



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGÍA
Área de Genética

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS
PROMOTORES DE LAS PROTEÍNAS ANTIVIRALES
Mx1, Mx2 Y Mx3 DE DORADA (*Sparus aurata*)**

José Antonio González Mariscal

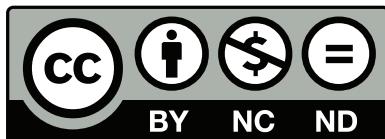
Málaga, 2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: José Antonio González Mariscal

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D^a María del Carmen Álvarez Herrero, Catedrática del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, y **D^a Julia Béjar Alvarado**, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga;

CERTIFICAN:

Que **D. José Antonio González Mariscal**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, su trabajo de Tesis Doctoral titulado:

“Caracterización estructural y funcional de los promotores de las proteínas antivirales Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada (*Sparus aurata*)”

Revisado el presente trabajo estimamos que puede ser presentado al Tribunal que ha de juzgarlo.

D^a María Carmen Álvarez Herrero

D^a Julia Béjar Alvarado



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de los **proyectos**:

- Proyecto I

TITULO DEL PROYECTO: Transferencia de inmunogenes a células y embriones de dorada (*Sparus aurata*) mediante sistemas de transposición. Valoración in vitro e in vivo para potenciar la resistencia a patógenos.

ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2007-60113)

ENTIDAD PARTICIPANTE: Universidad de Málaga

INVESTIGADOR PRINCIPAL: María del Carmen Álvarez Herrero

- Proyecto II

TITULO DEL PROYECTO: Caracterización funcional de las proteínas Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada.

ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2011-27181)

ENTIDAD PARTICIPANTE: Universidad de Málaga

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Julia Béjar Alvarado



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Parte de los resultados de esta tesis han originado las siguientes **publicaciones**:

1. González-Mariscal, J.A., Gallardo-Gálvez, J.B., Méndez, T., Álvarez, M.C. and Béjar, J. 2013. Cloning and characterization of the Mx1, Mx2 and Mx3 promoters from Gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish and Shellfish Immunology, en prensa. (Anexo VII)

También han originado los siguientes **artículos**:

1. González-Mariscal, J.A., Fernández-Trujillo, M.A., Méndez, T., Álvarez, M.C, and Béjar, J. 2013. Differential response of Mx1, Mx2 and Mx3 promoters from Gilthead seabream (*Sparus aurata*) to Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV). Manuscrito en preparación.
2. González-Mariscal, J.A., Fernández-Trujillo, M.A., Méndez, T., Álvarez, M.C, and Béjar, J. 2013. Analysis of the antagonistic effect of IPNV and VHSV on Mx1, Mx2 and Mx3 promoters from Gilthead seabream (*Sparus aurata*). Manuscrito en preparación.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Además han originado las siguientes comunicaciones a **congresos**:

1. **AUTORES:** González-Mariscal, J. A., Méndez, T., Alvarez, M.C. y Béjar, J.
TÍTULO: Caracterización de los promotores de las proteínas antivirales Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada (*Sparus aurata*)
TIPO DE PARTICIPACIÓN: póster
CONGRESO: V Foro Iberoamericano de los recursos pesqueros y la acuicultura
PUBLICACIÓN: Actas del Congreso
LUGAR CELEBRACIÓN: Cádiz, (España)
AÑO: 2012
2. **AUTORES:** González-Mariscal, J. A., Méndez, T., Alvarez, M.C. y Béjar, J.
TÍTULO: Respuesta de los promotores Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada (*Sparus aurata*) a la infección con el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa Virus (IPNV) y de la Septicemia Hemorrágica Viral (VSHV).
TIPO DE PARTICIPACIÓN: póster
CONGRESO: 9th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates
PUBLICACIÓN: Actas del Congreso
LUGAR CELEBRACIÓN: Málaga, (España)
AÑO: 2014
3. **AUTORES:** González-Mariscal, J. A., Méndez, T., Alvarez, M.C. y Béjar, J.
TÍTULO: Análisis del efecto antagonista de IPNV y VHSV sobre los promotores Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada (*Sparus aurata*).
TIPO DE PARTICIPACIÓN: póster
CONGRESO: 9th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates
PUBLICACIÓN: Actas del Congreso
LUGAR CELEBRACIÓN: Málaga, (España)
AÑO: 2014

AGRADECIMIENTOS

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tienes que agradecer a tanta gente. Intentaré resumir en unas líneas la gratitud que siento a todas las personas que han estado presentes durante esa etapa, haciendo posible que hoy deje de ser un sueño para pasar a ser una realidad.

A María del Carmen Álvarez Herrero y a Julia Béjar Alvarado, directoras de esta tesis, por toda su ayuda y sabios consejos, y por la confianza depositada en mi. Les agradezco que me hayan brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación hace ya más de cuatro años. Me han dado la oportunidad de conocer el mundo de la investigación y de descubrir cuanto motiva.

A nuestra especialista en cultivos celulares, Teresa Méndez, por su disponibilidad y colaboración en este trabajo. Llegar hasta aquí habría sido difícil sin tu ayuda.

A mis compañeros, Alejandra, Patricia, Braulio, Daniel con los que he compartido gran parte de mi trabajo les agradezco toda la ayuda que me han prestado así como los buenos momentos que he pasado en su compañía. Siento haberos torturado durante cuatro años con mis chistes malos. No quiero olvidar la ayuda y paciencia de Alejandro en los experimentos in vivo, ni a las doradas que dieron su vida por la ciencia. Gracias también a Alberto por su ayuda y por esos “relaxing coffee” entre experimentos.

A mi familia, a especialmente a mi madre Paqui, por creer siempre en mí y que podía llegar hasta aquí, y a mis hermanos, Nuria y Javier, por ser una motivación más en mi vida. A Encarni, Paco, Cristina, Mariano, Patricia, por toda su confianza y apoyo. No hubiera sido lo mismo sin vosotros.

A Marcio, Carolina, Rafa y Cristina por hacerme una persona tan afortunada de teneros como amigos. Gracias por escucharme.

A aquellas personas que han estado presentes en mi camino y, aunque ya no están, han puesto su granito de arena para que hoy sea quién.

Y en especial, a mi esposa Paola, por su confianza, por todos los ánimos recibidos, por su apoyo y por quererme tanto. Además, por su paciencia, en momentos tan difíciles como estos.

Y finalmente, a mi preciosa hija, Eva, que no se da cuenta aún de nada, gracias por darme esa sonrisa tan especial cada mañana.

A todos mi eterno agradecimiento.

ÍNDICE

	pág.
INTRODUCCIÓN	1 a 24
1. La Acuicultura	3
1. 1. Situación actual	3
1. 2. Retos que enfrenta la acuicultura	5
2. La dorada, características de la especie y de su cultivo	7
2. 1. Aspectos generales	7
2. 2. Producción de Dorada	8
2. 3. Patologías de origen vírico	9
3. Estrategias de mejora de la resistencia a las enfermedades virales.	11
4. El sistema inmune de los peces	12
4. 1. Características generales	12
4. 2. El sistema del interferón	13
5. Las proteínas Mx	16
5. 1. Características generales	16
5. 2. Las proteínas Mx de dorada	19
5. 3. Regulación de la expresión de las proteínas Mx19	20
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	29 a 56
1. Clonación de los promotores de la Mx1, Mx2 y Mx3 y caracterización de su estructura	31
1. 1. Extracción de DNA genómico de aleta caudal de dorada	31
1. 2. Obtención de las genotecas genómicas	32
1. 3. Ligación del DNA genómico a los adaptadores	35
1. 4. Amplificación de fragmentos mediante Nested-PCR	36
1. 5. Purificación, secuenciación y análisis de los fragmentos	36
2. Construcción de los vectores necesarios para la caracterización funcional de los tres promotores	37
2. 1. Los genes de luciferasa	37
2. 2. Clonación de los promotores completos	39
2. 3. Clonación de los promotores con distintos tipos de deleciones	41
2. 4. Otros plásmidos	42

3. Evaluación de la actividad de los tres promotores en respuesta a poli I:C	43
3. 1. Transfección de células RTG-2 con cada uno de los vectores construidos	43
3. 1. 1. Línea celular RTG-2	43
3. 1. 2. Transfección de las células RTG	44
3. 2. Estimulación con poli I:C	46
3. 2. 1. Respuesta de los promotores completos a distintas dosis de poli I:C	46
3. 2. 2. Ensayo de luciferasa	48
3. 2. 3. Promotores con deleciones	50
4. Evaluación la actividad de los tres promotores en respuesta a la infección por los virus IPNV y VHSV	51
4. 1. Virus IPNV y VHSV	51
4. 2. Infecciones	51
5. Evaluación del posible efecto antagonista de IPNV y VHSV sobre los promotores de los tres genes de Mx de dorada	52
5. 1. Obtención de las células estables transfectadas	52
5. 2. Ensayo de protección	54
RESULTADOS	57 a 88
1. Clonación de los promotores de la Mx1, Mx2 y Mx3 y caracterización de su estructura	59
1. 1. Walking sobre el DNA genómico de dorada	59
1. 2. Caracterización estructural de los promotores	61
1. 2. 1. Análisis filogenético	61
1. 2. 2. Motivos reguladores	62
1. 2. 3. Comparación con promotores de otras especies de peces	66
1. 2. 4. Análisis de las secuencias intrónicas	68
2. Construcción de los vectores necesarios para la caracterización funcional de los tres promotores	70
3. Evaluación de la actividad de los promotores en respuesta a IFN tipo I	73
3. 1. Respuesta de los promotores a distintas dosis de poli I:C	73
3. 2. Cinética de inducción de los promotores	75
3. 3. Respuesta de los promotores con deleciones	76
4. Evaluación de la actividad de los promotores en respuesta a la estimulación por los virus IPNV y VHSV	78
4. 1. Respuesta a la infección con IPNV	78
4. 2. Respuesta a la infección con VHSV	80

5. Evaluar el efecto de la actividad antagonista de IPNV y VHSV en la transcripción de los genes Mx de dorada	82
5. 1. <i>Obtención de células RTG-2 transfectadas estables</i>	82
5. 2. <i>Actividad antagonista de IPNV</i>	83
5. 2. <i>Actividad antagonista de VHSV</i>	85
DISCUSION	89 a 108
CONCLUSIONES	109 a 113
ANEXOS	114 a 163
BIBLIOGRAFÍA	164 a 184

FIGURAS

Figura 1. Representación del aumento de la producción acuícola frente a la pesca de captura en millones de toneladas en los últimos 60 años (FAO, 2012).	pág. 3
Figura 2. Distribución de especies producidas en 2010 (FAO, 2012).	4
Figura 3. Distribución de la producción acuícola de Andalucía por provincias (Ctaqua, 2013).	5
Figura 4. La dorada (<i>Sparus aurata</i>).	7
Figura 5. (A) Evolución de la producción mundial de dorada mediante acuicultura y pesca de 1980 a 2010(FAO, 2012). (B) Evolución de la producción de dorada en Europa y Mediterráneo de 1985 a 2011 (Sobre datos FAO, FEAP y APROMAR).	8
Figura 6. Distribución porcentual de la producción de acuicultura de dorada en el área mediterránea en 2011 (Sobre datos FAO, FEAP y APROMAR).	9
Figura 7. (A) Estructura tridimensional de IPNV. (B) Mapa genómico de IPNV.	10
Figura 8. (A) Estructura de un rhabdovirus. (B) Organización genómica de VHSV. Los números indican las posiciones de inicio y final de cada ORF.	11
Figura 9. Inducción del IFN tipo I tras infección vírica.	14
Figura 10. Cascadas de señalización de los dos tipos de interferón.	15
Figura 11. Estructura de la proteína Mx.	16
Figura 12. Árbol filogenético no enraizado que muestra la relación entre las secuencias de aminoácidos de las Mx de peces.	19
Figura 13. Extracciones de DNA genómico de aleta de dorada y determinación de su calidad.	32
Figura 14. Diagrama esquemático de los principales pasos del método de secuenciación por Genome Walking.	33

Figura 15. Formación de los adaptadores.	35
Figura 16. Esquema del uso del gen luciferasa para analizar la actividad de secuencias promotoras a modo de gen <i>reporter</i> .	38
Figura 17. Familia de vectores “pGL.4 Luciferase reporter vectors.	39
Figura 18. (A) Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>). (B) Células RTG-2.	43
Figura 19. Etapas del proceso de nucleofección.	45
Figura 20. Diseño de las placas para evaluar la respuesta de los promotores completos a distintas dosis de poli I:C.	47
Figura 21. Diseño de las placas utilizadas para determinar la cinética de activación de los promotores en respuesta a con poli I:C.	48
Figura 22. Esquema del ensayo de luciferasa usando el kit Dual Glo® Luciferase Assay System.	49
Figura 23. Fórmulas usadas para obtener los valores RLU y RRR.	50
Figura 24. Diseño de las placas donde se ensayó la estimulación por los virus IPNV y VHSV.	52
Figura 25. Fórmula usada para obtener los valores RRR con células estables	55
Figura 26. Diseño experimental del ensayo de protección.	55
Figura 27. Esquema resultado del proceso de genome walking.	60
Figura 28. Árbol filogenético no enraizado de las secuencias de los tres promotores.	61
Figura 29. Secuencias de los promotores Mx de dorada.	63-65
Figura 30. Estructura de los promotores Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada, y de otros promotores de Mx caracterizados en otras especies de peces y la MxA humana.	67
Figura 31. Esquema de los motivos encontrados en las regiones intrónicas de los genes Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada.	69

Figura 32. Estructura de los vectores que portan las secuencias completas de los promotores.	70
Figura 33. Estructura de los vectores que portan la región 5' de los promotores.	71
Figura 34. Estructura del vector pISRE.	71
Figura 35. Estructura del vector pISRE2.	72
Figura 36. Primers utilizados para la clonación de los fragmentos de los promotores.	72
Figura 37. Estructura del vector pCMV.	72
Figura 38. Respuesta de cada promotor a la estimulación con distintas concentraciones de poli I:C.	74
Figura 39. Cinética de la respuesta a Poli I:C de cada promotor Mx de dorada en valores de inducibilidad.	75
Figura 40. Valores de inducibilidad en respuesta a poli I:C de las diferentes construcciones.	77
Figura 41. Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a la infección con IPNV a 0.01 y 0.1 MOI, medida a 24, 48 y 72h de la infección	79
Figura 42. Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a la infección con VHSV a 0.01 y 0.1 MOI, medida a 24, 48 y 72 h de la infección.	81
Figura 43. Comprobación de la presencia de los genes de luciferasa y puromicina en el ADN genómico de las poblaciones celulares estables.	82
Figura 44. Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a la inducción con poli I:C y a la infección con IPNV.	84
Figura 45. Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a la inducción con poli I:C y a la infección con VHSV.	86
Figura 46. Anexo II. Secuencias de los promotores de los genes Mx1, Mx2 y Mx3 con los motivos reguladores resaltados correspondientes a la figura 30 con los nuevos motivos PRDI, IECS y EICE incluidos.	118
Figura 47. Anexo III. Estructura de los promotores Mx1, Mx2 y Mx3 de de dorada, y de otros promotores de Mx caracterizados correspondiente a la figura 30 en la cual se han incluido nuevas dianas de para IRF-8.	124

Figura 48. Anexo V. Respuesta de cada promotor de Mx de dorada a la inducción con poli I:C y a la infección con IPNV a 0.01 MOI	128
Figura 49. Anexo VI. Respuesta de cada promotor de Mx de dorada a la inducción con poli I:C y a la infección con VHSV a 0.1 MOI	130

TABLAS

	pág.
Tabla 1. Información existente sobre proteínas Mx de peces.	18
Tabla 2. Especificidad antiviral de las proteínas Mx de dorada.	20
Tabla 3. Información existente sobre algunos de los promotores de Mx caracterizados en peces y en vertebrados superiores.	22
Tabla 4. Primers usados para el Genome Walking.	35
Tabla 5. Primers usados en el proceso de clonación.	40
Tabla 6. Programas y soluciones utilizados para la optimización de la transfección.	44
Tabla 7. Primers de comprobación de integración.	53
Tabla 8. Anexo I. Información sobre los elementos más característicos de los promotores de Mx.	116
Tabla 9. Anexo IV. Resumen de nuevos motivos encontrados en dorada y otras especies Información sobre las ISRE y los sitios de unión de los nuevos factores de transcripción encontrados EICE, IECS, EIRE y PRDI en los demás promotores de Mx de peces y de vertebrados superiores caracterizados hasta el momento. Se incluyen los encontrados en dorada (<i>Sparus aurata</i>) en este trabajo.	126

ABREVIATURAS

α : nivel de significación

μL : microlitro

μg : microgramo

μM : micromolar

$^{\circ}\text{C}$: grados centígrados

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

AP-1: factor de transcripción AP-1 perteneciente a la familia Jun/ Fos

APROMAR: Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España

ATG: codón de inicio de la traducción

C: Citoplasma

C-: control negativo

C+: control positivo

cDNA: ácido desoxirribonucleico copia

CHSE: *Chinook salmo embryo* (línea celular)

CID: *Central Interactive Dominium* (Dominio Interactivo Central)

cm: centímetro

cm^2 : centímetro cuadrado

CMV: citomegalovirus

Ctaqua: Fundación Centro Tecnológico de Acuicultura de Andalucía

DNAg: DNA genómico

DNasa: desoxirribonucleasa

dNTPs: desoxirribonucleótidos

dsRNA: *Double-Stranded RNA* (RNA de cadena doble)

dsDNA: *Double-Stranded DNA* (DNA de cadena doble)

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid* (Etilen diamino tetra-Acético)

ESV: *Europeansheatfish virus* (Virus del siluro europeo)

FAO: *Food and agricultura organization* (Organización de Agricultura y Alimentación)

FEAP: *Federation of European Aquaculture Producers* (Federación Europea de Productores de Acuicultura)

g: gramo

GAS: (*Gamma Activated Site*) elemento activado por interferón-gamma.

GAF: *IFN- γ -activated factor* (Factor activado de IFN- γ)

GFP: *Green Fluorescen Protein* (Protein Verde Fluorescente)

GTP: *Guanosine-5'-triphosphate* (Guanosina Trifosfato)

GTPasa: enzima que hidroliza guanosina trifosfato

HCl: Ácido clorhídrico

HIRRV: *hirame rhabdovirus* (rhabdovirus del *hirame*)

IFN: interferón

IFN- α : interferón alfa

IFN- β : interferón beta

IFN γ : interferón gamma

IFNAR: receptor de interferón de tipo I

IFNAR1/2: subunidades del receptor IFNAR de interferón tipo I

IFNGR: receptor de interferón tipo II

IFNGR1/2: subunidades del receptor IFNG de interferón tipo II

IHNV: virus de la necrosis infecciosa hematopoyética

IL-6: interleucina 6

IPN: *Infectious Pancreatic Necrosis* (Necrosis Pancreática Infecciosa)

IPNV: *Infectious Pancreatic Necrosis Virus* (Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa)

IRF: *Interferon Regulatory Factor* (factor de regulación de interferón)

ISAV: *Infectious Salmon Anemia Virus* (Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón)

ISG: *Interferon Stimulated Gene* (Gen Estimulado por Interferón)

ISG-15: *Interferon Stimulated Gene 15* (Gen 15 Estimulado por Interferón)

ISGF3: *IFN-Stimulated Gene Factor 3* (Gen del Factor 3 Estimulado por Interferón)

ISRE: *Interferon Stimulated Response Element* (Elemento Estimulado en Respuesta a Interferón)

ISRE-LIKE: *Interferon Stimulated Response Element Like* (secuencia similar a ISRE)

JAK1/2: quinasas/ kinasa janus 1 y 2

Kb: kilobase

kDa: kilodalton

Kg: kilogramo

LCD: *Lymphocystis Disease* (Enfermedad de Linfocistis)

LCDV: *Lymphocystis Disease Virus* (Virus de la Enfermedad de Linfocistis)

LZ: *Leucine Zipper* (Cremallera de Leucinas)

M: molar

MOI: *Multiplicity of Infection* (Multiplicidad de Infección)

mm: milímetro

mg: miligramo

min: minuto

ml: mililitro

Mx: gen de resistencia a ortomixovirus

mM: milimolar

mV: milivoltio

n: número de réplicas

N: Núcleo

NaCl: cloruro sódico

NF- κ B: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell* (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)

ng: nanogramo

nm: nanómetro

ORF: *Open Reading Frame* (Marco Abierto de Lectura)

p: probabilidad crítica

pb: par de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

pH: potencial hidrógeno

PKR: proteína quinasa R

pMx1: plásmido que contiene el promotor de Mx1 de dorada

pMx2: plásmido que contiene el promotor de Mx2 de dorada

pMx3: plásmido que contiene el promotor de Mx3 de dorada

poli I:C: Ácido polinosinóico:policitidílico

PRDI: diana de unión IRF-8 (5'TCACTT3')

PURO: gen puromicina

RLU: *Relative Luminiscense Unit* (Unidad Relativa de Luminiscencia)

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

RNAbc: RNA bicatenario

RNAmc: RNA monocatenario

RNasa: ribonucleasa

rpm: revoluciones por minuto

RRR: *Relative Response Ratio* (Relación de Respuesta Relativa)

RT: reversotranscriptasa

RTG-2: *Rainbow trout gonad* (línea celular)

SAD: *Self-Assembly Domain* (dominio de autoensamblaje)

SauMx: *Sparus aurata Mx protein* (proteína Mx de *Sparus aurata*)

SD: desviación estándar

SDS: *Sodium Dodecylsulfate* (Dodecilsulfato Sódico)

SE: *Standard Error* (Error Estándar)

ssDNA: *Single-Stranded DNA* (DNA de cadena sencilla)

ssRNA: *Double-Stranded RNA* (RNA de cadena sencilla)

Sp-1: factor de transcripción perteneciente a la familia Sp/KLF

STAT1/2: *Signal Transducers and Activators of Transcription 1/2* (Transductor de señal y activador de la transcripción 1/2)

TCID50: *50% Tissue Culture Infective Dose* (Dosis Infecciosa de Cultivo de Tejidos 50%)

TE: Tris-EDTA *Buffer* (tampón Tris-EDTA)

TF: *Transcription Factor* (Factor de Transcripción)

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

Tyk2: tirosín kinasa 2

U: unidades

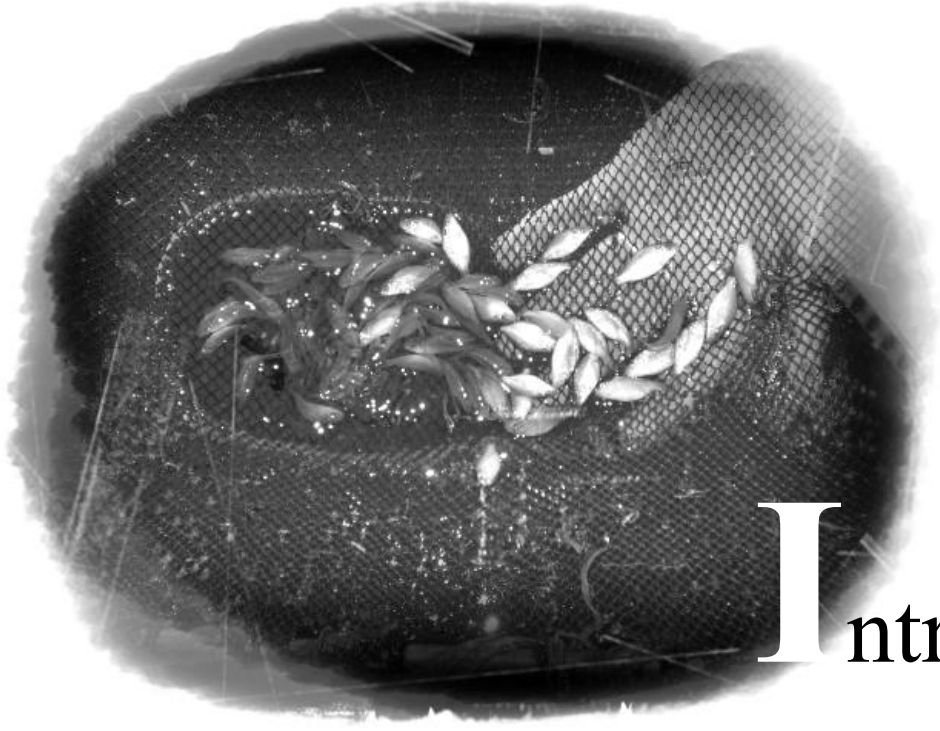
VHSV: *Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus* (Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral)

Vig-1: proteína codificada por el gen Vig1 o proteína homóloga a la viperina humana

Vig-2: proteína codificada por el gen Vig2

VNNV: *Viral Nervous Necrosis Virus* (Virus de la Necrosis Nerviosa Viral)

YGNNV: *Yellow Grouper Nervous Necrosis Virus* (Virus de la Necrosis Nerviosa del Mero Amarillo)



I ntroducción

INTRODUCCIÓN

1. La Acuicultura

1. 1. Situación actual

La Acuicultura es una actividad productiva de gran interés económico y ecológico, ya que presenta un alto potencial de crecimiento y su desarrollo sostenible constituye la vía óptima de aprovechamiento de los recursos pesqueros sin perjuicio de las poblaciones naturales de las especies que se cultivan. En la actualidad, es el sector de producción de alimentos que más rápidamente crece en el mundo, constituyendo aproximadamente el 50% de la producción acuática total (acuicultura y pesca) (FAO, 2012).

La producción de la pesca extractiva alcanzó su nivel máximo a finales de los años noventa, y desde entonces fluctúa en torno a dicho valor. Este hecho indica que los océanos se están explotando cerca de su producción máxima, por lo que el aumento de producción pesquera sólo podrá provenir de la Acuicultura. Su contribución a la producción pesquera mundial total ha aumentado constantemente hasta el 2010 (figura 1) (FAO, 2012).

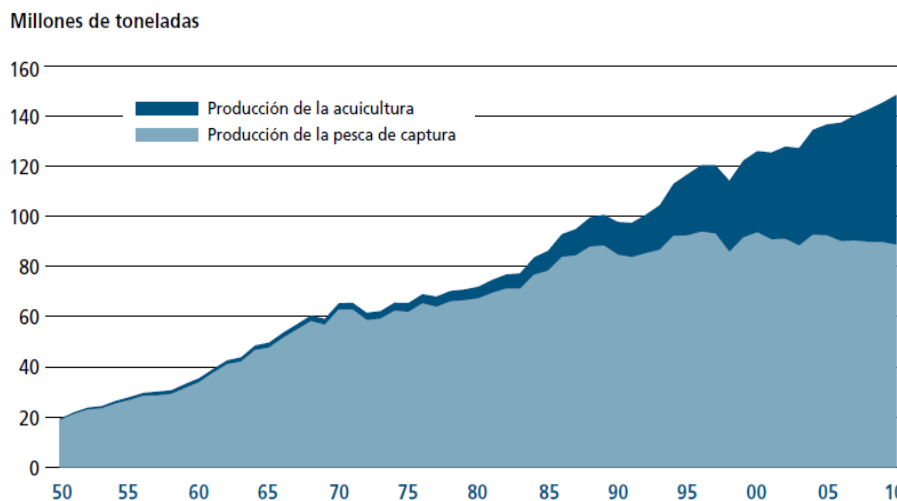


Figura 1. Representación del aumento de la producción acuícola frente a la pesca de captura en millones de toneladas en los últimos 60 años (FAO, 2012).

Además, el porcentaje de especies comestibles aportadas por la acuicultura aumentó un 38 % en 2010 respecto a años anteriores. Esta importante

aportación de la acuicultura se debe a la cría en cautividad de unas 541 especies y grupos de especies acuáticas (FAO, 2012), mediante diversos sistemas e instalaciones de cultivo. La distribución de la producción de estas especies en 2010 se muestra en el siguiente esquema:

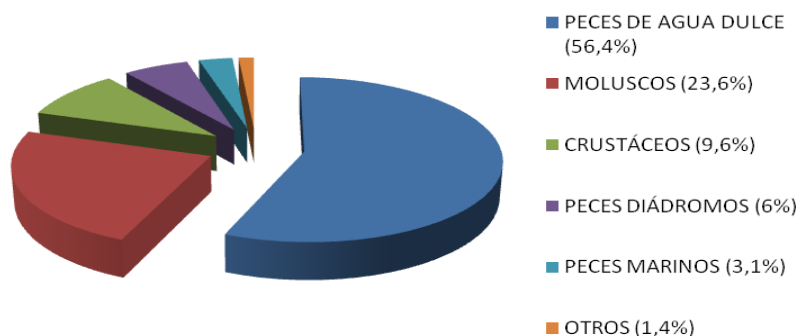


Figura 2. Distribución de especies producidas en 2010 (FAO, 2012).

La industria europea se centra en la producción de moluscos y pescados de alto valor comercial cuyas condiciones de cultivo son altamente tecnológicas y con un importante control sobre los procesos. La producción representa sólo el 3,2% de la producción mundial (FishStat, 2012), pero es líder en producción de algunas especies como salmón atlántico, trucha, lubina, dorada, rodaballo y mejillón.

A finales de la década de los noventa tiene lugar en España un importante avance industrial en materia de acuicultura, representando en la actualidad el 9.4% de la producción total europea (Apromar, 2012) y ocupando el tercer lugar en producción de pescado de acuicultura de Europa. Las especies cultivadas en España más importantes son: el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el rodaballo (*Psetta maxima*), el atún rojo (*Thunnus thynnus*), la corvina (*Argyrosomus regius*) y la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*). Otras producciones significativas son las procedentes de aguas continentales como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la anguila (*Anguilla anguilla*), la tenca (*Tinca tinca*) y el esturión (*Acipenser nacarii*).

En Andalucía, la acuicultura ha progresado significativamente en los últimos años, ya que es pionera en el desarrollo de cultivos marinos en España y Europa, produciendo el 25% de la producción española de peces marinos y siendo la región de Europa con más diversificación de especies. En la figura 3, se representa la producción acuícola andaluza por provincias en el año 2011 (Ctaqua, 2013), donde se puede observar cómo la provincia de Málaga ocupa el tercer lugar.

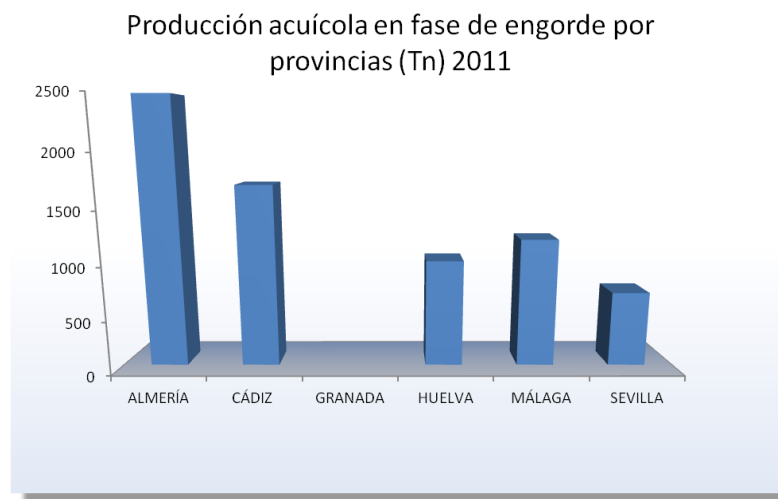


Figura 3. Distribución de la producción acuícola de Andalucía por provincias (Ctaqua, 2013).

1. 2. Retos que enfrenta la acuicultura

En la actualidad, la acuicultura se enfrenta a tres retos de los que depende su expansión: la diversificación de especies, la mejora y optimización de la nutrición y el control de las patologías. En este último aspecto se enmarca esta tesis doctoral. El rápido desarrollo de la acuicultura ha favorecido la aparición de enfermedades que conllevan importantes pérdidas económicas (revisado en Verschuer y cols., 2000; Subasinghe, 2005; Torrecillas y cols, 2007). En el cultivo intensivo, los animales están sometidos a condiciones de estrés que debilitan su sistema inmunitario, aumentando la susceptibilidad a los patógenos y favoreciendo así la emergencia de enfermedades. Tradicionalmente, las estrategias de control y prevención de enfermedades en acuicultura se han basado en vacunas, antibióticos y quimioterapéuticos,

estando ya ampliamente aceptado que es más aconsejable la prevención que el tratamiento.

Los brotes epizoóticos de enfermedades de etiología microbiana son una de las mayores amenazas. Entre ellos, los de etiología viral revisten mayor trascendencia debido a que:

1. provocan altas mortalidades,
2. pueden inducir infecciones persistentes: los supervivientes de una epizootia actúan como portadores asintomáticos eliminando partículas víricas durante largos periodos de tiempo,
3. producen infecciones duales, lo cual afecta al diagnóstico y control de la enfermedad, y
4. no existen tratamientos efectivos.

En los últimos años se ha detectado un número creciente de virus que infectan a peces cultivados entre los que se encuentran representantes de las familias *Birnaviridae*, cuyo principal representante es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV); *Rhabdoviridae*, virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) o virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV); *Iridoviridae*, virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (EHNV), virus de la linfocistis (LCDV) o virus de la necrosis eritrocítica (VEN); *Nodaviridae*, virus de la necrosis nerviosa vírica (VNNV); *Orthomyxoviridae*, virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) así como varios reovirus y togavirus (revisado en Barja, 2004). Sin embargo, es destacable que en dorada, objeto de estudio de esta tesis, a pesar de que se han aislado un cierto número de virus, la única enfermedad vírica descrita es la de linfocistis, que aunque es crónica, no implica mortalidad importante en las poblaciones afectadas, habiendo llegado a revertir en algunos casos (Borrego y cols., 2000). En otras palabras, en comparación con otras especies que se cultivan, la dorada es sorprendentemente resistente a las infecciones víricas, pudiendo comportarse como portadora asintomática de virus patógenos de otras especies.

2. La dorada, características de la especie y de su cultivo

2. 1. Aspectos generales

La dorada (*Sparus aurata* Linné, 1758) es un teleósteo perteneciente a la Familia *Sparidae*, orden Perciformes, conformado por 29 géneros y unas 100 especies. Es una especie muy común en el Mediterráneo, que se extiende también por el Mar Negro, el



Figura 4. La Dorada (*Sparus aurata*)

Mar Rojo y las costas orientales del Océano Atlántico, desde Inglaterra hasta las costas de Mauritania (Suau y López, 1976; Bauchot y Hureau, 1986).

Es un pez que se caracteriza por tener un cuerpo alto, ovalado y comprimido con una larga aleta dorsal. Posee una dentadura poderosa con seis fuertes colmillos de forma cónica muy afilados. Lo más característico de esta especie es la banda o franja dorada que cruza entre los ojos, más intensa o amarilla con la edad, y que determina su denominación comercial. Es una especie hermafrodita protándrica; son machos al nacer hasta que alcanzan aproximadamente los dos años, y a partir de los tres años se convierten en hembras maduras.

Su dieta natural es preferentemente carnívora, depredadora de especies de fondo, en especial moluscos (bivalvos y gasterópodos), crustáceos, vermes y pequeños peces (Arias, 1976, 1980; Suau y López, 1976; Francescon y cols., 1987). Con un crecimiento muy variable en función de su localización, se puede considerar que crecen más rápido en zonas semicerradas y salobres, como esteros y lagunas (Arias, 1980; Barbaro y cols., 1986; Castelló-Orvay y Calderer, 1993), que en zonas abiertas (Heldt, 1948). En general, se la considera una especie de crecimiento rápido en la naturaleza, que consigue los 300 g en el segundo año de cultivo y los 600 g en el

tercero, pudiendo alcanzar un tamaño de 70 cm y un peso de 6 Kg, especialmente las de captura o salvajes que se diferencian de las de acuicultura porque éstas son de color algo más oscuro, aunque ambas con las mismas aptitudes culinarias.

2. 2. Producción de Dorada

Su crianza se realiza en casi todos los países mediterráneos (figura 5). Los centros de cría producen huevos a partir de individuos reproductores en condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura que permiten tener puestas durante todo el año. Cada hembra llega a poner 2 millones de huevos de 1 mm de diámetro. Durante su primer mes de vida las larvas se alimentan de organismos vivos: rotíferos y artemia. Después inician una alimentación a base de piensos fabricados con ingredientes naturales principalmente marinos. Las instalaciones de cultivo son variadas: viveros flotantes en el mar, tanques de hormigón o estanques en tierra.

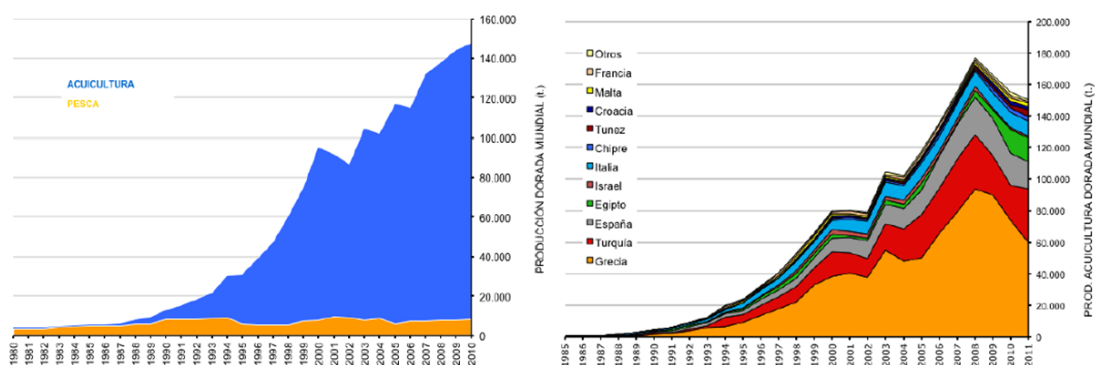


Figura 5. (A) Evolución de la producción mundial de dorada mediante acuicultura y pesca de 1980 a 2010(FAO, 2012). (B) Evolución de la producción de dorada en Europa y Mediterráneo de 1985 a 2011 (Sobre datos FAO, FEAP y APROMAR).

La producción mundial de dorada ha aumentado notablemente en los últimos 30 años (figura 5A), en los que los países de Europa y concretamente los situados en la cuenca del Mediterráneo, han mostrado un gran interés en el cultivo de dorada (figura 5B). Los últimos datos revelan el importante papel de España en el cultivo de dorada a nivel mundial (figura 6).

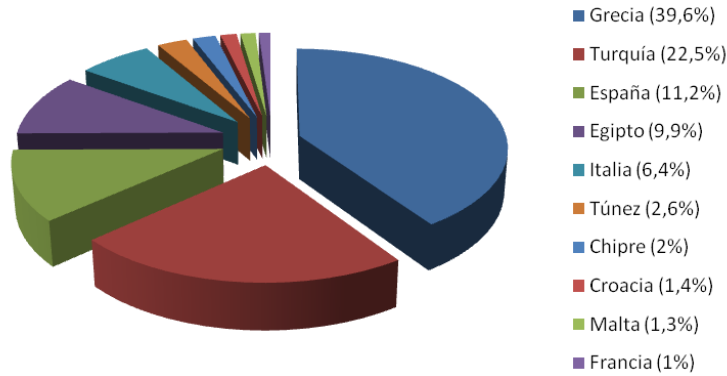


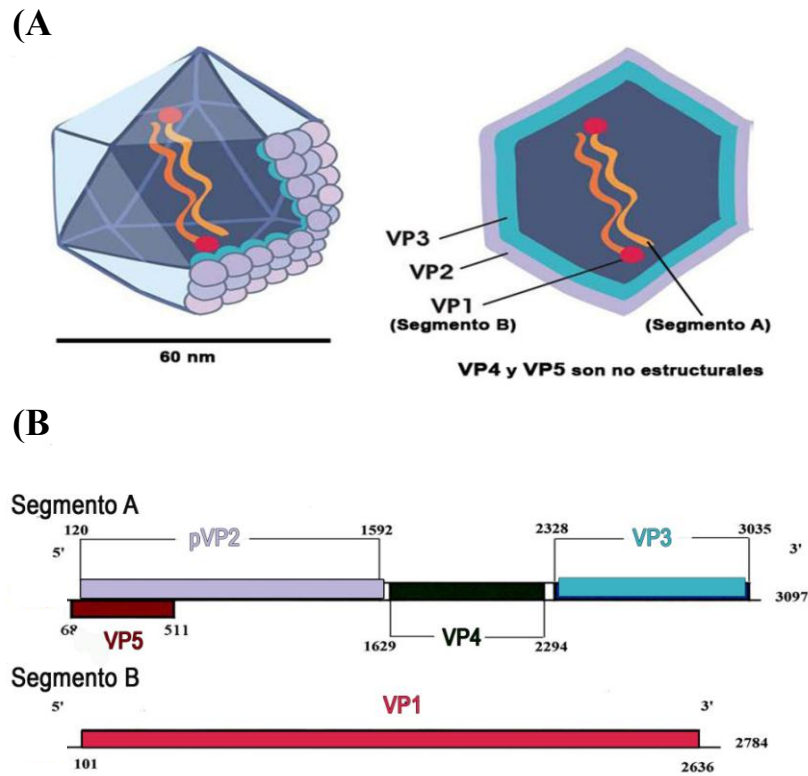
Figura 6. Distribución porcentual de la producción de acuicultura de dorada en el área mediterránea en 2011 (Sobre datos FAO, FEAP y APROMAR).

2. 3. *Patologías de origen vírico*

Como se ha mencionado anteriormente, la única patología de origen vírico descrita en dorada es la enfermedad de linfocistis (LCD), causada por el virus de *linfocistis* (LCDV), que pertenece al género *Lymphocystivirus*, incluido dentro de la familia *Iridoviridae*. Los peces afectados por LCD presentan numerosas pústulas que cubren todo su cuerpo, aunque no provocan la muerte del animal, sí hacen difícil su comercialización (Borrego y cols., 2000).

Además, la dorada puede comportarse como portador asintomático de otros virus que sí son patógenos de otras especies de peces, tales como el virus de la *Necrosis Nerviosa Viral*, (VNNV, familia *Nodaviridae*; Castri y cols., 2001), el virus de la *Necrosis Pancreática Infecciosa* (IPNV, familia *Birnaviridae*; Pérez-Prieto, y cols., 2001) y el virus de la *Septicemia Hemorrágica Viral* (VHSV, familia *Rhabdoviridae*; Esteban, y cols., 2008). Se describen a continuación las características de los dos virus utilizados en esta tesis: IPNV y VHSV.

IPNV es el agente causal de la necrosis pancreática infecciosa (IPN). Es un virus icosaédrico, desnudo, de 60 nm de diámetro (figura 7A), perteneciente a la familia *Birnaviridae*, cuyo genoma consta de dos segmentos, A y B, de RNA bicatenario (RNA_{bc}) (figura 7B).



Los síntomas de la IPN son distensión abdominal, natación errática, oscurecimiento de la piel, y lesiones focales necróticas en el tejido pancreático exocrino (McKnight y Roberts, 1976). Otros signos observados son palidez branquial, ligera exoftalmia, y erosión severa en la aleta dorsal.

IPNV está ampliamente distribuido en los países productores de salmónidos de América del Norte y del Sur, Europa y Asia. En el caso de peces marinos cultivados, se ha descrito la enfermedad en diferentes especies, concretamente, en España se ha detectado en el lenguado senegalés, el rodaballo, la urta y el pargo (Ledo y cols., 1990; Novoa y cols., 1991, 1992; Rodríguez y cols., 1997; Cutrin y cols., 2000; Lopez-Jimena y cols., 2010).

VHSV es el agente causal de la septicemia hemorrágica viral, pertenece al género *Novirhabdovirus*, familia *Rhabdoviridae* (Walker y cols., 2000), y presenta como material genético una única molécula de RNA monocatenario (RNAmc) de polaridad negativa (11-12 kb).

