

O JUMĂTATE DE SECOL DE CERCETARE ÎN DOMENIUL INTERFERONILOR

Half a Century of Research in the Field of Interferons

Marius Cornițescu¹, Teodora Cornițescu²

¹Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau“ al Academiei Române, București, România

²University of Giessen Lung Center (UGLC), Germania

REZUMAT

Interferonii reprezintă glicoproteine semnalizatoare sintetizate de celulele organismelor vertebrate ca răspuns la detecția unor modele moleculare asociate patogenilor și care transmit în mediul tisular mesajul inductor al unor stări celulare refractare pentru replicarea acestora.

Existența interferonilor a fost postulată acum mai mult de o jumătate de secol, iar timpul scurs de atunci a adus un flux continuu de informații privind proprietățile lor și privind mecanismele prin care își desfășoară acțiunea. Prezentul articol trece în revistă principalele etape din procesul de descifrare a mecanismelor de acțiune ale interferonilor și oferă o imagine de ansamblu asupra cunoștințelor acumulate.

Cuvinte cheie: interferoni.

ABSTRACT

Interferons are signaling glycoproteins synthesized by the cells of vertebrate organisms in response to the detection of pathogen-associated molecular patterns that transmit into the tissular environment the inducing message for cellular states refractory to the pathogen replication.

The existence of interferons was postulated more than half a century ago and the passed time brought a continuous flux of information regarding their properties and mechanisms of action.

The present article reviews the main events that occurred in the deciphering of the mechanisms of action of interferons and gives an overview of the accumulated knowledge.

Key words: interferons.

Interferonii sunt glicoproteine cu rol de declanșare a unor mecanisme celulare de apărare produse, la majoritatea vertebratelor, ca răspuns la detecția în celule a unor modele moleculare percepute ca străine organismului (în general componente microbiene).

Interferonii aparțin clasei mari de glicoproteine citokine, fiind primele citokine purificate la omogenitate, clonate, secvențiate complet, produse în formă recombinantă și aplicate clinic pe scară largă.

I. ISTORICUL CERCETĂRII ÎN DOMENIUL INTERFERONILOR

Postularea existenței interferonilor

În anumite condiții experimentale, celulele animale infectate cu un virus nu susțin creșterea unui al doilea virus, înrudit sau nu. Acest fenomen de inhibiție de către un virus a replicării altui virus, cunoscut sub numele de **interferență virală**, a fost observat de mult timp. În 1804, medicul britanic Edward Jenner, inițiatorul în medicină al metodei

Adresa de corespondență:

Marius Cornițescu, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau“, Șos. Mihai Bravu, Nr. 285, Sector 3, București
email: mariuscornitescu@yahoo.com

vaccinării, comunica într-o scrisoare către editor în revista *Medical and Physical Journal* că „afecțiunile herpetice au împiedicat deseori virusul vacinal să își producă activitatea corectă“ (56).

Fenomenul de interferență virală a fost pentru prima dată numit astfel de către cercetătorii britanici Gerald Findlay și Frank MacCallum în 1937. Aceștia au observat că infecția cu virusul febrei Văii Rift a protejat maimuțele de infecția cu virusul neînrudit al febrei galbene (25).

În anii 1940 virusologii americani Werner și Gertrude Henle au arătat că fenomenul de interferență poate fi studiat convenabil în oul de găină embrionat (45). Folosirea acestui sistem evita factori complicanți de la experimentele pe animale de laborator, precum faptul că animalele de laborator dezvoltă adesea infecții supraadăugate, cu agenți greu de detectat; de asemenea, sistemul imun la păsări este mai puțin complicat decât la mamifere, iar oul de găină este un sistem experimental mai ușor de manipulat și mai economic decât cel reprezentat de animalele de laborator. Multe experimente esențiale privind interferența virală, inclusiv experimentele din 1957 ale lui Isaacs și colab., au fost desfășurate pe modelul oului de găină embrionat.

În anii 1950 au fost **evaluate mai multe posibile explicații pentru fenomenul de interferență virală:**

(1) **Anticorpul neutralizant induși de virusul inductor.** Această explicație poate fi rapid exclusă, având în vedere că fenomenul de interferență se observă la câteva ore după tratamentul cu virusul inductor și, în plus, se manifestă nu numai împotriva unui virus de același tip (interferență homotipică), ci și împotriva virusurilor de tipuri diferite (interferență heterotipică).

(2) **Consumul de către virusul inductor a unor factori ai gazdei esențiali pentru replicarea virusului secund (interferat).** Aceasta era explicația unanim acceptată în anii 1950 pentru fenomenul de interferență virală, înainte să fie afirmată existența „interferonului“.

(3) **Sinteza activă de către gazda infectată cu virusul inductor a unor factori care induc, pentru o perioadă de timp, o stare refractară față de o nouă infecție virală.** Această explicație a fost postulată în anii 1950 de două grupuri independente de cercetători, un grup de la Universitatea Tokio, Japonia, și un grup de la National Institute for Medical Research, Marea Britanie.

În încercarea de a dezvolta un vaccin îmbunătățit pentru variolă, doi virusologi japonezi, **Yasuichi Nagano și Yasuhiko Kojima**, de la

Institutul pentru Boli Infecțioase al Universității din Tokyo, au efectuat experimente în care inoculau cutanat iepuri cu virus variolic inactivat prin iradiere cu lumină ultravioletă, iar după un interval administrau la același sit virus variolic viu și urmăreau reacția tisulară la 7 zile post-infecția cu virus viu. Virusul variolic folosit pentru inducția interferenței era produs tot pe iepure, recoltat sub formă de omogenate tisulare și apoi inactivat. Cercetătorii japonezi au observat că exista o diferență între gradul de inducție a interferenței de către omogenate inductoare recoltate la 3, respectiv 5 zile postinfecție (omogenatul de la 5 zile având activitate inductoare a interferenței crescută), deși titrurile virale din omogenate erau aceleași. Ei au emis ipoteza că acest lucru s-a întâmplat din cauza sintezei de către gazdă a unui „factor inhibitor viral“ și au început să îl caracterizeze prin fracționarea prin ultracentrifugare a omogenatelor tisulare inductoare. Au publicat aceste descoperiri în 1954 în revista franceză *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* (cu nume schimbat în 1999 în *Journal de la Société de Biologie*) (85).

Deși această lucrare a demonstrat că activitatea de interferență a replicării (și deci factorul „inhibitor viral“) era asociată unei fracțiuni moleculare separabile de particulele virale, nu a putut explica faptul că au obținut cu această fracțiune inducția de anticorpi antivirali. O altă lucrare, din 1958, care a descris folosirea unei triple ultracentrifugări a omogenatului, a demonstrat că factorul inhibitor a fost distinct de particulele virale și că imunizarea antivirală din experimentele din 1954 se datorase unei contaminări cu urme virale a fracțiunii „inhibitoare virale“ (86).

Din păcate, munca lui Nagano nu a fost apreciată pe deplin de-a lungul timpului, meritul pentru descoperirea interferonului atribuindu-li-se în general lui Isaacs și Lindenmann.

Virusologul britanic **Alick Isaacs** și cercetătorul elvețian **Jean Lindenmann**, de la National Institute for Medical Research din Londra, au emis ipoteza existenței unui factor de interferență virală produs de gazda infectată, studiind interferența produsă de virusul gripal inactivat termic asupra creșterii virusului gripal viu în membrane corioalantoidiene de ou de găină aflate într-o soluție nutritivă.

Studiul interferenței induse de virusurile gripale inactivate termic asupra replicării virusurilor gripale vii în ouăle de găină embrionate era un subiect de cercetare mai vechi al lui Isaacs. Acesta publicase anterior lucrări cu colaboratori din Australia folosind acest sistem experimental (51 și

seria). La mijlocul anilor 1950 Isaacs conducea la Londra laboratorul World Influenza Centre, stabilit de National Institute for Medical Research în colaborare cu Organizația Mondială a Sănătății drept centru al unei rețele globale de laboratoare colaboratoare pentru studiul virusurilor gripale. Împreună cu cercetătorul postdoctoral elvețian Jean Lindenmann, Isaacs a stabilit un sistem nou de lucru, în care foloseau fragmente de membrană corioalantoidiană de ou de găină, în mediu nutritiv, în loc de ouă de găină embrionate întregi, pentru a scădea efortul financiar și uman implicat de experimentele pe un număr mare de ouă de găină embrionate. În 1956 Isaacs și colab. au desfășurat experimente în care incubau timp de câteva ore fragmente de membrană corioalantoidiană cu virus gripal inactivat, în mediu nutritiv, după care înlocuiau în același mediu fragmentele incubate, cu altele noi, iar fragmentele incubate le introduceau în tuburi cu mediu proaspăt. Infectau la acest moment cu virus viu atât membranele noi, aflate în mediul vechi, cât și membranele vechi aflate în mediu nou și membrane care fuseseră păstrate în mediu nutritiv, fără contact cu virusul inactivat. Au determinat titrurile virusului viu obținute în toate tuburile la 24 de ore post-inoculare. Au detectat titruri asemănătoare în membranele vechi (incubate cu virusul inactivat) și în membranele noi (introduse în mediul în care fuseseră incubate membranele vechi). Aceste valori erau inferioare titrurilor din tuburile control, unde virusul viu replicase pe membrane care nu avuseseră contact cu virusul inactivat.

Întrucât fenomenul de interferență avea nevoie pentru producere de câteva ore de expunere a membranei la virusul inactivat, faptul că membranele nou introduse în mediul vechi au fost protejate la fel ca acelea incubate timp de ore l-a făcut pe Isaacs să formuleze ipoteza că membranele vechi au eliberat în mediu un factor care a protejat membranele noi împotriva infecției cu virusul viu. Astfel, fenomenul de interferență nu s-ar fi bazat exclusiv pe modificări biochimice în membranele incubate cu virus inactivat, ci și pe eliberarea în mediu a unui factor interferent, protector. Deși unele dintre explicațiile sugerate de Lindenmann pentru fenomenul de interferență observat au fost modificarea pH-ului soluției sau consumul unor factori esențiali din mediu, Isaacs a persistat în ideea producției active de către membranele incubate a unui factor de interferență virală, care a acționat asupra membranelor nou introduse în acel mediu.

Isaacs și colab. au publicat în 1957 două articole, în care descriau „interferonul“ drept factor

eliberat în mediul de cultură în urma incubării fragmentelor de membrană corioalantoidiană cu virusuri gripale inactivate și a cărui prezență era recunoscută prin capacitatea de a induce un efect inhibitor asupra creșterii unui număr de specii virale diferite în fragmentele proaspete de membrană (52 și seria). Astăzi agentul interferent din experimentele din 1957 ale lui Isaacs este cunoscut drept „interferon de tip I“.

Experimente ulterioare au tatonat condițiile necesare pentru obținerea unor concentrații crescute ale factorului interferon și au urmărit identificarea naturii lui și a activității față de diferitele tipuri virale. Isaacs și echipa au arătat că puteau obține în cantități crescute soluții ce conțineau interferon (de fapt, preparate proteice în care interferonul reprezenta o mică fracție, așa cum urma să se descopere ulterior), că interferonul era probabil de natură proteică și că interferă cu creșterea virusurilor nu numai in vitro, ci și in vivo (la iepuri) (76).

