein. *J Vet Med Sci*, 2002, **64**, 1085-1089.
30. PALM M., LEROY M., THOMAS A., LINDEN A., DESMECHT D. 2007. Differential anti-influenza activity among allelic variants at the *Sus Scrofa* Mx1 locus. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 27, 147-156.
31. NAKAMURA T., ASANO A., OKANO S., KO J., Kon Y., WATANABE T., AGUI T., Intracellular localization and antiviral property of canine Mx proteins. *J Interferon Cytokine Res*, 2005, **25**, 169-173.
32. BAISE E., PIRE G., LEROY M., GERARDIN J., GORIS N., DE CLERCQ K., KERKHOF P., DESMECHT D. 2004. Conditional expression of type I interferon-induced bovine Mx1 GTPase in a stable transgenic vero cell line interferes with replication of vesicular stomatitis virus. *J Interferon Cytokine Res.*, 24, 513-521.

33. LEROY M., PIRE G., BAISE E., DESMECHT D. 2006. Expression of the interferon-alpha/beta-inducible bovine Mx1 dynamin interferes with replication of rabies virus. *Neurobiol Dis.*, 21, 515-521.

V.3. 1. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la fonction antivirale

a) LES VIRUS INFLUENZA A

► *La protéine MX1 murine*

Lorsqu'on stimule le gène *Mx1* de la souris aux interférons de type I, on induit l'expression d'une protéine nucléaire (404). Il s'agit d'une GTPase de haute masse moléculaire qui confère à elle seule une résistance sélective contre les virus influenza A (405-407).

Pour la réplication de son génome, les virus influenza A dépendent de la synthèse *de novo* de protéines ; ainsi, dans les cellules hôtes infectées présentant un blocage dans la synthèse des protéines, le cycle de réplication est abortif, c'est-à-dire arrêté après la transcription primaire (408). Différents aspects du mécanisme moléculaire sous-jacent à l'activité anti-influenza de la protéine Mx1 de la souris sont élucidés. Ainsi, nous savons que la protéine Mx1 n'interfère ni avec la pénétration du virus dans la cellule hôte, ni avec le *uncoating* du virus, ni avec le transport des nucléocapsides parentales vers le noyau de la cellule hôte (409, 410). Cependant, il a été démontré que la protéine Mx1 de la souris interfère avec le taux d'accumulation des transcrits primaires ; en plus, nous savons que le degré d'inhibition est corrélé à la longueur du segment génomique. Ainsi, il semble que l'expression de la protéine Mx1 de la souris interfère plutôt sur l'élongation que sur l'initiation de la transcription (411). En effet, l'activité inhibitrice de la protéine Mx1 sur le cycle de multiplication des virus influenza A peut être neutralisée par la surexpression des trois protéines PB1, PB2 et PA (constituant la polymérase virale) ; dans une moindre mesure, la surexpression de PB2 à elle seule reproduit le même effet neutralisant (412, 413). Néanmoins, une interaction directe entre la protéine Mx1 de la souris et la sous-unité polymérase PB2 n'est pas encore décrite (414, 415). Ces observations permettent d'émettre l'hypothèse soit d'une interaction physique, soit d'une concurrence fonctionnelle entre la protéine Mx1 de la souris et certains composants du complexe polymérasique viral, bloquant ainsi son fonctionnement normal (416).

► *La protéine MxA humaine*

Concernant le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'activité anti-influenza de la protéine MxA humaine, certains aspects sont élucidés. Ainsi, nous savons que dans les cellules hôtes infectées exprimant la protéine MxA (a) le taux d'accumulation des transcrits viraux primaires n'est pas affecté, (b) les transcrits viraux primaires sont polyadénylés et dirigent, *in vitro*, la synthèse des protéines et (c) les transcrits viraux primaires s'accumulent dans le cytoplasme (417). Néanmoins, il a été démontré que dans les cellules hôtes infectées et exprimant la protéine MxA, on assiste à une diminution du taux d'accumulation d'ARN viral total par rapport à des cellules n'exprimant pas la MxA (418). Ainsi, on suppose que la protéine MxA affecte soit (a) l'accès des ARNm viraux à la machinerie de synthèse protéique, soit (b) la synthèse des protéines virales, soit (c) le transport des protéines virales nouvellement synthétisées vers le noyau, soit (d) la réplication du génome viral.

Pour avoir des indications supplémentaires quant au mécanisme moléculaire exact de la protéine MxA humaine, une protéine MxA à accumulation nucléaire a été construite (419, 420). Cette protéine nucléaire inhibe la transcription du génome viral de la même manière que la protéine Mx1 de souris (421, 422) ; malgré cette similitude, la surexpression de PB2 ne neutralise que dans une faible mesure l'activité anti-influenza exercée par la protéine MxA nucléaire. Cependant, une surexpression de la nucléoprotéine virale (NP) s'avère être plus efficace (423) ; en plus, il a été démontré que tant la protéine MxA nucléaire que la protéine MxA cytoplasmique s'associent avec la NP. Ainsi, on peut supposer que la protéine MxA nucléaire interfère avec la transcription virale soit d'une manière directe soit d'une manière indirecte grâce à une interaction avec la protéine virale NP (424). Enfin, on sait que la NP est un facteur essentiel pour l'élongation des chaînes d'ARN ; en conséquence, la protéine MxA nucléaire pourrait inhiber l'élongation de la chaîne d'ARN (425, 426).

D'autre part, l'ARN hélicase UAP56, connue pour son rôle de « chaperon » dans la liaison de la nucléoprotéine aux ARNs viraux, a été proposée comme cible de la protéine MxA pour expliquer l'effet antiviral de celle-ci (478).

b) LE VIRUS THOGOTO

► *La protéine MxA humaine*

Le virus Thogoto est le virus le plus sensible à l'activité anti-virale de la protéine MxA (427). La protéine MxA reconnaît les nucléocapsides entrantes du virus Thogoto (428, 429, 430) et bloque leur trafic centripète jusqu'au noyau de la cellule hôte. Le mécanisme moléculaire responsable de cette inhibition de transport n'est pas encore définitivement élucidé (431). Plusieurs hypothèses sont avancées : (a) des multimères de MxA se positionneraient autour de la nucléocapside et cacheraient ainsi le signal de localisation nucléaire des nucléocapsides entrantes ou (b) la protéine MxA dirigerait la nucléocapside entrante vers des compartiments du cytoplasme où les complexes MxA-nucléocapside seraient immobilisés et dégradés (432).

c) LE VIRUS DE LA STOMATITE VESICULEUSE

► *La protéine MxA humaine*

Les cellules murines 3T3 exprimant de manière constitutive la protéine MxA humaine acquièrent une forte résistance contre le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) (433). Dans ces cellules, les transcrits primaires des gènes viraux ne s'accumulent pas ; il semblerait que la protéine MxA interagisse avec la synthèse des ARNm soit en altérant l'activité du complexe ARN polymérase soit en déstabilisant indirectement les ARNm viraux. Cependant, les ARNm viraux obtenus à partir des cellules exprimant la protéine MxA ou à partir des cellules servant de contrôle se lient aux oligod(T) de manière semblable, ce qui démontre l'absence d'une intervention sur la polyadénylation des transcrits (434). L'effet inhibiteur de la protéine MxA sur les transcrits primaires du VSV est inversement proportionnel à : (a) l'ordre des gènes sur le génome viral (linéaire) et (b) l'activité transcriptionnelle des différents gènes. L'activité inhibitrice « en gradient » de MxA pourrait refléter une inhibition directe du complexe polymérasique viral. Dans ce cas, l'hypothèse d'une protéine MxA qui affecterait le processus d'élongation de la chaîne d'ARN sans affecter le processus d'initiation tient la route (435). Quoiqu'il en soit, comme il a été démontré que la protéine MxA purifiée est

capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle des vRNPs du VSV, il semble bien que les facteurs cellulaires de l'hôte n'interviennent pas dans le processus d'inhibition (436).

Dans des cellules exprimant la protéine MxA et préalablement traitées au cycloheximide, la concentration en ARN génomique parental n'est pas affectée, ce qui suggère que la protéine MxA n'intervient pas sur une étape située avant l'*uncoating* (437).

d) LE VIRUS LA CROSSE

► *La protéine MxA humaine*

Exprimée par des cellules en culture ou par des souris transgéniques, la protéine MxA inhibe le cycle de multiplication du virus la Crosse (LACV) (438, 439, 440). Le LACV possède un génome à ARN simple brin de polarité négative. Le virus transcrit et réplique son génome exclusivement dans le cytoplasme de la cellule hôte. La transcription primaire et la traduction sont catalysées par l'ARN polymérase virale. Le passage du mode transcription vers le mode réplication exige la néosynthèse des protéines virales N. Par conséquent, lorsqu'on limite la concentration en protéines N non assemblées, on interfère sur la réplication du génome du LACV (441). Dans des cellules exprimant la protéine MxA et infectées par le LACV, l'accumulation des transcrits viraux primaires ne semble pas être affectée ; cependant, l'amplification du génome viral est significativement diminuée (442). Ces phénomènes sont compatibles avec les observations qui établissent que la protéine MxA reconnaît la protéine N du LACV entrant et que, ensuite, la protéine MxA interagit avec la protéine N pour former des structures tubulaires allongées donnant lieu à des complexes périnucléaires (443). En effet, ces observations suggèrent que la MxA « séquestre » la protéine N libre, ce qui la rend moins disponible pour assumer ses fonctions dans le cycle viral, notamment le switch transcription/réplication. Le sort ultime des complexes MxA/N n'est pas connu (444). Enfin, la protéine MxA interfère de la même manière sur le cycle de réplication d'autres virus Bunyamwera comme par exemple le virus de la fièvre de la vallée du Rift ou encore le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (445).

e) LE VIRUS DE LA ROUGEOLE

► *La protéine MxA humaine exprimée dans une lignée de monocytes*

En cas de rougeole aiguë, le virus se réplique dans les monocytes et en altère les fonctions (446-449). Dans les monocytes exprimant la protéine MxA, la transcription du virus de la rougeole n'est pas affectée ; la synthèse et la stabilité des ARNm correspondants non plus. Cependant, dans les monocytes toujours, l'expression de la protéine MxA inhibe l'expression des protéines dites « de structure » du virus. En conséquence, on suppose que l'activité antivirale de la protéine MxA intervient à un moment situé après la transcription (450).

► *La protéine MxA humaine exprimée dans des cellules cérébrales*

Une infection chronique du système nerveux central avec le virus de la rougeole est caractérisée par une accumulation des ribonucléoprotéines virales dans les neurones et dans les cellules gliales. En plus, dans ces conditions, on observe une forte diminution du taux d'expression des protéines de l'enveloppe virale (451, 452). Des neurones infectés avec le virus de la rougeole présentent une expression importante de la protéine MxA (453) ; ici, cette protéine est capable de conférer une résistance contre les infections virales (454). Dans les cellules gliales humaines, l'expression de la protéine MxA provoque une diminution de l'efficacité de transcription comme en témoigne la réduction des quantités d'ARNm viral.

Donc, au sein des monocytes, la protéine MxA provoque une diminution de l'expression des glycoprotéines virales via un blocage transcriptionnel alors que dans les cellules gliales, l'expression de la protéine MxA induit une diminution de la production des protéines internes dites « de structure » via un blocage traductionnel (455).

f) LE SEMLIKI FOREST VIRUS

► *La protéine MxA humaine*

Le Semliki Forest virus (SFV) (*Togaviridae*) est un virus à ARN simple brin de polarité positive. Ce virus entre dans sa cellule hôte par endocytose via récepteur interposé (456), puis subit un processus d'*uncoating* qui libère la nucléocapside (457). La réplication du virus a lieu dans le cytoplasme de la cellule infectée et le génome viral libéré sert directement d'ARNm. Il semblerait que l'activité de la protéine MxA contre le SFV dépende soit de l'espèce, soit du type de cellule (458). Cette dépendance suggère la nécessité de la présence d'un facteur cellulaire (459, 460).

Dans les cellules exprimant la protéine MxA et infectées par le SFV, on assiste à une réduction de : (a) la synthèse des protéines virales, (b) la transcription de l'ARNm viral et (c) l'amplification du génome (461). Il est donc envisageable que la protéine MxA interagisse avec une étape précoce du cycle cellulaire du SFV. Ainsi, les cibles de l'activité inhibitrice de la protéine MxA pourraient être : (a) la synthèse ou le fonctionnement de la réplicase virale, (b) la synthèse ou l'élaboration des protéines de structure, (c) la réplication de l'ARN génomique viral, ou (d) la synthèse ou le *capping* de l'ARN viral. Il n'est pas exclu non plus que ce soit une interaction de la protéine MxA avec une/des protéines cellulaires qui soit à l'origine du blocage (462).

VI. EXPRESSION PATHOLOGIQUE DES PROTEINES M_x

VI.1. La surexpression de la protéine MxA dans l'anémie de Fanconi

L'anémie de Fanconi résulte d'un défaut génétique transmis de manière autosomale et récessive. Une dissection des bases génétiques sous-jacentes à ce syndrome clinique a permis l'identification de cinq sous-types différents ; ceux-ci partagent certaines caractéristiques cliniques et cellulaires (463, 464, 465). Les personnes atteintes présentent des malformations squelettiques et viscérales, une prédisposition pour le développement du cancer et une prédisposition pour une défaillance de la moelle osseuse ainsi que pour la leucémie aiguë (466, 467, 468). En 1997, Li et Youssoufian ont montré que, dans quatre des cinq sous-types, les malades montrent une surexpression de la protéine MxA en l'absence de toute stimulation exogène interférons-dépendante (469). La surexpression de la protéine MxA induit probablement une apoptose précoce mais aucun lien mécanistique n'a encore été objectivé entre cette surexpression et l'un ou l'autre symptôme ou lésion.

VI.2. La surexpression de la protéine MxA dans l'alopecia areata

L'*alopecia areata* (AA) est une maladie auto-immune caractérisée par une perte de cheveux incomplète ainsi que par une infiltration des follicules pileux par des lymphocytes T. Les personnes atteintes du syndrome de Down (DS, mongolisme) exhibent une fréquence de l'AA supérieure par rapport à la population en général. Le DS est lié à une copie additionnelle (entière ou partielle) du chromosome 21 (470) ; cette région chromosomale pourrait donc porter les gènes impliqués dans la pathogénie de l'AA (471). Le gène *MxA* humain est situé au sein d'une région du chromosome 21, y compris dans le fragment tripliqué minimum. Selon certains auteurs, la protéine MxA est donc probablement impliquée dans les manifestations du syndrome de Down (472). D'autre part, au sein des follicules pileux anormaux des personnes atteintes de AA, (et pas dans leurs follicules normaux) la protéine MxA est fortement surexprimée. Là encore, certains auteurs établissent un lien causal. Lorsque le gène *MxA* des personnes souffrant d'AA a été séquencé, quatre SNP particuliers (single nucleotide polymorphism) ont été mis en évidence au sein de l'intron 6. Une étude

d'association a permis de confirmer par la suite une association significative entre ce marqueur génétique et les patients atteints de AA (473).

VI.3. La surexpression de la protéine MxA dans la panencéphalite sclérosante subaiguë

La panencéphalite sclérosante subaiguë (SSPE) est une maladie neurodégénérative qui résulte d'une infection chronique, dite « *slow virus* », par un virus de la rougeole muté (474) ; cette maladie est rencontrée chez des enfants et chez de jeunes adultes. On sait que la protéine MxA inhibe la multiplication de certains virus à ARN simple brin, y compris la multiplication du virus de la rougeole (475, 476). Comme deux SNP particuliers au sein de la région du promoteur du gène *MxA* humain sont associés à la SSPE, certains auteurs avancent l'hypothèse d'une prédisposition de nature génétique. Sur un plan mécanistique, les mêmes auteurs évoquent même un lien de cause à effet entre une dérégulation de l'expression de MxA et l'établissement de l'infection persistante par le virus de la rougeole (477). Cette hypothèse reste une spéculation à ce jour, faute de travaux dédiés à sa vérification expérimentale.

VII. BIBLIOGRAPHIE RELATIVE A LA SYNTHÈSE SUR LES GTPases Mx

1. LINDENMANN J. 1962. Resistance of mice to mouse adapted influenza A virus. *Virology*, 16, 203-204
2. LINDENMANN J. 1964. Inheritance of resistance to influenza in mice. *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.*, 116, 506-509
3. ABUJIANG P., YAMADA Y., HALLER O., KOBAYASHI H., KAMOTO T., LU L.M., OGAWA M., ISHIMOTO A., KATOH H., KANEHIRA K., IKEGAMI S., KUKUMOTO M., HIAI H. 1996. The origin of SL family mice. *Lab. Anim.Sci*, 46, 410-41
4. HALLER O., ACKLIN M., STAEHELI P. 1986. Genetic resistance to influenza virus in wild mice. *Curr. Top. Microbiol.Immunol*, 127, 331-337
5. LINDENMANN J., KLEIN P. 1966. Further studies on the resistance of mice to myxoviruses. *Arch. Virol*, 1966, 19, 1
6. HALLER O., ARNHEITER H., GRESSER I., LINDEMANN J. 1979. Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice. *J.Exp.Med.*, 149, 601-612
7. HALLER O., ARNHEITER H., LINDENMANN J., GRESSER I. 1980. Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus. *Nature*, 283, 660 662
8. HORISBERGER M.A., STAEHELI P., HALLER O. 1983. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*, 80, 1910-1914

9. STAEHELI P., HALLER O. 1985. Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus resistant mice. *Mol.Cell.Biol.*, 5, 2150-2153
10. DREIDING P., STAEHELI P., HALLER O., 1985. Interferon-induced protein Mx accumulates in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses. *Virology*, 140, 192-196
11. STAEHELI P., PRAVTCHEVA D., LUNDIN L.G., ACKLIN M., RUDDLE F., LINDENMANN J., HALLER O. 1986. Interferon-regulated influenza virus resistance gene Mx is localized on mouse chromosome 16. *J.Virol*, 58, 967-969
12. STAEHELI P., HALLER O., BOLL W., LINDENMANN J., WEISSMANN C. 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, 44, 147-158
13. BOURNE H.R., SANDERS D.A., McCORMICK F. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348, 125-132
14. VAN DER BLIEK A.M. 1999. Functional diversity in the dynamin family. *Trends in Cell Biology*, 9, 96-102
15. PASCAL B.M., SHEPTNER H.S., VALLEE R.B. 1987. MAP 1C is a microtubule-activated AT-Pase which translocates microtubules *in vitro* and has dynein -like properties. *J.Cell Biol.*105, 1273-1282
16. ROBINSON P.J., LIU J.P., POWELL K.A., FYKSE E.M., SÜDHOF T.C. 1994. Phosphorylation of dynamin I and synaptic-vesicle recycling. *Trends Neurosci.*, 17, 348-353

17. VAN DER BLIEK A.M., MEYEROWITZ E.M. 1991. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic, *Nature*, 351, 411-414
18. CHEN M.S., OBAR R.A., SCHROEDER C.C., AUSTIN T.W., POODRY C.A., WADSWORTH S.C., VALLEE R. 1991. Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature*, 351, 583-586
19. VAN DER BLIEK A.M., REDELMEIER T.E., DAMKE H., TISDALE E.J., MEYEROWITZ E.M., SCHMID S.L. 1993. Mutations in human dynamin block an intermediate state in coat vesicle formation, *J. Cell Biol.*, 122, 553-563
20. HERSKOVITS J.S., BURGESS C.C., OBAR R.A., VALLEE R.B. 1993. Effects of a mutant rat dynamin on endocytosis. *J. Cell Biol.*, 122, 565-578
21. DAMKE H., BABA T., WARNOCK D.E., SCHMID S.L. 1994. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.*, 127, 915-934
22. PRAEFCKE G.J., McMAHON H.T. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 133-147
23. HINSHAW J.E. 2000. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16, 483-519
24. SONG B.D., SCHMID S.L. 2003. A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own, *Biochemistry*, 42, 1369-1376
25. VAN DER BLIEK A.M. Functional diversity in the dynamin family. 1999. *Trends in Cell Biology*, 9, 96-102

