



Doctoral Thesis

## Interferon-induced Mx proteins

**Author(s):**

Bazzigher, Luigi G.

**Publication Date:**

1992

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000666076> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 9650

**Interferon-Induced Mx Proteins:  
1) Virus-Induction of the Mouse Mx1 Protein  
2) cDNA Cloning and Characterization of the  
Duck Mx Protein**

A dissertation submitted to the  
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH**

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

**LUIGI G. BAZZIGHER**

Dipl. Natw. ETH

born May 13, 1951

citizen of Vicosoprano (Graubünden)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H. Hennecke, examiner  
Prof. Dr. P. Stäheli, co-examiner

Zürich 1992

---

## Summary

---

Infection of cells with virus leads to quick production and secretion of interferon (IFN). IFN in turn stimulates a set of responsive genes, whose products are responsible for the antiviral state. The IFN-induced mouse Mx1 protein accumulates in the cell nucleus, where it blocks influenza virus replication. Mice that carry mutations in the Mx1 gene are highly susceptible to infections with influenza virus. Mx genes were found in all mammalian species analyzed to date. A virus-inducible Mx gene was also identified in fish.

Some IFN-regulated genes can be activated by virus in a direct, IFN-independent way. It was postulated that this primary virus-mediated response might play a crucial role in virus defense. Accordingly, we hypothesized that virus-induced Mx protein might delay the production of infectious viral particles, thus giving the IFN system some extra time to develop the antiviral state. The first part of the present Ph. D. thesis work deals with this aspect of the Mx system.

To distinguish primary response to virus from the autocrine action of virus-induced IFN, the following strategies were chosen: (a) use of cell lines with defective IFN receptors, (b) use of cell lines with deleted IFN genes, and (c) treatment of normal cells with cycloheximide to block protein synthesis and thus synthesis of virus-induced IFN. In contrast to the two human IFN-regulated genes ISG15 und ISG56, the human MxA gene showed almost no primary response to Newcastle disease virus (NDV) or influenza virus. Similarly, direct activation of the mouse Mx1 gene by NDV or influenza virus was not significant in mouse embryo cells or explanted peritoneal macrophages. A moderate primary Mx1 response to NDV was observed in the permanent cell line L1210. Taken together these results indicate that primary response to virus does not play a significant role in the Mx-mediated resistance to viral disease.

Still, the remote possibility existed that virus-induced IFN could act from inside the cell despite nonfunctional receptors. However,

---

constitutively expressed IFN- $\alpha$ 5 in receptorless HEC-1B cells did not lead to activation of the IFN-responsive gene ISG15. Thus, binding of IFN to a functional IFN receptor is mandatory for proper function.

In the second part of this work the question of whether Mx genes exist in birds was addressed. cDNAs encoding duck Mx protein were cloned using polymerase chain reaction. Two allelic forms of duck Mx cDNA were isolated. These cDNAs hybridized to virus-induced duck mRNAs of 2.3 und 2.5 kb length. The difference in length of these transcripts was shown to result from alternative polyadenylation. Duck Mx protein showed a high degree of sequence homology to all known Mx proteins. Like mammalian Mx proteins it contained a GTP-binding consensus sequence in its amino-terminal moiety. A leucine zipper motif was found near its carboxy-terminus. Duck Mx protein lacked a characteristic nuclear transport motif. Using antibodies to *E.coli*-produced fusion protein, duck Mx protein was found to exhibit a non-typical nuclear and cytoplasmic staining pattern. To test whether the duck Mx protein could confer selective resistance independent of IFN action, its cDNA was expressed constitutively in mouse 3T3 cells. The two allelic forms of duck Mx protein both failed to inhibit influenza virus replication in transfected mouse cells.