Deși articolele din 1957 privind interferonul, ale lui Isaacs și colab. au fost receptate cu scepticism de lumea științifică, atât în Europa, cât și în America, interesul arătat de firmele farmaceutice față de un asemenea produs cu potențial de comercializare a făcut ca în Anglia să se realizeze un consorțiu public-privat pentru patentarea și exploatarea acestei descoperiri britanice (consorțiu din care făceau parte firmele Burroughs-Wellcome, Glaxo Laboratories și Imperial Chemical Industries-Pharmaceuticals). S-a dorit, astfel, să nu se repete experiența neplăcută a patentării de către americani a penicilinei descoperite de britanicul Alexander Fleming, fapt care a dus la situația cumpărării, inclusiv de către utilizatorii britanici, a antibioticului de la firmele americane. Munca pentru strângerea volumului de date experimentale necesar pentru patentare s-a desfășurat în paralel, sub conducerea lui Isaacs, în laboratoarele instituțiilor de stat și private din consorțiu. Deoarece principala revendicare la patentare era aplicabilitatea la om, s-au făcut toate demersurile pentru testarea rapidă la om a interferonului obținut pe linii celulare de maimuță. În 1962 a fost efectuat primul trial clinic la om, pe voluntari (102). A fost un trial clinic aprobat cu o rapiditate imposibil de reprodus în prezent, când medicamentele ajung mult mai greu în faza de testare la om. Rezultatele trialului au fost interpretate în mod exagerat în publicația din 1962 ca demonstrând că interferonul era lipsit de efecte adverse pentru subiecții umani. Date ulterioare au contrazis această afirmație.

Sisteme de producere în cantități industriale a interferonului; descoperirea existenței unor tipuri diferite de interferoni

După publicarea în 1957 a datelor privind existența unui factor de interferență față de infecțiile virale a urmat o perioadă în care natura și proprietățile „interferonului” au fost amănunțit analizate.

Interferonul, deși indus de un anumit virus, a fost activ împotriva unor virusuri de tip diferit, fiind astfel principalul candidat pentru explicarea interferenței heterotipice. Spre deosebire de virusul variolic, folosit de Nagano și Kojima, care are genom ADN, virusul gripal, folosit de Isaacs și Lindenmann, are un genom ARN. Astfel, rezultatele experimentelor de interferență virală au arătat încă de la începutul dezvoltării domeniului de cercetare că acest tip de răspuns al organismelor superioare la detecția agenților infecțioși este un mecanism de apărare cu spectru larg.

S-a observat că activitatea interferonului a fost distrusă de expunerea la proteaze și nu la nucleaze, ceea ce a sugerat foarte puternic faptul că acest factor era, cel puțin parțial, de natură proteică.

Interferonul obținut în experimentele inițiale a rezistat acidifierii la pH2, o proprietate care a fost mai departe utilă pentru purificarea sa, deoarece le-a permis cercetătorilor să distrugă ușor din mediul de cultură multe impurități, inclusiv urmele de virus infecțios folosit pentru inducție (ulterior s-a văzut că doar interferonii tip I erau rezistenți la pH 2, nu și interferonul tip II, la care tratamentul acid distruge conformația dimerică activă; această proprietate a contribuit încă de la început la diferențierea interferonilor de tip I și II).

O proprietate importantă a interferonului a fost specificitatea de specie, demonstrată în 1959 de faptul că interferonul obținut pe celule de vițel a fost inactiv pe celule de găină și invers (120). Această proprietate a oferit unele indicii privind faptul că interferonul nu acționează direct asupra virusului, ci interacționează cu structuri tip receptor ale celulelor țintă, care au particularități în funcție de specie.

Descifrarea proprietăților interferonilor a fost posibilă în anii 1960, într-o epocă în care nu apăruseră tehnicile de clonare a acizilor nucleici, doar prin perseverența unor laboratoare excepționale care au purificat factorul de interferență după inducția unor cantități masive de celule. A fost nevoie de operațiuni de mare amploare pentru obținerea interferonilor pentru că, așa cum avea să se dovedească, aceste citokine sunt prezente în

țesuturi în cantități infime, datorită potenței semnului indus de ele.

Cea mai avansată unitate de producție a interferonului uman prin inducția culturilor celulare a fost cea înființată la începutul anilor 1960 de **Kari Cantell de la National Blood Transfusion Service din Helsinki, Finlanda**. În această țară, spre deosebire de modul de organizare din restul emisferei vestice, colectarea de sânge de pe tot teritoriul a fost centralizată în capitală. Având la dispoziție mari cantități de sânge uman, Kari Cantell a elaborat un **sistem de producție a interferonului pe limfocite umane**, cărora le-a indus sinteza prin expunere la virus Sendai crescut pe embrioni de găină. Virusul Sendai nu crește pe limfocite umane, dar este un puternic inductor al interferonului în acest sistem.

Deși sistemul de producție a interferonului uman pe leucocite a fost reprodus în alte țări, nu s-a atins scala de producție a unității de la Helsinki. Era evident că era nevoie de o metodă alternativă de producție și s-a recurs la obținerea interferonului pe linii celulare umane imortalizate. Spre deosebire de zilele noastre, când metodele de menținere a culturilor celulare sunt bine puse la punct și există experiență în cultivarea celulelor în volume foarte mari în firmele de biotehnologii, la începutul anilor 1970 situația era cu totul alta. Două provocări au trebuit tratate: provocarea de a optimiza condițiile experimentale pentru a induce un nivel cât mai crescut al sintezei de interferon în celule și provocarea de a obține linii celulare stabile pentru cultura în volume mari.

Liniile celulare continue umane cunoscute la acel moment s-au dovedit neadecvate pentru sarcina propusă, singurul sistem potrivit identificat fiind reprezentat de **fibroblaste umane diploide din piele**. Pentru menținerea în cultură a acestor celule s-au folosit medii de cultură de cea mai bună calitate, bine standardizate, și ser fetal bovin, care, la acel moment, era un component al mediului de cultură neobișnuit și scump. De fapt, sistemele de cultură au evoluat la începutul anilor 1970 și datorită provocării de producere a interferonilor în cantități mari. În anii 1971-1972, mai multe laboratoare de cercetare din SUA, Europa și Japonia au stabilit unități de producție relativ mari pentru interferonul fibroblastic uman (72, 123).

Criteriul de comparație pentru evaluarea capacității de producție a interferonului din fibroblaste umane în aceste laboratoare a fost capacitatea de producție a interferonului din leucocite în unitatea de la Helsinki. Totuși, după un timp s-au acumulat tot mai multe **dovezi că „interferonul fibroblastic”**

și „interferonul leucocitar“ erau de fapt entități moleculare distincte. O observație importantă care a contribuit la această concluzie a fost aceea că antiserurile împotriva interferonilor parțial purificați, fibroblastic și leucocitar, nu au reacționat încrucișat în teste de neutralizare (42). Aceasta a dus la **diferențierea interferonilor în IFN- α (principalul component al „IFN leucocitar“) și IFN- β (principalul component al „IFN fibroblastic“)** (111).

Întrucât interferonul obținut pe fibroblaste (IFN- β) era diferit de cel obținut pe limfocite (IFN- α), rămăsese, deci, nerezolvată problema obținerii unei surse de IFN- α , ca alternativă la extragerea din limfocitele din sângele periferic; o sursă alternativă de IFN- α a fost obținută de compania Wellcome, care a elaborat un sistem de producție a IFN- α prin inducția cu virusul Sendai a unei linii celulare limfoblastoide tip B, numită Namalwa (26).

IFN- α și IFN- β umani produși prin metodele menționate (IFN- α pe leucocite de sânge periferic sau pe celule Namalwa și IFN- β pe fibroblaste din piele) au fost folosiți pentru studii de caracterizare moleculară și pentru experimente in vivo, inclusiv în trialuri clinice la om.

În paralel cu eforturile de producere a interferonilor umani, unele laboratoare s-au concentrat asupra producției de interferon de șoarece, pentru a avea libertate experimentală mai mare în studiul proprietăților in vivo ale acestor citokine. Pentru producerea interferonilor au fost induse linii celulare continue de șoarece (precum L929, C243-3 sau celule de ascite Ehrlich) prin expunere la virusul bolii Newcastle (60, 114, 119); s-a descoperit că aceste sisteme produceau de fapt amestecuri de IFN- α și IFN- β , care au fost utile pentru caracterizarea moleculară și funcțională a interferonilor murini.

La mijlocul anilor 1960 au fost comunicate date privind **producția unor factori asemănători interferonilor deja cunoscuți, în alte circumstanțe decât infecția virală**. Spre exemplu, **leucocite umane stimulate cu fitohemaglutinină**, proliferau și eliberau un factor antiviral asemănător interferonilor „limfocitar“ și „fibroblastic“ (125). Factorul nou descoperit a diferit de interferonii induși viral prin faptul că nu rezista la expunere la pH acid 2, un tratament aplicat interferonilor induși viral, pentru a inactiva virionii reziduali. În anii 1970 s-a văzut că o proteină asemănătoare, cu efect antiviral, a fost produsă la șoarece în timpul răspunsurilor imune celulare antigen-specifice; de aceea, acest nou tip de interferon a fost numit

„**interferon tip II**“ (129) (spre deosebire de cel indus viral, numit de tip I) sau „**interferon imun**“ (22).

În 1980 un comitet internațional a căzut de acord asupra unei nomenclaturi în care **interferonii induși viral (interferonii de tip I) au fost numiți IFN- α (fostul „IFN leucocitar“) și IFN- β (fostul „IFN fibroblastic“), iar IFN de tip II sau „imun“ a fost redenumit IFN- γ** (111).

Într-o perioadă în care se căutau metode pentru producerea în cantități crescute a interferonilor, **Charles Weissmann** și colaboratorii au raportat în 1980 **clonarea și expresia unei gene pentru IFN- α uman în Escherichia Coli** (87). Câteva luni mai târziu a fost comunicat de către alte echipe un **rezultat similar pentru IFN- β uman** (17, 36, 115, 117).

Clonarea interferonilor nu ar fi fost posibilă fără optimizări anterioare ale metodelor de inducție a ARN mesager pentru interferoni în celulele eucariote și fără progresele din domeniul tehnologiei ADN recombinant (metode care au permis clonarea și expresia unor secvențe ADN străine în E. Coli).

Au fost comparate proprietățile interferonilor produși pe E. Coli cu ale celor naturali, din punct de vedere al activității antivirale, al efectelor stimulatorie pentru celulele NK, al efectelor de inhibare a creșterii celulelor tumorale (79). Din fericire, majoritatea interferonilor tip I de la om sunt în mod natural neglicozilați, cu excepția IFN- β și a două specii IFN- α (1, 89), astfel încât, în urma clonării și expresiei în E. Coli (care nu glicozilează proteine, spre deosebire de celulele eucariote) s-au obținut produși cu activitate asemănătoare interferonilor produși natural.

Speciile de interferoni α , β și γ reprezintă cele mai importante specii cunoscute și cele ale căror proprietăți au fost cel mai bine studiate. Au fost descoperite și alte specii, inclusiv un tip III de interferoni (mai multe detalii în partea a doua a prezentului articol), ale căror roluri sunt evaluate în prezent. Au fost secvențiate și comparate genele codificatoare, au fost identificați receptorii folosiți și descifrate multe etape din cascadele de inducție și de acțiune ale acestor citokine.

Studiul mecanismelor de inducție a interferonilor

De la începutul studiului interferonilor era clar că inducția acestora era mediată de contactul celulelor cu virusuri, fie ele vii sau inactivate, cu genom ADN, ca virusul variolic, folosit de Nagano și Kojima (85), sau cu genom ARN, ca virusul gripal, folosit de Isaacs și Lindenmann (52).

Se cunoșteau din anii anteriori lansării ipotezei existenței interferonilor două preparate de origine fungică, buni inhibitori ai replicării virale, numite „statolon“ și „helenină“. S-a demonstrat că interferența cu replicarea virală avea ca substrat inducția interferonului și că principiul inductor al interferonului din compoziția lor era de natură ARN dublucatenar (69), probabil provenit dintr-un micofag (virus polyhedra care infecta fungii de origine ai extraselor). Testarea unor structuri sintetice ARN dublucatenar a confirmat faptul că induceau sinteza interferonului, secvențele de tip poly-rI:rC fiind cele mai bune inductoare (24). Întrucât se credea că ARN dublucatenar este un produs exclusiv viral și se știa că majoritatea virusurilor ARN sintetizează un astfel de produs la o etapă oarecare în cursul replicării lor, s-a crezut timp de câteva decenii că ARN dublucatenar este principalul inductor al interferonului din infecțiile virale. Au fost descoperite multe mecanisme celulare centrate în jurul ARN dublucatenar – fie activate de acest tip molecular, fie care acționau asupra lui, pentru a inhiba infecțiile virale.

