



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR

**“M_x PROTEIN INVOLVEMENT IN
THE INNATE IMMUNE SYSTEM
AGAINST VIRAL INFECTIONS IN
SENEGALESE SOLE
(*Solea senegalensis*)”**

TESIS DOCTORAL

Daniel Álvarez Torres

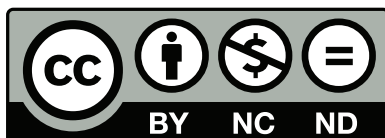
2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Daniel Álvarez Torres

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

FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR

**“M_x PROTEIN INVOLVEMENT IN
THE INNATE IMMUNE SYSTEM
AGAINST VIRAL INFECTIONS IN
SENEGALESE SOLE
(*Solea senegalensis*)”**

Memoria presentada por **D. Daniel
Álvarez Torres** para optar al grado de
Doctor en Biología con mención
internacional.

Fdo. El doctorando

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA-PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTOS DE MICROBIOLOGÍA
Y BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGÍA

Dña. MARÍA DEL CARMEN ALONSO SÁNCHEZ, Profesora Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, y **TUTORA** del doctorando dentro del programa de doctorado “**BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**”.

Dña. JULIA BÉJAR ALVARADO, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga y **Dña. MARÍA ESTHER GARCÍA ROSADO**, Profesora Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, como **DIRECTORAS** del trabajo de tesis realizado por el doctorando.

INFORMAN:

Que el doctorando **DANIEL ÁLVAREZ TORRES** ha realizado sus actividades de formación dentro del programa de doctorado bajo la supervisión de la tutora, así como su trabajo investigador dirigido por las directoras de modo multidisciplinar entre los departamentos de Microbiología y Biología Celular, Genética y Fisiología, que se presenta bajo el título “**Mx protein involvement in the innate immune system against viral infections in Senegalese sole (*Solea senegalensis*)**”. Este trabajo constituye su proyecto de Tesis para aspirar al Título de Doctor en Biología con mención internacional.

Y para que así conste, y tenga los efectos que correspondan, en cumplimiento de la legislación vigente, extendemos el presente informe en Málaga, a 1 de Julio de 2014.

Fdo. La tutora:

M^a del Carmen Alonso Sánchez

Fdo. Las directoras:

Julia Béjar Alvarado

M^a Esther García Rosado



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral han sido financiados por los siguientes **proyectos**:

Evaluación de la proteína Mx como herramienta biotecnológica en la mejora de la resistencia de peces cultivados a infecciones víricas. Instituto Andaluz de Biotecnología (2008-2009). BioAnd- 08/7/L12.

Caracterización funcional de la proteína Mx de lenguado (*Solea senegalensis*), proyectos de excelencia de la Junta de Andalucía (2010-2014) (P09-CVI-4579).

THE RESULTS DERIVED FROM THIS PhD THESIS HAVE BEEN PARTIALLY PUBLISHED IN:

PEER-REVIEWED JOURNALS:

Alvarez-Torres D, Bejar J, Collet B, Alonso MC, Garcia-Rosado E (2013). Structural and functional characterization of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) Mx promoter. Fish and Shellfish Immunology. 35, 1642-1648. (Annex 1)

Alvarez-Torres D, Alonso MC, Garcia-Rosado E, Collet B, Bejar J (2014). Differential response of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) Mx promoter to viral infections in two salmonid cell lines. Veterinary Immunology and Immunopathology. (*Submitted*, annex 2)

Alvarez-Torres D, Garcia-Rosado E, Fernandez-Trujillo MA, Bejar J, Alvarez MC, Borrego JJ, Alonso MC (2013). Antiviral specificity of the *Solea senegalensis* Mx protein constitutively expressed in CHSE-214 cells. Marine Biotechnology. 15, 125-132. (Annex 3)

INTERNATIONAL CONFERENCES:

Alvarez-Torres D, Fernandez-Trujillo MA, Alonso MC, Castro D, Borrego JJ, Garcia-Rosado E (2010). Specific antiviral activity of Senegalese sole Mx protein against different fish viruses. 8th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates. Santiago de Compostela (Spain) (poster communication).

Alvarez-Torres D, Garcia-Rosado E, Alonso MC, Collet B, Bejar J (2013). Characterization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) Mx promoter. First International Conference of Fish and Shellfish Immunology. Vigo (Spain) (poster communication).

Alvarez-Torres D, Podadera AM, Garcia-Rosado E, Collet B, Bejar J, Alonso MC (2013). Differences in the viral induction of the Senegalese sole Mx protein in RTG-2 and CHSE-214 cells. 16th E.A.F.P. International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Tampere (Finland) (poster communication).

NATIONAL CONFERENCES:

Alvarez-Torres D, Garcia-Rosado E, Fernandez-Trujillo MA, Castro D, Bejar J, Borrego JJ, Alonso MC (2010). Actividad antiviral de la proteína Mx de lenguado senegalés. VII Reunión Microbiología del Medio Acuático. Vigo (oral communication).

Alvarez-Torres D, Alonso MC, Garcia-Rosado E, Castro D, Borrego JJ, Bejar J (2012). Desarrollo de un sistema experimental para el estudio de la inducción de la expresión de la proteína Mx de lenguado senegalés. IX Congreso de Microbiología del Medio Acuático. Barcelona (oral communication).

Dedicado a todos los que han hecho posible este trabajo, en especial a mis directoras y tutora de tesis Julia, Esther y Mari Carmen, sin ellas este trabajo no hubiese sido posible. Agradecer especialmente al Dr. Juan José Borrego, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, y a la Dra. Dolores Castro por su ayuda, cariño y dedicación que siempre he recibido en todo momento.

ÍNDICE

	<u>PÁGINAS</u>
<u>RESUMEN</u>	1-10
<u>SUMMARY</u>	11-18
<u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	19-38
EL LENGUADO SENEGALÉS (<i>Solea senegalensis</i>):	21-22
CARACTERÍSTICAS GENERALES	
VIRUS QUE AFECTAN A LENGUADO SENEGALÉS	22-27
Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa	23-24
Virus de la Necrosis Hematopoyética Epizootica	24-25
Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral	26-27
EL SISTEMA INMUNE INNATO DE TELEÓSTEOS	27-35
El IFN I	28-30
Genes estimulados por IFN I	30-32
Proteínas Mx	32-35
LA PROTEÍNA Mx DE LENGUADO SENEGALÉS (SsMx)	36-38
<u>OBJETIVOS</u>	39-42
<u>AIMS</u>	43-46
<u>CAPÍTULO 1</u>	
<u>CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL</u>	47-126
<u>PROMOTOR DE <i>SsMx</i></u>	
INTRODUCCIÓN	47-50
MATERIAL Y MÉTODOS	51-66
SECUENCIACIÓN Y CLONACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN	51-54
<i>Mx</i> DE LENGUADO SENEGALÉS (<i>Solea senegalensis</i>) (<i>SsMx</i>)	
Obtención de la secuencia	51-52
Clonación	53-54

Índice

ANÁLISIS DEL MICROSATÉLITE DEL PROMOTOR DEL GEN <i>SsMx</i>	54-55
CONSTRUCCIONES DEL PROMOTOR EN EL VECTOR pGL4-Luc	55-58
Promotor completo y deleciones de posibles regiones reguladoras	55-57
Mutación puntual en la secuencia del ISRE1	57
Delección de la región rica en G-C	58
TRANSFECCIÓN CELULAR TRANSITORIA	59-60
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN <i>SsMx</i>	60-65
Actividad del promotor de <i>SsMx</i> en respuesta a poli I:C	60-62
Actividad del promotor de <i>SsMx</i> en respuesta a infecciones víricas	62-65
<i>Virus y cultivo celular</i>	62
<i>Diseño experimental</i>	63-64
Medida de actividad luciferasa	64-65
RESULTADOS	67-80
SECUENCIA Y ESTRUCTURA DEL PROMOTOR DE <i>SsMx</i>	67-69
Análisis de la variabilidad del microsatélite y caracterización de las poblaciones analizadas	68-69
ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE <i>SsMx</i> EN RESPUESTA A POLI I:C	69-74
Implicación de las secuencias ISRE en la actividad del promotor	71-73
Implicación de la región G-C en la actividad del promotor	74
ACTIVACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>SsMx</i> EN RESPUESTA A INFECCIONES VÍRICAS	75-80
DISCUSIÓN	81-90
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL PROMOTOR DE <i>SsMx</i>	81-85
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL PROMOTOR DE <i>SsMx</i>	86-88

RESPUESTA DEL PROMOTOR DE <i>SsMx</i> A INFECCIONES VÍRICAS	88-90
ANNEX 1	91-100
ANNEX 2	101-126
<u>CAPÍTULO 2</u>	
<u>ESPECIFICIDAD ANTIVIRAL DE LA PROTEÍNA Mx DE LENGUADO SENEGALÉS</u>	127-170
INTRODUCCIÓN	129-132
MATERIAL Y MÉTODOS	133-144
CULTIVOS <i>In vitro</i>	133-134
Cultivos celulares y virus	133
Determinación de la dosis infectiva viral	134
DESARROLLO Y ELECCIÓN DE UN CLON CELULAR QUE EXPRESA CONSTITUTIVAMENTE LA PROTEÍNA <i>SsMx</i>	134-136
CARACTERIZACIÓN DEL CLON CELULAR CHSE- <i>SsMx</i>	136-139
Morfología y curva de crecimiento	136-137
Transcripción del gen <i>SsMx</i>	137-138
Detección de la proteína <i>SsMx</i>	138-139
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL	139-144
Diseño experimental	139-140
Desarrollo de efectos citopáticos	140
Cuantificación de partículas víricas infectivas	140
Cuantificación de RNA viral mediante qPCR	150
Transcripción de genes <i>Mx</i>	143-144
RESULTADOS	145-154
OBTENCIÓN DE CLONES CELULARES	145-146
CARACTERIZACIÓN DEL CLON CELULAR CHSE- <i>SsMx</i>	146-148
Análisis de la morfología y crecimiento	146-147
Transcripción y expresión de <i>SsMx</i>	147-148
ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE <i>SsMx</i>	149-154
Evaluación del desarrollo de ECP y producción vírica	149-150

Cuantificación relativa de RNA viral	151-152
Análisis de la transcripción de los genes <i>Mx</i>	153-154
DISCUSIÓN	155-160
CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL DESARROLLADO	155-156
ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LA PROTEÍNA SsMx	156-160
ANNEX 3	161-170
<u>CHAPTER 3</u>	
<u>ROLE OF THE IFN I SYSTEM AGAINST VHSV INFECTION IN JUVENILE SENEGALESE SOLE</u>	171-194
INTRODUCTION	173-176
MATERIALS AND METHODS	177-182
VIRUS AND CELL CULTURE	177
EXPERIMENTAL DESIGN	177-179
RNA ISOLATION AND cDNA SYNTHESIS	179
QUANTIFICATION OF ISG TRANSCRIPTION AND VIRAL RNA	180-182
RESULTS	183-188
ISG TRANSCRIPTION AFTER VHSV INFECTION	183-184
EFFECT OF THE IFN I SYSTEM STIMULATED BY POLY I:C ON VHSV INFECTION	185-186
ISG TRANSCRIPTION IN POLY I:C INOCULATED SENEGALESE SOLE	187-188
DISCUSSION	189-194
VHSV INFECTION INDUCES MX, ISG15 AND PKR TRANSCRIPTION IN SENEGALESE SOLE	189-192
POLY I:C-STIMULATED IFN I SYSTEM PROTECTS SENEGALESE SOLE AGAINST VHSV INFECTION	192-193
VHSV INTERFERES WITH ISG INDUCTION PROMOTED BY POLY I:C	193-194

<u>GENERAL REMARKS</u>	195-204
<u>CONCLUSIONES</u>	205-208
<u>CONCLUSIONS</u>	209-212
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	213-236

RESUMEN

RESUMEN

La acuicultura es una actividad de gran interés económico y ecológico, que presenta un alto potencial de crecimiento, y cuyo desarrollo sostenible constituye la vía óptima de aprovechamiento de los recursos pesqueros sin perjuicio de las poblaciones naturales de las especies cultivadas. Hasta 1990 el cultivo de peces marinos en España estaba dominado por la dorada (*Sparus aurata*); sin embargo, la necesidad de diversificación ha llevado al cultivo de otras especies, entre las que destaca el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), que se ha convertido en una de las especies más prometedoras de la acuicultura del sur de Europa.

Como consecuencia del creciente desarrollo de la acuicultura han surgido una serie de problemas, entre los que destaca la aparición de brotes epizooticos de enfermedades infecciosas, que representan una de las mayores amenazas para el sistema comercial. Entre dichas enfermedades, las de etiología viral revisten gran trascendencia, debido a que: (i) provocan altas mortalidades; (ii) pueden inducir infecciones persistentes, lo que hace que los supervivientes de una epizootia puedan actuar como portadores asintomáticos eliminando partículas víricas durante largos periodos de tiempo; (iii) pueden producir infecciones duales, lo que afecta al diagnóstico y control de la enfermedad; y (iv) no existen tratamientos efectivos.

En los últimos años se ha detectado un número creciente de virus que infectan a peces cultivados. En el caso concreto del lenguado senegalés se ha descrito la susceptibilidad al Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), al Virus de la Enfermedad de Linfocistis (LCDV), al Virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV) y al Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV), a este último sólo en infecciones experimentales. Ante esta situación, resulta prioritario mejorar la resistencia de los animales a las infecciones víricas, por lo que es necesario conocer tanto los procesos patológicos como la respuesta inmune del hospedador.

El sistema inmune de teleosteos, al igual que el de vertebrados filogenéticamente superiores, está compuesto por el sistema inmune innato, natural o inespecífico, y el adquirido o específico. En peces, al contrario que en vertebrados superiores, el sistema inmune innato presenta una mayor importancia relativa que

el adaptativo, constituyendo la primera línea de defensa frente a infecciones víricas. El sistema inmune innato incluye, entre otros mecanismos, la producción de interferones (IFN), que son glicoproteínas (citoquinas) secretadas principalmente por células del sistema inmune en respuesta a una variedad de inductores, especialmente virus. En teleósteos se han detectado hasta la fecha dos tipos de IFN, el IFN tipo I (IFN I) y el IFN tipo II, siendo la inducción del IFN I en respuesta a las infecciones víricas la más estudiada. La síntesis de IFN I se produce rápidamente tras la infección vírica, induciendo, a su vez, la transcripción de genes estimulados por IFN (ISG), como *Mx*, *ISG15* y el gen que codifica a la Proteína Kinasa R (*PKR*), entre centenares de otros genes, en las células vecinas.

