Las dos proteínas Mx de lubina (*Dicentrarchus labrax*) responden de forma diferente a la infección por VNNV

P. Novel1, M. A. Fernández-Trujillo1 M. Manchado2, M. C. Alvarez1 y J. Béjar1

1 Area de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, bejar@uma.es

2 IFAPA Centro El Toruño, Junta de Andalucía, 11500 El Puerto de Santa María, Cádiz

**Summary**

Mx proteins are key components of the antiviral state triggered by interferon type I in response to viral infections. In this study, two different Mx genes have been identified in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), and their sequences were cloned and characterized. MxA cDNA consists of 1881 bp coding for a putative 626 aminoacids protein, while MxB cDNA has 1920 bp and results in a protein with 639 residues. Their corresponding genomic sequences contain 3538 bp and 5326 bp, respectively, and both present 12 exons and 11 introns. The expression patterns of the two Mx genes after an *in vivo* challenge with the viral nervous necrosis virus (VNNV), a serious pathogen in farmed European sea bass, have been characterized by real-time PCR. The results showed interesting differences in the transcription profile of both Mx, thus suggesting a differential role for each Mx isoform in the immune response of European sea bass to VNNV, and most likely in the general viral response of this species.

**Resumen**

Las proteínas Mx son elementos clave en el estado antiviral desencadenado por el interferón tipo I en respuesta a las infecciones virales. En este trabajo se han identificado dos genes Mx en lubina (*Dicentrarchus labrax*), y sus secuencias han sido clonadas y caracterizadas. El cDNA de la MxA contiene 1881 pb y codifica para una proteína de 626 aminoácidos. El cDNA de la MxB contiene 1920 pb y codifica para una proteína de 639 residuos. Sus correspondientes secuencias genómicas contienen 3538 pb y 5326 pb, respectivamente, y presentan 12 exones y 11 intrones. Los patrones de expresión de los dos genes tras una infección experimental con el virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV), uno de los patógenos más importantes en lubina, se han caracterizado mediante PCR cuantitativo. Los resultados mostraron interesantes diferencias en los perfiles de inducción de ambos genes, sugiriendo un papel diferencial para cada una de las isoformas en la respuesta inmune de la lubina a VNNV, y probablemente en la respuesta antiviral general de esta especie.

**Justificación**

Las proteínas Mx, gracias a su actividad antiviral directa, son elementos clave en la respuesta antiviral mediada por interferón (IFN) tipo I. Estas proteínas pertenecen a la familia de la dinaminas y están bastante conservadas en vertebrados. En peces, el número de isoformas de Mx es variable entre especies y parece estar relacionado con una diversificación funcional de estas proteínas.

El virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV) es uno de los principales patógenos de la lubina (*Dicentrarchus labrax*), por lo que conocer el sistema de defensa frente a las infecciones víricas de esta especie es una prioridad para poder mejorar su resistencia a los virus. Dado el importante papel de las proteínas Mx en la defensa antiviral de los peces y la susceptibilidad de la lubina a VNNV, el objetivo de este estudio consistió en caracterizar las proteínas Mx de lubina y su respuesta a la infección por VNNV.

# Material y Métodos

El punto de partida para la clonación fueron las dos secuencias de cDNA identificadas como Mx de lubina que estaban depositadas en la base de datos Genbank (AY424965; AM228974). Utilizando esta información se clonaron y secuenciaron ambos cDNAs a partir de muestras de branquias mediante PCR. Asimismo, se secuenciaron sus respectivos DNA genómicos, lo cual nos llevó a establecer la existencia de dos genes Mx independientes en lubina, a los que denominamos MxA y MxB.

Para el estudio de los patrones de expresión se llevó a cabo una infección experimental con VNNV en el Centro El Toruño y se recogieron muestras de riñón cefálico y de cerebro a distintos tiempos para ser analizadas mediante PCR cuantitativo.

**Resultados y Discusión**

El cDNA de la MxA contiene 1881 pb y codifica para una proteína de 626 aminoácidos. El cDNA de la MxB contiene 1920 pb y codifica para una proteína de 639 residuos. Ambas secuencias contienen todos los elementos característicos de las proteínas Mx.

En cuanto a la relación entre estas dos proteínas Mx y otras proteínas Mx de peces, el análisis filogenético sugiere la existencia de dos grupos de proteínas Mx dentro de los Perciformes y sitúa a la MxA en uno de ellos y a la MxB en el otro. Este tipo de relación también se encuentra en otras especies, como mero o pez cebra, donde se han encontrado siete genes Mx y un pseudogen que aparecen en varios grupos en el árbol filogenético. En cambio, otras especies como la dorada, otro Perciforme, o los Salmónidos tienen varios genes Mx que están estrechamente relacionados, lo cual ocurre también en mamíferos, que poseen dos genes Mx que están ligados en muchos casos. Varios estudios demuestran que distintas proteínas Mx de una especie piscícola determinada presentan distinta actividad o especificidad antiviral o distinta respuesta a las infecciones, por lo que se ha sugerido que la variabilidad de las Mx en peces es fruto de una estrategia de diversificación funcional para defenderse de forma más eficiente de las infecciones víricas. Dado que las distintas especies han tenido que enfrentarse a distintas presiones de selección por patógenos, la diversificación de las Mx es probablemente el resultado de estos procesos evolutivos.

Las secuencias genómicas de MxA y MxB contienen 3538 pb y 5326 pb, respectivamente, y presentan 12 exones y 11 intrones. Su estructura es similar a la de otras Mx de peces. En las regiones intrónicas y en la región 3’UTR se encontraron diversos motivos ISRE (respuesta a IFN tipo I) y GAS (respuesta a IFN tipo II) en ambas Mx, lo que sugiere que estas regiones están implicadas en la regulación transcripcional de ambos genes. Este tipo de motivos se han descrito en varios genes Mx, pero en ningún caso se ha estudiado su función. Sería muy interesante avanzar en este aspecto, ya que la capacidad de respuesta y la sensibilidad a las señales son aspectos fundamentales de la respuesta inmune. La regulación transcripcional de las Mx de lubina es otro de los aspectos a estudiar en el futuro.

Ambos genes se inducen en respuesta a la infección con VNNV, lo cual indica que estas proteínas tienen un papel en la respuesta antiviral mediada por IFN en lubina. Sin embargo, la respuesta de las dos Mx a la infección con VNNV fue muy diferente: la MxA muestra una respuesta más temprana y de mayor intensidad que la MxB, tanto en cerebro como en riñón cefálico, y tanto en la primera como en la segunda infección, por lo que MxA parece ser la proteína predominante en la respuesta contra este virus. En cambio, la MxB presentó una respuesta más débil y con mayor variabilidad entre individuos. Para completar la caracterización de la respuesta a infecciones víricas de las Mx de lubina habría que conocer la respuesta de ambas proteínas a otras infecciones víricas.

En definitiva, se ha realizado una primera caracterización de las proteínas Mx de lubina que debe continuar para establecer su papel en la defensa antiviral de esta importante especie en acuicultura.

**Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto europeo IMAQUANIM (contrato no. 007103) y por el proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía P09-TEP- 5380.

Este trabajo se ha publicado en Veterinary Immunology and Immunopathology 153 (2013) 240-248.