Deși multe date experimentale au arătat că nu numai componente virale, ci și bacteriene, precum lipopolizaharidul bacterian (LPS) (47, 112) sau lectine mitogene, precum fitohemaglutinina (125), induc interferonii, un progres enorm în înțelegerea mecanismelor de inducție a interferonilor a fost făcut abia în ultimul deceniu. Au fost descoperite în ultimii ani o pleiadă de componente ale mecanismelor de detecție a patogenilor și de inducție a sintezei de interferoni. Se cunoaște azi că există o sumă de senzori celulari, de tip Toll-like, helicaze citoplasmatică (precum RIG-I și Mda-5) sau NOD, care leagă moleculele improprii organismelor vertebrate. Aceste modele moleculare improprii sunt denumite „modele moleculare asociate patogenilor“ (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Detecția PAMP de către senzorii celulari specifici activează cascade de semnalizare al căror final este translocarea în nucleul celular a unor complexe activatoare ale transcripției și care se leagă la secvențe din promotorii genelor pentru citokine (ISRE).

Studiul mecanismelor de inducție a efectelor antivirale ale interferonilor

În timpul primului deceniu de cercetare privind interferonii, se credea că molecula interferon însăși, după intrarea în celulă și probabil după unele modificări metabolice, era inhibitorul direct al replicării virale. Specificitatea de specie a interferonilor, demonstrată în 1959 de faptul că interferonii produși

pe celule de vițel au fost inactivi pe celule de găină și invers (120) a indus pentru prima dată ideea unei posibile acțiuni a interferonilor pe structuri tip receptor de pe celulele țintă. La sfârșitul anilor 1960 au fost comunicate pentru prima dată dovezi privind legarea interferonilor la suprafața celulară (29). La începutul anilor 1980, studii de legare cu proteine marcate radioactiv au dus la concluzia că pe suprafața celulară există receptori specifici, de înaltă afinitate, pentru interferoni, că subspeciile diferite de interferoni tip I (IFN- α și IFN- β) folosesc un receptor comun și că acesta este distinct de receptorul pentru interferon tip II (2, 7). În plus, în ultimii ani au fost descoperiți interferonii tip III și s-a identificat și receptorul pentru ei (66, 105).

Ultimul deceniu a cunoscut achiziția unui volum enorm de date privind cascadele de proteine adaptoare care transmit mesajul de la receptorii IFN la inducția transcripției genelor specifice cu efect antiviral. Există sute de proteine a căror sinteză este indusă de interferoni și până în prezent numai rolul câtorva este bine studiat (mai multe detalii în partea a doua a articolului). În ciuda volumului mare de date acumulat de la postularea existenței interferonilor în 1957, multe aspecte din funcționarea acestui sistem de apărare așteaptă încă să fie clarificate și multe aplicații terapeutice își vor avea probabil originea în înțelegerea sa aprofundată.

II. PRIVIRE DE ANSAMBLU ASUPRA ORGANIZĂRII ȘI FUNCȚIONĂRII SISTEMULUI INTERFERON

În prima parte a articolului am prezentat câteva elemente privind istoricul descoperii interferonilor și al proprietăților acestora. În prezenta parte trecem în revistă câteva aspecte privind organizarea și funcționarea sistemului interferon la mamifere, în particular la om.

A. Interferonii

Interferonii sunt citokine produse de celulele organismelor vertebrate la detecția de către senzorii acestora a unor modele moleculare asociate patogenilor; interferonii transmit atât autocrin, cât și paracrin, un mesaj de modificare temporară a funcțiilor celulare, în scopul restrângerii replicării acestora.

Au fost identificate mai multe tipuri de interferoni. Primele dovezi privind faptul că interferonii sunt o familie de citokine au provenit din observarea diferențelor de antigenicitate între interferonii

obținuți din leucocite umane (IFN- α) și din fibroblaste umane (IFN- β) (42).

Odată cu clonarea IFN- α 1, IFN- α 2 și IFN- β a devenit evidentă natura multigenică a codificării în genom a interferonilor (37, 113, 116).

Până în prezent au fost descoperite la mamifere aproximativ 10 specii de IFN: IFN- α , β , ϵ , κ , ω , δ , τ , ν , ζ , γ , λ , care aparțin mai multor tipuri: IFN- γ aparține tipului II, IFN- λ tipului III, iar restul de specii tipului I. Dintre toate speciile de interferoni amintite, numai 7 sunt întâlnite la om (cele subliniate în enumerarea de mai sus).

Numărul de gene funcționale care codifică interferoni tip I, identificate până în prezent, este variabil la diferitele specii mamifere (IFN- δ există numai la porci și IFN- τ numai la rumegătoare; IFN- ω lipsește la șoareci).

În cadrul speciei **IFN- α** au fost descrise numeroase subspecii (13 la om). Pentru **IFN- β** , **ω** , **ϵ** , **κ** , **γ** se cunoaște câte o singură variantă. Pentru **IFN- λ** au fost descrise la om 3 subspecii (numite și interleukine IL-28A, IL-28B și IL-29).

La om, genele pentru interferonii tip I au în general omologie mai mare de 30% și sunt localizate pe un același cromozom, cromozomul 9 (19). Genele IFN- α formează un cluster din care nu face parte gena IFN- β . Tuturor genelor IFN tip I de la om le lipsesc intronii (41). Genele IFN tip II și III, în schimb, conțin introni. Gena pentru IFN- γ este localizată pe cromozomul 12 și genele pentru IFN- λ pe cromozomul 19; genele pentru IFN- λ au 15-20% omologie de secvență cu cele ale IFN- α (38, 105).

Interferonii tip I prezintă diferențe calitative și cantitative în inducția activităților specifice, atât antivirale, cât și non-antivirale (13, 28, 46). Cercetările în curs caută să găsească explicații pentru păstrarea în genom a unor multiple specii de IFN tip I și pentru exercitarea de către aceste citokine a unor efecte diferite în condițiile folosirii unui complex receptor comun (121).

B. Mecanismele de inducție a interferonilor

Experimentele din anii 1950 ale grupurilor lui Nagano și Isaacs și care au stat la baza emiterii teoriei privind existența factorilor tip interferon au identificat ca inductori ai fenomenului de interferență virală virusurile vii sau inactivate replicativ, cu genom ADN (virusul variolic) sau ARN (virusurile gripale) (52, 85).

Observația că inducția interferonului a fost produsă de către virusuri inactivate a arătat că replicarea virală nu este o cerință pentru producerea

acestui fenomen. S-a emis ipoteza că detecția de către celule a „informației genetice străine“ ar fi declanșatorul sintezei interferonilor.

În anii 1948 și respectiv 1950 se identificaseră deja două substanțe, numite „helenină“ și „statolon“, care posedau activitate antivirală largă. Ambele erau extrase provenite din fungi de tipul *Penicillium*: statolonul era numit astfel după fungul de origine, *Penicillium stoloniferum* (94), iar helenina după numele Helen al soției cercetătorului care a descris preparatul, și care îl obținuse prin cultivarea unei colonii fungice de pe o fotografie a ei (106).

În cazul statolonului, testarea capacității de inducție a interferonului s-a făcut în mod intenționat, pe baza afirmației lui Isaacs că ARN heterolog poate declanșa inducția interferonului, știindu-se că statolonul avea natură polianionică, asemănător ARN (64). Mai târziu s-a văzut că statolonul conținea de fapt ARN dublucatenar.

În cazul heleninei, se știa din 1948 că exercita un efect profilactic împotriva virusurilor din familii diferite, atât la șoareci, cât și la maimuțe (106). Au existat multiple studii privind natura heleninei și mecanismul subiacent al efectului său larg antiviral (107 și seria). Acestea au fost reluate după lansarea de către Isaacs a teoriei interferonului. Astfel, în 1966, analizându-se în detaliu compoziția chimică a heleninei, s-a descoperit că principalul element inductor al interferonului din compoziția sa, identificabil și în cazul statolonului, era ARN dublucatenar, provenit dintr-un virus din familia polyhedra ce infectează fungi (un micofag) (69). Identificarea ARN dublucatenar ca element inductor al IFN s-a făcut încercându-se să se rezolve problema capacității variabile de inducție a interferonului deținute de preparatele de helenină; încercându-se standardizarea principiului inductor, s-a văzut că acesta putea fi extras și purificat cu ajutorul fenolului și că avea, de fapt, natură ARN.

Studii amănunțite ale capacității de inducție a interferonului deținute de diferitele ARN naturale sau sintetice au arătat că aspectul dublucatenar al ARN a fost o proprietate esențială pentru inducție. La sfârșitul anilor 1960 era în curs de descifrare ciclul replicativ al principalelor familii virale și devenise clar că majoritatea familiilor de virusuri ARN au în cursul replicativ un stadiu ARN dublucatenar. De asemenea, la acel moment se credea că celulele neinfectate viral ale vertebratelor nu conțin în mod fiziologic ARN dublucatenar, fapt care a fost demonstrat ca nefiind valabil abia în anii 1990, când s-a descoperit fenomenul de

Tabelul 1. Momente semnificative din istoria cercetării în domeniul interferonilor

Ani	Evenimente	Referințe bibliografice
1957	Descrierea „interferonului” ca factor de interferență virală	52
1962	Primul trial clinic , cu interferon nepurificat, la voluntari umani	102
1964	Descrierea inducției interferonului de către bacterii și endotoxine bacteriene	47; 112
1965	Descrierea IFN tip II (IFN-)	125
1967	Identificarea ARN dublucatenar ca inductor al IFN	24
1969	Descrierea efectului inhibitor asupra creșterii tumorale la șoareci	39
1972-1976	Descrierea acțiunilor imunoreglatoare ale IFN	73; 74
1973	Trialuri clinice cu preparate impure de IFN	80
1974-1976	Descrierea proteinelor induse de IFN care mediază acțiuni antivirale	61; 70
1975	Identificarea de subtipuri distincte de IFN tip I (IFN- și IFN-)	42
1975-1977	Descrierea efectelor adverse ale IFN la animale	40; 95
1979	Izolarea și secvențierea ADNc IFN- uman	115
1980	Izolarea, secvențierea și expresia ADNc IFN-a uman	87
	Purificarea și secvențierea parțială a proteinelor IFN- și IFN- umane	65; 134
1981	Demonstrarea efectelor clinice ale IFN în scleroza multiplă	54
	Efectuarea de trialuri clinice cu IFN recombinant în cancer	50
1982	Izolarea și secvențierea ADNc IFN- uman	38
	Clonată o primă genă stimulată de interferoni (2',5'-oligoadenilat sintetaza)	78
1985	Identificarea elementelor ISRE , în regiunile reglatoare din amonte de genele inductibile de interferonii tip I	31
1988	Descoperirea familiei de factori de transcripție IRF	83
	Clonarea receptorului IFN tip II	84
1990	Identificarea complexului proteic ISGF-3 , care mediază activarea genelor induse de interferonii tip I	32
	Clonarea receptorului IFN tip I	20; 88
	Aprobarea de către FDA a folosirii clinice a IFN-a2 pentru tratamentul HCV	
1992-1994	Identificarea căii de semnalizare JAK-STAT drept cale majoră pentru expresia genică indusă de interferoni	15
1993	Aprobarea de către FDA a folosirii clinice a IFN- pentru tratamentul sclerozei multiple	
1995-1998	Identificarea rolurilor cheie jucate de IRF-3 și IRF-7 în inducția interferonilor tip I	58; 101
1997	Clonat primul receptor Toll	98
1999	Identificarea celulelor dendritice plasmocitoide ca producători robuști de IFN tip I	109
2000	Aprobarea de către FDA a folosirii clinice a IFN- recombinant pentru tratamentul granulomatozei cronice	
2001	Identificarea TLR3 drept inductor al IFN la detecția ARN dublucatenar	3
2004-2005	Identificarea helicazelor citosolice RIG-I și Mda-5 drept inductori ai IFN ca răspuns la ARN dublucatenar sau virusuri ARN	128

interferență ARN ca mijloc de reglare a expresiei unor gene (precursorul moleculelor de ARN interferent are o structură dublucatenară, însă mecanismele de protecție împotriva semnalizării pe calea interferonului de la acest precursor nu sunt încă pe deplin descifrate).