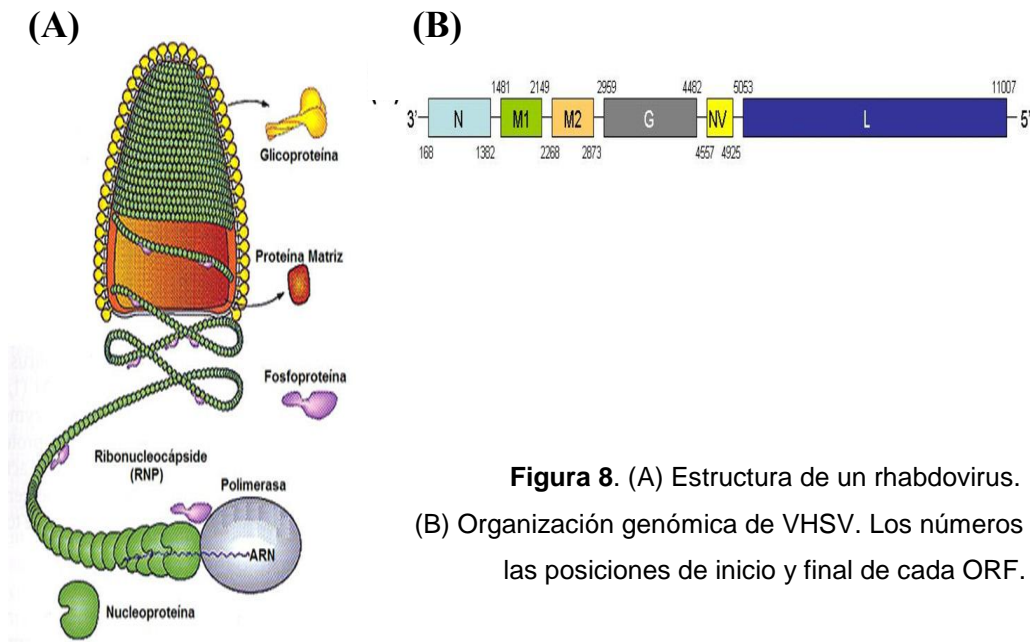


Figura 8. (A) Estructura de un rhabdovirus. (B) Organización genómica de VHSV. Los números indican las posiciones de inicio y final de cada ORF.

Los síntomas más comunes de la enfermedad son anorexia, lentitud de movimientos, letargia, oscurecimiento de la piel, palidez de las branquias, anemia, presencia de petequias, hemorragias en los ojos, en la base de las aletas y, en algunas ocasiones, en la piel, presentando frecuentemente exoftalmia bilateral o unilateral y edemas (Wolf, 1988). Se ha aislado de, al menos, 48 especies de peces, tanto marinas como de agua dulce (revisado en Skall y cols., 2005). Además, 11 especies piscícolas han sido descritas como susceptibles a la infección vírica bajo condiciones experimentales, considerándose la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) entre los hospedadores más susceptibles.

3. Estrategias de mejora de la resistencia a las enfermedades virales

En el momento actual, para frenar el desarrollo de patologías en los sistemas de producción, se suministran antimicrobianos o productos químicos que pueden resultar tóxicos para los peces y/o los consumidores, contaminantes del medio, o como en el caso de los antibióticos, inducir la aparición de multiresistencias en las cepas microbianas (Roberts, 2000; De Paola y cols., 1995). En el caso concreto de las infecciones víricas, la falta de tratamientos antivirales hace que las únicas medidas preventivas recomendadas sean las de carácter general, entre las que se incluyen el control exhaustivo de las posibles fuentes de infección (pienso, aguas de cultivo, etc.), de los peces a introducir en el sistema productivo, así como de las condiciones que pueden ocasionar situaciones de estrés, como la alta densidad de población o la manipulación de los animales.

Ante esta situación, resulta prioritario desarrollar estrategias preventivas que se basen en la mejora de la resistencia intrínseca de los animales a las infecciones. Dentro de estas estrategias destacan la administración de inmunoestimulantes, el desarrollo de vacunas y la aplicación de herramientas biotecnológicas. Sin embargo, para conseguir un desarrollo exitoso es necesario un conocimiento profundo de la interacción patógeno-hospedador, lo cual implica llevar a cabo un estudio previo tanto de los procesos patológicos como de la respuesta inmune del animal.

4. El sistema inmune de los peces

4. 1. Características generales

El sistema inmunitario de los teleósteos funciona de un modo muy similar al del resto de vertebrados. La respuesta inmunitaria es un mecanismo de defensa inducido por un agente extraño, el antígeno. Esta respuesta está bien desarrollada e integrada y puede ser de dos tipos: innata (o natural) y

adaptativa (o adquirida). En ambos tipos de respuesta están implicados tanto componentes celulares como humorales.

En comparación con otros grupos de vertebrados superiores, la importancia relativa del sistema inmune innato en peces es muy superior a la del adaptativo, ya que estos animales presentan un repertorio limitado de anticuerpos, poca memoria inmunológica y una proliferación de linfocitos lenta (Magnadóttir, 2006). Por el contrario, la respuesta inmune innata es rápida, inespecífica, muy poderosa y versátil, está muy conservada y es independiente de la temperatura.

4. 2. El sistema del interferón

El sistema inmune innato de los vertebrados posee un mecanismo de respuesta antiviral muy efectivo mediado por el interferón (IFN) (revisado en Samuel, 2001). Existen dos familias de esta citoquina, el IFN tipo I y el IFN tipo II. El IFN tipo I, que incluye el IFN- α y el IFN- β , es inducido por la infección viral en la mayoría de los tipos celulares, mientras que el IFN tipo II, IFN γ , es producido exclusivamente por células del sistema inmune (revisado en Samuel, 2001). El IFN desencadena un estado antiviral en los individuos infectados mediante la estimulación de cientos de genes, algunos de los cuales tienen actividad antiviral directa.

La acción de IFN- α e IFN- β está mediada por una cascada de señales que consta de dos fases (figura 9) (Doly y cols., 1998; revisado en Samuel, 2001). En primer lugar la síntesis de IFN se inicia rápidamente tras el reconocimiento por parte de la célula infectada de ARN bicatenario producto de la replicación vírica (Jacobs y Langland, 1996; Goodbourn y cols., 2000). El IFN I es entonces secretado por estas células con el fin de activar la síntesis de proteínas antivirales en las células vecinas, en las que se une a receptores específicos (interferon- α/β receptors, IFNAR1 e IFNAR2), presentes en todas las células nucleadas (Biron y Sen, 2001). Esta unión desencadena una cascada de señales que culmina en la formación del

complejo ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3), que está formado por los factores de transcripción STAT1 y STAT2 asociados a IRF-9. ISGF3 se une específicamente a los motivos ISRE (Interferon-Stimulated Response Element, $5'-(G/A/T)GAAAN_{(1,2)}GAAA(G/C)(A/T/C)-3'$), presentes en todos los promotores de los genes estimulados por IFN (ISGs, Interferon Stimulated Genes).

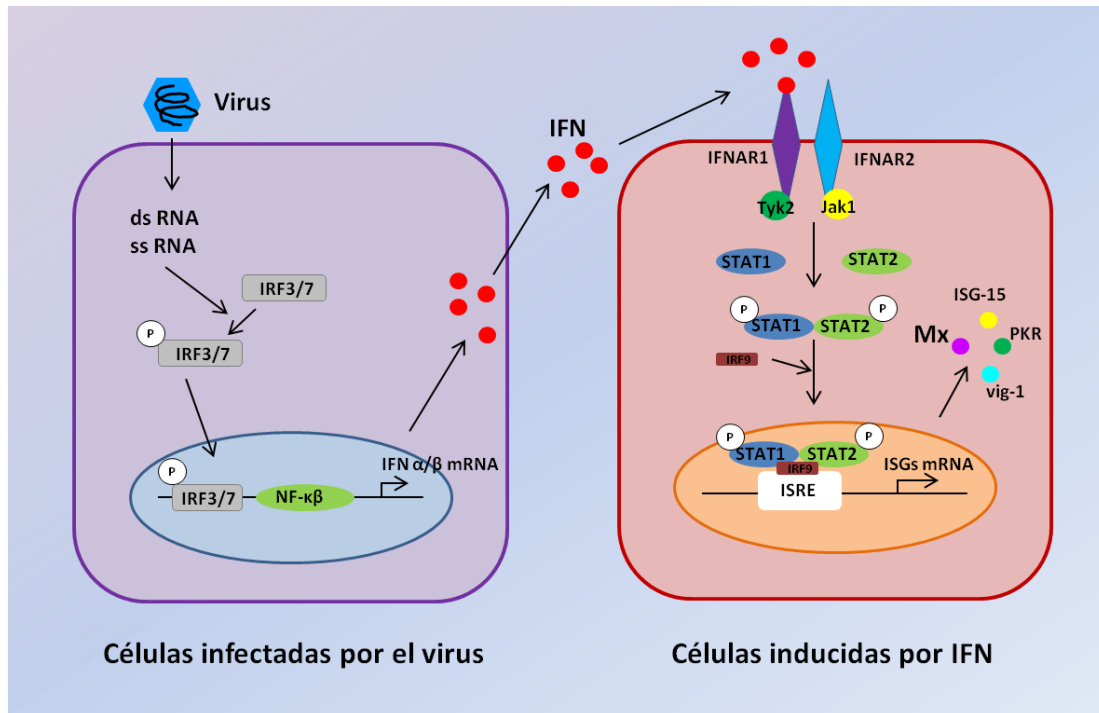


Figura 9. Inducción del IFN tipo I tras una infección vírica (revisado en Robertsen, 2006).

Por el contrario, el IFN- γ se une al complejo IFNGR compuesto por IFNGR-1 y IFNGR-2, desencadenando una cascada de señales que culmina en la formación del complejo de activación transcripcional GAF (IFN- γ -activated factor), el cual es un homodímero de Stat1 fosforilados, que se une a los motivos GAS (Gamma activated sites, $5'TTNCNNNAA3'$), presentes y característicos de los genes estimulados por IFN tipo II.

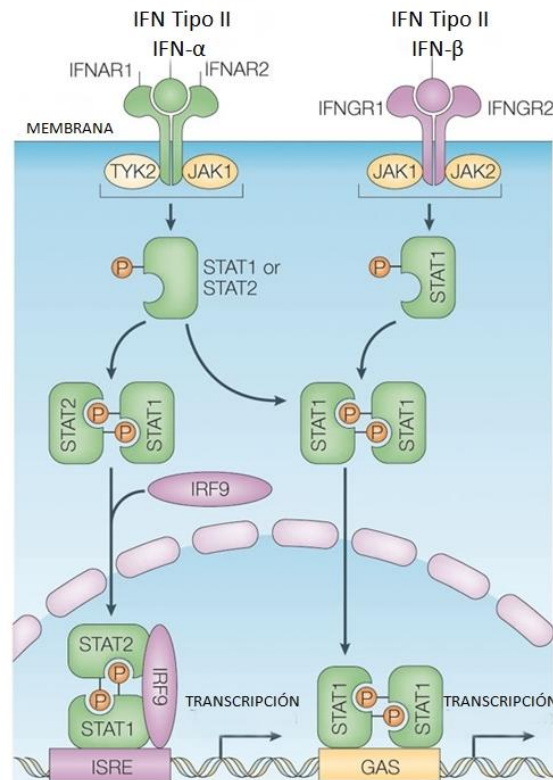


Figura 10. Cascadas de señalización de los dos tipos de interferón.

Aunque se ha demostrado una actividad similar a la del IFN de mamíferos en numerosas especies de peces (Ellis, 2001), la baja homología existente entre las secuencias de los genes de IFN en mamíferos y peces, hace que la clonación de dichos genes en vertebrados inferiores sea una tarea compleja. Por este motivo, la caracterización de los genes que codifican el IFN tipo I y II se ha llevado a cabo únicamente en unas pocas especies (revisado en Zou y Secombes, 2011) y las investigaciones se han centrado en la caracterización de los genes estimulados por IFN (ISGs). Entre los ISG identificados en peces destacan los de la proteína quinasa R dependiente de RNAbc (PKR) (Rothenburg y cols., 2005; Zhang y cols., 2007), la proteína vig-1 homóloga a la viperina de células humanas (Boudinot y cols., 1999), que inhibe la replicación del citomegalovirus humano (Chin y Creswell, 2001), la proteína Vig-2 (Boudinot y cols., 2001), la ISG-15 (Zhang y cols., 2007), una proteína similar a la ubiquitina, factores de regulación implicados en la ruta del interferón tales como IRF-1 (Yabu y cols., 1998) o IRF-2 (Collet y cols., 2003), este último de gran importancia en la regulación de la vía del interferon (revisado en Robertsen, 2006; Verrier y cols., 2011) y la proteína Mx, protagonista de esta tesis doctoral.

5. Las proteínas Mx

5. 1. Características generales

Las proteínas Mx fueron descritas por primera vez por Lindenmann (1962), durante el estudio de la resistencia al virus de la influenza (*Orthomyxovirus*) en ratones. Esta resistencia estaba mediada por el producto de un solo gen al que denominó Mx1. En la actualidad, las Mx constituyen uno de los ISGs más extensamente estudiados, ya que juegan un papel fundamental en la respuesta antiviral activada por el IFN (Horisberger y Gunst, 1991).

Las proteínas Mx son GTPasas de alto peso molecular pertenecientes a la superfamilia de las dinaminas. Esta superfamilia se caracteriza por tener baja afinidad por el GTP, alta tasa de hidrólisis del mismo y estar altamente conservadas en vertebrados (revisado en Hinshaw, 2000). Están implicadas en el tráfico intracelular y en la remodelación de las membranas intracelulares (Kochs y cols. 2005). Su estructura consiste en un dominio amino-terminal muy conservado que contiene el motivo tripartito de unión a GTP, y un dominio efector en el extremo carboxilo terminal, implicado en la oligomerización de las proteínas, que contiene a su vez un dominio interactivo central (CID) y una cremallera de leucinas (LZ) (Haller y cols., 2007).

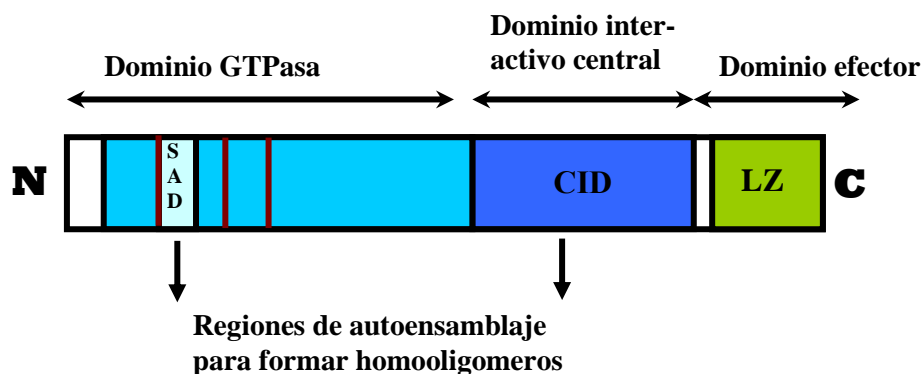


Figura 11. Estructura de la proteína Mx. El dominio GTPasa contiene los elementos tripartitos de unión a GTP (líneas verticales rojas) y el dominio de autoensamblaje, SAD. CID: dominio interactivo central; LZ: cremallera de leucinas (Haller y col., 2007).

Estas proteínas forman homooligómeros y se autoensamblan *in vitro* formando anillos o hélices, como resultado de la unión de la región LZ de una molécula al dominio CID de una segunda molécula vecina (Kochs y cols., 2002), lo que parece ser crítico tanto para su actividad GTPásica, como para su estabilidad y el reconocimiento de las proteínas virales diana.

Las proteínas Mx de vertebrados suelen aparecer en distintas isoformas, tales como Mx1, Mx2 y Mx3 de rata, Mx1 y Mx2 de ratón o MxA y MxB de humanos (Lee y Vidal, 2002; Li y cols. 2009), y difieren tanto en su especificidad antiviral como en su localización intracelular. La proteína MxA de humanos, la más estudiada, inhibe un amplio espectro de virus que incluye tanto virus RNA, como virus DNA (Frese y cols., 1996; Zhao y cols., 1996; Landis y cols., 1998; Haller y cols., 2007). También se han descrito proteínas que no poseen actividad antiviral, como la MxB de humanos (Pavlovic y cols., 1990), la Mx3 de rata (Meier y cols., 1990) o la Mx de pato (Bazzigher y cols., 1993). Aunque el mecanismo de acción de las Mx no se conoce en detalle, parece claro que está basado en una interacción directa entre la proteína Mx y una diana viral que debe ser identificada en cada caso (Mitchell y cols., 2012).

En peces, la caracterización de los genes y de la actividad de las proteínas Mx es de gran interés, puesto que al igual que ocurre en vertebrados superiores, su papel es clave dentro de la respuesta antiviral desencadenada por el IFN tipo I. En los últimos años se han clonado y caracterizado los cDNA de proteínas Mx de diversas especies de peces, habiéndose descrito varias isoformas en muchas de ellas. Asimismo, se conocen algunas secuencias genómicas y se ha estudiado su localización intracelular y su actividad antiviral, que se ha demostrado de forma directa en especies tan importantes para la acuicultura como la platija japonesa, el salmón, la perca barramundi, el mero, o el lenguado (Caipang y cols., 2003; Larsen y cols., 2004; Lin y cols., 2006; Wu y Chi, 2007; Fernández-Trujillo y cols., 2008) (Tabla 1).

Especie	DNAg	cDNA	Localización	Especificidad antiviral	Referencia
Anguila – <i>A. anguilla</i>		2			-
Carpa dorada – <i>C. auratus</i>		2	C		Zhang y cols, 2004
Carpa herbívora – <i>C. idella</i>		3			-
Pez cebra – <i>D. rerio</i>		7	C		Altmann y cols, 2004
Mero – <i>E. coioides</i>		3	C	YGNNV, VNNV	Lin y cols, 2006; Chen y cols, 2006
Mero tigre – <i>E. fuscoguttatus</i>		1	N		Cheng y cols, 2012
Rare minnow – <i>G. rarus</i>		1	C	GCRV	Su y cols., 2009
Fletán atlántico - <i>H. hippoglossus</i>		2	N + C		Jensen y Robertsen, 2000
Pez gato – <i>I. punctatus</i>	1*	2*			Plant y Thune, 2004, 2008
Corvina japonesa – <i>L. crocea</i>		1			-
Perca Barramundi – <i>L. calcarifer</i>		1		VNNV, IPNV	Wu y Chi., 2007
Trucha arcoíris – <i>O. mykiss</i>		3	N + C	IPNV, SAV, IHNV	Trobridge y Leong., 1995; Trobridge y cols., 1997; Lester y cols., 2012
Knifejaw barrado– <i>O. fasciatus</i>		3			Zenke y Kim, 2009
Tilapia del Nilo – <i>O. niloticus</i>		2			-
Sargo – <i>P. major</i>		2			-
Platija japonesa – <i>P. olivaceus</i>		1	C	HIRRV, VHSV	Lee y cols., 2000; Caipang y cols., 2003
Salmón atlántico – <i>S. salar</i>		3	C	IPNV, ISAV	Robertsen y cols., 1997; Larsen y cols., 2004; Kibenge y cols., 2005
Rodaballo – <i>S. maximus</i>		2	N + C		Abollo y cols., 2005
Pez mandarín – <i>S. chuatsi</i>		1			-
Lenguado senegalés – <i>S. senegalensis</i>	1	1	C	IPNV, VHSV	Fernández-Trujillo y cols., 2006, 2008; Álvarez-Torres y cols., 2013
Dorada – <i>S. aurata</i>	3	3	C	IPNV, VHSV, ESV, LCDV	Fernández-Trujillo y cols., 2011a, 2011b, 2013
Fugu – <i>T. rubripes</i>	1		C		Yap y cols., 2003

Tabla 1. Información existente sobre proteínas Mx de peces. C: citoplasma; N: núcleo.

*En pez gato se han clonado 5 promotores distintos, pero sólo hay publicadas 2 secuencias de cDNA y 1 de DNAg.

5. 2. Las proteínas Mx de dorada

La dorada posee tres genes Mx, denominados Mx1, Mx2 y Mx3, cuyos cDNAs y DNA genómicos completos han sido clonados y caracterizados en nuestro grupo de investigación (Fernández-Trujillo y cols., 2011a). Los tres genes poseen todos los elementos característicos de las Mx, son proteínas citoplasmáticas y poseen un alto porcentaje de identidad, de hecho al realizar el estudio filogenético las secuencias de aminoácidos de Mx1, Mx2 y Mx3 se agruparon de forma clara en uno de los dos grupos que forman los perciformes (figura 12).

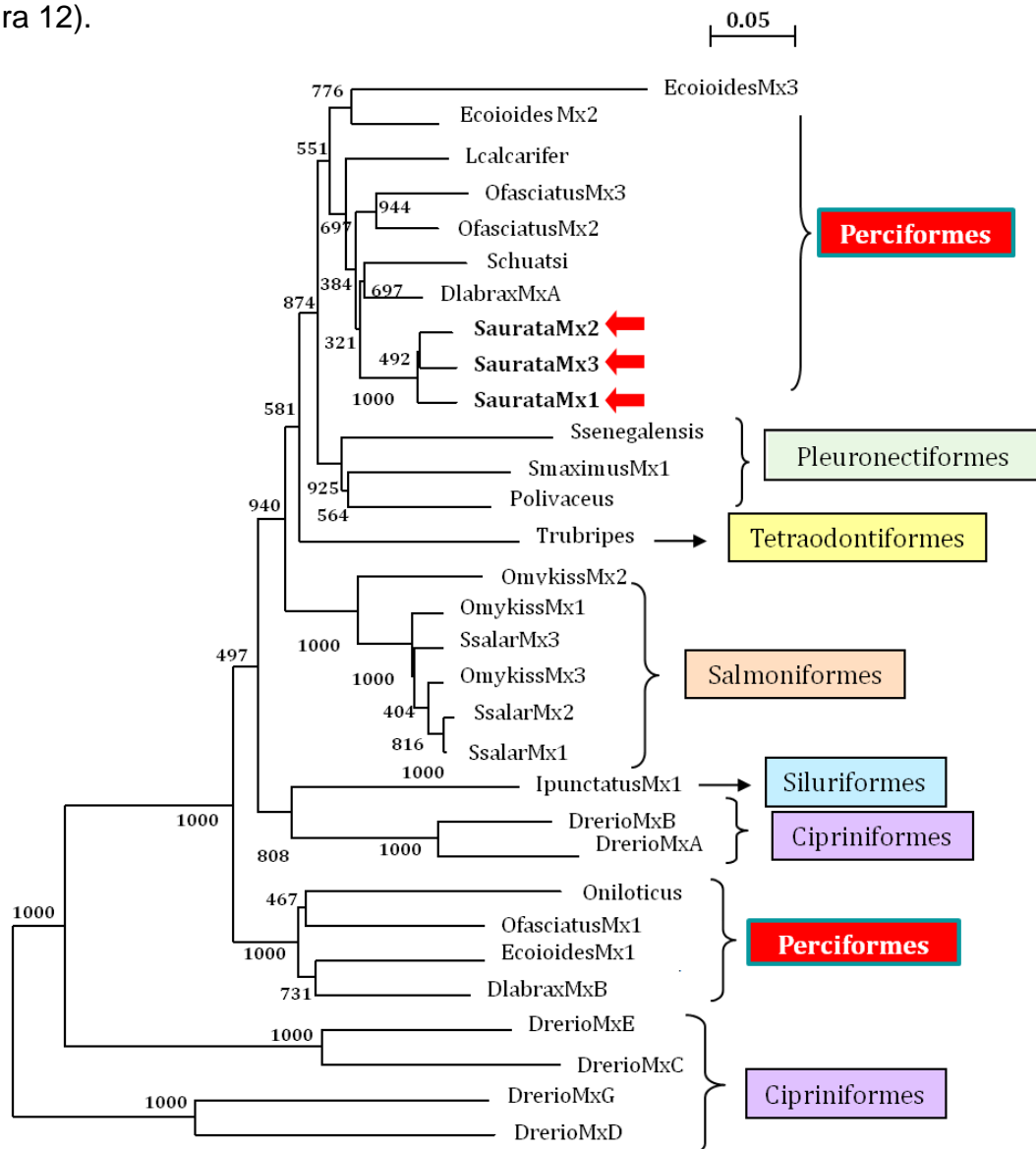


Figura 12. Árbol filogenético no enraizado de las secuencias de aminoácidos de las Mx de peces. Los porcentajes de identidad de las Mx de dorada fueron: Mx1/Mx2: 95.2 %; Mx1/Mx3: 95.8 %; Mx2/Mx3: 95.2 %.

Para la caracterización funcional de estas proteínas se han desarrollado sistemas experimentales *in vitro* consistentes en células CHSE que expresan de forma estable cada una de estas proteínas. En estos sistemas se ha estudiado la actividad antiviral de las tres proteínas Mx de dorada (Fernández-Trujillo y cols., 2011b, 2013): las tres proteínas presentan actividad antiviral, así como interesantes diferencias en cuanto a su especificidad antiviral. Concretamente, Mx1 muestra actividad antiviral contra LCDV y VHSV y además interfiere en la síntesis del RNA viral de IPNV sin afectar a la producción viral. Mx2 muestra actividad contra IPNV y frente a los dos virus DNA probados, LCDV y ESV. Por último, Mx3 confiere resistencia sólo contra VHSV e IPNV. En definitiva, las proteínas Mx de dorada poseen un amplio espectro antiviral, que abarca virus de diferentes familias y con diferente composición genómica.

Virus	Mx1	Mx2	Mx3
IPNV (dsRNA)	✓	✓	✓
VHSV (ssRNA)	✓		✓
LCDV (dsDNA)	✓	✓	
ESV (dsDNA)		✓	

Tabla 2. Especificidad antiviral de las proteínas Mx de dorada

Estos datos apoyan la relevancia de las proteínas Mx de dorada en la defensa antiviral de esta especie.

5. 3. Regulación de la expresión de las proteínas Mx

La expresión espacio-temporal de los ISGs está regulada de forma muy compleja. La razón de esa complejidad radica en su importante papel en el gobierno de la respuesta del IFN, y por consiguiente en la defensa del hospedador frente a las infecciones víricas. Por lo tanto, para comprender la interacción patógeno-hospedador es esencial conocer en profundidad los mecanismos que regulan la respuesta del IFN (Zou y Secombes, 2011).

Con este objetivo, un buen número de promotores de genes regulados por IFN han sido caracterizados en diversas especies de peces. La característica

común de estos promotores es la presencia de al menos un elemento ISRE, cuya secuencia consenso es: 5'-(G/A/T)GAAAN(1-2)GAAA(G/C)(A/T/C)-3', y que puede considerarse el elemento distintivo de los ISGs (Zhang y Gui, 2012). En el anexo I (tabla 8) se presentan las características de los motivos reguladores identificados en los genes estimulados por IFN.

En cuanto a los promotores de las proteínas Mx, se han caracterizado en varias especies de vertebrados superiores y de peces (Tabla 3). Se caracterizan por presentar elementos ISRE en número variable, generalmente en el extremo 3' de los promotores, por presentar motivos GAAA, denominados "ISRE-core sequences", así como otros elementos entre los que destacan las secuencias GAS (Gamma-activated sites), que son las secuencias características de los promotores estimulados por IFN II (Zhang y Gui, 2012). Por otro lado, es destacable que la mayoría de los promotores Mx descritos carecen de caja TATA, lo cual parece estar asociado a la presencia de regiones ricas en GC que están implicadas en la unión de factores de transcripción ubicuos como el Sp1 (Zhang y cols., 1994), y que se asocian a genes con múltiples sitios de transcripción y con una compleja regulación de su expresión (Deaton y Bird, 2011).

La regulación de la expresión de los genes Mx se ha estudiado mediante la transfección de líneas celulares con un plásmido que contiene el gen de la luciferasa controlado por promotores de Mx (Collet y Secombes, 2001; Yap y cols., 2003; Altmann y cols., 2004; Collet y cols., 2004; Johansen y cols., 2004; Ooi y cols., 2005). Este sistema parece idóneo tanto para dilucidar como para cuantificar este proceso, así como para determinar algunas de las interacciones entre el sistema inmune innato y la replicación vírica.

De hecho, utilizando este tipo de aproximación experimental, varios trabajos han revelado el papel fundamental de la regulación de la expresión de las Mx en la interacción virus-hospedador. Por un lado, se ha observado que los promotores de la Mx de trucha arcoíris y de salmón atlántico responden tanto a IFN I como a IFN II (Jørgensen y cols., 2007; Sun y cols., 2011), por lo que los

	ESPECIE	ISRE CANÓNICA	ISRE LIKE	GAS	TATA box	IL-6	SP-1	AP-1	NF-kB	REFERENCIA	
VERTEBRADOS SUPERIORES	Gallo	2		1		1				Schumacher y cols, 1994	
	Ratón	Mx1	1			SI	1			Hug y cols, 1988	
		Mx2	1	1(3n)			1	1			Asano y cols, 2003
	Vaca Mx1 (a)	1	1			2	2		1	Gérardin y cols, 2003	
	Vaca Mx1 (b)	4				2		2	2	Yamada y cols, 2009	
	Oveja Mx1	2	1	3		4	6	3	3	Assri y Ott, 2006	
	Humanos MxA	2	1(3n)			3	1		1	Ronni y cols., 1988	
PECES	Trucha arcoíris Mx1	1		1	SI	1				Collet y Secombes, 2001	
	Fugu	2								Yap y cols, 2003	
	Pez cebra MxA	2		4		1		1		Altmann y cols., 2004	
	Platija japonesa	4		2	SI					Ooi y cols , 2005	
	Pez gato	Mx1	1		1					2	Plant y Thune, 2004 Plant y Thune, 2008
		Mx2		1(3n)	1	SI	1				
		Mx3		1(3n)	1				2		
		Mx4			2		1		1		
Mx5			1(3n)	3		1		2			
Lenguado senegales	3		1			2	1		Alvarez-Torres y cols., 2013		

Tabla 3. Información existente sobre algunos de los promotores Mx caracterizados en peces y en vertebrados superiores. Se presentan los sitios de unión a factores de transcripción identificados. Los elementos ISRE-LIKE son mutaciones puntuales excepto en los casos señalados como (3n), los cuales presentan 3 nucleótidos entre los motivos GAAA.

promotores Mx pueden representar un elemento común en el que ambas rutas de señalización convergen. Y por otra parte, se ha demostrado que varios virus parecen bloquear la activación del promotor de la Mx de trucha (Collet y cols., 2007; Jørgensen y cols., 2007; Skjesol y cols., 2009), es decir, la expresión de la Mx parece ser la diana de la actividad antagonista de estos virus.

Aproximadamente el 50% de los virus identificados en la actualidad poseen la capacidad de bloquear el estado antiviral impuesto en la célula hospedadora por la respuesta del IFN (Versteeg y García-Sastre, 2010). Para ello, el virus en cuestión puede actuar tanto en la transcripción como en la traducción de los genes de IFN, o en la transcripción o traducción de los ISGs (revisado en Randall y Goodbourn, 2008).

Conocer el funcionamiento de estos mecanismos antagonistas y el modo en el que los factores virales interactúan con la maquinaria celular es esencial para entender la interacción patógeno-hospedador y a la vez representan uno de los aspectos más interesantes de la regulación de la expresión de los ISGs en general y de los genes de las proteínas Mx en particular.



O bjetivos

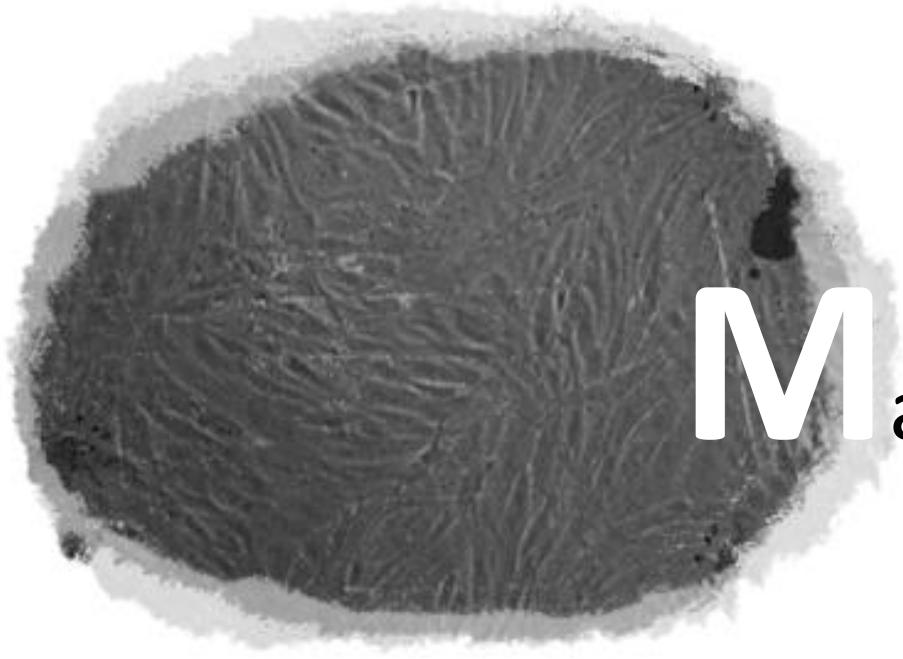
OBJETIVOS

Dado el papel protagonista de las proteínas Mx en la exitosa respuesta antiviral de la dorada, y la relevancia del conocimiento de la regulación de su expresión para comprender la interacción virus-hospedador en esta especie, en la presente tesis doctoral se planteó como **OBJETIVO**:

**La clonación y caracterización estructural y funcional
de los promotores de los genes de las proteínas antivirales
Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada (*Sparus aurata*).**

Este objetivo se abordó mediante los siguientes objetivos parciales:

1. Clonación de los promotores de los genes Mx1, Mx2 y Mx3 y caracterización de su estructura.
2. Construcción de los vectores necesarios para la caracterización funcional de los tres promotores.
3. Evaluación de la actividad de los tres promotores en respuesta a poli I:C.
4. Evaluación de la actividad de los tres promotores en respuesta a la infección por los virus IPNV y VHSV.
5. Evaluación del posible efecto antagonista de IPNV y VHSV sobre los promotores de los tres genes Mx de dorada.



Material

&



Método **S**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Clonación los promotores de la Mx1, Mx2 y Mx3 y caracterización de su estructura

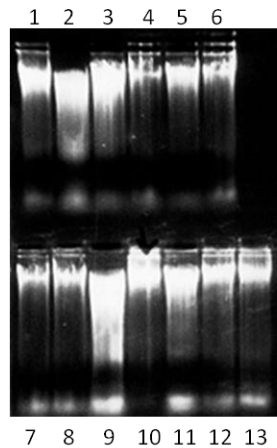
1. 1. *Extracción de DNA genómico de aleta caudal de dorada*

El DNA genómico de dorada fue extraído mediante el método de precipitación salina (Martínez y cols., 1988). En total se realizaron 20 extracciones de aleta de distintos individuos. A 10 mg de aleta caudal recién cortada, se le añadieron 300 μ L de tampón de lisis I (0.1 M tris-HCl pH 8.0 y 0.1 M EDTA pH 8.0) y se volteó el tubo durante 1 min. A continuación se añadieron 300 μ L de tampón de lisis II (0.1 M tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0 y 1 % SDS) y se volteó 1 min. Seguidamente se añadieron 32 μ L de solución de precipitación (NaCl 6 M) y 30 μ L de proteinasa K (20 mg/ml) (Promega). En este punto se dejó en agitación a 55 °C toda la noche.

Al día siguiente y una vez atemperados los tubos en hielo durante 10 min, se les añadieron 30 μ L de RNAsa (10 mg/ml) (Promega) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se añadieron 160 μ L de solución de precipitación (NaCl 6 M) y se incubaron en hielo durante 10 min. A continuación se centrifugaron 10 min a 13.000 rpm a 4 °C y se pasó el sobrenadante a un tubo limpio. Este paso se realizó dos veces para mejorar la pureza del DNA genómico. La precipitación del DNA se llevó a cabo mediante la adición de 600 μ L de isopropanol al sobrenadante. Se invirtieron los tubos 25 veces y se dejaron atemperar a temperatura ambiente 10 min. Luego, se centrifugaron 3 min a 13.000 rpm a 4 °C, se retiró el sobrenadante cuidando que el pellet se mantuviera en el fondo. Finalmente, se añadieron 500 μ L de etanol al 70 % a -20 °C y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet en hielo. Una vez eliminado cualquier resto de etanol, el pellet con el DNA genómico se disolvió en 30 μ L de agua bidestilada estéril y se dejó hidratar durante 24 h a 4 °C. La concentración de las muestras se determinó en un espectrofotómetro, Nanodrop ND-1000 (Thermo).

Para comprobar la pureza y calidad del ADN genómico obtenido se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.6 %, donde se corrieron 0.1 μ g de DNA a 40 mV. Además, se realizaron digestiones (0.1 μ g de DNA) con *DraI* (Takara).

Extracciones de DNA genómico
de aleta caudal de dorada.



Digestiones con *DraI*:
comprobación de la
calidad del genómico.

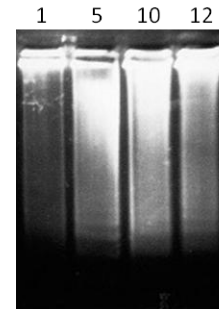


Figura 13. En la figura de la izquierda se muestra un gel de agarosa con el DNA genómico correspondiente a las extracciones 1-13. Las extracciones elegidas para continuar los experimentos fueron 1, 5, 10 y 12, las cuales presentaban un DNA genómico menos degradado y menor cantidad de RNA. En la imagen de la derecha se muestra la electroforesis de las digestiones con *Dra I* de las extracciones de genómicos elegidas. Las de mayor calidad son las que muestran un barrido mayor y que corresponden a las extracciones 5 y 10.

1. 2. Obtención de las genotecas genómicas

La técnica denominada “*genome walking*” consiste en la amplificación de secuencias desconocidas de DNA genómico, adyacentes a secuencias ya conocidas, según se esquematiza en la figura 14. En nuestro caso, se disponía de las secuencias genómicas de los genes completos de Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada (M119602, HQ264099, and HM159991) los cuales habían sido obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación (Fernandez-Trujillo, 2011a). Estas secuencias presentaban entre sí una identidad del 100 % en el exón 1, por lo que el diseño de primers específicos se realizó sobre la secuencia del intrón 1, donde aparecían las primeras diferencias entre los tres genes. Para cada Mx se diseñaron una pareja de *primers* reversos que se

denominaron ExtMx1R, IntMx1R, ExtMx2R, IntMx2R, ExtMx3R e IntMx3R, y cuyas secuencias se muestran en la tabla 4.

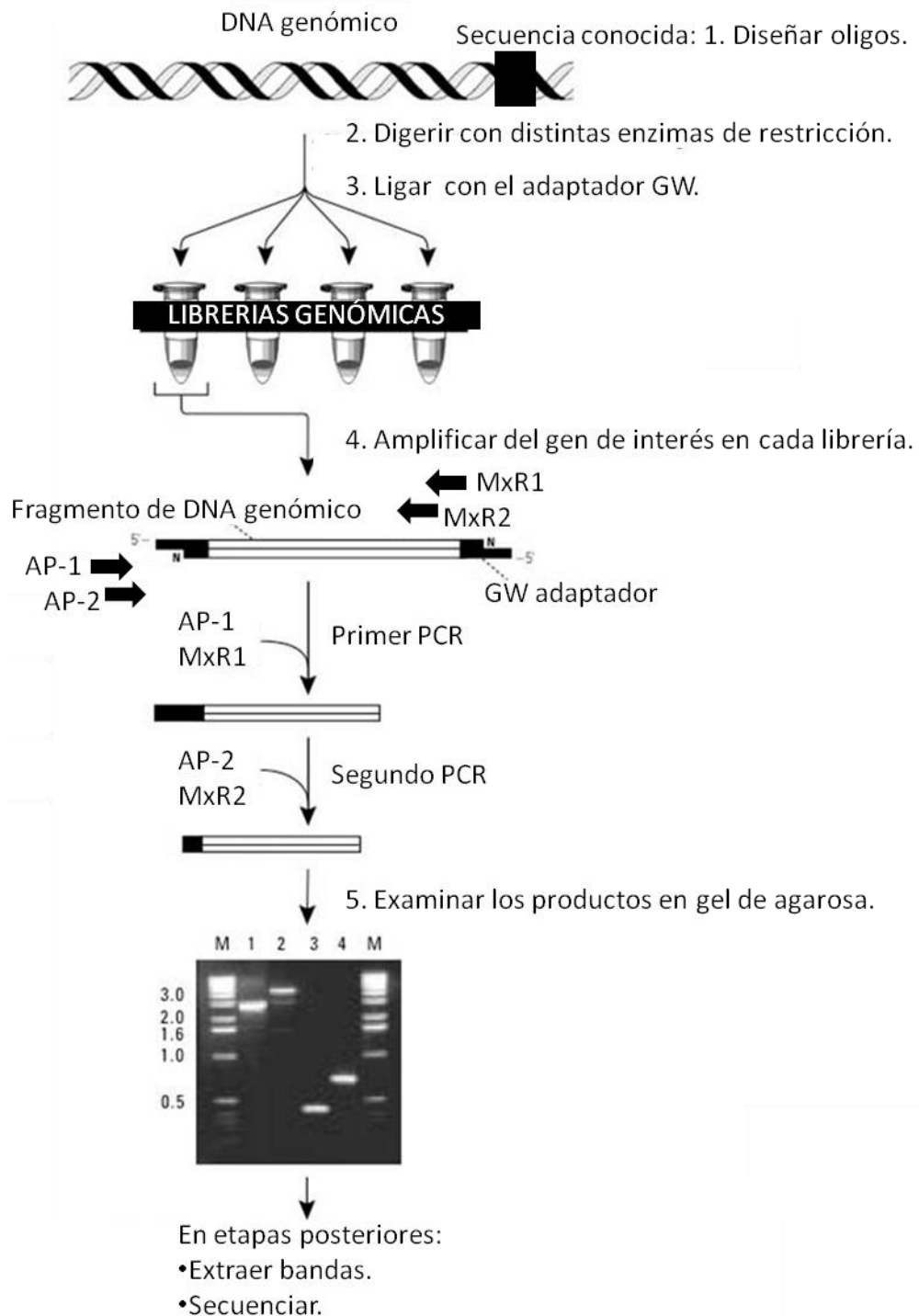


Figura 14. Esquema de los principales pasos del método de secuenciación por Genome Walking. Pon genoteca en vez de librería y primers en vez de oligos para que siempre sea igual, los nombres en vez de MxR1 y MxR2 pon ExtMxR, IntMxR, que es como los llamamos en el texto.

El DNA genómico se digirió con enzimas de restricción que dejan extremos romos (AfeI, EcoRV, HindIII, HpaI, NruI, PvuII, ScaI, SmaI and SmaI) (Takara) y otras que dejan extremos cohesivos (ApaI, BglI, BglII, ClaI, EcoRI, HindIII, KpnI, NaeI, NdeI, NotI, SacI, SalI, SpeI, SphI, XbaI y XhoI) (Takara). Estas últimas se usaron como alternativa a las digestiones anteriores para el caso de Mx1. La elección de las enzimas se realizó mediante el análisis previo del patrón de digestión de cada secuencia, comprobando que ninguna de las enzimas seleccionadas cortaba entre los primers diseñados, desde los intrones y el ATG. Para ello se empleó la aplicación telemática NebCutter (PubMed). Cada digestión se llevó a cabo con 25 μL de DNA genómico (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 8 μL de la enzima de restricción correspondiente (10 U/ μL), 10 μL de tampón (10 X) y 57 μL agua bidestilada en un volumen final de 100 μL . La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se volvieron a invertir varias veces y se volvieron a incubar hasta el día siguiente. Las digestiones que dejan extremos cohesivos se trataron después con el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I (Takara) para hacer los extremos romos. Para ello al DNA digerido (entre 0.1 y 4 μg , según digestiones) se le añadieron 2 μL de tampón *klenow* 10X, 0.5 μL de mezcla de dNTPs a 2 mM (0.05 mM de cada nucleótido), 0.5 μL de fragmento *Klenow* (10 U/ μL), y agua hasta 20 μL . Se incubaron los tubos a 37 °C durante 10-15 min y se detuvo la reacción con un choque térmico a 72 °C durante 10 min. Para comprobar que el DNA se había digerido completamente, se realizó una electroforesis de cada digestión (5 μL) en un gel de agarosa al 0.6 % a 40 mV.