26. DANINO D., HINSHAW J.E. 2001. Dynamin family of mechanoenzyme. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 454-460
27. ROTHMAN J.H., RAYMOND C.K., GILBERT T., O'HARA P.J., STEVENS T.H. 1990. A putative GTP binding protein homologous to interferon-inducible Mx proteins performs an essential function in yeast protein sorting. *Cell*, 61, 1063-1074
28. CLARK S.G., SHURLAND D.L., MEYEROWITZ E.M., BARGMANN C.I., VAN DER BLIEK A.M. 1997. A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-inducible locomotion defect in *C.elegans*. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 94, 10438-10443
29. GAMMIE A.E., KURIHARA L.J., VALLEE R.B., ROSE M.D. 1995. DNM1, a dynamin-related gene, participated in endosomal trafficking in yeast. *J. Cell Biol.* 130, 553-566
30. IMOTO M., TACHIBANA I., URRUTIA R. 1998. Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to yeast dynamin-like GTPase VPS1p. *J.Cell Sci.*, 111, 1341-1349
31. SMIRNOVA E., SHURLAND D.L., RYAZANRSEV S.N., VAN DER BLIEK A.M. 1998. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.*, 143, 351-358
32. Yoon Y., Pitts K.R., DAHAN S., McNIVEN M.A. 1998. A novel dynamin-like protein associated with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells, *J. Cell Biol.*, 140, 779-793
33. Jones B.A., Fangman W.L. 1992. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.*, 6, 380-389

34. ALEXANDER C., VOTRUBA M., PESCH V.E., THISELTON D.L., MAYER S., MOORE A., RODRIGUEZ M., KELLNER U., LEO KOTTLER B., AUBURGER G., BHATTACHARYA S.S., WISSINGER B. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.*, 26, 211-215
35. Delettre C., Lenaers G., Griffoin J.M., Gigarel N., Lorenzo C., Belenguer P., Pelloquin L., Grosgeorge J., Turc-Carel C., Perret E., Astarie-Dequeker C., Lasquelléc L., Arnaud B., Ducommun B., Kaplan J., Hamel C.P. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.*, 26, 207-210
36. DANINO D., HINSHAW J.E. 2001. Dynamin family of mechanoenzyme. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 454-460
37. GU X., VERMA D.P. 1996. Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants. *EMBO J.*, 15, 695-704
38. Gu X., VERMA D.P. 1997. Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division, *Plant cell*, 9, 157- 169
39. Kang S.G., JIN J.B., PIAO H.L., PIH K.T., JANG H.J., LIM J.H., HWANG I. 1998. Molecular cloning of Arabidopsis cDNA encoding a dynamin-like protein that is localized to plastids. *Plant Mol.Biol.*, 38, 437-447
40. PARK J.M., KANG S.G., PIH K.T., JANG H.J., PIAOH L., YOON H.W., CHO M.J., HWANG I. 1997. A dynamin-like protein in, ADL1, is present in membranes as a high-molecular –mass complex in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*, 115, 763-771

41. PARK J.M., CHO J.H., KANG S.G., JANG H.J., PIH K.T., PIAO H.L., CHO M.J., HWANG I. 1998. A dynamin-like protein in *Arabidopsis thaliana* is involved in biogenesis of thylakoid membranes, *EMBO J.*, 17, 859-867, 1998
42. DANINO D., HINSHAW J.E. 2001. Dynamin family of mechanoenzyme. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 454-460
43. STAEHELI P., HORISBERGER M.A., HALLER O. 1984. Mx-dependent resistance to influenza viruses is induced by mouse interferons alpha and beta but not gamma. *Virology*, 132, 456-461
44. STAEHELI P., HALLER O. 1985. Interferon -induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Mol. Cell Biol.*, 5, 2150-2153
45. BOEHM U., GUETHELEIN L., KLAMP T., OZBEK K., SCHAUB A., FÜTTERER A., PFEFFER K., HOWARD J.C. 1998. Two families of GTPases dominated the complex cellular response to IFN-gamma. *Journal of immunology*, 161, 6715-6723
46. BOURNE H.R., SANDERS D.A., McCORMICK F. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348, 125-132
47. DEVER T.E., GLYNIAS M.J., MERRICK W.C. 1987. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 454-557
48. MARTENS S., HOWARD J. 2006. The interferon-inductible GTPases. *Annu. Rev. Cell Dev.*, 22, 559-589

49. HORISBERGER M.A., McMASTER G.K., ZELLER H., WATHELET M.G., DELLIS J., CONTENT J. 1990. Cloning and sequence analyses of cDNAs for interferon- and virus- induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: functional study of the corresponding gene promoter. *J. Virol.*, 64, 1171-1181, 1990

50. PITOSSO F., BLANK A., SCHRODER A., SCHWARZ A., HUSSO P., SCHWEMMLE M., PAVLOVIC J., STAEHELI P. 1993. A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J. Virol.*, 67, 6726-6732

51. MELEN K., JULKUNEN I. 1994. Mutational analysis of murine Mx1 protein: GTP binding core domain is essential for anti-influenza A activity. *Virology*, 205, 269-279

52. PITOSSO F., BLANK A., SCHRODER A., SCHWARZ A., HUSSO P., SCHWEMMLE M., PAVLOVIC J., STAEHELI P. 1993. A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J. Virol.*, 67, 6726-6732

53. TOYODA T., ASANO Y., ISHIHAMA A. 1995. Role of GTPase activity of murine Mx1 protein in nuclear localization and anti-influenza activity. *J. Gen. Virol.*, 76, 1867-1869

54. SCHWEMMLE M., WEINING K.C., RICHTER M.F., SCHUMACHER B., STAEHELI P., Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein. 1995. *Virology*, 206, 545-554

55. VAN DER BLIEK A.M. 1999. Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol.*, 9, 96-102

56. LUPAS A., VAN DYKE M., STOCK J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences, *Science*, 252, 1162-1164

57. OKAMATO P.M., TRIPET B., LITOWSKI J., HODGES R.S., VALLEE R.B. 1999. Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J.Biol.Chem.*, 274, 10277-10286
58. MUHLBERG A.B., WARNOCK D.E., SCHMID S.L. 1997. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.*, 16, 6676-6683
59. SEVER S., MUHLBERG A.B., SCHMID S.L. 1999. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 398, 481-486
60. SMIRNOVA E., SHURLAND D.L., NEWMAN-SMITH E.D., PISHVAEE B., VAN DER BLIEK A.M. 1999. A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J.Biol.Chem.*, 274, 14942-14947
61. LUPAS A., VAN DYKE M., STOCK J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, 1991, 252, 1162-1164
62. MUHLBERG A.B., WARNOCK D.E., SCHMID S.L. 1997. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase, *EMBO J.*, 16, 6676-6683
63. SEVER S., MUHLBERG A.B., SCHMID S.L. 1999. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 398, 481-486
64. HINSHAW, J.E. 2000. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 16, 483-519
65. HIRST J.D., VIETH M., SKOLMICK J., BROOKS C.L.I. 1996. Predicting leucine zipper structure from sequence. *Protein Eng.*, 9, 657-662

66. LANDSCHULZ W.H., JOHNSON P.F., McKNIGHT S.L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA-binding proteins. *Science*, 240, 1764-1790
67. BROCCIERI L., KARLIN S. 2000. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function and evolution. *Protein Sci.*, 9, 476-486
68. MELEN K., RONNI T., BRONI B., KRUG R.M., VON BONSDORFF C.H., JULKUNEN I. 1992. Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 25898, 25907
69. WEITZ G., BEKISZ J., ZOON K., ARNHEITER H. 1998. Purification and characterization of human Mx protein. *J. Interferon Res.*, 9, 679-689
70. DREIDING P., STAEHELI P., HALLER O. 1985. Interferon-induced protein Mx accumulated in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses, *Virology*, 140, 192-196
71. DI PAOLO C., HEFTI H.P., MELI M., LANDIS H., PAVLOVIC J. 1999. Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal End of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization. *J.Biol.Chem.*, 271, 32071-32078
72. NAKAYAMA M., YAZAKI K., KUSANO A., NAGATA K., HANAI N., ISHIHAMA A. Structure of mouse Mx1 protein. 1993. Molecular assembly and GTP-dependent conformational change. *J.Biol.Chem.*, 268, 15033-15038
73. MELEN K., RONNI T., BRONI B., KRUG R.M., VON BONSDORFF C.H., JULKUNEN I. 1992. Interferon-induced Mx proteins form Oligomers and contain a putative leucine zipper. *J.Biol.Chem.*, 267, 25898-25907

74. SCHWEMMLE M., RICHTER M.F., HERRMANN C., NASSAR N., STAHELI P. 1995. Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *J.Biol.Chem*, 270, 13518-13523
75. MELEN K., JULKUNEN I. 1997. Nuclear cotransport mechanism of cytoplasmic human MxB protein. *J.Biol.Chem.*, 272, 32353-32359
76. PONTEN A., SICK C., WEEBER M., HALLER O., KOCHS G. 1997. Dominant negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J.Virol.*, 71, 2591-2599
77. DI PAOLO C., HEFTI H.P., MELI M., LANDIS H., PAVLOVIC J. 1999. Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal End of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization, *J.Biol.Chem.*, 271, 32071-32078
78. Di PAOLO C., HEFTI H.P., MELI M., LANDIS H., PAVLOVIC J. 1999. Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA is a prerequisite for its oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 32071-32078
79. MELEN K., RONNI T., BRONI B., KRUG R.M., VON BONSDORFF C.H., JULKUNEN I. 1992. Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contains a putative leucine zipper. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 25898, 25907
80. SCHUHMACHER B., STAHELI P. 1998. Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MxA GTPase. *J.Biol.Chem.*, 273, 2835-28370
81. RICHTER M.F., SCHWEMMLE M., HERRMANN C., WITTINGHOFER A., STAHELI P. 1995. Interferon-induced MxA protein. GTP binding and GTP hydrolysis properties, *J.Biol.Chem.*, 270, 13512-13517

82. NAKAYAMA M., YAZAKI K., KUSANO A., NAGATA K., HANAI N., ISHIHAMA A. 1993. Structure of mouse Mx1 protein. Molecular assembly and GTP-dependent conformational change, *J.Biol.Chem.*, 268, 15033-15038
83. KOCHS G., HAENER M., AEBI U., HALLER O., Self-assembly of human MxA. 2002. GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J.Bio.Chem.*, 277, 14172-14176
84. DI PAOLO C., HEFTI H.P., MELI M., LANDIS H., PAVLOVIC J. 1999. Intramolecular backfolding of the carboxy-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization, *J.Biol.Chem.*, 274, 32071-32078
85. SCHWEMMLE M., RICHTER M.F., HERRMANN C., NASSAR N., STAEHELI P. 1995. Unexpected structural requirements for GTPase activity of the Interferon-induced MxA protein. *J.Biol.Chem.*, 270, 13518,13523
86. FLOHR F., SCHNEIDER SCHAULIES S., HALLER O., KOCHS G. 1999. The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures. *FEBS Lett.*, 463, 24-28
87. SCHWEMMLE M., RICHTER M.F., HERRMANN C., NASSAR N., STAEHELI P. 1995. Unexpected structural requirements for GTPase activity of the Interferon-induced MxA protein. *J.Biol.Chem.*, 1995, 270, 13518,13523
88. MUHLBERG A.B., WARNOCK D.E., SCHMID S.L. 1997. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.*, 16, 6676-6683
89. WARNOCK D.E., HINSHAW J.E., SCHMID S.L. 1996. Dynamin self assembly stimulates its GTPase activity. *J. Biol Chem.*, 271, 22310-22314

90. WARNOCK D.E., SCHMID S.L. 1996. Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. *BioEssays*, 18, 885-893, 1996
91. SEVERS S., MUHLBERG A.B., SCHMID S.L. 1999. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor mediated endocytosis. *Nature*, 398, 481-486
92. HINSHAW J.E. 2000. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu.Rev.Cell Dev.Bio.*, 16, 483-519
93. SALIM K., BOTTOMLY M.J., QUERFURTH E., ZVELEBIL M.J., GOUT I., SCAIFE R., MARGOLIS R.L., GIGG R., SMITH C.I., DRISCOLL P.C., WATERFIELD M.D., PANAYOTOU G.1996. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.*, 15, 6241-6250
94. SWEITZER S.M., HINSHAW J.E. 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, 93, 1021-1029
95. TAKEI H., HAUCKE V., SLEPNEV V., FARSAK K., SALAZAR M., CHEN H., DE CAMILLI P. 1998. Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis protein-free liposomes. *Cell*, 94, 131-141
96. TAKEI K., McPHERSON P.S., SCHMID S.L., DE CAMILLI P. 1995. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature*, 374, 186-190
97. YOON Y., PITSS K.R., McNIVEN M.A. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. 2001. *Mol.Biol.Cell.*, 12, 2894-2905

98. ACCOLA A.M., HUANG B., MASRI A.A., McNIVEN M.A. 2002. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 21829-21835
99. LEE S.H., VIDAL S.M. 2002. Functional diversity of Mx proteins: Variations on a theme of host resistance to infections. *Genome Res.*, 12, 527-530
100. PITOSI F., BLANK A., SCHRÖDER A., SCHWARZ A., HUSSE P., SCHWEMMLE M., PAVLOVIC J., STAEHELI P. 1993. A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J Virol.*, 67, 6726-6732
101. MELEN K., JULKUNEN I. 1994. Mutational analysis of murine Mx1 protein: GTP-binding core domain is essential for anti-influenza activity. *Virology*, 205, 269-279
102. SCHWEMMLE M., RICHTER M.F., HERRMANN C., NASSAR N., STAEHELI P. 1995. Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *J Biol Chem.*, 270, 13518-13523
103. JANZEN C., KOCHS G., HALLER O. 2000. A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J Virol*, 74, 8202-8206
104. TOYODA T., ASANO Y., ISHIHAMA A. 1995. Role of GTPase activity of murine Mx1 protein in nuclear localization and anti-influenza virus activity. *J Gen Virol*, 75, 1867-1869
105. KOCHS G., HALLER O. 1999. Interferon-induced human MXA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 2082-2086

106. KOCHS G., HALLER O. 1999. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem*, 1999, 274, 4370-4376
107. FLOHR F., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HALLER O., KOCHS G. 1999. The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures. *FEBS Lett*, 463, 24-28
108. HALLER O., FRESE M., KOCHS G. 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech*, 17, 220-230
109. LEE S.H., VIDAL S.M. 2002. Functional diversity of Mx proteins: Variations on a theme of host resistance to infection, *Genome Res.*, 12, 527-530
110. LEE S.H., VIDAL S.M. 2002. Functional diversity of Mx proteins: Variations on a theme of host resistance to infection, *Genome Res.*, 2002, 12, 527-530
111. FLOYD S., DE CAMILLI P. 1998. Endocytosis proteins and cancer: a potential link? *Trends Cell Biol.*, 8, 299-301
112. LEE S.H., VIDAL S.M. 2002. Functional diversity of Mx proteins: Variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Res.*, 12, 527-530
113. GARBER E.A., HRENIUK D.L., SCHEIDEL L.M., VAN DER PLOEG L.H. 1993. Mutations in murine Mx: effects on localization and antiviral activity. *Virology*, 194, 715-723
114. MELEN K., JULKUNEN I. 1994. Mutational analysis of murine Mx1 protein: GTP-binding core domain is essential for anti-influenza activity. *Virology*, 205, 269-279

115. TOYODA T., ASANO Y., ISHIHAMA A. 1995. Role of GTPase activity of murine Mx1 protein in nuclear localization and anti-influenza activity. *J. Gen. Virol.*, 76, 1867-1869
116. ZÜRCHER T., PAVLOVIC J., STAEHELI P. 1992. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J.*, 11, 1657-1661
117. NOTEBORN M., ARNHEITER H., RICHTER -MANN L., BROWNING H., WEISSMANN C. 1987. Transport of murine Mx protein into the nucleus is dependent on a basic carboxy-terminal sequence. *J. Interferon Res.*, 7, 657-669
118. ZÜRCHER T., PAVLOVIC J., STAEHELI P. 1992. Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus. *J. Virol.*, 66, 5059-5066
119. LEE S.H., VIDAL S.M. 2002. Functional diversity of Mx proteins: Variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Research*, 12, 527-530
120. KO J.H., TAKADA A., MITSUHASHI T., AGUI T., WATANABE T. 2004. Native antiviral specificity of chicken Mx proteins depends on amino acid variation at position 631. *Animal Genetics*, 35, 119-122
121. JOHANNES L., KAMBADUR R., LEE-HELLMICH H., HODKINSON C.A., ARNHEITER H., MEIER E. 1997. Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half. *J. Virol.*, 71, 9792-9795
122. MOROZUMI T., SUMANTRI C., NAKAJIMA E., KOBAYASHI E., ASANO A., OISHI T., MITSUHASHI T., WATANABE T., HAMASIMA N. 2001. Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene. *Biochem Genet*, 39, 251-260

123. PALM M., LEROY M., THOMAS A., LINDEN A., DESMECHT D. 2007. Differential anti-influenza activity among allelic variants at the *Sus Scrofa* Mx1 locus. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 27, 147-156
124. HORISBERGER M.A., GUNST M.C. 1991. Interferon-induced proteins: Identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology*, 180, 185-190
125. MÜLLER M., BREM G. 1991. Disease resistance in farm animals. *Experientia*, 47, 923-934
126. STAEHELI P., YU Y.X., GROB R., HALLER O. 1989. A double-stranded RNA-inducible fish gene homologous to murine influenza virus resistance gene Mx. *Mol. Cell. Biol.*, 9, 3117-3121
127. MEIER E., FÄH J., GROB M.S., END R., STAEHELI P., HALLER O. 1988. A family of interferon-induced Mx-related mRNAs encodes cytoplasmic and nuclear proteins in rat cells. *J. Virol.*, 62, 2386-2393
128. STAEHELI P., HALLER O. 1985. Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Mol Cell Biol*, 5, 2150-2153
129. AEBI M., FÄH J., HURT N., SAMUEL C.E., THOMIS D., BAZZIGHER L., PAVLOVIC J., HALLER O., STAEHELI P. 1989. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol Cell Biol*, 9, 5062-5072
130. HORISBERGER M.A. 1988. The action of recombinant bovine interferons on influenza virus replication correlates with the induction of two Mx-related proteins in bovine cells. *Virology*, 162, 181-186

131. CHARLSTON B., STEWART H. 1993. An interferon-induced Mx protein: cDNA sequence and high –level expression in the endometrium of pregnant sheep. *Gene*, 137, 327-331
132. CHESTERS P.M., STEELE M., PUREWAL A., EDINGTON N. 1997. Nucleotide sequence of equine MxA cDNA. *DNA Seq.*, 7, 239-242
133. HICKS B.A., ETTER S.J., CARNAHAN K.G., JOYCE M.M., ASSIRI A.A., CARLING S.J., KODALI K., JOHNSON G.A., HANSEN T.R., MIRANDO M., A., WOODS G.L., VANDERWALL D.K., OTT T.L. 2003. Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts and mares. *J Anim Sci*, 81, 1552-1561
134. NAKAMURA T., ASANO A., OKANO S., KO J., KON Y., WATANABE T., AGUI T. 2005. Intracellular localization and antiviral property of canine Mx proteins. *J Interferon Cytokine Res.*, 25, 169-173
135. HORISBERGER M., SCHRENK R., STAIGER S., LEYVRAZ A., MARTINOD S. 1990. Induction of Mx-related protein in cat peripheral blood mononuclear cells after administration of recombinant human interferon hybrid. *Antiviral Res.*, 13, 53-59
136. MÜLLER M., WINNACKER E., BREM G. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *J Interferon Res.*, 12, 119-129
137. HUG H., COSTAS C., STAEHELI P., AEBI M., WEISSMANN C. 1988. Organization of the murine *Mx* gene and characterization of its interferon-and virus –inductible promoter. *Molecular and cellular Biology*, 3065-3079