Astfel, în anii 1960 s-a spus că ARN dublucatenar de origine virală ar putea fi agentul de elecție declanșator al sintezei interferonului, deținut de virusuri. În timp s-a văzut că virusurile au și alte componente, în afară de ARN dublucatenar, care induc interferonii, și că există și alți inductori ai interferonilor, care nu sunt întâlniți deloc la

virusuri. Totuși, descoperirea ARN dublucatenar ca inductor al interferonilor a fost un mare progres, deoarece a făcut să fie testate mai departe o gamă largă de molecule din această clasă ca inductori. Unul dintre cei mai cunoscuți inductori, de natură ARN dublucatenar, descoperit în acest context, este poly-rI:rC; acesta induce puternic sinteza interferonilor în culturi celulare de rinichi de iepure sau de fibroblaste diploide umane din piele (fibroblastele din piele fiind sistemul folosit pentru producerea în cantități industriale a interferonului „fibroblastic”, IFN-β), precum și in vivo după injectarea intravenoasă la iepuri sau șoareci (24).

Identificarea ARN dublucatenar ca inductor al interferonilor a fost o confirmare a teoriei că răspunsul interferon este datorat detecției de către senzorii celulari a unor structuri moleculare recunoscute ca „străine“. Mai mult, s-a văzut că ARN dublucatenar nu reprezintă numai un inductor al sintezei interferonilor, ci și o țintă a mecanismelor de apărare induse de aceștia. De exemplu, sistemul enzimatic antiviral indus de interferoni, format din 2',5'-oligoadenilat-sintetază (2',5'-OAS) și ribonucleaza L (RNaza L) are nevoie de ARN dublucatenar pentru activare (62, 70) și își exercită activitatea antivirală prin acțiune directă asupra ARN.

Așa cum arătam, s-au acumulat numeroase dovezi experimentale care au demonstrat că ARN dublucatenar este doar unul dintre modelele moleculare inductoare ale sintezei interferonilor. Încă din anii 1960 producția de interferon a fost demonstrată la găini, șoareci și iepuri injectați cu o varietate de bacterii sau cu lipopolizaharid

bacterian (LPS) (47, 112). De asemenea, IFN- γ a fost descoperit ca interferon indus în suspensiile de leucocite umane în urma tratamentului cu fitohemaglutinină (PHA), o lectină mitogenă (125).

În prezent se cunoaște că de fapt interferonii sunt induși de produși moleculari diverși, precum acizi nucleici, lipide, polizaharide, proteine microbiene, care sunt recunoscuți ca necaracteristici organismelor vertebrate. Aceste modele moleculare inductoare ale interferonilor au fost numite cu termenul generic „modele moleculare asociate patogenilor“ („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs).

Au fost identificate mai multe sisteme celulare de detecție a PAMP: receptori extracelulari sau endozomali tip Toll-like sau lectine; senzori intracitoplasmatici precum helicazele RIG-I și Mdr-5; senzori intracitoplasmatici tip NOD (figura 1 și tabelul 2).

Detecția PAMP de către senzorii celulari declanșează cascade complexe de semnalizare, la care

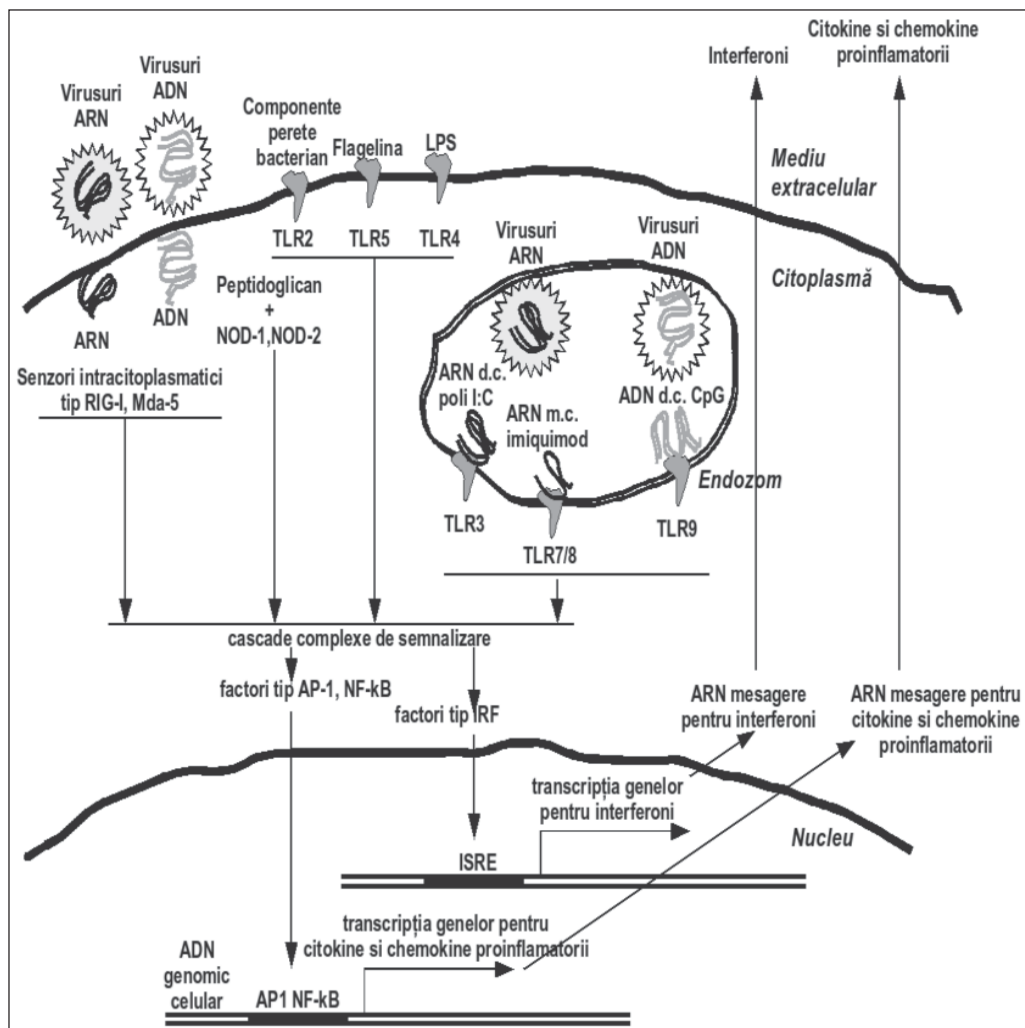


Figura 1. Privire de ansamblu asupra mecanismelor de inducție a sintezei interferonilor.

Tabelul 2. Elemente privind specificitățile de recunoaștere a modelelor moleculare asociate patogenilor (PAMP) de către senzorii celulari.

Senzorul	Modelul PAMP recunoscut	Referințe bibliografice
TLR1	nu sunt identificați liganzi direcți; își exercită funcția în asociere cu TLR2	
TLR2	participă la recunoașterea unei mari varietăți de molecule străine: - singur recunoaște: - peptidoglican, acid lipoteichoic și lipoproteine din bacterii Gram-pozitive; - lipoarabinomanan din micobacterii; - zymosan din peretele celular fungic; - heterodimerizează cu alte TLR, ceea ce îi extinde domeniul de molecule microbiene recunoscute: - TLR2 + TLR6: lipopeptide diacilate din micoplasme; - TLR2 + TLR1: lipopeptide triacilate.	35; 90
TLR3	recunoaște ARN dublucatenar și analogul sintetic al ARN dublucatenar, poly-rI:rC	3
TLR4	primul TLR uman identificat; recunoaște lipopolizaharidul bacterian (LPS) din bacteriile Gram-negative	93
TLR5	flagelina, component al bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative	43
TLR6	foarte asemănător cu TLR1; își exercită funcția în asociere cu TLR2	
TLR7	ARN monocatenar	44
TLR8	ARN monocatenar	44
TLR9	ADN bogat în secvențe CpG, nemetilată și monocatenar (ceea ce distinge ADN bacterian de ADN mamifer)	99
TLR10	funcția și ligandul direct sunt încă necunoscute; mutații în TLR10 la om sunt asociate cu astmul bronșic	68
NOD-1,2	peptidoglicani	71
Dectina 1	-glucan	8
RIG-I, Mda-5	ARN dublucatenar	128

participă zeci de proteine adaptor și care duc la translocarea în nucleul celular a unor elemente transcripționale activate, de tip IRF (interferon regulatory factor), care declanșează sinteza IFN, sau de tip AP1, NF- κ B, care declanșează sinteza altor citokine, proinflamatorii.

Au fost identificate în promotorii genelor pentru interferoni secvențe comune, numite ISRE (IFN-stimulated response element), la care se leagă factorii transcripționali activați de recunoașterea PAMP.

C. Receptorii pentru interferoni

În prezent se cunoaște că, asemănător majorității citokinelor și factorilor de creștere, interferonii își mediază efectele prin intermediul interacțiunii cu receptorii specifici de pe suprafața celulară.

Interferonii de tip I (IFN- α și IFN- β) folosesc un complex receptor comun, notat IFNAR; interferonul de tip II (IFN- γ) folosește un receptor specific, IFNGR; interferonii de tip III se leagă de un complex receptor format dintr-un lanț specific, IFNLR1 și un lanț folosit și de IL10, lanțul IL10R2.

Complexul receptor pentru interferonii tip I (complexul IFNAR) constă din două lanțuri proteice transmembranare: IFN-aR1 (numit și IFNAR1)

și IFN-aR2 (numit și IFNAR2), acesta din urmă fiind și lanțul major de legare a ligandului. Genele pentru cele două lanțuri ale receptorilor IFNAR sunt situate pe cromozomul uman 21 (121).

Afinitatea de legare a interferonului de către lanțul IFNAR2 se situează în domeniul concentrațiilor nanomolare, pe când cea de legare a interferonului de către lanțul IFNAR1 este de 1000 de ori mai slabă (121). Studiile de legare sugerează existența unui complex ternar între IFNAR1, IFN și IFNAR2, având stoichiometrie 1:1:1 și arhitectură similară, dacă nu identică, pentru toți interferonii tip I. Asamblarea complexului ternar interferon-receptor este probabil un proces în doi pași, în care interferonul se leagă la un lanț IFNAR (cel mai probabil la lanțul IFNAR2, din cauza afinității crescute), apoi îl recrutează și pe al doilea, fără interacție anterioară între cele două lanțuri receptor (121).

Deși interferonii tip I folosesc același complex receptor, specii diferite de interferon tip I induc răspunsuri biologice întrucâtva diferite (122). Se consideră că **mai mulți factori dictează efectele diferite ale diversilor interferoni tip I în contextul folosirii aceluiași complex receptor:**

(1) **Afinitatea diferită de legare a respectivului IFN de către lanțurile IFNAR 1 și 2 și**

deci stabilitatea complexului IFN-receptor (53, 55, 59, 121).