La síntesis de proteínas antivirales se produce tras la unión del IFN I a receptores específicos, lo que activa la tirosina quinasa 2 (TYK2) y la *Janus* quinasa (JAK1), que fosforilan las proteínas activadoras de la transcripción 1 y 2 (STAT1 y STAT2). Los STAT activados penetran en el núcleo celular y, asociados a factor regulador de la transcripción del interferón 9 (IRF9), se unen a los elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE), presentes en los promotores de los ISG. Algunos de los ISG identificados en peces son los que codifican las proteínas ISG15, PKR, *vig1*, una proteína similar a la proteína con motivos tripartitos de mamíferos (TRIM), y la proteína *Mx*. Todos los ISG mencionados incrementan su nivel de transcripción en respuesta tanto a la inducción con ácido poliinosinico-policitidílico (poli I:C), como a la infección por algunos virus; sin embargo, su actividad antiviral en peces sólo está demostrada en el caso de la PKR de platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*), la ISG15 de pez cebra (*Danio rerio*), que tiene actividad frente a distintos virus, y por último, las proteínas *Mx*, que han sido ampliamente estudiadas en diversas especies de teleósteos, y que tradicionalmente se han utilizado como modelo de actividad antiviral del sistema del IFN I, por lo que es el ISG en el que se centra esta tesis doctoral.

Las proteínas *Mx* son GTPasas de alto peso molecular pertenecientes a la superfamilia de las dinaminas que están ampliamente caracterizadas en mamíferos, ya que juegan un papel fundamental en la respuesta antiviral activada por el IFN I. Todas las GTPasas de gran tamaño tienen la capacidad de auto-ensamblarse formando oligómeros y cooperar en la hidrólisis de GTP. Las proteínas *Mx*

purificadas forman homo-oligómeros de alto peso molecular y se auto-ensamblan *in vitro* formando anillos o hélices, lo que parece ser crítico para su actividad GTPásica, su estabilidad, y el reconocimiento de las estructuras virales diana. Las proteínas Mx suelen presentar distintas isoformas que difieren tanto en su especificidad antiviral como en su localización intracelular. La localización diferencial de estas proteínas hace que necesariamente inhiban el ciclo vital del virus en diferentes fases.

Nuestro grupo de investigación ha clonado el cDNA de la proteína Mx de lenguado senegalés (SsMx), y ha confirmado mediante *Southern blot* la presencia de un solo gen *Mx* en el genoma de esta especie. Además, se han realizado estudios sobre su cinética de expresión en animales inoculados con poli I:C e infectados con IPNV, observándose en ambos casos un aumento significativo en la transcripción de este gen y la generación de un estado antiviral tras la inducción del sistema del IFN I mediante poli I:C.

A nivel funcional apenas existe información sobre las proteínas Mx en peces, así, la especificidad antiviral y el mecanismo de acción son aspectos parcialmente desconocidos. En cuanto a la información sobre los promotores de los genes *Mx* en peces, sólo se han descrito en algunas especies, determinándose que la regulación de la transcripción de los ISG es compleja, estando, además, involucrada directamente en la actividad antiviral mediada por el sistema del IFN I.

En relación a estos antecedentes, se propone como objetivo principal de esta tesis doctoral la caracterización funcional de la proteína SsMx, como modelo de la actividad del sistema mediado por IFN I. Para la consecución de este objetivo, se ha realizado el estudio de la regulación transcripcional de *SsMx*, lo que resulta esencial para entender las interacciones virus-hospedador que se establecen durante la infección vírica (capítulo 1 de la presenta tesis doctoral). Además, también se ha determinado el papel de la proteína SsMx frente a la infección vírica mediante el estudio *in vitro* de la especificidad antiviral (capítulo 2) y el estudio *in vivo* del papel del sistema del IFN I de lenguado senegalés frente a la infección con VHSV (capítulo 3). Todos los resultados obtenidos colaboran en el avance del conocimiento sobre la actividad de los ISG, lo que ayuda a asentar las bases para el

desarrollo de futuras estrategias encaminadas al control de las infecciones virales que afectan al cultivo intensivo de esta especie.

CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN *Mx* DE LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*)

Los estudios sobre los mecanismos involucrados en la regulación de la transcripción de genes *Mx* en teleósteos son aún escasos, ya que únicamente se han clonado y caracterizado los promotores de unos pocos de estos genes. Sin embargo, la caracterización de los elementos regulares implicados en la transcripción de los ISG en general, y de los genes *Mx* en particular, es imprescindible para determinar algunos de los factores implicados en la actividad antiviral de estas proteínas.

En el presente capítulo se ha obtenido la secuencia del promotor de *SsMx* mediante la técnica *Genome walking*, que permite conocer secuencias de DNA colindantes a una secuencia conocida. Este promotor presenta elementos característicos de los promotores de los ISG, aunque también muestra características únicas. Así, este promotor, junto al promotor de *Mx* de la platija japonesa, es el único promotor de *Mx* que contiene tres ISRE. Otra característica diferencial del promotor de *SsMx* es la presencia de una región rica en nucleótidos G-C cercana al codón de inicio de la transcripción, que incluye un sitio de unión al factor de transcripción SP1, por lo que parece que constituye el sitio de inicio de la transcripción. Además, esta región G-C contiene una región microsatélite, cuya variabilidad se ha estudiado en tres poblaciones de lenguado, encontrándose 4 alelos diferentes, lo que no había sido descrito en promotores de *Mx* en teleósteos hasta la fecha. Por otro lado, en el promotor de *SsMx* se ha identificado un sitio de activación de IFN gamma (GAS), cuya funcionalidad no ha sido estudiada en el presente trabajo, pero que constituye un elemento importante para estudios futuros.

La caracterización funcional del promotor de *SsMx* se ha realizado en las células gonadales de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, RTG-2) y células embrionarias de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*, CHSE-214), transfectadas transitoriamente con distintas construcciones insertas en el vector

pGL4.22 (pGL4-Luc), que expresa el gen de la luciferasa bajo el control de distintas regiones del promotor de *SsMx*. La actividad luciferasa se determinó en ambos tipos celulares después de distintos tiempos post-estimulación (p.e.) con poli I:C y después de la inoculación con distintas dosis de diferentes virus patógenos para peces, obteniéndose los valores de actividad a distintos tiempos post inoculación (p.i.).

La estimulación con poli I:C activó el promotor completo de *SsMx* en ambas líneas celulares, con un incremento máximo de la actividad luciferasa de 2,83 y 5,96 veces en células RTG-2 y CHSE-214, respectivamente. Este estudio constituye la primera referencia de inducción de un gen *Mx* en células de especies de peces no relacionadas filogenéticamente. Además, se estudió la actividad luciferasa tras la inducción con poli I:C en células transfectadas con las distintas construcciones del promotor de *SsMx* en el vector pGL4-Luc. Los resultados indicaron que el ISRE1, cercano al codón de inicio de la traducción, es fundamental para la actividad del promotor, mientras que los ISRE2 e ISRE3 contribuyen parcialmente a su actividad. Para confirmar la implicación del ISRE1 en la actividad del promotor se introdujo una mutación puntual en su secuencia, lo que provocó la desaparición total de su actividad, confirmando la importancia de esta región en la regulación de la actividad del promotor de *SsMx*. Del mismo modo, la delección de la región rica en nucleótidos G-C también provoca pérdida de la actividad del promotor de *SsMx*, por lo que esta región está involucrada en el control de la transcripción de *SsMx* al mismo nivel que lo está el ISRE1.

La respuesta del promotor frente a infecciones víricas se estudió en células RTG-2 y CHSE-214 transfectadas transitoriamente con la construcción que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor completo de *SsMx*. Dichas células fueron inoculadas con IPNV, VHSV y el Virus de la Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHNV) a diferentes dosis. Los resultados mostraron una inducción diferencial dependiendo del virus y/o tipo celular. Concretamente, la infección con EHNV indujo el promotor de *SsMx* sólo en células CHSE-214, mientras que la infección con VHSV produjo un incremento en la actividad luciferasa sólo en células RTG-2. La infección con IPNV no incrementó la actividad del promotor en ninguno de los dos tipos celulares ensayados. Estos resultados

ponen de manifiesto la existencia de factores celulares específicos en el control de la ruta de señalización del IFN I, y la falta de inducción del promotor de *SsMx* frente a la infección por algunos virus, lo que sugiere la existencia de mecanismos de actividad antagonista en algunos de los virus ensayados frente al sistema del IFN I, estando involucrados en el éxito de la infección vírica.

CAPÍTULO 2: ESPECIFICIDAD ANTIVIRAL DE LA PROTEÍNA Mx DE LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*)

La especificidad antiviral de las proteínas Mx depende de distintos factores, como el tipo celular, el cual indica diferencias en la ruta de inducción del gen *Mx*; la presencia de estrategias antagonistas virales frente al sistema del IFN I; y de mecanismos de acción específicos de cada proteína Mx. Por este motivo, se hace necesario el estudio de la actividad antiviral de cada proteína Mx en particular.

La especificidad antiviral de la proteína SsMx se ha determinado en un clon de células CHSE-214 (CHSE-SsMx), que expresa la proteína recombinante SsMx de forma constitutiva, homogénea y estable. Este tipo de sistemas *in vitro* son herramientas adecuadas para estudiar la actividad antiviral de estas proteínas, ya que en ellos la expresión de *SsMx* es independiente de los mecanismos de inducción del IFN I, y en consecuencia, su actividad depende solamente de los virus considerados en el estudio. El clon desarrollado en este trabajo también representa una herramienta válida para estudiar la proteína SsMx a nivel funcional.

La especificidad antivírica de SsMx se determinó frente a virus patógenos de peces capaces de multiplicarse en células CHSE-214 y que presentan distintos tipos de material genético. Concretamente se utilizaron el Virus de Siluros Europeos (ESV, familia *Iridoviridae*), el VHSV (familia *Rhabdoviridae*), y el IPNV (familia *Birnaviridae*).

En los estudios realizados se detectó una fuerte actividad antiviral de SsMx frente a los virus IPNV y VHSV, observándose una disminución en la producción vírica de hasta 100 veces en células CHSE-SsMx inoculadas con IPNV y VHSV a las 72 h p.i. con respecto a las células control. Además, se produjo una disminución en los valores relativos del RNA viral que codifica la poliproteína (para IPNV) a

las 48 h p.i., y la nucleoproteína (en el caso de VHSV) a las 24 y 48 h p.i. en células que expresan la proteína recombinante SsMx con respecto a las células control. De este modo, la actividad antiviral de SsMx frente a estos virus parece ocurrir, al menos en parte, mediante una reducción de la síntesis del RNA viral. Por otro lado, la proteína SsMx no inhibe la replicación de ESV, ya que no se observaron diferencias significativas ni en el título vírico, ni en la transcripción del gen que codifica la proteína principal de la cápside de ESV en las células que expresan la proteína SsMx con respecto a las que no. Los resultados obtenidos indican que SsMx no tiene actividad antiviral frente a ESV, aunque debe seguirse profundizando en el estudio de la actividad antiviral del sistema del IFN I completo frente a este virus.

CAPÍTULO 3: PAPEL DEL SISTEMA DEL IFN I FRENTE A LA INFECCIÓN CON VHSV EN JUVENILES DE LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*)

En el capítulo 2 del presente trabajo se ha demostrado la actividad antiviral de la proteína SsMx frente a VHSV *in vitro*. En el presente capítulo se han realizado experimentos *in vivo* con el fin de determinar el papel del sistema del IFN I de lenguado senegalés frente a la infección con distintos aislados de VHSV.

La estimulación del sistema del IFN I por la infección vírica se evaluó mediante la cuantificación relativa de la transcripción de diferentes ISG (*Mx*, *ISG15* y *PKR*) en riñón cefálico de animales inyectados de forma intraperitoneal con dos aislados diferentes de VHSV a una dosis subletal de (10^4 TCID₅₀/pez): (i) un aislado marino, altamente patógeno para lenguado, y (ii) un aislado de agua dulce, que no causa o causa baja mortalidad en esta especie. La inducción de los tres ISG estudiados fue similar en respuesta a la infección por ambos aislados en todos los tiempos analizados, obteniéndose niveles relativos de transcripción máximos y más tempranos para el gen *ISG15*. Los valores relativos de RNA viral (nucleoproteína) en el riñón cefálico de los animales inoculados con el aislado de VHSV patógeno es superior a los valores relativos obtenido en peces inoculados con el aislado no patógeno a las 12, 24, y 48 h p.i. (etapas tempranas de la infección). Estos resultados

Resumen

sugieren que el aislado no patógeno induce la transcripción de los ISG estudiados al mismo nivel que el aislado patógeno con un menor nivel de replicación.

El papel protector del sistema del IFN I frente a la infección con VHSV se determinó en juveniles de lenguado inoculados con poli I:C. Trascurridas 24 h estos animales se inocularon con una dosis letal de un aislado de VHSV patógeno para lenguado (10^5 TCID₅₀/pez). Los controles utilizados fueron: (i) animales inoculados con VHSV sin previa estimulación con poli I:C, (ii) animales inoculados sólo con medio L-15 y (iii) animales inoculados únicamente con poli I:C.

La actividad antiviral del sistema del IFN I se determinó mediante el cálculo de la mortalidad acumulada a los 30 d p.i., la determinación de la productividad vírica en bazo y corazón, y la cuantificación de RNA viral en riñón cefálico a distintos tiempos p.i. Los resultados mostraron una drástica disminución de la mortalidad, así como de la síntesis de RNA viral y de la productividad vírica en el grupo estimulado con poli I:C con respecto al grupo no estimulado, lo que indica que el sistema del IFN I de lenguado protege frente a la infección por VHSV. Para determinar el papel del sistema del IFN I en la protección observada se cuantificó la transcripción de *Mx*, *ISG15* y *PKR* en riñón cefálico, detectándose un aumento del nivel de transcripción de los tres ISG en respuesta tanto a poli I:C como a VHSV. Además, la infección con VHSV en lenguados previamente estimulados con poli I:C causó una disminución en la transcripción temprana de los ISG analizados con respecto al control inoculado únicamente con poli I:C. Estos resultados indican una posible actividad antagonista de VHSV frente al sistema del IFN I de lenguado que afectaría a la transcripción de los ISG analizados, al menos en las primeras etapas de la infección vírica.

SUMMARY

SUMMARY

INTRODUCTION

Type I interferon (IFN I) plays a key role in the innate immune system against viral infections in fish, inducing the expression of IFN-stimulated genes (ISGs) and promoting an antiviral state. One of the most studied ISG is Mx, which plays an important role within the fish antiviral immune system, and has been traditionally used as a marker of the IFN I activity.

Mx proteins are dynamins involved in intracellular membrane remodeling and intracellular trafficking. These proteins have been detected in mammals, birds, fish, and invertebrates. In fish, a variable number of isoforms have been recorded, depending on the fish species considered. The antiviral activity of the piscine Mx proteins depends on the fish species, the *Mx* isoform and the virus considered.