A continuación, se purificó el DNA añadiéndole un volumen de fenol, se centrifugó 5 min a 13.000 rpm a 4 °C y se transfirió la fase acuosa a otro *ependorf* en hielo. Luego se añadió un volumen de cloroformo y se repitió el proceso. Para precipitar el DNA se añadieron 2 volúmenes de etanol 95 % a -20 °C, 1/10 volumen de Acetato sódico 3 M a pH 4.5 (9.5 μL), y 20 μg de glucógeno (1 μL de una solución a 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Promega). Tras centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm a 4 °C, se retiró el sobrenadante y el pellet se disolvió en 20 μL de tampón TE (10mM de TrisHCl y 0.1 mM de EDTA a pH 7.5). Finalmente se midió la concentración de DNA de cada muestra en el nanodrop.

Nombre	Secuencia 5'-3'
ExtMx1R	ACACAGTGTCAAACAGAAGGAGATG
IntMx1R	AATACATCTTACATGACAAAAGAGGCCTG
ExtMx2R	TAGCAGAAATGTTCTTTATGACTGGAG
IntMx2R	ATCTGCAATACATATCCATATCCGC
ExtMx3R	TGTTATTAACATATGAATATTTCCGGG
IntMx3R	TTTTCTTAATTACCACACCTGTCC
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
PLMx1R	TCCATCTCATCTTTGGCGTTTCG
PLMx2R	GTATTGTGGCACTCTGTTTGACCTCAG
PLMx3R	ATGCTGTGGTTGTCCCTGTTCC
Mx1F	CGTCTGATTTCTCGTCGTCTAGGAAAG
Mx2F	GCTTCACTCTGCACTGTTACAATGAGC
Mx3F	TTAATTGGCCTAGATGACATTCGGTATC
AD1	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT
AD2	(P)ACCAGCCC

Tabla 4. Primers usados para el Genome Walking. (P) indica grupo fosfato en 5'.

1. 3. Ligación del DNA genómico a los adaptadores

Los adaptadores se prepararon a partir de los oligos que lo componen (AD1 y AD2) y cuyas secuencias se muestran en la tabla 4. Se pusieron en un tubo ambos oligonucleótidos a una concentración de 25 μ M y se incubó a 100 °C durante 5 min. Seguidamente, se dejó a temperatura ambiente 20 min y otros 20 min a 4 °C, para que hibridasen de manera correcta.

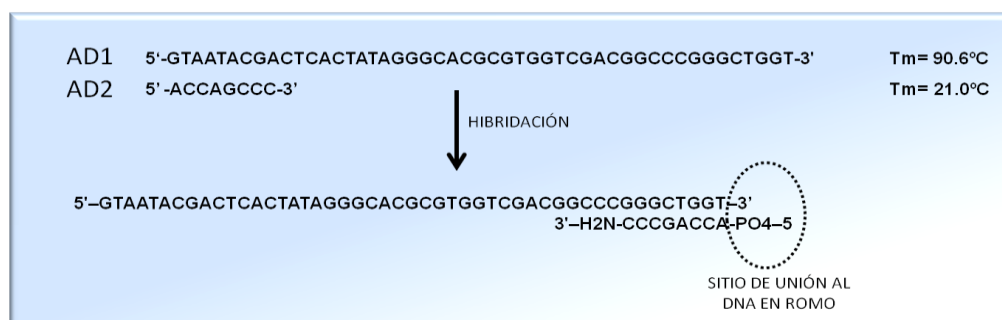


Figura 15. Formación de los adaptadores.

A continuación, el DNA digerido se ligó al adaptador. Para ello se transfirieron 4 μL de DNA genómico digerido a un eppendorf nuevo a 4 $^{\circ}\text{C}$, y se añadieron 1.9 μL de Adaptador (25 μM), 0.5 μL de enzima T4 DNA ligasa (6 U/ μl) (takara) y 1.6 μL de buffer T4 DNA ligasa 10X. Se dejó incubar a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Finalmente, se detuvo la reacción mediante incubación a 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min y se añadieron 72 μL de tampón TE (10/1, pH 7.5), llevando la reacción hasta un volumen final de 80 μL .

1. 4. Amplificación de fragmentos mediante Nested-PCR

La amplificación se llevó a cabo mediante Nested-PCR. Los primers reversos fueron los diseñados en los intrones de cada Mx y los directos son los llamados AP1 y AP2 que se unían a los adaptadores. La enzima usada fue GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega). Para el primer PCR se usó como DNA molde 1 μl de cada ligación y para el segundo (nested) 1 μl del primer PCR. Los programas de los PCR fueron:

1. Para el primer PCR: 95 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; (95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 56 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2.5 min) x 35 ciclos; 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min. Las parejas de primers: AP1/ExtMx1R, AP1/ExtMx2R y AP1/ExtMx3R.
2. Para el segundo PCR: 95 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; (95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 64 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2.5 min) x 35 ciclos; 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min. Las parejas de primers: AP2/IntMx1R, AP2/IntMx2R y AP2/IntMx3R.

1. 5. Purificación, secuenciación y análisis de los fragmentos

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 0.6 %. Las bandas obtenidas fueron purificadas mediante el kit “Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). Seguidamente se secuenciaron utilizando los primers reversos usados en la segunda ronda de PCR.

Antes de proseguir con la obtención de secuencias de mayor tamaño, se realizó un PCR de control utilizando un *primer* directo diseñado a partir de la secuencia obtenida. Estos nuevos *primers* se denominaron Mx1F, Mx2F y

Mx3F. Los primers reversos utilizados fueron los del segundo PCR. Una vez comprobado que cada fragmento obtenido correspondía a su Mx de partida, se diseñaron otros tres primers reversos en el extremo 5' de cada secuencia, y se realizaron nuevos PCRs junto con el primer AP2, con el fin de seguir avanzando en la secuencia. Los *primers* diseñados fueron PLMx1L, PLMx2L y PLMx3L para Mx1, Mx2 y Mx3 respectivamente. Las condiciones de los PCR fueron: 95 °C, 2 min; (95 °C, 30 s; 64 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min) x 35 ciclos; 72 °C, 5 min.

Paralelamente, se realizó un PCR de comprobación con combinaciones Mx1-Mx2, Mx1-Mx3 y Mx2-Mx3 de primers directos y reversos, es decir: Mx1F/IntMx2R, Mx1F/ IntMx3R, Mx2F/IntMx1R, Mx2F/IntMx3R, Mx3F/ IntMx1R y Mx3F/ IntMx2R. La enzima usada fue GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) y las condiciones de los PCR fueron: 95 °C, 2 min; (95 °C, 30 s; 64 °C, 30 s; 72 °C, 2.5 min) x 35 ciclos; 72 °C, 5 min. En ningún caso se obtuvieron productos de PCR con estas combinaciones control.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa SeqmanII (DNA Star), el cual permite el alineamiento de secuencias formando contigs. De este modo, todos los fragmentos obtenidos de cada promotor se solaparon formando un contig de aproximadamente 1 Kb. El análisis de los contigs se realizó con el programa ClustalW, que permite comparar secuencias.

2. Construcción de los vectores necesarios para la caracterización funcional de los tres promotores

2. 1. Los genes de luciferasa

Las luciferasas son proteínas que emiten luz tras la degradación de un sustrato específico y entre ellas, la luciferasa “*firefly*” de 61 kDa procedente de la luciérnaga (*Photinus pyralis*), y la luciferasa “*renilla*” de 36 kDa y procedente del cnidario *Renilla reniformis*, son de elección para cuantificar la actividad de promotores. Entre sus ventajas figuran el ser funcionales justo después de la traducción, y que el ensayo de su actividad es fácil, rápido y fiable. En la figura

16 se esquematiza el fundamento del uso de la luciferasa en este tipo de ensayos.

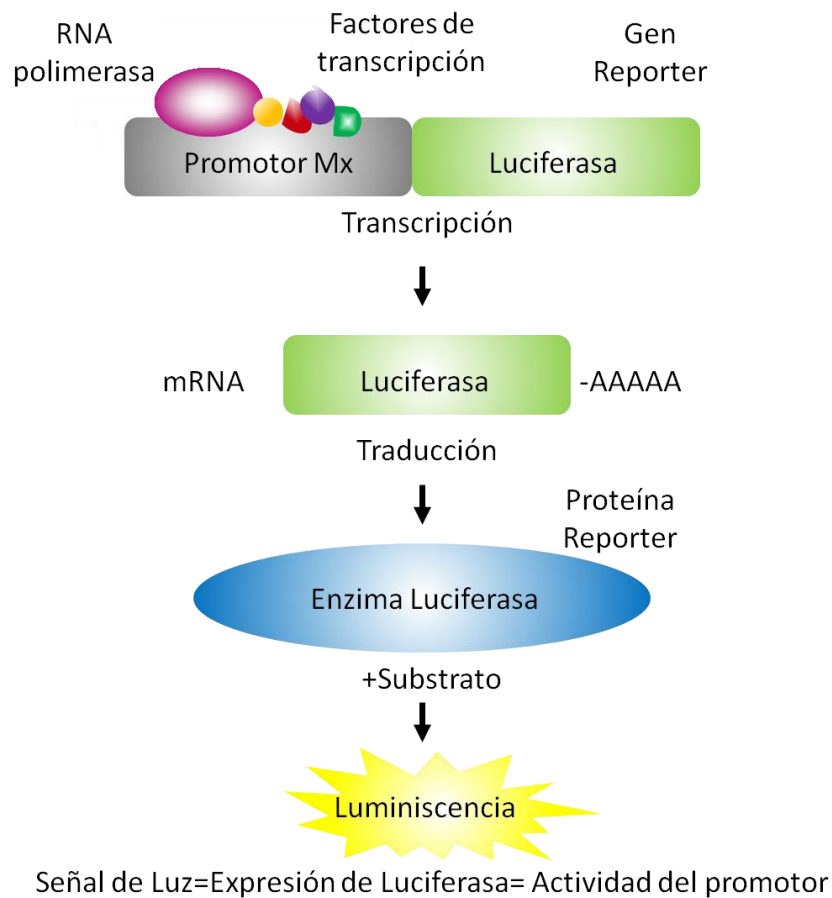


Figura 16. Esquema del uso del gen luciferasa para analizar la actividad de secuencias promotoras a modo de gen *reporter*.

Por lo tanto, una vez obtenidas las secuencias de los promotores, se procedió a la construcción de los vectores con luciferasa necesarios para su análisis funcional. Para ello se utilizó el vector pGL4.22 [luc2CP/Puro] (Promega) (figura 17). Este vector pertenece a una familia de vectores pGL4, la cual se caracteriza por contener el gen de la luciferasa de luciérnaga, un sitio de clonación múltiple justo delante, que permite clonar las secuencias de los promotores a estudiar, un gen de resistencia a ampicilina y un marcador seleccionable de células eucariotas. En nuestro caso, contiene el gen de la puromicina como marcador seleccionable. El gen de luciferasa de este vector contiene además en el extremo carboxilo terminal las regiones hCL y hPEST (señal de degradación de las proteínas), las cuales ayudan a la degradación

rápida de la luciferasa (3h) para mejorar la dinámica de transcripción, ya que el exceso de producto puede ralentizar la transcripción de los mismos. Todo esto se refleja en una medida más precisa de la respuesta de los promotores analizados.

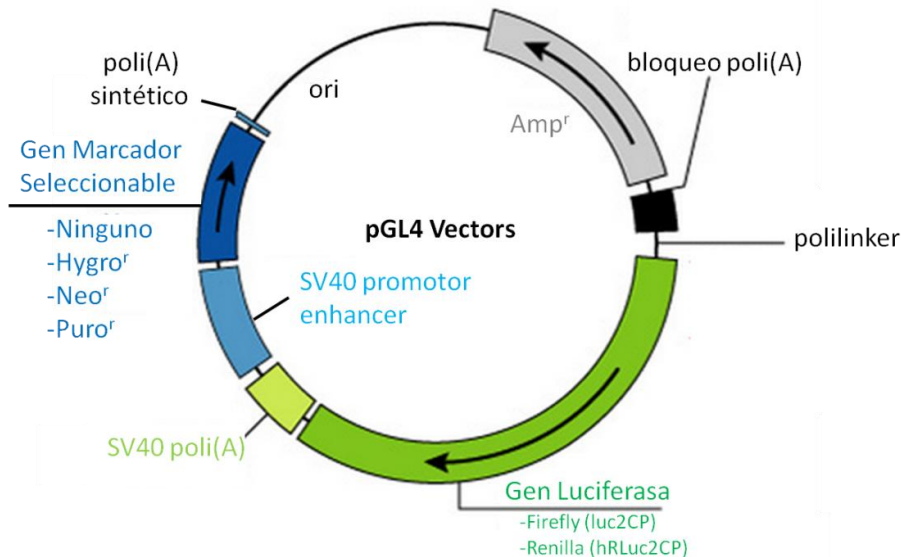


Figura 17. Familia de vectores “pGL.4 Luciferase reporter vectors” (Promega).

La clonación direccional fue la estrategia seguida en la construcción de los vectores utilizados. Para ello se llevó a cabo una doble digestión secuencial del vector pGL4.22, en primer lugar con BglIII (Takara) y a continuación con XhoI (Takara), con el fin de linealizar el vector y dejarlo preparado para la subclonación de los promotores.

2. 2. Clonación de los promotores completos

Para construir los vectores con los promotores completos de las tres Mx de dorada, se realizó una PCR a fin de obtener los tres fragmentos correspondientes. Para ello se diseñaron primers directos en el extremo 5' de cada secuencia: XhoIMx1F, XhoIMx2F y XhoIMx3F, y un primer reverso justo antes del ATG, AtgBglIIR, válido para la amplificación de los tres promotores (Tabla 5). Estos primers tienen dianas de restricción de las enzimas XhoI

(directos) y BglII (reverso). Para la amplificación se utilizó la enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega). Las condiciones de las PCR fueron: 95 °C, 2 min; seguido de 35 ciclos de 95 °C, 30 s; 65 °C, 63 °C, y 61 °C, 30 s, para pMx1, pMx2 y pMx3 respectivamente, y 72 °C, 1.5 min, seguidos de una etapa final de 72 °C, 5 min. Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 0.6 % y las bandas obtenidas fueron purificadas con el kit GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Posteriormente, cada fragmento obtenido fue doblemente digerido con XhoI (Takara), y BglII (Takara), y nuevamente purificado con el kit anterior. Los fragmentos digeridos fueron ligados al vector pGL4.22 [luc2CP/Puro] mediante reacción con la enzima T4 DNA Ligasa (6 U/μL) (Takara), a 16 °C durante 24 h.

Nombre	Secuencia 5'-3'
CMVXhoIF	TTACGCCT CGAG GCGAAAGG
CMVBglIIR	CGTTGGG AGATCT CCCATATGG
XhoIMx1F	CTGCAGCTCC CTCGAG TGG
BglIIMx1R	CCCATTACCGGAA AGATCT AAGACA
XhoIMx2F	TGAGACT CGAG TTTTGTTTTGTTCAG
BglIIMx2R	CTCAATGTTTCT AGATCT TTGAGTTTCC
XhoIMx3F	CTTTGGT CTCGAG ATTGATTG
BglIIMx3R	GTCTATCCAT CGATCT GTGGCG
XhoIISREF	TCGTCCCATTACT CGAG AGAGTAAAGAC
XhoIISRE2F	CGGCAACT CGAGA AAGAAAAAGGAAAG
ATGBglIIR	GTTTCATGCTGCT CGATCT TGTCTGC
RV3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC

Tabla 5. Primers usados en el proceso de clonación. En negrita se muestran los sitios diana de las enzimas de restricción que aparecen en el nombre de cada primer.

Los plásmidos obtenidos tras las reacciones de ligación se purificaron mediante precipitación con 25 μl de acetato amónico 8 M, 1 μl de glucógeno a 20 mg/ml (Promega), 64 μl agua bidestilada estéril y 200 μl de etanol 100 % a -20 °C. Se centrifugaron a 13.000 rpm 20 min, se retiró el sobrenadante, dejando el pellet en el eppendorf y se añadieron 200 μl de etanol 70 % a -20 °C. Se centrifugaron 10 min a 13.000 rpm y el pellet se disolvió en 10 μl de agua bidestilada estéril.

Una vez purificados los plásmidos se electroporaron en *E. coli* DH5 α , usando el electroporador 2510 (Eppendorf), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las bacterias electroporadas se sembraron en placas de LB con ampicilina (50 mg/ml) y se incubaron 24 h a 37 °C. De cada una de las transformaciones, se picaron varias de las colonias obtenidas, a fin de extraer los plásmidos correspondientes, usando para ello el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Los insertos de los plásmidos se secuenciaron utilizando el primer universal RV3. Finalmente, de los clones positivos se realizaron maxipreparaciones de plásmidos con el *Genopure Plasmid Maxi Kit* (Roche), y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso posterior. Estos plásmidos se denominaron pMx1, pMx2 y pMx3.

2. 3. Clonación de los promotores con distintos tipos de deleciones

Para el análisis de diferentes motivos de los promotores, se construyeron otros 5 vectores a partir de los obtenidos en el apartado anterior. Los tres primeros correspondieron a las regiones de los tres promotores que estaban corriente arriba (5') del motivo ISRE localizado en los tres promotores; el cuarto contuvo el fragmento común a los tres promotores que se encuentra entre el motivo ISRE y el ATG (extremo 3'); y el quinto vector incluyó la región 3' del promotor de la Mx2 hasta el motivo ISRE-like específico de este promotor.

La estrategia de clonación fue la misma que en el apartado anterior, es decir, diseño de primers específicos que incluían dianas de restricción para poder subclonar los fragmentos amplificados en el vector pGL4.22. Los primers para los vectores de las regiones 5' fueron: XhoIMx1F/BglIIMx1R, XhoIMx2F/BglIIMx2R, and XhoIMx3F/BglIIMx3R (Tabla 5). Las condiciones de las PCR: 95 °C, 2 min, 35 ciclos a 95 °C, 30s, 64 °C (pMx1), 60 °C (pMx2) y 61 °C (pMx3), 30 s, 72 °C, 1 min, y un paso final a 72 °C for 5 min. Los vectores se denominaron pMx1noISRE, pMx2noISRE y pMx3noISRE.

El vector con el extremo 3', común a los tres promotores, se denominó pISRE, y para su construcción se utilizaron los primers XhoISREF y AtgBglIIR, y como molde el vector pMx1Luc. Por último, el vector con la región 3' del promotor de

la Mx2 se construyó usando como molde el vector pMx2Luc, así como los primers XhoIISREMx2F y AtgBglIIR. En ambos casos las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95 °C, 2 min, 35 ciclos de 95 °C, 30s, 66 °C, 30 s, y 72 °C, 30 s, seguidos de una etapa final a 72 °C, 5 min. Los productos amplificados se purificaron, se digirieron con las enzimas XhoI y BglII, y se subclonaron en el vector pGL4.22 según se ha descrito anteriormente.

2. 4. Otros plásmidos

En los ensayos realizados se utilizaron además los siguientes plásmidos:

- pCVpF-GFP/PURO, que contiene el gen de la proteína de fusión GFP-puromicina bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Este vector se usó como control visual de la transfección celular.

- pCMVLuc, que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor CMV. Al tener expresión constitutiva de la luciferasa se usó como control positivo de la expresión de este gen. Para la construcción de este vector se diseñaron los primers CMVXhoIF y CMVXhoIR (Tabla 5), que contenían dianas XhoI y BglII y se realizó un PCR utilizando como molde el vector pCVpF-GFP/PURO para extraer el promotor CMV, que se subclonó en el vector pGL4.22 de la misma manera que se ha descrito en el caso de los otros vectores. Las condiciones del PCR fueron: 95 °C, 2 min; (95 °C, 30s; 66 °C, 30 s; 72 °C, 1 min) x 35 ciclos; 72 °C, 5 min.

- pGL4.22 [Luc2CP/Puro], el vector vacío que se utilizó como control negativo de la expresión de luciferasa.

-pRenilla (Promega), que se utilizó en todas las transfecciones para normalizar la eficiencia de la transfección entre muestras.

3. Evaluación de la actividad de los tres promotores en respuesta a poli I:C

3. 1. Transfección de células RTG-2 con cada uno de los vectores construidos

3. 1. 1. Línea celular RTG-2

Para los ensayos de actividad de los promotores se utilizó la línea celular RTG-2, procedente de gónadas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Wolf y cols., 1960). Esta línea ha sido previamente utilizada con éxito para determinar la actividad del promotor de la proteína Mx de trucha (Collet y cols., 2004, 2007).

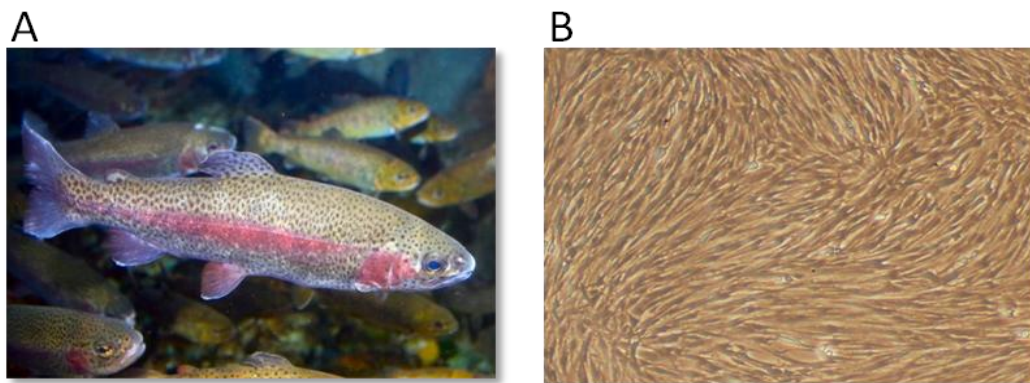


Figura 18. (A) Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). (B) Células RTG-2 (40x)

Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² (NuncTM). El medio de cultivo fue Leibowitz L-15 (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, BioWhittaker), 2 % de L-glutamina (Invitrogen) y 1% de antibióticos (penicilina, 100 U/ml; estreptomycin, 100 µg/ml; y anfotericina B, 250 ng/ml; Invitrogen). La incubación se hizo en atmósfera normal a 18 °C.

Para subcultivar se retiró el medio, se aplicó un lavado con PBS 1X y se añadieron 1 ml de Tripsina/EDTA estéril (Tryple Select 1X, Gibco) por frasco. Se siguió mediante observación al microscopio la evolución del proceso digestivo hasta que todas las células estaban separadas de la superficie. A

continuación se retiró la tripsina, y mediante pipeteo con medio de cultivo se resuspendieron cuidadosamente y se subcultivaron.

3. 1. 2. Transfección de las células RTG-2

Todas las transfecciones se realizaron con el electroporador Amaxa Cell Line Nucleofector (Lonza). En primer lugar se optimizó el protocolo para usar el equipo con esta línea celular, a fin de determinar el programa más idóneo que combinara una alta eficiencia de transfección con una alta supervivencia de las células. Para ello se siguieron las instrucciones del fabricante y se probaron las soluciones L y V con distintos programas según se muestra en la tabla 6. En las transfecciones de prueba se usó un plásmido propuesto por el fabricante, que contiene GFP. En el proceso se realizaron varias réplicas de cada programa/solución.

Programa	Solución	
	L	V
1	A-020	A-020
2	T-020	T-020
3	T-030	T-030
4	X-001	X-001
5	X-005	X-005
6	L-029	L-029
7	D-023	D-023

Tabla 6. Programas y soluciones utilizados para la optimización de la transfección.

La combinación con la que se obtuvo el mejor rendimiento fue el programa D-0.23 con la solución V, con los que se obtuvo un 50-60 % de supervivencia media, con un 50 % de células transfectadas.

Para todas las transfecciones realizadas, las células RTG-2 se cultivaron de forma regular, y una vez que los cultivos alcanzaron una confluencia del 90%, las células se separaron y se contaron en una cámara de Neubauer. Para cada transfección se utilizaron 2×10^6 células, aproximadamente. Las células se centrifugaron a 2.500 rpm a temperatura ambiente (22 °C en el área cultivos celulares de la Universidad de Málaga), y se añadieron 100 μ l de solución de

nucleofección por transfección (suplemento S + solución V o solución L), no superando nunca los 15 min de permanencia de las células en dicha solución, debido a su toxicidad. A continuación, se añadieron 2 μg de DNA por transfección y se puso todo en una cubeta de electroporación. Una vez electroporadas, las células se sembraron en placas de 96 pocillos con el medio de cultivo habitual y se incubaron a 18 °C.

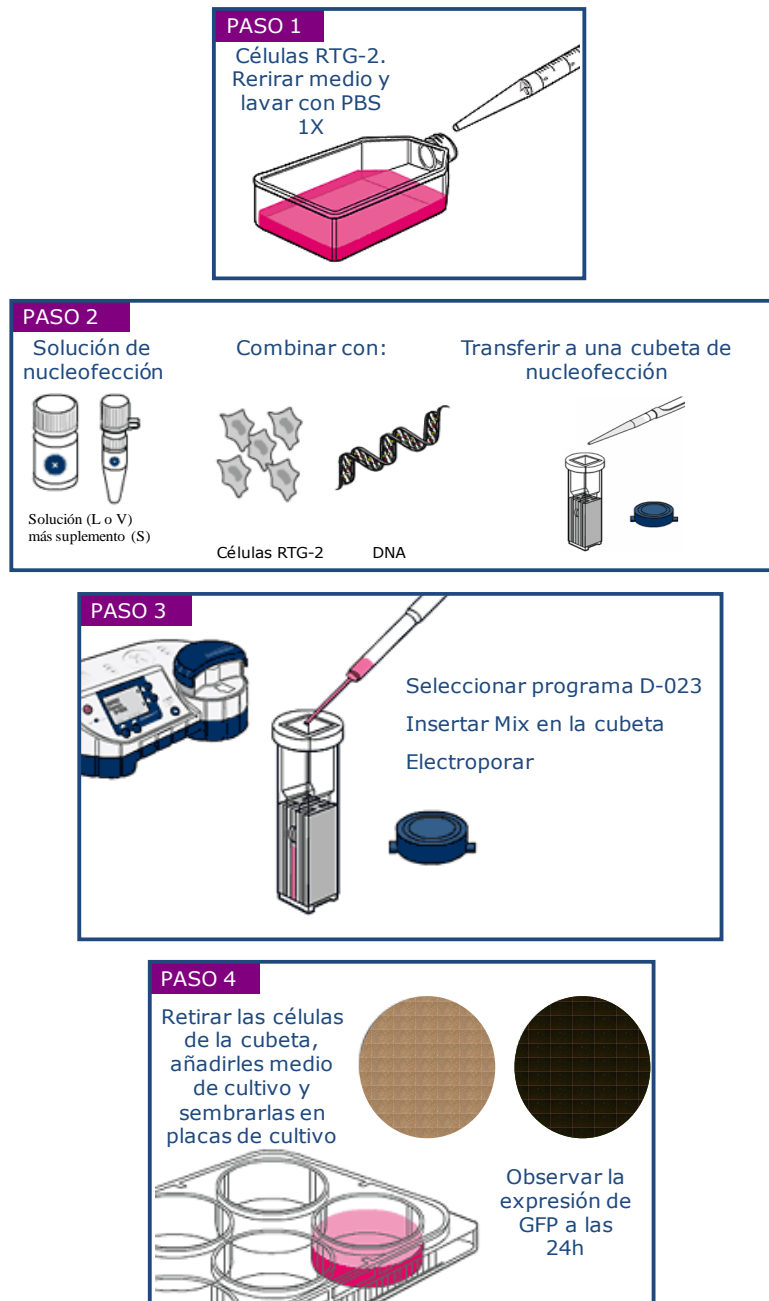


Figura 19. Etapas del proceso de nucleofección.

A las 24 h de transfección, las células se examinaron en un microscopio invertido con fluorescencia (Nikon DIAPHOT-TMD) para detectar la expresión de GFP. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon D50 adaptada al microscopio.

En todos los experimentos realizados, las células se transfectaron con los vectores a analizar (1.840 ng), más el vector *renilla*-luciferasa (80 ng) para normalizar la eficiencia de transfección de las distintas muestras, y con el vector pCvGFPpf (80 ng) como control visual del proceso de transfección

3. 2. Estimulación con poli I:C

El poli I:C o ácido policitidílico es un cadena doble de RNA con una hebra de un polímero de ácido inosínico y otra de un polímero de ácido citidílico. Es estructuralmente similar al ARN de doble cadena, que está presente en algunos virus, por lo que estimula la respuesta de IFN tipo I en las células, lo que lo convierte en una herramienta común en el estudio de este tipo de respuesta (Biron y Sen, 2001).

3. 2. 1. Respuesta de los promotores completos a distintas dosis de poli I:C

Con el fin de analizar la actividad de cada promotor en respuesta a IFN I, las células se transfectaron con las construcciones pMx1, pMx2 y pMx3, y 24 h después se estimularon con distintas dosis de poli I:C (1, 5, 10, 50 y 100 µg/ml de medio). A las 24 h del tratamiento se midió la actividad luciferasa (ver apartado 3. 2. 2.). El diseño de las placas se presenta en la figura 20.

Las células transfectadas con el vector pGL4.22 (sin promotor) se sembraron en la fila 1 de las placas (control negativo), mientras que las células transfectadas con el vector pCMVluc (control positivo), se sembraron en la fila 2 de las placas.

Los distintos tratamientos se aplicaron a parejas de columnas de las placas (figura 20). De esta forma se obtuvieron cuatro réplicas para cada vector y tratamiento en cada transfección. Se realizaron 3 transfecciones independientes, por lo que se obtuvieron un total de 12 datos por tratamiento y vector.

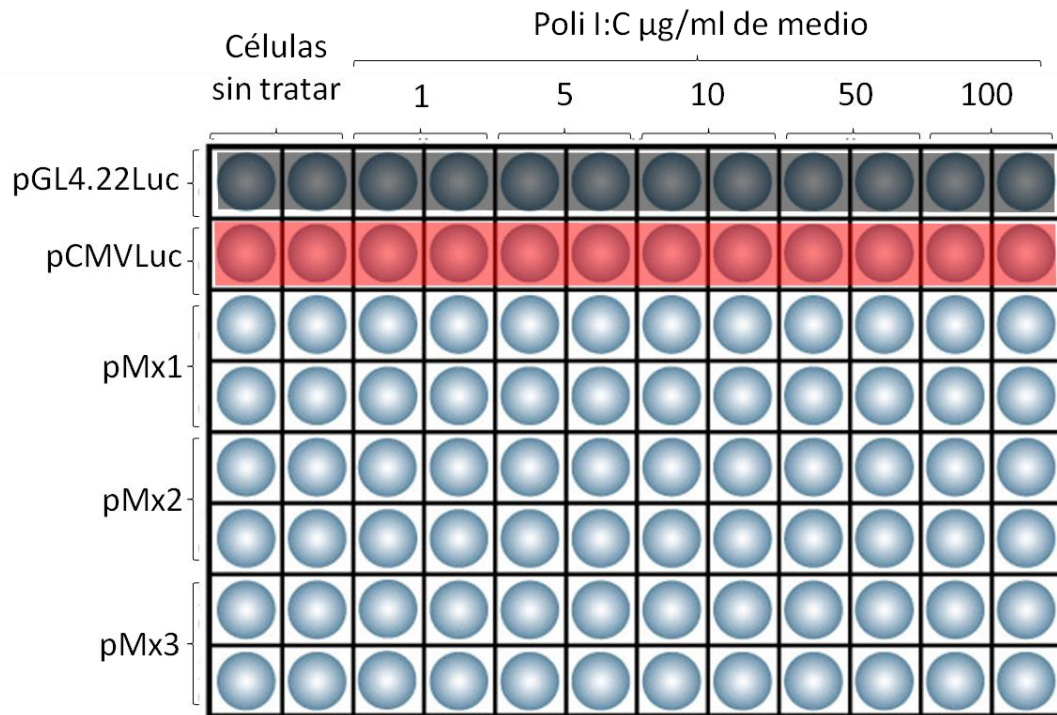


Figura 20. Diseño de las placas utilizadas para evaluar la respuesta de los promotores completos a distintas dosis de poli I:C.

Con el fin de analizar la cinética de activación de cada promotor se realizó otro experimento de estimulación con 10 µg/ml de poli I:C y se midió la actividad luciferasa a distintos tiempos (6, 12, 24, 48 y 72 h). El diseño de la placa se muestra en la figura 21. Se hicieron dos transfecciones independientes, con un total de 8 puntos para cada tratamiento.

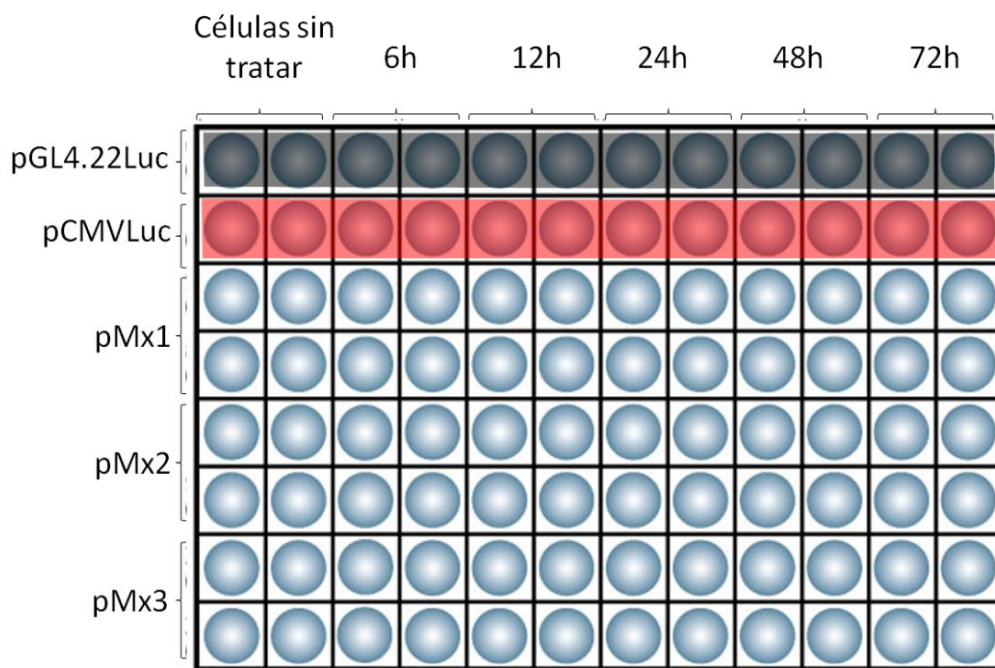


Figura 21. Diseño de las placas utilizadas para determinar la cinética de activación de los promotores en respuesta a poli I:C.

3. 2. 2. Ensayo de luciferasa

La actividad luciferasa se midió en un Luminómetro Glomax (Promega) y utilizando el kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) según las instrucciones del fabricante. Este kit permite detectar la actividad de la luciferasa *firefly* y de la luciferasa *renilla* de manera secuencial (figura 22). El primer paso consistió en lisar las células. Para ello se les retiró el medio, y tras un lavado con PBS 1X, se les añadieron 20 μ l de Passive Lysis Buffer (Promega) a cada pocillo y se dejaron las placas en agitación 15 min a temperatura ambiente. Finalizada la lisis, se tomaron 20 μ l de cada pocillo y se pusieron en una placa blanca y opaca de 96 pocillos, apta para la lectura con el luminómetro, la cual contenía 100 μ l del reactivo Luciferase Assay Reagent II (LAR II) previamente preparado y alicuotado. Tras homogeneizar las muestras y el reactivo, se midió rápidamente la actividad luciferasa.

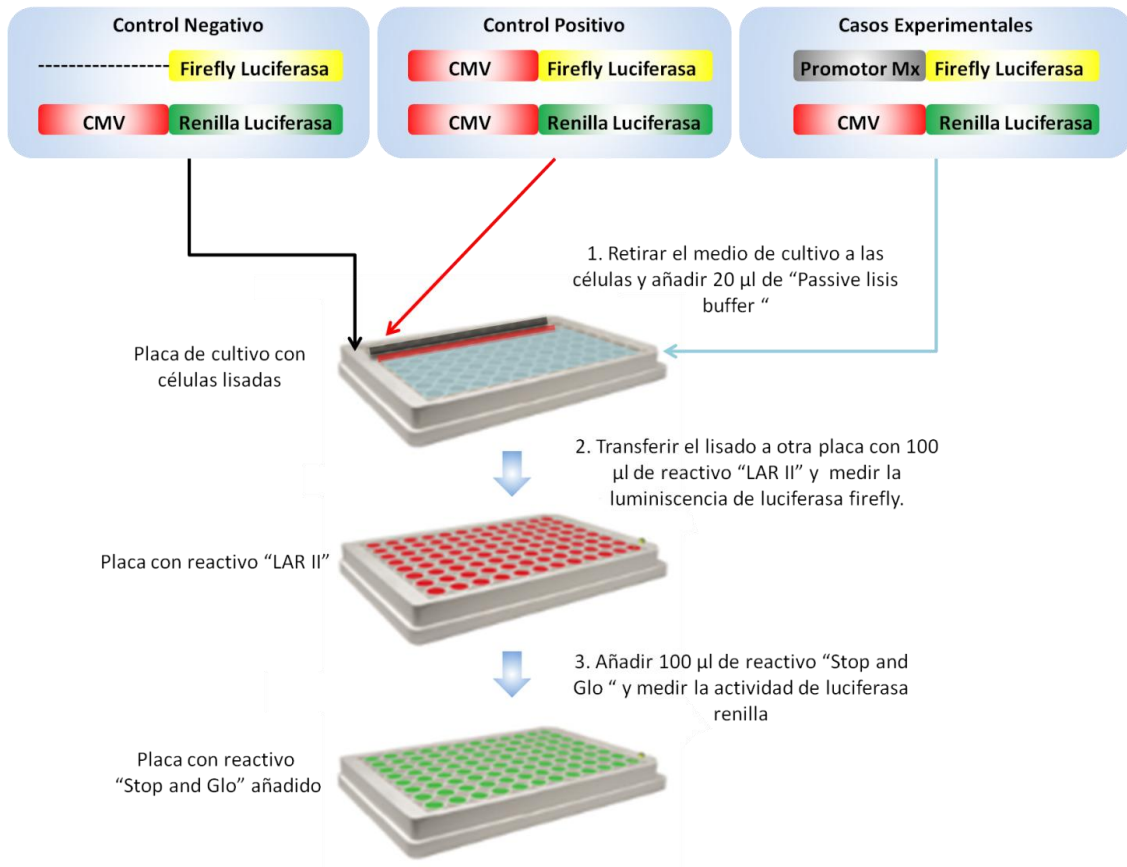


Figura 22. Esquema del ensayo de luciferasa usando el kit Dual-Glo® Luciferase Assay System.

Una vez registrada la actividad luciferasa, se añadieron a cada pocillo 100 µl del reactivo *Stop and Glo Reagent*, el cual detiene la reacción de la luciferasa *firefly* y proporciona el sustrato para la luciferasa *renilla*, midiendo la actividad de la luciferasa *renilla* en el luminómetro. El luminómetro se programó para 10 s de medida y 2 s de pausa entre mediciones consecutivas.

Realizadas las dos medidas, la actividad luciferasa o RLA (Relative Luciferase Activity) de *firefly* de cada pocillo se normalizó con los valores obtenidos con *renilla*. De este modo se obtuvieron los valores RLU (Relative Luciferase Units) de cada pocillo. A continuación, los valores RLU obtenidos fueron relativizados con los valores obtenidos en los controles positivo y negativo, obteniendo los valores RRR (Relative Response Ratio) según la fórmula de la figura 23.

$$RLU = \frac{RLA \text{ Luciferasa}}{RLA \text{ Renilla}} ; RRR = \frac{(RLU \text{ Experimental}) - (RLU \text{ C-})}{(RLU \text{ C+}) - (RLU \text{ C-})}$$

$$(RLU \text{ C-}) = \text{pGL4.22 [Luc2CP/Puro]}$$

$$(RLU \text{ C+}) = \text{pCMVLuc}$$

Figura 23. Fórmulas usadas para obtener los valores RLU y RRR.

Los valores de inducibilidad representan la respuesta relativa a cada tratamiento respecto a células sin tratar. Se calcularon como la razón entre los valores de RRR de cada muestra y los de células sin tratar (transfectadas con el mismo plásmido pero no estimuladas con poli I:C). La ausencia de respuesta o umbral de inducción es 1, es decir, la actividad luciferasa no es diferente de la obtenida en células sin tratar. Los datos se presentan como la media \pm el error estándar (SE). Las diferencias entre las muestras (células tratadas y no tratadas) así como las diferencias en la inducibilidad de los tres promotores se analizaron mediante el test de Student de dos colas, considerándose significativos los valores de $p < 0.05$.

3. 2. 3. Promotores con deleciones

Para el análisis de los promotores con deleciones, las células RTG-2 se transfectaron con las construcciones: pMx1noISRE, pMx2noISRE, pMx3noISRE, pISRE y pISRE2.

En cada experimento se utilizaron los controles positivo y negativo correspondientes, de forma similar al diseño de placas para los vectores con los promotores completos (apartado 3. 2. 1.). A las 24 h de la transfección, las células se estimularon con 10 $\mu\text{g/ml}$ de poli I:C y 24 h más tarde, se midió la actividad luciferasa según el apartado 3. 2. 2. Para cada vector, se realizaron tres transfecciones independientes para cada vector. Los datos se analizaron como se describe en el apartado 3. 2. 2.

4. Evaluación la actividad de los tres promotores en respuesta a la infección por los virus IPNV y VHSV

4. 1. *Virus IPNV y VHSV*

La elección de los virus se basó en su capacidad de multiplicación en células RTG-2 y en su infectividad en dorada, que se comporta como especie portadora asintomática de ambos virus (Cagri y cols., 2001, Pérez-Prieto, y cols., 2001; Esteban, y cols., 2008). Fueron el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) genotipo Sp, aislado de lenguado senegalés (Rodríguez y cols., 1997), y el Virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) genotipo la (cedido por el Dr C.P. Dopazo, de la Universidad de Santiago de Compostela).

Ambos se propagaron en células BF-2 (Wolf y Quimby, 1962) cultivadas a 20 °C en medio L-15 (Gibco) suplementado con un 2% de suero fetal bovino (FBS, BioWhittaker), 4 mM de L-glutamina (Gibco), 1 % de antibióticos (penicilina, 100 U/ml; estreptomina, 100 µg/ml; y anfotericina B, 250 ng/ml; Invitrogen). Los títulos víricos se calcularon por el método de la dosis infectiva 50 % (TCID₅₀) (Cunningham, 1973), la cual representa la dosis, o dilución de la muestra, que produce efectos citopáticos en el 50 % de las réplicas de los cultivos celulares. Una vez titulados los virus, se les retiró el medio y se congelaron directamente a -80 °C.

4. 2. *Infecciones*

Las células RTG-2 se transfectaron con los plásmidos pMx1, pMx2 y pMx3 según se ha descrito en el apartado 3. 1. 2., se sembraron en placas de 96 pocillos y a las 24 h se infectaron con los virus IPNV y VHSV, a dos dosis distintas: 0.01 y 0.1 MOI (multiplicity of infection). Las infecciones se realizaron en el medio de cultivo habitual pero sin suero, y tras una hora de adsorción de los virus, se retiró el medio y se añadió medio de mantenimiento (Medio habitual con suero al 2 %).