În general, IFNAR2 are afinitate mai mare pentru interferon decât IFNAR1, existând și excepții: IFN- α 1 are o afinitate scăzută de legare a lanțului IFNAR2 (34).

(2) **Concentrația pe suprafața celulară a receptorilor IFNAR și organizarea lor laterală în microdomenii.** Acest aspect poate modela responsivitatea fiecărui tip celular față de diferitele specii de interferoni (104).

Componentele complexului IFNAR prezintă domenii de interacție cu kinaze intracelulare: lanțul IFNAR1 interacționează cu kinaza Tyk2, iar lanțul IFNAR2 cu kinaza Jak1. Semnalizarea prin receptorul IFNAR duce la fosforilarea de către aceste kinaze a proteinelor STAT1 și STAT2 și la formarea unui complex între STAT1 și STAT2 fosforilate și proteina IRF9, numit complex ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3). Acest complex translocă în nucleu și activează transcripția genelor induse de interferonii tip I prin legare la secvențele ISRE (IFN-stimulated response element) din promotorii acestor gene (figura 2).

Receptorul pentru interferon tip II (IFN- γ), notat IFNGR, este un complex de patru lanțuri proteice, câte două din fiecare tip IFNGR1 și IFNGR2. Un complex receptor IFNGR leagă un homodimer antiparalel de IFN- γ (4).

Lanțul IFNGR1 este codificat de o genă de pe cromozomul uman 6 și prezintă un domeniu de legare pentru kinaza Jak1 și un sit de docking pentru STAT1. Lanțul IFNGR2 deține un domeniu

de legare a Jak2 și este codificat de o genă de pe cromozomul uman 21, situată într-un cluster care mai conține și secvențe codificante pentru IFNAR1, IFNAR2 și receptorul 2 pentru interleukina 10 (IL10R2, numit și IL10RB) (67).

Deși lanțul IFNGR1 este constitutiv exprimat pe toate celulele organismului, expresia lanțului IFNGR2 este reglată strict, acesta fiind puțin exprimat constitutiv.

Legarea IFN- γ la lanțurile IFNGR1 și IFNGR2 activează kinazele Jak1 și Jak2, care fosforilează proteina STAT1; dimeri de STAT1 fosforilată translocă în nucleu și induc transcripția genelor care conțin în promotor secvența de activare specifică IFN- γ (gamma activating sequence, GAS) (108) (figura 2).

Receptorul pentru interferonii tip III (IFN-I) folosește aceeași cale de semnalizare cu receptorii pentru interferonii tip I, dar reprezintă o structură moleculară complet diferită. Este alcătuit dintr-un lanț specific, IFNLR1, care interacționează cu kinaza Jak1 și un lanț receptor pe care îl folosește și interleukina 10, lanțul IL10R2, și care prezintă un domeniu de interacție cu kinaza Tyk2. Legarea IFN-I la receptor duce la activarea unei căi de semnalizare asemănătoare celei induse de interferonii tip I: se formează un complex între proteinele STAT1 și STAT2 fosforilate și IRF9, care translocă în nucleul celular și activează transcripția genelor care conțin în promotor secvențe ISRE (figura 2).

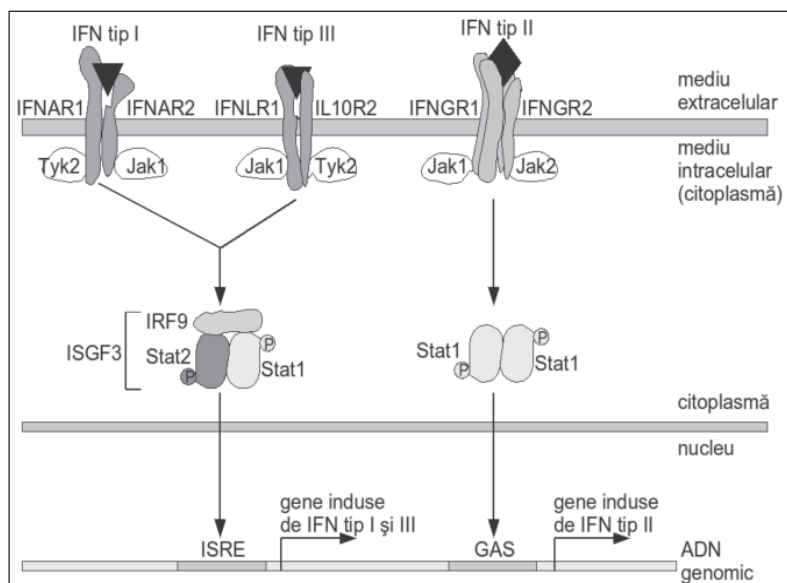


Figura 2. Reprezentare schematică a mecanismelor de inducție a genelor stimulate de interferoni.

D. Mecanismele de acțiune ale interferonilor

Mecanisme de inducție de către interferoni a proteinelor efectoare

După acumularea în anii 1950 de dovezi experimentale în favoarea existenței reale a interferonilor, s-a pus problema modului cum își desfășoară interferonii activitatea antivirală, și anume prin ce mecanism concret biologic, chimic sau fizic, și la nivelul cărei etape din replicarea virală.

Experimente din anii 1960 au arătat că este necesar, **pentru exercitarea efectelor antivirale ale interferonilor, ca transcripția ADN în ARN să funcționeze corect** în celula infectată. Taylor a arătat că tratarea celulelor cu actinomicină D, o substanță care se intercalează în mod ireversibil în moleculele ADN și le împiedică transcripția în ARN, împiedică exercitarea efectului interferonilor (118). După tratarea culturilor celulare cu actinomicină D pe perioade scurte de timp (1 oră), apoi cu interferon, s-a observat o replicare identică, la nivel crescut, a virusurilor ARN pe celulele netratate cu interferon, indiferent dacă acestea fuseseră anterior expuse la actinomicină D sau nu, și pe celule tratate cu actinomicină D plus interferon. Singurul caz în care a fost inhibată replicarea virală a fost pe celule netratate cu actinomicină D, dar tratate cu interferon.

Experimentele lui Taylor au demonstrat că, pentru exercitarea efectului antiviral al interferonului, trebuia să aibă loc transcrierea ADN în ARN, inclusiv în infecțiile cu virusuri care nu conțin ADN în ciclul replicativ, cum au fost virusurile cu genom ARN, folosite de el. Prin urmare, ADN celular era cel care trebuia transcris în ARN. Această concluzie era o dovadă în plus că interferonul nu acționa direct asupra virusurilor, ci indirect, prin inducția unor efectori ai gazdei, și că aceștia trebuiau produși în mod activ, cu transcrierea ADN celular. Cel mai probabil aceștia erau de natură proteică.

Concluziile privind natura proteică a efectorilor antivirali induși de interferoni, desprinse din experimentele lui Taylor, erau indirecte. Teste specifice privind necesitatea translației proteice pentru exercitarea efectelor interferonilor (teste realizate prin inhibiția translației cu ajutorul cicloheximidei, puomicinei sau fluorofenilalaninei) nu au dus la rezultate unanime. Aceasta, deoarece inhibiția sintezei proteice avea efecte atât asupra replicării virale, cât și asupra mecanismelor de apărare ale gazdei, induse de interferoni. Dovada inducției sintezei unor efectori proteici de către interferoni a venit din **analiza în geluri 2D a proteinelor din**

lizate celulare induse și neinduse cu ei; în lizatele induse de interferoni s-a putut observa apariția a zeci de proteine care nu erau prezente sau erau prezente în cantități minime în celule în stare obișnuită.

Din zecile de proteine induse de interferoni, câteva au fost studiate în mai mare detaliu; le-au fost **identificate secvențele aminoacidice și secvențele genice corespunzătoare**. Cunoscându-se secvențele genice, s-au descoperit **secvențe consens în promotori** (30,31,81,131). Au fost folosite aceste secvențe consens drept **sonde nucleotidice pentru identificarea proteinelor adaptor care se leagă la acești promotori în procesul de activare a transcripției genice**. Au fost astfel identificate ca proteine ce se leagă la promotorii genelor stimulate de interferonii tip I proteinele STAT1, STAT2 și IRF9 (32,124).

O altă metodă folosită pentru identificarea elementelor cascadei de semnalizare de la interferoni la proteinele efectoare antivirale a fost **generarea prin mutageneză chimică de linii celulare cu defecte ale elementelor cascadei de semnalizare**. În acest sens, au fost modificate linii celulare normale prin introducerea în genomul lor a unor gene toxice, sub promotorul unor gene induse de interferoni (de exemplu, gena pentru guanil-fosforibozil-transferază, sub controlul promotorului genei 6-16). Astfel, genele toxice nou introduse se exprimau numai prin inducția de către interferoni. Liniile celulare transgenice au fost supuse apoi mutagenzei chimice, cu generarea de variate defecte genomice, inclusiv în cascadele de semnalizare de la interferoni. Tratamentul cu interferoni a dus la inducția genelor toxice în celulele cu semnalizare intactă, dar nu și în celulele cu defecte de semnalizare de la interferoni. Adiția substratului enzimei toxice (adiția 6-thioguaninei, în cazul celulelor transgenice pentru guanil-fosforibozil-transferază) a dus la moartea celulelor care o exprimau și a selectat clonele mutante cu defect în cascadele de semnalizare de la interferoni, care nu au exprimat-o.

Studii ulterioare au identificat genele și proteinele afectate de mutații și au permis studiul amănunțit al rolului acestor proteine în cascadele de semnalizare. Au fost identificate astfel ca proteine implicate în semnalizarea de la interferoni tirozinkinaza Tyk2, 7 membri ai familiei STAT și 4 membri ai familiei Jak, și s-a arătat că acești factori transcripționali și tirozinkinaze sunt esențiali pentru răspunsurile nu numai de la interferoni, ci și de la alte citokine și factori de creștere (103).

Elementele esențiale pentru răspunsul față de IFN tip I sunt receptorul heterodimer pentru IFN tip I (IFNAR), tirozinkinazele Tyk2 și Jak1, proteinele STAT1 și STAT2, care sunt fosforilate ca răspuns la semnal, și proteina IRF9 (figura 2). Atașarea complexului format din proteinele STAT1 și STAT2 fosforilate și din IRF9 la secvențe specifice din promotorul genelor stimulate de interferonii tip I inițiază transcripția acestor gene.

Elementele esențiale pentru răspunsul la IFN tip II sunt cele 2 proteine din alcătuirea receptorului IFNGR, tirozinkinazele Jak1 și Jak2, și proteina STAT1, care este fosforilată ca răspuns la semnal. Dimerul de proteine STAT1 fosforilate translocă în nucleu și participă la declanșarea transcripției de pe promotorii ce conțin secvențe GAS (gamma activating sequence).

Elementele esențiale pentru răspunsul la IFN tip III sunt tirozinkinazele Tyk2 și Jak1, proteinele STAT1 și STAT2, care sunt fosforilate ca răspuns la semnal, și IRF9 nefosforilat (figura 2). Complexul format din proteinele fosforilate STAT1 și STAT2 și din proteina IRF9 participă la activarea transcripției genelor induse de interferonii tip III, în mod asemănător mecanismului folosit de interferonii tip I.