138. ASANO A., JIN H.K., WATANABE T. 2003. Mouse *Mx2* gene: organization, mRNA expression and the role of interferon-response promoter in its regulation. *Gene*, 306, 105-113
139. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778
140. THOMAS A.V., PALM M., BROERS A.D., ZEZAFOUN H., DESMECHT D.J.-M. 2006. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics*, 58, 383-389
141. GERARDIN J. A.-G., BAISE E.A., PIRE G.A., LEROY M.P.P., DESMECHT D. J.-M. 2003. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene*, 326, 67-75
142. HORISBERGER M.A., STAEHEI P., HALLER O. 1983. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 1910-1914
143. HALLER O., ARNHEITER H., GRESSER I., LINDENMANN J. 1979. Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice. *J Exp Med*, 149, 601-612
144. STAEHELI P., HORISBERGER M.A., HALLER O. 1984. Mx-dependent resistance to influenza viruses is induced by mouse interferons alpha and beta but not gamma. *Virology*, 132, 456-461

145. HORISBERGER M.A. 1988. The action of recombinant bovine interferons on influenza virus replication correlates with the induction of two Mx-related proteins in bovine cells. *Virology*, 162, 181-186
146. STAEHELI P., DANIELSON P., HALLER O., SUTCLIFFE J. 1986. Transcriptions activation of mouse Mx gene by type I interferon. *Mol Cell Biol*, 6, 4770-4474
147. HUG H., COSTAS C., STAEHELI P., AEBI M., WEISSMANN C. 1988. Organization of the murine *Mx* gene and characterization of its interferon-and virus –inductible promoter. *Molecular and cellular Biology*, 3065-3079
148. HORISBERGER M.A., McMASTER G.K., ZELLER H., WATHELET M.G., DELLIS J., CONTENT J. 1990. Cloning and sequence analysis of cDNA for interferon- and virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: functional study of the corresponding gene promoter. *J.Virol.*64, 1171-1181
149. GERARDIN J. A.-G., BAISE E.A., PIRE G.A., LEROY M.P.P., DESMECHT D. J.-M. 2003. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene*, 326, 67-75
150. SCHUMACHER B., BERNASCONI D., SCHULTZ U., STAEHELI P. 1994. The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology*, 203, 144-148
151. CHANG K.C. HANSEN E., FRONI L., LIDA J., GOLDSPINK G. 1991. Molecular and functional analysis of the virus- and interferon-inductible human MxA promoter. *Arch Virol*, 117, 1-15

152. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778

153. COLLET B., SECOMBES C.J. 2001. The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter. Structural and functional characterization. *Eur J Biochem*, 268, 1577-1584

154. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778

155. THOMAS A.V., PALM M., BROERS A.D., ZEZAFOUN H., DESMECHT D.J.-M. 2006. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics*, 58, 383-389

156. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778

157. GERARDIN J. A.-G., BAISE E.A., PIRE G.A., LEROY M.P.P., DESMECHT D. J.-M. 2003. Genomic structure, organization, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene*, 326, 67-75

158. HUG H., COSTAS C., STAEHELI P., AEBI M., WEISSMANN C. 1988. Organization of the murine *Mx* gene and characterization of its interferon- and virus -inducible promoter. *Molecular and cellular Biology*, 3065-3079
159. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778
160. GERARDIN J. A.-G., BAISE E.A., PIRE G.A., LEROY M.P.P., DESMECHT D. J.-M. 2003. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene*, 326, 67-75
161. CHANG K.C. HANSEN E., FRONI L., LIDA J., GOLDSPIK G. 1991. Molecular and functional analysis of the virus- and interferon-inducible human MxA promoter. *Arch Virol*, 117, 1-15
162. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778
163. THOMAS A.V., PALM M., BROERS A.D., ZEZAFOUN H., DESMECHT D.J.-M. 2006. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics*, 58, 383-389

164. COLLET B., SECOMBES C.J. 2001. The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter. Structural and functional characterization. *Eur J Biochem*, 268, 1577-1584
165. HUG H., COSTAS C., STAEHELI P., AEBI M., WEISSMANN C. 1988. Organization of the murine *Mx* gene and characterization of its interferon-and virus –inducible promoter. *Molecular and cellular Biology*, 3065-3079
166. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778
167. GERARDIN J. A.-G., BAISE E.A., PIRE G.A., LEROY M.P.P., DESMECHT D. J.-M. 2003. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene*, 326, 67-75
168. HALLER O., ARNHEITER H., GRESSER I., LINDENMANN J. 1979. Genetically determined, interferon dependent resistance to influenza virus in mice. *J. Exp. Med.*, 149, 601-612
169. AEBI M., FÄH J., HURT N., SAMUEL C.E., THOMIS D., BAZZIGER L., PAVLOVIC J., HALLER O., STAEHELI P. 1989. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol.Cell.Biol.*, 9, 5062-5072
170. BAZZIGHER L., PAVLOVIC J., HALLER O., STAEHELI P. 1992. Mx genes show weaker primary response to virus than other interferon-regulated genes. *Virology*, 186, 154-160

171. STAEHELI P., HORISBERGER M.A., HALLER O. 1984. Mx-dependent resistance to influenza viruses is induced by mouse interferons alpha and beta but not gamma. *Virology*, 132, 456-461

172. STAEHELI P., DANIELSON P., HALLER O., SUTCLIFF J.G. 1986. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 4770-4774

173. STAEHELI P., DANIELSON P., HALLER O., SUTCLIFF J.G. 1986. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 4770-4774

174. FÄH J., PAVLOVIC J., BURG G. 1995. Expression of MxA protein in inflammatory dermatoses. *J. Histochem. Cytochem.*, 43, 47-52

175. JAKSCHIES S., HOCHKEPPEL H.K., HORISBERGER M.A., DEICHER H., VON WUSSOW P. 1990. Emergence and decay of the human Mx homolog in cancer patients during and after interferon- α therapy. *J. Biol. Response Modifiers*, 9, 305-312

176. LINDENMANN J. 1962. Resistance of mice to mouse adapted influenza A virus. *Virology*, 16, 203-204

177. LINDENMANN J. 1964. Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 116, 506-509

178. STAEHELI P., COLONNO R.J., CHENG Y-S. E. 1983. Different mRNAs induced by interferon in cells from inbred mouse strains A/J and A2G

179. HALLER O., ACKLIN M., STAEHELI P. 1986. Genetic resistance to influenza virus in wild mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 127, 331-337

180. HALLER O., ACKLIN M., STAEHELI P. 1987. Influenza virus resistance of wild mice: wild-type and mutant Mx alleles occur at comparable frequencies. *J. Interferon Res.*, 7, 647-656

181. STAEHELI P., GROB R., MEIER E., SUTCLIFFE J.G., HALLER O. 1988. Influenza virus susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol.Cell.Biol.*, 8, 4518-4523
182. STAEHELI P., DANIELSON P., HALLER O., SUTCLIFFE J.G. 1986. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol.Cell. Biol.*, 6, 4770-4774
183. STAEHELI P., HALLER O., BOLL W., LINDENMANN J., WEISSMANN C. 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, 44, 147-158
184. STAEHELI P., PRAVTCHEVA D., LUNDIN L.G., ACKLIN M., RUDDLE F., LINDENMANN J., HALLER O. 1986. Interferon regulated influenza virus resistance gene Mx is located on mouse chromosome 16. *J.Virol.*, 58, 967-969
185. STAEHELI P., PRAVTCHEVA D., LUNDIN L.G., ACKLIN M., RUDDLE F., LINDENMANN J., HALLER O. 1986. Interferon regulated influenza virus resistance gene Mx is located on mouse chromosome 16. *J.Virol.*, 58, 967-969
186. REEVES R.H., O'HARA B.F., PAVAN W.J., GEARHART J.D., HALLER O. 1988. Genetic mapping of the *Mx* influenza virus resistance gene within the region of mouse chromosome 16 that is homologous to human chromosome 21. *J.Virol.*, 67, 4372-4375
187. HUG H., COSTAS C., STAEHELI P., AEBI M., WEISSMANN C. 1988. Organization of the murine *Mx* gene and characterization of its interferon-and virus –inducible promoter. *Molecular and cellular Biology*, 3065-3079

188. DREIDING P., STAEHELI P., HALLER O. 1985. Interferon-induced protein Mx accumulates in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses. *Virology*, 140, 192-196
189. HORISBERGER M.A., STAEHELI P., HALLER O. 1983. Interferon-induced a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*, 80, 1910-1914
190. CHELBI-ALIX M.K., PELICANO L., QUIGNON F., KOKEN M.H., VENTURINI L., STADLER M., PAVLOVIC J., DEGOS L., de THÉ H. 1995. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia*, 9, 2027-2033
191. TROST M., KOCHS G., HALLER O. 2000. Characterization of a novel serine/threonine kinase associated with nuclear bodies. *J Biol Chem*, 275, 7373-7377
192. ENGELHARDT O.G., ULLRICH E., KOCHS G., HALLER O. 2001. Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Exp Cell Res*, 271, 286-295
193. HODGES M., TISSOT C., HOWE K., GRIMWADE D., FREEMONT P.S. 1998. Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am. J. Hum. Genet.*, 63, 297-304
194. MATERA A.G. 1999. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* 9, 302-309
195. Maul G.G., Negorev D., Bell P., Ishov A.M. 2000. Review: Properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J.Struct.Biol.*, 129, 278-287

196. SEELER J.S., DEJEAN A. 1999. The nuclear bodies: actors or extras? *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 9, 362-367
197. STERNSDORF T., GROTZINGER T., JENSEN K., WILL H. 1997. Nuclear dots: Actors on many stages. *Immunobiology*, 198, 307-331
198. ENGELHARDT O.G., ULLRICH E., KOCHS G., HALLER O. 2001. Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic Leukemia protein nuclear bodies. *Experimental Cell Research*, 271, 286-295
199. HUG H., COSTAS C., STAEHELI P., AEBI M., WEISSMANN C. 1988. Organization of the murine *Mx* gene and characterization of its interferon-and virus –inductible promoter. *Molecular and cellular Biology*, 3065-3079
200. HUG H., COSTAS C., STAEHELI P., AEBI M., WEISSMANN C. 1988. Organization of the murine *Mx* gene and characterization of its interferon-and virus –inductible promoter. *Molecular and cellular Biology*, 3065-3079
201. HUG H., COSTAS C., STAEHELI P., AEBI M., WEISSMANN C. 1988. Organization of the murine *Mx* gene and characterization of its interferon-and virus –inductible promoter. *Molecular and cellular Biology*, 3065-3079
202. JIN H.K., TAKADA A., KON Y., HALLER O., WATANABE T. 1999. Identification of the murine Mx2 gene: interferon-induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 73, 4925-4930

203. ASANO A., JIN H.K., WATANABE T. 2003. Mouse *Mx2* gene: organization, mRNA expression and the role of interferon-response promoter in its regulation. *Gene*, 306, 105-113
204. AEBI M., FÄH J., HURT N., SAMUEL C.E., THOMIS D., BAZZIGHER L., PAVLOVIC J., HALLER O., STAEHELI P. 1989. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human MX proteins. *Molecular and cellular biology*, 9, 5062-5072
205. HORISBERGER M.A., WATHELET M., SZPIRER J., SZPIRER C., ISLAM Q., LEVAN G., HUEZ G., CONTENT J. 1988. cDNA cloning and assignment to chromosome 21 of IFI-78K gene, the human equivalent of murine *Mx* gene. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 14, 123-131
206. RAZIUDDIN A., SARKAR F.H., DUTKOWSKI R., SHULMAN L., RUDDLE F.H., GUPA S.L. 1984. Receptors for human α and β interferon but not gamma interferon are specified by human chromosome 21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5504-5508
207. GOETSCHY J-F., ZELLER H., CONTENT J., MORISBERGER M.A. Regulation of the interferon-inductible IFI-78K gene, the human equivalent of the murine MX gene, by interferons, double-stranded RNA, certain cytokines, and viruses. 1989. *J.Virol.*, 63, 2616-2622
208. MELEN K., KESKINEN P., RONNI T., SARENEV T., LOUNATMAN K., JULKUNEN I. 1996. Human MxB protein, an Interferon- α -inductible GTPase, contains a nuclear targeting signal and is localized in the heterochromatin region beneath the nuclear envelope. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 38, 23478-23486
209. KOZAK M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 15, 8125-8148

210. HORISBERGER M.A. 1992. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *Journal of Virology*, 4705-4709

211. HORISBERGER M.A. 1992. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *Journal of Virology*, 4705-4709

212. ACCOLA M.A., HUANG B., MASRI A.A., McNIVEN M.A. 2002. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 21829-21835

213. KOCHS G., REICHELT M., DANINO D., HINSHAW J.E., HALLER O. 2005. Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. *Methods Enzymol*, 404, 632-643

214. STERTZ S., REICHELT M., KRIJNSE-LOCKER J., MACKENZIE J., SIMPSON J.C., HALLER O., KOCHS G. 2006. Interferon-induced, antiviral human MxA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum. *Journal of interferon and cytokine research*, 26, 650-660

215. STERTZ S., REICHELT M., KRIJNSE-LOCKER J., MACKENZIE J., SIMPSON J.C., HALLER O., KOCHS G. 2006. Interferon-induced, antiviral human MxA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum. *Journal of interferon and cytokine research*, 26, 650-660

216. CHANG K.C. HANSEN E., FRONI L., LIDA J., GOLDSPINK G. 1991. Molecular and functional analysis of the virus- and interferon-inductible human MxA promoter. *Arch Virol*, 117, 1-15

217. HORISBERGER M.A., McMASTER G.K., ZELLER H., WATHELET M.G., DELLIS J., CONTENT J. 1990. Cloning and sequence analysis of cDNA for interferon- and virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-

binding sites: functional study of the corresponding gene promoter. *J.Virol.*64, 1171-1181

218. CHANG K.C., HANSEN E., FORINI L., LIDA J., GOLDSPINK G. 1991. Molecular and functional analysis of the virus- and interferon-inducible human MxA promoter. *Arch.Virol.*117, 1-15

219. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778

220. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778

221. NAKADE K., HONDA H., NAGATA K. Promoter structure of the MxA gene that confers resistance to influenza virus. 1997. *FEBS Lett*, 418, 315-318

222. HIJIKATA M., MISHIRO S., MIYAMOTO C., FURUICHI Y., HASHIMOTO M., OHTA Y. Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analysing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro. 2001. *Intervirology*, 44, 379-382

223. CHANG K.C. HANSEN E., FRONI L., LIDA J., GOLDSPINK G. 1991. Molecular and functional analysis of the virus- and interferon-inductible human MxA promoter. *Arch Virol*, 117, 1-15

224. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLIS J., VAN EYLEN F., GOETCHY J.F., HORISBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promotor analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res*, 18, 773-781

225. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLIS J., VAN EYLEN F., GOETCHY J.F., HORISBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promotor analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res*, 18, 773-781

226. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLIS J., VAN EYLEN F., GOETCHY J.F., HORISBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promotor analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res*, 18, 773-781

227. HORISBERGER M.A. 1988. The action of recombinant bovine interferons on influenza virus replication correlates with the induction of two Mx-related proteins in bovine cells. *Virology*, 162, 181-186

228. HORISBERGER M.A., GUNST M.C. 1991. Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology*, 180, 185-190

229. ELLINWOOD N.M., BERRYERE T.G., FOURNIER B.P., BOWEN R.A., BUCHANAN F.C., SCHMUTZ S.M. 1999. MX1 maps to cattle chromosome 1. *Anim.Genet.*, 30, 164-165

230. ELLINWOOD N.M., McCUE J.M., GORDY P.W., BOWEN R.A. 1998. Cloning and characterization of cDNAs for bovine (*bos taurus*) Mx protein. *J. Interferon Cytokine Res.*, 18, 745-755
231. GERARDIN J. A.-G., BAISE E.A., PIRE G.A., LEROY M.P.P., DESMECHT D. J.-M. 2003. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene*, 326, 67-75
232. CHANG K.C., HANSEN E., FRONI L., LIDA J., GOLDSPINK G. 1991. Molecular and functional analysis of the virus-and interferon-inducible human MxA promoter. *Arch. Virol.*, 117, 1-15
233. HUG H., COSTAS M., STAEHELI P., AEBI M., WEISSMANN C. 1988. Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon-and virus inducible promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 3065-3079
234. REID L.E., BRASNETT A.H., GILBERT C.S., PORTER A.C., GEWERT D.R., STARK G.R., KERR I.M. 1989. A single DNA response element can confer inducibility by both alpha-and gamma-interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 840-844
235. GERARDIN J. A.-G., BAISE E.A., PIRE G.A., LEROY M.P.P., DESMECHT D. J.-M. 2003. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene*, 326, 67-75
236. BABIKER H.A.E., NAKATSU Y., YAMADA K., YONEDDA A., TAKADA A., UEDA J., HATA H., WATANABE T. 2007. Bovine and water buffalo Mx2 genes: polymorphism and antiviral activity

237. MÜLLER M., WINNACKER E.L., BREM G. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: New members of a family of interferon-inductible proteins with homology to GTP-binding proteins. *J. Interferon Res.* 12, 119
238. STAEHELI P., HALLER O., BOLL W., LINDENMANN J., WEISSMANN C. 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, 44, 147-158
239. MÜLLER M., WINNACKER E.-L., BREM G. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *Journal of interferon research*, 12, 119-129
240. MÜLLER M., WINNACKER E.-L., BREM G. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *Journal of interferon research*, 12, 119-129
241. THOMAS A.V., PALM M., BROERS A.D., ZEZAFOUN H., DESMECHT D.J.-M. 2006. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics*, 58, 383-389
242. BRAWERMAN G. 1989. mRNA decay: Finding the right targets. *Cell*, 57, 9-10
243. THOMAS A.V., PALM M., BROERS A.D., ZEZAFOUN H., DESMECHT D.J.-M. 2006. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics*, 58, 383-389
244. MÜLLER M., WINNACKER E.-L., BREM G. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *Journal of interferon research*, 12, 119-129

245. MOROZUMI T., NAITO T., LAN P.D., NAKAJIMA E., MITSUHASHI T., MIKAWA S., HAYASHI T., AWATA T., UENISHI H., NAGATA K., WATANABE T., HAMASIMA N. 2009. Molecular cloning and characterization of porcine Mx2 gene. *Mol Immunol.*, 46, 858-65
246. THOMAS A.V., PALM M., BROERS A.D., ZEZAFOUN H., DESMECHT D.J.-M. 2006. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics*, 58, 383-389
247. THOMAS A.V., PALM M., BROERS A.D., ZEZAFOUN H., DESMECHT D.J.-M. 2006. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics*, 58, 383-389
248. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778
249. RONNI T., MATIKAINEN S., LEHTONEN A., PALVIMO J., DELLILS J., VAN EYLEN F., GOETSCHY J-F., HORSIBERGER M.A., CONTENT J., JULKUNEN I. 1998. The proximal interferon stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *Journal of Interferon and Cytokine research*, 18, 773-778
250. ASANO A., JIN H.K., WATANABE T. 2003. Mouse *Mx2* gene: organization, mRNA expression and the role of interferon-response promoter in its regulation. *Gene*, 306, 105-113

251. THOMAS A.V., PALM M., BROERS A.D., ZEZAFOUN H., DESMECHT D.J.-M. 2006. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics*, 58, 383-389
252. GUTTMACHER A.E., COLLINS F.S. 2002. Genomic medicine: a primer. *N. Engl. J. Med.*, 347, 1512-1520
253. HALLER O. 1981. Inborn resistance of mice to orthomyxoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 92, 25-52
254. STAEHELI P., HALLER O. 1987. Interferon-induced Mx protein: a mediator of cellular resistance to influenza virus. *Interferon*, 8, 1-23
255. STAEHELI P., GROB R., MEIER E., SUTCLIFFE G., HALLER O. 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Molecular and cellular biology*, 8, 4518-4523
256. STAEHELI P., HALLER O., BOLL W., LINDENMANN J., WEISSMANN C. 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx CDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, 44, 147-158
257. STAEHELI P., DANIELSON P., HALLER O., SUTCLIFFE J.G. 1986. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol. Cell Biol.*, 6, 4770-4774
258. STAEHELI P., HALLER O., BOLL W., LINDENMANN J., WEISSMANN C. 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx CDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, 44, 147-158