La actividad luciferasa *firefly* y *renilla* se midió a las 24, 48 y 72 h de las infecciones. Como control positivo de inducción se midió la actividad de luciferasa de células inducidas con poli I:C durante 24 h a la concentración de mayor respuesta obtenida en el apartado 3. 2. 1. El diseño experimental se muestra en la figura 24, donde se puede observar que el tratamiento a 72 h se realizó en una placa aparte. Se realizaron 2 transfecciones independientes de cada virus, lo que supone un total de 8 valores para cada tratamiento y virus. Los datos se analizaron como se describe en el apartado 3. 2. 2.

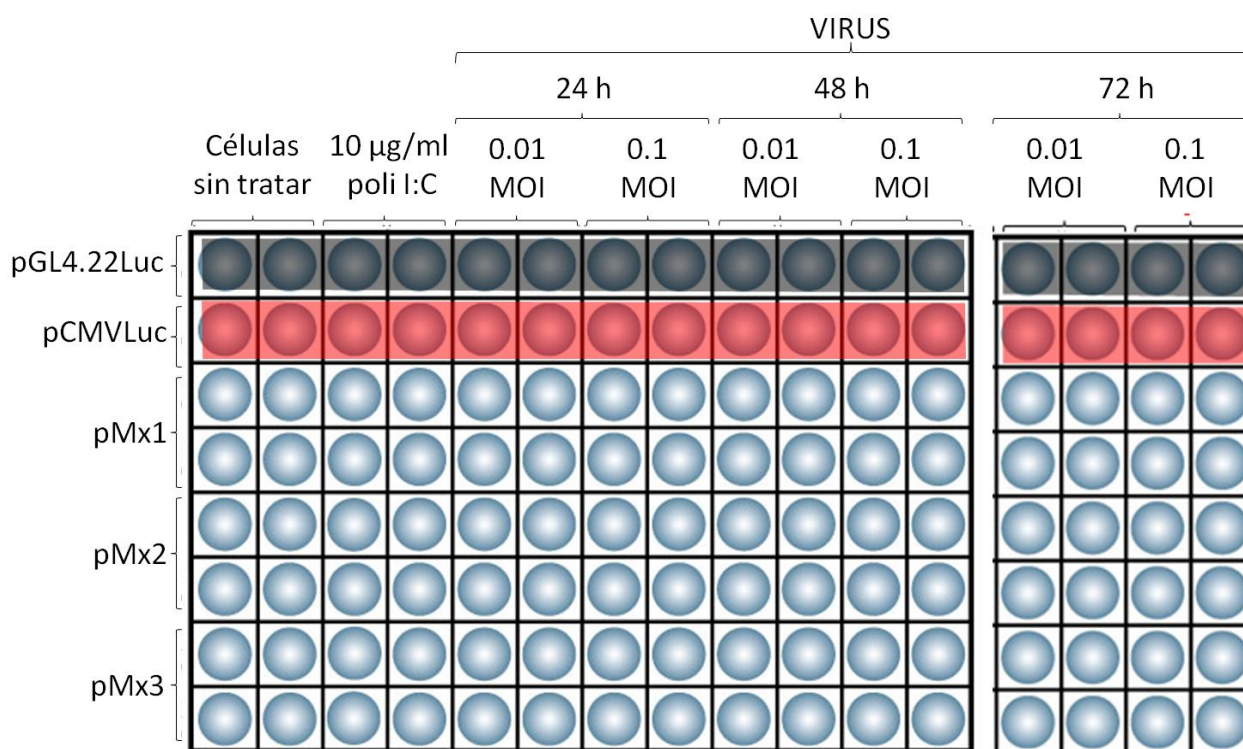


Figura 24. Diseño de las placas donde se ensayó la estimulación por los virus IPNV y VHSV.

5. Evaluación del posible efecto antagonista de IPNV y VHSV sobre los promotores de los tres genes Mx de dorada

5.1. Obtención de células RTG-2 transfectadas estables

Para analizar la capacidad de IPNV y VHSV de ejercer un efecto antagonista sobre los promotores de Mx de dorada, células transfectadas con los plásmidos pMx1, pMx2 y pMx3, fueron seleccionadas con puromicina (10 mg/ml; Gibco, Invitrogen) durante varias semanas, hasta obtener poblaciones estables. Para ello, a las 72 h de la transfección, las células se cultivaron con el medio habitual al que se le añadió puromicina (2 µg/ml de medio). Tras varias semanas de selección (entre 4 y 7) y una vez que se observó que la presencia del antibiótico no provocaba mortalidad en los cultivos, las células se cultivaron en el medio habitual. Sólo se cultivaron en presencia de puromicina de forma esporádica, para comprobar que las células expresaban el gen de resistencia. De la misma forma, se obtuvieron poblaciones estables de células transfectadas con los plásmidos pCMVluc y pGL4.22, que sirvieron como controles positivo y negativo respectivamente.

Para comprobar que el plásmido se había integrado en el genoma de las células se realizó un PCR con unos primers que amplificaban un fragmento del gen de la luciferasa y del gen de resistencia a puromicina (tabla 7). El DNA genómico procedente de células seleccionadas con cada una de las construcciones se extrajo con el kit High Pure PCR Template Preparation (Roche), usando para ello un frasco de 25 cm² por extracción, es decir, aproximadamente 2·10⁶ células.

Nombre	Secuencia 5'-3'
LucF	AGCGCTATGGGCTGAATACAAAC 69
LucR	TTAAGCTACTGAACCAAGTTCTTGCAAGC 68
PurF	CATCGAGCGTGTGACAGAGTTG 68
PurR	AATGGAAGGTTTCTTGGTGCGC 70

Tabla 7. Primers de comprobación de integración.

5. 2. Ensayo de protección

Las células RTG-2 transfectadas estables se sembraron en placas de 96 pocillos, y se les aplicaron los distintos tratamientos:

1. Controles:

- *Células sin tratamiento (columna A).*
- *Estimulación con poli I:C durante 24 h (columna B).*
- *Estimulación con poli I:C durante 48 h (columna C).*
- *Estimulación con poli I:C durante 72 h (columna D).*
- *Infección con virus durante 48 h (columna E).*

2. Tratamientos experimentales:

- *Poli I:C + Virus:* se añadió poli I:C a las células y a las 24 h el virus, el cual se mantuvo en proceso infectivo durante 48 h (*columna F*).
- *Virus + poli I:C:* se añadió primero el virus y a las 48 h de la infección, se añadió poli I:C (*columna G*).
- *Virus y poli I:C a la vez:* tanto el virus como poli I:C se añadieron al mismo tiempo (*columna H*).

La dosis usada de cada virus estuvo en función de los resultados obtenidos en el apartado 4. 2., y fue para IPNV de 0.01 MOI y para VHSV de 0.1 MOI. Tras los tratamientos, se midió la actividad luciferasa. Al no ser necesario normalizar la eficiencia de transfección, en este caso no se midió la actividad renilla. Por tanto, tras obtener los valores RLA de luciferasa estos fueron relativizados frente al control positivo y negativo usando una fórmula similar a la anteriormente aplicada (figura 25) a fin de obtener valores RRR. Finalmente, los valores de inducibilidad se obtuvieron comparando dichos datos frente a células sin tratar.

$$RRR = \frac{(RLA \text{ Experimental}) - (RLA C-)}{(RLA C+) - (RLA C-)}$$

(RLA C-) = pGL4.22 [luc2CP/Puro]
 (RLA C+) = pCMVLuc

Figura 25. Fórmula usada para obtener los valores RRR con células estables

Se realizaron 2 experimentos independientes de cada virus, lo que supone un total de 8 valores para cada tratamiento y virus. Las diferencias entre los datos se analizaron como se describe en el apartado 3. 2. 2.

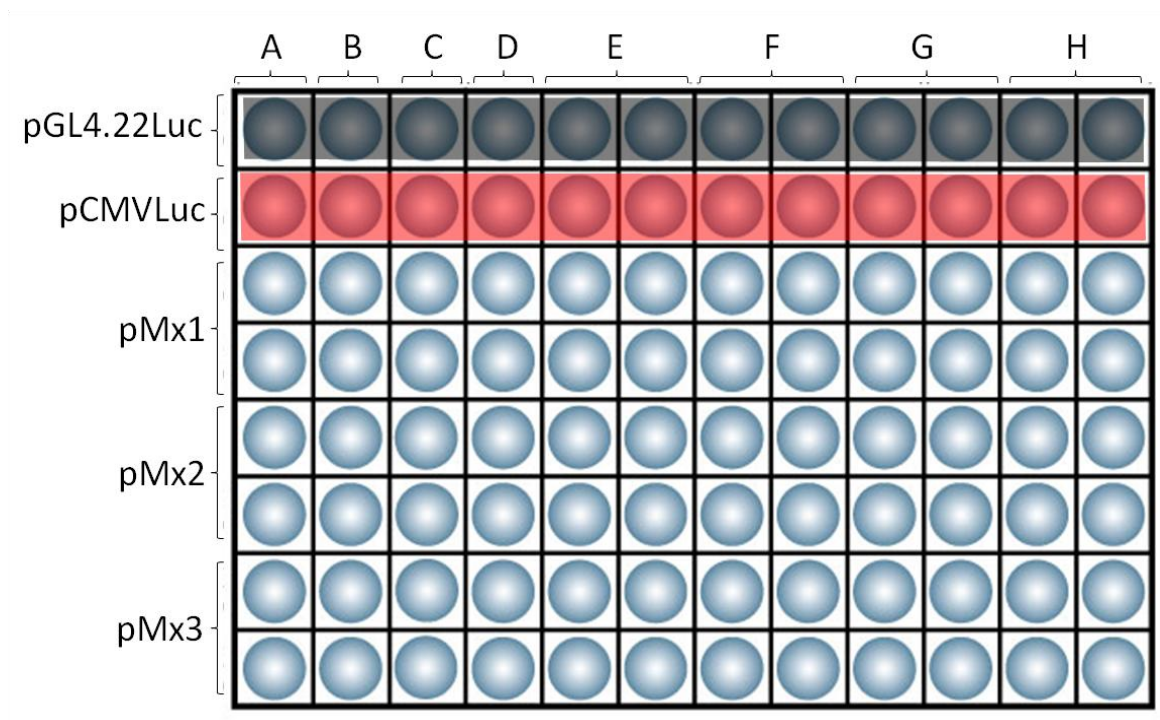
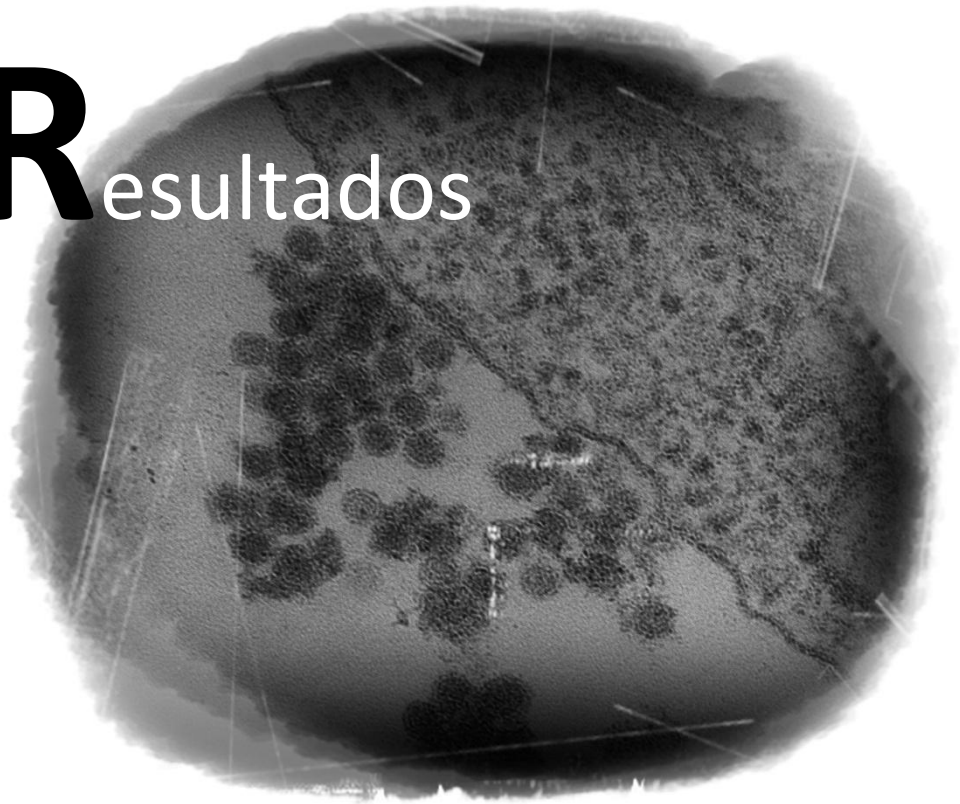


Figura 26. Diseño experimental del ensayo de protección.

R

Resultados



RESULTADOS

1. Clonación de los promotores de la Mx1, Mx2 y Mx3 y caracterización de su estructura

1. 1. *Walking sobre el DNA genómico de dorada*

Para la clonación de los promotores de los genes Mx de dorada, el primer Nested-PCR se realizó con primers reversos diseñados sobre el intrón 1 de cada gen Mx. El análisis de los fragmentos de PCR confirmó la obtención de secuencias adyacentes al extremo 5' del cDNA de cada uno de los tres genes Mx. Estos fragmentos tenían una longitud de 541 pb para Mx1, 839 pb para Mx2 y 1226 pb para Mx3 (figura 27).

A continuación, y mediante nuevos primers reversos diseñados para las regiones próximas al extremo 5' de las secuencias obtenidas (primers PLMx1, PLMx2 y PLMx3), se realizó un nuevo PCR. Para Mx2 se obtuvo un fragmento de 349 pb, con lo que junto al existente, disponíamos en total de un fragmento de 1188 pb a partir del codón de inicio. Para Mx1 y Mx3, en cambio, no se obtuvo ningún fragmento adicional. En el caso de Mx3, optamos por no realizar ningún otro PCR, dado el tamaño aceptable del fragmento inicial obtenido (1226 pb). Sin embargo, y a fin de aumentar el tamaño del fragmento del promotor Mx1, se repitió el segundo PCR, si bien utilizando DNAg digerido con endonucleasas distintas. De esta reacción se obtuvo un fragmento de 402 pb, que añadido al fragmento generado en el primer PCR, nos permitía disponer de un fragmento de 943 pb.

Las secuencias de los fragmentos se analizaron con la aplicación Seqman II, para comprobar el correcto solapamiento entre ellas. Para confirmar estas secuencias se realizó un PCR que comprendía desde el extremo 5' hasta el intrón 1 de cada promotor. Los fragmentos obtenidos se secuenciaron, confirmando así la obtención de las regiones promotoras de los tres genes. Estas secuencias se depositaron en la base de datos Genbank, con números

Genome Walking

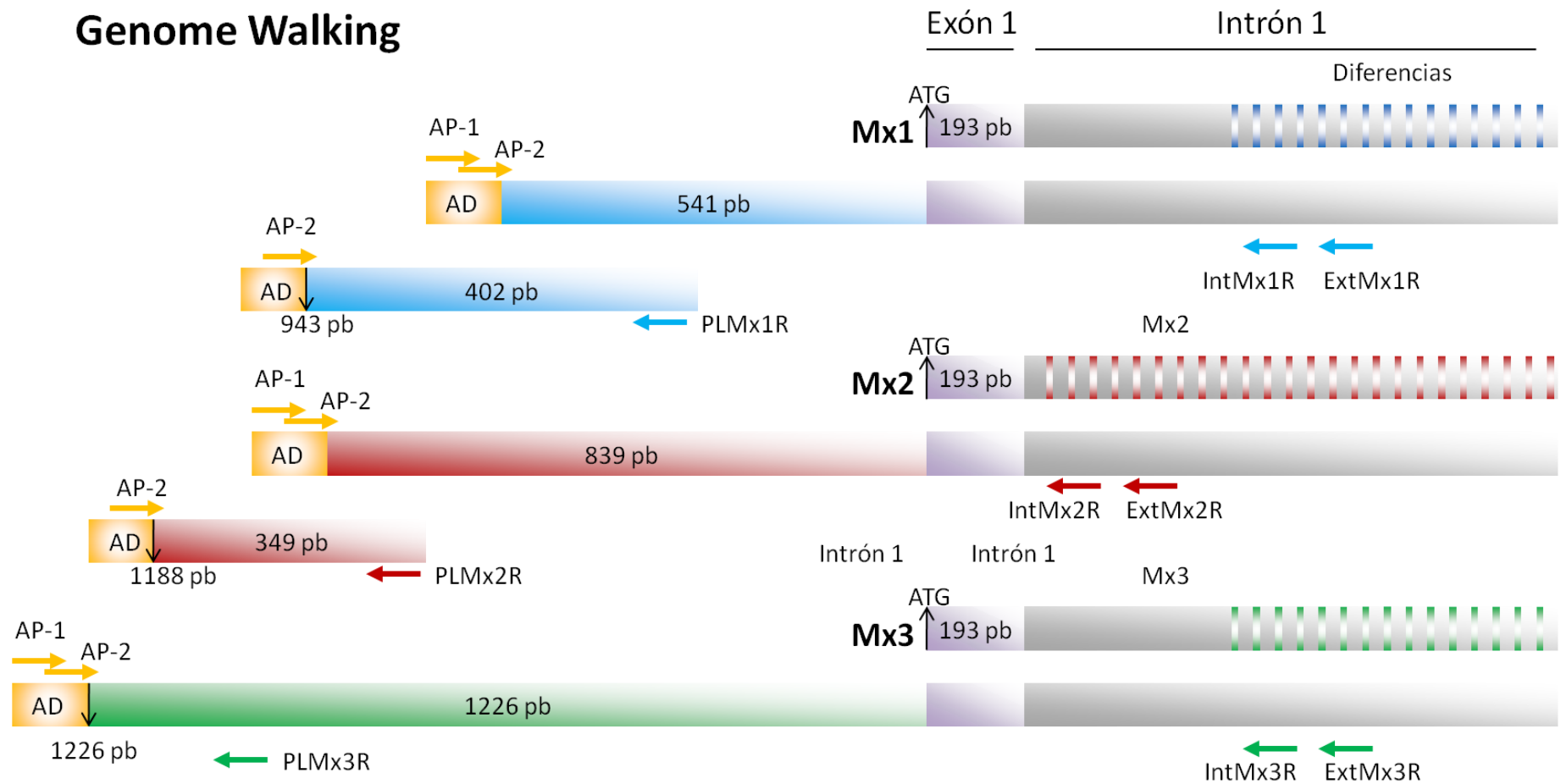


Figura 27. Esquema del *genome walking* destinado a clonar los promotores de Mx1, Mx2 y Mx3. Para el primer Nested-PCR los primers reversos se diseñaron en el intrón 1. El segundo PCR se realizó con AP-2 y los primers reversos se diseñaron sobre la secuencia obtenida para cada promotor (PLMx1R, PLMx2R y PLMx3R).

de acceso JQ392566, JQ392567 y JQ392568 para las regiones promotoras de Mx1, Mx2 y Mx3, respectivamente, y que a partir de ahora denominaremos pMx1, pMx2 y pMx3.

1. 2. Caracterización estructural de los promotores

1. 2. 1. Análisis filogenético

Las secuencias de los promotores se alinearon mediante la aplicación Clustal W (EMBL-EBI), la cual nos permitió obtener una matriz de identidad. Los porcentajes de identidad entre las secuencias fueron del 51.71 % para pMx1:pMx2, 46.95 % para pMx2:pMx3 y 63.55 % entre pMx1:pMx3. Además, las secuencias se analizaron con la aplicación *Phylogeny* (PhyML, MrBayes, TNT, BioNJ) que permitió determinar la “distancia genética” entre las tres secuencias, y la construcción de un filograma (figura 28). Se trata de un árbol no enraizado donde el valor de la longitud de las ramas representa la divergencia evolutiva entre las secuencias. En él se observa como pMx2, se distancia de pMx1 y pMx3.

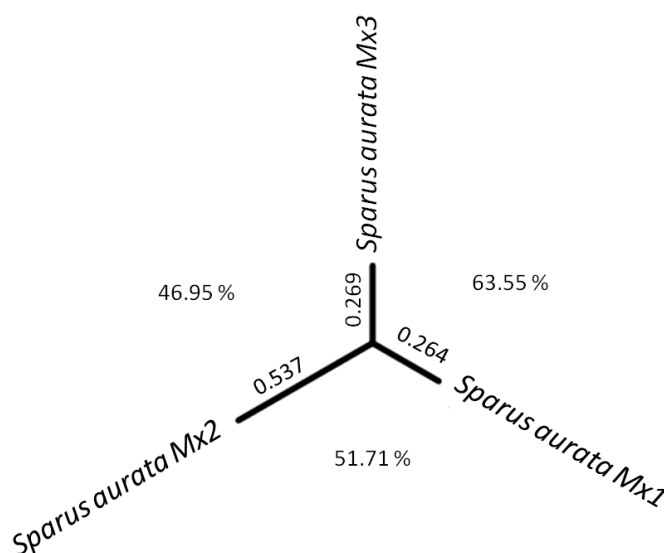


Figura 28. Árbol filogenético no enraizado de las secuencias de los tres promotores. El valor numérico sobre las ramas indica la distancia genética entre las secuencias. Entre las ramas figura el tanto por ciento de identidad entre las correspondientes secuencias.

Además, en los tres promotores se identificó una región muy conservada de 157 pb en el extremo 3', desde el codón de inicio hasta el sitio -101. El porcentaje de identidad de esta región es del 98% entre pMx1:pMx2, y del 96 % entre pMx1:pMx3 y pMx2:pMx3.

1. 2. 2. *Motivos reguladores*

La búsqueda de regiones reguladoras en los tres promotores se realizó tomando como referencia, por un lado, los motivos característicos de genes estimulados por interferón (ISGs), es decir, ISREs y GAS (revisado en Platánias, 2005; revisado en Takaoka y Yanai, 2006), así como aquellos encontrados en promotores Mx de peces (Collet y Secombes, 2001; Yap y cols., 2003; Altmann y cols., 2004; Chen y cols., 2006; Ooi y cols., 2005; Plant y Thune, 2008) y otros vertebrados (Schumacher y cols., 1994; Ronni y cols., 1988; Asano y cols., 2003; Gérardin y cols., 2004; Assiri y Ott, 2007; Yamada y cols., 2009). El conjunto de motivos identificados en cada promotor, así como su localización, se representan en la figura 29.

El primer tipo de motivo identificado fue GAAA/TTTC, del que se encontraron 13 copias en pMx1, 15 en pMx2 y 12 en pMx3. Este motivo se denomina también "ISRE core sequence", ya que dos GAAA/TTTC consecutivos forman un motivo ISRE, según la secuencia canónica en peces (A/G/T)GAAA(N)₁₋₂GAAA(C/G)(A/C/T) (Collet y Secombes, 2001). En el extremo 3' de los tres promotores se localizó un único ISRE, en las posiciones -73 a -87 (figura 29).

Además, en pMx2 se encontraron dos secuencias de las denominadas ISRE-like, es decir elementos ISRE que contienen alguna variación respecto a la secuencia canónica (Rang, 2000; Gérardin, 2003; Jia, 2009). Concretamente, el ISRE-like1, el más próximo al ATG, contiene un nucleótido de más entre los motivos GAAA y mientras que el ISRE-like2, el más distante del ATG, contiene una mutación en la tercera adenina del primer motivo GAAA (figura 29). Las posiciones de estos dos elementos ISRE-like son -102 a -89 y -133 a -121 respectivamente.

A. Promotor Mx1

```

-901 TCACGCGTCG ACTAGTACTA GCTTGATCAA AATGACATTT GGTACA

-841 ATCCTGTTCT CTCAGCACTG TACTGCAGCT CCCTCGTGTG GGTGTACACA GGAAGTTGCT
                               XhoIMx1F

-781 GTTTAAACTA CACAAAGGAT AACCAAGGCGC ATAAACACAA TCTTTCTTCT GCCGCGCATC

-721 AACAGGCAGT TATGATCTTC CACCCTCAGC CATGAAGGCG CTGCATCAGT GATTTAAGTA

-661 CAAAGTTGAT TCAGTTCTGA CCTCCAGACC AGTGATCCAT CAATGATGGA TATGTAGATG

-601 TTTTTTCTGA CACATGCGTA TCAATACTTC CATCTCAACA ACATCTATTA ATATGTTATC

-541 AATGCAGGCC TGATGTGTCT CTTCACAGTG CCTTTCATC ATGCAATCCT TGTCAGCCTG

-481 GAAACCTTAG TTAACTATTC CAGATAAAGT AAACAGTTTA AAAGTTAAAT GTGACAGAGG

-421 GCTAAAGAGA AACGCTAGTT TAGGGGATAA ATTGAACAAG ATACACAAAG TTTGCTTAGG

-361 ACAAAAAAAAA CAAAAAAAAAC AAAATCGTTT AAAAGCGGTT CTTCATTTCT TTCAGTCAGG

-301 ATCTCCACAA GTTCATTAC CATCCTCTGC AGGGCTCTCC TGACGGTCCT CATCGTCTGA

-241 TTTCTCGTCG TCTAGGAAAG ACAACAGTTT TTAGAAAGAT ATCTGCTCCT CCACATTTTC

-181 GAAACGCCAA AGATGAGATG GATTTACATC ACGATAACTC AAAGTCTGC ACCTCCGCT

          GAS      BglIIMx1R      ISRE
-121 GGTGTTTCGTC CCATTACCGG AAAGAGTAAA GACAA GGAAA CGAAACC TAA ACTCAGTGCA
          XhoIISREF * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
-61  GTATCCGCGG TGCTACCGG GCTGCTGCCA CTCCAGCAGC TGCTGCTGAG GACTCCGGAC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
+1  GCTGAACTCA CCTCAAGTCC ACACAACTCA TCTGACAGCA GACAAGAAGT GAGCAGC ATG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          INICIO
          AtgBglIIR
    
```

Figura 29. Secuencias de los promotores de los genes Mx1 (A), Mx2 (B) y Mx3 (C) con sus motivos reguladores resaltados. Los motivos GAA/TTTC están subrayados. Las flechas indican la localización de los primers usados en la clonación. Los asteriscos en la región 3' indican identidad de secuencia entre los tres promotores.

B. Promotor Mx2

```

-1141 GGCACAGTGT GTTGACACAG GGAGAGGGGT GTCTGTGTCT CACTCTCTGT G
-1081 ACCCACATCA CGTGTTTTCA CACAGTGTC CACAGGGGTT ATTCCACAC ACAAGTTTTC
-1021 AACACAATAG TTTTGAGACA AGAGTTTGT TTTTTGTCAG CTACCACATC ACATCTGACA
      XhoIMx2F
      IL-6
-961 AACAGTTGCA GACCTGGGAT TTGTGTTGCA CTCAGAACT ATGGGGCCAG TTTCTACAA
      GAS
-901 ATGGTGCTTT AAAGTAAGCA TGTGTTAGTT AAATGAATTT GGTGTATTTT GTTATGGGGC
      GAS
-841 AGCTTCTTTA TGCTGTTTAT GTAATTACTG ATTACTCTGA CAAAGTACTG TATTGTATTT
-781 TTATTCTTAT TGAGCCCAAG ATATGTGTGA TTACTCAGAG TTAAGGCTGA ATACATTAAA
      GAS
-721 AGTGATTGA ATTTAATTT GAGAATTTC CAATAGGGTT ACATGTAATA CGTGTGTGTG
      GAS
-661 TGTGTGTGCG TGTGTGTGCG CGCGCGTGGG GGGTGATTTC AGTAAACTGG TAAACAAACA
-601 AGGAAGGGGG ACTTCTAGCC TAGATAAATA GATATGACAG CAGGTGCTCC CATTTAAGAT
-541 GAGCTCCGGA TATTGTCACC TAGCAAAAAA CTCTAATTAA TCCCTCTGAG GTCAACAGAA
-481 GTGCCACAAT ACACCGACAA CAGGTGGGAC GGTAGAAGAA GGCACACAAA CATCCGGAAC
-421 AAAATAAAGG TAGAGTACAG CGCCATGATA AATAAATAGT ACATCAATAT GACTGTACTA
      TATA
-361 ACATAATTAT GTTACTTAGT TATAATGGTAT GACGTGCACG TTTGAGCTTC ACTCTGCACT
-301 GTTACAATGA GCTGATCACA TTCATGATGA GCGAAGGTTT ATTTACGACT TTAACATTTG
-241 GACGTTTAGT ATGAGTCCAA TGTGAACTT AATGTGCGTT AATGTGATAA GGAACTCAA
      ISRE-LIKE
-181 AGATTGAGAA ACATTGAGAA ACTAAAGTGA ATTTTATTTC AGCACACAGG AATGGAACT
      BglIIMx2R
      ISRE-LIKE ISRE
-121 AAAGGCGGCA ACTGGCAAAG AAAAAGGAAA CAAAAGAAA CGAAACCTAA CCTCAGTGCA
      XhoIISRE2F * * * * *
-61 GTATCCGCGG TGTCTACCCG GCTGCTGCCA CACCAGCATC TGCTGCTGAG GACTCCGGAC
      *****
+1 GCTGAACTCA CCTCAAGTCC ACACAACTCA TCTGACAGCA GACAAGAAGT GAGCAGCATG
      *****
      INICIO
      AtgBglIIR
  
```


Seguidamente se localizaron secuencias GAS (Gamma Activated Site), características de los genes estimulados por IFN- γ , en los tres promotores, encontrándose 1 en Mx1 (-99 a -108); 4 en Mx2 (-616 a -625; -695 a -704; -884 a 893 y -902 a -911); y 2 en Mx3 (-525 a -534 y -1117 a -1126). Estas secuencias aparecen en ambas hebras de la molécula de DNA, y algunas, al tratarse de secuencias palindrómicas, aparecen con sentido en las dos hebras de la molécula, como es el caso de la secuencia GAS encontrada en Mx1, y la más próxima al ATG para Mx2 y Mx3.

También se identificaron cajas TATA en pMx2 y pMx3, aunque lejos del inicio de la transcripción, en posiciones -336 a -342 y -238 a -244, respectivamente.

Por último, se identificó un sitio de reconocimiento para IL-6 en pMx2, en las posiciones -942 a -948.

1. 2. 3. Comparación con Promotores de otras especies de peces

Dada la existencia en la base de datos de secuencias de promotores de varias especies de peces, resultaba útil para nuestro estudio realizar un análisis comparativo de las mismas. En la figura 30 se muestra la estructura de los 4 promotores de Mx de peces considerados, correspondientes a las siguientes especies: platija japonesa, *Paralichthys olivaceus*, trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*, Fugu, *Takifugu rubripes*, pez cebra, *Danio rerio*, además de la MxA humana.

El análisis de estas secuencias reveló la presencia en todos ellos de motivos GAAA/TTTC en número variable. También todos presentan al menos un motivo ISRE, siendo la platija japonesa la de mayor número de motivos (4). Curiosamente, en el trabajo donde se describe la estructura de este promotor, dos de estos motivos se consideraron ISRE no canónicos (Ooi y cols., 2005).

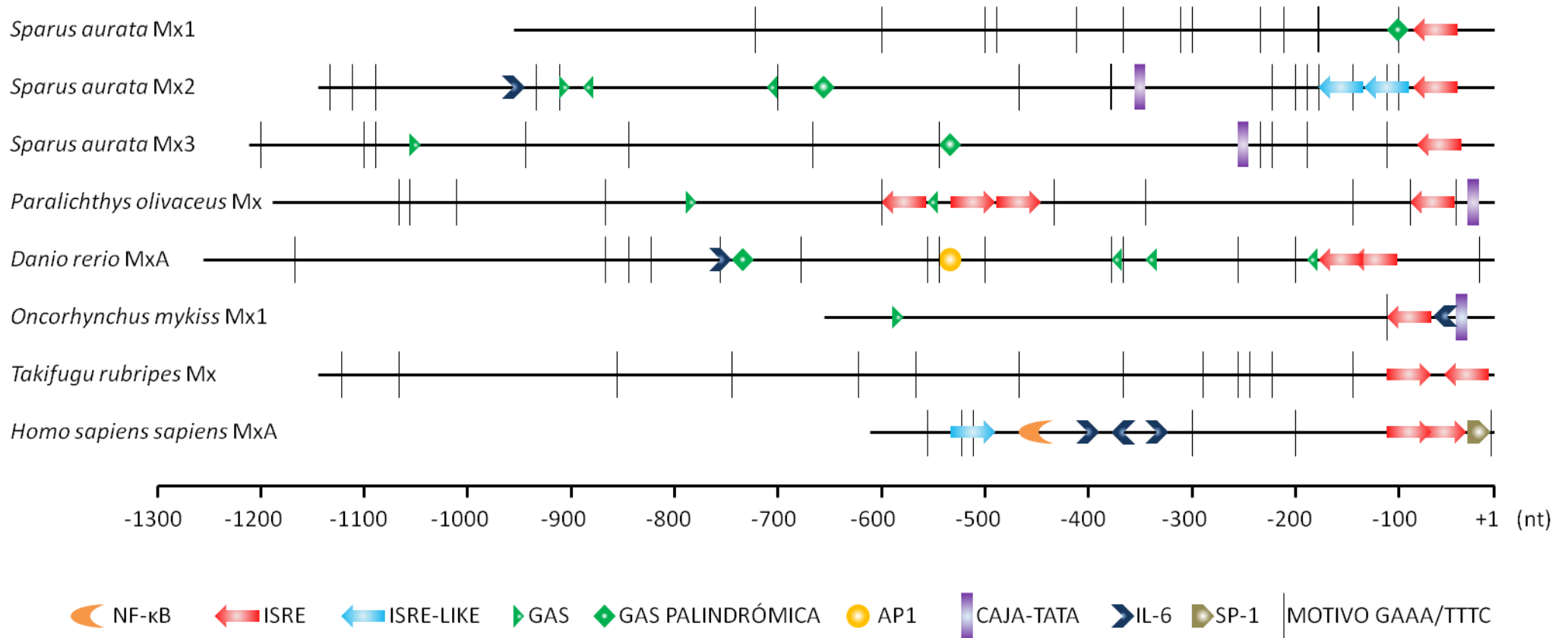


Figura 30. Estructura de los promotores Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada, y de otros promotores de Mx caracterizados en otras especies de peces y la MxA humana. Los elementos identificados se muestran en la leyenda. *Takifugu rubripes* (Yap y cols., 2003; AF525215.1). *Oncorhynchus mykiss* (Collet y Secombes, 2001; AF310254). *Homo sapiens sapiens* (Horisberg y Gunst, 1991; X55639.1). *Danio rerio* (Altmann y cols., 2004; AF532723). *Paralichthys olivaceus* (Ooi y cols., 2005; no disponible). *Sparus aurata* (González-Mariscal y cols., 2014; Mx1, JQ392566; Mx2, JQ392567; Mx3, JQ392568).

También aparecen motivos ISRE-like en el caso de la MxA humana (Ronni y cols., 1998), que al igual que el ISRE-like 2 de pMx2 tiene tres nucleótidos entre los dos motivos GAAA. Las secuencias GAS también están presentes en la mayoría de los promotores, aunque en número variable, siendo 4 el máximo de motivos encontrados. El motivo de respuesta a IL-6 se ha localizado en pez cebra y trucha arcoíris además de en el pMx2 de dorada, así como en el promotor de la MxA de humanos, donde se han observado hasta 3 de estos motivos. Otros motivos, como los sitios AP y SP-1, se han identificado sólo en pez cebra y humanos. Las cajas TATA se han identificado sólo en carpa y en trucha, aunque en ambos casos este motivo se encuentra cerca del inicio de la transcripción.

1. 2. 4. Análisis de las secuencias intrónicas

Dado que disponíamos de las secuencias genómicas de los tres genes y teniendo en cuenta las evidencias que apuntan al papel de estas secuencias en la regulación de la expresión génica (Damore y cols., 1996; Gérardin y cols., 2003; Assiri y Ott, 2007; Plant y Thune, 2008), se realizó un análisis de los motivos reguladores presentes en los intrones de los genes Mx1, Mx2 y Mx3. En el esquema de la figura 31 se muestra la estructura de los genes Mx de dorada, compuestos por 12 exones y 11 intrones (Fernandez-Trujillo y cols., 2011), así como los motivos reguladores identificados.

El número de elementos localizados fue elevado: 8 en el gen Mx1, 17 en Mx2, y 18 en Mx3. Estos motivos incluyen elementos ISRE (2 en Mx1 y en Mx3); ISRE-LIKE (4, 5, y 3 en Mx1, Mx2 y Mx3 respectivamente); de respuesta a IL-6 (4 en Mx2) y sobre todo, secuencias GAS. Del total de secuencias GAS (22 encontradas entre los tres genes), 12 fueron localizadas en Mx3, de las cuales una de ellas era palindrómica. En Mx2 se hallaron 8, todas en el intrón 1. En cambio, tan sólo se identificaron 2 en el gen Mx1.

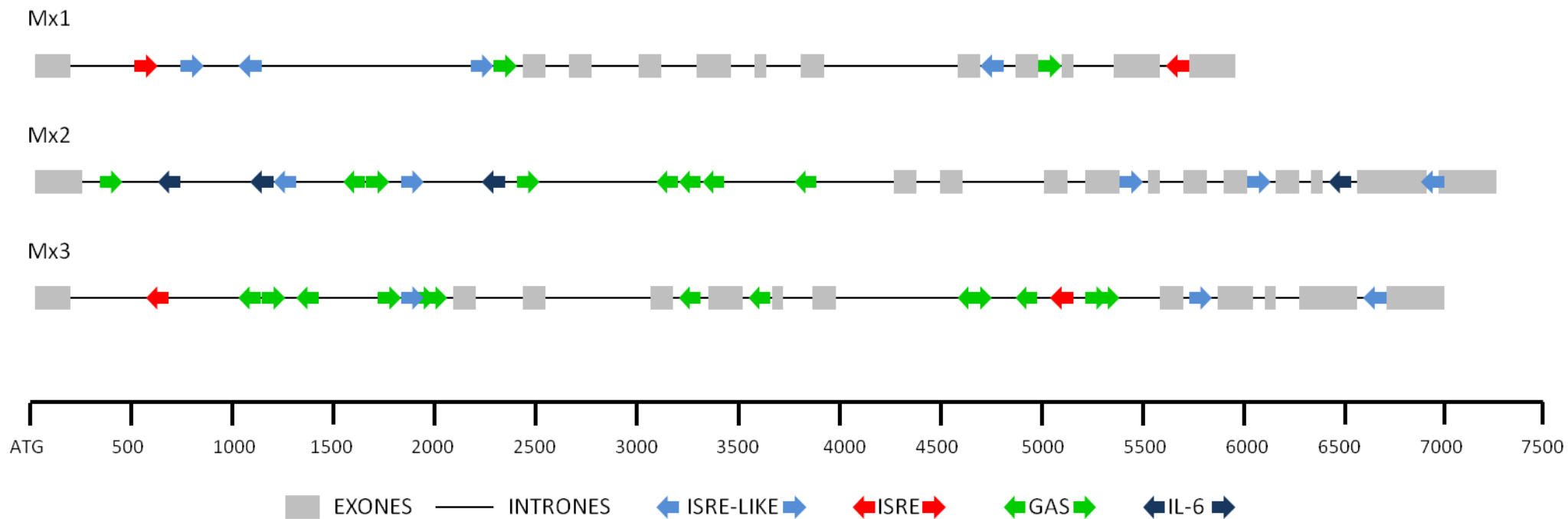


Figura 31. Esquema de los motivos encontrados en las regiones intrónicas de los genes Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada. Los elementos representados se muestran en la leyenda.

2. Construcción de los vectores necesarios para la caracterización funcional de los tres promotores

Una vez identificadas las regiones más relevantes de los promotores, se diseñaron las construcciones oportunas para su análisis funcional, utilizando para ello el vector pGL4.22. En primer lugar se construyeron los vectores que contenían los promotores completos: pMx1, pMx2 y pMx3, cuya estructura se muestra en la figura 32.

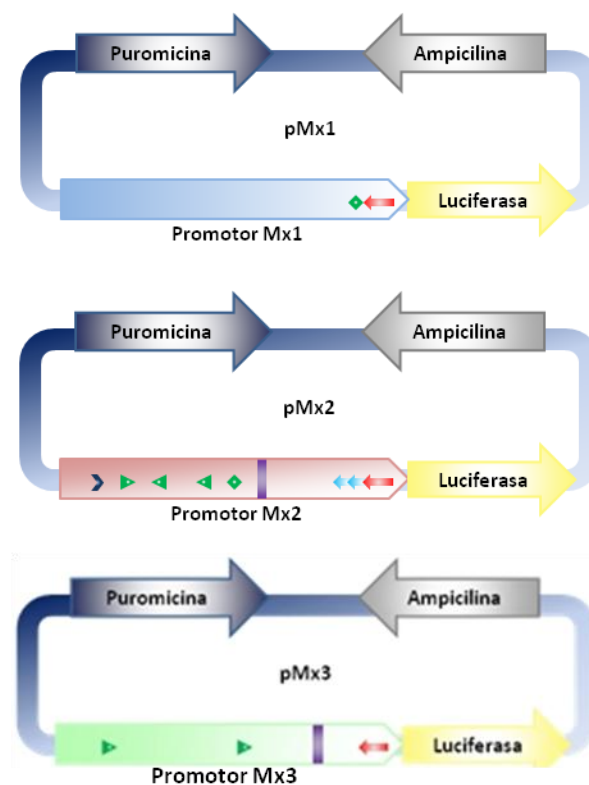


Figura 32. Esquema de los vectores portadores de las secuencias completas de los promotores.

Una vez comprobados estos vectores, se utilizaron para construir los vectores con distintas deleciones. Los plásmidos que portaban la región desde el extremo 5' hasta inmediatamente antes del elemento ISRE se denominaron respectivamente pMx1noISRE, pMx2noISRE y pMx3noISRE y su estructura se muestra en la figura 33.

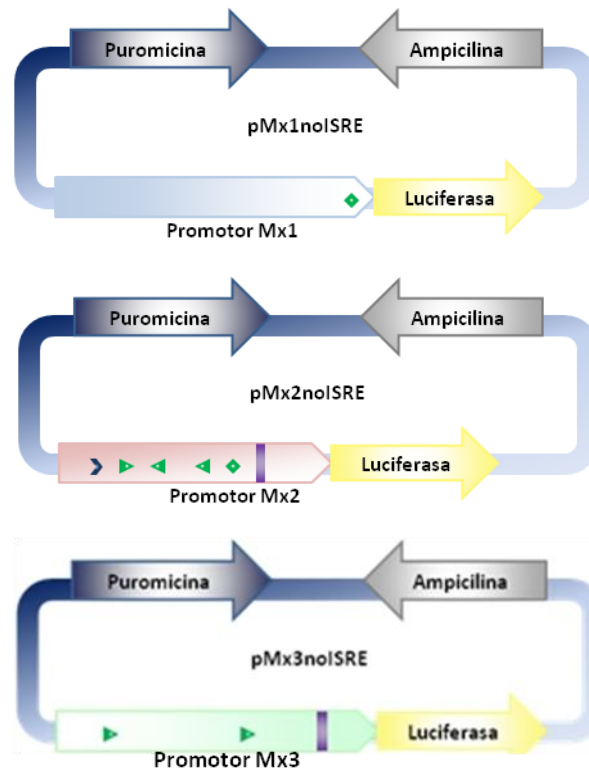


Figura 33. Estructura de los vectores que portan la región 5' de los promotores.

A continuación se construyó un vector que portaba la región 3' común a los tres promotores y que se denominó pISRE (figura 34).