Proteine cu efect antiviral induse de interferoni și mecanismele lor de acțiune

O problemă importantă în descifrarea mecanismelor de apărare prin interferoni a fost legată de etapele din ciclul replicativ viral inhibitate de acest sistem de apărare. Experimentele desfășurate în anii imediat următori descoperirii interferonilor au arătat că **între etapele interferate nu se numărau adsorbția și internalizarea virală, ci etapele intracelulare ale replicării virale.**

Au fost identificate două mecanisme principale antivirale exercitate de proteinele induse de interferoni:

1) degradarea ARN și inhibiția sintezei proteice

În experimentele de identificare a factorilor inhibitori virali din celulele tratate cu interferoni, Kerr și colaboratorii au descoperit că ARN dublu-catenar putea să își exercite rolul antiviral numai dacă celulele dețineau suficient ATP (96). ATP nu era numai necesar pentru desfășurarea activității endonucleazelor cu efect antiviral, ci și pentru producerea unui factor cu efect antiviral, cu masă moleculară mică și care rămânea în volumul de excludere în experimentele de filtrare în gel (97). Analiza chimică a arătat că acest factor este un oligoadenilat cu legături 2'-5', diferit față de acizii nucleici uzuali, cu legături 3'-5' (63). S-a văzut că

2',5'-oligoadenilații sunt sintetizați din ATP de către enzime (2',5'-oligoadenilat-sintetaze) induse de IFN (49) și care necesită ARN dublu-catenar drept cofactor. **2',5'-oligoadenilații activează consecutiv o endonuclează (ribonucleaza L, notată și RN-aza L) care degradează ARN, inhibând astfel sinteza de proteine** atât microbiene (virale), cât și celulare, și participând la inducția apoptozei celulelor infectate. Inducția apoptozei de către interferoni este un mecanism cu beneficii atât în apărarea antimicrobiană (în particular antivirală), cât și antitumorală a organismului (9, 10).

2) captarea componentelor virale înainte de asamblarea și eliberarea virionilor

Încă din anii 1970 au apărut din studiul retrovirusurilor dovezi că **interferonii pot inhiba eliberarea particulelor virale printr-un mecanism diferit de inhibare a sintezei proteice.**

În anii 1970 retrovirusurile erau numite „oncornavirusuri” (prescurtare pentru „oncogenic RNA viruses”, „virusuri oncogene cu genom ARN”), deoarece principalii membri cunoscuți ai familiei produceau leucemii și sarcoame la găini și șoareci. S-a intuit că existau și la om virusuri din această familie, care erau probabil responsabile de unele forme de cancer. Au fost descoperiți ulterior în această familie reprezentanți la om, virusurile HTLV (human T-cell leukemia virus). Tratatamentul cu interferon al liniilor celulare care dețineau retrovirusuri integrate și active replicativ a dus la scăderea eliberării de virioni. Cum în acel timp cuantificarea virusurilor prin metode moleculare nu era ușoară, una dintre metodele folosite era cuantificarea în preparate de microscopie electronică a numărului de virioni din celule și din exteriorul lor. S-a observat prin această metodă că, deși în supernatant scăzuse eliberarea de virioni, în celule numărul particulelor virale era crescut (5,6,11); în plus, particulele virale eliberate de celulele tratate cu interferoni, atâtea câte erau, prezentau defect replicativ (92).

Studii ulterioare au arătat că celulele tratate cu interferoni produc enzime cu rol în deaminarea genomurilor ARN virale (de exemplu, proteinele din familia APOBEC), pentru a induce mutații și a face virusurile incompetente replicativ și că unele virusuri au dezvoltat factori de contracarare a acțiunii acestor proteine (de exemplu, s-a găsit ca rol al proteinei vif a virusului HIV contracararea acțiunii proteinelor APOBEC, în particular APOBEC3G). În plus, au fost descoperite proteine tip dinamină, din familia Mx, induse de interferoni, care sechestrează componente virale de-a lungul

căilor de transport intracelular și împiedică asamblarea și eliberarea de virioni (activitate identificată inițial față de virusurile din familia Orthomyxoviridae).

Interferonii induc expresia a aproximativ 200 de gene (interferon stimulated genes, ISGs). Numărul și natura acestor gene depind de tipul de interferon, de tipul celular examinat și de starea anterioară de activare a celulei de către alte citokine din rețelele de semnalizare imune (16, 18).

Câteva proteine cu acțiune antivirală induse de interferoni sunt cunoscute de mai mult timp și, astfel, au fost studiate în mai mare detaliu:

1) 2',5'-oligoadenilat sintetazele (2',5'-OAS) și ribonucleaza L (RNaza L) formează un sistem de luptă al gazdei împotriva virusurilor ARN. Enzimele 2',5'-oligoadenilat sintetaze sunt activate direct de ARN dublucatenar și produc din ATP un lanț oligoadenilat de 3-6 baze, cu legături 2'-5' (61). Mașinăria celulară nu folosește legături 2'-5' pentru stocarea informației în ARN, singura funcție bine stabilită până în prezent pentru 2',5'-oligoadenilați fiind activarea enzimei ubiquitare latente RNaza L. La legarea 2',5'-oligoadenilaților la ea, RNaza L monomerică inactivă dimerizează într-o ribonuclează activă (21), care clivează de la capătul 3' al catenelor ARN grupări dinucleotidice UU sau UA (27, 127).

A fost demonstrat rolul esențial al căii constituite din 2',5'-OAS și RNaza L în inhibiția replicării virusului encefalomiocarditei (EMCV), a virusului Cocksackie B4, a virusului West Nile, a unor retrovirusuri și a virusului hepatitic C (HCV) (110).

2) Protein-kinaza activată de ARN dublucatenar (PKR) a fost între primele enzime induse de interferoni identificate (130).

PKR este o serin/treonin kinază care inhibă activitatea celulară de translație proteică, drept răspuns la detecția ARN dublucatenar și la alte semnale (126). PKR poate fi activată direct de ARN dublucatenar sau de proteina PACT, în absența ARN dublucatenar (91) și controlează translația ARN mesagere în proteine prin intermediul fosforilării factorului de inițiere a sintezei proteice EIF2 α . Fosforilarea EIF2 α duce la formarea unui complex inactiv între EIF2-GDP și factorul de reciclare EIF2 β ; blocarea în acest fel a EIF2 α are ca efect inhibiția globală a sintezei proteice, blocarea replicării virale și răspuns de stres celular.

Importanța PKR în apărarea antivirală este dovedită de faptul că multe virusuri prezintă strategii de ocolire a acestei proteine, precum sechestrarea ARN dublucatenar pentru evitarea

recunoașterii de către PKR sau inhibarea activității kinazice a PKR (33).

3) Proteinele înrudite cu p56 (p56, p54) inhibă translația în proteine a ARN mesagere prin legarea la diferite subunități ale factorului de inițiere a translației EIF3 și blocarea activității acestuia (100).

4) Proteinele Mx au fost identificate în 1986, observându-se că linia de șoareci A2G era rezistentă la virusurile gripale (48,75). S-a văzut că responsabilă pentru această rezistență era proteina Mx1, a cărei genă era intactă la linia de șoareci A2G și defectivă la majoritatea celorlalte linii de șoareci de laborator. A fost investigată distribuția la diferite specii a acestor proteine și s-a văzut că sunt întâlnite și la alte mamifere, inclusiv la om.

Proteinele Mx sunt GTP-aze mari (aprox. 80 kDa) din superfamilia dinaminelor, care se auto-asamblează și leagă nucleoproteinele virale, astfel interferând cu traficul lor intracelular și implicit cu asamblarea și eliberarea virală.

Demonstrația în 1999 a faptului că celulele de la șoareci triplu knockout pentru PKR, RNaza L și Mx sunt încă protejate antiviral de către tratamentul cu interferon (133) indică faptul că sistemul genelor induse de interferoni are un mare spectru de elemente efectoare, că există și alte căi de apărare antivirală foarte puternice, exercitate de proteine efectoare încă incomplet studiate până în prezent.

E. Interferonii ca elemente integratoare între imunitatea înăscută și în cea adaptivă

Pe lângă rolul de citokine semnalizatoare ale infecției, responsabile de punerea în practică în interval de câteva ore de la detecția agenților străini, a unei stări tisulare nefavorabile replicării acestora, **interferonii** și celulele imune specializate în producția de interferoni reprezintă **elemente importante în activarea răspunsului imun adaptiv împotriva agenților patogeni**.

Deși orice celulă a organismului poate sintetiza interferoni în momentul detecției infecției, anumite celule specializate sintetizează aceste citokine la nivele mult crescute, datorită expresiei crescute a senzorilor pentru detecția PAMP și a unui grad de preactivare fiziologică în aceste celule a cascadelor de semnalizare intracelulară care duc la sinteza interferonilor. Celulele specializate în sinteza masivă de interferoni la detecția patogenilor sunt celulele dendritice, atât cele asociate țesuturilor, cât și cele circulante. Tipul circulant, celulele dendritice plasmocitoide produc masiv interferoni tip I (109) și prezintă limfocitelor T CD4+ fragmente

peptidice derivate din patogen, pe molecule de suprafață aparținând complexului major de histocompatibilitate (MHC) clasa a II-a. Fragmentele peptidice virale sunt prezentate în mod funcțional de către celulele sistemului imun pe complexe MHC II, iar de către celulele infectate pe complexe MHC I. Limfocitele T CD8+ recunosc fragmentele peptidice exprimate pe complexe MHC I de către celulele infectate și le elimină, în acest fel eliminând o sursă de răspândire a infecției virale.

Expresia proteinelor MHC de clasa a II-a pe suprafața celulelor imune specializate este stimulată de IFN- γ , dar nu și de interferonii de tip I (132). Prezentarea antigenelor virale pe MHC clasa I este upregulată marcat atât de interferonii tip I, cât și de IFN tip II (IFN- γ) (82).

Interferonii promovează acumularea de leucocite la siturile de invazie a patogenilor. Alături de alte citokine, precum TNF- α și IL-1 β , interferonii stimulează expresia moleculelor de adeziune precum ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1) (12).

Au fost identificate un **efect stimulator al IFN- α asupra celulelor natural killer (NK), macrofagelor și limfocitelor T (cu diferențiere spre Th1)**, și un **efect activator al IFN- γ asupra limfocitelor T (în concert cu interleukina 2), macrofagelor și celulelor prezentatoare de antigen APC** (57).

Interferonii **induc producția de citokine chemotactice (chemokine) care participă la recrutarea leucocitelor.** Trei chemokine foarte înrudite implicate în acumularea de limfocite T activate și macrofage la locul infecției sunt proteinele induse de interferoni **CXCL9**, cunoscută și sub numele de „monokina indusă de IFN- γ “ (monokine induced by IFN- γ , MIG), **CXCL10**, cunoscută și ca „proteina de 10 kDa inductibilă de IFN- γ “ (IFN- γ 10 kDa inducible protein, IP-10) și **CXCL11**, cunoscută și ca „a-chemoattractantul limfocitelor T inductibil de interferon“ (interferon-inducible T-cell a-chemoattractant, I-TAC) (14, 23, 77).

F. Aplicații clinice și efecte adverse ale interferonilor

Inițial, pe baza unor studii limitate la animale și la om și sub presiunea utilității comerciale, interferonii au fost lăudați ca medicamente cu larg potențial terapeutic și fără efecte adverse (102). Totuși, în timp au fost observate efectele adverse ale administrării interferonilor, care sunt atât de

neplăcute, încât le limitează foarte mult aplicabilitatea clinică.

Din mai multe motive, **administrarea terapeutică a interferonilor**, așa cum este ea efectuată în prezent, pe cale sistemică, în doze relativ mari și de lungă durată, **nu este ușor acceptabilă de organism.** În primul rând, **starea celulară indusă de interferoni este o stare de stres celular**, improprie unei administrări de durată a acestor citokine. În al doilea rând, datele experimentale arată că **interferonii sunt eliberați în mod natural în cantități mici**, datorită potenței lor, și că **zona de distribuție și de exercitare a efectului este limitată**, tisulară. În cazul infecțiilor cu răsunet sistemic, sinteza masivă în țesuturi și trecerea în sânge a interferonilor se asociază cu o stare de rău general a organismului. Din aceste considerente, tratamentul cu interferoni pe cale sistemică reprezintă un element de stres major pentru organismul primitorului și este rezervat pentru afecțiuni pentru care nu există altă opțiune terapeutică.