259. DREIDING P., STAEHELI P., HALLER O., 1985. Interferon induced protein Mx accumulates in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses. *Virology*, 140, 192-196
260. HORISBERGER M.A., STAEHELI P., HALLER O. 1983. Interferon induced a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1910-1914
261. STAEHELI P., DREIDING P., HALLER O., LINDENMANN J. 1985. Polyclonal and monoclonal antibodies to the interferon-inducible protein Mx of influenza virus-resistant mice. *J. Biol. Chem.*, 260, 1821-1825
262. STAEHELI P., HORISBERGER M.A., HALLER O. 1984. Mx-dependent resistance to influenza virus is induced by mouse interferons α and β but not γ . *Virology*, 132, 456-461
263. STAEHELI P., HALLER O., BOLL W., LINDENMANN J., WEISSMANN C. 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx CDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, 44, 147-158
264. STAEHELI P., GROB R., MEIER E., SUTCLIFFE G., HALLER O. 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Molecular and cellular biology*, 8, 4518-4523
265. STAEHELI P., GROB R., MEIER E., SUTCLIFFE G., HALLER O. 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Molecular and cellular biology*, 8, 4518-4523

266. HALLER O., ACKLIN M., STAEHELI P. 1987. Influenza virus resistance of wild mice: wild type and mutant Mx alleles occur at comparable frequencies. *J. Interferon Res.* 7, 647-656
267. STAEHELI P., GROB R., MEIER E., SUTCLIFFE G., HALLER O. 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Molecular and cellular biology*, 8, 4518-4523
268. STAEHELI P., GROB R., MEIER E., SUTCLIFFE G., HALLER O. 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Molecular and cellular biology*, 8, 4518-4523
269. STAEHELI P., GROB R., MEIER E., SUTCLIFFE G., HALLER O. 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Molecular and cellular biology*, 8, 4518-4523
270. ABUJIANG P., YAMADA Y., HALLER O., KOBAYASHI H., KAMOTO T., LU L.M., OGAWA M., ISHIMOTO A., KATOH H., KANEHIRA K., IKEGAMI S., FUKUMOTO M., HIAI H. 1996. The origin of the SL family mice. *Lab. Anim. Sci.*, 46, 410-417
271. HALLER O., ACKLIN M., STAEHELI P. 1986. Genetic resistance to influenza virus in wild mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 127, 331-337
272. LINDENMANN J., KLEIN P. 1996. Further studies on the resistance of mice to myxoviruses. *Arch. Virol.*, 19, 1
273. STAEHELI P., SUTCLIFF G. 1988. Identification of a second interferon-regulated murine Mx gene. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 4524-4528

274. JIN H.-K., TAKADA A., KON Y., HALLER O., WATANABE T. 1999. Identification of the murine Mx2 gene: Interferon-induced expression of the Mx2 protein from feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus. *J.Virol.*, 73, 4925-4930

275. JIN H.-K., TAKADA A., KON Y., HALLER O., WATANABE T. 1999. Identification of the murine Mx2 gene: Interferon-induced expression of the Mx2 protein from feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus. *J.Virol.*, 73, 4925-4930

276. ZÜRCHER T., PAVLOVIC J., STAEHELI P. 1992. Mouse MX2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology*, 187, 796-800

277. JIN H.-K., YOSHIMATASU K., TAKADA A., OGINA M., ASANO A., ARIKAWA J., WATANABE T. 2001. Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication. *Arch.Virol.*, 146, 41-49

278. ELLINWOOD M.W., McCUE J.M., GORDY P.W., BOWEN R.A. 1988. Cloning and characterization of the cDNAs for a bovine (*Bos taurus*) Mx protein. *JOURNAL OF Interferon and Cytokine Research*, 18, 745-755

279. ELLINWOOD M.W., McCUE J.M., GORDY P.W., BOWEN R.A. 1988. Cloning and characterization of the cDNAs for a bovine (*Bos taurus*) Mx protein. *JOURNAL OF Interferon and Cytokine Research*, 18, 745-755

280. NAKATSU Y., YAMADA K., UEDA J., ONOGI A., ABLES G.P., NISHIBORI M., HATA H., TAKADA A., SAWAI K., TANABE Y., MORITA M., DAIKOHARA M., WATANABE T. Genetic polymorphisms and the antiviral activity in the bovine MX1 gene. 2004. *Animal Genetics*, 35, 182-187

281. BAISE E., PIRE G., LEROY M., GORIS N., De CLERCQ K., KERKHOFS P., DESMECHT D. 2004. Conditional expressing of type I interferon-induced bovine Mx1

GTPase in a stable transgenic vero cell line interferes with replication of the vesicular stomatitis virus. *J. Interferon Cytokine Res.*, 24, 513-51

282. BABIKER H.A.E., NAKATSU Y., YAMADA K., YONEDA A., TAKADA A., UEDA J., HATA H., WATANABE T. 2007. Bovine and water buffalo Mx2 genes: polymorphism and antiviral activity. *Immunogenetics*, 59, 59-67

283. BABIKER H.A.E., NAKATSU Y., YAMADA K., YONEDA A., TAKADA A., UEDA J., HATA H., WATANABE T. 2007. Bovine and water buffalo Mx2 genes: polymorphism and antiviral activity. *Immunogenetics*, 59, 59-67

284. BABIKER H.A.E., NAKATSU Y., YAMADA K., YONEDA A., TAKADA A., UEDA J., HATA H., WATANABE T. 2007. Bovine and water buffalo Mx2 genes: polymorphism and antiviral activity. *Immunogenetics*, 59, 59-67

285. BABIKER H.A.E., NAKATSU Y., YAMADA K., YONEDA A., TAKADA A., UEDA J., HATA H., WATANABE T. 2007. Bovine and water buffalo Mx2 genes: polymorphism and antiviral activity. *Immunogenetics*, 59, 59-67

286. BERNASCONI D., SCHULTZ U., STAEHELI P. 1995. The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity. *J. Interferon Res.*, 15, 47-53

287. BENFIELD C.T., LYALL J.W., KOCHS G., TILEY L.S. 2008. Asparagine 631 Variants of the Chicken Mx Protein Do Not Inhibit Influenza Virus Replication in Primary Chicken Embryo Fibroblasts or In Vitro Surrogate. *J. Virol.*, 82, 7533-7539

288. KO J.-H., JIN H.-K., ASANO A., TAKADA A., NINOMIYA A., KIDA H., HOKIYAMA H., OHARA M., TSUZUKI M., NISHIBORI M., MIZUTANI M., WATANABE T. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. 2002. *Genome Research*, 12, 595-601

289. KO J.-H., JIN H—K., ASANO A., TAKADA A., NINOMIYA A., KIDA H., HOKIYAMA H., OHARA M., TSUZUKI M., NISHIBORI M., MIZUTANI M., WATANABE T. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. 2002. *Genome Research*, 12, 595-601
290. LI X.Y., QU L.J., YAO J.F., YANG N. Skewed allele frequencies of an Mx gene mutation with potential resistance to avian influenza virus in different chicken populations. Rapid communication. 2006. *Poultry science*, 85, 1327-1329
291. LI X.Y., QU L.J., YAO J.F., YANG N. Skewed allele frequencies of an Mx gene mutation with potential resistance to avian influenza virus in different chicken populations. Rapid communication. 2006. *Poultry science*, 85, 1327-1329
292. MÜLLER M., WINNACKER E.L., BREM G. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: New members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *J. Interferon Res.* 12, 119
293. MOROZUMI T., SUMANTRI C., NAKAJIMA E., KOBAYASHI E., ASANO A., OISHI T., MITSUHASHI T., WATANABE T., HAMASIMA N. 2001. Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene. *Biochem Genet*, 39, 251-260
294. ASANO A., KO J.-H., MOROZUMI T., HAMASHIMA N., WATANABE T. 2002. Polymorphisms and the antiviral property of porcine Mx1 protein. *J.Vet.Med.Sci.*, 64, 1085-1089
295. PALM M., LEROY M., THOMAS A., LINDEN A., DESMECHT D. 2007. Differential anti-influenza activity among allelic variants at the *Sus Scrofa* Mx1 locus. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 27, 147-156

296. HINSHAW J.E., SCHMID D.L. 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, 374, 190-192
297. JATIANI S.S., MITTAL R. 2004. Expression of the antiviral protein MxA in cells transiently perturbs endocytosis. *Biochem Biophys Res Comm.*, 323, 190-192
298. KOCHS G., HALLER O. 1999. Interferon-induced human MXA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 2082-2086
299. STERTZ S., REICHEL T. M., KRIJNSE-LOCKER J., MACKENZIE J., SIMPSON J.C., HALLER O., KOCHS G. 2006. Interferon-induced, antiviral human MXA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum
300. JATIANI S.S., MITTAL R. 2004. Expression of the antiviral protein MXA in cells transiently perturbs endocytosis. *Biochem Biophys Res Comm.*, 323, 190-192
301. HINSHAW J.E., SCHMID D.L. 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, 374, 190-192
302. CARR J.F., HINSHAW J.E. 1997. Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and gamma-phosphate analogues. *J.Biol.Chem.*, 272, 28030-28035
303. McNIVEN M.A. Dynamin: a molecular motor with purchase action. 1998. *Cell*, 94, 151-154
304. HINSHAW J.E. Dynamin spirals 1999. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 9, 260-267

305. SWEITZER S.M., HINSHAW J.E. 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, 93, 1021-1029
306. TAKEI K., HAUCKE V., SLEPNEV V., FARSAFAD K., SALAZA M., CHEN H. DE CAMILLI P. 1998. Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell* 94, 131-141
307. DI PAOLO C., HEFTI H.P., MELI M., LANDIS H., PAVLOVIC J. 1999. Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization. *J.Biol.Chem*, 274, 32071-32078
308. MELEN K., RONNI T., BRONI B., KRUG R.M., VON BONSDORFF C.H., JULKUNEN I. Interferon-induced Mx proteins forms oligomers and contain a putative leucine zipper. 1992. *J.Biol.Chem.*, 25898-25907
309. PONTEN A., SICK C., WEEBER M., HALLER O., KOCHS G. Dominant negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. 1997. *J.Virol.*, 71, 2591-2599
310. SCHUMACHER B., STAEHELI P. Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MXA GTPase. 1998. *J.Biol Chem.*, 273, 28365-28370
311. WEITZ G., BEKISZ J., ZOON K., ARNHEITER H. Purification and characterization of human Mx proteins. 1989. *J. Interferon Res.* 9, 679-689
312. ACCOLA M.A., HUANG B., MASRI A.A., McNIVEN M.A. 2002. The antiviral dynamin family member, MXA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 277, 21829-21835

313. STERTZ S., REICHELT M., KRIJNSE-LOCKER J., MACKENZIE J., SIMPSON J.C., HALLER O., KOCHS G. 2006. Interferon-induced, antiviral human MXA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum

314. DI PAOLO C., HEFTI H.P., MELI M., LANDIS H., PAVLOVIC J. 1999. Intramolecular backfolding of the carboxy-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization. *J.Biol.Chem*, 274, 32071-32078

315. JANZEN C., KOCHS G., HALLER O. A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. 2000. *J.Virol.*, 74, 8202-8206

316. ACCOLA M.A., HUANG B., MASRI A.A., McNIVEN M.A. 2002. The antiviral dynamin family member, MXA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 277, 21829-21835

317. REICHELT M., STERTZ S., KRIJNSE-LOCKER J., HALLER O., KOCHS G. 2004. Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic*, 5, 772-784

318. STERTZ S., REICHELT M., KRIJNSE-LOCKER J., MACKENZIE J., SIMPSON J.C., HALLER O., KOCHS G. 2006. Interferon-induced, antiviral human MXA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum

319. STEEGMAIER M., OORSCHOT V., KLUMPERMAN J., SCHELLER R.H. 2000. Syntaxin 17 is abundant in steroidogenic cells and implicated in smooth endoplasmic reticulum membrane dynamics. *Mol. Biol. Cell*, 11, 2719-2731

320. ACCOLA M.A., HUANG B., MASRI A.A., McNIVEN M.A. 2002. The antiviral dynamin family member, MXA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 277, 21829-21835

321. STERTZ S., REICHEL T M., KRIJNSE-LOCKER J., MACKENZIE J., SIMPSON J.C., HALLER O., KOCHS G. 2006. Interferon-induced, antiviral human MXA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum

322. STERTZ S., REICHEL T M., KRIJNSE-LOCKER J., MACKENZIE J., SIMPSON J.C., HALLER O., KOCHS G. 2006. Interferon-induced, antiviral human MXA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum

323. ACCOLA M.A., HUANG B., MASRI A.A., McNIVEN M.A. 2002. The antiviral dynamin family member, MXA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 277, 21829-21835

324. SWEITZER S.M., INSHAW J.E. 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, 93, 1021-1029

325. TAKEI K., SLEPNEV V.I., HAUCKE V., DECAMILLI P. 1999. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.*, 1, 8-9

326. ACCOLA M.A., HUANG B., MASRI A.A., McNIVEN M.A. 2002. The antiviral dynamin family member, MXA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 277, 21829-21835

327. STERTZ S., REICHEL T M., KRIJNSE-LOCKER J., MACKENZIE J., SIMPSON J.C., HALLER O., KOCHS G. 2006. Interferon-induced, antiviral human MXA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum

328. BIRNBAUMER L., BOULAY G., BROWN D., JIANG M., DIETRICH A., MIKOSHIBA K., ZHU X., QIN N. 2000. Mechanism of capacitative Ca^{2+} entry (CCE): interaction between IP3 receptor and TRP links the internal calcium storage compartment to plasma membrane CCE channels. *Recent Prog. Horm. Res.* 55, 127-161

329. VENNEKENS R., VOETS T., BINDELS R.J., DROOGMANS G., NILIUS B. 2002. Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium*, 31, 253-264

330. LUSSIER M.P., CAYOUCETTE S., LEPAGE P.K., BERNIER C., FRANCOEUR N., St-HILAIRE M., PINARD M., BOULAY G. 2005. MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *The Journal of biological chemistry*, 280, 19393-19400

331. LUSSIER M.P., CAYOUCETTE S., LEPAGE P.K., BERNIER C.L., FRANCOEUR N., St-HILAIRE M., PINARD M., BOULAY G. 2005. MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 19393-19400

332. VASQUEZ G., WEDEL B.J., AZIZ O., TREBAK M., PUTNEY J.W.Jr. The mammalian TRPC cation channels. 2004. *Biochim. Biophys. Acta*, 1742, 21-36

333. LUSSIER M.P., CAYOUCETTE S., LEPAGE P.K., BERNIER C.L., FRANCOEUR N., St-HILAIRE M., PINARD M., BOULAY G. 2005. MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 19393-19400

334. LUSSIER M.P., CAYOUCETTE S., LEPAGE P.K., BERNIER C., FRANCOEUR N., St-HILAIRE M., PINARD M., BOULAY G. 2005. MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *The Journal of biological chemistry*, 280, 19393-19400

335. LUSSIER M.P., CAYOUILLE S., LEPAGE P.K., BERNIER C.L., FRANCOEUR N., St-HILAIRE M., PINARD M., BOULAY G. 2005. MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 19393-19400
336. MUSHINSKI J.F., NGUYEN P., STEVENS L.M., KHANNA C., LEE S., CHUNG E.J., LEE M.J., KIM Y.S., LINEHAN W.M., HORISBERGER M.A., TREPEL J.B. 2009. Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA. *J Biol Chem.*, 284, 15206-14
337. KOCHS G., HALLER O. 1999. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J. Biol.Chem*, 274, 4370-4376
338. HALLER O., KOCHS G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. 2002. *Traffic*, 3, 710-717
339. STAEHELI P., PITOSI F., PAVLOVIC J. 1993. Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends Cell Biol. Aug.*, 3, 268-272
340. JOHANNES L., ARNHEITER H., MEIER E. 1993. Switch in antiviral specificity of a GTPase upon translocation from the cytoplasm to the nucleus. *J.Virol.*, 67, 1653-1657
341. MEIER E., KUNZ G., HALLER O., ARNHEITER H. 1990. Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J.Virol.*, 64, 6263-6269
342. SCHNEIDER-SCHAULIES S., SCHNEIDER-SCHAULIES J., SCHUSTER A., BAYER M., PAVLOVIC J., ter MEULEN V. 1994. Cell-type-specific MxA-mediated –mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J.Virol.*, 68, 6910-6917

343. LANDIS H., SIMON-JODICKE A., KLOTI A., DI PAOLO C., SCHNORR J.J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HEFTI H.P., PAVLOVIC J. 1998. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J Virol.*, 72, 1516-1522
344. PAVLOVIC J., ZÜRCHER T., HALLER O., STAEHELI P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J.Virol.*, 64, 3370-3375
345. HALLER O., FRESE M., ROST D., NUTTALL P., KOCHS G. 1995. Tick-born thogoto virus infection in mice is inhibited by the Orthomyxovirus resistance gene product Mx1. *J.Virol.*, 69, 2596-2601
346. FRESE M., WEEBER M., WEBER F., SPETH V., HALLER O. 1997. Mx1 sensitivity: Batken virus is an orthomyxovirus closely related to Dhori virus. *J Gen Virol*, 78, 2453-2458
347. SCHWEMMLE M., WEINING K., RICHTER M., SCHUMACHER B., STAEHELI P. 1995. Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein. *Virology*, 206, 545-554
348. PAVLOVIC J., ZÜRCHER T. HALLER O., STAEHELI P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J Virol.*, 64, 3370-3375
349. SCHNORR J.J., SCHNEIDER_SCHAULIES S., SIMON-JODICKE A., PAVLOVIC J., HORISBERGER M.A., ter MEULEN V. 1993. MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J.Virol.*, 67, 4760-4768

350. SCHNEIDER-SCHAULIES S., SCHNEIDER-SCHAULIES J., SCHUSTER A., BAYER M., PAVLOVIC J., ter MEULEN V. 1993. Cell-type specific MxA mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol.*, 68, 6910-6917
351. ZHAO H., DE B.P., DAS T., BANERJEE A.K. 1996. Inhibition of human parainfluenza virus -3 replication by interferon and human MxA. *Virology*, 220, 330-338
352. HEFTI H.P., FRESE M., LANDIS H., DI PAOLO C., AGUZZI A., HALLER O., PAVLOVIC J. 1999. Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against LaCrosse virus and other lethal viral infections. *J.Virol.*, 73, 6984-6991
353. FRESE M., KOCHS G., FELDMANN H., HERTKORN C., HALLER O. 1996. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J.Virol.*, 70, 915-923
354. KANERVA M., MELEN K., VAHERI A., JULKUNEN I. 1996. Inhibition of puumal and tula hantaviruses in Vero cells by MxA protein. *Virology*, 224, 55-62
355. KOCHS G., JANZEN C., HOHENBERG H., HALLER O. 2002. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 3153-3158
356. ANDERSSON I.,BLADH L., MOUSAVI JAZI M., MAGNUSSON K., LUNDKVIST A., HALLER O., MAIRAZIMI A. 2004. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*, 78, 4323-4329

357. BRIDGEN A., DALRYMPLE D., WEBER F., ELLIOT R. 2004. Inhibition of Dugbe nairovirus replication by human MxA protein. *Virus Res.*, 99, 47-50
358. HEFTI H.P., FRESE M., LANDIS H., DI PAOLO C., AGUZZI A., HALLER O., PAVLOVIC J. 1999. Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against LaCrosse virus and other lethal viral infections. *J. Virol.*, 73, 6984-6991
359. LANDIS H., SIMON-JODICKE A., KLOTI A., DI PAOLO C., SCHNORR J.J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HEFTI H.P., PAVLOVIC J. 1998. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J Virol.*, 72, 1516-1522
360. CHIEUX V., CHEDHADEH W., HARVEY J., HALLER O., WATTRE P., HOBER D. 2001. Inhibition of Coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein. *Virology*, 283, 84-92
361. GORDIEN E., ROSMORDUC O., PELTEKIAN C., GARREAU F., BRECHOT C., KREMSDORF D. 2001. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J Virol.*, 75, 2684-2691
362. LARSEN R., ROKENES T., ROBERTSEN B. 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *J Virol.*, 78, 7938-7944
363. LINDENMANN J. 1962. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology*, 16, 203-204