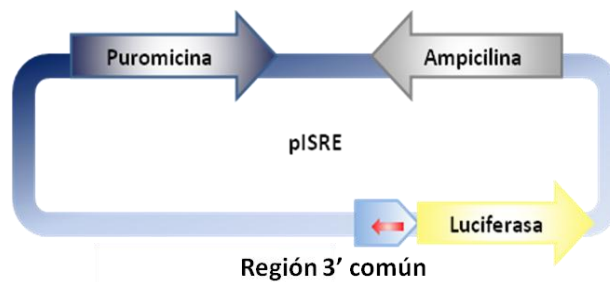


Figura 34. Estructura del vector pISRE.

Finalmente, se construyó un vector que portaba la región 3' de pMx2, incluyendo el motivo ISRE común y el motivo ISRE-like1 específico de este promotor. Este vector se denominó pISRE2 (figura 35).

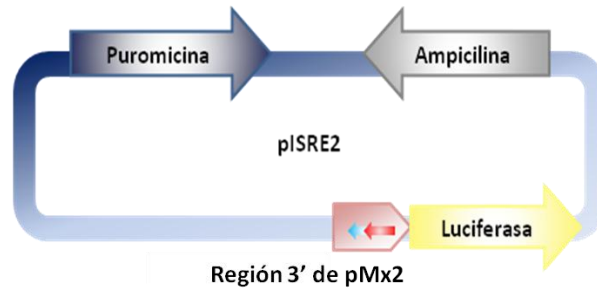


Figura 35. Estructura del vector pISRE2.

En la figura 36 se muestra la estrategia de obtención de estos vectores, así como la localización de los primers utilizados para la obtención de los fragmentos necesarios.

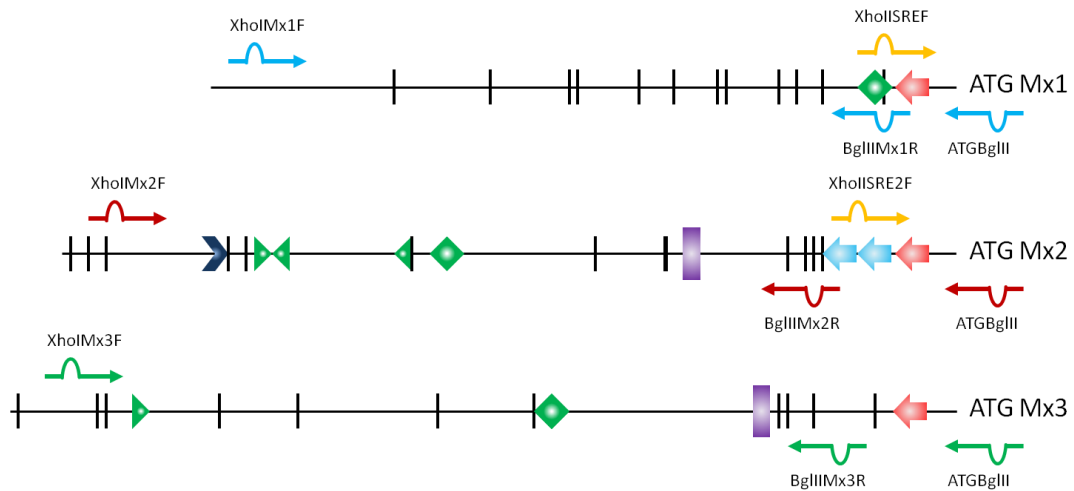


Figura 36. Primers utilizados para la clonación de los fragmentos de los promotores.

Además de estos vectores, también se construyó un vector para utilizarlo como control positivo, conteniendo la luciferasa bajo el promotor constitutivo del citomegalovirus (CMV) (figura 37).

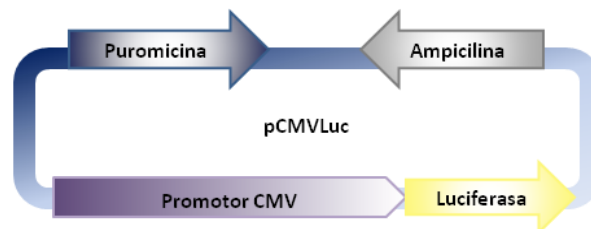


Figura 37. Estructura del vector pCMVluc.

3. Evaluación de la actividad de los tres promotores en respuesta a poli I:C

3. 1. Respuesta de los promotores a distintas dosis de poli I:C

Con el fin de caracterizar la respuesta de los promotores Mx de dorada a IFN tipo I, células RTG-2 se transfectaron con los vectores pMx1, pMx2 y pMx3 y se estimularon con distintas dosis de poli I:C. A las 24 h de la estimulación se midió la actividad luciferasa de cada muestra. Para facilitar la comparación entre los los tres promotores, los resultados se presentan como valores de “Relative Response Ratio”, (RRR), es decir, respuesta de cada promotor relativizada a la actividad luciferasa obtenida de las células transfectadas con el vector pCMVluc, que expresan luciferasa de forma constitutiva (figura 38).

Como se puede observar en las gráficas, los tres promotores responden significativamente a la inducción con poli I:C, incluso con la dosis más pequeña de 1 µg/mL. La respuesta aumenta a 5 µg/mL, manteniéndose bastante estable hasta los 50 µg/mL. A concentraciones más elevadas la respuesta parece comenzar a decrecer. En los tres casos, la respuesta máxima aparece con 10 µg/mL de poli I:C. Por otro lado, el rango de valores de RRR observado para cada promotor fue muy distinto. El valor más alto para Mx1 no superó los 0.5 de RRR, para Mx2 el valor RRR fue superior a 25 y en Mx3 se encontraba en torno a 15, por lo que los niveles de estimulación son diferentes entre los tres promotores.

El tratamiento control, representado por células transfectadas sin tratar con poli I:C, mostró niveles basales de expresión que fueron menores de 0.1 en el caso de Mx1, de 5 en Mx2 y 2.5 en Mx3. A partir de estos valores, se determinó la respuesta relativa de cada promotor a cada uno de los tratamientos respecto a las células sin tratar, es decir la inducibilidad. Los valores máximos encontrados en cada caso fueron 8.41 para Mx2, 5.75 para Mx1 y 3.35 para Mx3.

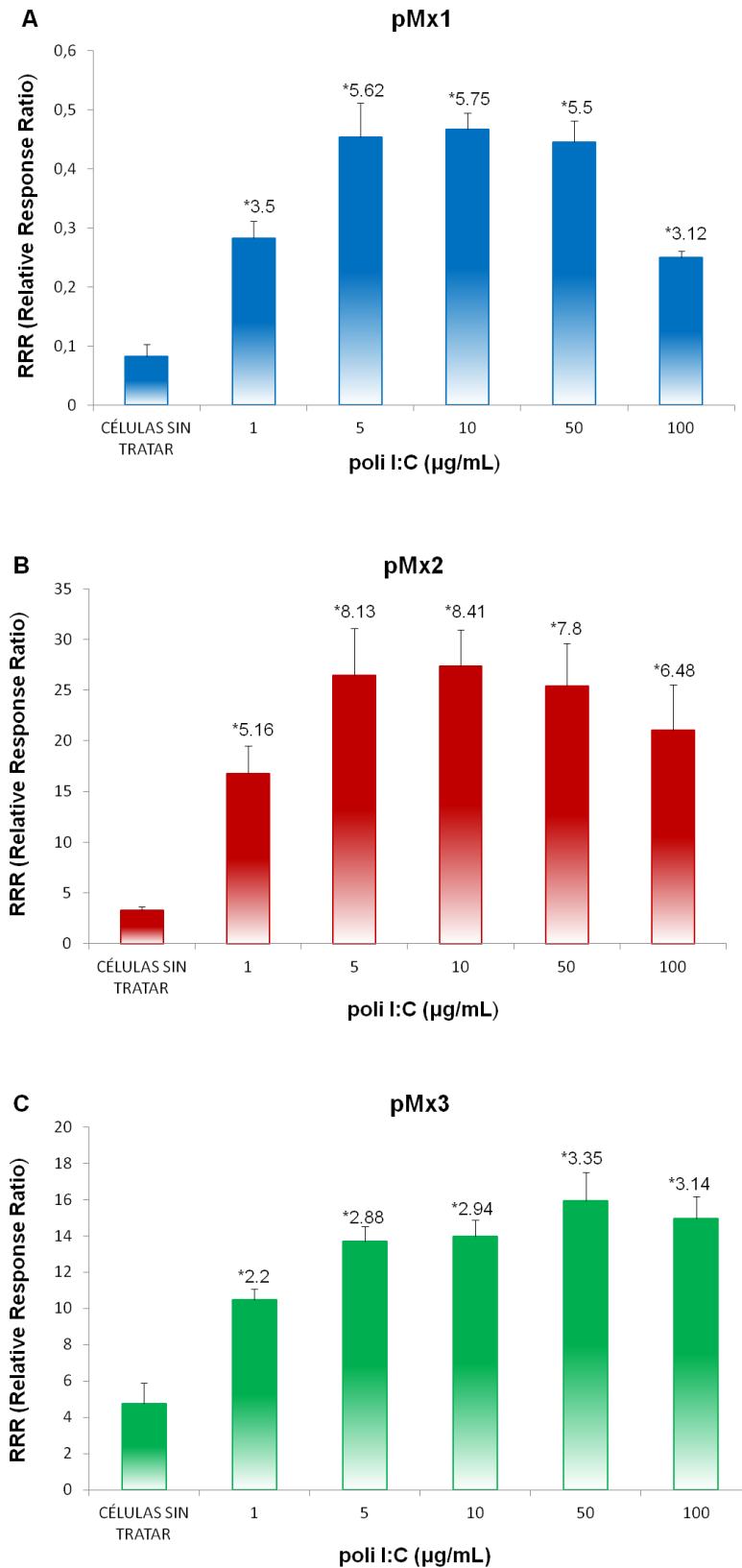


Figura 38. Respuesta de cada promotor a la estimulación con distintas concentraciones de poli I:C. Cada barra representa la media y el error estándar (SE) para n=8. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a células sin tratar. El valor numérico sobre las barras indica la inducibilidad (respuesta relativa respecto al control de células sin tratar).

3. 2. Cinética de inducción de los promotores

La cinética de inducción de los promotores se estudió en células transfectadas con los vectores pMx1, pMx2 y pMx3, y estimuladas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de poli I:C. En la figura 39 se muestran los resultados en valores de inducibilidad para cada promotor, es decir, la respuesta relativa de cada promotor (RRR) normalizada respecto al valor obtenido en células transfectadas con el mismo vector, pero no tratadas con poli I:C.

Los tres promotores mostraron una respuesta significativa a las 6h de iniciarse tratamiento, que aumentó hasta las 24 h, donde se observa el máximo de inducción. A partir de este punto, la respuesta comienza a decrecer, en el caso de pMx2 la respuesta decae de forma más acusada.

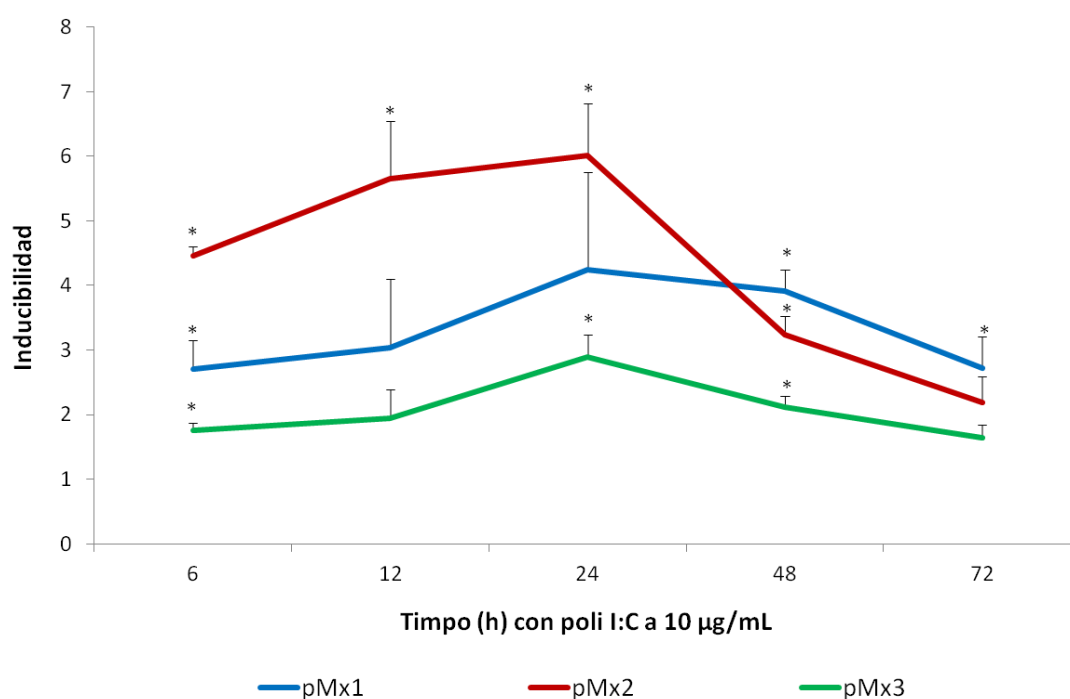


Figura 39. Cinética de la respuesta a Poli I:C (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de cada promotor Mx de dorada en valores de inducibilidad (RRR experimental/RRR células sin tratar). Cada barra representa la media \pm el error estándar (SE) para $n=8$. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a las células sin tratar.

3. 3. Respuesta de los promotores con deleciones

Para determinar el papel del motivo ISRE encontrado en las secuencias de los tres promotores, se realizaron una serie de construcciones con distintas deleciones respecto a los promotores completos. Las células RTG-2 se transfectaron con estas construcciones y se trataron con poli I:C (10 µg/mL) durante 24 h. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 40.

En las células transfectadas con las construcciones que carecían del extremo 3', poseedor del motivo ISRE, se observó un importante descenso en la respuesta a poli I:C. En el caso de los vectores pMx1noISRE y pMx3noISRE, la respuesta descendió un 80.69 % y 48.97 %, respectivamente, presentando valores de inducibilidad de 1.1 y 1.5, que no fueron significativamente diferentes del valor umbral (1). Sin embargo, en el caso de pMx2noISRE, en que el descenso en la respuesta fue importante, (de un 55.52 % respecto a la del promotor completo), el valor de inducibilidad fue significativo (3.72), lo que indica que, aún sin el motivo ISRE, pMx2 responde a la estimulación con poli I:C.

En cuanto a la construcción pISRE, que contiene la región 3' común a los tres promotores, incluido el motivo ISRE, su respuesta fue significativa, lo que indica que esta región es suficiente para la respuesta a IFN I de los tres promotores. Sin embargo, la inducción es significativamente menor que la obtenida con los promotores pMx1 y pMx2 completos (descenso del 66.44 % y 77.05 %), lo que sugiere un efecto aditivo de los elementos reguladores presentes en estos dos promotores. En el caso de pMx3, la respuesta del promotor completo no es diferente respecto a la obtenida con pISRE, lo que indica que esta región es la única responsable de la respuesta de este promotor a IFN I. Finalmente, se determinó la respuesta de la construcción pISRE2, que contiene la región 3' de pMx2, hasta el motivo ISRE-like1. La inducción no fue diferente de la obtenida con la construcción pISRE, lo que parece indicar que este motivo ISRE-like no es funcional.

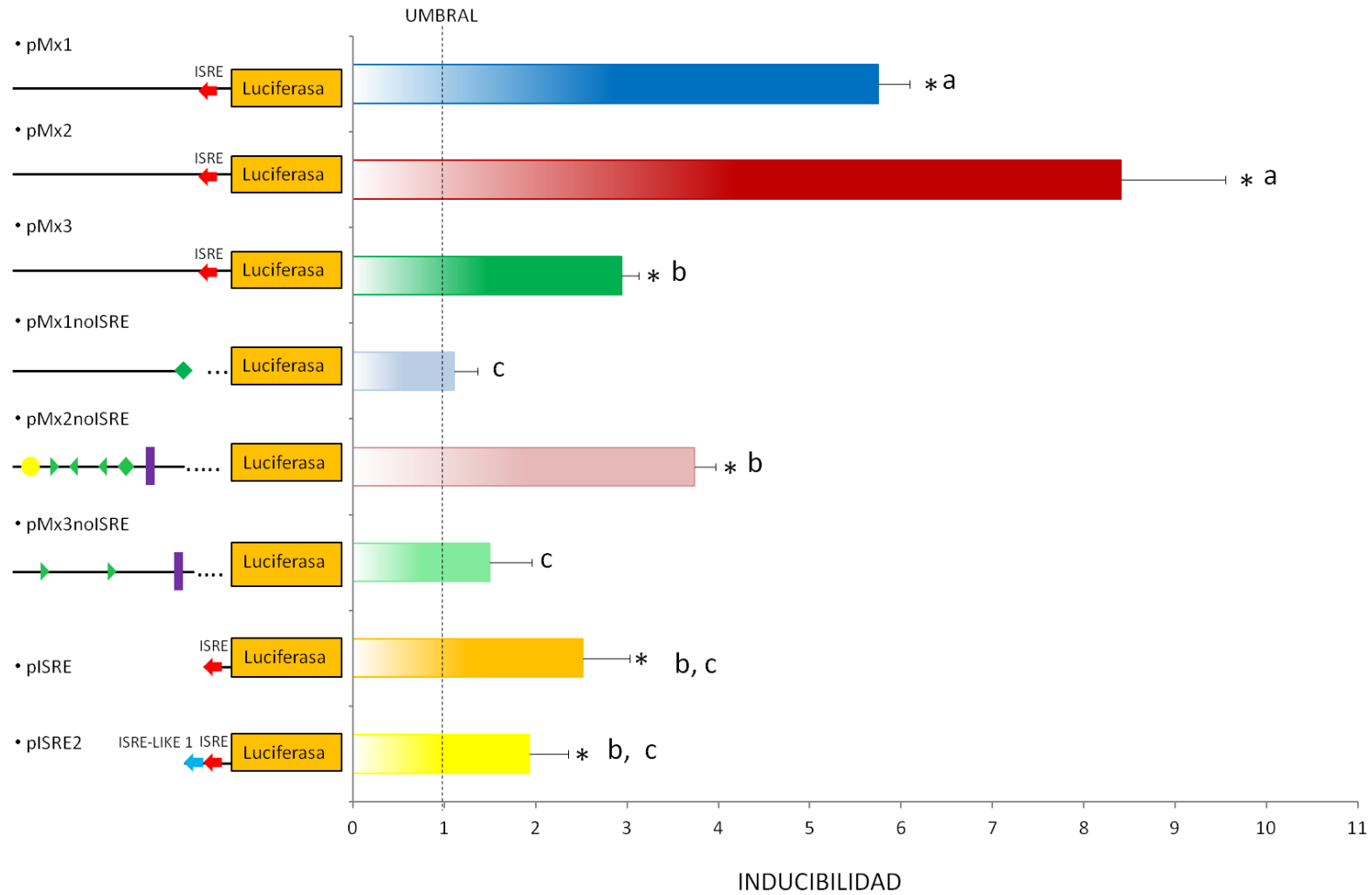


Figura 40. Valores de inducibilidad en respuesta a poli I:C (10 µg/ml) de las diferentes construcciones. Cada barra representa la media + el error estándar (SE) para n=8. Barras con distintas letras indican diferencias significativas (p<0.05). * Diferencias significativas respecto a células sin tratar.

4. Evaluación de la actividad de los promotores en respuesta a estimulación por los virus IPNV y VHSV

4.1. Respuesta a la infección con IPNV

Para determinar la respuesta de los promotores Mx de dorada a la infección con el virus IPNV, células RTG-2 se transfectaron con las construcciones que contienen los promotores completos. Las células transfectadas se infectaron con IPNV a 0.01 y 0.1 MOI. Posteriormente se midió la actividad luciferasa a 24, 48 y 72 h de la infección (p.i.). Los resultados obtenidos para cada promotor se muestran como valores de inducibilidad respecto a células transfectadas no infectadas (figura 41). Como control positivo se usaron células transfectadas estimuladas con poli I:C a 10 $\mu\text{g/mL}$, en las que la actividad luciferasa se midió a las 24 h de la estimulación.

Los resultados obtenidos indican que los tres promotores se estimulan por la infección con IPNV. Sin embargo, su respuesta es menor que la observada por la estimulación con poli I:C, y en los tres casos, la dosis menor de virus (0.01 MOI) es la que genera una respuesta mayor, es más, pMx1 y pMx3 no se estimulan con la dosis alta. Respecto a la cinética de inducción, no se detecta respuesta hasta las 48 h p.i., momento en que la respuesta es máxima en el caso de pMx1 y pMx3. En el caso de pMx2, la respuesta es máxima a las 72 h de la infección. Este promotor responde de forma muy similar en células infectadas con 0.1 y 0.01 MOI.

El rango de valores de RRR obtenidos para cada promotor fue muy distinto y similar a los obtenidos tras la estimulación con poli I:C (figura 38).

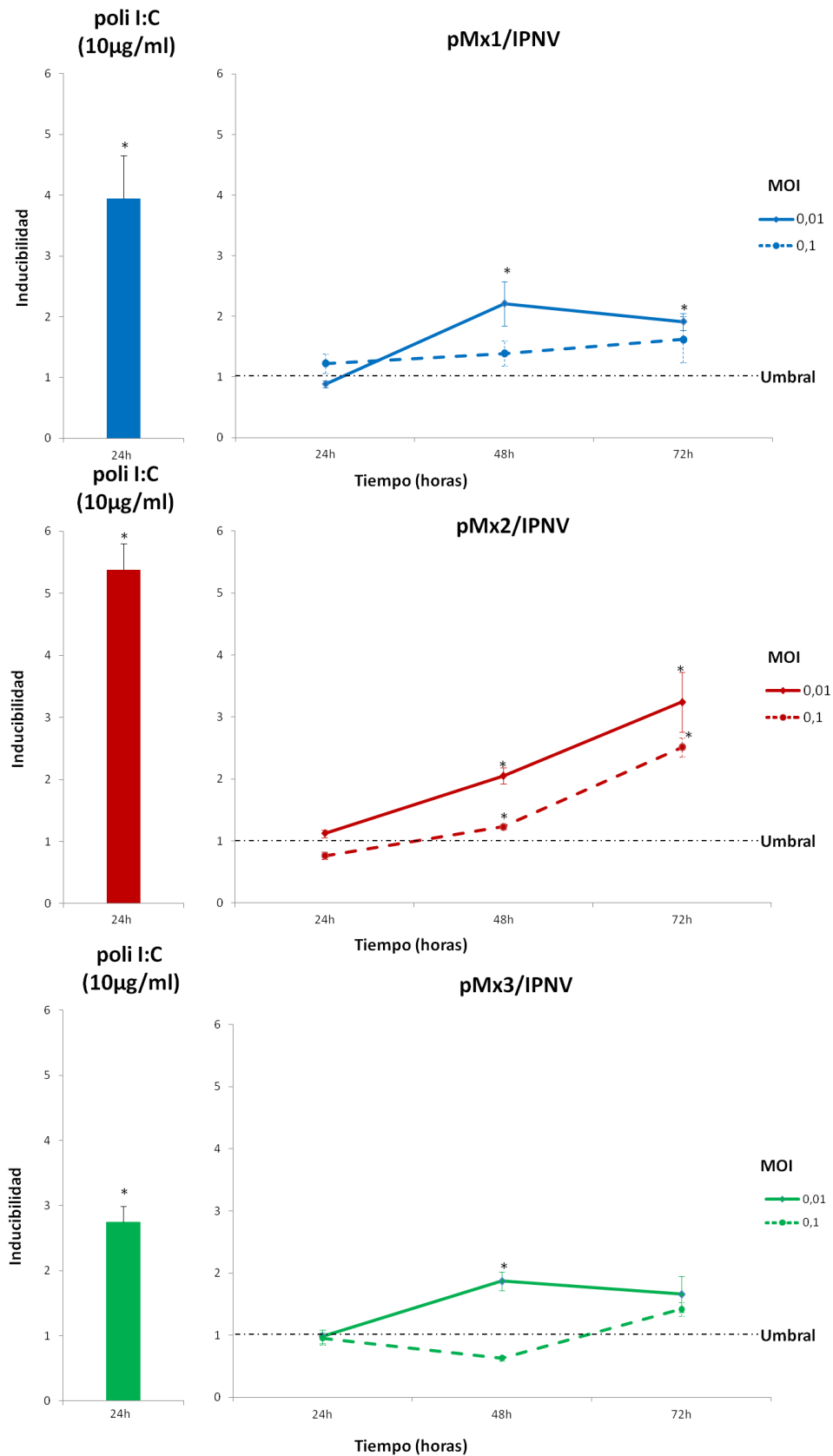


Figura 41. Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a la infección con IPNV a 0.01 y 0.1 MOI, medida a 24, 48 y 72h de la infección. Cada barra representa la media \pm el error estándar (SE) para n=8. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a células sin infectar ni estimular.

4. 2. Respuesta a la infección con VHSV

La respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 al virus VHSV, se analizó de la misma manera que a IPNV. En este caso, los resultados indican que los tres promotores también responden a la infección por VHSV, mostrando de nuevo diferencias entre ellos en cuanto a la magnitud, cinética y sensibilidad de sus respuestas (figura 42).

Sólo pMx1 responde a ambas dosis de virus, en cambio pMx2 y pMx3 sólo se activan cuando las células se infectan con VHSV a 0.1 MOI. A esta dosis, la respuesta de pMx1 y pMx2 es significativa a las 24 h p.i., en cambio la de pMx3 sólo lo es a 48 h p.i. La respuesta de pMx1 es máxima a las 48 h de la infección y luego decrece, mientras que la respuesta de pMx2 aumenta a las 48 h, es máxima a las 72 h p.i. y alcanza niveles de inducibilidad similares a los obtenidos con el tratamiento con poli I:C. En el caso de la infección a 0.01, la respuesta de pMx1 es significativa a 48 h y 72 h p.i., con una inducción similar en ambos casos.

Al igual que ocurrió en los experimentos anteriores, el rango de valores de RRR obtenidos para cada promotor fue muy distinto y similar al observado tras la estimulación con poli I:C (figura 38).

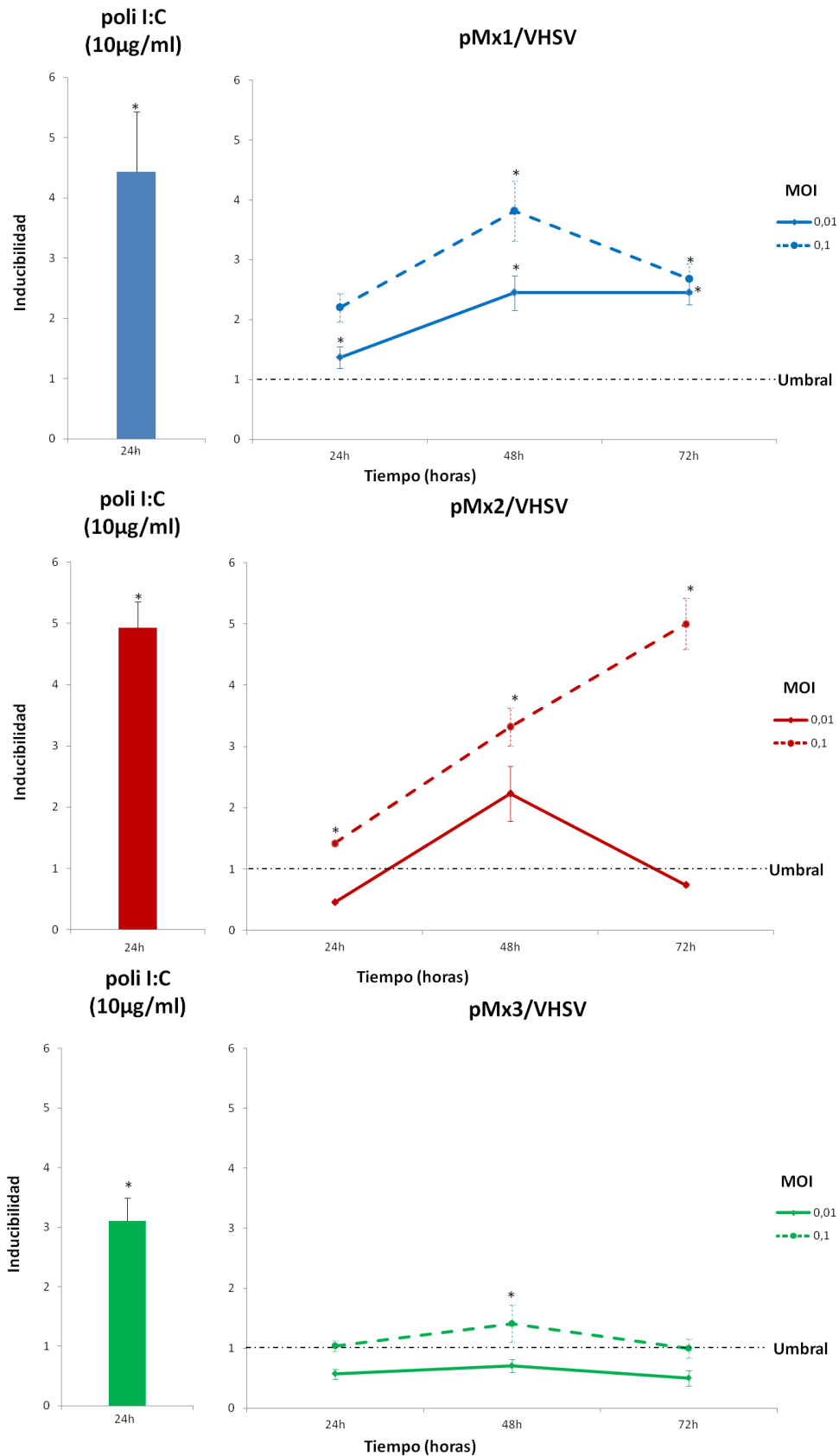


Figura 42. Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a la infección con VHSV a 0.01 y 0.1 MOI, medida a 24, 48 y 72 h de la infección. Cada barra representa la media ± el error estándar (SE) para n=8. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a células sin infectar.

5. Evaluación del efecto de la actividad antagonista de IPNV y VHSV en la transcripción de los genes Mx de dorada

5. 1. Obtención de células RTG-2 transfectadas estables

Para comprobar la posible actividad antagonista de IPNV y VHSV sobre los promotores de los genes Mx de dorada, células RTG-2 se transfectaron con los plásmidos pMx1, pMx2 y pMx3, que contienen los promotores completos, y se seleccionaron con el antibiótico puromicina hasta obtener tres poblaciones celulares estables. De la misma forma, se obtuvieron poblaciones estables de células transfectadas con los plásmidos pCMVluc y pGL4.22, que sirvieron como controles positivo y negativo respectivamente.

Las poblaciones celulares estables se obtuvieron tras aproximadamente 4 semanas de selección y 5 subcultivos. Tanto la morfología como el crecimiento de las células transfectadas fueron similares a los de las células RTG-2 originales. La presencia del plásmido transfectado se comprobó mediante PCR sobre DNA genómico de las células. Los resultados muestran la amplificación de los dos genes (luciferasa y puromicina) en los cinco cultivos celulares (Fig 41), lo que indica que ambos están integrados en el genoma de las células.

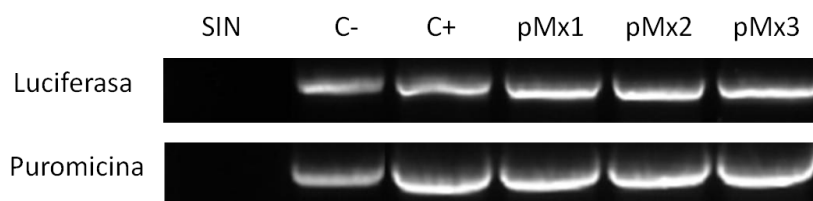


Figura 43. Comprobación de la presencia de los genes de luciferasa y puromicina en el DNA genómico de las poblaciones celulares estables. SIN (células sin transfectar); C- (células transfectadas con el vector pGL4.22) y C+ (células transfectadas con el vector pCMVluc).

5. 2. *Actividad antagonista de IPNV*

Para evaluar la posible actividad antagonista de IPNV sobre pMx1, pMx2 y pMx3, las poblaciones celulares obtenidas previamente se sembraron en placas de 96 pocillos y se sometieron a 3 tratamientos diferentes:

- Estimulación con poli I:C y a las 24 h inoculación de IPNV.
- Inoculación de IPNV y a las 24 h estimulación con poli I:C.
- Inoculación de IPNV y estimulación con poli I:C a la vez.

Como controles experimentales, lotes de cada población de células recibieron sólo uno de los tratamientos, es decir, se inocularon con IPNV o se estimularon con poli I:C. Los resultados obtenidos de actividad luciferasa se muestran en la figura 44 representados en valores de inducibilidad.

Los promotores pMx1 y pMx3 mostraron un comportamiento similar en cuanto a la magnitud de la respuesta (entre 1.2 y 2) y la cinética de inducción por poli I:C. En cuanto a la infección con IPNV, la respuesta no fue significativa en ningún caso, ni la infección con IPNV alteró la estimulación de ambos promotores con poli I:C. Estos resultados indican que IPNV no tiene efecto antagonista sobre pMx1 y pMx3.

En cambio, en el caso de pMx2, por un lado, la magnitud de la respuesta es bastante mayor (>25) y presenta un patrón de inducción diferente al de pMx1 y pMx3 con una respuesta máxima a las 24 h del tratamiento. Además, la respuesta a IPNV es significativa, aunque bastante menor que la obtenida al estimular con poli I:C, y cuando las células se infectan y se estimulan, la respuesta que se observa es similar a la obtenida sólo con la infección, por lo que IPNV parece tener un efecto antagonista sobre pMx2, disminuyendo su respuesta a poli I:C significativamente.

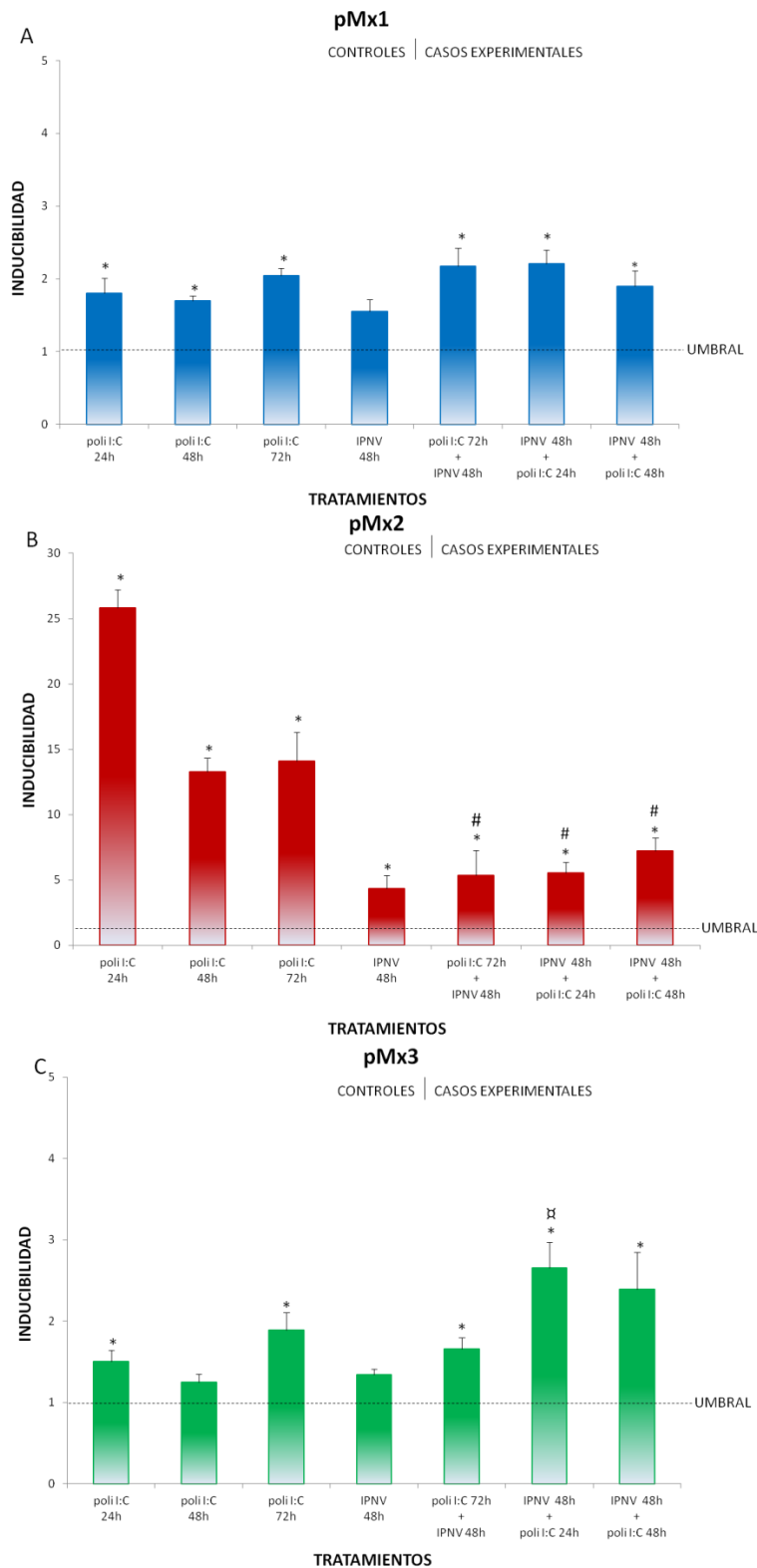


Figura 44. Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a la inducción con poli I:C (10 µg/ml) y a la infección con IPNV (0.01 MOI). Cada barra representa la media + el error estándar (SE) para n=8 en los tratamientos y el control con IPNV, y n=4 para los controles de poli I:C y células sin tratar. * existen diferencias respecto a células sin tratar; □ existen diferencias respecto a células infectadas; # existen diferencias respecto a células tratadas con poli I:C durante el mismo tiempo.

5. 3. *Actividad antagonista de VHSV*

De la misma manera que en el caso de IPNV y a fin de evaluar la posible actividad antagonista de VHSV sobre pMx1, pMx2 y pMx3, las poblaciones celulares obtenidas previamente se sembraron en placas de 96 pocillos y se sometieron a 3 tratamientos diferentes:

- Estimulación con Poli I:C y a las 24 h inoculación de VHSV.
- Inoculación de VHSV y a las 24 h estimulación con poli I:C.
- Inoculación de VHSV y estimulación con poli I:C a la vez.

Como controles experimentales lotes independientes de cada población de células recibieron sólo uno de los tratamientos, es decir, se inocularon con VHSV o se estimularon con poli I:C. Los resultados de actividad luciferasa obtenidos se muestran en la figura 45 representados en valores de inducibilidad.

Los resultados obtenidos muestran un nivel de respuesta de pMx1 y pMx3 similar (entre 1.5 y 3), mientras que en el caso de pMx2 la inducibilidad llega a ser de mayor de 16. En cuanto a la cinética de estimulación por poli I:C, es similar para pMx1 y pMx3, con valores similares en los tres tiempos analizados, mientras que en el caso de pMx2 el valor máximo es a 24 h y desciende de forma acusada a 48 h y 72 h. La infección con VHSV estimula los tres promotores de forma significativa. Cuando las células se someten a los dos tratamientos en las tres combinaciones descritas, los resultados muestran que la infección por VHSV no afecta a la estimulación causada por poli I:C, lo que indica que este virus no parece tener efecto antagonista sobre pMx1, pMx2 y pMx3.

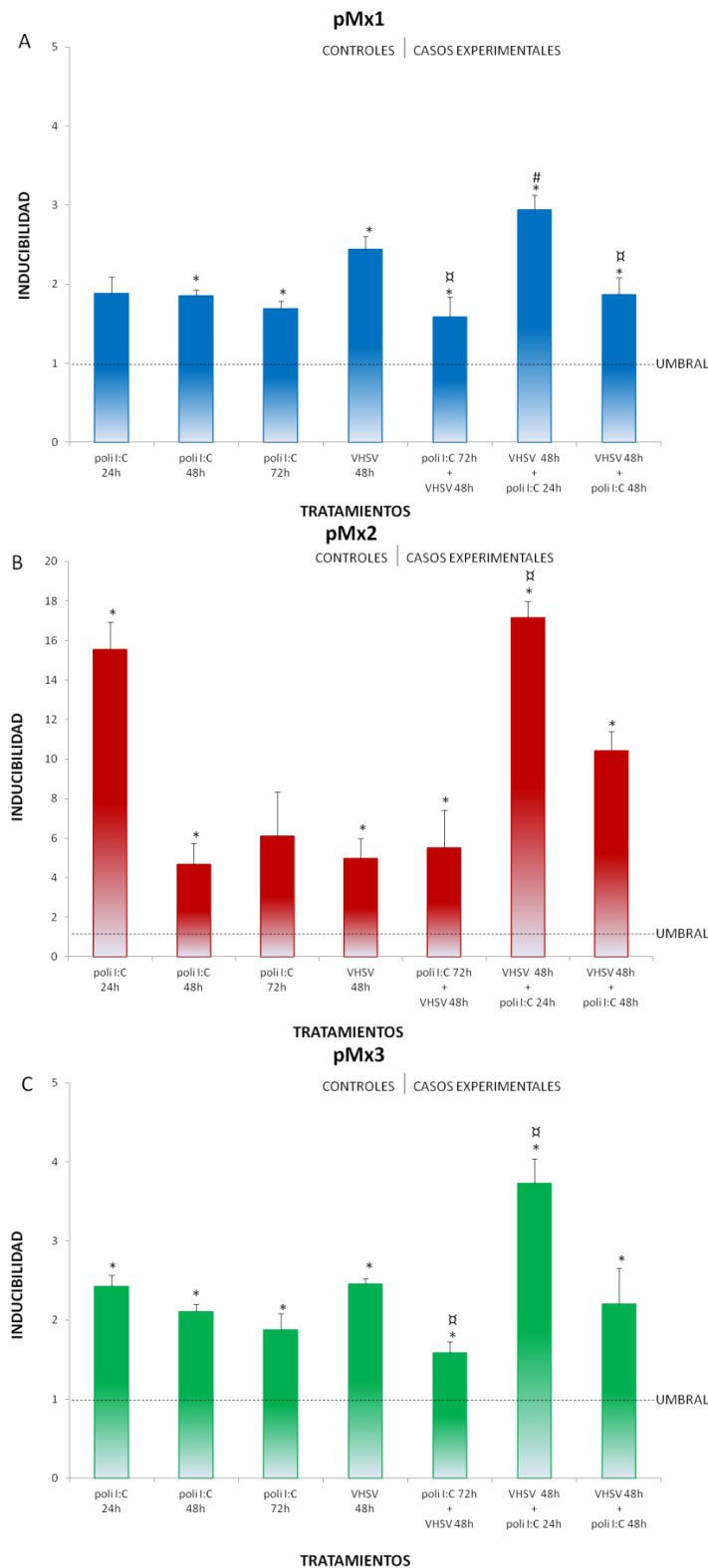
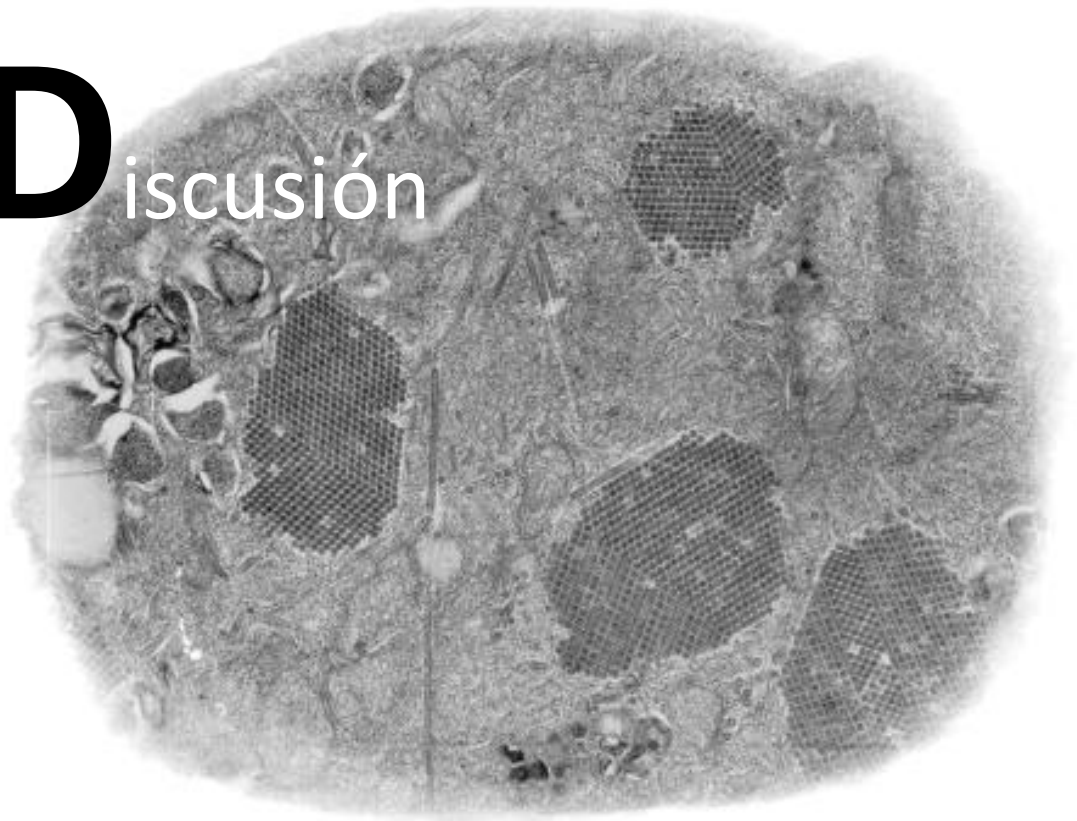


Figura 45. Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a la inducción con poli I:C (10 µg/ml) y a la infección con VHSV (0.1 MOI). Cada barra representa la media + el error estándar (SE) para n=8 en los tratamientos y el control con VHSV, y n=4 para los controles de poli I:C y células sin tratar. * existen diferencias respecto a células sin tratar; ☒ existen diferencias respecto a células infectadas; # existen diferencias respecto a células tratadas con poli I:C durante el mismo tiempo.