The gene encoding the Mx protein of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) (*SsMx*), one of the most important fish species in the Spanish aquaculture, has been recently cloned and characterized. Senegalese sole has only one *Mx* isoform, which shows antiviral activity against the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV); however, since this fish species can be affected by other viral pathogens, its antiviral activity should be tested against a higher number of fish viruses.

The expression of ISGs is under a complex spatial and temporal regulation, responsible for the establishment of an antiviral state mediated by the IFN I system. Hence, the study on the regulation of the IFN I response is essential to understand virus-host interactions. In addition, the evaluation of fish ISG role against viral infections, their antiviral specificity, as well as their mechanisms of action and transcriptional regulation, may help to develop strategies to control viral infections affecting the aquaculture industry.

CHAPTER 1:

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE SENEGALESE SOLE (*Solea senegalensis*) *Mx* GENE PROMOTER

The mechanisms involved in the transcriptional regulation of fish *Mx* genes are poorly understood, as only few *Mx* promoters have been cloned and characterized to date. Likewise, the study on the *Mx* gene transcription regulation in fish is of great importance, since some *Mx* proteins show antiviral activity, and their expression is induced by a wide range of viruses. Therefore, the characterization of the regulatory mechanisms controlling the transcription of *Mx* genes could significantly contribute to understand the virus-host interaction in fish. In this chapter, the structural and functional characterization of the Senegalese sole *Mx* promoter has been performed using a reporter system that expresses the luciferase gene under the control of the *SsMx* promoter.

The sequence of *SsMx* promoter was obtained by Genome walking. This promoter, along with the Japanese flounder *Mx* promoter, is the only one in fish that contain three interferon-stimulated response elements (ISREs). Another specific feature of the *SsMx* promoter is the presence of a 24-bp G-C island, sited close to the ATG codon, which includes one Sp1 binding site, and may be the transcriptional start site. This G-C island is a variable microsatellite, which has never been reported in teleost *Mx* promoters to date. Furthermore, this promoter also contains a gamma interferon activation site (GAS) element. Therefore, the presence of the above described elements confirms that *SsMx* promoter shows the typical ISG promoter structure.

For the functional characterization, the salmonid cell lines CHSE-214 and RTG-2 were transiently transfected with a construct consisting of the *SsMx* promoter linked to a luciferase reporter gene (in the pGL4.22 vector). The ability of the *SsMx* promoter to drive the expression of luciferase was determined in both systems after stimulation with polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) and after inoculation with different doses of several fish viruses. The study was performed at different times post-infection (p.i.).

A clear activation of the *SsMx* promoter was recorded after poly I:C stimulation in both cell lines (maximum fold induction: 2.83 and 5.96, for RTG-2 and CHSE-214 cells, respectively). This PhD Thesis constitutes the first study reporting the induction of an *Mx* gene transcription by IFNs from fish species not phylogenetically related (salmonids). In addition, in order to determine the role of each ISRE in the activation of the *SsMx* promoter, several constructs containing different deletions were obtained. The results indicated that the ISRE1, close to the start codon, is crucial for the *SsMx* promoter activity, whereas ISRE2 and ISRE3 show a minor additive effect. To confirm the main implication of the ISRE1 in the activity of the *SsMx* promoter, a point mutation was introduced in this sequence. This change totally abolished the promoter activity, confirming the essential role of the proximal ISRE in the *SsMx* promoter response. Similarly, the poly I:C stimulation of cells transfected with a *SsMx* promoter construct lacking the C-G microsatellite demonstrated that this region is involved in the *SsMx* transcriptional control at the same level as the ISRE1.

In order to study the response of the *SsMx* promoter to viral infections, CHSE-214 and RTG-2 cells transiently transfected with the complete *SsMx* promoter construct were inoculated with the IPNV, the Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) and the Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus (EHNV). The results obtained were different depending on the cell line considered. Specifically, EHNV infection induced the *SsMx* promoter only in CHSE-214 cells, whereas the infection with VHSV induced the promoter only in RTG-2 cells. The infection with IPNV did not result in the induction of the *SsMx* promoter in any of the cell lines considered. These results indicate the relevance of specific cellular factors on the control of the IFN I signalling pathway, and suggest the existence of viral antagonistic activity, which is probably involved in the success of the viral evasion strategies.

Summary

CHAPTER 2:

ANTIVIRAL SPECIFICITY OF THE SENEGALESE SOLE (*Solea senegalensis*) Mx PROTEIN

The antiviral specificity of fish Mx proteins may depend on several factors, such as the cell type, which may indicate differences in the Mx induction pathway and/or the presence/absence of specific receptors in the cell surface; the presence of viral antagonistic strategies against the IFN I system; and the specific mechanism of each Mx protein, which may be related to the antiviral specificity. Therefore, the antiviral specificity of each particular Mx protein must be specifically determined.

Transfected cells expressing exogenous Mx proteins are adequate tools to study the antiviral activity of these proteins, since in these *in vitro* systems their expression does not depend on IFN-induced mechanisms, and, in consequence, their activity only depends on the virus considered. Thus, in order to study the SsMx antiviral specificity, a stable monoclonal population of CHSE-214 cells expressing SsMx (CHSE-SsMx) was established and characterized. The stable transgenic clone developed in this study represents a valuable tool to examine the SsMx protein at a functional level.

CHSE-SsMx cells have been used to test the antiviral activity of SsMx against RNA and DNA viruses pathogenic to fish: IPNV (*Birnaviridae*), VHSV (*Rhabdoviridae*) and the European Sheatfish Virus (ESV, *Iridoviridae*). A strong inhibition of IPNV and VHSV replication was observed in SsMx-expressing cells, as has been shown by the virus yield reduction and the decrease in the synthesis of the viral RNA encoding the polyprotein (for IPNV) at 48 h p.i., and the nucleoprotein (for VHSV) at 24 and 48 h p.i. The titres of both viruses replicating on SsMx-expressing cells were at least 100 times lower than those recorded on control cells. Therefore, the activity of SsMx against these viruses seems to occur by a reduction in the synthesis of the viral RNA.

On the other hand, SsMx did not inhibit ESV replication, since no significant differences were observed between SsMx-expressing and control cells regarding the virus yield or the major capsid protein gene transcription. The results obtained

showed the lack of SsMx activity against this virus. However, an anti-ESV activity by the complete IFN I pathway of Senegalese sole cannot be ruled out.

CHAPTER 3:

ROLE OF THE IFN I SYSTEM AGAINST VHSV INFECTION IN JUVENILE SENEGALESE SOLE (*Solea senegalensis*)

The antiviral activity of the SsMx protein against VHSV infection has been demonstrated in this PhD Thesis using an *in vitro* approach (see Chapter 2). For this reason, in the present chapter several *in vivo* assays have been performed in order to determine the role of the IFN I system of Senegalese sole against the infection by pathogenic and non-pathogenic VHSV isolates. In addition, a protection assay has been conducted to determine if poly I:C is able to induce an antiviral state against the pathogenic VHSV isolate.

The IFN I system stimulation by the viral infections has been evaluated by the relative quantification of the transcription of several ISGs, such as *Mx*, *ISG-15* and *PKR*. These analyses have been performed in head kidney samples from animals intramuscularly injected with two different VHSV isolates (10^4 TCID₅₀/fish): (i) a marine isolate highly pathogenic to sole, and (ii) a fresh-water isolate causing very low or no mortality in this fish species (non-pathogenic isolate). The induction of the three ISGs tested was similar regardless of the viral isolate considered at all times p.i. analyzed, and the maximum level of transcription was always obtained for the *ISG-15* gene. The quantitative analysis of viral RNA (nucleoprotein) showed a higher level of viral genome in head kidney samples from animals inoculated with the pathogenic VHSV isolate compared to the viral genome level in fish inoculated with the non-pathogenic isolate at 12, 24 and 48 h p.i. Taken together, these results suggest that the non-pathogenic isolate induces similar ISG response at lower level of replication.

To study the protective role of the innate immune system against VHSV infection, the IFN I-mediated system of juvenile Senegalese sole was stimulated by intra-muscular injection of poly I:C. These animals were maintained for 24 h, and subsequently challenged by intramuscular injection with the pathogenic VHSV isolate (2×10^5 TCID₅₀/fish). The cumulative mortality at the end of the experiment

Summary

(30 days p.i.) in the control group (L-15-VHSV) was 68%, whereas in the poly I:C stimulated group (poly I:C-VHSV) was reduced to 5%. Thus, poly I:C promoted an antiviral state that protected the fish from the VHSV infection. This protection interfered with VHSV replication, as a decrease of the viral RNA was recorded in animals sampled from the poly I:C-VHSV group compared to viral RNA in control fish (L-15-VHSV group) at all sampling times analyzed.

In addition, the quantitative analysis of the *Mx*, *ISG-15* and *PKR* genes transcription showed that VHSV interfered negatively with the early ISG stimulation triggered by poly I:C (at 3-6 h p.i.). These results suggest that the marine VHSV isolate used in this study may have mechanisms to evade or limit the innate host defenses, increasing the preferential transcription and translation of its own genes in the early infection. However, the IFN system is recovered at 12-24 h p.i., as the transcription level of the three ISGs studied was quantitatively similar in the poly I:C-VHSV and L-15-VHSV groups at those times p.i.

These results support the suitability of ISG expression analysis, including *Mx*, as a marker to study the virus-host interaction in fish.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

EL LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*): CARACTERÍSTICAS GENERALES

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) es una especie piscícola bentónica que se distribuye por el mar Mediterráneo y el océano Atlántico. Pertenece a la familia *Soleidae*, y se encuentra dentro del orden Pleuronectiformes, conocido comúnmente como “peces planos”.

El cultivo del lenguado se inició en los años 80 en España y Portugal con la introducción de dos especies: el lenguado común (*Solea solea*) y el lenguado senegalés (Person-le-Ruyet et al., 1980). Ambas especies presentan un ciclo de vida muy similar (Russell, 1976), el lenguado senegalés posee importantes ventajas para su cultivo, ya que alcanza mayor peso y talla que el lenguado común en condiciones controladas de temperatura (Olmedo et al., 2003; Rodriguez y Souto, 2003). La producción española de esta especie fue de 194 toneladas en 2012 un 176,3% más que en 2011 (110 toneladas) y un 270,9% más que en 2008 (55 toneladas), siendo las principales comunidades productoras Galicia, Canarias y Andalucía (APROMAR, 2013). De este modo, el lenguado senegalés se ha convertido en una de las especies piscícolas con mayor importancia a nivel de rentabilidad en la acuicultura española, alcanzando en 2012 el mayor valor económico por Kg (Tabla 1).

Tabla 1. Producción en toneladas, valor por Kg y valor total en euros de las especies de teleósteos cultivadas en España durante 2012 (APROMAR, 2013).

	Producción (Toneladas)	Precio (€/Kg)	Valor total (€)
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	16.930	5,00	84.650.000
Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	7.755	9,14	70.880.700
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	14.367	4,96	71.260.320
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	2.879	4,20	12.091.000
Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	402	8,10	3.256.200
Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	194	11,00	1.210.000
Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	200	9,60	1.920.000

Introducción general

Las principales causas por las que el cultivo de lenguado senegalés no consigue su despegue definitivo son la dificultad de controlar las condiciones de reproducción en cautividad, así como la incidencia de enfermedades infecciosas. Dentro de estas enfermedades, las de origen vírico presentan una especial relevancia debido a diversos factores, entre los que destaca la falta de tratamientos antivirales, haciéndose, por tanto, necesario el desarrollo de medidas de prevención y control. En este sentido, resulta esencial conocer los mecanismos de defensa de esta especie frente a infecciones víricas.

VIRUS QUE AFECTAN A LENGUADO SENEGALÉS

Las condiciones de cultivo intensivo en las instalaciones de acuicultura suponen una importante fuente de estrés para los animales, lo que puede ocasionar situaciones de inmunodepresión que favorezcan la aparición de enfermedades infecciosas (Bly et al., 1997). Aunque las enfermedades de origen vírico presentan una baja incidencia, constituyen uno de los principales problemas en el cultivo del lenguado y de otras especies de teleósteos, debido a las altas mortalidades que provocan y a la inducción de infecciones persistentes, lo que conlleva la aparición de portadores asintomáticos que pueden convertirse en reservorios que dispersan partículas víricas durante largos períodos de tiempo. Todo ello, unido a la escasez de tratamientos antivirales, hace que estas enfermedades puedan provocar la pérdida de hasta el 100% de la producción (Masoero et al., 1986; Wolf, 1988; Meyer, 1991).

Los virus descritos hasta la fecha que pueden afectar al lenguado senegalés son el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV, familia *Birnaviridae*), el Virus de la Enfermedad de Linfocistis (LCDV, familia *Iridoviridae*), el Virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV, familia *Nodaviridae*) y el Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV, familia *Rhabdoviridae*). A continuación se realiza una breve descripción de las especies víricas que se utilizan en el presente trabajo: IPNV, el virus que causa la enfermedad de la Necrosis Hematopoyética Epizootica (EHN) y VHSV. Aunque EHN no causa enfermedad en lenguado, en este trabajo se ha utilizado como modelo de virus DNA.

Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa

Es el agente causal de la necrosis pancreática infecciosa (IPN), enfermedad de amplia distribución en los países productores de salmónidos de América, Europa y Asia, aunque también se ha descrito en peces marinos cultivados. Así, en España este virus se ha detectado en lenguado senegalés, rodaballo (*Psetta maxima*), urta (*Pagrus auriga*) y pargo (*Pagrus pagrus*) (Ledo et al., 1990; Novoa et al., 1991; 1993; Rodríguez Saint-Jean et al., 1997; Cutrin et al., 2000; Lopez-Jimena et al., 2010). Los síntomas descritos en salmónidos y peces marinos son similares, y consisten en: 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 es un virus icosaédrico, desnudo, de 60 nm de diámetro (Figura 1.A), perteneciente a la familia *Birnaviridae*, cuyo genoma consta de dos segmentos, A y B, de RNA bicatenario (dsRNA) (Figura 1.B).

El segmento A contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF). El de mayor tamaño codifica el precursor de la poliproteína (PP), de 106 kDa, que se escinde cotraduccionalmente por acción de una proteasa viral para generar tres polipéptidos: pVP2 (precursor de la proteína principal de la cápside, VP2), VP3 (proteína minoritaria de la cápside, implicada en el empaquetamiento del RNA viral), y VP4 (proteína no estructural con actividad autoproteásica, responsable de la digestión de la poliproteína). El ORF de menor tamaño se solapa con el anterior en el extremo 5', y codifica un polipéptido no estructural rico en arginina (VP5) (Figura 1.B), de 17 kDa, que está involucrada en mecanismos de evasión del sistema inmune innato (Suzuki et al., 1997; Skjesol et al., 2011).