364. THIMME R., FRESE M., KOCHS G., HALLER O. 1995. Mx1 but not MxA confers resistance against tick-borne Dhori virus in mice. *Virology*, 211, 296-301
365. FRESE M., WEEBER M., WEBER F., SPETH V., HALLER O. 1997. MX1 Sensitivity: Batken virus is an orthomyxovirus closely related to Dhori viurs. *J Gen Virol.* 78, 2453-2458
366. JIN H., TAKADA A., KON Y., HALLER O., WATANABE T. 1999. Identification of the murine Mx2 gene: interferon-induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus and Hantaanvirus. *J. Virol.*, 73, 4925-4930
367. ZÜRCHER T., PAVLOVIC J., STAHELI P.1992. Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology* 187, 796-800
368. JIN H.K., YOSHIMATSU K., TAKADA A., OGINO M., ASANO A., ARIKAWA J., WATANABE T. 2001. Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication. *Arch Virol*, 146, 41-49
369. ARNHEITER H., HALLER O.1988. Antiviral state against influenza virus neutralized by microinjection of antibodies to interferon-induced Mx proteins. *EMBO J.*, 7, 1315-1320
370. SANDROCK M., FRESE M., HALLER O., KOCHS G. 2001. Interferon-induced rat Mx proteins confer resistance to Rift Valley fever virus and other arthropode-borne viruses. *J Interferon Cytokine Res.*, 21, 663-668
371. MEIER E., KUNZ G., HALLER O., ARNHEITER H. Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. 1990. *J Virol.*, 64, 6263-6269

372. SANDROCK M., FRESE M., HALLER O., KOCHS G. 2001. Interferon-induced rat Mx proteins confer resistance to Rift Valley fever virus and other arthropode-borne viruses. *J Interferon Cytokine Res.*, 21, 663-668
373. PAVLOVIC J., ZÜRCHER T, HALLER O. STAEHELI P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MXA protein. *J Virol*, 64, 3370-33375
374. PAVLOVIC J., ZÜRCHER T, HALLER O. STAEHELI P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MXA protein. *J Virol*, 64, 3370-33375
375. FRESE M., KOCHS G., MEIER-DIETER U., SIEBLER J., HALLER O. 1995. Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus. *J Virol.*, 69, 3904-3903
376. FRESE M., KOCHS G., MEIER-DIETER U., SIEBLER J., HALLER O. 1995. Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus. *J Virol.*, 69, 3904-3903
377. MARSCHALL M., ZACH A., HECHTFISCHER A., FOERST G., MEIER-EWERT H., HALLER O. 2000. Inhibition of influenza C viruses by human MxA protein. *Virus Res*, 67, 179-188
378. SCHWEMMLE M., WEINING K., RICHTER M., SCHUMACHER B., STAEHELI P. 1995. Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein. *Virology*, 206, 545-554
379. SCHNORR J.J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., SIMON-JODICKE A., PAVLOVIC J., HORISBERGER M.A., ter MEULEN V. 1993. MxA-dependent inhibition of measles virus

glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol.*, 67, 4760-4768

380. STAHELI P., PAVLOVIC J. 1991. Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MxA protein. *J Virol.*, 65, 4498-4501

381. FRESE M., KOCHS G., FELDMANN H., HERTKORN C., HALLER O. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol*, 1996, 70, 915-923

382. MIURA T.A., CARLSON J.O., BEATY B.J., BOWEN R.A., OLSON K.E. 2001. Expression of human MxA protein in mosquito cell interferes with LaCrosse virus replication

383. FRESE M., KOCHS G., FELDMANN H., HERTKORN C., HALLER O. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol*, 1996, 70, 915-923

384. KANERVA M., MELEN K., VAHERI A., JULKUNEN I. Inhibition of puumala and tula hantaviruses in Vero cells by MxA protein. *Virology*, 1996, 224, 55-62

385. FRESE M., KOCHS G., FELDMANN H., HERTKORN C., HALLER O. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol*, 1996, 70, 915-923

386. BRIDGEN A., DALRYMPLE D., WEBER F., ELLIOT R. Inhibition of Dugbe neurovirus replication by human MxA protein. *Virus Res.*, 2004, 99, 47-50

387. ANDERSSON I., BLADH L., MOUSAVI JAZI M., MAGNUSSON K., LUNDKVIST A., HALLER O., MAIRAZIMI A. 2004. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*, 78, 4323-4329
388. ZHAO H., DE B.P., DAS T., BANERJEE A.K. 1996. Inhibition of human parainfluenza virus -3 replication by interferon and human MxA. *Virology*, 220, 330-338
389. SCHNORR J.J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., SIMON-JODICKE A., HORISBERGER M.A. ter MEULEN V. 1993. MxA –dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol.*, 67, 4760-4768
390. SCHNEIDER-SCHAULIES S., SCHNEIDER-SCHAULIES J., SCHUSTER A., BAYER M., PAVLOVIC J., ter MEULEN V. 1994. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J. Virol.*, 68, 6910-6917
391. PAVLOVIC J., ZÜRCHER T, HALLER O. STAEHELI P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MXA protein. *J Virol*, 64, 3370-33375
392. LANDIS H., SIMON-JODICKE A., KLOTI A., DI PAOLO C., SCHNORR J.J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HEFTI H.P., PAVLOVIC J. 1998. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicaon in the absence of viral structural proteins. *J Virol.*, 72, 1516-1522
393. CHIEUX V., CHEHADEH W., HARVEY J., HALLER O., WATTRÉ P., HOBBER D. 2001. Inhibition of Coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein. *Virology*, 283, 84-92

394. PAVLOVIC J., ZÜRCHER T., HALLER O., STAEHELI P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MXA protein. *J Virol*, 64, 3370-33375

395. GORDIEN A., ROSMORDUC O., PELTEKIAN C., GARREAU F., BRECHOT C., KREMSDORF D. 2001. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inductible MxA protein. *J Virol*, 75, 2684-2691

396. PELTIKIAN C., GORDIEN E., GARREAU F., MEAS-YEDID V., SOUSSAN P., WILLIAMS V., CHAIX M.-L., OLIVO-MARIN J.-C., BRECHOT C., KREMSDORF D. 2005. Human MxA protein participates to the interferon-related inhibition of hepatitis B virus replication in female transgenic mice. *J Hepatol.*, 43, 965-972

397. KO J., JIN H., ASANO A., TAKADA A., NINOMIYA A., KIDA H., HOKIYAMA H., OHARA M., TSUZUKI M., NISHIBORI M., MIZUTANI M., WATANABE T. 2002. Polymorphisms and the differential antiviral activity of chicken Mx gene. *Genome Res.*, 12, 595-601

398. ASANO A., KO J.H., MOROZUMI T., HAMASHIMA N., WATANABE T. 2002. Polymorphism and the antiviral property of porcine MX1 protein. *J Vet Med Sci*, 64, 1085-1089

399. PALM M., LEROY M., THOMAS A., LINDEN A., DESMECHT D. 2007. Differential anti-influenza activity among allelic variants at the *Sus Scrofa* Mx1 locus. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 27, 147-156

400. BAISE E., PIRE G., LEROY M., GERARDIN J., GORIS N., DE CLERCQ K., KERKHOFS P., DESMECHT D. 2004. Conditional expression of type I interferon-induced bovine Mx1 GTPase in a stable transgenic vero cell line interferes with replication of vesicular stomatitis virus. *J Interferon Cytokine Res.*, 24, 513-521

401. LEROY M., PIRE G., BAISE E., DESMECHT D. 2006. Expression of the interferon-alpha/beta-inducible bovine Mx1 dynamin interferes with replication of rabies virus. *Neurobiol Dis.*, 21, 515-521
402. BABIKER H.A., NAKATSU Y., YAMADA K., YONEDA A., TAKADA A., UEDA J., HATA H., WATANABE T. 2007. Bovine and water buffalo Mx2 genes: polymorphism and antiviral activity. *Immunogenetics*, 59, 59-67
403. NAKAMURA T., ASANO A., OKANO S., KO J.H., KON Y., WATANABE T., AGUI T. 2005. Intracellular localization and antiviral property of canine Mx proteins. *J Interferon Cytokine Res.*, 25, 169-173
404. DREIDING P., STAEHELI P., HALLER O. 1985. Interferon induced protein Mx accumulates in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses. *Virology*, 140, 192-196
405. PAVLOVIC J., STAEHELI P. 1991. The antiviral potentials of Mx proteins. *J. Interferon Res.*, 11, 215-219
406. PAVLOVIC J., ZÜRCHER T., HALLER O., STAEHELI P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J.Virol.*, 64, 3370-3375
407. STAEHELI P., HALLER O., BOLL W., LINDENMANN J., WEISSMANN C. 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, 44, 147-158

408. PAVLOVIC J., HALLER O., STAEHELI P. 1992. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *Journal of Virology*, 66, 2564-2569
409. HORISBERGER M.A., HALLER O., ARNHEITER H. 1980. Interferon-dependent genetic resistance to influenza virus in mice: virus replication in macrophages is inhibited at an early step. *J.Gen.Virol.*, 50, 205-210
410. MEYER T., HORISBERGER M.A. 1984. Combined action of mouse α and β interferons in influenza virus-infected macrophages carrying the resistance gene Mx. *J.Virol.*, 49, 709-716
411. PAVLOVIC J., HALLER O., STAEHELI P. 1992. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *Journal of Virology*, 66, 2564-2569
412. HUANG T., PAVLOVIC J., STAEHELI P., KRYSTAL M. 1992. Overexpression of the influenza virus polymerase can titrate out inhibition of the murine Mx1 protein. *J.Virol.*, 66, 4154-4169
413. STRANDEN A.M., STAEHELI P., PAVLOVIC J. 1993. Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. *Virology*, 197, 642-651
414. HUANG T., PAVLOVIC J., STAEHELI P., KRYSTAL M. 1992. Overexpression of the influenza virus polymerase can titrate out inhibition of the murine Mx1 protein. *J.Virol.*, 66, 4154-4169

415. STRANDEN A.M., STAEHELI P., PAVLOVIC J. 1993. Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. *Virology*, 197, 642-651
416. PAVLOVIC J., HALLER O., STAEHELI P. 1992. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *Journal of Virology*, 66, 2564-2569
418. ZÜRCHER T., PAVLOVIC J., STAEHELI P. 1992. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J.*, 11, 1657-1661
419. TURAN K., MIBAYASHI M., SUGIYANA K., SAITO S., NUMAJIRI A., NAGATA K. 2004. Nuclear MxA protein forms a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome
420. ZÜRCHER T., PAVLOVIC J., STAEHELI P. 1992. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J.*, 11, 1657-1661
421. TURAN K., MIBAYASHI M., SUGIYANA K., SAITO S., NUMAJIRI A., NAGATA K. 2004 Nuclear MxA protein form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome
422. TURAN K., MIBAYASHI M., SUGIYANA K., SAITO S., NUMAJIRI A., NAGATA K. 2004 Nuclear MxA protein form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome
423. TURAN K., MIBAYASHI M., SUGIYANA K., SAITO S., NUMAJIRI A., NAGATA K. 2004 Nuclear MxA protein form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome

424. TURAN K., MIBAYASHI M., SUGIYANA K., SAITO S., NUMAJIRI A., NAGATA K. 2004 Nuclear MxA protein form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome
425. HONDA A., UEDA K., NAGATA K., ISHIHAMA A. 1988. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J. Biochem.*, 104, 1021-1026
426. FRESE M., KOCHS G., MEIER-DIETER U., SIEBLER J., HALLER O. 1995. Human MxA protein inhibits tick-borne Hantaan virus but not Dhori virus. *J.Virol.*, 69, 3904-3909
427. KOCHS G., HALLER O. 1999. GTP-bound human MXA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J.Biol. Chem.* 274, 4370-4376
428. KOCHS G., HALLER O. 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogotovirus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.*, 96, 2082-2086
429. WEBER F., HALLER O., KOCHS G. 2000. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J.Virol.*, 74, 560-563
430. KOCHS G., HALLER O. Interferon-induced human MXA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 2082-2086
431. KOCHS G., HALLER O. Interferon-induced human MXA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 2082-2086

432. PAVLOVIC J., ZÜURCHER T., HALLER O., STAEHELI P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J.Virol.*, 64, 3370-3375
433. STAEHELI P., PAVLOVIC J. 1991. Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MXA protein. *Journal of Virology*, 65, 4498-4501
434. STAEHELI P., PAVLOVIC J. 1991. Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MXA protein. *Journal of Virology*, 65, 4498-4501
435. SCHWEMMLE M., WEINING K.C., RICHTER M.F., SCHUMACHER B., STAEHELI P. 1995. Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MXA protein. *Virology*, 206, 545-554
436. STAEHELI P., PAVLOVIC J. 1991. Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MXA protein. *Journal of Virology*, 65, 4498-4501
437. FRESE M., KOCHS G., FELDMANN H., HERTKORN C., HALLER O. 1996. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MXA protein. *J.Virol.*, 70, 915-923
438. HEFTI H.-P., FRESE M., LANDIS H., DiPAOLO C., AGUZZI A., HALLER O., PAVLOVIC J. 1999. Human MXA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against LaCrosse virus and other lethal viral infections. *J.Virol.*, 73, 6984-6991
439. MIURA T.A., CARLSON J.O., BEATY B.J., BOWEN R.A., OLSON K.E. 2001. Expression of human MxA protein in mosquito cells interferes with Lacrosse virus replication. *J.Virol.*, 75, 3001-3003

440. HACKER D., RAJU R., KOLAKOFSKY D. 1989. La Cross virus nucleocapsid protein controls its own synthesis in mosquito cells by encapsidating mRNA. *J.Virol.*, 63, 5166-5174

441. FRESE M., KOCHS G., FELDMANN H., HERTKORN C., HALLER O. 1996. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MXA protein. *J.Virol.*, 70, 915-923

442. KOCHS G., JANZEN C., HOHENBERG H., HALLER O. 2002. Antivirally active MXA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *PNAS*, 99, 3153-3158

443. KOCHS G., JANZEN C., HOHENBERG H., HALLER O. 2002. Antivirally active MXA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *PNAS*, 99, 3153-3158

444. KOCHS G., JANZEN C., HOHENBERG H., HALLER O. 2002. Antivirally active MXA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *PNAS*, 99, 3153-3158

445. ANDERSSON I., BLADH L., MOUSAVI-JAZI M., MAGNUSSIN K.-E., LUNDKVIST A., HALLER O., MIRAZIMI A. 2004. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus. *Journal of virology*, 78, 4323-4329

446. HYYPIÄ T., KOKIAMÄKI P., VAINONPÄÄ R. 1985. Replication of measles virus in human lymphocytes. *J.Exp.Med.*, 161, 1261-1271

447. OSUNKOYA B.O., ADELEYE G.I., ADEJUMO T.A., SALIMONU L. 1974. Studies on leucocytes cultures in measles. II. Detection of measles virus antigens in human leucocytes by immunofluorescence. *Arch.Gesamte. Virusforsch.*, 44, 323-329

448. WROSZ H., KULCYCKI J., LASKOWSKI Z., MATA CZ D., BRZOSKO W.J. 1979. Detection of measles virus antigen(s) in peripheral blood lymphocytes from patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Arch. Virol.*, 60, 291-297

449. McCHESNEY M.B., OLDSTONE M.B.A. 1987. Viruses perturb lymphocyte functions: selected principle characterizing virus induced immunosuppression. *Annu.Rev.Immunol.*, 5, 279-304

450. SCHNORR J.J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., SIMON-JÖDICKE A., PAVLOVIC J., HORISBERGER M.A., ter MEULEN V. 1993. MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *Journal of Virology*, 67, 4760-4768

451. SCHNEIDER-SCHAULIES S., ter MEULEN V. 1992. Molecular aspects of measles virus induced central nervous system diseases, p. 419-449. In R.P. Roos (ed.) *Molecular neurovirology*. Humana Press, Inc., Clifton, N.J.

452. KRAUS E., SCHNEIDER-SCHAULIES S., MIYASAKA M., TAMATANI T., SEDWICK J. 1991. Augmentation of major histocompatibility complex class I and ICAM-1 expression on glial cell following measles virus infection: evidence for the role of type-1 interferon. *Eur. J. Immunol.*, 22, 175-182

453. SCHNEIDER-SCHAULIES S., SCHNEIDER-SCHAULIES J., SCHUSTER A., BAYER M., PAVLOVIC J., ter MEULEN V. 1994. Cell-type specific MxA –mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *Journal of Virology*, 68, 6910-6917

454. SCHNEIDER-SCHAULIES S., SCHNEIDER-SCHAULIES J., SCHUSTER A., BAYER M., PAVLOVIC J., ter MEULEN V. 1994. Cell-type specific MxA –mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *Journal of Virology*, 68, 6910-6917

455. SCHNEIDER-SCHAULIES S., SCHNEIDER-SCHAULIES J., SCHUSTER A., BAYER M., PAVLOVIC J., ter MEULEN V. 1994. Cell-type specific MxA –mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *Journal of Virology*, 68, 6910-6917
456. MARSH M., HELENIUS A. 1989. Virus entry into animal cells. *Adv. Virus. Res.*, 36, 107-151
457. SINGH I., HELENIUS A. 1992. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J. Virol.*, 66, 7049-7058
458. LANDIS H., SIMON-JÖDICKE A., KLÖTI A., DI PAOLO C., SCHNORR J.-J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HEFTI H.-P., PAVLOVIC J. 1998. Human MXA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of the viral structural proteins. *J. Virol.*, 72, 1516-1522
459. LANDIS H., SIMON-JÖDICKE A., KLÖTI A., DI PAOLO C., SCHNORR J.-J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HEFTI H.-P., PAVLOVIC J. 1998. Human MXA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of the viral structural proteins. *J. Virol.*, 72, 1516-1522
460. LANDIS H., SIMON-JÖDICKE A., KLÖTI A., DI PAOLO C., SCHNORR J.-J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HEFTI H.-P., PAVLOVIC J. 1998. Human MXA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of the viral structural proteins. *J. Virol.*, 72, 1516-1522

461. LANDIS H., SIMON-JÖDICKE A., KLÖTI A., DI PAOLO C., SCHNORR J.-J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HEFTI H.-P., PAVLOVIC J. 1998. Human MXA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of the viral structural proteins. *J. Virol.*, 72, 1516-1522
462. LANDIS H., SIMON-JÖDICKE A., KLÖTI A., DI PAOLO C., SCHNORR J.-J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., HEFTI H.-P., PAVLOVIC J. 1998. Human MXA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of the viral structural proteins. *J. Virol.*, 72, 1516-1522
463. DUCKWORTH-RYSIECKI G., CORNISH K., CLARKE C.A., BUCHWALD M. 1985. Identification of two complementation groups in Fanconi Anemia. *Somatic. Cell Mol. Genet.*, 11, 35-41
464. STRATHDEE C.A., DUNCAN A.M.V., BUCHWALD M. 1992. Evidence for at least four Fanconi anemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat. Genet.*, 1, 196-198
465. JOENJE H., LO TEN FOE J.R., OOSTRA A.B., van BERKEL C.G.M., ROOIMANS T., SCHROEDER-KURTH T., WEGNER R.-D., GILLE J.J.P., BUCHWALD M., ARWERT F. 1995. Classification of Fanconi Anemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype. *Blood.*, 86, 2156-2160
466. FANCONI G. 1967. Familial panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (FA). I. Clinical aspects. *Semin. Hematol.*, 4, 233-240