Discusión



DISCUSIÓN

Comprender la interacción patógeno-hospedador es quizás el objetivo principal del estudio de la respuesta inmune en cualquier tipo de organismo. En el caso de las especies cultivadas de peces, este conocimiento debe servir para diseñar estrategias orientadas a mejorar su resistencia a las enfermedades infecciosas. Las proteínas Mx, como protagonistas de la respuesta antiviral desencadenada por IFN, ocupan una situación privilegiada en este contexto. Por esa razón, son numerosos los estudios en peces cultivados dirigidos a caracterizar tanto su actividad antiviral como los mecanismos que regulan su expresión (Collet y Secombes, 2001; Yap y cols., 2003; Altmann y cols., 2004; Ooi y cols., 2005; Plant y Thune, 2004, 2008; Haller 2011, Fernandez-Trujillo y cols., 2013; Álvarez-Torres y cols., 2013).

Dentro del ámbito de los peces, la dorada, especie destacada de la acuicultura mediterránea, se distingue por presentar una inusual resistencia a las infecciones víricas (Borrego y cols., 2000), lo que la convierte en un modelo atractivo de defensa antiviral entre los peces de cultivo. Por este motivo, nuestro grupo de investigación está interesado en dilucidar el papel que juegan las proteínas Mx de la dorada, (Mx1, Mx2 y Mx3) en su exitosa respuesta a las infecciones víricas (Fernandez-Trujillo y cols., 2011a, 2011b y 2013). Como contribución a esta línea de investigación, en esta tesis doctoral se han secuenciado, clonado y caracterizado, estructural y funcionalmente, los promotores de los tres genes Mx de dorada: pMx1, pMx2 y pMx3.

Estructura de los promotores pMx1, pMx2 y pMx3

Tras la secuenciación de pMx1, pMx2 y pMx3, cuyo tamaño resultó en 1Kb aproximadamente, se realizó el análisis filogenético de las tres secuencias, en el que pMx2 destacó como la más distante, mientras que pMx1 y pMx3 presentaban una relación más cercana, aunque con valores de identidad no muy elevados (63.55 %). En peces, existen datos de secuencias de promotores de genes Mx procedentes de distintas especies (Collet y Secombes, 2001; Yap

y cols., 2003; Altmann y cols., 2004; Plant y Thune, 2004, 2008; Ooi y cols., 2005, Álvarez-Torres, 2013) aunque son muy escasos los datos de secuencias de promotores Mx pertenecientes a la misma especie. De hecho, sólo se han analizado las secuencias de los cinco promotores de pez gato, cuyos valores de identidad oscilan entre el 57.77 y el 83.08 % (Plant y Thune, 2008), más dispares de los encontrados en nuestro caso. En cualquier caso, la divergencia entre los tres promotores Mx de dorada contrasta con la gran similitud entre las secuencias aminoacídicas de las tres proteínas Mx correspondientes (Porcentajes de identidad Mx1/Mx2: 95.2 %; Mx1/Mx3: 95.8 % y Mx2/Mx3: 95.2 %), lo cual les hace formar un grupo sólido en el árbol filogenético (figura 12). Estas observaciones abren posibilidades a la existencia de mecanismos de regulación específicos para estos genes, como se ha demostrado en este trabajo.

A pesar de la relativa baja identidad entre los pMx de dorada, es destacable la presencia de una región en su extremo 3' con elevada identidad (96-98%). Este fragmento, que hemos considerado común para pMx1, pMx2 y pMx3, comprende 157 pb, desde el ATG hasta el nucleótido -101 y en él se encuentra el único elemento ISRE identificado en estos promotores. El alto grado de conservación, junto a la presencia de un ISRE canónico según la secuencia consenso propuesta por Collet y Secombes en 2001, sugiere que esta región conservada debe jugar un importante papel en la regulación de la expresión de los genes Mx de dorada. En este papel también participa, con toda probabilidad, la región 5' UTR de estos genes, puesto que en estas regiones se han descrito diversos elementos implicados en la regulación de la expresión de los genes a los que pertenecen (Barret y cols., 2012).

Aunque la caracterización de promotores Mx en peces se limita a unas pocas especies, los motivos ISRE identificados en ellos, resultan en un número variable. Así, el promotor de la Mx1 de trucha arcoíris (Collet y Secombes, 2001), el de la Mx de pez gato (Plant y Thune, 2008), y el de la Mxg de pez cebra, presentan un único ISRE, al igual que ocurre con los tres promotores de dorada. En contraposición, el promotor de la Mx de fugu (Yap y cols., 2003), de

mero (Chen y cols., 2006), y los de Mxa y Mxb de pez cebra (Li y cols., 2009), presentan dos ISREs; el promotor de la Mx de lenguado presenta tres (Alvarez-Torres y cols., 2013) y el de la Mx de platija japonesa cuatro (Ooi y cols., 2005). La comparación de la estructura de promotores de distintas especies indica que, ni el grado de similitud en las secuencias, ni la presencia/ausencia de elementos reguladores en los promotores, permite predecir el grado de similitud/divergencia en la expresión de los correspondientes genes (Tirosh y cols., 2009). Al contrario, se sabe simplemente que la estructura de los promotores es específica para cada especie y que la gran diversidad del número de motivos ISRE, sugiere un papel relevante para estos elementos en la regulación de la expresión de los genes Mx. Posiblemente, y al igual que debe ocurrir con otros genes del sistema inmune, el patrón estructural y funcional de los promotores Mx esté relacionado con el tipo de patógenos a los que ha tenido que hacer frente cada especie a lo largo de su historia evolutiva, y por tanto, con la resistencia/susceptibilidad actual de cada especie a los distintos virus (Lee y Vidal 2002; Li y cols., 2009; Vilcinskas, 2013; Ekblom y cols., 2010; revisado en Pond y cols., 2012).

Además del ISRE, los tres promotores Mx de dorada presentan también un número considerable de motivos GAAA o "ISRE core sequences" a lo largo de su secuencia: 13, 15 y 12 en Mx1, Mx2 y Mx3 respectivamente (figura 29). Estos motivos son frecuentes en los promotores Mx y en los de otros ISGs, tanto de peces como de vertebrados superiores (Chang y cols., 1991; Hug y cols., 1988; Gérardin y cols., 2004). Respecto a la función de estos motivos, los 10 elementos GAAA detectados en el promotor de la Mxa de pez cebra parecen actuar como potenciadores en la expresión de este gen (Altman y cols., 2004), lo que sugiere que los de dorada podrían ejercer un efecto similar. Además, en el caso de pMx2 dos motivos GAAA consecutivos generan dos elementos de los denominados ISRE-like. A pesar de haberse identificado elementos ISRE-like en varios promotores de genes Mx, y de otros ISGs (Horisberg y Gunst, 1991; Asano y cols., 2003; Gérardin y cols., 2003 Assiri y Ott, 2006; Jiang y cols., 2009; Jia y Zhou, 2010), hasta el momento, sólo el

ISRE-like del promotor de la Mx2 de ratón se ha confirmado como funcional y necesario para la correcta actividad de este promotor (Asano y cols., 2003).

Corriente arriba del motivo ISRE, en los tres promotores Mx de dorada se identificaron otros elementos reguladores, entre los que destacan los motivos GAS (Gamma Activated Site), que aparecen en posición y número variable (1, 4 y 2 en pMx1, pMx2 y pMx3, respectivamente). Estos motivos también aparecen en los promotores de las Mx de platija japonesa (Ooi y cols., 2005), trucha arcoíris (Collet y Secombes, 2001), lenguado senegalés (Alvarez Torres y cols., 2013) y pez cebra (Altmann y cols., 2004). Estas secuencias parecen estar implicadas en la respuesta a IFN- γ , por lo que Mx1, Mx2 y Mx3 podrían responder también a esta citoquina, como se ha descrito en trucha arcoíris (Jørgensen y cols., 2007) y salmón atlántico (Sun y cols., 2011) aunque esta respuesta parece, al menos en parte, ser dependiente de un pico de expresión secundario de IFN I inducido por IFN II (Jørgensen y cols., 2007; Sun y cols., 2011). Por otro lado, resulta llamativo que en vertebrados superiores el número de secuencias GAS de los pMx es muy bajo, lo cual se ha asociado a una mayor especialización, tanto del sistema inmune natural, en el que el IFN I tiene un papel más relevante, como del adaptativo, en el que es el IFN II el que tiene un mayor peso (Zou y Secombes, 2011).

En pMx2 y pMx3 se identificó además una caja TATA canónica, lo cual es un hallazgo infrecuente. De hecho, sólo se han detectado en platija japonesa (Ooi y cols., 2005) y trucha arcoíris (Collet y Secombes, 2001); y en mamíferos sólo en ratón (Hug y cols., 1988). En nuestro caso es interesante que la caja TATA se halle alejada del sitio de inicio de la transcripción en ambos promotores (sitios -336 y -238, en pMx2 y pMx3 respectivamente), lo que sugiere que estos promotores puedan tener otro sitio de inicio de la transcripción, o poseer promotores alternativos para estos genes, tal como se ha descrito en la MxA humana (Noguchi y cols., 2013). Por otro lado, los promotores con varios sitios de inicio de la transcripción son normalmente más complejos porque la expresión de los genes correspondientes es fruto de la combinación de muchos factores, que pueden actuar de forma independiente o sinérgica (Barret y cols.,

2012). Ciertamente, una regulación compleja de los genes Mx concuerda y refuerza su importante papel en la defensa antiviral.

En pMx2 se encontró también un motivo de respuesta a IL-6. Este tipo de motivos se han descrito en otros promotores Mx, como el de trucha arcoíris (Collet y Secombes, 2001), pez gato (Plant y Thune, 2008) o el de la Mx_a de pez cebra (Altmann y cols., 2004). Estos motivos también están presentes en los promotores de la Mx de pollo (Schumacher y cols., 1994) y en los de las Mx de varias especies de mamíferos (Horisberger y Gunst, 1991; Assiri y Ott, 2006; Assano y cols., 2003; Gérardin y cols., 2003; Yamada y cols., 2009). Además, se ha sugerido que IL-6 puede tener un papel regulador de la expresión de Mx1 bovina (Gérardin y cols., 2003). De hecho, IL-6 es una de las citoquinas más importantes y de efecto más pleiotrópico debido a su importante papel como mediadora de las respuestas innata y adaptativa (revisado en Akira y cols., 1990; y Naka y cols., 2002). Por tanto, la presencia del elemento de respuesta a IL-6 en pMx2 sugeriría la participación de este gen en otras rutas de señalización del sistema inmune. Por otro lado, es destacable el aumento de motivos de respuesta a IL-6 en promotores Mx de vertebrados superiores, lo que podría estar asociado a una mayor complejidad de las interacciones que coordinan la respuesta inmunitaria en estas especies (revisado en Akira y cols., 1990; y Naka y cols., 2002).

En otras especies, además de los elementos descritos en los promotores de las Mx de dorada, se han identificado también motivos de unión al factor Sp-1, AP-1, o NF- κ B (Zhang y cols., 1994; Gérardin y cols., 2004; Altman y cols., 2004; Plant y Thune, 2008; Alvarez-Torres y cols., 2013) (tabla 3). Esta diversidad estructural apunta de nuevo a que, en cada especie, los genes del sistema inmune se han ido modelando a lo largo de la evolución a través de las interacciones patógeno-hospedador que han ocurrido (Lee y Vidal, 2002).

Por último, la identificación de motivos reguladores ISRE, ISRE-LIKE, GAS y sitios de unión de IL-6 en las regiones intrónicas de los tres genes Mx de dorada (figura 31), sugiere la implicación de estas regiones en la regulación de

la expresión de sus correspondientes genes. El número de genes cuyos intrones tienen un papel importante en la regulación de su expresión aumenta sin cesar desde hace tiempo (Barret y cols., 2012). Este tipo de información es escasa en genes del sistema inmune, aunque algunos autores han llegado a identificar elementos ISRE e ISRE-like en regiones intrónicas (Ronni y cols., 1998; Damore y cols., 1996; Gérardin y cols., 2003; Assiri y Ott, 2006; Plant y Thune, 2008; Jia y Zhou, 2010), llegando incluso a demostrarse en algún caso su papel regulador (Damore, 1996). Resulta por tanto tentador suponer que las regiones intrónicas de los genes Mx1, Mx2 y Mx3 puedan participar de alguna manera en la regulación de su expresión. De hecho, el papel de este tipo de regiones en la regulación de la expresión génica, es uno de los aspectos más interesantes a estudiar, ya que pueden revelarnos mecanismos sorprendentes de control e interacción en la compleja red de genes del sistema inmune.

Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a poli I:C

Con el fin de estudiar la actividad de pMx1, pMx2 y pMx3, cada una de las secuencias se subclonó en un vector de luciferasa. Posteriormente, células RTG-2 se transfectaron con estos plásmidos y se trataron con poli I:C, como potente inductor de IFN tipo I (Biron y Sen, 2001). La respuesta de los tres promotores fue positiva a la inducción, habiéndose revelado en todos ellos un patrón de inducción dependiente de la dosis de poli I:C, con perfil similar, aunque con niveles de expresión diferentes, tanto en células sin tratar (expresión basal) como en células inducidas con poli I:C (figura 38). En concreto, en pMx2 se observó el nivel de inducción más alto ($RRR = 27$), y en pMx1 el más bajo ($RRR < 0.5$). A pesar de estas diferencias, los valores de inducibilidad no fueron dispares (5.75, 8.41, 3.35 para pMx1, pMx2 y pMx3, respectivamente). Este parámetro, que representa el cociente entre la respuesta de cada muestra y la de células transfectadas con el mismo vector pero no tratadas con poli I:C, resulta el más informativo, debido a que refleja la respuesta de los promotores a los estímulos empleados experimentalmente.

Por este motivo lo utilizamos para comparar la respuesta de los tres promotores en los experimentos subsiguientes.

En cuanto a la cinética de inducción por poli I:C (figura 39), pMx1 y pMx2 ya mostraron una respuesta significativa a las 6 horas de la estimulación, mientras que la respuesta de pMx3 no fue significativa hasta las 24 h. Los valores máximos de inducibilidad se obtuvieron a las 24 h de la inducción para los tres promotores y decrecieron a partir de las 48 h, de forma más acusada en el caso de pMx2. Este perfil resulta similar al obtenido al analizar otros promotores de Mx de peces (Collet y Secombes, 2001; Yap y cols., 2003; Altmann y cols., 2004; Chen y cols., 2006; Ooi y cols., 2005; Plant y Thune, 2008; Alvarez-Torres y cols., 2013). Aunque puede resultar tentador comparar nuestro resultados con los obtenidos en distintos experimentos de inducción de promotores Mx de peces con poli I:C, esto ha de hacerse con cierta cautela, ya que la capacidad de respuesta de un promotor depende de múltiples factores, entre los que figuran el vector utilizado, el gen indicador y la línea celular donde se realicen los ensayos (Tafalla y cols., 2007; Alvarez-Torres y cols., 2013). A pesar de ello, puede decirse que entre los distintos promotores analizados hasta ahora, sólo se detectan algunas variaciones, bien en la intensidad de la respuesta (de 1 o 2 órdenes de magnitud), o en la cinética de activación de dichos promotores (respuestas significativas entre 6 y 24 h tras la inducción). En el caso de los promotores Mx de dorada resulta probable que la variabilidad en la respuesta esté relacionada con los motivos presentes en cada promotor. Así por ejemplo, pMx2 presenta una respuesta superior y un mayor número de elementos reguladores: De hecho, los resultados obtenidos concuerdan con los niveles de transcripción de los genes Mx1, Mx2 y Mx3 tras una infección experimental con VNNV (Fernández-Trujillo y cols., 2011), donde, paralelamente a los resultados del presente trabajo, la inducción mayor y más temprana correspondió a Mx2 tanto en cerebro como en riñón cefálico. Por tanto, ambos experimentos apuntan a que Mx2 es la isoforma predominante en la respuesta temprana de dorada a la infección viral. Por otro lado, el rápido descenso de la respuesta de pMx2 podría estar asociado a mecanismos de represión activados tras rebasar Mx2 un cierto nivel de transcripción, tal como

se ha sugerido para el promotor de la Mx1 de trucha (Collet y cols., 2007). Entre los genes que podrían estar implicados en este proceso de regulación negativa destaca el factor de transcripción IRF-2, que ejerce de forma similar un efecto negativo sobre varios ISGs de mamíferos (Hida y cols., 2000; Choi y cols., 2001).

Para determinar el papel del elemento ISRE común a pMx1, pMx2 y pMx3, se construyeron varios vectores que contenían versiones truncadas de los promotores (figura 33). La delección de la región 3' incluyendo el elemento ISRE, hizo que los promotores pMx1 y pMx3 no respondieran a la inducción con poli I:C (vectores pMx1noISRE y pMx3noISRE). En cambio, en el caso de pMx2 (vector pMx2noISRE), la respuesta, aunque se redujo en un 55.52 %, sí fue significativa. Estos resultados indican que el motivo ISRE es imprescindible para la actividad de pMx1 y pMx3, pero no para la de pMx2, en la que el ISRE contribuye a la respuesta máxima, mostrando, aparentemente, un efecto aditivo. Es frecuente encontrar entre los promotores Mx que su respuesta es dependiente de su o sus elementos ISRE, ya que en los casos en que hay dos ISRE cercanos ambos parecen ser necesarios para alcanzar la respuesta máxima del promotor en cuestión (Ronni y cols., 1998; Yap y cols., 2003; Altmann y cols., 2004; Ooi y cols., 2005; Assiri y Ott., 2007; Álvarez-Torres y cols., 2013). De hecho y dada la proximidad de los dos elementos ISRE en la mayoría de los casos, se ha sugerido que un único complejo de factores de transcripción se une a los dos ISRE a la vez, o planteado de otra manera, ambos ISRE cooperarían con los factores de transcripción a los que se unen (Altmann y cols., 2004). La respuesta independiente del ISRE mostrada por pMx2, indica que otros elementos reguladores presentes en esta versión truncada del promotor (pMx2noISRE), tales como los 4 motivos GAS, el elemento de respuesta a IL-6 y la caja TATA, deben ser los responsables de la respuesta parcial observada. Un análisis funcional exhaustivo de la respuesta observada nos permitirá dilucidarlos.

Cuando las células RTG-2 se transfectaron con el vector pISRE, que contiene la región 3' común para los tres promotores incluyendo el motivo ISRE, la

respuesta a poli I:C fue significativa, aunque bastante menor que en el caso de los promotores completos (inducibilidad = 1.96 pISRE, figura 40). Por tanto, la región 3' común es capaz de generar una respuesta por sí sola, que no es sin embargo suficiente para alcanzar el nivel de inducción mostrado por los promotores completos. Esto quiere decir, que la máxima respuesta de los tres promotores es dependiente del resto de elementos reguladores que se encuentran fuera de su región 3'.

Por último, para investigar si el motivo ISRE-like1 contribuye a la respuesta de pMx2, se utilizó el vector pISRE2, que incluye el motivo ISRE común y el ISRE-like1. Los resultados obtenidos no son significativamente diferentes de los obtenidos con el vector pISRE, lo cual sugiere que el motivo ISRE-like1 no es funcionalmente significativo. Este resultado coincide con la falta de actividad mostrada por el motivo ISRE-like del promotor de la MxA humana (Ronni y cols., 1998), el cual también tiene tres nucleótidos en lugar de dos entre las dos secuencias GAAA que lo componen. De hecho, la presencia de más de dos nucleótidos en esa posición parece que afecta negativamente a la especificidad de unión a los motivos ISRE (Lin y cols., 2000; revisado en Tamura y cols., 2011).

En cuanto al papel del motivo ISRE-like2 de pMx2, no ha podido analizarse en este estudio debido a las dificultades técnicas para obtener el vector apropiado, por lo tanto no podemos excluir que este motivo sea funcional. De hecho, en el promotor de la Mx1 de ratón un motivo ISRE-like similar al ISRE-like2 de pMx2, es decir, con una mutación puntual en una de las secuencias GAAA, ha demostrado contribuir a la respuesta de este promotor (Asano y cols., 2003). Asimismo, varios motivos ISRE-like de mamíferos responden a factores reguladores de interferon o IRFs (revisado en Tamura y cols., 2008), por lo que es posible que los motivos ISRE-like de peces sean también la diana de los IRFs. De hecho, esta es una hipótesis atractiva a la hora de asignar una función a los numerosos elementos ISRE-like encontrados en los promotores (y algunos intrones) de los ISGs. En concreto, el factor IRF-8 de mamíferos es capaz de unirse tanto a elementos ISRE como a elementos ISRE-like y

dependiendo del sitio de unión y de su interacción con otros factores actúa como activador o inhibidor (revisado en Tamura y cols., 2008). IRF-8 induce la producción de IFN I en células presentadoras de antígenos y colabora en la inducción de genes inducidos por IFN II (Tamura y cols., 2005; Taylor y cols., 2007; Huang y cols., 2007). Si bien este tipo de actividad no se ha descrito en peces, hemos identificado los motivos de unión a IRF-8 presentes en los promotores Mx de dorada. En el Anexo II (figura 46) se presentan los motivos identificados en pMx1, pMx2 y pMx3; en el Anexo III (figura 47) un esquema de los motivos identificados en los promotores Mx de varias especies, y en el Anexo IV (tabla 9) una tabla con el número de motivos de este tipo encontrados en promotores Mx de peces y de varias especies de vertebrados superiores. Estos motivos podrían funcionar como sitios de unión a IRF-8 y sus cofactores de la siguiente forma:

- IRF-8 reprime la transcripción uniéndose a la secuencia PRDI, 5'TCACTT3' (Zhu y cols., 2004). En pMx2, hay uno de estos motivos en la posición -92 a -98; y en pMx3, hay dos, (sitios -3 a -9 y -655 a -661). Este motivo se ha localizado también en otros promotores Mx de peces, como lenguado, platija japonesa, trucha arcoíris, pez cebra, y en cuatro de los cinco promotores Mx descritos en pez gato, por lo que es razonable pensar que pueden ser elementos funcionales también en estas especies.
- IRF-8 unido a IRF-1, IRF-2, IRF-4 y al represor TEL, se une al motivo ISRE inhibiendo la transcripción. En cambio, si se une al factor de transcripción PU.1 activa la transcripción de los genes uniéndose a los motivos Ets-IRF, que son tres: EICE (*Ets-IRF composite element*) (GGAANNGAAA), IECS (*Ets composite sequence*) (GAAANN(N)GGAA), y EIRE (*Ets/IRF response element*) (GGAAANNGAAA), los cuales son motivos ISRE o ISRE-like (Tamura y cols., 2008). El motivo ISRE-like2 de pMx2, cuya secuencia es 5'GGAATGGAAA3', es un motivo EICE, y en otros promotores Mx de peces también se han encontrado varios de estos motivos, por lo que podrían ser elementos funcionales capaces de responder a IRF-8. En el caso de pMx2, al estar tan cerca los motivos

ISRE, ISRE-like1 e ISRE-like2 es tentador pensar en un efecto cooperativo que sería muy interesante investigar.

Respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3 a la infección con IPNV y VHSV

La caracterización de pMx1, pMx2 y pMx3 continuó con la evaluación de su respuesta a la infección por los virus IPNV y VHSV. La elección de estos dos virus se basa en su capacidad de multiplicación en células RTG-2 y en el comportamiento de la dorada como especie portadora asintomática de ambos virus (Pérez-Prieto y cols., 2001; Esteban y cols., 2008), por lo que resulta atractivo caracterizar su respuesta antiviral frente a estos dos virus que, a diferencia que en dorada, sí son patógenos de otras especies que se cultivan (revisado en Gomez-Casado y cols., 2011; revisado en Skall y cols., 2005).

Para ello, células RTG-2 transfectadas con las construcciones que portaban los promotores completos, se infectaron con los virus y se midió la actividad luciferasa 24, 48 y 72h tras la infección. Los resultados indican que los dos virus inducen significativamente los promotores de los genes Mx de dorada, aunque mostraron diferencias tanto en los niveles de inducción obtenidos, como en la respuesta específica de cada uno de los promotores, así como en la respuesta de los promotores a las dosis de virus aplicadas.

En relación a la magnitud de la respuesta de los promotores, en general, la respuesta a IPNV fue menor que la obtenida con poli I:C, en cambio, el nivel de inducción alcanzó niveles similares con VHSV y con poli I:C. Respecto a la cinética de inducción, tanto para IPNV como para VHSV, los niveles más altos se alcanzaron a las 48 o a las 72h, siendo por tanto más tardía que cuando las células se estimularon con poli I:C. Un efecto similar se ha descrito en ensayos *in vivo* en diversas especies de peces, donde con frecuencia, se alcanzan niveles mayores y más tempranos de transcripción de genes Mx en peces inyectados con poli I:C, que en peces inoculados con distintos virus, entre los que figuran IPNV y VHSV (O'Farrel y cols., 2002; Purcell y cols., 2004; Plant y cols., 2005; Lockart y cols., 2007; Tafalla y cols., 2007; Fernández-Trujillo y cols., 2008; Matsuyama y cols., 2011; Avunje y cols., 2011). Esta observación

se ha interpretado como que la respuesta a los virus requiere más tiempo que la estimulación directa con poli I:C que, como análogo de RNA de cadena doble, estimula receptores que están más adelante en la ruta del IFN I que los virus (Biron y Sen, 2001).

En cuanto al comportamiento de los tres promotores, los perfiles de respuesta que presenta cada promotor (figuras 41 y 42) son parecidos frente a los dos virus, aunque cada uno de ellos muestra sus propias peculiaridades. Así, la respuesta de pMx1 a VHSV es mayor que a IPNV, mientras que pMx3, responde levemente y de forma similar a ambos virus (inducibilidad 1.41 y 1.82 respectivamente). Por otro lado, pMx2 destaca una vez más por su respuesta más acentuada que pMx1 y pMx3 frente a los dos virus, al tiempo que llama la atención su falta de respuesta a la concentración más baja (0.01 MOI) de VHSV.

Respecto a la respuesta a las dos dosis de virus utilizadas, en el caso de IPNV, la infección con la más pequeña (0.01 MOI), dió lugar a una respuesta superior de los promotores. En cambio, al infectar las células con VHSV, la respuesta fue mayor con la dosis más elevada de virus (0.1 MOI). Parecería lógico pensar que una mayor concentración de partículas virales, debería inducir un nivel de interferón mayor y esto a su vez, una inducción más acusada de los ISGs (revisado en Robertsen, 2006). En cambio, los resultados obtenidos con IPNV indican lo contrario, a mayor cantidad de virus, menor respuesta de las Mx dorada. En este sentido, varios autores han descrito una respuesta a IPNV retardada o atenuada en comparación con la respuesta a poli I:C (Collet y cols., 2007; Skjesol y cols., 2009). E incluso se ha demostrado que IPNV interfiere la cascada de señalización que desencadena el IFN, siendo la transcripción de Mx una de las dianas de esta actividad antagonista de la respuesta a IFN mostrada por IPNV (Collet y cols., 2007; Skjesol y cols., 2009). Nuestros resultados con IPNV concuerdan con esta teoría, por la que cuando las células se infectan con las dosis víricas más altas, la interferencia sería más eficiente, y por tanto la replicación viral muy rápida, tanto que podría interferir con la producción de proteínas de la propia célula, incluidas las de respuesta antiviral,

lo que a su vez conllevaría un retraso en la respuesta antivírica (Collet y cols., 2007; Skjesol y cols., 2009), tal y como ha ocurrido en nuestro caso, donde en dichas condiciones sólo ha aparecido una respuesta tardía (72 h) y de baja intensidad (máxima inducibilidad 3.24).

Para probar esta hipótesis, es decir, un posible efecto antagonista de IPNV sobre la respuesta de pMx1, pMx2 y pMx3, realizamos un ensayo de protección celular, en el que las células se estimularon primero con poli I:C, y a continuación se inocularon con cada uno de los dos virus. El análisis posterior de la actividad luciferasa de cada muestra nos permitiría evaluar este efecto.

Para ello, en primer lugar se obtuvieron células RTG-2 que poseían de forma estable las construcciones con los promotores completos. Estas tres poblaciones celulares, junto con los correspondientes controles, (células transfectadas con el vector vacío, pGL4.22, y con el vector de expresión constitutiva, pCMVLuc), han demostrado ser de gran utilidad en este tipo de ensayos.

En el caso de IPNV, se detectó un claro efecto antagonista del virus sobre la actividad de pMx2, ya que, en todos los casos, la presencia del virus hace disminuir de forma significativa la estimulación de este promotor causada por poli I:C. El efecto antagonista aumenta cuando primero se inocula el virus y después se estimula con poli I:C, habiéndose observado, en este caso, una reducción en la respuesta del 78.53 % respecto al control correspondiente de poli I:C. Este resultado parece lógico, ya que si primero se estimulan las células con poli I:C y luego se infectan, o si poli I:C y el virus alcanzan simultáneamente las células, el promotor se activa y el frenado en la actividad transcripcional provocado por el virus, tiene un efecto menor. Como se ha mencionado anteriormente, estudios anteriores habían demostrado la capacidad del IPNV de interferir con la cascada de señalización de IFN, siendo la transcripción de Mx una de las dianas de actuación de este virus (Collet y cols., 2007; Skjesol y cols., 2009). Nuestros resultados apoyan estas observaciones previas y añaden pMx2 a la lista de promotores Mx que son

sensibles al efecto de IPNV. Al igual que en los estudios previos, la interferencia que ejerce IPNV no consigue anular por completo la respuesta a IFN, sino que se detecta una estimulación de pMx2 atenuada y retardada. En cambio, en células TO y CHSE, IPNV no estimula la transcripción de Mx (Jensen and Robertsen, 2002; Collet y cols., 2007; Fernández-Trujillo y cols., 2008, 2011b; Alvarez-Torres y cols., 2013), es más, si estas células se estimulan con poli I:C o con IFN directamente, una infección posterior con IPNV es capaz de inhibir por completo la estimulación previa. Por el contrario, IPNV no inhibe la ruta del IFN en macrófagos de salmón (Collet y cols., 2007), por tanto, el efecto antagonista de IPNV depende del promotor en cuestión y del tipo celular que se infecte, lo cual apunta una vez más a un control de la expresión de los genes Mx muy complejo y en el que intervienen varias rutas de señalización (Collet, 2013a).

En cambio para pMx1 y pMx3, la presencia de IPNV no tiene efecto sobre la estimulación que causa el poli I:C. Por lo que podríamos identificar un nuevo aspecto en el que los tres promotores difieren funcionalmente, lo cual anima a buscar los elementos responsables de este comportamiento diferencial. No obstante, es necesario destacar que la magnitud de la respuesta en estos dos promotores es muy pequeña, mientras que las células transfectadas con pMx2 presentan una inducibilidad muy alta (> 25). De hecho, los valores de RRR obtenidos en células sin tratar, es decir los niveles basales de expresión de luciferasa, muestran diferencias importantes entre las tres poblaciones celulares (Anexo V, figura 48), llegando a alcanzar valores de RRR de 6.95 y 5.18 para pMx1 y pMx3 respectivamente, mientras que las células con pMx2 mostraron un nivel basal mucho menor (RRR = 1.4). La variación en los niveles basales de luciferasa puede ser debida a los llamados *efectos de posición*, consecuencia a su vez de la región y/o la forma en que se haya integrado el plásmido en el genoma de las células receptoras (revisado en Hackett y Álvarez, 2000). Por otro lado, y dado que las poblaciones transfectadas con los tres tipos de plásmidos son igualmente heteróneas, no parece probable que el fenómeno de *efectos de posición* afecte de manera diferencial a las poblaciones con pMx2. Por lo tanto, la observación de una menor

supervivencia de las células transfectadas con pMx2, respecto a las transfectadas con pMx1 y pMx3, añadido a que las células que sobreviven presentan en todos los casos niveles basales bajos, sugiere que las células con niveles basales mayores no sobreviven a la selección. La intolerancia a que pMx2 esté activo podría deberse a que su actividad interfiere de algún modo con las funciones vitales de las células, es decir, Mx2 podría estar implicada en otros aspectos de la biología celular, aparte de la actividad antiviral. Por otro lado, la elevada actividad basal de pMx1 y pMx3 en las respectivas poblaciones estables, podrían estar enmascarando la inducción causada por IPNV. Para descartar esa posibilidad habría que establecer poblaciones con niveles basales menores y comparar los resultados.

Volviendo a la actividad antagonista de IPNV, las proteínas responsables parecen ser VP4 y VP5 (Skjesol y cols., 2009), si bien no se conoce en profundidad el mecanismo por el que ejercen este efecto. Una vez que se desvelen las interacciones moleculares que tienen lugar, conoceremos cómo influyen los distintos elementos que participan en el fenómeno antagonista, como el tipo celular, el serotipo del virus, su virulencia, o el promotor Mx en cuestión (Collet y cols., 2007; Lester y cols., 2012; Collet y cols., 2013b).

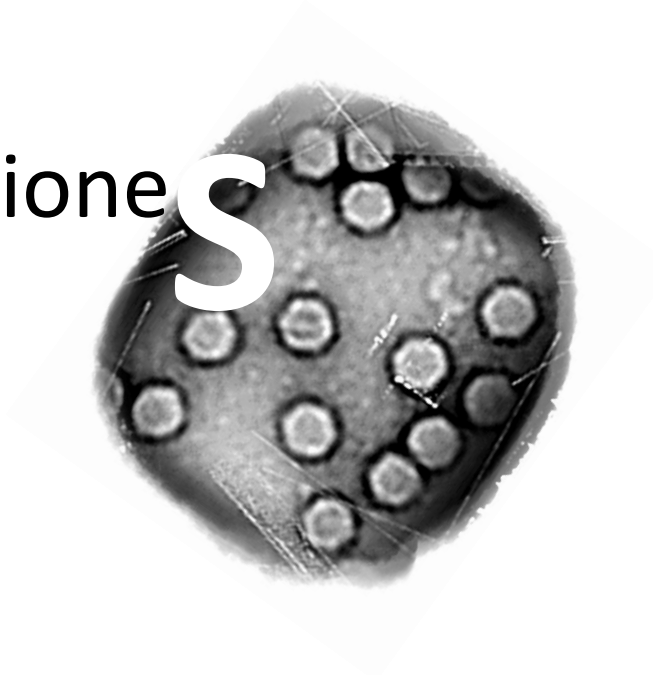
En el caso de VHSV, no se detectan cambios significativos en la inducción causada por poli I:C debidos a la presencia del virus. Por tanto, este virus no parece tener efecto antagonista sobre ninguno de los promotores Mx de dorada; aunque, como en el caso anterior, no podemos descartar que la elevada expresión basal de pMx1 y pMx3 (Anexo VI, figura 49), esté afectando de alguna forma a los resultados del experimento, ni que este efecto no ocurra en otras condiciones. De hecho, en un artículo reciente se ha descrito que la proteína NV de VHSV parece tener un importante papel en la supresión de la respuesta a IFN I en células EPC y en platija japonesa (Kim y Kim, 2012). Esta proteína parece también inhibir la activación de NF- κ B mediada por TNF- α (Kim y Kim, 2013). Tanto IFN I como NF- κ B desempeñan papeles fundamentales en la respuesta inmune temprana contra varios tipos de patógenos, es más, la respuesta de NF- κ B está estrechamente relacionada con

la respuesta mediada por IFN I (Hug y cols., 1988; Gérardin y cols., 2004). De nuevo, sólo el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de estas observaciones nos permitirá comprender las complejas interacciones que tienen lugar tras la infección con VHSV.

Como consideración final, diremos que el resultado final de un proceso infectivo, refleja la habilidad del virus para redirigir el “mapa de ruta” de las células, a fin de lograr replicarse con éxito y a la vez contrarrestar la respuesta antiviral del hospedador, el cual, a través de la experiencia adquirida tras numerosos “enfrentamientos”, va mejorando sus estrategias de defensa a las infecciones. En el caso de la dorada, es altamente probable que la diversidad funcional detectada en los promotores de sus tres genes Mx, juegue un papel fundamental en la exitosa estrategia antiviral desarrollada por esta especie.



C Conclusiones S



CONCLUSIONES

1. Los promotores de los genes Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada poseen una estructura similar a la de promotores Mx de otros vertebrados; presentando un motivo común ISRE y otros elementos reguladores que aparecen en número variable (ISRE-like, GAAA, GAS y uno de respuesta a IL-6).
2. Los tres promotores comparten una región de 157 pb en el extremo 3', la cual alberga la región 5' UTR y el motivo ISRE. Esta región tan conservada debe por tanto poseer un papel relevante en la regulación de los tres genes.
3. Los elementos ISRE-like, identificados en pMx2, se corresponden con motivos de respuesta a IRF-8, por lo que IRF-8 podría participar en la regulación de la expresión de Mx2.
4. La presencia de motivos reguladores en los intrones de los genes Mx1, Mx2 y Mx3, sugieren su implicación en la regulación de la expresión de estos genes.
5. Los tres promotores están implicados en la respuesta a interferón tipo I, siendo pMx2 el más destacado, lo que reafirma a Mx2 como la isoforma predominante en la defensa antiviral de la dorada.
6. El elemento ISRE es esencial para la activación de pMx1 y de pMx3; en cambio, la respuesta de pMx2 es independiente de este elemento.
7. El resto de motivos reguladores presentes en pMx1, pMx2 y pMx3 contribuyen de forma aditiva para alcanzar la máxima respuesta de sus respectivos promotores.
8. Los virus IPNV y VHSV inducen respuesta en los tres promotores Mx de dorada, si bien comportándose de forma diferente en cuanto a niveles y cinética de inducción.

9. IPNV ejerce un efecto antagonista sobre pMx2, bloqueando la activación de este promotor por efecto de poli I:C.

10. Poblaciones de células RTG-2, transformadas de forma estable, respectivamente con las construcciones pMx1, pMx2 y pMx3, son un producto de esta tesis. Representan herramientas muy valiosas para futuros estudios sobre regulación de la expresión génica de los genes Mx1, Mx2 y Mx3.



A nexos

SIGLA	Motivo y secuencia diana	Localización	Función
ISRE	Interferon Stimulated Response Element 5'-(T/A/G)(C/G)TTTCN(1-2)TTTC(C/T/A)-3'	Promotores de genes estimulados por IFN-I	Activar la transcripción de genes inducidos por IFN-I
ISRE-Like	Interferon Stimulated Response Element con alguna mutación	Promotores de genes estimulados por IFN-I y algunos intrones	Activar la transcripción de genes inducidos por IFN-I
GAS	Gamma Activated Site 5'-TTNCNNNA-3'	Promotores de genes estimulados por IFN-II y algunos intrones	Activar o inducir la transcripción de genes inducidos por IFN-II
TATA-box	Goldberg-Hogness box 5'-TATAAA-3'	Promotores de genes de arqueas y eucariotas (en el 24% de los genes humanos)	Implicada en el proceso de transcripción
IL-6	Interleucina 6 binding site 5'-CTGGGA-3'	Segregada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos	Actividad antiinflamatoria y proinflamatoria
			Interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa a los linfocitos T citotóxicos, células plasmáticas, modula la hematopoyesis
SP1 site	Specificity Protein 1 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' (GC box element).	En células humanas y algunos promotores de Mx de peces	Implicado en la expresión génica que tiene lugar durante el desarrollo temprano de un organismo
			Regula la inmunidad innata celular mediante la inducción por lipopolisacáridos
AP-1 site	Activator Protein-1 5'-TGAG/CTCA-3'	Nuclear En todas las células	Regula la expresión génica de genes relacionados con la respuesta a diversos estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento, estrés e infecciones virales o bacterianas.
			Controla, procesos celulares de diferenciación, proliferación y apoptosis
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 5'GGGRNNYCC-3'	Se encuentra en la mayoría de tipos de células animales	Implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, las citoquinas, radiación ultravioleta, LDL oxidadas y antígenos bacterianos o virales
			Regulación de la respuesta inmune debida a la infección
			Implicado en proceso de sináptica y de memoria

Tabla 8. Información sobre los elementos más característicos de los promotores de Mx.