Efectele adverse ale interferonilor pot fi clasificate în:

- 1) **efecte constituționale:** stare de rău general, oboseală, frisoane, febră, mialgii;
- 2) **efecte neurologice:** la nivelul sistemului nervos central – somnolență, letargie, tremor, alterarea statusului mental (amețeală, confuzie); la nivelul sistemului nervos periferic – amorțeli, parestezii;
- 3) **efecte psihice:** modificări de dispoziție (depresie, uneori avansată);
- 4) **efecte toxice:**
 - **endocrine:**
 - stimularea sintezei hormonilor hipofizari ACTH, prolactină, hormon de creștere; indirect creșterea nivelului seric al cortizolului (din cauza creșterii ACTH);
 - disfuncție tiroidiană mediată autoimun, cu hipotiroidism;
 - **hepatice:** creșterea nivelului transaminazelor serice;
 - **hematologice:** neutropenie.

În prezent, interferonii sunt **folosiți în aplicații terapeutice**, în principal în următoarele tipuri de afecțiuni:

- 1) **afecțiuni virale** – hepatitele cronice B și C;
- 2) **afecțiuni de natură oncologică** – melanom malign, carcinom cu celule renale;
- 3) **afecțiuni imunitare cu cauză genetică** – boala granulomatoasă cronică;
- 4) **boli neurodegenerative** – scleroza multiplă.

Tendența generală a fost de a se renunța la folosirea interferonilor în cazul identificării unor terapii

mai puțin toxice și cu beneficiu terapeutic asemănător, sau de a folosi interferonii ca adjuvanți; de asemenea, pegilarea interferonilor a reprezentat un mare pas înainte în terapie, deoarece timpul de înjumătățire crescut a permis scăderea dozelor administrate sistemic și scăderea efectelor adverse, cu păstrarea efectului terapeutic.

CONCLUZII

Interferonii au fost descoperiți în urmă cu o jumătate de secol, iar studiul lor a dus la o mai bună înțelegere a mecanismelor de funcționare a sistemului imun.

Inițial, datele privind funcționalitatea interferonilor s-au acumulat lent, din cauza dificultății de purificare și a diversității lor, în condițiile în care echipe diferite au lucrat pe sisteme experi-

mentale diferite și au obținut rezultate întrucâtva diferite.

Inițial, interferonii au fost văzuți ca fiind lipsiți de efecte secundare și ca reprezentând un posibil remediu universal, fie antiviral, fie antitumoral. În timp s-a văzut că starea celulară indusă de interferoni este o stare improprie funcționării normale a celulei, dar necesară pentru limitarea replicării în organism a patogenilor.

Din cauza efectelor adverse, aplicațiile clinice ale interferonilor sunt strict limitate la afecțiuni în care nu există tratamente alternative care să aibă beneficii terapeutice asemănătoare.

Îmbunătățirea continuă a înțelegerii funcționării sistemului imun și a sistemului interferon în particular, va duce la găsirea de noi soluții terapeutice, mai rafinate și cu mai puține efecte adverse decât tratamentele disponibile în prezent.

BIBLIOGRAFIE

1. **Adolf GR, Kalsner I, Ahorn H, Maurer-Fogy I, Cantell K** – Natural human interferon-alpha 2 is O-glycosylated. *Biochem J*, 1991; 276: 511-518.
2. **Aguet M, Belardelli F, Blanchard B, Marcucci F, Gresser I** – High-affinity binding of 125I-labeled mouse interferon to a specific cell surface receptor. IV. Mouse gamma interferon and cholera toxin do not compete for the common receptor site of alpha/beta interferon. *Virology*, 1982; 117: 541-544.
3. **Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA.** – Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001; 413: 732-738.
4. **Bach EA, Aguet M, Schreiber RD** – The IFN-g receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, 1997; 15: 563-591.
5. **Billiau A, Heremans H, Allen PT, De Maeyer-Guignard J, De Somer P** – Trapping of oncornavirus particles at the surface of IFN-treated cells. *Virology*, 1976; 73: 537-542.
6. **Billiau A, Heremans H, Allen PT, Barin S, De Somer P** – IFN inhibits C-type virus at a posttranscriptional, prerelease step. *Arch Virol*, 1978; 57: 205-220.
7. **Branca AA, Baglioni C** – Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature*, 1981; 294: 768-770.
8. **Brown GD, Gordon S** – Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, 2001; 413: 36-37.
9. **Castelli JC, Hassel BA, Maran A, Paranjape J, Hewitt JA, Li XL et al** – The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ*, 1998; 5: 313-320.
10. **Castelli JC, Hassel BA, Wood KA, Li XL, Amemiya K, Dalakas MC et al** – A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *J Exp Med*, 1997; 186: 967-972.
11. **Chang EH, Mims SJ, Triche TJ, Friedman RM** – IFN inhibits mouse leukaemia virus release: an electron microscope study. *J Gen Virol*, 1977; 34: 363-367.
12. **Chang Y-J, Holtzman MJ, Chen C-C** – Interferon-gamma-induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. *J Biol Chem*, 2002; 277: 7118-7126.
13. **Coeelho LF, de Freitas Almeida GM, Mennechet FJ, Blangy A, Uze G** – Interferon-a and -b differentially regulate osteoclastogenesis: role of differential induction of chemokine CXCL11 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102: 11917-11922.
14. **Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP et al** – Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med*, 1998; 187: 2009-2021.
15. **Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR** – Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 1994; 264: 1415-1421.
16. **Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH** – Identification of genes differentially regulated by interferon a, b or g using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 15623-15628.
17. **Derynck R, Remaut E, Saman E, Stanssens P, De Clercq E, Content J et al** – Expression of human fibroblast IFN gene in *Escherichia coli*. *Nature*, 1980; 287: 193-197.
18. **de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM et al** – Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol*, 2001; 69: 912-920.
19. **Diaz MO** – The human type I interferon gene cluster. *Seminars in Virology*, 1995; 6: 143-149.
20. **Domanski P, Colamonic OR** – The type-I interferon receptor. The long and short of it. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1996; 7: 143-151.
21. **Dong B, Silverman RH** – 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem*, 1995; 270: 4133-4137.
22. **Falcoff R** – Some properties of virus- and immune-induced human lymphocyte IFNs. *J Gen Virol*, 1972; 16: 251-253.
23. **Farber JM** – A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 5238-5242.
24. **Field AK, Tytell AA, Lampson GP, Hilleman MR** – Inducers of IFN and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967; 58: 1004-1010.
25. **Findlay GM, MacCallum FO** – An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses. *J Path and Bact*, 1937; 44: 405-424.
26. **Finter NB** – Large-scale production of human IFN from lymphoblastoid cells. *Texas Rep Med Biol*, 1982; 175-178.
27. **Floyd-Smith G, Slattery E, Lengyel P** – Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate-dependent endonuclease. *Science*, 1981; 212: 1030-1032.
28. **Foster GR, Masri SH, David R, Jones M, Datta A, Lombardi G et al** – IFN-a subtypes differentially affect human T cell motility. *J Immunol*, 2004; 173: 1663-1670.
29. **Friedman, RM** – Interferon binding: the first step in establishment of antiviral activity. *Science*, 1967; 156:1760-1761.
30. **Friedman RL, Manly SP, McMahon M, Kerr IM, Stark GR** – Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell*, 1984; 38: 745-755.
31. **Friedman RL, Stark GR** – a-Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature*, 1985; 314: 637-639.

32. **Fu XY, Schindler C, Improta T, Aebersold R, Darnell JE Jr** – The proteins of ISGF-3, the interferon α -induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 7840-7843.
33. **Gale M Jr, Katze MG** – Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Pharmacol Ther*, 1998; 78: 29-46.
34. **Gavutis M, Jaks E, Lamken P, Piehler J** – Determination of the two-dimensional interaction rate constants of a cytokine receptor complex. *Biophys J*, 2006; 90: 3345-3355.
35. **Girard R, Pedron T, Uematsu S, Balloy V, Chignard M, Akira S et al** – Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J Cell Sci*, 2003; 116(Pt 2): 293-302.
36. **Goeddel DV, Shepard HM, Yelverton E, Leung D, Crea R** – Synthesis of human fibroblast IFN by *E. coli*. *Nucl Acids Res*, 1980; 8: 4057-4074.
37. **Goeddel DV, Leung DW, Dull TJ, Gross M, Lawn RM, McCandliss R et al** – The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs. *Nature*, 1981; 290: 20-26.
38. **Gray PW, Goeddel DV** – Structure of the human immune interferon gene. *Nature*, 1982; 298: 859-863.
39. **Gresser I, Bourali C, Levy JP, Fontaine-Brouty-Boye D, Thomas MT** – Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969; 63: 51-57.
40. **Gresser I, Tovey MG, Maury C, Chouroulinkov I** – Lethality of interferon preparations for newborn mice. *Nature*, 1975; 258: 76-78.
41. **Hardy MP, Owczarek CM, Jermini LS, Ejdeback M, Hertzog PJ** – Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*, 2004; 84: 331-345.
42. **Havell EA, Berman B, Ogburn CA, Berg K, Paucker K, Vilcek J** – Two antigenically distinct species of human IFN. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975; 72: 2185-2187.
43. **Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR et al** – The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 2001; 410: 1099-1103.
44. **Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S et al** – Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004; 303: 1526-1529.
45. **Henle W** – Interference phenomena between animal viruses: a review. *J Immunol*, 1950; 64: 203-235.
46. **Hilkens CM, Schlaak JF, Kerr IM** – Differential responses to IFN- α subtypes in human T cells and dendritic cells. *J Immunol*, 2003; 171: 5255-5263.
47. **Ho M** – Interferon-like viral inhibitor in rabbits after intravenous administration of endotoxin. *Science*, 1964; 146: 1472-1474.
48. **Horisberger MA, Staeheli P, Haller O** – Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 1910-1914.
49. **Hovanessian AG, Brown RE, Kerr IM** – Synthesis of low molecular weight inhibitor of protein synthesis with enzyme from IFN-treated cells. *Nature*, 1977; 268: 537-540.
50. **Ikiz D, Nola P, Mariciac Z, Smudj K, Oresiac V, Knezevic M et al** – Application of human leukocyte interferon in patients with urinary bladder papillomatosis, breast cancer, and melanoma. *Lancet*, 1981; 1: 1022-1024.
51. **Isaacs A, Edney M** – Interference between inactive and active influenza viruses in the chick embryo. I. Quantitative aspects of interference. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1950; 28: 219-230.
52. **Isaacs A, Lindenmann J** – Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond, B, Biol Sci*, 1957; 147: 258-267.
53. **Jaitin DA, Roisman LC, Jaks E, Gavutis M, Piehler J, Van der Heyden J et al** – Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN- α 2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN- β . *Mol Cell Biol*, 2006; 26: 1888-1897.
54. **Jacobs L, O'Malley J, Freeman A, Ekes R** – Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science*, 1981; 214: 1026-1028.
55. **Jaks E, Gavutis M, Uze G, Martal J, Piehler J** – Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J Mol Biol*, 2007; 366: 525-539.
56. **Jenner E** – Letter to the Editor. *Med and Phys J*, 1804; 12: 97-102.
57. **Jonasch E, Haluska FG** – Interferon in Oncological Practice: Review of Interferon Biology, Clinical Applications, and Toxicities. *The Oncologist*, 2001; 6: 34-55.
58. **Juang YT, Lowther W, Kellum M, Au WC, Lin R, Hiscott J et al** – Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 9837-9842.
59. **Kalie E, Jaitlin DA, Abramovich R, Schreiber G** – An interferon α 2 mutant optimized by phage display for IFNAR1 binding confers specifically enhanced antitumor activities. *J Biol Chem*, 2007; 282: 11602-11611.
60. **Kawade Y, Yamamoto Y** – Induction and production of L cell IFN. In: S. Pestka, Editor, IFNs. Part A. Methods in enzymology vol. 78, Academic Press, New York (1981), pp. 175-184.
61. **Kerr IM, Brown RE, Ball LA** – Increased sensitivity of cell-free protein synthesis to double-stranded RNA after interferon treatment. *Nature*, 1974; 250: 57-59.
62. **Kerr IM, Brown RE, Hovanessian AG** – Nature of inhibitor of cell-free protein synthesis formed in response to IFN and double-stranded RNA. *Nature*, 1977; 268: 540-542.
63. **Kerr IM, Brown RE** – pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of proteins synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75: 256-260.
64. **Kleinschmidt WJ, Cline JC, Murphy EB** – Interferon production by statolon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964; 52: 741-744.
65. **Knight Jr E, Hunkapiller MW, Korant BD, Hardy RW, Hood LE** – Human fibroblast interferon: amino acid analysis and amino terminal amino acid sequence. *Science*, 1980; 207: 525-526.
66. **Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK et al** – IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 2003; 4: 69-77.
67. **Kotenko SV, Langer JA** – Full house: 12 receptors for 27 cytokines. *Int Immunopharmacol*, 2004; 4: 593-608.
68. **Lazarus R, Raby BA, Lange C, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Vercelli D et al** – Toll-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004; 170: 594-600.
69. **Lampson GP, Tytell AA, Field AK, Nemes MM, Hilleman MR** – Inducers of IFN and host resistance. I. Double-stranded RNA from extracts of *Penicillium funiculosum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967; 58: 782-789.
70. **Lebleu B, Sen GC, Shaila S, Cabrer B, Lengyel P** – Interferon, double-stranded RNA, and protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976; 73: 3107-3111.
71. **Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE** – Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35(Pt 6): 1479-1484.
72. **Leong SS, Horoscawicz J** – Production and preparation of human fibroblast IFN for clinical trials. In: S. Pestka, Editor, IFNs. Part A. Methods in enzymology vol. 78, Academic Press, New York (1981), pp. 87-101.
73. **Lindahl P, Leary P, Gresser I** – Enhancement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972; 69: 721-725.
74. **Lindahl P, Gresser I, Leary P, Tovey M** – Interferon treatment of mice: enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976; 73: 1284-1287.
75. **Lindenmann J** – Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1964; 116: 506-509.
76. **Lindenmann J, Burke DC, Isaacs A** – Studies on the production, mode of action and properties of interferon. *Br J Exp Path*, 1957; 38: 551-562.
77. **Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV** – Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*, 1985; 315: 672-676.
78. **Marie I, Hovanessian AG** – The 69-kDa 2-5A synthetase is composed of two homologous and adjacent functional domains. *J Biol Chem*, 1992; 267: 9933-9939.
79. **Masucci MG, Szigeti R, Klein E, Gruet J, Montagnier L, Taira H et al** – Effect of IFN- α 1 from *E. coli* on some cell functions. *Science*, 1980; 209: 1431-1435.
80. **Merigan TC, Reed SE, Hall TS, Tyrrell DA** – Inhibition of respiratory virus infection by locally applied interferon. *Lancet*, 1973; 1: 563-567.
81. **Merlin G, Chebath J, Benech P, Metz R, Revel M** – Molecular cloning and sequence of partial cDNA for interferon-induced (2'-5')oligo(A) synthetase mRNA from human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 4904-4908.
82. **Miller DM, Zhang Y, Rahill BM, Kazor K, Rofigha S, Eckel JJ et al** – Human cytomegalovirus blocks interferon-gamma stimulated up-regulation of major histocompatibility complex class I expression and the class I antigen processing machinery. *Transplantation*, 2000; 69: 687-690.
83. **Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, et al** – Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- α gene regulatory elements. *Cell*, 1988; 54: 903-913.