El segmento B consta de un único ORF que codifica el polipéptido VP1, que se corresponde con una RNA polimerasa dependiente de RNA (Duncan et al., 1991). VP1 se encuentra en el virión libre o unido covalentemente al extremo 5' de ambos segmentos de RNA genómico (VPg) (Song et al., 2005), e interviene en la síntesis de mRNA y en el ensamblaje de la partícula viral (Maraver et al., 2003).

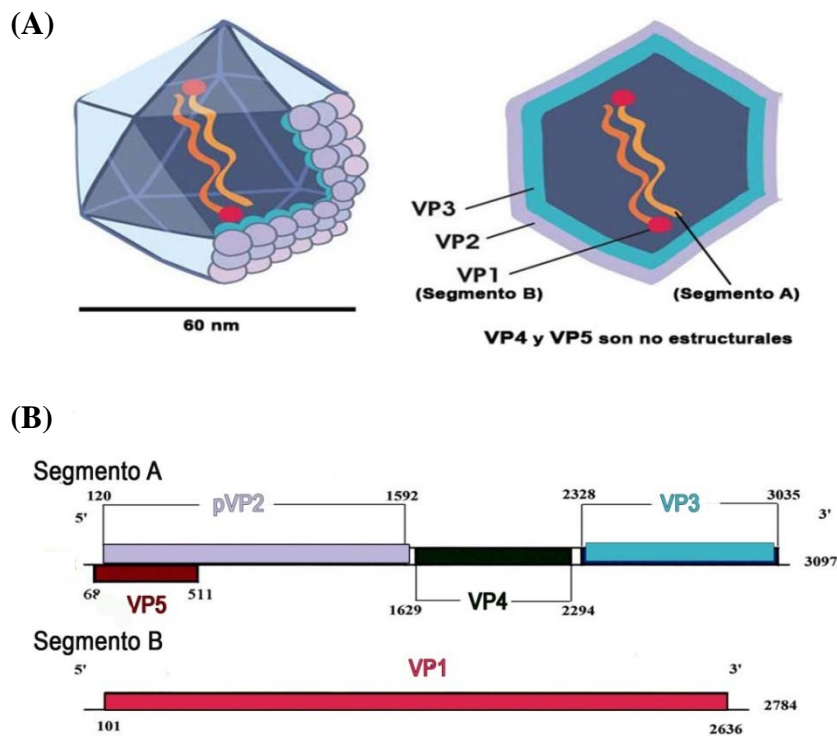


Figura 1. (A) Estructura tridimensional de IPNV, las proteínas VP4 y VP5 no forman parte del virión, la proteína VP1 se encuentra unida a los extremos 5' de cada segmento. (B) Mapa genómico de IPNV (Rodríguez Saint-Jean et al., 2003).

Virus de la Necrosis Hematopoyética Epizoótica

Aunque no se ha demostrado que el EHNV afecte al lenguado senegalés, sí parece ser una amenaza para otras especies de peces cultivados como el bagre (*Ictalurus melas*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), o el rodaballo (Langdon et al., 1988; Pozet et al., 1992; Bloch y Larsen, 1993). EHNV es el primer aislado vírico reconocido como agente causal de la enfermedad de la necrosis hematopoyética epizoótica (EHN) (Langdon y Humphrey, 1987), aunque posteriormente se han descrito síndromes similares producidos por otros virus como el Virus Europeo de pez gato (*Ictalurus melas*) (ECV) (Pozet et al., 1992) y el Virus de Siluros Europeos (*Silurus glanis*) (ESV) (Ahne et al., 1989; 1990). EHN muestra signos clínicos generales. Así, en los peces muertos suelen aparecer lesiones en la

piel, aletas y branquias, y en peces moribundos también se ha observado desorientación y un oscurecimiento de la piel (Reddacliff y Whittington, 1996).

EHNV, ECV y ESV pertenecen al género *Ranavirus*, familia *Iridoviridae*, cuya especie tipo es al Virus 3 de Rana (FV3) (Chinchar et al., 2005). Los virus pertenecientes al género *Ranavirus* presenta viriones icosaédricos de 150 a 180 nm de diámetro (Figura 2.A), cuya cápside proteica está constituida fundamentalmente por la proteína principal de la cápside (MCP). Su genoma consta de una molécula de DNA lineal de doble cadena (dsDNA) de aproximadamente 150-170 kb (Figura 2.B). Toda la estructura puede estar rodeada por una envuelta lipoproteica externa, adquirida a partir de la célula hospedadora durante el proceso de liberación (Braunwald et al., 1985), cuya presencia incrementa la especificidad de la infección, aunque no resulta esencial para mantener la infectividad vírica. Su ciclo de replicación se produce tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula infectada, siendo en el citoplasma donde se produce el ensamblaje de la cápside viral (Chinchar et al., 2005).

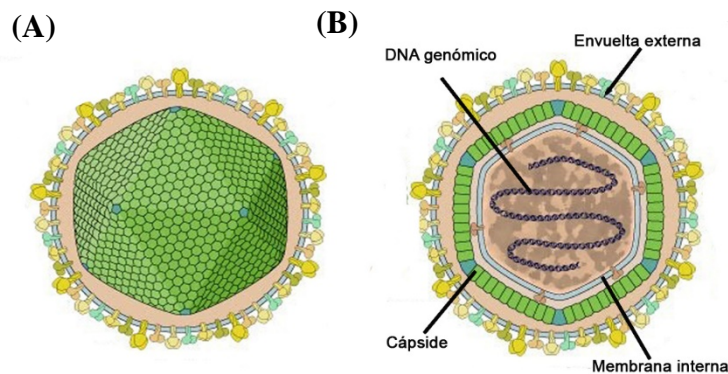


Figura 2. Representación de un iridovirus. (A) Esquema tridimensional. (B) Estructura y organización del virión (modificado de ViralZone, Swiss institute of bioinformatics).

Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral

Este virus es el agente causal de la septicemia hemorrágica viral (VHS), cuyos síntomas más comunes son anorexia, lentitud de movimientos, letargia, oscurecimiento de la piel, palidez de las branquias, anemia, petequias y hemorragias en los ojos, en la base de las aletas y, en algunas ocasiones, en la piel, presentando con frecuencia exoftalmia bilateral o unilateral y edemas (Wolf, 1988). Se ha aislado, al menos, de 48 especies de peces, tanto marinas como de agua dulce (Skall et al., 2005), habiéndose descrito 11 especies susceptibles bajo condiciones experimentales. La trucha arcoíris se encuentra entre los hospedadores más susceptibles.

Aunque esta enfermedad no se ha detectado en poblaciones cultivadas de lenguado senegalés, recientemente se ha demostrado su susceptibilidad a un aislado marino de VHSV mediante infección experimental (Lopez-Vazquez et al., 2011), por lo que este virus podría ser un patógeno potencial para esta especie.

VHSV, familia *Rhabdoviridae* (Walker et al., 2000), presenta como material genético una molécula de RNA monocatenario (ssRNA) de polaridad negativa (11-12 kb) que contiene seis ORF (Figura 3.A) que codifican la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (M1), la proteína matriz (M2), la glicoproteína de la envuelta (G), la proteína no estructural (NV), y la polimerasa asociada al virus (L) (Schutze et al., 1999). Los viriones tienen un tamaño aproximado de 70 nm de diámetro y 180 nm de longitud (Figura 3.B). Están constituidos por un *core* ribonucleoproteico (RNP) formado por el RNA rodeado por un alto número de moléculas de la proteína N y, en menor medida, por L, y envuelto por una bicapa lipídica que incluye la glicoproteína viral G. La fosfoproteína (20-30 kDa) es un cofactor de la polimerasa viral requerido para la transcripción y replicación, que en células infectadas se asocia a N favoreciendo la encapsidación. La proteína M2 (20-30 kDa) es un componente interno del virión que une el *core* RNP al dominio citoplasmático de la G. La proteína NV sólo está presente en células infectadas, y su función no está bien estudiada, aunque su presencia mejora la multiplicación vírica y parece estar involucrada en procesos de evasión del sistema inmune innato por parte de VHSV (Biacchesi et al., 2000; Thoulouze et al., 2004, Kim y Kim, 2012).

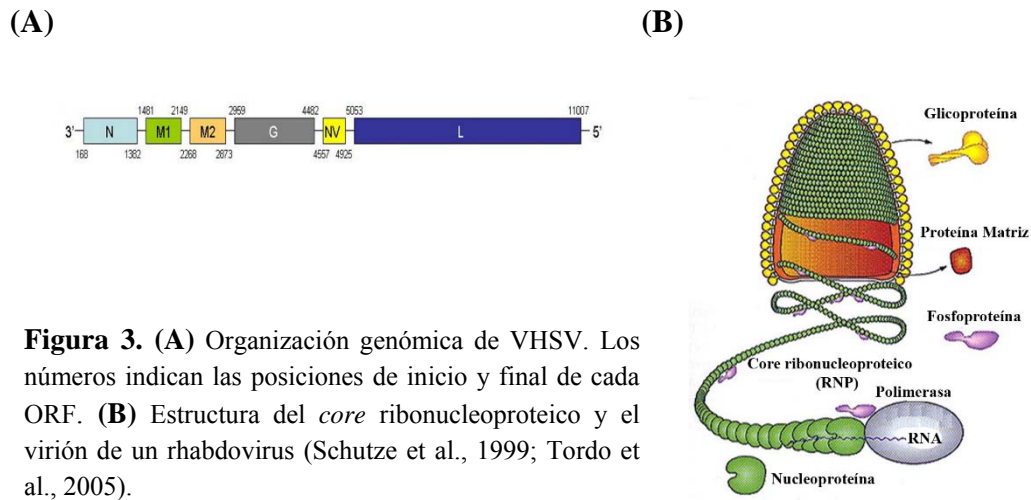


Figura 3. (A) Organización genómica de VHSV. Los números indican las posiciones de inicio y final de cada ORF. (B) Estructura del *core* ribonucleoproteico y el virión de un rhabdovirus (Schutze et al., 1999; Tordo et al., 2005).

EL SISTEMA INMUNE INNATO DE TELEÓSTEOS

El sistema inmune de teleosteos, al igual que el de vertebrados superiores, está compuesto por el sistema inmune innato, natural o inespecífico, y el adquirido o específico. En peces, al contrario que en vertebrados superiores, la importancia relativa del sistema inmune innato es muy superior a la del adaptativo, ya que estos animales presentan una menor diversidad de anticuerpos, poca memoria inmunológica, y una proliferación de linfocitos lenta (Magnadottir, 2006). Por el contrario, la respuesta inmune innata es rápida, inespecífica, muy poderosa, versátil y más independiente de la temperatura que en vertebrados superiores.

El sistema inmune innato incluye, entre otros mecanismos, la producción de interferones (IFN) (Samuel, 2001). Los interferones son glicoproteínas (citoquinas) secretadas principalmente por células del sistema inmune en respuesta a una variedad de inductores, especialmente virus. Presentan propiedades antivirales, antiproliferativas e inmuno-moduladoras (Samuel, 2001; Kontsek et al., 2003; Pestka et al., 2004). En mamíferos, los IFN se dividen en tres grupos diferentes, IFN tipo I (IFN I), IFN tipo II (IFN γ) e IFN tipo III, que se diferencian en base a su función biológica, estructura y tipo de receptor. El IFN tipo II está implicado tanto en la actividad del sistema inmune innato como en la respuesta del sistema adaptativo; sin embargo, los IFN I y tipo III forman parte únicamente del sistema

Introducción general

inmune innato, y su expresión se induce en respuesta a las infecciones víricas (revisado en Langevin et al., 2013a).

En teleósteos se han detectado hasta la fecha dos tipos de IFN (IFN I y tipo II) que, aunque comparten la misma nomenclatura que los IFN de mamíferos, presentan distintas características biológicas y estructurales. El número de genes de IFN I inducidos por infección vírica en peces es variable, así se ha descrito un único gen en el pez globo (*Takifugu rupries*) y en el pez medaka (*Oryzias latypes*), cuatro genes en el pez cebra (*Danio rerio*) y hasta once genes en salmón atlántico (*Salmo salar*) (revisado en Sun et al., 2009; Langevin et al., 2013a). En pez cebra (tomado como modelo) el IFN I se subdivide en dos grupos, que se diferencian en base al tipo de receptor al que se unen y al número de residuos de cisteína unidos por puentes disulfuro que contiene su secuencia (2 en el IFN I grupo 1, y 4 en el IFN I grupo II) (revisado en Langevin et al., 2013a). En salmón atlántico, el IFN inducido por infección vírica y/o el ácido poliinosinico-policitidílico (poli I:C) se divide en 4 subgrupos (IFNa, IFNb, IFNc e IFNd), incluyéndose los IFNa e IFNd dentro del grupo I y los IFNb e IFNc dentro del grupo II (Aggad et al., 2009).

El IFN juega un papel fundamental en la primera línea de defensa frente a infecciones víricas en peces (Jensen y Robertsen, 2002; Rodriguez Saint-Jean y Perez-Prieto, 2006; Zhang et al., 2007), por lo que nos vamos a centrar en su estudio.

El IFN I

En vertebrados superiores, la expresión de IFN I se induce tras la detección celular temprana de patrones moleculares asociados a los patógenos víricos (VAMP), tales como moléculas de dsRNA que se producen durante el ciclo de multiplicación vírica (Jacobs y Langland, 1996; Goodbourn et al., 2000), ssRNA viral, DNA viral, imidazoquinolinas (immunomoduladores), motivos de secuencias de DNA ricas en Citosina y Guanina no metiladas (CpG-DNA), que pueden encontrarse en el genoma de virus y bacterias, o por el poli I:C, un análogo sintético del dsRNA muy utilizado en estudios *in vitro* e *in vivo* (revisado en Robertsen, 2008) (Figura 4).

La detección de VAMP corre a cargo de un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Takeuchi y Akira, 2007). Los principales PRR en células nucleadas de mamíferos son la RNA helicasa RIG-1, la proteína del gen asociado a la diferenciación del melanoma 5 (MDA5), que reconocen ssRNA o dsRNA (Figura 4), y los receptores tipo Toll (TLR).