467. ALTER B.P., YOUNG N.S. 1993. The bone marrow failure syndromes. In Hematology of Infancy and Childhood. D.G. NATHAN and F.A. OSKI, editors. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 216-316
468. LIU J.M., BUCHWALD M., WALSH C.E., YOUNG N.S. 1994. Fanconi anemia and novel strategies for therapy. *Blood.*, 84, 3995-4007
469. LI Y., Youssoufian H. 1997. MxA overexpression reveals a common genetic link in four Fanconi Anemia complementation groups. *J. Clin Invest.*, 11, 2873-2880
470. TAZI-AHNINI R., DI GIOVINE F.S., MCDONAGH A.J.G., MESSENGER A.G., AMADOU C., COX A., DUFF G.W., CORK M.J. 2000. Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Human Genetics*, 106, 639-645
471. REEVES R.H., O'HARA B.F., PAVAN W.J., GEARHART J.D., HALLER O. 1988 Genetic mapping of the Mx influenza virus resistance gene within the region of mouse chromosome 16 that is homologous to human chromosome 21. *J Virol.*, 62, 4372-4375
472. TAZI-AHNINI R., DI GIOVINE F.S., MCDONAGH A.J.G., MESSENGER A.G., AMADOU C., COX A., DUFF G.W., CORK M.J. 2000. Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Human Genetics*, 106, 639-645
473. AZI-AHNINI R., DI GIOVINE F.S., MCDONAGH A.J.G., MESSENGER A.G., AMADOU C., COX A., DUFF G.W., CORK M.J. 2000. Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Human Genetics*, 106, 639-645

474. GASCON G.C. Subacute sclerosing panencephaliti. 1996. Semin Pediatr Neurol. 4, 260-269
475. SCHNEIDER-SCHAULIES S., SCHNEIDER-SCHAULIES J., SCHUSTER A., BAYER M., PAVLOVIC J., ter MEULEN V. 1994. Cell-type specific MXA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J.Virol.*68, 6910-6917
476. SCHNORR J.J., SCHNEIDER-SCHAULIES S., SIMON-JÖDICKE A., PAVLOVIC J., HORISBERGER M., ter MEULEN V. 1993. MXA dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J.Virol.*, 67, 4760-4768
477. TORISU H., KUSUHARA K., KIRA R., BASSUNY W.M., SAKAI Y., SANEFUJI M., TAKEMOTO M., HARA T. 2004. Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology*, 62, 457-460
478. WISSKIRCHEN C ;, LUDERSDORFER T., MUELLER D., MORITZ E., PAVLOVIC J. 2011. The interferon induced antiviral protein MxA interacts with the cellular RNA helicases UAP56 and URH49. *J. Biol. Chem.*, 286, 34743-51

Contributions personnelles

Etude 1

Detection of new allelic polymorphisms in the human *MxA* gene

Detection of new biallelic polymorphisms in the human *MxA* gene

Tam Tran Thi Duc · Frédéric Farnir ·
Charles Michaux · Daniel Desmecht ·
Anne Cornet

Received: 15 February 2012 / Accepted: 6 June 2012 / Published online: 20 June 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract The interferon-inducible human *MxA* protein plays an important role in innate defense against an array of viruses. One might expect allelic diversity at the *MxA* locus to influence the timing and magnitude of its expression or even the range of viruses whose biological cycle is inhibited by the encoded product. Here we have collected 267 samples of genomic DNA from three distinct populations (European, Asian, and African) and have systematically sequenced the promoter of the *MxA* gene and its 17 exons in order to inventory its allelic variants. Eighteen single-nucleotide polymorphisms were detected, four of which had never been identified before. Two of these, located in the promoter (at positions –309 and –101 respectively), might affect the *MxA* expression pattern. The other two result in substitutions (Gly255Glu and Val268Met) in the protein's N-terminal region that might directly affect its antiviral function.

Keywords Interferon · Mx · Virus · Innate immunity

Introduction

The Mx proteins of vertebrates are high-molecular-weight dynamin-like proteins encoded, according to the species, by

two or three distinct genes whose expression depends strictly on type-1 and type-3 interferons [1]. They consist of three domains: an N-terminal GTPase domain that binds and hydrolyzes GTP (G domain), a middle domain that mediates self-assembly and oligomerization (MD), and a C-terminal GTPase effector domain involved in self-assembly (GED) [2]. Some isoforms are able to inhibit the life cycle of one or several viruses and are thus components of innate immune response. The ability of an Mx protein to act against a virus depends on the nature of its GED domain, probably involved in recognizing viral targets [3]. Among the Mx proteins known to exert antiviral activity, the human *MxA* protein displays the broadest antiviral spectrum, inhibiting the life cycles of viruses belonging to a diverse range of families: *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bunyaviridae*, *Picornaviridae*, and *Togaviridae* [4]. These features of *MxA*, demonstrated in vitro, make it appear as a key antiviral effector of innate immunity in the human species. Accordingly, its allelic polymorphism can be expected to affect the severity of viral diseases in humans [4].

The *MxA* gene (GenBank accession no. AC005612) is located on the long arm of chromosome 21 (21q22.3) and contains 17 exons over a 33-kb stretch [5, 6]. Its promoter contains three interferon-stimulated response elements (ISREs), a class II IL-6 response element, an Sp1 binding site, and several NF-kappaB binding sites [7]. To date, two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been characterized. They are located in the promoter region, at positions –123 (C/A) and –88 (G/T), and affect the *MxA* expression level of [8–10]. A series of population-based studies have linked these SNPs to specific risks or clinical outcomes [11–17]. The flowering of such studies since the discovery of these first two SNPs highlights the crucial medical importance of *MxA* allelic variants as biomarkers of susceptibility or resistance to viral infections in humans. It is

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11033-012-1708-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

T. T. T. Duc · D. Desmecht (✉) · A. Cornet
Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Liège, Sart Tilman B43, 4000 Liege, Belgium
e-mail: daniel.desmecht@ulg.ac.be

F. Farnir · C. Michaux
Department of Biostatistics, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Liège, Sart Tilman B43, 4000 Liege, Belgium

thus highly desirable to screen the *MxA* promoter and coding sequence systematically so as to inventory its allelic variants. Here our aim was to contribute to this inventory and to examine whether genotype frequencies vary among ethnic groups. We have detected many SNPs, four of which, including two non-synonymous SNPs in the coding sequence, have never been detected before (<http://snp.cshl.org>).

Materials and methods

Population samples

Two hundred and sixty-seven mouth swabs (Isohelix Swab, cat. no. SK-2S) were collected from three distinct populations between 2008 and 2011. Thirty-six swabs were obtained from Asian (Chinese and Vietnamese) university students, 131 from Belgian and French students (Western Europeans), and 100 from African students (from Algeria, Libya, Cameroun, Niger, Congo, or Rwanda). Within each

ethnic group, the subjects tested were randomly selected. Each swab was rubbed for 1 min against the inside of the cheek or behind the lower or upper lip and stored at 4 °C until processed. The study was approved by the local Bioethics Committee (File #PolyMxA/AC/2010).

DNA extraction and SNP detection

Genomic DNA was extracted from mouth epithelial cells with a commercially available kit (Isohelix cat. no. BEK-50). Each specimen was characterized quantitatively (Nanodrop) and qualitatively (Isohelix cat. no. DQC-50) and stored at −20 °C until used. SNPs were detected by PCR amplification of 12 successive segments of the *MxA* gene, followed by sequencing of the PCR products. A first step was to validate combined long-range and nested PCR amplification of the 9.8-kb gene segment comprising the promoter and exons 1–5. Then, 11 exon-specific PCR protocols were developed. Primer sequences are listed in Table 1 and the detailed characteristics of each PCR

Table 1 Sequences of primers used to amplify *MxA* gene promoter and exons

Primer name	Primer sequence 5' → 3'	Annealing temperature (°C)	Exon	PCR product size
Long-range PCR F	ATCTCCCACTCACAGCCAGTTAGCC	55.9	Promoteur— Exon 5	9,631
Long-range PCR R	GCAGCTGGGTGCAATTTTCCTAAAG	52.6		
Nested PCR F	CATGGGTCTGCTTGACTCAGCCCTC	57.5	Promoteur— Exon 5	9,044
Nested PCR R	CTCCCTGGGTCAACTCCTTCACCTC	57.5		
MxAex6F	TTAGACTTATTGAAGTTGGCCGT	64	6	193
MxAex6R	TCTTCCTACCACACTGATCTGT	68		
MxAex7F	GCTTCAAGCGTTAGTAAGCAA	64	7	138
MxAex7R	AAAAGAAGTAGAAGGAACCGTGG	66		
MxAex8F	TCCCAATCACAGAAAATTGAATC	62	8	155
MxAex8R	GCTTCCATTCAACTTGACAGAAC	66		
MxAex9F	CTGAGCCTATAGCTCTGCTCTG	70	9	139
MxAex9R	CTGCTCCCTTAGCAGGTCTTAGT	70		
MxAex10F	GAGATGGGATGTCCATAACTCAA	66	10	199
MxAex10R	GGCAGTATTTGTAATCCCCTTC	66		
MxAex11F	GAGCTCATTCCATATCATTGTGG	66	11	79
MxAex11R	ATAGTCTATCAGCATTCCCCTG	68		
MxAex12 + 13F	GTTGTTGAATCTCAAATTGCTCC	64	12 + 13	265
MxAex12 + 13R	CCTTTAGGAAGGATTGGGTTATG	66		
MxAex14F	ACTCCCCTCCTGAGATGACTAA	68	14	159
MxAex14R	GAGGAAAGTGCTGAAGTTTGGT	64		
MxAex15F	GGGGTCATTTGCTTTTAAGATTC	64	15	77
MxAex15R	CGTTTAAGCACTCCCTCCTTTAT	66		
MxAex16F	GGGCTAGAAACCTGCCTTAGATA	68	16	249
MxAex16R	AGGCTAACAAAGGAGGTAACGAC	68		
MxAex17F	TGCCTGCTTACCTTTATAGAGCA	66	17	682
MxAex17R	TATTAAGTTAGCACCGTTGGCTT	64		

reaction are available on request. The PCR products were purified with the innuPREP DOUBLEpure kit (Analytik Jena) and sequenced on an ABI-3100 Genetic Analyzer using Big Dye terminator chemistry (Applied Biosystems). The primers listed in Online Resource #2 were used to sequence the 9.8-kb gene segment comprising the promoter and exons 1–5. Primers were designed with Netprimer [http://www.premierbiosoft.com/netprimer]. Nucleotide sequence and identity analyses were carried out, respectively, with the Chromas v.2.21 (http://www.

technelysium.com.au) and BLAST programs. Sequences were aligned with GeneDoc v.2.7.000 (http://www.psc.edu/biomed/genedoc).

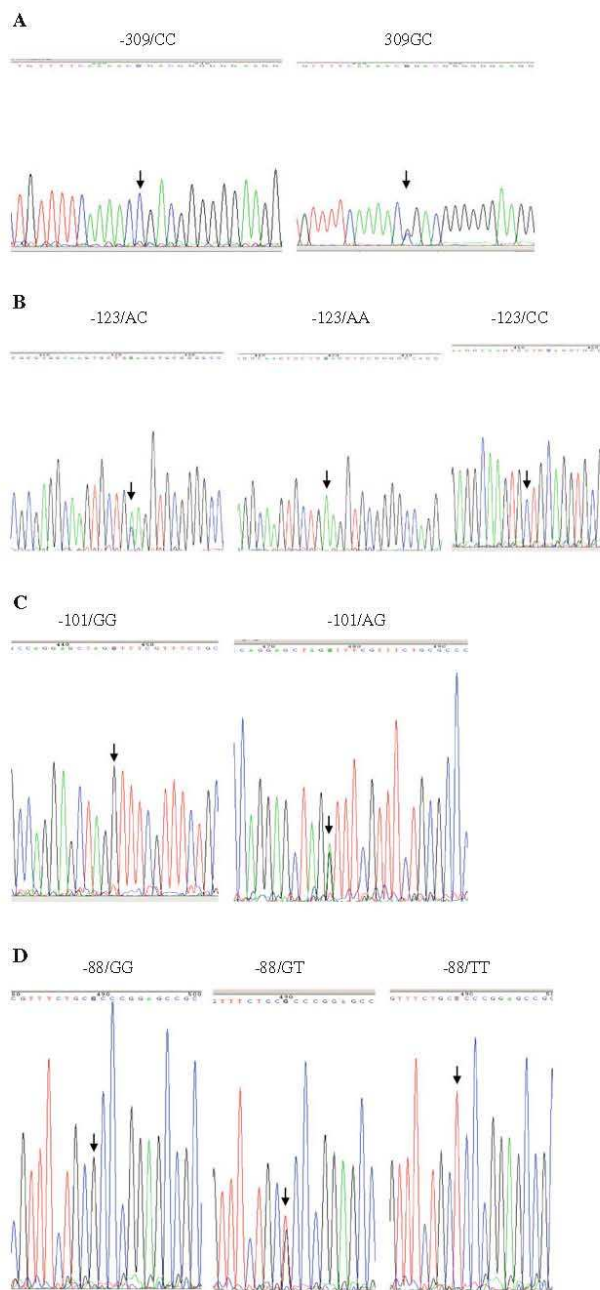
Statistical methods

Allele and genotype frequencies were estimated by direct counting. The heterogeneity of population samples and conformity with the Hardy–Weinberg equilibrium were

Table 2 Synopsis of reported single nucleotide polymorphisms in human *MxA* gene

Genomic segment	Nucleotide change	Alleles	SNP ID	Amino acid change	Ensembl	NCBI SNP	This study	
Promoter	–309	C/G	Not listed yet	–	ND	–	+	
	–159	C/A	rs35745218	–	ND	+	–	
	–139	C/T	rs34188463	–	ND	+	–	
	–123	C/A	rs17000900	–	ND	+	+	
	–101	G/A	–	–	ND	–	+	
	–88	G/T	rs2071430	–	ND	+	+	
Exon 1	+20	A/C	rs464138	–	+	+	+	
Exon 5	+5824	C/T	rs114131127	–	+	+	–	
Exon 7	+10892	G/A	rs17000915	–	+	+	–	
Exon 9	+14738	C/T	rs467960	–	+	+	+	
Exon 10	+15523	G/A	Not listed yet	G/E	–	–	+	
	+15527	T/G	rs55748803	–	+	+	–	
	+15561	G/A	Not listed yet	V/M	–	–	+	
Exon 11	+17578	G/A	rs62623435	G/R	+	+	–	
	+17599	C/T	rs116233935	–	+	+	–	
Exon 12	+19278	G/A	rs115187240	–	+	+	–	
Exon 13	+19777	G/A	rs469390	V/I	+	+	+	
	+19784	C/T	rs34717738	A/V	+	+	–	
	+19827	T/C	rs75157475	–	+	+	–	
	+19897	G/T	rs35132725	E/X	+	+	–	
Exon 14	+22960	T/C	rs2070229	–	+	+	+	
	+23046	T/G	rs78721041	V/G	+	+	–	
Exon 15	+24998	A/C	rs75718352	N/T	+	+	–	
Exon 16	+26476	G/A	rs1804113	V/I	+	+	–	
	+26508	A/G	rs1050008	–	+	+	+	
	+26577	C/T	rs117998041	–	+	+	+	
	+26580	G/A	rs469304	–	+	+	+	
	Exon 17	+32352	C/T	rs111867117	–	+	+	–
		+32376	G/T	rs2230454	Q/H	+	+	–
+32398		C/A	COSM71731	L/I	+	–	–	
+32537		A/G	rs1557370	–	+	+	+	
+32605		C/T	rs2230455	–	+	+	–	
+32639		C/T	rs116752870	–	+	+	–	
+32640		G/A	rs2230456	–	+	+	+	
+32685		A/G	rs1804112	–	+	+	–	
+32748	A/G	rs60687893	–	+	+	+		
+32749	T/A	rs55992492	–	+	+	+		
+32925	G/A	rs73372143	–	+	+	+		

Fig. 1 Examples of chromatograms revealing the polymorphisms discovered in the *MxA* promoter region. A → D : positions –309, –123, –101 and –88, respectively



evaluated with Fisher's exact test and the χ^2 test. The criterion for statistical significance was $P < 0.05$.

Results

The promoter and the 17 exons of the *MxA* gene were sequenced from the genomic DNA of 267 subjects from Belgium and France ($n = 131$), Africa ($n = 100$), or Asia ($n = 36$). Eighteen SNPs were identified in the cohort, four of which are not listed in international databases (Table 2). The first two (−309 C/G and −101 G/A), whose chromatograms are presented (Fig. 1), are located in the promoter. They were detected in the African population, although quite rarely, since only two individuals heterozygous at −309 and a single individual heterozygous at −101 were identified. Two new SNPs were identified in exon 10: +15523 G/A and +15561 G/A. At position +15523, the A allele appeared very rare and exclusively in the Asian population (two GA heterozygous individuals were detected). This rare allele encodes a protein with a Gly255Glu substitution. At position +15561, the A allele appeared very rare, having been found in only one (African) individual (who was homozygous for this allele). This rare variant encodes a protein with a Val268Met substitution.

Genotype and allele frequencies are displayed in Online Resources #4–8. A significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium was observed in 4 out of 45 tests ($P < 0.0001$ in the African population for the −123 and −88 polymorphisms, $P < 0.005$ in the African population for the +15561 polymorphism, and $P < 0.001$ in the Western European population for the +32537 polymorphism). This number of significant results is no larger than might be expected to occur through chance alone. Seventeen tests showed significant differences between the three populations ($P < 0.05$). The C/G, A/C, A/G, and G/T allele distributions at positions −309, −123, −101, and −88, respectively, within the promoter, were similar in the three groups, with a highly dominant allele at each location (C, C, G, and G respectively). The most noticeable features detected were (i) the total absence of the −309G and −101A alleles in the Asian and Western European populations and (ii) the low prevalence of the high-MxA-producer genotypes AA (−123) and TT (−88). In the UTR-5' region, the distribution of the C/A (+20) allele appeared significantly different among groups, the C allele being dominant in Asia and the A allele elsewhere. Within the coding region, the three most noticeable between-population differences were the absence of allele A in one (32925) or two (15523 and 32640) of the populations studied.

Discussion

In this study of polymorphisms in the *MxA* gene and of the corresponding allele frequencies within geographically diverse populations, we have highlighted genetic variation linked to ethnic origin. The variation of some allele frequencies was sufficient to distinguish at least one population as « different » from the others. For example, the Asian group shows lower +20A and +26580A allele frequencies than the other populations. Only in the case of the −123 and −88 polymorphisms were the allele distributions about the same throughout the three populations. The findings of this study corroborate the scant population data available. The low prevalence of the high-MxA-producer genotypes AA (−123) and TT (−88) has been noted previously [8], as has the high occurrence of the +20C allele in Asian populations [14].

We have detected four new polymorphisms, two in the coding region of *MxA* (one leading to a Gly255Glu substitution and the other to a Val268Met substitution in the N-terminal domain) and two in the promoter region. The available structural data are not sufficient for predicting which specific *MxA* functions might be altered by these variations [18]. Nevertheless, BLOSUM 62 matrix scoring of the two substitutions according to their putative impacts on protein structure [19] revealed that Gly255Glu might significantly affect *MxA* structure (score: −2), while Val268Met should not (score: +1). On the other hand, both new polymorphisms revealed in the *MxA* promoter region might significantly alter the gene's expression pattern, since the first two polymorphisms ever identified in the *MxA* promoter appear to be linked to the *MxA* expression level, the specific risk of infection, and the clinical outcome of disease [8–10]. A highly significant difference in the distribution of −88 G/T has been observed between patients with persistent and self-limiting HBV infections [15], and the presence of the AG haplotype (−123A and −88G) in an individual appears to correlate significantly with susceptibility to HBV infection [16]. Furthermore, a lower frequency of the −88 GG genotype has been observed in self-limiting HCV infection and in nonresponders to therapy [11]. In Japanese individuals, the −88 GT genotype may confer to the host genetic susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis [12]. Also, a significantly higher frequency of the −123A, −88T haplotype, correlating with overexpression of *MxA*, has been observed in multiple sclerosis [14]. As regards susceptibility to the SARS coronavirus, −123A allele carriers appear to be significantly less at risk of infection [17], a GT genotype at position −88 appears associated with increased susceptibility [20], and the GG genotype at position −88 appears to be more frequent in hypoxemic than in non-hypoxemic patients [13]. All these observations make it

a priority to conduct functional testing of the new MxA promoter haplotypes revealed here and to include them in future population-based case–control studies. Of particular interest is the fact that the new –101A allele restores a near-canonical ISRE module in the promoter, which theoretically should increase MxA expression in response to interferons α , β , and λ .