84. **Munro S, Maniatis T** – Expression cloning of the murine interferon gamma receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 9248-9252.
85. **Nagano Y, Kojima Y** – Pouvoir immunisant du virus vaccinal inactivé par des rayons ultraviolets. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1954; 148: 1700-1702.
86. **Nagano Y, Kojima Y** – Inhibition de l'infection vaccinale par un facteur liquide dans le tissu infecté par le virus homologue. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1958; 152: 1627-1629.
87. **Nagata S, Taira H, Hall A, Johnsrud L, Streuli M, Ecsödi J et al** – Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte IFN activity. *Nature*, 1980; 204: 316-320.
88. **Novick D, Cohen B, Rubinstein M** – The human interferon a/b receptor: characterization and molecular cloning. *Cell*, 1994; 77: 391-400.
89. **Nyman TA, Kalkkinen N, Tolo H, Helin J** – Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon-alpha2b and interferon-alpha14c produced by Sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes. *Eur J Biochem*, 1998; 253: 485-493.
90. **Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB et al** – The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97: 13766-13771.
91. **Patel RC, Sen GC** – PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J*, 1998; 17: 4379-4390.
92. **Pitha PM, Wivel NA, Fernie BF, Harper HP** – Effect of IFN on murine leukaemia virus infection. IV. Formation of non-infectious virus in chronically infected cells. *J Gen Virol*, 1979; 42: 467-480.
93. **Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X et al** – Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998; 282: 2085-2088.
94. **Powell HM, Culbertson CG, McGuire JM, Hoehn MM, Baker LA** – A filtrate with chemoprophylactic and chemotherapeutic action against MM and Semliki Forest viruses in mice. *Antibiot Chemother*, 1952; 2: 113-118.
95. **Riviere Y, Gresser I, Guillon J-C, Tovey MG** – Inhibition by anti-interferon serum of lymphocytic choriomeningitis virus disease in suckling mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 2135-2139.
96. **Roberts WK, Clemens MJ, Kerr IM** – IFN-induced inhibition of protein synthesis in L-cell extracts: an ATP-dependent step in the activation of an inhibitor by double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976; 73: 3136-3140.
97. **Roberts WK, Hovanessian A, Brown RE, Clemens MJ, Kerr IM** – IFN-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature*, 1976; 254: 477-480.
98. **Rose D, Zhu X, Kose H, Hoang B, Cho J, Chiba A** – Toll, a muscle cell surface molecule, locally inhibits synaptic initiation of the RPS motoneuron growth cone in *Drosophila*. *Development*, 1997; 124: 1561-1571.
99. **Rutz M, Metzger J, Gellert T, Luppa P, Lipford GB, Wagner H et al** – Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol*, 2004; 34: 2541-2550.
100. **Sarkar SN, Sen GC** – Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol Ther*, 2004; 103: 245-259.
101. **Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N** – Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett*, 1998; 441: 106-110.
102. **Scientific Committee on Interferon** – Effect of interferon on vaccination in volunteers. *Lancet*, 1962; i: 873-875.
103. **Schindler C, Levy DE, Decker T** – JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*, 2007; 282: 20059-20063.
104. **Severa M, Remoli ME, Giacomini E, Ragimbeau J, Lande R, Uzé G et al** – Differential responsiveness to IFN-a and IFN-b of human mature DC through modulation of IFNAR expression. *J Leukoc Biol*, 2006; 79: 1286-1294.
105. **Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE et al** – IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 2003; 4: 63-68.
106. **Shope RE** – Therapeutic activity of a substance from *Penicillium funiculosum* Thom against swine influenza virus infection in mice. *Am J Bot*, 1948; 35: 803.
107. **Shope RE** – An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*. I Effect upon infection in mice with swine influenza virus and Columbia SK encephalomyelitis virus. *J Exp Med*, 1953; 97: 601-625.
108. **Shuai K, Schindler C, Prezioso VR, Darnell JE Jr** – Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science*, 1992; 258: 1808-1812.
109. **Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S et al** – The nature of the principal type I interferon-producing cells in human blood. *Science*, 1999; 284: 1835-1837.
110. **Silverman RH** – Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol*, 2007; 81: 12720-12729.
111. **Interferon Nomenclature Meeting** sponsored by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases and the World Health Organization- U.S., National Centre on Interferon. *Nature*, 1980; 286: 110.
112. **Stinebring WR, Youngner JS** – Patterns of interferon appearance in mice infected with bacteria or bacterial endotoxin. *Nature*, 1964; 204: 712.
113. **Streuli M, Nagata S, Weissmann C** – At least three human type a-interferons: structure of a 2. *Science*, 1980; 209: 1343-1347.
114. **Taira H, Broeze RJ, Slatery E, Lengyel P** – Large-scale production of mouse IFNs from monolayers of Ehrlich ascites tumor cells. *J Gen Virol*, 1980; 49: 231-234.
115. **Taniguchi T, Saka M, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M, Kobayashi M, Sudo T** – Construction and identification of a bacterial plasmid containing the human fibroblast interferon gene sequence. *Proc Jpn Acad*, 1979; 55B: 464-469.
116. **Taniguchi T, Mantei N, Schwarzein M, Nagata S, Muramatsu M, Weissmann C** – Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. *Nature*, 1980; 285: 547-549.
117. **Taniguchi T, Guarente L, Roberts T, Kimelman D, Douhan JI, Ptashne M** – Expression of the human fibroblast IFN gene in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 5230-5233.
118. **Taylor J** – Inhibition of IFN action by actinomycin D. *Biochem Biophys Res Commun*, 1964; 14: 447-453.
119. **Tovey MG, Begon-Lours J, Gresser I** – A method for the large-scale production of potent IFN preparations. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1974; 146: 809-815.
120. **Tyrrell D** – IFN produced by cultures of calf kidney cells. *Nature*, 1959; 184: 452-453.
121. **Uze G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S** – The receptor of the type I interferon family. *Curr Topics Microbiol Immunol*, 2007; 316: 71-95.
122. **van Boxel-Dezaire AHH, Rani MRS, Stark GR** – Complex modulation of cell type-specific signalling in response to type I interferons. *Immunity*, 2006; 25: 361-372.
123. **van Damme J, Billiau A** – Large-scale production of human fibroblast IFN. In: S. Pestka, Editor, IFNs. Part A. Methods in enzymology vol. 78, Academic Press, New York (1981), pp. 101-119.
124. **Velazquez L, Fellois M, Stark GR, Pellegrini S** – A protein tyrosine kinase in the interferon a/b signaling pathway. *Cell*, 1992; 70: 313-322.
125. **Wheelock EF** – IFN-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, 1965; 141: 310-311.
126. **Williams BR** – Signal integration via PKR. *Sci STKE*, 2001; 89: RE2.
127. **Wreschner DH, McCauley JW, Skehel JJ, Kerr IM** – Interferon action- sequence specificity of the ppp(A2'p)nA-dependent ribonuclease. *Nature*, 1981; 289: 414-417.
128. **Yoneyama M, Kikuchi M, Natsumawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M et al** – The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, 2004; 5: 730-737.
129. **Youngner J, Salvin SB** – Production and properties of migration inhibitory factor and IFN in the circulation of mice with delayed type hypersensitivity. *J Immunol*, 1973; 111: 1914-1922.
130. **Zilberstein A, Kimchi A, Schmidt A, Revel M** – Isolation of two interferon-induced translational inhibitors: a protein kinase and an oligoadenylate synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75: 4734-4738.
131. **Zinn K, DiMaio D, Maniatis T** – Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human b-interferon gene. *Cell*, 1983; 34: 865-879.
132. **Zhao W, Cha EN, Lee C, Park CY, Schindler C** – Stat2-dependent regulation of MHC class II expression. *J Immunol*, 2007; 179: 463-471.
133. **Zhou A, Paranjape JM, Der SD, Williams BR, Silverman RH** – Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. *Virology*, 1999; 258: 435-440.
134. **Zoon KC, Smith ME, Bridgen PJ, Anfinsen CB, Hunkapiller MW, Hood LE** – Amino terminal sequence of the major component of human lymphoblastoid interferon. *Science*, 1980; 207: 527-528.