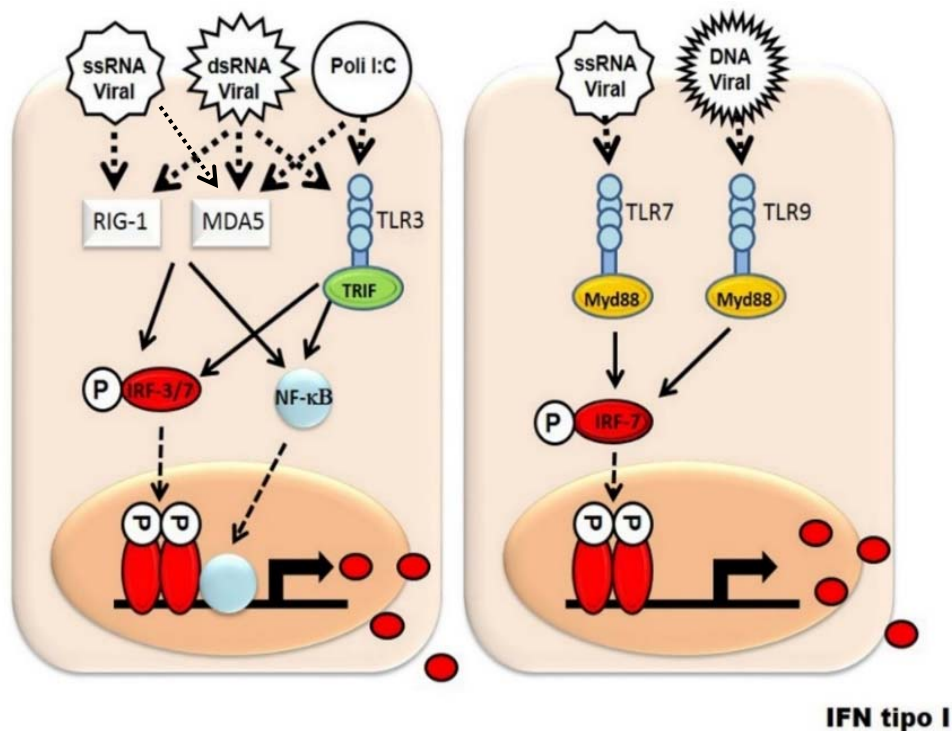


Figura 4. Vías de activación de los promotores de los genes de IFN tipo I en vertebrados superiores (adaptado de Robertsen, 2008).

En teleósteos se han clonado diferentes receptores TLR, entre los que destacan los TLR 3, 7, 8, 9 y 22, que poseen distintos patrones de reconocimiento; de esta forma, el TLR3 parece reconocer pequeños fragmentos de dsRNA y poli I:C, mientras que TLR7 y 8 reconocen ssRNA. Por otro lado, se ha demostrado que el TLR9 reconoce motivos de secuencias CpG-DNA y que el TLR22 de teleósteos responde a infecciones víricas, poli I:C y grandes fragmentos de dsRNA (revisado en Langevin et al., 2013a). Además, se han clonado diferentes factores reguladores de transcripción del interferón como el 3 y/o 7 (IRF3, IRF7) y MDA5 (Su et al.,

Introducción general

2010; Langevin et al., 2013a), y se ha demostrado la inducción de IFN tipo I en respuesta a la infección por diferentes virus patógenos de peces, así como por acción de poli I:C (Robertsen, 2006; Garcia-Rosado et al., 2010; Langevin et al., 2013a).

Todas estas vías conducen a una activación coordinada de los factores IRF3 e IRF7 que, junto con el factor de transcripción nuclear kappa B (NFκ-B), se unen al promotor del gen que codifica el IFN I para iniciar así, su transcripción. Estos datos confirman que las rutas descritas están muy conservadas evolutivamente, por lo que se propone un mecanismo de inducción de IFN I en teleósteos muy similar al de vertebrados superiores.

Genes estimulados por IFN I

El IFN I de vertebrados superiores es secretado por las células infectadas, y activa la síntesis de proteínas antivíricas en las células vecinas mediante su unión a receptores específicos (IFNAR1, IFNAR2), que están presentes en todas las células nucleadas (Biron y Sen, 2001). Esta unión activa la Tirosina quinasa 2 (TYK2) y la Janus quinasa 1 (JAK1), que fosforilan las proteínas activadoras de la transcripción 1 y 2 (STAT1 y STAT2), estableciendo la denominada ruta JAK/STAT (Figura 5). Los STAT activados penetran en el núcleo celular asociados junto al factor regulador de transcripción del interferón 9 (IRF9), y se unen a los motivos GAAAN(N)GAAA o elementos de respuesta estimulados por el IFN (ISRE) presentes en los promotores de los genes estimulados por IFN I (ISG) (Goodbourn et al., 2000). Finalmente, se produce la transcripción de los ISG, muchos de los cuales codifican proteínas con actividad antiviral directa (Robertsen, 2006).

En el pez cebra se ha descrito una ruta similar a la de vertebrados superiores, habiéndose identificado dos tipos de receptores para el IFN I; uno de ellos está formado por el complejo CRFB5/CRFB1, al que se unen el IFN ϕ 1 o IFN ϕ 4 (IFN I, grupo I), mientras que el otro receptor se encuentra formado por el complejo CRFB5/CRFB2, al que se unen el IFN ϕ 2 o el IFN ϕ 3 (IFN I, grupo II) (revisado en Langevin et al., 2013a). Por otro lado, se han secuenciado los genes que codifican TYK2, JAK1, STAT1, STAT2 e IRF9, y se ha determinado que TYK2 se encuentra asociada a CRFB5, mientras que Jak1 se encuentra unida a CRFB1 y CRFB2

(Figura 5). Esta ruta propone un mecanismo de activación mediante la ruta JAK/STAT similar a la de vertebrados superiores. Además, la presencia de motivos ISRE, indispensables para la transcripción de ISG, se ha descrito también en promotores de ISG de distintas especies de teleósteos (Collet y Secombes, 2001).

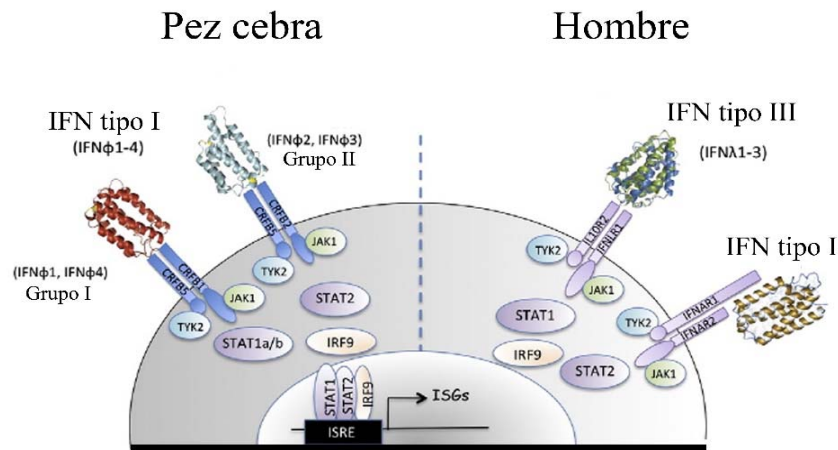


Figura 5. Inducción de la expresión de los genes estimulados por IFN (ISG) por acción del IFN tipo I (ruta JAK/STAT) en el pez cebra y hombre (adaptado de Langevin et al., 2013a).

Algunos de los ISG identificados en peces son los que codifican la proteína ISG15 (O’Farrell et al., 2002; Rokenes et al., 2007; Liu et al., 2010; Yasuike et al., 2010; Langevin et al., 2013b); la proteína quinasa R dependiente de dsRNA (PKR) (Hu et al., 2004; Rothenburg et al., 2008; Zhu et al., 2008); la proteína vig1 (Boudinot et al., 1999; Chin y Cresswell, 2001; DeWitte-Orr et al., 2007); una proteína parecida a la proteína con motivos tripartitos de mamíferos (TRIM) (Reymond et al., 2001; O’Farrell et al., 2002; Rajsbaum et al., 2008; Furnes y Robertsen, 2010); y la proteína Mx (revisado en Garcia-Rosado et al., 2010) (Figura 6).

Introducción general

Todos los ISG mencionados incrementan su transcripción en respuesta tanto a poli I:C como a infección vírica; sin embargo, su actividad antiviral en peces sólo se ha demostrado en el caso de la PKR de platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*), que inhibe la multiplicación de un rhabdovirus (Zhu et al., 2008); la ISG15 de pez cebra, que tiene actividad antiviral frente a virus RNA y DNA (Langevin et al., 2013b); y, por último, las proteínas Mx, que han sido ampliamente estudiadas en diversas especies de teleósteos y que tradicionalmente se han utilizado como modelo de actividad antiviral del sistema del IFN I, por lo que es el principal gen en el que centraremos este estudio (Garcia-Rosado et al., 2010).

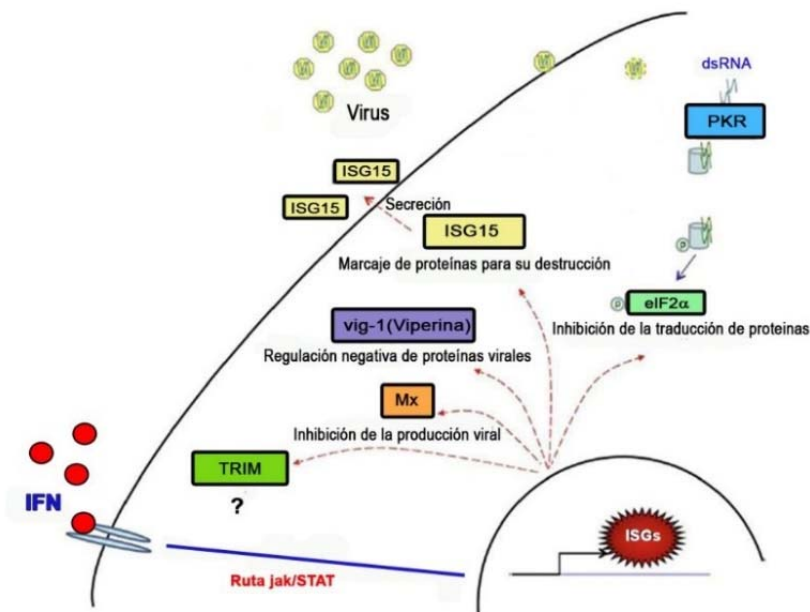


Figura 6. ISG identificados en teleósteos y sus funciones (adaptado de Verrier et al., 2011).

Proteínas Mx

Las proteínas Mx son GTPasas de la familia de las dinaminas, las cuales están involucradas en el tráfico intracelular. Se encuentran altamente conservadas en vertebrados (Horisberger y Gunst, 1991). Fueron descubiertas por Lindenmann (1962) al estudiar una estirpe de ratones inmune al virus de la influenza A, letal

para otras. Esta resistencia estaba mediada por el producto de un solo gen, al que denominó *Mx1*. Las proteínas Mx presentan un dominio amino-terminal muy conservado, que contiene un motivo tripartito de unión a GTP, y un dominio efector en el extremo carboxilo terminal (Figura 7), implicado en la oligomerización de las proteínas, que contiene el dominio interactivo central (CID) y una cremallera de leucinas (LZ) (Haller et al., 2007).

Todas las GTPasas de gran tamaño tienen la capacidad de auto-ensamblarse formando oligómeros y cooperar en la hidrólisis de GTP (Melen y Julkunen, 1994; Accola et al., 2002; Kochs et al., 2002), lo que parece ser crítico tanto para su actividad GTPásica, como para su estabilidad y el reconocimiento de estructuras virales diana. La oligomerización parece ser el resultado de la unión de la región LZ de una molécula al dominio CID de una segunda molécula vecina (Haller y Kochs, 2002).

Las proteínas Mx de vertebrados suelen aparecer en distintas isoformas, como ocurre en el hombre (MxA, MxB), en rata (Mx1, Mx2, Mx3) (revisado en Lee y Vidal, 2002; Li et al., 2009), o en algunas especies de teleósteos, como la dorada (*Sparus aurata*) (SauMx1, SauMx2, SauMx3) (Fernandez-Trujillo et al., 2011). Las isoformas pueden diferenciarse tanto en su especificidad antiviral como en su localización celular, que puede ser citoplasmática o nuclear. Estas últimas poseen una señal de localización nuclear (NLS), que puede aparecer en el extremo amino o carboxilo, según la especie considerada (Figura 7). La localización nuclear o citoplasmática de estas proteínas hace que inhiban el ciclo de multiplicación vírica en diferentes fases.

Aunque existen proteínas Mx carentes de actividad antiviral demostrada, como la MxB del hombre, varios estudios indican una clara actividad antivírica de numerosas proteínas Mx de vertebrados superiores frente a un amplio rango de virus, discutiéndose si dicha actividad es casual y provocada por una función celular inespecífica, o si se trata de una respuesta que inhibe específicamente a un conjunto de patógenos (revisado en Lee y Vidal, 2002).

Introducción general

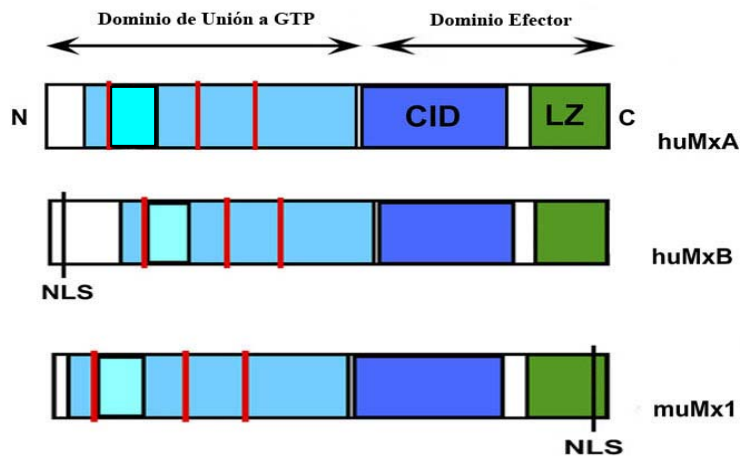


Figura 7. Estructura de las proteínas MxA (huMxA), MxB (huMxB) del hombre y Mx1 de ratón (*Mus musculus*) (muMx1). El extremo amino (N) contiene los elementos tripartitos de unión a GTP (líneas verticales rojas). En el extremo carboxilo (C) se localiza el dominio efector, compuesto por el dominio interactivo central (CID) y la cremallera de leucinas (LZ). La línea negra representa la señal de localización nuclear (NLS) (modificado de Haller et al., 2007).

Actualmente se conoce el número de isoformas y la localización intracelular de proteínas Mx de diferentes especies de peces (Tabla 2), habiéndose demostrado su actividad antiviral frente a virus pertenecientes a diferentes familias (revisado en Garcia-Rosado et al., 2010; Limin et al., 2012).

En cuanto a la regulación de la expresión de los genes *Mx*, como en el caso de otros ISG, parece ser bastante compleja, ya que es una de las claves de la interacción patógeno-hospedador (Zou y Secombes, 2011). Por otro lado, la expresión de *Mx* parece ser la diana de la actividad antagonista frente al sistema del IFN I por varios virus (Collet et al., 2007; Jørgensen et al., 2007; Skjesol et al., 2009). Existen pocos estudios sobre la regulación de la expresión de ISG, pero hay consenso en que su caracterización es uno de los aspectos más importantes para comprender la respuesta antiviral generada por IFN I.