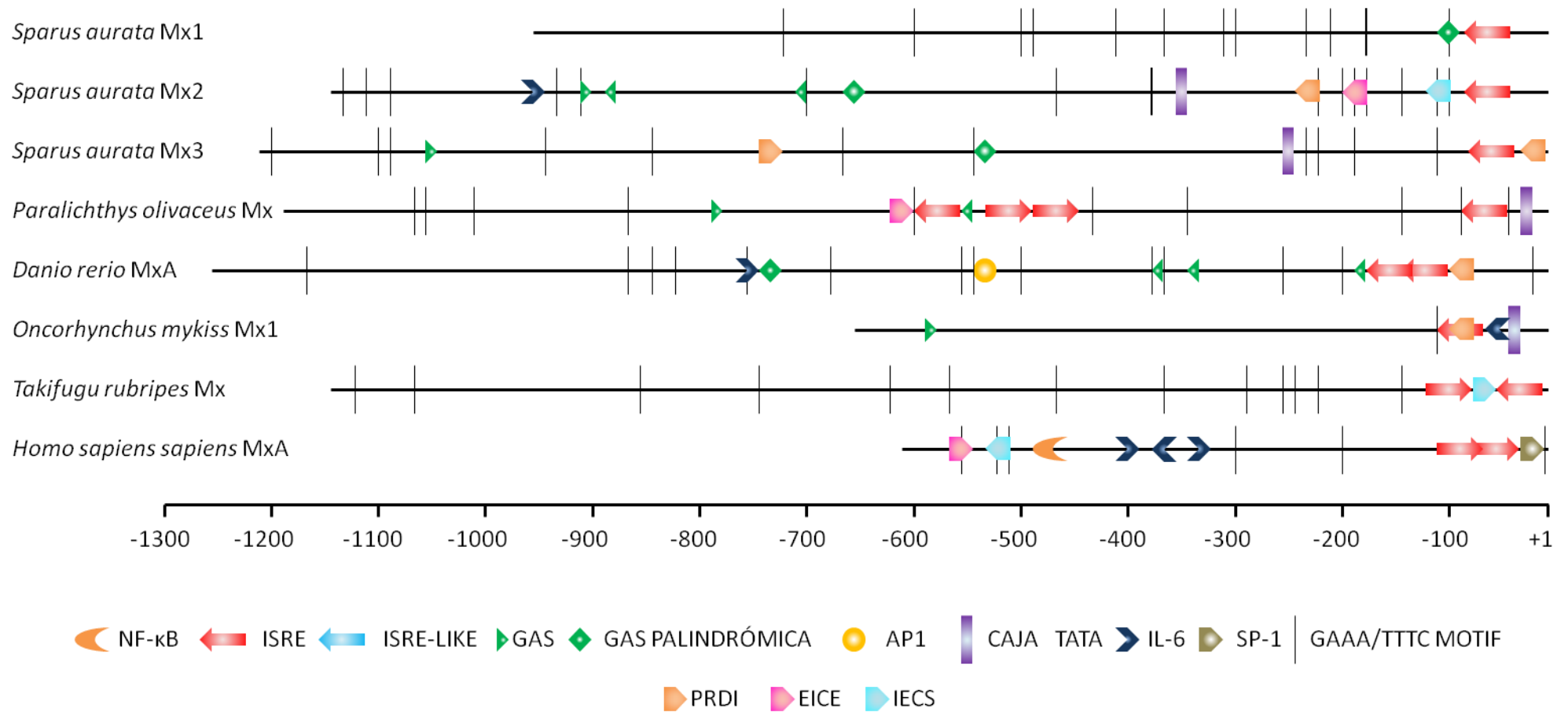


Figura 47. Estructura de los promotores Mx1, Mx2 y Mx3 de de dorada, y de otros promotores de Mx caracterizados correspondiente a la figura 28 en la cual se han incluido nuevas dianas de para IRF-8. IRF-8 actúa como represor o inductor dependiendo de su interacción con otros factores y de la unión de estos complejos a las dianas IECS y EICE. Varias ISRE-LIKE descritas anteriormente han sido sustituidas por su correspondiente diana a IRF-8.

	ESPECIE		ISRE	EIRE	EICE	IECS	PRDI	REFERENCIA
VERTEBRADOS SUPERIORES	Gallo		1			1		Schumacher y cols., 1994
	Ratón	Mx1	1					Hug y cols, 1988
		Mx2	1				1	Asano y cols., 2003
	Vaca Mx1 (a)		1					Gérardin y cols., 2003
	Vaca Mx1 (b)		4					Yamada y cols., 2009
	Ovine Mx1		2				1	Assri y Ott, 2006
	Humanos MxA		2		1	1		Ronni y cols., 1998
PECES	Trucha arcoíris Mx1		1	1			1	Collet y Secombes, 2001
	Fugu		2			1		Yap y cols., 2003
	Pez cebra MxA		2				1	Altmann y cols., 2004
	Platija japonesa		4					Ooi y cols., 2006
	Pez gato	Mx1	1					Plant y Thune, 2007 Plant y Thune, 2008
		Mx2						
		Mx3						
		Mx4						
		Mx5						
	Lenguado senegales		3				1	Alvarez-Torres y cols.,2013
Dorada	Mx1	1					González-Mariscal y cols., 2014	
	Mx2	1		1	1	1		
	Mx3	1				2		

Tabla 9. Información sobre las ISRE y los nuevos sitios diana encontrados: EICE, IECS, EIRE y PRDI en los promotores de Mx de peces y de vertebrados superiores caracterizados hasta el momento. Se incluyen los encontrados en dorada (*Sparus aurata*), en este trabajo. Las secuencias de Mx1 vaca (a) y (b) han sido interpretadas de manera distinta por ambos autores (Gérardin y cols., 2003; Yamada y cols., 2009). La secuencia propuesta por Gérardin y cols., no está disponible, lo cual ha impedido comprobar si contiene alguno de los nuevos motivos propuestos.

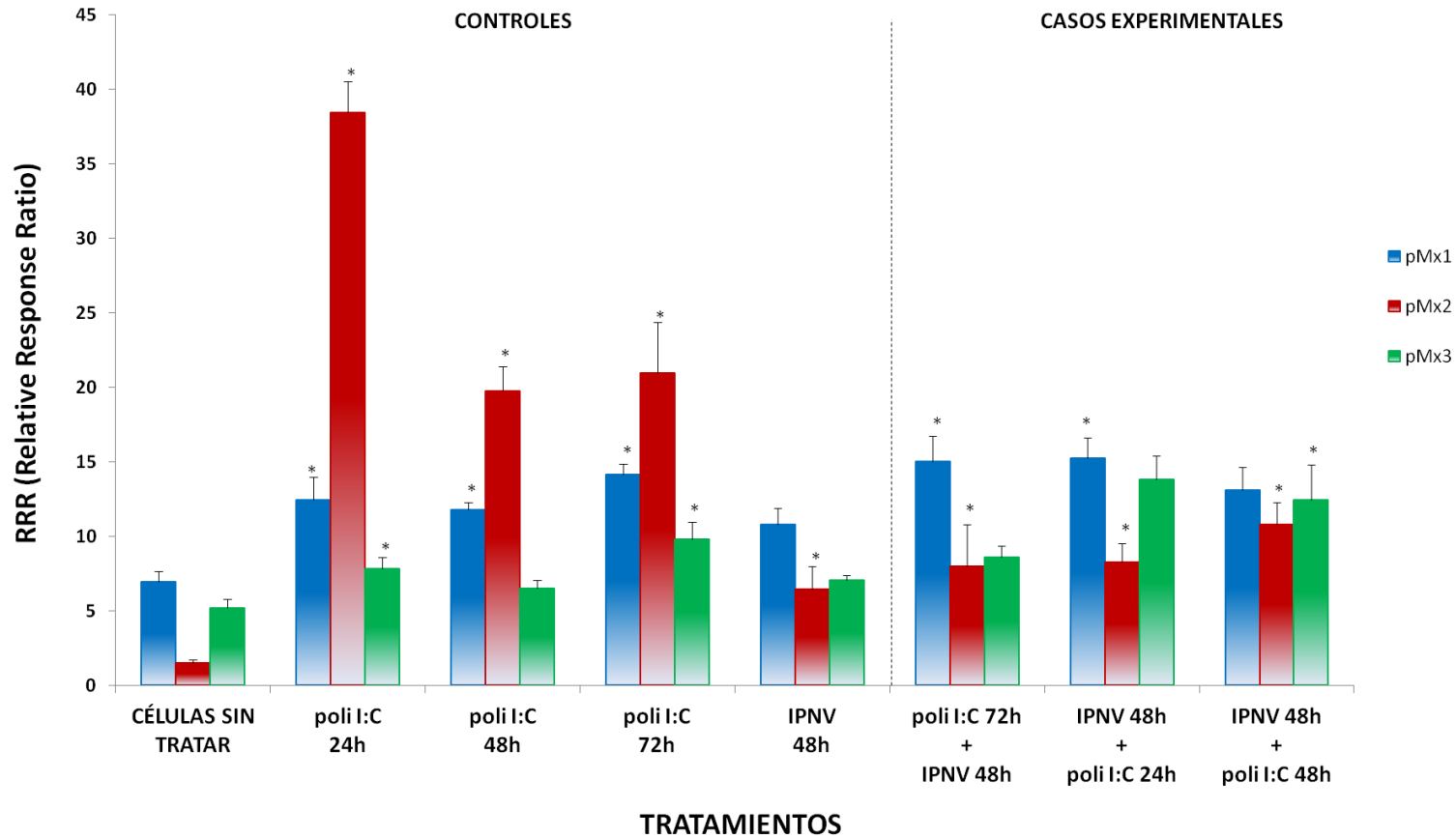


Figura 48. Respuesta de cada promotor de Mx de dorada a la inducción con poli I:C (10µg/ml) y a la infección con IPNV a 0.01 MOI. Los datos se muestran en valores de RRR (Relative Response Ratio). Como controles de referencia se usaron células sin tratar, células inducidas sólo con poli I:C (10µg/ml) durante 24, 48 y 72h, y células sólo infectadas con IPNV a 0.01 MOI. Cada barra representa la media + el error estándar (SE) para n=8 en los tratamientos y el control con IPNV, y n=4 para los controles de poli I:C y células sin tratar. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a células sin tratar.

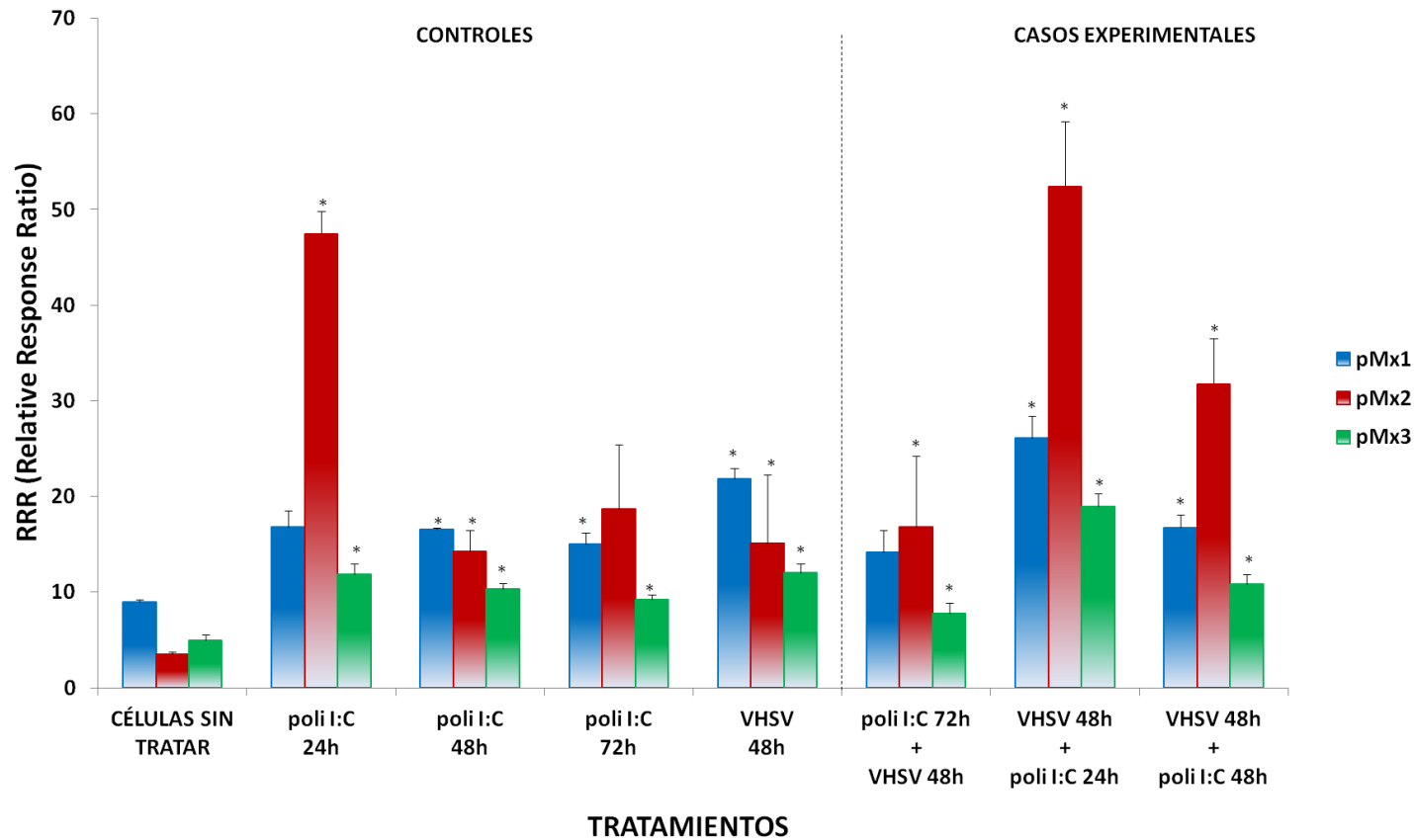


Figura 49. Respuesta de cada promotor de Mx de dorada a la inducción con poli I:C (10µg/ml) y a la infección con VHSV a 0.1 MOI. Los datos se muestran en valores de RRR (Relative Response Ratio). Como controles de referencia se usaron células sin tratar, células inducidas sólo con poli I:C (10µg/ml) durante 24, 48 y 72h, y células sólo infectadas con VHSV a 0.1 MOI. Cada barra representa la media + el error estándar (SE) para n=8 en los tratamientos y el control con IPNV, y n=4 para los controles de poli I:C y células sin tratar. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a células sin tratar.

Cloning and characterization of the Mx1, Mx2 and Mx3 promoters from gilthead seabream (*Sparus aurata*).

González-Mariscal, J.A., Gallardo-Gálvez, J.B., Méndez, T., Álvarez M.C. and Béjar J.*

Department of Genetics, University of Málaga, Spain.

KEYWORDS

Mx protein,
ISRE,
promoter,
IFN I,
gilthead seabream,
Sparus aurata.

ABSTRACT

Mx proteins are main effectors of the antiviral innate immune response mediated by type I interferon (IFN I). Actually, diverse Mx proteins from fish proved highly active against fish viruses, standing out among them the Mx1, Mx2 and Mx3 from gilthead seabream (*Sparus aurata*), a species exhibiting a natural resistance to viral diseases. In this study, the structure and functional activity of their corresponding promoters (pMx1, pMx2 and pMx3) have been assessed. The three promoters present an identical 3' region of 157 bp, exhibiting a single canonical interferon-stimulated response element (ISRE), which is indispensable for the poli:IC induction of pMx1 and pMx3, while not for that of pMx2. In the remaining part of the three promoters other regulatory motifs were identified, as gamma IFN activated sites in variable number (1, 4 and 2 in pMx1, pMx2 and pMx3, respectively), as well as several independent GAAA elements or ISRE core sequences (13, 15 and 12 in pMx1, pMx2 and pMx3, respectively). The structural dissimilarities shown by the three promoters parallels with the differences observed in their response profiles, in terms of the time course of the induction, and basal and induced expression levels of each promoter. Altogether, these findings indicate that the expression of Mx1, Mx2 and Mx3 genes from the gilthead seabream might be specifically regulated, in accordance with the functional role of each Mx protein in the successful antiviral response shown by this species.

1. INTRODUCCION

The vertebrate innate immunity has an effective antiviral response mediated by type I interferon (IFN I). Hence, one of the key issues in understanding virus-host relationship is the knowledge of the regulatory mechanisms governing IFN response. Fish appear to trigger IFN I in a similar way to that in mammals [1], where its activation is well characterized [2, 3, 4]. Briefly, in virus-infected cells, type I IFN response is initiated through recognition of viral products. Such recognition events trigger signalling pathways that activate the transcription of type I

IFNs. After binding of IFNs to their receptors in neighbouring cells, the JAK-STAT signalling pathway is activated, and the transcription factor complex ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) is formed. Finally, the ISGF3 complex specifically binds to the IFN-stimulated response elements (ISRE), located in the promoters of IFN-stimulated genes (ISGs). The expression of ISGs generates an antiviral state in cells. It is also known that the expression of ISGs genes is under a complex spatial and temporal regulation,

which seems to be responsible for the control of the antiviral response [5].

Among the ISGs, those of Mx proteins play a main role in the IFN I response [6]. Mx proteins belong to the dynamin superfamily of high molecular weight GTPases, which are involved in intracellular membrane remodelling and intracellular trafficking [7]. Though the basic mechanism of the antiviral activity of Mx proteins is not completely understood, it seems clear that it relies on a direct interaction between the Mx protein and a viral target that needs to be defined in each case [7]. The antiviral activity of Mx proteins against a wide range of viruses has been largely reported in several fish species [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]. For that reason, fish Mx proteins have been intensively studied, especially in aquacultured species, where knowing pathogen-host interactions might be essential to develop strategies aimed at enhancing fish natural resistance to viral infections [18].

At the moment, the regulatory mechanisms of the fish Mx expression are poorly understood, although few Mx promoters have been cloned and functionally characterized: pufferfish, *Takifugu rubripes* [19], zebrafish, *Danio rerio* [20], rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Mx1 [21], Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [22], orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [23], channel catfish, *Ictalurus punctatus* [24], and Senegalese sole, *Solea senegalensis*, [15].

understand the successful antiviral strategies developed by this species. As a first approach in disclosing the regulation of seabream Mx genes, in this study, the promoters of M1 Mx2 and Mx3 (pMx1, pMx2 and pMx3) have been cloned; their regulatory motifs have been

Otherwise, the interest for studying the regulation of Mx transcription in fish has been stressed by studies reporting: i) the use of Mx expression to test the effects of a knocked-out recombinant virus [25]; ii) the response of rainbow trout and Atlantic salmon Mx promoters to both type I and II IFNs [26, 27]; and iii) the apparent blocking of Mx activation by several viruses [26, 28, 29].

The study of Mx genes in the farmed fish gilthead seabream has special interest, since this species displays a unusually high natural resistance to viral diseases [30], and is an asymptomatic carrier and/or reservoir of several viruses pathogenic to other species, such as viral nervous necrosis virus, VNNV [31], infectious pancreatic necrosis virus, IPNV [32] and viral haemorrhagic septicaemia virus, VHSV [33]. Three independent Mx genes (Mx1, Mx2, and Mx3) have been identified in gilthead seabream [34]. The three Mx proteins possess antiviral activity with a wide antiviral spectrum that includes RNA and DNA viruses, and show interesting differences in their antiviral specificities [35, 14]. Additionally, the three Mx genes showed different patterns of induction, in terms of tissue, time course, and level of expression, after an experimental infection with VNNV, which indicates a differential modulation of each Mx gene transcription over the immune response to VNNV [34]. Therefore, assessing the regulatory mechanisms controlling the transcription of the three Mxs can give light to

identified; their responses to poly I:C analysed; and the role of the ISRE motif found screened.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Cloning of gilthead seabream *pMx1*, *pMx2* and *pMx3*

Genomic DNA was extracted from gilthead seabream fin clips using the saline precipitation method [36]. DNA was resuspended in double-distilled water and stored at 4°C. DNA concentration and purity were measured by spectrophotometry.

The Genome-Walker™ Universal Kit (Clontech) was used to clone the three promoters. Briefly, genomic DNA was independently digested with eight different blunt-end restriction enzymes (AfeI, EcoRV, HindIII, HpaI, NruI, PvuII, Scal, SmaI, and SwaI), purified by phenol-chloroform and ligated to the GenomeWalker adaptor. Two specific reverse primers were designed from intron 1 of each Mx gene, where first sequence differences were detected among them [34]. A first PCR was performed using Go-Taq DNA polymerase (Promega), adaptor primer AP1, and ExtMx1L, ExtMx2L, and ExtMx3L for *pMx1*, *pMx2*, and *pMx3*, respectively (Table 1). The cycling protocol was: 95° C for 2 min, 35 cycles of 95° C for 30 s, 56° C for 30 s, 72° C for 2.5 min, and a final step at 72° C for 5 min. A second round PCR was then carried out with the adapter primer AP2 and IntMx1L, IntMx2L and IntMx3L primers (Table 1), using 1 µL of the first round PCR mix. The cycling protocol was: 95° C for 2 min, 35 cycles of 95° C for 30 s, 64° C for 30 s, 72° C for 2.5 min, and a final step at 72°C for 5 min. PCR products were separated on a 0.6% agarose gel. Bands obtained were purified with the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Helathcare), and directly sequenced. Three new primers were designed from the obtained

sequences: PLMx1L, PLMx2L and PLMx3L, and used together with the AP2 primer for a third PCR. Cycling conditions were as in the second PCR round. PCR products were sequenced and analyzed using SeqmanII software. A consensus sequence of approximately 1 Kb was obtained from each Mx promoter (Figure 1S). To search for possible ISG motives in the corresponding promoters, all sequences were analysed by using EditSeq software (Lasergene DNASTar, version 7.0.0)

2.2 Construction of *pMx1*, *pMx2* and *pMx3* reporter plasmids

Complete promoter fragments were generated by PCR with specific primers designed from the consensus sequences, and containing a XhoI restriction site on the forward primers (XhoIMx1F, XhoIMx2F XhoIMx3F for *pMx1*, *pMx2* and *pMx3* respectively) and a BglII restriction site on the common reverse primer, AtgBglIIR, that was used to clone the three promoters (Table 1). PCRs were carried out with the Go-Taq DNA polymerase (Promega), and cycling conditions were: 95° C for 2 min, 35 cycles of 95° C for 30 s, 64° C (*pMx1*), 63° C (*pMx2*) or 61° C (*pMx3*) for 30 s, 72° C for 1.5 min, and a final step at 72° C for 5 min. Amplification products were purified as described above, and digested with XhoI and BglII. Then, these fragments were purified and ligated to pGL4.22 (luc2CP/Puro, Promega), previously digested with XhoI and BglII. The vectors containing the complete promoters were named *pMx1Luc*, *pMx2Luc* and *pMx3Luc*.

For the promoter deletion studies, five vectors were constructed (schemes appear in Figure 4): three of them including the corresponding 5' ends

up to the ISRE motif; one containing the common 3' end of the three promoters, including the ISRE motif; and finally, a fifth vector containing the 3' end of the pMx2 with the common ISRE motif and one of the two close ISRE-like motifs specific of pMx2. For amplifying the vectors containing the 5' regions, the three constructs with the complete promoters were used as templates and specific primers (XhoIMx1F/BglIIMx1R, XhoIMx2F/BglIIMx2R, and XhoIMx3F/BglIIMx3R, Table 1 and Figure 1S) were designed to obtain the desired fragments. PCR conditions were: 95° C for 2 min, 35 cycles of 95° C for 30s, 64° C (pMx1), 60° C (pMx2) or 61° C (pMx3) for 30 s, 72° C for 1 min, and a final step at 72°C for 5 min. Constructs were named pMx1noISRE (-111 to -821), pMx2noISRE (-171 to -1001) and pMx3noISRE (-171 to -1181). The vector pISRE comprised the 3' extreme of the three promoters (-48 to -111) and was constructed using as template the pMx1Luc vector and the primers XhoISREF and AtgBglIIR. The vector pISRE2 (-48 to -111) was constructed using as template the pMx2Luc vector and the primers XhoISREm2F and AtgBglIIR. For both 3' vectors PCR conditions were: 95° C for 2 min, 35 cycles of 95° C for 30s, 66° C for 30 min, 72° C for 30s, and 72° C for 5 min. Amplified products were purified, digested with the enzymes XhoI and BglII, and subcloned into the pGL4.22 vector as described above.

For the pCMVLuc construct, the primers CMVXhoIF and CMVBglIIR were used to obtain the CMV promoter from the pCVpF plasmid [37]. Cycling conditions were 95° C for 2 min, 35 cycles of 95° C for 30s, 66° C for 30 min, 72° C for 30s, and 72° C for 5 min. The PCR product was purified, digested with the enzymes XhoI and BglII, and subcloned into the pGL4.22 vector as

described above. All constructs were confirmed by sequencing.

2.3. Transfections and induction of Mx promoters

The RTG cell line, derived from gonad tissue of rainbow trout [38] was used to evaluate the response of the gilthead seabream Mx promoters. Cells were grown at 20°C in Leibowitz L-15 medium (Gibco) supplemented with 10% foetal bovine serum (BioWhittaker), 4 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 250 ng/ml Fungizone.

For transfection, cells were trypsinized, resuspended (ca. 10^6 cells) in 100 µl of Nucleofector solution V (Lonza) and immediately transfected using the program D-0.23 of an Amaxa Nucleofector (Lonza). Cell electroporation was performed using 100 µL of cell suspension and 2 µg of DNA made up of: 1.840 ng of the experimental vector, 80 ng of the pRL-TK plasmid expressing Renilla luciferase (Promega), used to normalize transfection efficiency, and 80ng of pCVpf, which expresses the green fluorescence protein (GFP) under the control of the CMV promoter, used as visual control of the transfection. Transfected cells were added to 100 µl of culture medium and seeded into 96 well culture plates (ca. 10^4 cells/well). GFP expression was checked at 24h post-transfection.

	NAME	SEQUENCE 5'-3'
GENOME WALKING PRIMERS	ExtMx1R	ACACAGTGTCAAACAGAAGGAGATG
	IntMx1R	AATACATCTTACATGACAAAAGAGGCCTG
	ExtMx2R	TAGCAGAAATGTTCTTTATGACTGGAG
	IntMx2R	ATCTGCAATACATATCCATATCCGC
	ExtMx3R	TGTTATTAACATATGAATATTTCCGGG
	IntMx3R	TTTTCTTAATTACCACACCTGTCC
	AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
	AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
	PLMx1R	TCCATCTCATCTTTGGCGTTTCG
	PLMx2R	GTATTGTGGCACTCTGTTTGACCTCAG
	PLMx3R	ATGCTGTGGTTGTCCCTGTTCC
	CLONING PRIMERS	CMVXhoIF
CMVBgIIIR		CGTTGGG AGATCT CCCATATGG
XhoIMx1F		CTGCAGCTCC CTCGAG TGG
BgIIIMx1R		TCGTGATGTAAATCCATC AGATCT TTGG
XhoIMx2F		TGAG ACTCGAG TTTTGTTTTTTGTCAG
BgIIIMx2R		CTCAATGTTTCT AGATCT TTGAGTTTCC
XhoIMx3F		CTTTGGT CTCGAG ATTGATTTG
BgIIIMx3R		GTCTATCCATC AGATCT GTGGCG
XhoIISREF		TTCGTCCCATT ACTCGAG AGAGTAAAGAC
XhoIISREMx2F		CGGCA ACTCGAG AAGAAAAGGAAAG
ATGBgIIIR		GTTTCATGCTGCTC AGATCT TGTCTGC

Table 1: Primers used in this study. XhoI and BgIII sites appear in bold.

To induce promoter activity, transfected cells were treated 24 h post-transfection with the synthetic dsRNA poly I:C (Sigma) at 1, 5, 10, 50 and 100 µg/ml. The luciferase activity was measured at 24 h post induction. To study the induction time course, transfected cells were treated at 24 post-transfection with poly I:C at 10 µg/ml and luciferase activity was measured at 6, 12, 24, 48 and 72 h post induction.

For each experimental vector, at least two independent transfections with 4 replicates per treatment were performed. As described below,

in each experiment, a batch of RTG cells were transfected with the pCMVLuc vector as positive controls, and another batch of cells with the promoterless vector pGL4.22, as negative controls, that were used for normalization of the luciferase activity data.

2.4. Luciferase assay

To measure luciferase activity, the culture medium was removed and cells were lysed with Glo Lysis Buffer (Promega). The luminescence of

luciferase and renilla luciferase was measured using a Dual-Glo Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a GloMax 96 Microplate Luminometer (Promega). The activity of Renilla luciferase was used to normalize the transfection efficiency: to obtain the relative light units (RLU) values for each sample, the ratio between luciferase and renilla luminescence was calculated. Then, RLU values were transformed into Relative Response Ratio (RRR) values, using data from positive controls (cells transfected with the pCMVLuc vector) and negative controls (cells transfected with the empty vector pGL4.22), and according to the untreated cells) as well as differences of inducibility values between the three promoters, were tested using a two-tailed unpaired Student's t-test, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Structural characterization of gilthead seabream Mx promoters

Three DNA fragments of around 1 Kb, which contained the promoters of Mx1, Mx2 and Mx3 genes, were cloned and sequenced. The three sequences were deposited on Genbank (accession numbers: JQ392566 for pMx1, JQ392567 for pMx2, and JQ392568 for pMx3), and are shown in Figure 1S. The three promoters presented a highly conserved 3' region of 157 bp, covering from ATG to the -101 positions, with identity values of 98% for Mx1/Mx2; and 96% for both pairs pMx2/pMx3 and pMx1/pMx3. By contrast, the remainder sequences of the three

formula: $\frac{\text{Experimental sample RLU} - \text{Negative control RLU}}{\text{Positive control RLU} - \text{Negative control RLU}}$.

The inducibility values represent the relative fold change of a sample with respect to untreated cells. They were calculated as the ratio between each experimental RRR value and that of transfected but untreated cells. The baseline (no induction) is considered as the same response than untreated cells, that is, inducibility = 1. Data are presented as mean \pm standard error (SE). Differences between samples (experimental and promoters were less conserved, showing identity values between 44.6% and 62.5%.

The regulatory motifs identified in pMx1, pMx2 and pMx3 are shown in Figure 1 and in more detail in Figure 1S. All of them show an ISRE motif (GGAAACGAAACC) located in the conserved 3' region, between -73 and -87 sites. They also share a variable number of ISRE core sequences (GAAA/TTTC), 13 in pMx1, 15 in pMx2 and 12 in pMx3, and of gamma IFN activated sites (GAS: TTNCNNNAA): In pMx1, a single GAS motif with palindromic structure and covering from -99 to -107 positions was identified; in pMx2, four GAS elements, one of them with palindromic structure, were detected at positions -616 to -624; -695 to -703; -883 to -892; and -902 to -910; Finally, in pMx3 two GAS motifs were identified, the first one (palindromic) was located between -525 to -533 sites, and the second one from -1017 to -1025 positions.

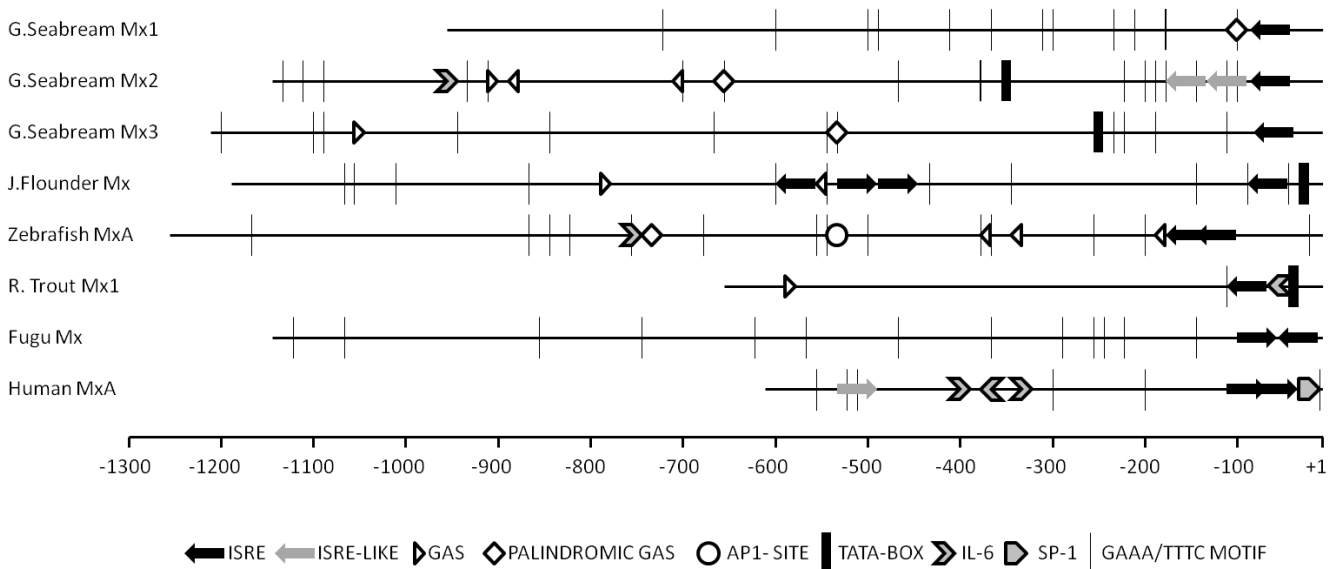


Fig 1. Schematic representation of pMx1, pMx2, and pMx3 structure, as well as that of Mx promoters corresponding to other four fish species and human MxA. The +1 position refers to the putative transcription start site. See figure legend for key.

Apart from these common motifs, pMx2 shows a putative interleukin-6 (IL-6) binding site from -942 to -947 sites. In addition, two pairs of ISRE core sequences formed two ISRE-like motifs in this promoter. In this way, the ISRE-like1 motif contains 3 nucleotides, instead of two, between the two ISRE core sequences (located -89 to -102 sites), and the ISRE-like2 has a point mutation in one of the ISRE core sequences, located from -121 to -133 sites (Figures 1 and 1S).

None of the three promoters presented TATA boxes close to the transcription start site, though in pMx2 and pMx3 a consensus TATA box (TATAAT) was identified from -336 to -342 and from 238 to -244 respectively (Figures 1 and 1S).

3.2. Response of gilthead seabream Mx promoters to poly I:C

To address a functional approach of the whole gilthead seabream Mx promoters, their sequences were linked to a luciferase gene and the resulting constructions were transfected into

RTG cells. Afterwards, cells were stimulated with different concentrations of poly I:C, so as to determine the dose response, which was represented in terms of the relative response ratio. The results presented in Figure 2 show that the three promoters were up-regulated by poly I:C. The responsiveness pattern showed a similar profile for all of them: the response was significant with 1 µg/mL of poly I:C, increased at 5 µg/mL, was quite stable from 5 to 50 µg/mL and started to decrease at 100 µg/mL.

It is remarkable that the range of RRR values, relative to the positive control (cells transfected with the pCMVLuc vector), proved quite different for each promoter. For pMx1 the maximum relative response (at 10 µg/mL) was lower than 0.5, while for pMx2 it was higher than 25, and for pMx3 was around 15. The untreated cells also showed different basal levels, being less than 0.1 for pMx1 and 4.4 and 4.8 for pMx2 and pMx3, respectively. When inducibility (i.e. relative response ratio in induced over non-induced cells) was calculated, the highest values were obtained

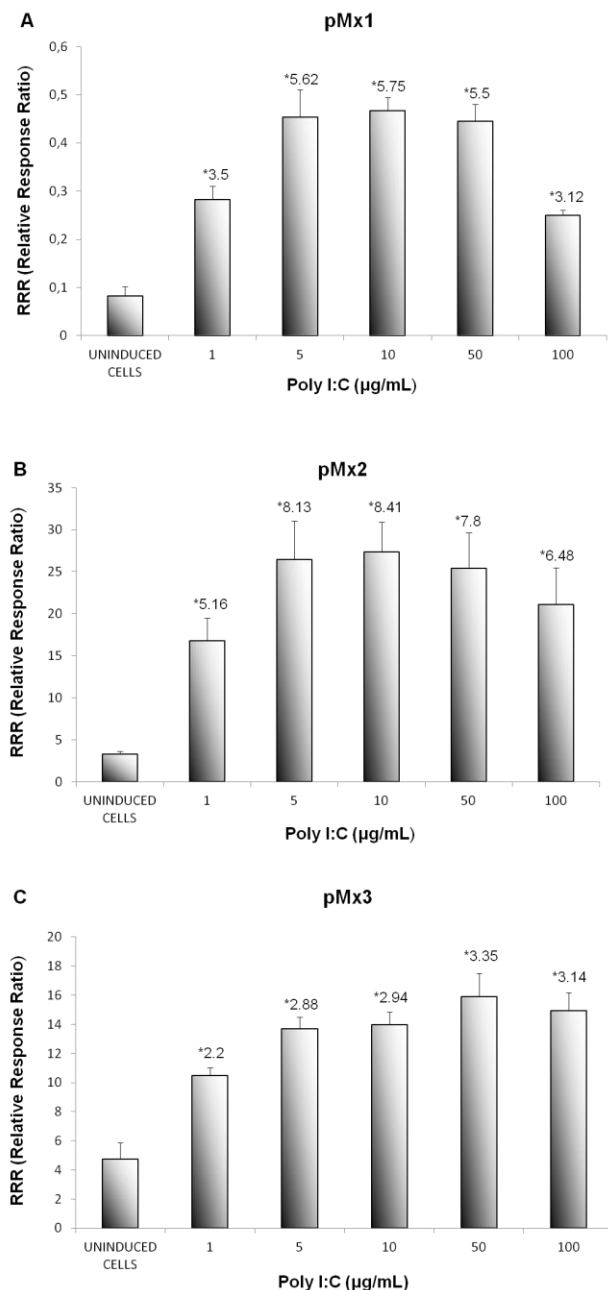


Fig 2. Activity of pMx1 (A), pMx2 (B) and pMx3 (C) in response to poly I:C. RTG cells were transfected with vectors containing the complete promoters, and 24 h later treated with different concentrations of poly I:C. Luciferase activity was measured 24 h after induction. Each bar represents the mean response \pm SE (n=8), relative to the positive control (response of pCMVLuc transfected cells). Inducibility values (RRR in induced cells/RRR in uninduced cells) are shown by a numeric value above each bar. Asterisks indicate significant differences between induced and uninduced cells ($p < 0.05$).

for pMx2 (8.41), followed by pMx1 (5.75) and pMx3 (3.35) (Figure 2).

The kinetics of poly I:C induction at 10 μ g/mL was presented in terms of inducibility (Figure 3). For the three promoters the response was significant as early as 6 h, gradually increased until 24 h post induction, and decreased thereafter. Differences between the three promoter's response were significant only between pMx2 and pMx3 from 6h to 48h, and between pMx1 and pMx3 at 48h.

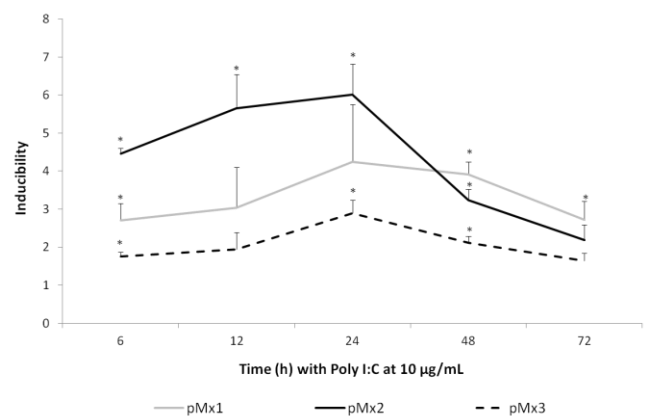


Fig 3. Activation kinetics of pMx1, pMx2, and pMx3, presented as inducibility values (RRR in induced cells/RRR in uninduced cells), determined in RTG cells transfected with pMx1Luc, pMx2Luc and pMx3Luc vectors, and treated 24 h later with poly I:C at 10 μ g/mL for 6, 12, 24, 48 and 72 h. Each point represents the mean inducibility \pm SE (n=5). Asterisks indicate significant differences between induced and uninduced cells ($p < 0.05$).

3.3. Response of promoters' deletion mutants

To characterize the role of the conserved 3' region where the ISRE motif is located in the three promoters, a series of deletion mutants were produced and fused to the luciferase gene. The resulting constructs were transfected into RTG cells and induced with poly I:C at 10 μ g/mL.

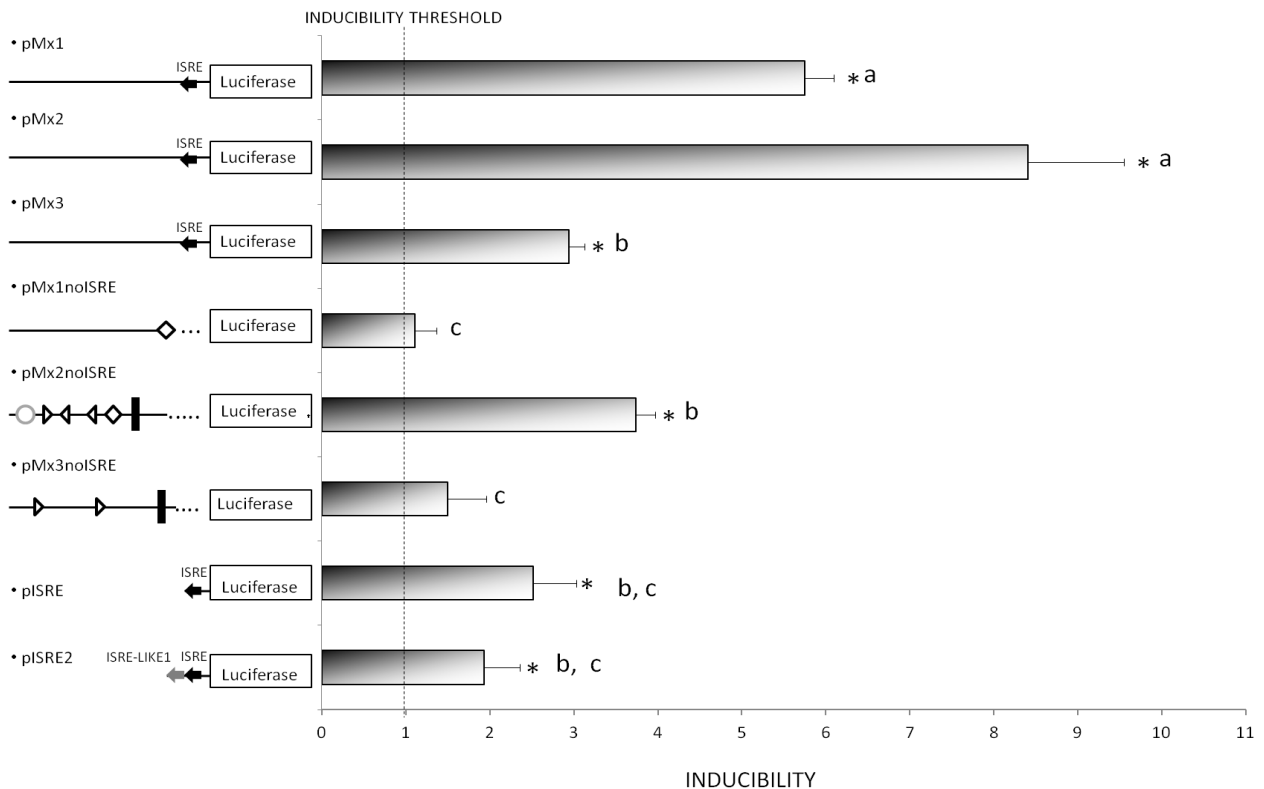


Fig 4. Functional analysis of pMx1, pMx2 and pMx3 deletion mutants. Inducibility values (RRR in induced cells/RRR in uninduced cells) were determined in RTG transfected cells, treated 24 h later with poly I:C at 10 μ g/mL for 24 h. Each point represents the mean inducibility \pm SE (n=8). Asterisks indicate significant differences between induced and uninduced cells ($p < 0.05$). Different letters denote significant differences between bars ($p < 0.05$).

The results displayed in Figure 4 indicate that the deletion of the ISRE motif abolished the response of pMx1 (pMx1noISRE) and pMx3 (pMx3noISRE), but not that of pMx2 (pMx2noISRE), which showed an inducibility value of 3.72. Vectors only containing the 3' region of the promoters showed an inducibility value of 2.52 for the pISRE vector, and of 1.93 for the pISRE2 vector.