---

## Kurzfassung

---

Virusinfektionen von Zellen führen in Kürze zu Produktion und Sekretion von Interferon (IFN). Dieses stimuliert in nichtinfizierten Nachbarzellen eine Reihe von Genen, deren Produkte den antiviralen Zustand bewirken. Das IFN-induzierte Mx1-Protein der Maus reichert sich im Zellkern an, wo es die Replikation von Influenza Viren blockiert. Mausstämme, welche Mutationen im Mx1-Gen aufweisen, sind im höchsten Grad gegen Influenza Viren empfindlich. Mx-Gene wurden in allen bis heute untersuchten Säugetierarten gefunden. Ein virus-induzierbares Mx-Gen wurde auch in Fischen identifiziert.

Einige der IFN-regulierten Gene können auch direkt durch Virus aktiviert werden. Es wurde postuliert, dass diese primäre, durch Virus vermittelte Antwort eine entscheidende Rolle in der Virusabwehr spielen könnte. Virus-induziertes Mx-Protein könnte die Produktion infektiöser Viruspartikel verzögern, und damit dem IFN-System zusätzliche Zeit für den Aufbau des antiviralen Zustands geben. Dieser Aspekt des Mx-Systems wurde im ersten Teil dieser Arbeit behandelt.

Zur Unterscheidung von primärer Antwort und sekundärer autokriner Wirkung von virusinduziertem IFN, wurden folgende Strategien gewählt: (a) Verwendung von Zelllinien mit defektem IFN-Rezeptor, (b) Verwendung von Zelllinien mit deletierten IFN-Genen, und (c) Behandlung von normalen Zellen mit Cycloheximid, um die Proteinsynthese zu unterbrechen und damit auch die Synthese von virusinduziertem IFN. Im Gegensatz zu den beiden humanen IFN-regulierten Genen ISG15 und ISG56, zeigte das humane MxA-Gen kaum eine primäre Antwort nach Infektionen mit Newcastle disease Virus (NDV) oder mit Influenza Virus. Eine signifikante direkte Aktivierung des Mx1-Gens der Maus durch NDV oder durch Influenza Virus konnte weder in Mausembryozellen noch in explantierten Makrophagenzellen festgestellt werden. Einzig in der permanenten Zelllinie L1210 konnte eine leichte Stimulierung von Mx1 mRNA gemessen werden. Diese Resultate zeigen, dass die direkte Induktion durch Virus für die Mx-

---

abhängige Resistenz bedeutungslos ist.

Es bestand die Möglichkeit, dass IFN intrazellulär und unabhängig von membranständigen IFN-Rezeptoren wirken könnte. Allerdings konnte konstitutiv in rezeptorlosen HEC-1B Zellen exprimiertes IFN- $\alpha$ 5 keine ISG15 mRNA stimulieren. IFN muss also an seinen Rezeptor binden um Wirkung zu zeigen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Frage nach aviären Mx Genen untersucht. Mit Hilfe der "polymerase chain reaction" konnten cDNAs, welche für das Mx-Protein der Ente kodieren, kloniert werden. Zwei allelische Formen konnten unterschieden werden. Diese hybridisierten an virus-induzierte Enten-mRNAs von 2.3 und 2.5 kb Länge. Es konnte aber gezeigt werden, dass der Unterschied in der Länge dieser Transkripte durch alternative Polyadenylierung entsteht. Das Mx-Protein der Ente wies einen hohen Grad von Sequenz-Homologie zu allen bekannten Mx-Proteinen auf. Wie Mx-Proteine von Säugern enthält es eine Konsensussequenz für GTP-Bindung in der amino-terminalen Region. Das Sequenzmotif für einen Leucin-Reißverschluss wurde beim Carboxy-Terminus gefunden. Das Enten Mx-Protein wies kein charakteristisches Kerntransport-Signal auf. Mit Antikörpern gegen in *E.coli* produziertes Fusions-Protein wurde eine nicht-typische nukleäre und zytoplasmatische Verteilung des Enten-Mx-Proteins gefunden. Um die antivirale Wirkung des Mx-Proteins der Ente zu testen, wurde die cDNA konstitutiv in Maus 3T3-Zellen exprimiert. Allerdings konnte keine der beiden cDNAs die Replikation von Influenza Viren in Mauszellen verhindern.