Tabla 2. Isoformas de Mx caracterizadas en teleósteos y localización intracelular (adaptado de Garcia-Rosado et al., 2010; Limin et al., 2012). ND: No Determinado.

Especies	Isoformas	Localización intracelular
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	7	Citoplasma
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Mx1	Citoplasma
	Mx2	
	Mx3	Núcleo
Fletán atlántico (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	2	Núcleo+Citoplasma
Platija japonesa (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	1	Citoplasma
Pez gato (<i>Ictalurus punctatus</i>)	5	ND
Salmón atlántico (<i>Salmo salar</i>)	ASMx1	Citoplasma
	ASMx2	
	ASMx3	ND
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	SauMx1	
	SauMx2	Citoplasma
	SauMx3	
Perca barramundi (<i>Lates calcarifer</i>)	ND	ND
Mero (<i>Epinephelus coioides</i>)	MxI	
	MxII	Citoplasma
	MxIII	
Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)	SsMx	Citoplasma
Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	Mx tipo 1	
	Mx tipo 2	ND
Perca (<i>Perca fluviatilis</i>)	1	ND
Pez globo (<i>Takifugu rubripes</i>)	1	Citoplasma
Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	AaMxA AaMxB AaMxC AaMxD	ND
Mero de mármol marrón (<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>)	1	ND
<i>Gobiocypris rarus</i>	1	ND
<i>Larimichthys crocea</i>	1	ND
Besugo de roca (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	RbMx1	
	RbMx2	ND
	RbMx3	
Carpa china (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	CiMx1	Núcleo+Citoplasma
	CiMx2	Citoplasma
	CiMx3	Núcleo+Citoplasma
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	MxA	
	MxB	ND
Carpa dorada (<i>Carassius auratus</i>)	CaMx1	
	CaMx2	Citoplasma

LA PROTEÍNA Mx DE LENGUADO SENEGALÉS

En estudios previos, nuestro grupo de investigación ha clonado el cDNA del gen *Mx* de lenguado senegalés (*SsMx*), así como el DNA genómico, confirmando mediante *Southern* la presencia de un solo gen *Mx*, que codifica una única isoforma de la proteína, cuya secuencia completa presenta 12 exones y 11 intrones (Fernandez-Trujillo et al., 2006; 2008). La longitud de los exones del gen *SsMx* es prácticamente idéntica a la de los exones de los genes de las proteínas Mx de fugu (*Takifugu rubripes*), Mx1 de pez gato (*Ictalurus punctatus*), Mx1 de dorada y MxA y MxB de lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Figura 8). Sin embargo, existen grandes diferencias en la longitud de los intrones.

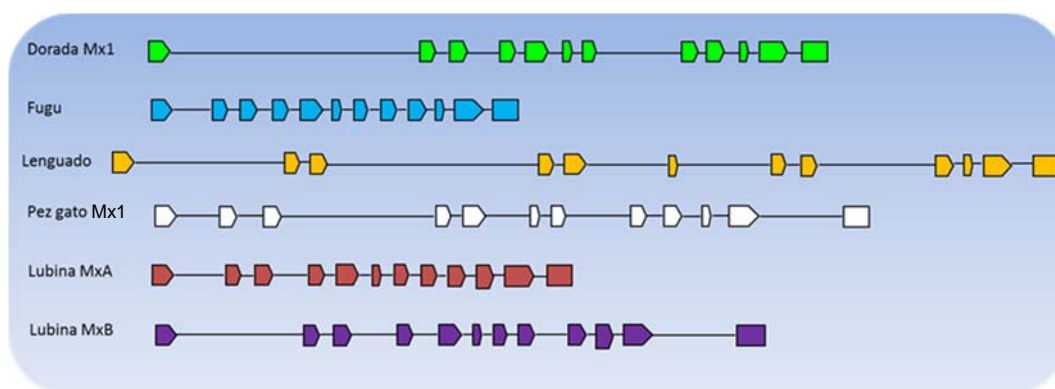


Figura 8. Comparación de la estructura del gen que codifica la proteína Mx1 de dorada, fugu, lenguado senegalés, Mx1 pez gato y MxA y MxB de lubina. En colores se representan los exones y con una línea los intrones.

El gen *SsMx* presenta un ORF de 1.872 pb, que codifica una proteína de 623 aminoácidos (Fernandez-Trujillo et al., 2006) (*GenBank*, número de acceso: AY790537). El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Mx de teleósteos indica que la proteína *SsMx* se encuentra dentro del grupo filogenético formado por el orden Pleuronectiformes, al que pertenece el lenguado senegalés (Figura 9).

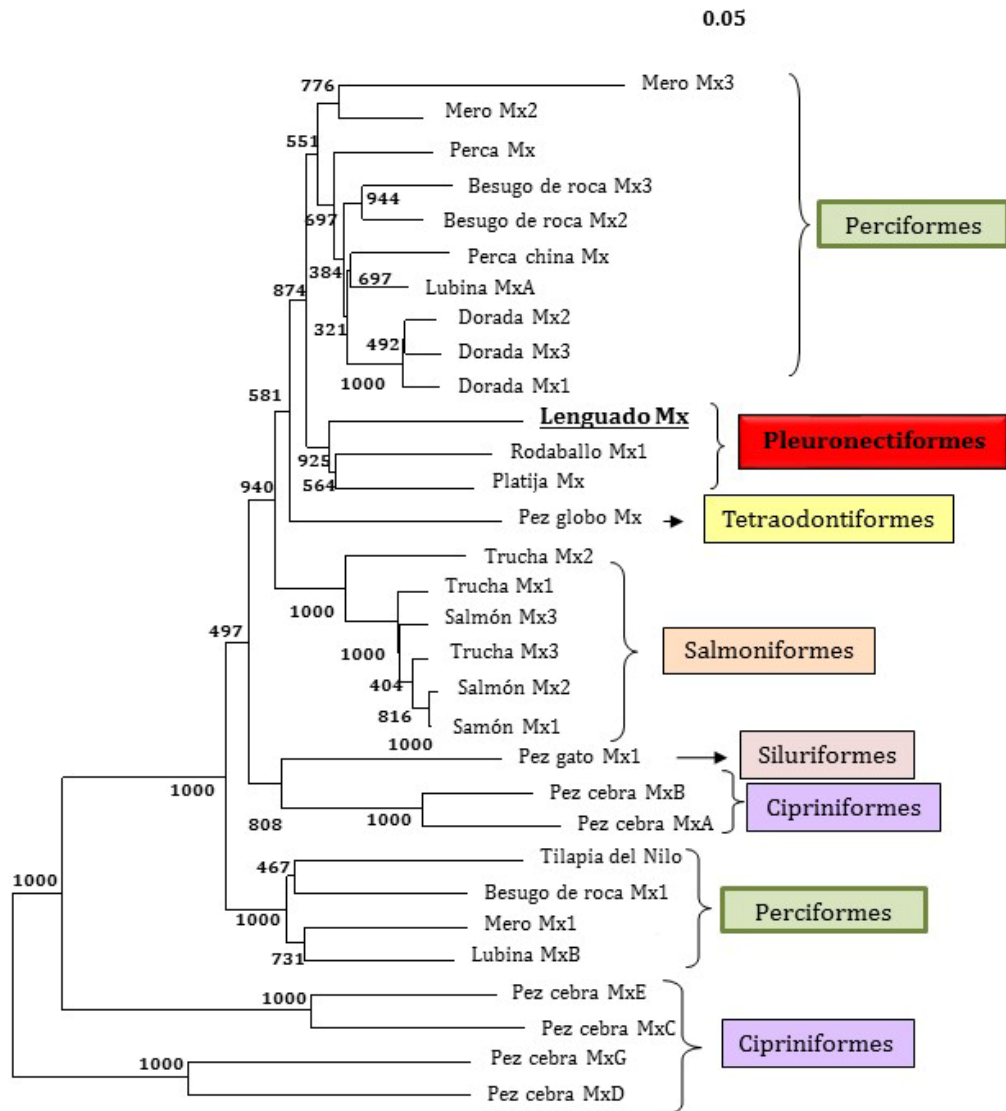


Figura 9. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la proteína Mx de diferentes teleósteos. Los números indican las distancias filogenéticas (adaptado de Gonzalez-Mariscal, 2014).

El análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de SsMx frente a la de otras especies de teleósteos revela un porcentaje de identidad que oscila entre el 67,9% (pez cebra) y el 80,1% (platija japonesa), lo que indica que son secuencias muy conservadas. Las regiones más conservadas se encuentran en el extremo amino terminal (dominio de unión a GTP), mientras que las más variables se localizan en el extremo carboxilo terminal (dominio efector) (Fernandez-Trujillo, 2008).

Introducción general

Teniendo en cuenta estos antecedentes, puede decirse que el conocimiento en profundidad de la especificidad antiviral, el mecanismo de acción, la regulación transcripcional, o el papel relativo respecto a otros ISG, de la Mx de las distintas especies piscícolas en general, y de SsMx en particular, puede contribuir significativamente al desarrollo de estrategias que posibiliten el ambicioso objetivo de controlar las infecciones víricas en acuicultura.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Debido a la importancia del sistema inmune innato en la primera línea de defensa frente a las infecciones víricas en teleósteos, en el presente trabajo se plantea como **objetivo global** la caracterización funcional de la proteína Mx de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (SsMx), como modelo de la actividad del sistema mediado por interferón tipo I (IFN I).

Para ello se plantean los siguientes **objetivos parciales**:

- Clonación, y caracterización estructural y funcional del promotor del gen *SsMx*.
- Evaluación *in vitro* de la actividad de la proteína SsMx frente a virus patógenos de peces.
- Evaluación *in vivo* de la actividad del sistema mediado por IFN I de juveniles de lenguado frente a la infección por aislados patógenos y no patógenos del Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV).

AIMS

Since the innate immune system constitutes the first line of defense against viral infections in teleosts, the **main aim** of the present PhD Thesis has been the functional characterization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) Mx protein (SsMx), considered as a marker of the antiviral activity mediated by the type I interferon system (IFN I).

In order to fulfil this aim, the study has focused on:

- Cloning, and structural and functional characterization of the *SsMx* gene promoter.
- *In vitro* evaluation of the SsMx protein activity against fish viral pathogens.
- *In vivo* evaluation of the Senegalese sole IFN I-mediated activity against pathogenic and non-pathogenic Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) isolates.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN *Mx* DE LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*)

Alvarez-Torres D, Bejar J, Collet B, Alonso MC, Garcia-Rosado E (2013). Structural and functional characterization of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) *Mx* promoter. Fish and Shellfish Immunology. 35, 1642-1648. (Annex 1)

Alvarez-Torres D, Alonso MC, Garcia-Rosado E, Collet B, Bejar J (2014). Differential response of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) *Mx* promoter to viral infections in two salmonid cell lines. Veterinary Immunology and Immunopathology. (*Submitted*, annex 2)

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos que regulan la expresión de los genes estimulados por interferón (ISG) están implicados en el control de la defensa frente a las infecciones víricas. Por este motivo, conocer los elementos y mecanismos de regulación de estos genes ayuda a comprender las interacciones entre virus y hospedadores.

En vertebrados superiores se han caracterizado los promotores de diversos ISG, como los de *ISG15*, *ISG20* e *ISG54* en el hombre (Levy et al., 1986; Reich et al., 1987; Gongora et al., 2000), y varios promotores de los genes *Mx* (Hug et al., 1988; Horisberger et al., 1990; Schumacher et al., 1994; Anne et al., 2006; Li et al., 2009).

En teleósteos, la mayoría de promotores de ISG caracterizados hasta la fecha corresponden a genes *Mx*, aunque también se han descrito los promotores de *ISG15* de bacalao atlántico (*Gadus marhua*) y pez cabeza de serpiente (*Channa argus*) (Seppola et al., 2007; Weizhang y Qionglin, 2008), y el promotor del gen de la proteína quinasa R (PKR) en carpa dorada (*Carassius aurata*). En concreto, los promotores de genes *Mx* descritos hasta el momento son los del pez globo (*Takifugu rupries*), uno de los genes *Mx* del pez cebra (*Danio rerio*), el de *Mx1* de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el de platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*), uno de los genes *Mx* de mero (*Epinephelus coioides*), el de *Mx1* de pez gato (*Ictalurus punctatus*) y los de tres genes *Mx* de dorada (*Sparus aurata*) (Collet et al., 2001; Yap et al., 2003; Altmann et al., 2004; Chen et al., 2006; Ooi et al., 2006; Plant y Thune, 2008; Gonzalez-Mariscal et al., 2014).

La estructura de dichos promotores varía dependiendo de la especie; de forma general, pueden presentar de uno a tres elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE), un número variable de elementos GAAA/TTTC, de sitios de activación del IFN gamma (GAS) (Zhang et al., 1994; Gonzalez-Mariscal et al., 2014) y, en algunos casos, se ha descrito la presencia de cajas TATA, y sitios de unión al factor de transcripción SP1.

A pesar de que la proteína Mx es uno de los ISG mejor estudiados, los mecanismos que regulan su expresión en peces son aún poco conocidos. Las variaciones en los elementos reguladores de los promotores de genes *Mx* se

Capítulo 1

traducen en diferencias en los patrones de activación en respuesta tanto al ácido poliinosinico-policitidílico (poli I:C), como a infecciones producidas por distintos patógenos víricos. Esta diversidad hace necesario el estudio de estas regiones en cada una de las especies piscícolas de interés, ya que la regulación de la expresión de genes *Mx* puede estar relacionada con la susceptibilidad de diferentes especies de peces a virus específicos.

DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL PROMOTOR DE *SsMx*

El análisis de la secuencia ha mostrado que el promotor de *SsMx* no posee caja TATA, contiene 3 secuencias ISRE, una secuencia GAS, 14 motivos GAAA/TTTC y una región rica en nucleótidos G-C cercana al codón de inicio, la cual incluye el sitio de unión al factor de transcripción SP1 y tiene estructura de microsatélite. En los promotores de *Mx* de vertebrados superiores, así como en los de teleosteos, las secuencias ISRE están bastante conservadas, y atienden a la secuencia consenso (A/G/T)GAAA(N)1-2GAAA(C/G)(A/C/T) (Collet y Secombes, 2001). Las secuencias de los ISRE1 e ISRE3 del promotor de *SsMx* coinciden con esta secuencia consenso, mientras que el ISRE2 presenta la secuencia reverso complementaria, este tipo de secuencias reversas de los motivos ISRE se han encontrado en otros promotores de *Mx*, demostrándose igual implicación en la funcionalidad de los promotores en los que se encuentran que las secuencias ISRE consenso (Yap et al., 2003; Thomas et al., 2006; Plant et al., 2008). En los promotores de *Mx* que poseen varios ISRE, dos de ellos suelen encontrarse próximos al sitio de inicio de la transcripción, y cercanos entre sí. Es el caso de los promotores de uno de los genes *Mx* de pez globo, pez cebra y mero (Yap et al., 2003; Altman et al., 2004; Chen et al., 2006), así como el de los promotores de *MxA* de hombre, *Mx2* de ratón y *Mx1* de cerdo (Nadake et al., 1997; Asano et al., 2003; Thomas et al., 2006). Sin embargo, en el promotor de *SsMx* el ISRE1 es el único cercano al codón ATG (-115 pb), mientras que los ISRE2 e ISRE3 se encuentran a 400 pb de dicho codón, aunque cercanos entre sí. Esta localización de los ISRE es similar a la descrita en el promotor de *Mx* de platija japonesa, única especie de teleosteo en la que se han encontrado 3 secuencias ISRE hasta la fecha (Figura 11). La estrecha relación filogenética entre lenguado senegalés y platija japonesa, pertenecientes ambos al orden Pleuronectiformes, puede explicar la similitudes encontradas en la estructura de los promotores de sus genes *Mx*.