4. DISCUSSION

The promoters of the three gilthead seabream Mx genes (pMx1, pMx2 and pMx3) have been cloned and characterized in the present study. Their structural characterization has shown a highly conserved 3' region of 157 bp, presenting a single ISRE motif in identical position in all of them. The conservation, along with the presence

of the ISRE motif, fully coincident with the consensus sequence (A/G/T)GAAA(N)₁₋₂GAAA(C/G)(A/C/T) described by Collet and Secombes [21], suggest a main role for this region in the regulation of the corresponding genes. Although the characterization of Mx promoters in fish is limited to few species, the number of ISREs so far identified in them is rather variable (Figure 1). In this way, rainbow trout Mx [21], channel catfish Mx [24] and zebrafish Mxg promoters [39] present one ISRE, similarly to the three gilthead seabream Mx promoters, whereas pufferfish Mx [19], grouper Mx [23], and Mxa and Mxb promoters from zebrafish [39], contain two close ISREs. Otherwise, Senegalese sole shows three [15] and Japanese flounder contains four ISREs [22]. This diversity in the number of ISRE motifs in fish Mx promoters suggests a crucial role for them in

the Mx expression regulation which might be somehow species specific and in accordance with the susceptibility of different fish species to specific viruses [39].

Upstream of the ISRE, other regulatory motifs were identified in the three promoters, such as GAS elements, which are present in all of them, though in different numbers (1, 4 and 2 in pMx1, pMx2 and pMx3, respectively). These motifs have also been identified in the Japanese flounder [22], rainbow trout [21], Senegalese sole [15] and zebrafish [20] Mx promoters, showing a similar representation than in the seabream Mx promoters (Figure 1). GAS elements are involved in IFN- γ responsiveness [40], suggesting that Mx1, Mx2 and Mx3 expression might also respond to type II IFN, as it has been reported in rainbow trout [26] and in Atlantic salmon [27], although this response seems to be, at least partially, dependant on a secondary release of IFN I induced by type II IFN [26, 27].

Additionally, numerous independent GAAA elements or ISRE core sequences (13, 15 and 12 in pMx1, pMx2 and pMx3, respectively) were identified in the three promoters (Figure 1 and 1S). These motifs are also widespread in fish and higher vertebrates Mx promoters, as well as in other ISG promoters [41, 42, 43]. Regarding their function, the presence of 10 GAAA elements upstream of the ISREs in zebrafish Mxa promoter, seems to play a role in enhancing gene expression [20], which might be applied to the large representation of these elements in the seabream Mx promoters.

Besides, an IL-6 response element was identified in pMx2. IL-6 motifs have also been described in other fish Mx promoters, such as rainbow trout

[21], channel catfish [24], and zebrafish Mxa [20] promoters. Otherwise, they are also present in chicken Mx promoter [44], and in several Mx promoters from mammalian species [45, 46, 47, 43, 48]. In addition, it has been reported that IL-6 may have a regulatory role in the maintenance of bovine Mx1 expression [43]. IL-6 is one of the most pleiotropic and important cytokines due to its important role mediating the innate and adaptive immune responses [49, 50]. Therefore, the presence of IL-6 response elements in Mx promoters might suggest the involvement of Mx genes in other immune response signalling pathways.

Finally, regarding the presence of a consensus TATA box in both pMx2 and pMx3, it results unusual, as only few Mx promoters present this motif (Figure 1). Interestingly, the TATA boxes identified, are far from the transcription start site (-336 and -238, respectively), thus suggesting the presence of another transcription start site and/or of alternative promoters in these two genes, as it has been found in human MxA [51].

To study the activity of pMx1, pMx2 and pMx3, each promoter was subcloned into a luciferase reporter vector, transferred to RTG-2 cells, and induced by poly I:C, as a potent inducer of type I IFN [52]. The response of the three promoters was positive (Figure 2), exhibiting dose dependent patterns with similar profile, though with different basal and maximum expression levels. In this way, pMx2 showed the highest induction value (RRR = 27) and Mx1 the lowest (RRR < 0.5). In spite of these differences, the values of inducibility appeared quite close (5.75, 8.41, 3.35 for pMx1, pMx2 and pMx3, respectively) (Figure 2). Since this parameter is the most informative, it was used to compare the

promoters' responsiveness in the following experiments. Concerning the time-course of the response to poly I:C induction (Figure 3), pMx1 and pMx2 showed a quicker response which was significant at 6 h p.i., while pMx3 showed no significant induction before 24 h. The highest inducibility values appeared at 24h in the three promoters, decreasing thereafter, more sharply in the case of pMx2. These profiles are rather coincident with data from similar experiments with other fish Mx promoters [21, 53, 54, 19, 24, 15]. It is widely accepted that inducibility depends on several factors, including the reporter vector and the cell line used [15]. In this way, only some variations in the intensity of the response or in the time course of the induction were detected among the different fish Mx promoters characterized so far.

The above results from pMx1, pMx2 and pMx3 parallel the discrepant transcription activity shown by Mx1, Mx2 and Mx3 genes after an experimental challenge with VNNV [34], where, in agreement with our current observations, the higher and earlier induction corresponded to Mx2 in brain and head kidney. Thus, both sources of information points at Mx2 as the predominant isoform during the early response of this species to viral infection.

To discriminate the role of the ISRE motif found in the three Mx promoters, several truncated constructs driving luciferase expression were generated (Figure 4). The deletion of the 3' region including the ISRE from pMx1 and pMx3 (pMx1noISRE and pMx3noISRE constructs) completely abolished their inducibility by poly I:C, whereas in the case of pMx2 (pMx2noISRE construct), the inducibility was reduced from 8.41 to 3.72, that is, a 55.52%, though the response

was still significant. These results indicate that the ISRE motif is crucial for pMx1 and pMx3 activity, whereas it does not seem to be essential in pMx2, though contributes to its highest activity apparently showing an additive effect. Interestingly, ISRE dependent response is most frequent among Mx promoters, and in those cases where two close ISREs are present both appear necessary to achieve the full promoter activity [19, 22, 15, 55, 46, 20]. The ISRE independent response shown by the pMx2noISRE vector indicates that other regulatory elements of this pMx2 truncated version (4 GAS motifs, the IL-6 response element and the TATA box) must be responsible of the observed response. This peculiarity represents an attractive challenge for further investigating this point.

When using the pISRE construct, containing the conserved 3' region of the three promoters including the ISRE motif, the inducibility value was significant but quite low (2.52, Figure 4), thus indicating that the ISRE motif is not self sufficient to attain the maximum expression level of Mx genes, but is dependent upon the rest of regulatory elements located outside of the conserved 3' region.

To assess the function of the ISRE-like1 motif identified in pMx2, the pISRE2 construct, which includes both the ISRE and the ISRE-like1 motifs, was used. The inducibility results showed no significant differences when compared with those from the pISRE vector (Figure 4), thus suggesting that the ISRE-like1 motif might not be functional. These findings are in agreement with the lack of activity shown by the ISRE-like motif of the human MxA promoter [55], also containing three nucleotides instead of two between the two

ISRE-core sequences. Actually, more than two nucleotides seem to negatively affect the binding specificity of the ISRE motifs [56]. Regarding the function of ISRE-like2 motif, it could not be addressed due to technical drawbacks in obtaining the truncated plasmid, thus, a functional role cannot be ruled out. This assumption is supported by the functionality shown by an ISRE-like motif from the mouse Mx1 promoter, also presenting a point mutation in one of its ISRE core sequences [47], as well as by the response shown by some mammalian ISRE-like motifs to several interferon regulatory factors (IRF) [57], which might support that this kind of motifs in fish are also involved in the pathways regulated by fish IRFs.

In summary, the gilthead seabream Mx promoters share a conserved region in the 3' extreme, where a single canonical ISRE element is located. This region seems crucial for the response of pMx1 and pMx3 to type I IFN, though other regulatory motifs located upstream up to 5' end also contribute to attaining the maximum response in both promoters. In the case of pMx2, an enhancing effect of the regulatory motifs located in the 5' region was also observed, though the response of this part of pMx2 was independent of the ISRE motif. Interestingly, the three promoters present different activity levels (both basal and induced), as well as slight differences in their induction kinetics, thus suggesting a differential modulation in the expression of Mx1, Mx2 and Mx3 genes, whose proteins might most likely be involved in maintaining the singular natural antiviral resistance shown by gilthead seabream.

ACKNOWLEDGMENTS

This study has been funded by the project AGL2011-27181 from the Ministry of Education and Science, Spanish Government, co-funded by FEDER from E.U.

REFERENCES

- [1] Zhang YB, Gui JF. Molecular regulation of interferon response in fish. *Dev Comp Immunol* 2012;38:193-202.
- [2] Baum A, Garcia-Sastre A. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino Acids* 2010;38:1283-99.
- [3] Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 2008;8:559-68.
- [4] Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 2008;26:535-84.
- [5] Zou J, Secombes CJ. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev Comp Immunol* 2011;35:1376-87.
- [6] Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:778-809.
- [7] Kochs G, Reichelt M, Danino D, Hinshaw JE, Haller O. Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. *Methods Enzymol* 2005;404:632-43.

- [8] Caipang CM, Hirono I, Aoki T. In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Mx. *Virology* 2003;317:373-82.
- [9] Wu YC, Chi SC. Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23:97-108.
- [10] Larsen R, Røkenes TP, Robertsen B. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *J Virol* 2004;78:7938-44.
- [11] Lin C, Christopher John JA, Lin C, Chang C. Inhibition of nervous necrosis virus propagation by fish Mx proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:534-9.
- [12] Kibenge MJT, Munir K, Kibenge FSB. Constitutive expression of Atlantic salmon Mx1 protein in CHSE-214 cells confers resistance to infectious salmon anaemia virus. *Virology* 2005;2:75.
- [13] Fernández-Trujillo MA, García-Rosado E, Alonso MC, Borrego JJ, Álvarez MC, Béjar J. In vitro inhibition of sole aquabirnavirus by Senegalese sole Mx. *Fish and Shellfish Immunology* 2008;24:187-93.
- [14] Fernandez-Trujillo MA, Garcia-Rosado E, Alonso MC, Castro D, Alvarez MC, Bejar J. Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) show antiviral activity against RNA and DNA viruses. *Mol Immunol* 2013;56:630-6.
- [15] Alvarez-Torres D, Bejar J, Collet B, Alonso MC, Garcia-Rosado E. Structural and functional characterization of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) Mx promoter. *Fish Shellfish Immunol* 2013;35:1642-8.
- [16] Lester K, Hall M, Urquhart K, Gahlawat S, Collet B. Development of an in vitro system to measure the sensitivity to the antiviral Mx protein of fish viruses. *J Virol Methods* 2012;182:1-8.
- [17] Trobridge GD, Chiou PP, Leong JA. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx proteína expresión in salmon cells. *J Virol* 1997;71:5304-11.
- [18] Magnadottir B. Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol* 2010;12:361-79.
- [19] Yap WH, Tay A, Brenner S, Venkatesh B. Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) Mx gene and functional characterization of its promoter. *Immunogenetics* 2003;54:705-13.
- [20] Altmann SM, Mellon MT, Johnson MC, Paw BH, Trede NS, Zon LI, et al. Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev Comp Immunol* 2004;28:295-306.
- [21] Collet B, Secombes CJ. The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter: structural and functional characterization. *Eur J Biochem* 2001;268:1577-84.
- [22] Ooi EL, Hirono I, Aoki T. Functional characterisation of the Japanese flounder,

Paralichthys olivaceus, Mx promoter. Fish Shellfish Immunol 2006; 21:293-304.

[23] Chen Y, Su Y, Lin JH, Yang H, Chen T. Cloning of an orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and characterisation of its expression in response to nodavirus. Fish Shellfish Immunol 2006;20:58-71.

[24] Plant KP, Thune RL. Genomic organisation of the channel catfish Mx1 gene and characterisation of multiple channel catfish Mx gene promoters. Fish Shellfish Immunol 2008;24:575-83.

[24] Kim MS, Kim KH. Effects of NV gene knock-out recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on Mx gene expression in Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Shellfish Immunol 2012;32:459-63.

[26] Jørgensen JB, Johansen A, Hegseth MN, Zou J, Robertsen B, Collet B, et al. A recombinant CHSE-214 cell line expressing an Mx1 promoter-reporter system responds to both interferon type I and type II from salmonids and represents a versatile tool to study the IFN-system in teleost fish. Fish Shellfish Immunol 2007;23:1294-303.

[27] Sun F, Zhang YB, Liu TK, Shi J, Wang B, Gui JF. Fish MITA serves as a mediator for distinct fish IFN gene activation dependent on IRF3 or IRF7. J Immunol 2011;187:2531-9.

[28] Collet B, Munro ES, Gahlawat S, Acosta F, Garcia J, Roemelt C, et al. Infectious Pancreatic Necrosis Virus suppresses type I interferon signalling in rainbow trout gonad cell line but not

in Atlantic salmon macrophages. Fish Shellfish Immunol 2007;22:44-56.

[29] Skjesol A, Aamo T, Hegseth MN, Robertsen B, Jørgensen JB. The interplay between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the IFN system: IFN signaling is inhibited by IPNV infection. Virus Research 2009;143:53-60.

[30] Borrego JJ, DCastro MC, Balebona ME, García-Rosado L, López-Cortés. Patologías de la dorada. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y pesca 2000.

[31] Castri J, Thiéry R, Jeffroy J, de Kinkelin P, Raymond JC. Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. Dis Aquat Organ 2001;47:33-8.

[32] Perez-Prieto S, Garcia-Rosado E, Rodriguez S, Castro D, Borrego JJ. Antigenic properties and experimental transmission to several fish species of a marine birnavirus isolated from sole (*Solea senegalensis*). Vet Microbiol 2001;82:11-25.

[33] Esteban MA, Meseguer J, Tafalla C, Cuesta A. NK-like and oxidative burst activities are the main early cellular innate immune responses activated after virus inoculation in reservoir fish. Fish and Shellfish Immunol 2008;25:433-8.

[34] Fernández-Trujillo MA, Novel P, Manchado M, Sepulcre MP, Mulero V, Borrego JJ, et al. Three Mx genes with differential response to VNNV infection have been identified in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Mol Immunol 2011;48:1216-23.

[35] Fernández-Trujillo MA, García-Rosado E, Alonso MC, Borrego JJ, Álvarez MC, Béjar J. Differential antiviral activity of Mx1, Mx2 and Mx3

proteins from gilthead seabream (*Sparus aurata*) against Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV). *Mol Immunol* 2011;49:107-14.

[36] Martínez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S. A protein salting-out method applied in genomic DNA isolation from fish whole blood. *BioTechniques* 1988;24: 238-9.

[37] Zhao H, Li M, Purwanti YI, Liu R, Chen T, Li Z, Hong N, Guan G, Yin A, Xiao L, Ge R, Song J, Hong Y. Mitf is a transcriptional activator of medaka germ genes in culture. *Biochimie* 2012;94:759-67.

[38] Wolf K, Quimby MC, Carlson CP. Infectious pancreatic necrosis virus: lyophilization and subsequent stability in storage at 4°C. *Appl Microbiol* 1969;17:623-4.

[39] Li G, Zhang J, Sun Y, Wang H, Wang Y. The evolutionarily dynamic IFN-inducible GTPase proteins play conserved immune functions in vertebrates and cephalochordates. *Mol Biol Evol* 2009;26:1619-30.

[40] Castro R, Martin SA, Bird S, Lamas J, Secombes CJ. Characterisation of gamma-interferon responsive promoters in fish. *Mol Immunol* 2008;45:3454-62.

[41] Chang KC, Hansen E, Feroni L, Lida J, Goldspink G. Molecular and functional analysis of the virus- and interferon-inducible human MxA promoter. *Arch Virol* 1991;117:1-15.

[42] Hug H, Costas M, Staeheli P, Aebi M, Weissmann C. Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and

virus-inducible promoter. *Mol Cell Biol* 1988;8:3065-79.

[43] Gerardin JA, et al. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) MX1 gene. *Gene* 2004;326:67-75.

[44] Schumacher B, Bernasconi D, Schultz U, Staeheli P. The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology* 1994;203:144-8.

[45] Horisberger MA, Haller O, Arnheiter H. Interferon-dependent genetic resistance to influenza virus in mice: virus replication in macrophages is inhibited at an early step. *J Gen Virol* 1980;50:205-210.

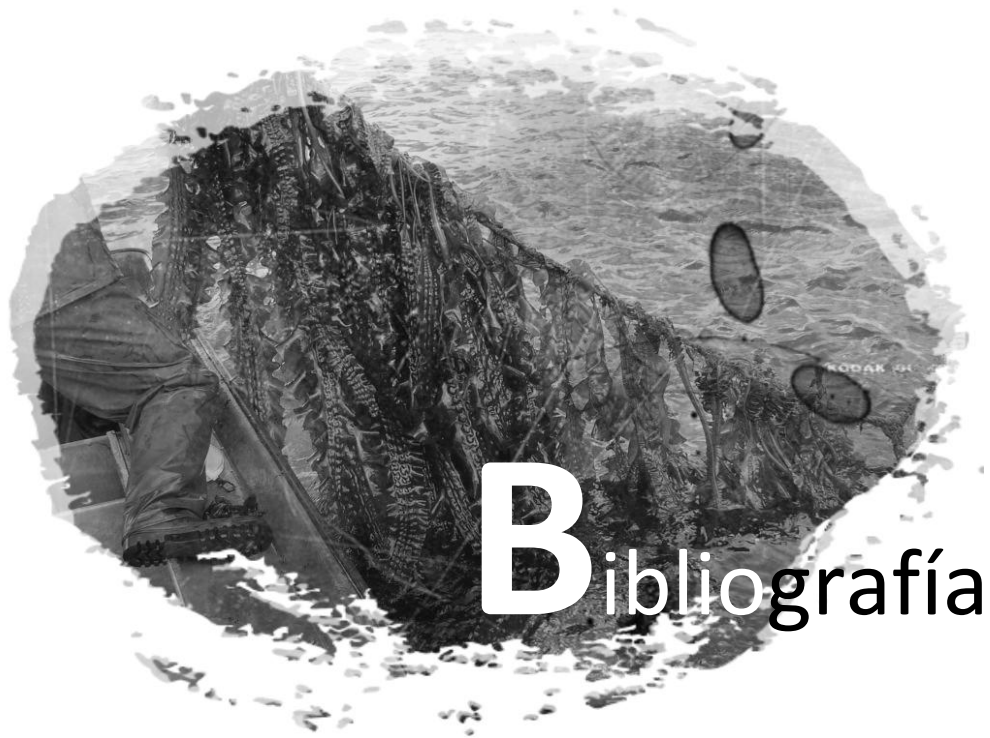
[46] Assiri AM, Ott TL. Cloning and characterizing of the ovine Mx1 gene promoter/enhancer region. *Dev Comp Immunol* 2007; 31:847-57.

[47] Asano A, Jin HK, Watanabe T. Mouse Mx2 gene: organization, mRNA expression and the role of the interferon-response promoter in its regulation. *Gene* 2003;306:105-13.

[48] Yamada K, Nakatsu Y, Onogi A, Takasuga A, Sugimoto Y, Ueda J, Watanabe T. Structural and functional analysis of the bovine Mx1 promoter. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:217-26.

[49] Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J*. 1990;11:2860-7.

- [50] Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 2002;4:S233-42.
- [51] Noguchi S, Hijikata M, Hamano E, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, et al. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics* 2013;65:107-14.
- [52] Biron CA, Sen GC. Interferons and other cytokines. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001, p. 321-51.
- [53] Collet B, Boudinot P, Benmansour A, Secombes CJ. An Mx1 promoter-reporter system to study interferon pathways in rainbow trout. *Dev Comp Immunol* 2004;28:793-801.
- [54] Johansen A, Collet B, Sandaker E, Secombes CJ, Jørgensen JB. Quantification of atlantic salmon type-I interferon using an Mx1 promoter reporter gene assay. *Fish Shellfish Immunol* 2004;16:173-84.
- [55] Ronni T, Matikainen S, Lehtonen A, Palvimo J, Dellis J, Van Eylen F, et al. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:773-81.
- [56] Lin R, Genin P, Mamane Y, Hiscott J. Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Mol Cell Biol* 2000;20:6342-53.
- [57] Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 2008;26:535-584.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Abollo, E., Ordás, C., Dios, S., Figueras, A., Novoa, B., 2005. Molecular characterization of a turbot Mx cDNA. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 185–190.

Altmann, S.M., Mellon, M.T., Johnson, M.C., Paw, B.H., Trede, N.S., Zon, L.I., Kim, C.H., 2004. Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish *Danio rerio*. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 295–306.

Álvarez-Torres, D., García-Rosado, E., Fernández-Trujillo, M.A., Béjar, J., Álvarez, M.C., Borrego, J.J., Alonso, M.C., 2013. Antiviral specificity of the *Solea senegalensis* Mx protein constitutively expressed in CHSE-214 cells. *Mar. Biotechnol.* 15, 125–132.

APROMAR, Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos, informe 2012. La acuicultura marina en España.
<http://www.apromar.es/Informes/informe%202012/Informe-APROMAR-2012.pdf>

Akira, S., Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T., 1990. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 4, 2860-2867.

Arias, A., 1976. Sobre la biología de la dorada, *Sparus aurata* L., de los esteros de la provincia de Cádiz. *Inv. Pesq.* 40, 201-222.

Arias, A., 1980. Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata* L.) y el robalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cádiz. *Inv. Pesq.* 44, 59-83.

Asano, A., Jin, H.K., Watanabe, T., 2003. Mouse Mx2 gene: organization, mRNA expression and the role of the interferon-response promoter in its regulation. *Gene* 306,105–13.

Assiri, A.M., Ott, T.L., 2007. Cloning and characterizing of the ovine Mx1 gene promoter/enhancer region. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 847–857.

Avunje, S., Kim, W.S., Park, C.S., Oh, M.J., Jung, S.J., 2011. Toll-like receptors and interferon associated immune factors in viral haemorrhagic septicaemia virus-infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 31, 407-414.

Barbaro, A., Francescon, A., Bertaggia, R., Antonini., G., 1986. Crescita, sopravvivenza e produzione in ambiente vallivo di una popolazione di *Sparus aurata* riprodotta artificialmente. *Quad. Civ. Staz. Idrobiol.* 13, 21-29.

Barrett, L.W., Fletcher, S., Wilton, S.D., 2012. Regulation of eucariotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-encoding elements. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3613-3634.

Barja J.L. 2004. Report about fish viral diseases. Mediterranean aquaculture diagnostic laboratories. *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches* 49, 91-102.

Bauchot, M.L., Hureau, J.C., 1986. Sparidae. In: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean* 2, 883-907.

Bazzigher, L., Schwarz, A., Staeheli, P., 1993. No enhanced influenza virus resistance of murine and avian cells expressing cloned duck Mx protein. *Virology* 195, 100-112.

Biron, C.,A., Sen, G.,C., 2001. Interferons and other cytokines. *Fields Virology* 4th Edition, 321-351.

Borrego, J.J., Castro D., Balebona, M.C., García-Rosado, M.E., López-Cortés, L., 2000. Patologías de la dorada. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y pesca.

Boudinot, P., Massin, P., Blanco, M., Riffault, S., Benmansour, A., 1999. Vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoaA family. *J Virol.* 73, 1846-1852.

Boudinot, P., Salhi, S., Blanco, M., Benmansour, A., 2001. Viral haemorrhagic septicaemia virus induces vig-2, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 383-397.

Caipang, C.M.A., Hirono, I., Aoki, T., 2003. In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. *Virology* 317, 373–382.

Castelló-Orvay, F., Calderer, A., 1993. Growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different culture conditions. En: *Production, Environment and Quality.* (G.Barnabé & P.Kestemont Eds.) Bordeaux Aquaculture'92. Ghent, Belgium. E.A.S. Special publication 18, 227-233.

Castri, J., Thiéry, R., Jeffroy, J., de Kinkelin, P., Raymond, J.C., 2001. Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Dis Aquat Organ* 47, 33-38.

Chang, K.C., Hansen, E., Feroni, L., Lida, J., Goldspink, G., 1991. Molecular and functional analysis of, the virus and interferon-inducible human MxA promoter. *Arch Virol.* 117, 1-15.

Chen, ZY., Su, Y., Lin, J.H., Yang, H., Chen, T., 2006. Cloning of an orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and characterisation of its expression in response to nodavirus. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 58-71.

Cheng, W., Tsai, R.T., Chang, C.C., 2012. Dietary sodium alginate administration enhances Mx gene expression of the tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* receiving poly I:C. *Aquaculture* 324–325, 201–208.

Chin, K.C., Cresswell, P., 2001. Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 15125–15130.

Choi, Y., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Berghman, L.R., Joyce, M.M., Taylor, K.M., Stewart, M.D., Bazer, F.W., Spencer, T.E., 2001. Interferon regulatory factor-two restricts expression of interferon-stimulated genes to the endometrial stroma and glandular epithelium of the ovine uterus. *Biol Reprod.* 65, 1038-1049.

Collet, B., Secombes, C.J., 2001. The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter. Structural and functional characterization. *Eur. J. Biochem.* 269, 1577-1584.

Collet, B., McDonald, C., Secombes, C.J., 2003. The promoter for the Interferon Regulatory Factor (IRF)-2 in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: cloning and reporter gene activity. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 473-477.

Collet, B., Boudinot, P., Benmansour, A., Secombes, C.J., 2004. An Mx1 promoter-reporter system to study interferon pathways in rainbow trout. *Dev Comp Immunol.* 28, 793-801.

Collet, B., Munro, E.S., Gahlawat, S., Acosta, F., Garcia, J., Roemelt, C., Zou, J., Secombes, C.J., Ellis, A.E., 2007. Infectious pancreatic necrosis virus suppresses type I interferon signalling in rainbow trout gonad cell line but not in Atlantic salmon macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 44-56.

Collet, B., 2013a. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Dev Comp Immunol.* 43,160-173.

Collet, B., Urquhart, K., Noguera, P., Larsen, K.H., Lester, K., Smail, D., Bruno, D., 2013b. A method to measure an indicator of viraemia in Atlantic salmon using a reporter cell line. *J Virol Methods* 191,113-117.

Ctaqua. (2013). Fundación Centro Tecnológico de Acuicultura de Andalucía.
<http://www.cetaqua.com/es>

Cunningham, C.H., 1973. Quantal and enumerative titration of virus in cell cultures. Tissue culture: methods and applications. New York: Academic Press Inc., p. 527-532.

Cutrin, J.M., Oliveira, J.G., Barja, J.L., Dopazo, C.P., 2000. Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish, and other reservoirs in Northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol.* 66, 839-843.

Damore, M.A., Omori, S.A., Wall, R., 1996. IFN-gamma induces the kappa intron enhancer via an IFN-stimulated response element. *J Immunol.* 156, 2451-2457.

De Paola, A., Peeler, J.T., Rodrick, G., 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in catfish ponds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2335–2340.

Deaton, A.M., Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010-1022.

Doly, J., Civas, A., Navarro, S., Uze, G., 1998. Type I interferons: expression and signalization. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1109-1121.

Ekblom, R., French, L., Slate, J., Burke, T., 2010. Evolutionary analysis and expression profiling of zebra finch immune genes. *Genome Biol Evol.* 2, 781-790.

Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 827–839.

Esteban, M.A., Meseguer, J., Tafalla, C., Cuesta, A., 2008. NK-like and oxidative burst activities are the main early cellular innate immune responses activated after virus inoculation in reservoir fish. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 433-438.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012.

The State of World Fisheries and Aquaculture.
<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>

Fernández-Trujillo, M.A., Porta, J., Borrego, J.J., Alonso, M.C., Álvarez, M.C., Béjar, J., 2006. Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 21, 577–582.

Fernández-Trujillo, M.A., García-Rosado, E., Alonso, M.C., Borrego, J.J., Álvarez, M.C., Béjar, J., 2008. In vitro inhibition of sole aquabirnavirus by Senegalese sole Mx. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 187–193.

Fernández-Trujillo, M.A., García-Rosado, E., Alonso, M.C., Borrego, J.J., Álvarez, M.C., Béjar, J., 2011a. Differential antiviral activity of Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from gilthead seabream (*Sparus aurata*) against Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV). *Mol. Immunol.* 49, 107–114.

Fernández-Trujillo, M.A., Novel, P., Manchado, M., Sepulcre, M.P., Mulero, V., Borrego, J.J., Álvarez, M.C., Béjar, J., 2011b. Three Mx genes with differential response to VNNV infection have been identified in Gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol. Immunol.* 48, 1216–1223.

Fernández-Trujillo, M.A., García-Rosado, E., Alonso, M.C., Castro, D., Álvarez, M.C., Béjar, J., 2013. Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) show antiviral activity against RNA and DNA viruses. *Mol. Immunol.* 56, 630-636.

FishStat (2006). <http://www.fao.org/fishery/statistics>

Francescon, A., Barbaro, A., La Rocca, A., Bertaggia. R., 1987. Stima quantitativa della dieta naturale dell'orata (*Sparus aurata*) in ambiente salmastro. Arch.Oceanogr.Limnol. 21, 45-61.

Frese M., Kochs G., Feldmann H., Hertkorn C., Haller O., 1996. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. J Virol. 70, 915-923.

García-Sastre, A., Biron, CA., 2006. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente. Science 312, 879-882.

Gérardin, J.A., Baise, E.A., Pire, G.A., Leroy, M.P., Desmecht, D.J., 2004. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. Gene 326, 67–75.

Gomez-Casado, E., Estepa, A., Coll, J.M., 2011. A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines Vaccine 29, 2657–2671.

Goodbourn, S., Didcock, L., Randall, R.E., 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. J. Gen. Virol. 81, 2341-2364.

Hackett, P.B., Alvarez, M.C., 2000. The molecular genetics of transgenic fish. Recent advances in marine biotechnology: vol. 4 Aquaculture: Part B Fishes. Science Publishers, 77–145.

Haller, O., Staeheli, P., Kochs, G., 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. Biochimie 89, 812–818.

Heldt, H., 1948. Études sur le Thon, la daurade et le muge. Bull.Stat.Ocean. de Salammbô 1, 1-40.

Hida, S., Ogasawara, K., Sato, K., Abe, M., Takayanagi, H., Yokochi, T., Sato, T., Hirose, S., Shirai, T., Taki, S., Taniguchi, T., 2000. CD8(+) T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon-alpha/beta signaling. *Immunity* 13, 643-655.

Hinshaw, J.E., 2000. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16, 483-519.

Horisberger, M.A., Gunst, M.C., 1991. Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology* 180, 185–190.

Huang, W., Hovath, E., Eklund, E.A., 2007. PU.1, interferon regulatory factor (IRF-2), and the interferon consensus sequence binding protein (ICSBP/IRF8) cooperate to activate NF1 transcription in differentiating myeloid cells. *J Biol Chem.* 282, 6629-6643.

Hug, H., Costas, M., Staeheli, P., Aebi, M., Weissmann, C., 1988. Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3065-3079.

Jacobs, B.L., Langland, J.O., 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* 219, 339-49.

Jensen, V., Robertsen, B., 2000. Cloning of an Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 701-710.

Jia, W., Zhou, X., 2010. Molecular structural and functional characterization of STAT1 gene regulatory region in teleost *Channa argus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 146–151.

Jiang, J., Zhang, Y.B., Li, S., Yu, F.F., Sun, F., Gui, J.F., 2009. Expression regulation and functional characterization of a novel interferon inducible gene *Gig2* and its promoter. *Mol Immunol.* 46, 3131-3140.

Johansen, A., Collet, B., Sandaker, E., Secombes, C.J., Jørgensen, J.B., 2004. Quantification of atlantic salmon type-I interferon using an Mx1 promoter reporter gene assay. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 173-184.

Jørgensen, J.B., Johansen, A., Hegseth, M.N., Zou, J., Robertsen, B., Collet, B., et al., 2007. A recombinant CHSE-214 cell line expressing an Mx1 promoter-reporter system responds to both interferon type I and type II from salmonids and represents a versatile tool to study the IFN-system in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1294-1303.

Kibenge, M.J., Munir, K., Kibenge, F.S., 2005. Constitutive expression of Atlantic salmon Mx1 protein in CHSE-214 cells confers resistance to infectious salmon anaemia virus. *Virol. J.* 26, 75.

Kim, M.S., Kim, K.H., 2012. Effects of NV gene knock-out recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on Mx gene expression in *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 32, 459-463.

Kim, M.S., Kim, K.H., 2013. The role of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) NV gene in TNF- α - and VHSV infection-mediated NF- κ B activation. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1315-1319.

Kochs, G., Haener, M., Aebi, U., Haller, O., 2002. Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J. Biol. Chem.* 277, 14172–14176.

Kochs, G., Reichelt, M., Danino, D., Hinshaw, J.E., Haller, O., 2005. Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. *Methods. Enzymol.* 404, 632–643.

Landis, H., Simon-Jödicke, A., Klöti, A., Di Paolo, C., Schnorr, J.J., Schneider-Schaulies, S., Hefti, H.P., Pavlovic, J., 1998. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J Virol.* 72, 1516-1522.

Larsen, R., Røkenes, T.P., Robertsen, B., 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *J. Virol.* 78, 7938–7944.

Ledo, A., Lupiani, B., Dopazo, C.P., Toranzo, A.E., Barja, J.L., 1990. Fish viral infections in northwest of Spain. *Microbiologia* 6, 21-29.

Lee, J.Y., Hirono, I., Aoki, T., 2000. Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 407–415.

Lee, S.H., Vidal, S.M., 2002. Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Res.* 12, 527-530.

Lester, K., Hall, M., Urquhart, K., Gahlawat, S., Collet, B., 2012. Development of an in vitro system to measure the sensitivity to the antiviral Mx protein of fish viruses. *J. Virol. Methods* 182, 1–8.

Li, G., Zhang, J., Sun, Y., Wang, H., Wang, Y., 2009. The evolutionarily dynamic IFN-inducible GTPase proteins play conserved immune functions in vertebrates and cephalochordates. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1619–1630.

Lin, C.H., Christopher John, J.A., Lin, C.H., Chang, C.Y., 2006. Inhibition of nervous necrosis virus propagation by fish Mx proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 534–539.

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

Lockhart, K., McBeath, A.J., Collet, B., Snow, M., Ellis, A.E., 2007. Expression of Mx mRNA following infection with IPNV is greater in IPN-susceptible Atlantic salmon post-smolts than in IPN-resistant Atlantic salmon parr. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 151-156.

Lopez-Jimena, B., Garcia-Rosado, E., Infante, C., Cano, I., Manchado, M., Castro, D., Borrego, J.J., Alonso, M.C., 2010. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from asymptomatic redbanded seabream, *Pagrus auriga Valenciennes*, and common seabream, *Pagrus pagrus* (L.), using a non-destructive procedure. *J Fish Dis.* 33, 311-319.

Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137-151.

Martínez, G., Shaw, E.M., Carrillo, M., Zanuy, S., 1988. A protein salting-out method applied in genomic DNA isolation from fish whole blood. *BioTechniques* 24, 238–239.

Matsumoto, M., Funami, K., Oshiumi, H., Seya, T., 2004. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol. Immunol.* 48 3, 147–154.

Matsuyama, T., Fujiwara, A., Takano, T., Nakayasu, C., 2011. Suppression subtractive hybridization coupled with microarray analysis to examine differential expression of genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes during *Edwardsiella tarda* and viral hemorrhagic septicemia virus infection. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 524-532.

McKnight, I.J., Roberts, R.J., 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis. II. Stress-mediated recurrence. *Br Vet J.* 132, 209-214.

Meier, E., Kunz, G., Haller, O., Arnheiter, H., 1990. Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J Virol.* 64, 6263-6269.

Mitchell, P.S., Patzina, C., Emerman, M., Haller, O., Malik, H., Kochs, G., 2012. Evolution-guided identification of antiviral specificity determinants in the broadly acting interferon-induced innate immunity factor MxA. *Cell Host & Microbe* 12, 598–604.

Naka, T., Nishimoto, N., Kishimoto, T., 2002. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 4, 233-242.

Noguchi, S., Hijikata, M., Hamano, M., Matsushita, I., Ito, H., Ohashi, J., Nagase, T., Keicho, N., 2013. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics* 65, 107-114.

O'Farrell, C., Vaghefi, N., Cantonnet, M., Buteau, B., Boudinot, P., Benmansour, A., 2002. Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. *J Virol.* 76, 8040-8049.

Ooi, E.L., Hirono, I., Aoki, T., 2005. Functional characterisation of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Mx promoter. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 293-304.

Pavlovic, J., Zürcher, T., Haller, O., Staeheli, P., 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J Virol.* 64, 3370-3375.

Perez-Prieto, S., Garcia-Rosado, E., Rodriguez, S., Castro, D., Borrego, J.J. 2001. Antigenic properties and experimental transmission to several fish species of a marine birnavirus isolated from sole (*Solea senegalensis*). *Vet Microbiol.* 82, 11-25.

Plant, K.P., Thune, R.L., 2004. Cloning and characterization of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Mx gene. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 391–405.

Plant, K.P., Harbottle, H., Thune, R.L., 2005. Poly I:C induces an antiviral state against Ictalurid Herpesvirus 1 and Mx1 transcription in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol.* 29, 627-635.

Plant, K.P., Thune, R.L., 2008. Genomic organisation of the channel catfish Mx1 gene and characterization of multiple channel catfish Mx gene promoters. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 575–583.

Platanias, L.C., 2005. Mechanism of type-I and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 375-386.

Pond, S.L., Murrell, B., Poon, A.F., 2012. Evolution of viral genomes: interplay between selection, recombination, and other forces. *Methods Mol Biol.* 856, 239-272.

Purcell, M.K., Kurath, G., Garver, K.A., Herwig, R.P., Winton, J.R., 2004. Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 447-462.

Randall, R.E., Goodbourn, S., 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* 89, 1–47.

Rang, A., Heise, T., Will, H., 2001. Lack of a role of the interferon-estimated response-element like region in interferon alpha-induced suppression of Hepatitis B virus in vitro. *J Biol Chem.* 276, 3531-3535.

Roberts, M.C., 2000. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontology* 28, 280–297.

Robertsen, B., Trobridge, G., Leong, J.A., 1997. Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Dev. Comp. Immunol. 21, 397–412.

Robertsen, B., 2006. The interferon system of teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 20, 172–191.

Rodriguez, S., Vilas, M.P., Gutierrez, M.C., Perez-Prieto, S.I., Sarasquete, M.C., Rodriguez, R.B., 1997. Isolation and characterization of a birnavirus from the sole *Solea senegalensis*. J Aquat Anim Health 9, 295-300.

Ronni, T., Matikainen, S., Lehtonen, A., Palvimo, J., Dellis, J., Van Eylen, F., 1988. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. J Interferon Cytokine 18, 773-781.

Rothenburg, S., Deigendesch, N., Dittmar, K., Koch-Nolte, F., Haag, F., Lowenhaupt, K., Rich, A., 2005. A PKR-like eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from zebrafish contains Z-DNA domains instead of dsRNA binding domains. Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 1602–1607.

Samuel, C.E., 2001. Antiviral actions of interferons. Clin. Microbiol. Rev. 14, 778–809.

Schumacher, B., Bernasconi, D., Schultz, U., Staeheli, P., 1994. The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. Virology. 203, 144-148.

Skall, H.F., Olesen, N.J., Mellergaard, S., 2005. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming--a review. J Fish Dis. 28, 509-529.

Skjesol, A., Aamo, T., Hegseth, N.M., Robertsen, B., Jørgensen, J.B., 2009. The interplay between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the IFN system: IFN signaling is inhibited by IPNV infection. *Virus Research* 143, 53–60.

Su, J., Yang, C., Zhu, Z., Wang, Y., Jang, S., Liao, L., 2009. Enhanced grass carp reovirus resistance of Mx-transgenic rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Fish Shellfish Immunol.* 26, 828–835.

Suau, P., López, J., 1976. Contribución al estudio de la dorada, *Sparus aurata* L. *Inv. Pesq.* 40, 169–199.

Subasinghe, R.P., 2005. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67, 117–124.

Sun, B., Skjæveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jørgensen, J., Robertsen, B., 2011. Antiviral Activity of Salmonid Gamma Interferon against Infectious Pancreatic Necrosis Virus and Salmonid Alphavirus and Its Dependency on Type I Interferon. *J. Virol.* 85, 9188-9198.

Tafalla, C., Chico, V., Perez, L., Coll, J.M., Estepa, A., 2007. In vitro and in vivo differential expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx isoforms in response to Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) G gene, poly I:C and VHSV. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 210-221.

Taylor, P., Tamura, T., Kong, H.J., Kubota, T., Kubota, M., et al. 2007. Type I interferon induction in dendritic cells requires IRF-8 that effects the feedback phase of transcription. *Immunity* 27, 228–239.

Takaoka, A., Yanai, A., 2006. Interferon signalling network in innate defence. *Cellular Microbiology* 8, 907–922.

Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., Taniguchi, T., 2008. The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 535-584.

Tamura, T., Thotakura, P., Tanaka, T.S., Ko, M.S., Ozato, K., 2005. Identification of a target genes and unique cis element regulated by IRF-8 in developing macrophages. *Blood.* 106, 1938-1947.

Tirosh, I., Barkai, N., Verstrepen, K.J., 2009. Promoter architecture and the evolvability of gene expression. *J. Biol.* 8, 95.

Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L., Izquierdo, M.S., 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 969–981.

Trobridge, G.D., Leong, J.A., 1995. Characterization of a rainbow trout Mx gene. *J. Interferon Cytokine Res.* 1995, 691–702.

Trobridge, G.D., Chiou, P.P., Leong, J.A., 1997. Cloning of the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J. Virol.* 71, 5304–5311.

Verrier, E.R., Langevin, C., Benmansour, A., Boudinot, P., 2011. Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Dev Comp Immunol.* 35, 1204-1214.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655–671.

Versteeg, G.A., García-Sastre, A., 2010. Viral tricks to grid- lock the type I interferon system. *Curr Opin Microbiol.* 13, 508-516.

Vilcinskas, A.J., 2013. Evolutionary plasticity of insect immunity. *Insect Physiol.* 59, 123-129.

Walker, P.J., Benmansour, A., Calisher, C.H., Dietzen, R. and 7 others 2000. Family Rhabdoviridae. In: van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB and 7 others(eds) *Virus taxonomy. 7th Rep Int Comm Taxon Viruses.* Academic Press, San Diego, CA, p 563–583.

Wolf, K., Snieszko, S.F., Dunbar, C.E., Pyle, E., 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc Soc Exp Biol Med* 104,105-108.

Wolf, K., Quimby, M.C., 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science* 135, 1065-1066.

Wolf, K., 1988. *Fish Viruses and Fish Viral Diseases.* Cornell University Press, Ithaca.

Wu, Y.C., Chi, S.C., 2007. Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 97–108.

Yabu, T., Hirose, H., Hirono, I., Katagiri, T., Aoki, T., Yamamoto, E., 1998. Molecular cloning of a novel interferon regulatory factor in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 7, 138-144.

Yap, W.H., Tay, A., Brenner, S., Venkatesh, B., 2003. Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) Mx gene and functional characterization of its promoter. *Immunogenetics* 54, 705–713.

Yamada K., Nakatsu, Y., Onogi, A., Takasuga, A., Sugimoto, Y., Ueda, J., Watanabe, T., 2009. Structural and functional analysis of the bovine Mx1 promoter. *J Interferon Cytokine Res.* 29, 217-226.

Zenke, K. and Kim, K.H., 2009. Molecular cloning and expression analysis of three Mx isoforms of rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 599–605.

Zhang, D.E., Hetherington, C.J., Tan, S., Dziennis, S.E., Gonzalez, D.A., Chen, H.M., Tenen, D.G., 1994. Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14. *J Biol Chem.* 269, 11425-11434.

Zhang, Y.B., Li, Q., Gui, J.F., 2004. Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and IFN. *Immunogenetics* 56, 68-75.

Zhang, Y.B., Jiang, J., Chen, Y.D., Zhu, R., Shi, Y., Zhang, Q.Y., Gui, J.F., 2007. The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus blastulae* (CAB) cells. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 232–243.

Zhang, Y.B., Gui, J.F., 2012. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Dev Comp Immunol.* 38, 193-202.

Zhu, C., Saberwal, G., Lu, Y., Platanias, L.C., Eklund, E.A., 2004. The interferon consensus sequence-binding protein activates transcription of the gene encoding neurofibromin 1. *J Biol Chem.* 279, 50874-50885.

Zou, J. and Secombes, C.J., 2011. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1376–1387.