Acknowledgments The authors are grateful to Michael Sarlet for efficient and skilled technical assistance.

References

- Haller O, Staeheli P, Kochs G (2009) Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses. *Rev Sci Tech* 28:219–231
- Haller O, Gao S, von der Malsburg A, Daumke O, Kochs G (2010) Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *J Biol Chem* 285:28419–28424
- Lee SH, Vidal SM (2002) Functional diversity of the Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Res* 12:527–530
- Haller O, Kochs G (2011) Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res* 31:79–87
- Aebi M, Fah J, Hurt N, Samuel CE, Thomis D, Bazzighe L, Pavlovic J, Haller O, Staeheli P (1989) cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol Cell Biol* 9:5062–5072
- Tazi-Ahmini R, di Giovine FS, McDonagh AJ, Messenger AG, Amadou C, Cox A, Duff GW, Cork MJ (2000) Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Hum Genet* 106:639–645
- Ronni T, Matikainen S, Lehtonen A, Palvimo J, Dellis J, Van Eylem F, Goetschy JF, Horisberger M, Content J, Julkunen I (1998) The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res* 18:773–781
- Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S (2000) 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* 43:124–127
- Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Takagi K, Satoh J, Kumada H (2004) Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J Viral Hepat* 11:271–276
- Kong XF, Zhang XX, Gong QM, Gao J, Zhang SY, Wang L, Xu J, Han Y, Jin GD, Jiang JH, Zhang DH, Lu ZM (2007) MxA induction may predict sustained virologic responses of chronic hepatitis B patients with IFN- α treatment. *J Interferon Cytokine Res* 27:809–818
- Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Hennig BJ, Hellier S, Zhang L, Wright M, Chiaromonte M, Graves M, Thomas HC, Hill AV, Thursz MR (2003) Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun* 4:411–419
- Torisu H, Kusuhara K, Kira R, Bassuny WM, Sakai Y, Sanefuji M, Takemoto M, Hara T (2004) Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 62:457–460
- Hamano E, Hijikata M, Itoyama S, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha LD, Ban VV, Matsushita I, Yanai H, Kirikae F, Kirikae T, Kuratsuji T, Sasazuki T, Keicho N (2005) Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population. *Biochem Biophys Res Commun* 329:1234–1239
- Furuyama H, Chiba S, Okabayashi T, Yokota S, Nonaka M, Imai T, Fujii N, Matsumoto H (2006) Single nucleotide polymorphisms and functional analysis of MxA promoter region in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 249:153–157
- Peng XM, Lei RX, Gu L, Ma HH, Xie QF, Gao ZL (2007) Influences of MxA gene –88 G/T and IFN- γ +874 A/T on the natural history of hepatitis B virus infection in an endemic area. *Int J Immunogenet* 34:341–346
- Cao B, Liu X, Hou F, Li W, Han Z, Zhang Q, Dai Y, Xu C, Qi H (2009) The haplotype of the MxA gene promoter is associated with hepatitis B virus infection in a Chinese population. *Liver Int* 29:1383–1388
- Ching JC, Chan KY, Lee EH, Xu MS, Ting CK, So TM, Sham PC, Leung GM, Peiris JS, Khoo US (2010) Significance of the myxovirus resistance A (MxA) gene –123C> a single-nucleotide polymorphism in suppressed interferon beta induction of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Infect Dis* 201:1899–1908
- Gao S, von der Malsburg A, Dick A, Faelber K, Schröder GF, Haller O, Kochs G, Daumke O (2011) Structure of myxovirus resistance protein A reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. *Immunity* 35: 514–525
- Henikoff S, Henikoff JG (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10915–10919
- He J, Feng D, de Vlas SJ, Wang H, Fontanet A, Zhang P, Plancoûlaine S, Tang F, Zhan L, Yang H, Wang T, Richardus JH, Habbema JD, Cao W (2006) Association of SARS susceptibility with single nucleic acid polymorphisms of OAS1 and MxA genes: a case-control study. *BMC Infect Dis*. doi:10.1186/1471-2334-6-106

Online resource #1. Primers used for sequencing promoter and exons 1-5.

<i>Primer</i>	<i>Primer sequence 5' → 3'</i>	<i>Annealing temperature (°C)</i>	<i>Promoter or exon</i>
Promoter F	ACACACCCGTTTCCACCCTGGAGAGGCCAG	63.3	Promoter
Promoter R	TGCGCAGTGCTGGAGTGCGGCCTCCGCTCT	66.1	
Exon 1F	AGCTAGGTTTCGTTTCTGCGCCC	53.7	Exon 1
Exon 1R	TACTAGCAGCCGAGAAGGTGCC	55.5	
Exon 2F	TCCCACCAACACTCACAGCAGGT	53.7	Exon 2
Exon 2R	TGGAAGAGGCTACACTTTCCAACA	52.5	
Exon 3F	GGGAGAGGAAGGGGGCTGAATCC	57.3	Exon 3
Exon 3R	TTAGCGCACAGGTGCAGGAAACC	53.7	
Exon 4F	CATATTATTGATCCAGGCAGCAG	66	Exon 4
Exon 4R	TGACTGCCTTATACTTGTCTGCAT	68	
Exon 5F	CCCAGATTGTCAGACTCCATAAG	68	Exon 5
Exon 5R	CCACCTATATGTTTTTCCACAA	64	

Online resource #2. Allelic/genotypic distributions of SNPs in promoter of human *MxA* gene

Polymorphism	Genotype	African		Asian		European		P value
		n	%	n	%	n	%	
-309C>G	CC	98	98.0	36	100	131	100	0.3913
	CG	2	2.0	0	0	0	0	
	HWE P value	0.92		NS		NS		
-123C>A	AA	6	6.0	0	0	1	0.7	0.0271
	CA	13	13.0	7	19.4	33	25.2	
	CC	81	81.0	29	80.6	97	74.1	
	HWE P value	0.0000		0.72		0.31		
-101G>A	GG	99	99.0	36	100	131	100	0.5094
	AG	1	1.0	0	0	0	0	
	HWE P value	0.99		NS		NS		
-88G>T	GG	80	80	25	69.4	94	71.8	0.0182
	GT	14	14.0	10	27.8	36	27.5	
	TT	6	6.0	1	2.8	1	0.8	
	HWE P value	0.0001		1		0.21		
Allele								
-309C>G	C	198	99.0	72	100	262	100	0.3915
	G	2	1.0	0	0	0	0	
-123C>A	A	25	12.5	7	9.7	35	13.4	0.7868
	C	175	87.5	65	90.3	227	86.6	
-101G>A	A	1	0.5	0	0	0	0	0.5094
	G	199	99.5	72	100	262	100	
-88G>T	G	174	87.0	60	83.3	224	85.5	0.7238
	T	26	13.0	12	16.7	38	14.5	

NS: Non significant. See text for key.

Online resource #3. Allelic/genotypic distributions of SNP in exon #1 of human *MxA* gene

Polymorphism	Genotype	African		Asian		European		P value
		n	%	n	%	n	%	
+20A>C	AA	48	48.0	2	5.6	44	34.0	<0.0001
	AC	40	40	14	38.9	64	48.9	
	CC	12	12.0	20	55.6	23	17.6	
HWE P value		0.42		0.82		0.99		
Allele								
+20A>C	A	136	68.0	18	25.0	152	58.0	<0.0001
	C	64	32.0	54	75.0	110	42.0	

See text for key.

Online resource #4. Allelic/genotypic distributions of SNPs in exon #10 of human *MxA* gene

Polymorphism	Genotype	African		Asian		European		P value
		n	%	n	%	n	%	
+15523 G>A	GA	0	0	2	5.6	0	0	0.0177
	GG	100	100	34	94.4	131	100	
	HWE P value	NS		0.86		NS		
+15561 G>A	AA	1	1.0	0	0	0	0	0.5094
	GG	99	99.0	36	100	131	100	
	HWE P value	0.005		NS		NS		
	Allele							
+15523 G>A	A	0	0	2	2.8	0	0	0.0180
	G	200	100	70	97.2	262	100	
+15561 G>A	A	2	1.0	0	0	0	0	0.3915
	G	198	99.0	72	100	262	100	

NS: Non significant. See text for key.

Online resource #5. Allelic/genotypic distributions of SNPs in exon #16 of human *MxA* gene

Polymorphism	Genotype	African		Asian		European		P value
		n	%	n	%	n	%	
+26508 G>A	AA	77	77.0	17	47.2	96	73.3	0.0028
	AG	22	22.0	16	44.4	34	26.0	
	GG	1	1.0	3	8.3	1	0.8	
	HWE P value	0.37		0.30		0.24		
+26577 C>T	CC	100	100	35	97.2	130	99.2	0.2519
	CT	0	0	1	2.8	1	0.8	
	HWE P value	NS		NS		NS		
+26580 G>A	AA	6	6.0	0	0	43	32.8	<0.0001
	GA	41	41.0	2	5.6	67	51.2	
	GG	53	53.0	34	94.4	21	16.0	
	HWE P value	0.19		0.98		0.55		
	Allele							
+26508 G>A	A	176	88.0	50	69.4	226	86.3	0.0014
	G	24	12.0	22	30.6	36	13.7	
+26577 C>T	C	200	100	71	98.6	261	99.6	0.2517
	T	0	0	1	1.4	1	0.4	
+26580 G>A	A	53	26.0	2	2.8	153	58.4	<0.0001
	G	147	73.5	70	97.2	109	41.6	

NS: Non significant. See text for key.

Online resource #6. Allelic/genotypic distributions of SNPs in exon #17 of human *MxA* gene

Polymorphism	Genotype	African		Asian		European		P value
		n	%	n	%	n	%	
+32537 A>G	AA	81	81.0	23	63.9	116	88.6	0.0128
	AG	16	16.0	11	30.6	12	9.2	
	GG	3	3.0	2	5.6	3	2.3	
	HWE P value	0.07		0.65		0.001		
+32640 G>A	AA	1	1.0	0	0	0	0	0.0081
	GA	6	6.0	0	0	0	0	
	GG	93	93.0	36	100	131	100	
	HWE P value	0.13		NS		NS		
+32748 A>G	AA	81	81.0	23	63.9	116	88.6	0.1053
	AG	16	16.0	12	33.3	31	23.7	
	GG	3	3.0	1	2.8	1	0.8	
	HWE P value	0.07		0.41		0.36		
+32749 T>A	AA	3	3.0	1	2.8	0	0	0.0311
	TA	16	16.0	12	33.3	32	24.4	
	TT	81	81.0	23	63.9	99	75.6	
	HWE P value	0.07		0.41		0.17		
+32925 G>A	GA	4	4.0	1	2.8	0	0	0.0479
	GG	96	96.0	35	97.2	131	100	
	HWE P value	0.97		NS		NS		
Allele								
+32537 A>G	A	178	89.0	57	79.2	244	93.1	0.0035
	G	22	11.0	15	20.8	18	6.9	
+32640 G>A	A	8	4.0	0	0	0	0	<0.0001
	G	192	96.0	72	100	262	100	
+32748 A>G	A	178	89.0	58	80.6	229	87.4	0.1924
	G	22	11.0	14	19.4	33	12.6	
+32749 T>A	A	22	11.0	14	19.4	32	12.2	0.1754
	T	178	89.0	58	80.6	230	87.8	
+32925 G>A	A	4	2.0	1	1.4	0	0	0.0490
	G	196	98.0	71	98.6	262	100	

NS: Non significant. See text for key.

Etude 2

Functional characterization of new allelic polymorphisms identified in the promoter region of the human *MxA* gene

Title

Functional characterization of new allelic polymorphisms identified in the promoter region of the human *MxA* gene

Authors

Tam TRAN THI DUC, Daniel DESMECHT, Anne CORNET

Address

Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Sart Tilman
B43, B-4000 Liège, Belgium

Accepted for publication in *International Journal of Immunogenetics*, July 2012

Abstract

The Mx proteins are high-molecular-weight dynamin-like proteins whose expression depends strictly on type-I and -III interferons (IFN). Some isoforms are able to inhibit the life cycle of one or several viruses and are thus components of innate immune response. The human MxA protein displays the broadest antiviral spectrum which makes it appear as a key antiviral effector of innate immunity. Allelic polymorphisms located in the *MxA* gene promoter can be expected to affect the magnitude of *MxA* mRNA transcription in response to IFNs and therefore to alter the severity of viral diseases in humans. Here, three single nucleotide polymorphism sites (-309, -101 and +20) were examined for their ability to alter *MxA* gene promoter-driven reporter expression. We show that, besides the previously reported role of -123A and -88T, the presence of -101G is equally important. Moreover, when a promoter construct carries these three critical nucleotides, a first additional positive effect is conferred by a C at position -309 and, in this latter case, a second additional effect is produced by a A at position +20. This finding is clinically useful to improve prediction of IFN-responsiveness in patients not only with viral diseases for which type-I IFN therapy is used.

Keywords ► Interferon, MxA, virus, innate immunity

Introduction

The Mx proteins of vertebrates are high-molecular-weight dynamin-like proteins encoded, according to the species, by two or three distinct genes whose expression depends strictly on type-I and type-III interferons (IFN) (Haller and others, 2009). They consist of three domains: an N-terminal GTPase domain that binds and hydrolyzes GTP, a middle domain that mediates self-assembly and oligomerization, and a C-terminal GTPase effector domain involved in self-assembly (Haller and others, 2010). Some isoforms are able to inhibit the life cycle of one or several viruses and are thus components of innate immune response. Among the Mx proteins known to exert antiviral activity, the human MxA protein displays the broadest antiviral spectrum, inhibiting the life cycles of viruses belonging to a diverse range of families: the *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bunyaviridae*, *Picornaviridae*, and *Togaviridae* (Lee and Vidal, 2002 ; Haller and Kochs, 2011). These biological features of MxA, demonstrated *in vitro*, make it appear as a key antiviral effector of innate immunity in the human species. Accordingly, allelic polymorphisms located in the *MxA* gene promoter can be expected to affect the magnitude of *MxA* mRNA transcription in response to type-I and –III IFNs and therefore to alter the severity of viral diseases in humans. The *MxA* gene (GenBank accession no. AC005612) is located on the long arm of chromosome 21 (21q22.3) and contains 17 exons over a 33-kb stretch (Aebi and others, 1989; Tazi-Ahnini and others, 2000). Its promoter contains three interferon-stimulated response elements (ISREs), a class II IL-6 response element, a Sp1 binding site, and several NF-kappaB binding sites (Ronni and others, 1998). To date, three single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been characterized in the promoter region, at positions -123 (C/A), -88 (G/T) and +20 A/C, of which two (-123 and -88) affect the expression level of

MxA (Hijikata and others, 2000 ; 2001 ; Suzuki and others, 2004 ; Kong and others, 2007). A series of population-based studies have associated these two SNPs to specific risks or clinical outcomes (Knapp and others, 2003; Torisu and others, 2004; Hamano and others, 2005; Furuyama and others, 2006); Peng and others, 2007; Cao and others, 2009; Ching and others, 2010). The flowering of such studies since the discovery of these first SNPs highlights the crucial medical importance of *MxA* gene promoter allelic variants as biomarkers of susceptibility or resistance to viral infections in humans. Since these first three SNPs in the *MxA* gene proximal promoter were disclosed (Hijikata and others, 2000), we identified two new ones (-309 C/G and -101 G/A) by systematic screening of west european, asian and african subpopulations (Tran Thi Duc et al., 2012). The newcomers were detected in the African population only, with low allele frequencies: 1% for -309G and 0.5% for -101A. To establish whether said polymorphisms alter the magnitude of MxA expression, the ability of promoter constructs carrying various genotypes to drive luciferase expression in response to standardized stimulations with IFN α was characterized.

Materials and Methods

Cloning and mutagenesis

The 747 bp DNA stretch extending from nt -573 to nt +174 of the *MxA* gene was synthesized by PCR using genomic DNA from a donor carrying the reference promoter sequence with primers 5'-ACA CAC CCG TTT CCA CCC TGG AGA GGC CAG-3' (forward) and 5'-TAC TAG CAG CCG AGA AGG TGC CC-3' (reverse), cloned in pCRII-TOPO (Invitrogen), and subcloned into the promoterless firefly luciferase reporter gene vector pGL3-Basic (Promega)

by using *Sma*I restriction enzymes. Nine haplotypic variants of the *MxA* gene proximal promoter were then produced by site-directed mutagenesis using the QuickChange II[®] Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene). These variants first consist in naturally occurring promoter haplotypes (constructs #1-5). Then, in order to dissect the contribution of each SNP to promoter activity, five additional variants consisting in diverse combinations of the SNPs present at positions -309, -123, -101, -88, and +20 were synthesized (Table 1, constructs #5-9). The correct DNA sequences of the nine final constructs were verified on an automated DNA sequencer ABI Prism (Applied Biosystems Perkin Elmer).

Transfection assay of the promoter reporter genes

Human embryonic 293 kidney epithelial cells (HEK293, ATCC #CRL-1573) were cultured in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Transfections were carried out with FUGENE HD (Roche Diagnostics) as previously described, with some modifications. Briefly, the cells were washed, centrifuged for 10 min at 1 000 g, and resuspended in medium to a final concentration of 2.5×10^5 cells per ml. For each transfection, 500 μ l of the cell suspension (1.25×10^5 cells) were incorporated in each of a series of P24 wells containing 22 μ l of OptiMEM with 40 ng of *MxA* gene promoter allelic construct and 2.5 ng of pRL-TK *renilla* luciferase reporter vector (Promega, Madison, WI, USA) for monitoring efficacy of transformation, and 3 μ l of Fugene HD. Sixteen hours after transfection, cells were stimulated for 24 h with 1 000 units per ml of IFN α (Sigma) before preparation of total cell lysates. In all reporter assays, Luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to manufacturer's instructions on a Orion-II microplate

luminometer (Berthold Detection Systems). Each transfection experiment was performed 2-4 times in triplicate with 2 different DNA preparations. To normalize the transfection efficiency, the measured activity from the promoter constructs and the pGL3/basic was divided by the activity of the pRL-TK control. Sets of data were compared by regular one-way ANOVA followed by the Bonferroni post test, with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. NS, $p > 0.10$.

Results

A 747-bp DNA fragment of the *MxA* gene proximal promoter was amplified from one individual and ligated into the pGL3/basic vector (construct #1). Eight different DNA fragments were synthesized from this initial variant, four corresponding to other naturally occurring *MxA* gene promoter haplotypes (constructs #2 to #5) and four representing four theoretically possible but yet nonidentified haplotypes (Table 1). Upon exposure to IFN α , all constructs displayed a 10- to 50-fold higher activity than after incorporation of vehicle only. Taken together, measurements of the nine promoter activities reveal three statistically distinct functional categories ($p < 0.05$), with high- (construct #4), medium- (constructs #1, #3, #5, #8, and #9) and low-expressing (constructs #2, #6 and #7) promoters (Fig. 1). The most intense expression rate was driven by construct #4 ($p > 0.05$), which confirms the critical importance of the simultaneous presence of -123A and -88T variants for maximizing *MxA* expression (Hijikata and others, 2000; 2001). To examine the possible role of the new SNP we disclosed at position -101, *MxA* gene promoter activity was measured by substituting the G at this position by a A in haplotypes #1 (medium-expressing) and #4 (high-expressing). In both cases substitution of G by A (haplotypes #2 and #6) caused a dramatic abatement of IFN α -induced expression which enlightens the critical superiority of alleles comprising a G at position -101.