El promotor de *SsMx* contiene 14 motivos independientes GAAA/TTTC, los cuales se han descrito con bastante frecuencia en otros promotores de *Mx* y otros

Capítulo 1

ISG (Hug et al., 1988; Reid et al., 1989; Chang et al., 1991). En el promotor de *Mx* de pez cebra se han descrito 10 motivos GAAA/TTTC, que tienen un papel importante en el incremento de la expresión génica (Altmann et al., 2004).

En el promotor de *SsMx* se ha encontrado un elemento GAS con una secuencia coincidente con la secuencia consenso TTNCNNNAA (Jørgensen et al., 2007), que se solapa en parte con la secuencia del ISRE1. Estos elementos también se han localizado en los promotores de los genes *Mx* descritos de platija japonesa, trucha arcoíris, pez cebra y cerdo (Figura 11). En vertebrados superiores, los elementos GAS están involucrados en la respuesta mediada por el IFN gamma ($\text{IFN}\gamma$), y diversos estudios apuntan a que en teleósteos puede existir un mecanismo similar. Concretamente, en células CHSE-214 transfectadas de forma estable con una construcción que contiene el gen de luciferasa bajo el control del promotor de *Mx1* de trucha arcoíris (CHSE-*Mx10*), se ha descrito un aumento en la expresión de luciferasa en respuesta a $\text{IFN}\gamma$ de trucha arcoíris (Jørgensen et al., 2007). Los autores sugieren que este resultado puede deberse a la presencia de un elemento GAS en el promotor de *Mx1* de trucha arcoíris, lo que permitiría la respuesta a $\text{IFN}\gamma$, aunque no descartan que el $\text{IFN}\gamma$ desencadene la expresión del IFN I (Zou et al., 2005; Jørgensen et al., 2007), y que sea éste el que, en última instancia, active el promotor de *Mx* de trucha arcoíris. La posible activación del promotor de *SsMx* por el $\text{IFN}\gamma$ no ha sido evaluada en este estudio, aunque la presencia de un elemento GAS en su secuencia hace de este promotor una buena herramienta para abordar el estudio de los mecanismos de activación de genes *Mx* por $\text{IFN}\gamma$.

El promotor de *SsMx* presenta una región rica en nucleótidos G-C (isla G-C), que contiene, a su vez, la secuencia consenso (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(G/C), correspondiente a la secuencia de unión del factor de transcripción SP1, situada a 75 pb del codón de inicio de la traducción. Las islas G-C suelen aparecer en promotores que carecen de caja TATA, como ocurre en el promotor de *SsMx*. Los genes que presentan en sus promotores islas G-C poseen con frecuencia múltiples sitios de inicio de la transcripción, lo que implica un complejo sistema en la regulación de la expresión de los mismos (Deaton y Bird, 2011). Además, los dominios ricos en nucleótidos G-C en promotores parecen incrementar la probabilidad de unión de factores de transcripción generales.

En los promotores de *Mx1* de ratón, de *MxA* de hombre, y de *Mx* bovina y porcina aparecen secuencias de unión al factor de transcripción SP1 cercanas al sitio de inicio de la transcripción (Hug et al., 1988; Nakade et al., 1997; Gerardin et al., 2004; Thomas et al., 2006), aunque el promotor de *Mx1* de cerdo es el único que, además, carece de caja TATA (Thomas et al., 2006). En teleósteos también se han encontrado secuencias de unión a SP1 en los promotores de *Mx* de platija japonesa y *Mx1* de trucha arcoíris, pero, a diferencia de lo que ocurre en el promotor de *SsMx*, se localizan a mayor distancia del codón ATG (Ooi et al., 2006; Collet y Secombes, 2001).

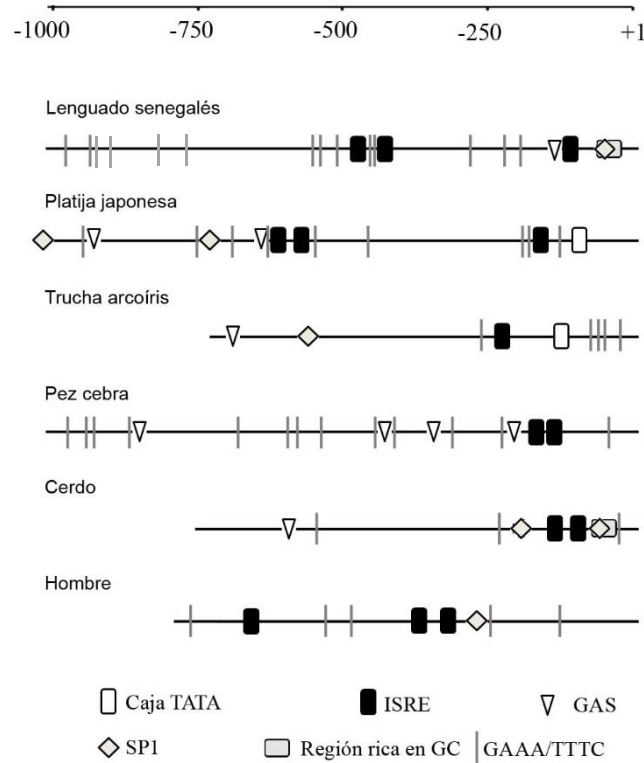


Figura 11. Representación esquemática de la estructura de los promotores de *Mx* en diferentes especies de vertebrados respecto al codón de inicio de la traducción (ATG). Los rectángulos blancos representan las cajas TATA, las secuencias GAS están representadas por los triángulos en blanco, las secuencias ISRE por rectángulos negros, los sitios Sp1 por rombos grises, la región rica en nucleótidos G-C por rectángulos grises y los motivos GAAA/TTTC por líneas verticales.

La delección de la región G-C del promotor de *SsMx* provoca la desaparición de la actividad luciferasa en células transfectadas, lo que sugiere que esta región es un elemento clave para el inicio de la transcripción del gen *SsMx*.

El análisis de la secuencia de la isla G-C ha permitido determinar que esta región contiene repeticiones consecutivas de nucleótidos, y que estas repeticiones constituyen un microsatélite. Los microsatélites son repeticiones en tándem de motivos cortos de hasta 6 pares de bases que están ampliamente distribuidos por todo el genoma de vertebrados, generalmente en zonas no codificantes (Toth et al., 2000). Sus secuencias pueden, además, presentar alta tasas de mutación, por lo que se utilizan como marcadores moleculares en estudios de variabilidad y análisis genético de poblaciones (Queller et al., 1993). En cuanto a su función, se ha descrito su papel en la regulación de la transcripción de los genes, especialmente en microsatélites situados en promotores o en intrones (Liu et al., 2005). En concreto, varios autores han demostrado que diferencias alélicas en microsatélites están relacionadas con el nivel de activación de los promotores de diversos genes de vertebrados superiores (Gazzoli y Kolodner, 2003; Harendza et al., 2003; Stevens et al., 2003; Baseggio et al., 2004), incluyendo casos en los que aparecen microsatélites en las secuencias de unión a factores de transcripción, como en el promotor de *SsMx*.

En teleósteos se han descrito microsatélites en promotores de distintos genes, aunque su implicación en la actividad del promotor aún se desconoce, es el caso del promotor del gen de la hormona de crecimiento de dorada (Almuly et al., 2005), de los factores reguladores de la transcripción del IFN (IRF) del pez cabeza de serpiente (Weizhang y Qionglin, 2008) o del promotor de la IL-6 de la platija japonesa (Kong et al., 2010). El análisis de la variabilidad de la región microsatélite del promotor de *SsMx* ha demostrado la existencia de cuatro alelos diferentes en las tres poblaciones analizadas. Dado el pequeño tamaño de estas poblaciones, es posible que exista una mayor variabilidad alélica que la descrita en este estudio. El significado funcional de las variantes alélicas encontradas no ha podido abordarse en este estudio, sin embargo algunas características de la distribución de los alelos y de la estructura genética de las poblaciones respaldarían esta línea de investigación, ya que el hecho de que el alelo 1 esté presente en todos los individuos

analizados podría sugerir que es indispensable para la viabilidad de los individuos, dado que su frecuencia es alta, pero no tanto como para alcanzar ese nivel de presencia. De hecho, eso podría justificar el importante exceso de heterocigotos que presentan las dos poblaciones analizadas, que aunque sólo es significativo en el caso de la población gallega, en el caso de la población natural de Cádiz, el reducido tamaño de la población afecta probablemente a la significación del parámetro F_{IS} .

Atendiendo a la función de los microsátélites en los promotores de genes de vertebrados superiores, se podría sugerir que los polimorfismos encontrados en la secuencia del microsátélite G-C del promotor de *SsMx* pueden estar involucrados en los niveles de activación del mismo. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser confirmada, pero si existiese una relación funcional entre las variantes alélicas del microsátélite del promotor de *SsMx* y la regulación de la expresión de este gen, lo cual a su vez estuviera relacionado con la susceptibilidad/resistencia a las infecciones virales de esta especie, podríamos estar ante un posible marcador para la selección y mejora genética de lenguado senegalés respecto al carácter resistencia a las infecciones virales. Un planteamiento similar se ha hecho en rodaballo (*Scophthalmus maximus*), una especie muy cercana al lenguado, en el que diferencias en la estimulación de la *Mx2* se han asociado a la susceptibilidad a VHSV de los individuos (Díaz-Rosales et al., 2012).

Según se deduce de los resultados presentados en esta tesis doctoral, el promotor de *SsMx* presenta una estructura que difiere de la del resto de promotores de teleósteos descritos hasta la fecha, siendo, junto al de la platija japonesa, el único promotor de *Mx* de teleósteos que posee 3 motivos ISRE. Además, es el único promotor de *Mx* en el que se ha detectado una región G-C cercana al codón de inicio de la traducción que contiene un microsátélite, lo que supone un nuevo elemento de variabilidad en la estructura de este tipo de promotores. Esta región está claramente involucrada en la regulación del promotor de *SsMx*, lo que la convierte en un atractivo elemento de regulación, no observado con anterioridad en promotores *Mx*.

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL PROMOTOR DE *SsMx*

En el presente trabajo se ha establecido un sistema que expresa la luciferasa bajo el control de dicho promotor en células CHSE-214 y RTG-2 transfectadas. Dichas células fueron tratadas con distintas concentraciones de poli I:C, un potente estimulador del sistema del IFN I (Biron y Sen, 2001), observándose un incremento de la actividad luciferasa dependiente de la concentración de poli I:C (entre 1,6 y 2,5 veces en el caso de células RTG-2 y de 4 hasta casi 5 veces en el caso de células CHSE-214). La inducibilidad máxima del promotor de *SsMx* en células RTG-2 fue menor que en células CHSE-214 transfectadas, sin embargo, la comparación de la actividad del promotor en los dos tipos celulares puede no ser adecuada, debido a la utilización de diferentes protocolos de estimulación. En concreto, las células CHSE-214 necesitan la transfección con poli I:C para estimular el sistema del IFN I (Jensen et al., 2002), lo que puede provocar una mayor eficiencia en la estimulación debido a la introducción directa del poli I:C en las células.

Con respecto a la cinética de activación, en células RTG-2 la actividad luciferasa comenzó a las 6 h p.e., mientras que en células CHSE-214 no se detectó hasta las 48 h p.e., obteniéndose los valores máximos en este tipo celular a las 72 h p.e. (5,96 veces superior respecto a las células control). En trabajos anteriores realizados con el promotor de *Mx1* de trucha arcoíris se han obtenido resultados similares, observándose un retraso en la actividad del mismo en respuesta a la activación con IFN I en células CHSE-214 con respecto a células RTG-2 transfectadas (Collet et al., 2004; Jørgensen et al., 2007). El conjunto de estos datos indica que las células CHSE-214 pueden poseer un mecanismo de activación de la ruta mediada con IFN I más lento.

Los valores de activación del promotor de *SsMx* obtenidos en el presente estudio son inferiores a los descritos para otros genes de proteínas Mx, como el gen *Mx1* de trucha arcoíris, estudiado en células RTG-2 y CHSE-214 con un sistema experimental similar al utilizado en este trabajo (Collet y Secombes, 2001; Collet et al., 2004; Johansen et al., 2004). Estos estudios utilizan el vector de expresión de luciferasa pGL3, que permite la acumulación de la proteína luciferasa en el interior celular, mientras que en el presente trabajo se ha utilizado el vector pGL4, que

contiene dos secuencias que desestabilizan el mRNA de la proteína luciferasa evitando así su acumulación y permitiendo, por tanto, la obtención de una medida puntual de la actividad del promotor. Por otro lado, usando sistemas que utilizan el vector pGL3 en líneas celulares diferentes a RTG-2 y CHSE-214 se han determinado valores de actividad de luciferasa similares a los descritos en el presente estudio, es el caso del promotor de *Mx* del pez globo en células de hepatoma de pez (PHLC-1) y del promotor de *Mx1* de pez gato en células epiteliales de ciprínidos (EPC) (Yap et al., 2003; Plant y Thune, 2008). Estos resultados indican que la inducibilidad de los promotores depende de distintos factores, que incluyen tanto el vector de expresión como el sistema celular. El presente trabajo constituye el primer estudio en el que se describe la inducción por IFN I de dos especies de salmónidos (trucha arcoíris y salmón *chinook*) de un gen *Mx* perteneciente a una especie de pez no relacionada filogenéticamente (lenguado senegalés), indicando que la ruta de señalización de IFN I de salmónidos está lo bastante conservada como para tener la capacidad de activar el promotor de *SsMx*.