Further, to examine the role of the new SNP we identified at position -309, *MxA* gene promoter activity was measured with either a C or a G at this position. In this case, the functional impact of said substitution appeared to be context-dependent, either with the C allele increasing activity (construct #4 vs construct #8, $p < 0.05$) or with both alleles driving similar expression when most favourable residues are absent at -123 and -88 (construct #1 vs construct #3, $p > 0.10$). Furthermore, the expression increasing effect of allele -309C is lost when the favourable G at position -101 is replaced by A (construct #2 vs construct #3, $p < 0.05$). Thus, the C allele at position -309 increases expression if and only if the promoter simultaneously carries -123A, -101G and -88T. Finally, substitution of the A by C at position +20 in the high-expressing construct significantly decreases expression rate (construct #4 vs. construct #5, $p < 0.05$) suggesting a functional role too. However, the same substitution does not alter expression in -101A variants (construct #6 vs construct #7, $p > 0.10$), nor in -309G variants (construct #8 vs construct #9, $p > 0.10$). Taken together, we show that, besides the crucial role of -123A and -88T previously reported (Hijikata and others, 2000; 2001), the presence of -101G is equally important. Moreover, when and only when a promoter construct carries these three critical nucleotides, an additional positive effect is conferred by a C at position -309 and, in this latter case, a second additional effect is produced by a A at position +20. Interestingly, the best promoter haplotype (construct #4) simultaneously carries the five alleles contributing to optimization of reporter gene expression.

Discussion

Type-I IFN-inducible human *MxA* protein mediates resistance against influenza A and several other RNA viruses. Specific recognition of response elements by transcription factors

and their combinatorial assembly on the *MxA* gene promoter is crucial for the fine tuning of the timing and amplitude of transcription. It was established before that the promoter of the *MxA* gene contains two functional IFN-stimulated response elements (ISRE) near the transcription start site [7] and that two SNPs, -123 (C/A) and -88 (G/T) control *MxA* expression. Three other SNPs located in the proximal promoter were identified but their impact on *MxA* expression rate was never addressed so far. All three were found to alter significantly expression, with a major effect for -101 (G/A) and a context-dependent effect of -309 (C/G) and +20 (A/T). The effect of -101 G/A substitution comes as no surprise given the fact that replacement of the G by A turns a canonical ISRE into a near-canonical ISRE, which is logically supposed to upset the binding of the ISGF3 complex on the *MxA* gene proximal promoter, thus decreasing *MxA* expression in response to interferons α , β , and λ . Besides, the conditional additive effects provided by the C and A at positions -309 and +20 were not predictable. As promoters are well known to contain diverse short- and long-range selective response elements, both SNPs could be located in an enhancer/silencer yet to be discovered. Alternatively, as optimal aggregation of the enhanceosome depends of the tridimensional folding of intervening DNA stretches between neighboring response elements, both G/C and A/T substitutions could critically alter binding-favorable allosteric states.

In conclusion, our results show that allelic diversity in the *MxA* gene proximal promoter significantly alter the tight regulation of antiviral *MxA* protein expression by type-I and -III IFNs. Besides the known -123 (C/A) and -88 (G/T) variants, three new SNPs were shown to control *MxA* expression rate. This finding is clinically useful to improve prediction of IFN-responsiveness in patients not only with hepatitis C but also other viral diseases for which type-I IFN therapy is used. Population-based studies could also benefit from this new

information to discover new or strengthen existing associations between specific risks or clinical outcomes and *MxA* gene proximal promoter variants.

Acknowledgements

The authors are grateful to Michael Sarlet for enthusiastic, efficient and skilled technical assistance.

References

1. Aebi M, Fah J, Hurt N, Samuel CE, Thomis D, Bazzighe L, Pavlovic J, Haller O, Staeheli P (1989) cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol Cell Biol* 9:5062-5072
2. Cao B, Liu X, Hou F, Li W, Han Z, Zhang Q, Dai Y, Xu C, Qi H (2009) The haplotype of the MxA gene promoter is associated with hepatitis B virus infection in a Chinese population. *Liver Int* 29:1383-1388
3. Ching JC, Chan KY, Lee EH, Xu MS, Ting CK, So TM, Sham PC, Leung GM, Peiris JS, Khoo US (2010) Significance of the myxovirus resistance A (MxA) gene -123C>a single-nucleotide polymorphism in suppressed interferon beta induction of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Infect Dis* 201:1899-1908
4. Furuyama H, Chiba S, Okabayashi T, Yokota S, Nonaka M, Imai T, Fujii N, Matsumoto H (2006) Single nucleotide polymorphisms and functional analysis of MxA promoter region in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 249:153-157
5. Haller O, Gao S, von der Malsburg A, Daumke O, Kochs G (2010) Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *J Biol Chem* 285:28419-28424

6. Haller O, Kochs G (2011) Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like GTPase with Broad Antiviral Activity. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 31:79-87
7. Haller O, Staeheli P, Kochs G (2009) Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses. *Rev Sci Tech* 28:219-231
8. Hamano E, Hijikata M, Itoyama S, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha LD, Ban VV, Matsushita I, Yanai H, Kirikae F, Kirikae T, Kuratsuji T, Sasazuki T, Keicho N (2005) Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population. *Biochem Biophys Res Commun* 329:1234-1239
9. Hijikata M, Mishiro S, Miyamoto C, Furuichi Y, Hashimoto M, Ohta Y (2001) Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro. *Intervirology* 44: 379-382.
10. Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S (2000) 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* 43:124-127
11. Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Hennig BJ, Hellier S, Zhang L, Wright M, Chiamonte M, Graves M, Thomas HC, Hill AV, Thursz MR (2003) Polymorphisms

- in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun* 4:411-419
12. Kong XF, Zhang XX, Gong QM, Gao J, Zhang SY, Wang L, Xu J, Han Y, Jin GD, Jiang JH, Zhang DH, Lu ZM (2007) MxA induction may predict sustained virologic responses of chronic hepatitis B patients with IFN-alpha treatment. *J Interferon Cytokine Res* 27:809-818
13. Lee SH, Vidal SM (2002) Functional diversity of the Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Res* 12:527-530
14. Peng XM, Lei RX, Gu L, Ma HH, Xie QF, Gao ZL (2007) Influences of MxA gene -88 G/T and IFN-gamma +874 A/T on the natural history of hepatitis B virus infection in an endemic area. *Int J Immunogenet* 34:341-346
15. Ronni T, Matikainen S, Lehtonen A, Palvimo J, Dellis J, Van Eylen F, Goetschy JF, Horisberger M, Content J, Julkunen I (1998) The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res* 18:773-781
16. Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Takagi K, Satoh J, Kumada H (2004) Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J Viral Hepat* 11:271-276

17. Tazi-Ahnini R, di Giovine FS, McDonagh AJ, Messenger AG, Amadou C, Cox A, Duff GW, Cork MJ (2000) Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Hum Genet* 106:639-645

18. Torisu H, Kusuhara K, Kira R, Bassuny WM, Sakai Y, Sanefuji M, Takemoto M, Hara T (2004) Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 62:457-460

19. Tran Thi Duc T, Desmecht D, Cornet A (2012) Detection of new biallelic polymorphisms in the human MxA gene. *Mol Biol Rep*, in press.

Table 1 — Variants of *MxA* gene proximal promoter tested in this study

Construct	-309	-123	-101	-88	20
#1	C	C	G	G	C
#2	C	C	A	G	C
#3	G	C	G	G	C
#4	C	A	G	T	A
#5	C	A	G	T	C
#6	C	A	A	T	A
#7	C	A	A	T	C
#8	G	A	G	T	A
#9	G	A	G	T	C

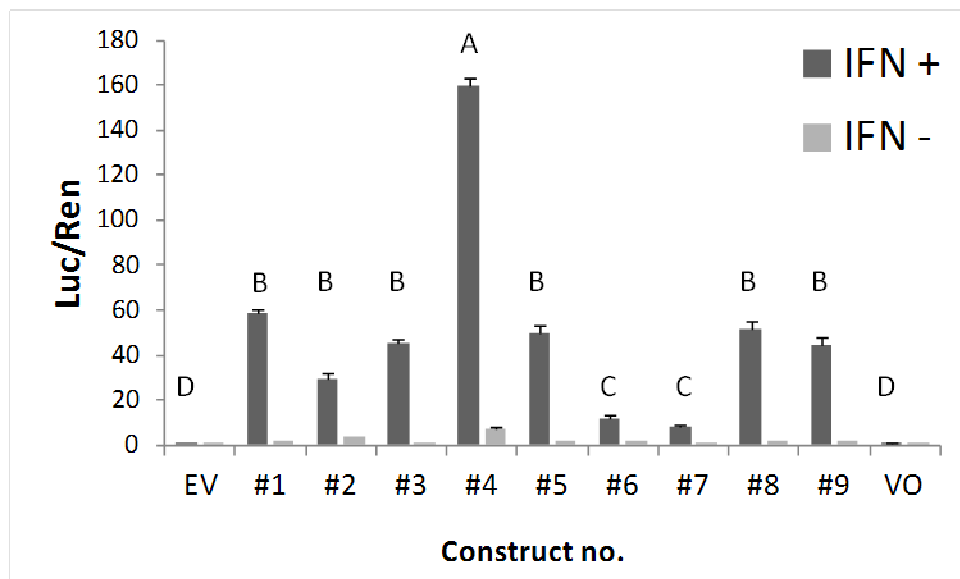


Fig. 1 — Luciferase assay of *MxA* gene proximal promoter region. Luciferase/Renilla ratio refers to the ratio between Luciferase luminance as pGL3-basic plasmid activity (namely, activity of *MxA* gene promoter region) and Renilla luminance as pRL-TK plasmid activity (namely, internal control). Open columns, untreated cells; black columns, cells exposed to 1000 units of IFN α per ml medium for 24 h. Sets of data were compared by regular one-way ANOVA followed by the Bonferroni post test. Reporter gene expression was similar for constructs with same letter ($p > 0.05$) and was significantly different between those with different letters, with $A > B$ ($p < 0.001$), $B > C$ ($p < 0.01$) and A, B and $C > D$ ($p < 0.001$). EV, empty vector; VO, vector omitted.

Discussion générale

Même si plusieurs polymorphismes alléliques au locus *MxA* humain étaient connus, l'ensemble des haplotypes possibles n'en restait pas moins indéterminé. Un inventaire des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) a donc été entrepris au sein du laboratoire au départ d'une cohorte de plusieurs centaines d'individus d'origine africaine, asiatique et européenne. Selon les données disponibles dans la littérature, aucune étude de polymorphisme n'avait été réalisée à ce jour sur la population africaine.

Nous avons montré que le patron allélique d'une population donnée permet de la distinguer des autres populations. Par exemple, les variations alléliques en position +20A (rs464138) et +26580 (rs469304) sont plus fréquemment présentes dans la population asiatique que dans les autres populations étudiées.

Nos résultats indiquent que les variations alléliques aux positions -123 (rs17000900) et -88 (rs2071430) sont les plus fréquemment rencontrées dans les trois populations inventoriées. La double homozygotie CC à la position -123 et GG en position -88 prédomine dans les trois populations. Ces résultats sont en accord avec la tendance dégagée des études de Hijikata et collaborateurs (Hijikata *et al.*, 2000; Hijikata *et al.*, 2001). A la position +20, c'est l'allèle C qui est le plus fréquemment rencontré, ce qui est cette fois en accord avec la variation décrite dans l'étude de Furuyama (Furuyama *et al.*, 2006).

Nous avons identifié quatre nouveaux polymorphismes, deux situés dans la région du promoteur et deux en région codante aux positions +15523 et +15561, plus précisément dans la partie traduite du gène (de l'exon 5 jusqu'au milieu de l'exon 17). Les deux polymorphismes localisés aux positions -309 et en -101 que nous avons détectés sont uniquement présents dans la population africaine. Il est important de noter que le

polymorphisme identifié à la position +15523 peut engendrer un changement important puisque la glycine serait remplacée par l'acide glutamique à la position 255 de la protéine si l'allèle concerné sert de matrice pour produire la protéine MxA. Des études ultérieures devraient alors être réalisées afin de déterminer si la substitution glycine/glutamine (Gly/Glu) provoque des différences structurelles ou fonctionnelles importantes, même si, à l'heure actuelle, aucune donnée extraite de la littérature ne permet d'affirmer que la position 255 soit stratégique notamment dans l'activité antivirale de la protéine MxA (Haller *et al.*, 2010). D'autre part, un individu d'origine africaine a été identifié comme étant homozygote pour le nouvel allèle que nous avons détecté à la position +15561 G/A. Nous observons que ce polymorphisme n'engendre, en principe, qu'un changement mineur puisqu'il n'induit que la substitution d'une valine par une méthionine (Val/Met). Ces deux substitutions sont situées dans le domaine N-terminal de la protéine MxA humaine et pourraient directement affecter sa fonction antivirale. Les données structurelles disponibles ne sont pas suffisantes pour prédire que les fonctions spécifiques de la protéine MxA pourraient être modifiées par ces variations (Gao *et al.*, 2011). Néanmoins, les scores obtenus pour les deux substitutions, via la matrice BLOSUM 62 permettant de déterminer leurs impacts potentiels sur la structure de la protéine (Henikoff et Henikoff, 1992), ont révélé que la variation Gly255Glu pourrait significativement affecter la structure de la protéine MxA, le score étant de -2, tandis que la variation Val268Met ne l'affecterait pas, vu que le score obtenu est de +1.

En ce qui concerne les nouveaux polymorphismes alléliques détectés dans le promoteur (-309 et -101) et à l'instar des corrélations qui ont été examinées entre les deux premiers polymorphismes identifiés par ailleurs (-123 et -88) et le niveau d'expression de MxA, le risque spécifique de contracter certaines maladies ou le niveau de morbidité associé à telle ou telle maladie (Hijikata *et al.*, 2000 ; Hijikata *et al.*, 2001 ; Suzuki *et al.*, 2004 ; Kong *et al.*, 2007), ils devraient faire l'objet d'études approfondies semblables puisqu'ils pourraient aussi affecter le contrôle de l'expression de la protéine MxA. Par exemple, une différence extrêmement significative dans la distribution des allèles G/T en -88 a été observée entre patients qui éliminent le virus de l'hépatite B et patients qui développent une hépatite B chronique (Peng *et al.*, 2007). On peut donc supposer que, à terme, l'utilisation des SNP présents dans le promoteur du gène MxA conduira à des découvertes importantes dans le domaine des relations hôte-pathogène.

Dans la même veine, la possession de l'haplotype AG (-123A et -88G) corrèle positivement avec la susceptibilité à l'hépatite B (Cao *et al.*, 2009). De plus, une faible fréquence du génotype -88 GG a été observée chez les porteurs sains de l'hépatite C et chez les patients ne répondant pas à la thérapie à l'interféron pegylé (Knapp *et al.*, 2003). Chez les Japonais, le génotype -88 G/T semble conférer une susceptibilité génétique à développer des panencéphalites sclérosantes subaiguës (Torisu *et al.*, 2004). En outre, une augmentation significative de la fréquence de l'haplotype -123A/-88T, en corrélation avec la surexpression de MxA, a été observée dans de multiples cas de sclérose en plaques (Furuyama *et al.*, 2006). En ce qui concerne le SRAS (*severe acute respiratory syndrome*) à coronavirus, les porteurs de l'allèle -123A seraient significativement moins menacés de développer cette infection (Ching *et al.*, 2010), le portage du génotype GT à la position -88 serait associé à une susceptibilité augmentée (He *et al.*, 2006) et les patients devenant hypoxémiques seraient plus fréquemment porteurs du génotype GG à la position -88 (Hamano *et al.*, 2005). Ce florilège de résultats nous a conduits à considérer que la mesure de l'impact fonctionnel des polymorphismes nouvellement découverts sur le fonctionnement du promoteur MxA était une priorité. En effet, on n'imagine pas utiliser ces nouveaux marqueurs dans des études d'association s'ils n'ont pas d'impact sur le contrôle de l'expression de la protéine MxA.

La variation que nous avons découverte en position -101 présente un intérêt particulier parce que l'allèle « A » reconstitue un motif ISRE (*Interferon Sensitive Response Element*) situé dans le promoteur de MxA, ce qui devrait théoriquement augmenter son expression chez les patients traités à l'interféron α , β ou λ . En effet, les gènes *Mx* étudiés possèdent tous plusieurs copies de motifs ISRE au niveau de leur région promotrice (Hug *et al.*, 1988 ; Chang *et al.*, 1991 ; Schumacher *et al.*, 1994 ; Gerardin *et al.*, 2004 ; Thomas *et al.*, 2006). La présence de ces motifs rend l'expression des gènes *Mx* dépendante de la présence d'interférons de type I (Staheli *et al.*, 1984 ; Aebi *et al.*, 1989 ; Goetschy *et al.*, 1989). En raison de l'implication directe des gènes *Mx* dans le processus de la réponse cellulaire interféron-dépendante, les études génétiques menées sur le gène *MxA* humain ont systématiquement été orientées vers une recherche des variations alléliques dans un contexte pathologique. Ces études ont le plus souvent été menées dans le but de corrélérer la réponse au traitement à l'interféron d'un individu à un polymorphisme particulier, ciblant plus particulièrement une partie du

promoteur (Hijikata *et al.*, 2000 ; Hijikata *et al.*, 2001 ; Suzuki *et al.*, 2004 ; Torisu *et al.*, 2004 ; Furuyama *et al.*, 2006). En effet, plusieurs études ont démontré la corrélation de l'expression de la protéine MxA en réponse à l'interféron en fonction des polymorphismes situés aux positions -123 et -88 (Hijikata *et al.*, 2000 ; Hijikata *et al.*, 2001 ; Knapp *et al.*, 2003 ; Torisu *et al.*, 2004 ; Furuyama *et al.*, 2006). Des analyses, *in vitro*, ont été menées afin de comparer l'activité du promoteur entre, d'une part, la séquence avec les homozygotes C (-123) G (-88) et d'autre part celle avec A (-123) T (-88) à l'aide d'une approche gène-rapporteur. Les résultats montrent que l'activité du promoteur de MxA est plus importante lorsque les allèles -123/A et -88/T sont présents plutôt que les allèles -123/C et -88/G, ce qui démontre que le polymorphisme du promoteur de MxA a une influence significative sur la réponse au traitement de l'hépatite C par IFN (Hijikata *et al.*, 2001).

Dans notre étude, nous avons réalisé neuf constructions représentant diverses combinaisons des cinq polymorphismes localisés aux positions -309 (C/G), -123 (A/C), -101 (A/G), -88 (G/T) et +20 (A/C). Ce faisant, nous avons montré que tous ces polymorphismes affectent le taux d'expression, y compris les nouveaux. Dès lors, nous pensons qu'il est fondé d'engager des études d'association entre la détention de tel ou tel allèle à ces trois nouvelles positions et la présentation clinique des maladies virales en général.

Perspectives

Ce travail constitue la première étude systématique des polymorphismes alléliques présents au niveau du gène *MxA* dans les trois principales populations humaines. Nos résultats ont montré que la diversité allélique dans la région promotrice du gène *MxA* peut modifier significativement la régulation de l'expression de la protéine antivirale *MxA* en présence des interférons de type I et III. En outre, nous avons démontré que, à côté des deux variants connus : -123 (C/A) et -88 (G/T), trois nouveaux polymorphismes (-309 (C/G), -101 (G/A) et +20 (A/T)) contrôlent le niveau d'expression de la protéine *MxA*.

Nos résultats permettent d'améliorer la justesse des génotypages qui sont actuellement prescrits en clinique pour prédire la réactivité des patients infectés par l'hépatite C aux interférons de type I.

Il serait intéressant de poursuivre notre étude sur un plus grand nombre d'individus de la population africaine, notamment parce qu'il n'est pas impossible que l'inventaire des variants existant dans cette population reste incomplet. De même, il serait intéressant d'étudier l'influence sur l'activité antivirale des deux nouveaux polymorphismes localisés aux positions +15523 (G/A) et +15561 (G/A) de la région codante du gène *MxA* puisqu'ils causent deux substitutions dans la séquence protéique de la protéine *MxA*.

Les nouveaux polymorphismes que nous avons détectés pourraient aussi permettre de découvrir de nouvelles associations entre prévalence de maladies virales spécifiques, manifestations cliniques, pronostic vital et nouveaux variants alléliques du gène *MxA*.

NOTES

NOTES