Para determinar el papel de las distintas secuencias ISRE encontradas en la secuencia del promotor de *SsMx*, se realizaron construcciones que contenían diversas mutaciones. Dichas construcciones fueron insertadas en el vector pGL4 y transfectadas en células CHSE-214 y RTG-2. La delección de los ISRE distales (ISRE2 e ISRE3) produjo una reducción significativa de la actividad del promotor en ambos tipos celulares. Sin embargo, la delección del ISRE1 (más cercano al codón ATG) provocó la pérdida total de la actividad del promotor. Estos resultados indican que el ISRE1 es fundamental para la actividad del promotor, mientras que el ISRE2 e ISRE3 contribuyen a que el promotor de *SsMx* alcance su máxima actividad, presentando un efecto aditivo. Estos resultados son similares a los descritos para el promotor de *Mx* de platija japonesa (Ooi et al., 2006), y para promotores que contienen dos ISRE próximos al codón ATG (*MxA* de hombre, *Mx1* de cerdo, *Mx* de pez globo y uno de los genes *Mx* de pez cebra), en los que ambos ISRE son esenciales para la actividad del promotor (Yap et al., 2003; Altmann et al., 2004).

Para confirmar la implicación del ISRE1 en la actividad del promotor de *SsMx*, se introdujo una mutación puntual en su secuencia, lo que provocó la desaparición de la actividad del promotor en respuesta a poli I:C, por lo que la actividad del promotor de *SsMx* depende del ISRE1. En el promotor de *MxA* de humanos se ha descrito que un cambio de nucleótido simple (SNP) puede afectar significativamente a los niveles de expresión de dicho gen. De hecho, el cambio de un único nucleótido en la secuencia ISRE de dicho promotor provoca la inactividad del mismo (Tran et al., 2012).

Por otro lado, la delección de un fragmento de 841 pb del extremo 5' del promotor de *SsMx* (construcción promSsMx-483) provocó un ligero incremento en el porcentaje de la actividad del promotor en células RTG-2 transfectadas, indicando la posible presencia de elementos de regulación negativa en esta región, lo que ha sido previamente sugerido en el promotor de *Mx* de platija japonesa (Ooi et al., 2006). Este efecto no aparece en las células CHSE-214 transfectadas con esta construcción, lo que refuerza la idea de que en la actividad del promotor pueden estar implicados diferentes factores celulares. Dichos factores parecen diferir según la especie piscícola, siendo diferentes incluso en especies muy cercanas filogenéticamente, como la trucha arcoíris y el salmón *chinook*.

RESPUESTA DEL PROMOTOR DE *SsMx* A INFECCIONES VÍRICAS

Este estudio se ha llevado a cabo cuantificando la actividad luciferasa en células RTG-2 y CHSE-214 transfectadas con la construcción completa del promotor de *SsMx* tras la inoculación con IPNV, VHSV y EHNV. Los virus utilizados se han seleccionado en base a la permisibilidad de las líneas celulares RTG-2 y CHSE-214 a la infección por dichos virus (Nygaard et al., 2000; Isshiki et al., 2001; Song et al., 2005; Ariel et al., 2009), y al tipo de ácido nucleico que poseen. Este tipo de sistema se ha utilizado con el mismo fin en estudios previos, determinándose la expresión del promotor de *MxI* de trucha arcoíris en células RTG-2 y CHSE-214 (células RTG-P1 y CHSE-Mx10) en respuesta a la infección por IPNV, VHSV y el Alfavirus de Salmón (SAV) (Collet et al., 2004; 2014;

Jørgensen et al., 2007), así como la expresión del gen *Mx* de platija japonesa tras la infección con VHSV en células EPC (Kim y Kim, 2012).

En el presente trabajo, la infección con IPNV no ha inducido el promotor en ninguna de las líneas celulares ensayadas. Jørgensen et al. (2007) describieron resultados similares en células CHSE-Mx10, que expresan luciferasa bajo el control del promotor de *Mx1* de trucha arcoíris, inoculadas con IPNV. La capacidad de IPNV de suprimir los mecanismos celulares activados por IFN I está ampliamente demostrada, lo que puede explicar la falta de inducibilidad del promotor en los sistemas descritos. Concretamente, la inoculación de IPNV en células RTG-P1 y CHSE-Mx10 cuya actividad luciferasa había sido previamente activada, provocó la disminución significativa, o incluso supresión, de la actividad luciferasa, indicando un bloqueo de la señalización en la ruta del IFN I por el virus (Collet et al., 2007; Jørgensen et al., 2007). Posteriormente, Skjesol et al. (2009) determinaron que las proteínas VP4 y VP5 de IPNV interactúan con factores de la ruta de señalización del IFN I, provocando un bloqueo en dicha ruta, lo que imposibilita la transcripción de *Mx*. Además, la ausencia de expresión de *Mx* endógeno en células CHSE-214 tras la infección con IPNV descrita por diversos autores, y corroborada en la presente tesis doctoral (capítulo 2), también sugiere una actividad antagonista de IPNV frente al sistema del IFN I en este tipo celular (Larsen et al., 2004; Fernandez-Trujillo et al., 2008b; 2011).

En el presente trabajo se ha demostrado que VHSV activa el promotor de *SsMx*, aunque únicamente en las células RTG-2, alcanzando bajos valores de inducibilidad máxima (2,89 veces respecto a las células control no infectadas a las 48 h p.i. en la dosis más alta de virus utilizada). Resultados similares han sido descritos por Collet et al. (2004), quienes sugieren que VHSV puede poseer algún tipo de actividad antagonista que bloquee parcialmente la ruta de activación de ISG desencadenada por el IFN I, lo que justificaría los bajos valores de inducibilidad tras la infección por este virus. La estimulación del sistema del IFN I tras infección por VHSV está claramente demostrada en diversas especies de teleósteos, habiéndose descrito como un potente activador de dicho sistema (Kinkelin y Dorson, 1973; Boudinot et al., 1999; 2001; O'Farrell et al., 2002). Sin embargo, en el presente trabajo no se ha detectado actividad luciferasa en células CHSE-214

Capítulo 1

transfectadas con el promotor de *SsMx* tras la infección con este virus, lo que sugiere una posible supresión de los mecanismos de activación de la ruta del IFN I en las células CHSE-214, que no ha sido descrita hasta la fecha. Recientemente, Kim y Kim (2013) han establecido la implicación de la proteína no estructural (NV) de VHSV en la supresión de la actividad del promotor de *Mx* de platija japonesa en células EPC, mediante la interacción con el factor de transcripción nuclear kappa B (NFκ-B).

La inoculación de EHNV en células CHSE-214 transfectadas con el promotor completo de *SsMx* produjo un incremento en la expresión de la luciferasa, siendo éste el primer estudio en el que se realiza esta observación. Sin embargo, la inoculación del mismo virus en monocapas de células RTG-2 no indujo la activación del promotor, aunque sí se desarrollaron ECP. Este resultado hace suponer un posible mecanismo antagonista de EHNV frente al sistema del IFN I de trucha arcoíris. Otros virus con genoma DNA patógenos de peces presentan mecanismos de supresión del sistema del IFN I, es el caso del ranavirus Virus Z de *Rana catesbeiana* (Rothenburg et al., 2011), el adenovirus Koiherpesvirus (KHV) (Sunarto et al., 2012) o el *Singapore Grouper Iridovirus* (SGIV), entre otros iridovirus (Hansen et al., 2009). Estos datos indican que los virus han desarrollado complejos mecanismos, independientemente del genoma y/o grupo al que pertenezcan, que desregulan funciones celulares básicas, utilizando la maquinaria de replicación celular y bloqueando total o parcialmente los elementos antivirales que los organismos han desarrollado a lo largo del proceso evolutivo.

Las distintas estrategias desarrolladas por virus para evadir la respuesta del IFN I se desconocen en parte, por lo que es necesario profundizar en su estudio para entender mejor las interacciones virus-hospedador que se producen durante la infección viral. Por otro lado, las diferencias en la inducción del promotor de *SsMx* en células CHSE-214 y RTG-2 después de la infección con los mismos virus parecen indicar que existen factores celulares específicos que están involucrados en la respuesta de señalización del IFN I. Por este motivo, utilizar estos dos sistemas celulares puede resultar útil e interesante para continuar en el estudio de los mecanismos virales de evasión del sistema del IFN I e identificar los factores celulares involucrados en dichos mecanismos en distintas especies de teleósteos.

CAPÍTULO 2

ESPECIFICIDAD ANTIVIRAL DE LA PROTEÍNA Mx DE LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*)

Alvarez-Torres D, Garcia-Rosado E, Fernandez-Trujillo MA, Bejar J, Alvarez MC, Borrego JJ, Alonso MC (2013). Antiviral specificity of the *Solea senegalensis* Mx protein constitutively expressed in CHSE-214 cells. Marine Biotechnology. 15, 125-132. (Annex 3)

INTRODUCCIÓN

Aunque actualmente está claramente demostrada la actividad antiviral de las proteínas Mx de diversas especies de peces (Tabla 1), los resultados muestran que ésta depende de numerosos factores relacionados tanto con el tipo celular (diferencias en la vía de inducción o en la eficiencia de la respuesta), como con el tipo de virus (tipo de ácido nucleico, ciclo de multiplicación, presencia de proteínas virales antagonistas frente al sistema del IFN tipo I, IFN I) o con el mecanismo de acción de cada proteína Mx.

En este sentido, los sistemas basados en la expresión constitutiva de proteínas Mx en una línea celular exógena constituyen una herramienta idónea, ya que en ellas la expresión de dichas proteínas es independiente de los mecanismos de inducción del sistema del IFN I, y, por tanto, independiente del tipo celular, lo que hace que el efecto antiviral determinado dependa sólo de la proteína Mx y del virus considerado en el estudio.

Esta aproximación experimental se ha utilizado con éxito en estudios previos para determinar la actividad antiviral de proteínas Mx de diferentes especies de peces, como la platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*) contra distintos virus de la familia *Rhabdoviridae* (Caipang et al., 2002; 2003); perca (*Lates calcarifer*) contra virus de las familias *Nodaviridae* y *Birnaviridae* (Wu y Chi, 2007); la actividad de la proteína Mx1 de salmón atlántico (*Salmo salar*) frente a la infección por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) o el Virus de la Anemia Infecciosa de Salmón (ISAV), así como para el estudio de la actividad de las proteínas Mx de dorada (*Sparus aurata*) frente a IPNV, al Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV), al Virus de Siluros Europeos (ESV) y al Virus de la Enfermedad de Linfocistis (LCDV) (Larsen et al., 2004; Kibenge et al., 2005; Fernandez-Trujillo et al., 2011; 2013).

Capítulo 2

Tabla 1. Especificidad antiviral de proteínas Mx en peces (adaptado de Garcia-Rosado et al., 2010; Limin et al., 2012). ND: No determinado.

Especies	Isoformas	Especificidad antiviral	
		Virus	Familia
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	7	ND	
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Mx1	IPNV, SAV	<i>Birnaviridae</i> , <i>Togaviridae</i>
	Mx2		
	Mx3		
Fletán atlántico (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	2 posibles	ND	
Platija japonesa (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	1	HIRRV VHSV	<i>Rhabdoviridae</i>
Pez gato (<i>Ictalurus punctatus</i>)	5 posibles	ND	
Salmón atlántico (<i>Salmo salar</i>)	ASMx1	IPNV	<i>Birnaviridae</i>
	ASMx2		
	ASMx3		
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	SauMx1	VHSV, LCDV	<i>Birnaviridae</i> , <i>Rhabdoviridae</i> , <i>Iridoviridae</i>
	SauMx2	ESV, LCDV, IPNV	
	SauMx3	VHSV, IPNV	
Perca barramundi (<i>Lates calcarifer</i>)	ND	VNNV IPNV	<i>Betanodaviridae</i> <i>Birnaviridae</i>
	MxI MxII MxIII	YGNNV VNNV	<i>Betanodaviridae</i>
Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)	SsMx	IPNV	<i>Birnaviridae</i>
Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Mx tipo 1	ND	
	Mx tipo 2		
Perca (<i>Perca fluviatilis</i>)	1	ND	
Pez globo (<i>Takifugu rubripes</i>)	1	ND	
Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	AaMxA AaMxB AaMxC AaMxD	ND	
Mero del mármol marrón (<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>)	1	ND	
<i>Gobiocypris rarus</i>	1	ND	
<i>Larimichthys crocea</i>	1	ND	
Besugo de roca (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	RbMx1	ND	
	RbMx2		
	RbMx3		
Carpa china (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	CiMx1	GCRV	<i>Reoviridae</i>
	CiMx2		
	CiMx3		
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	MxA	ND	
	MxB		
Carpa dorada (<i>Carassius auratus</i>)	CaMx1	ND	
	CaMx2		

En un trabajo previo, nuestro grupo de investigación caracterizó la actividad antiviral de la proteína Mx de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (SsMx) frente a IPNV utilizando una población policlonal de células embrionarias de salmón *chinook* (*Oncorhynchus tshawytscha*) (CHSE-214) que expresaban de forma constitutiva dicha proteína (Fernandez-Trujillo et al., 2008b). Este estudio constituye el punto de partida del presente trabajo, en el que se ha desarrollado una población monoclonal de células CHSE-214 denominada CHSE-SsMx, que expresa de forma constitutiva, estable y homogénea la proteína SsMx. Las células CHSE-214 son las más empleadas en este tipo de estudios, ya que son fáciles de cultivar, y cuentan con protocolos de transfección, selección y obtención de líneas clonales claramente estandarizados y optimizados (Larsen et al., 2004; Kibenge et al., 2005). Siendo, además, susceptibles a un amplio rango de virus patógenos de peces, entre los que se encuentran los que vamos a utilizar en este trabajo (Nygaard et al., 2000; Isshiki et al., 2001; Song et al., 2005; Ariel et al., 2009). El objetivo de este estudio es determinar la especificidad antiviral de la proteína SsMx usando el sistema experimental desarrollado CHSE-SsMx frente a virus patógenos de peces con distinto material genético.

DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL DESARROLLADO

El estudio de la especificidad antiviral de Mx de peces resulta esencial para comprender la interacción patógeno-hospedador en especies de interés en acuicultura, como el lenguado senegalés. En este trabajo se ha desarrollado una población clonal de células embrionarias CHSE-214 que expresan la proteína SsMx de forma constitutiva y estable. Este sistema experimental constituye una herramienta muy valiosa para el estudio de la actividad antiviral de dicha proteína, lo que incluye la determinación de su especificidad antiviral.

Este sistema *in vitro* supone una mejora del sistema desarrollado anteriormente, que estaba basado en una población policlonal (Fernandez-Trujillo et al., 2008b). En concreto, la población monoclonal muestra una mayor homogeneidad y estabilidad en la expresión de la proteína, lo que resulta fundamental para obtener resultados fiables, repetitivos y comparables entre experimentos. El carácter estable de la transcripción del gen *SsMx* en el clon CHSE-SsMx se ha confirmado mediante RT-PCR convencional en varios subcultivos celulares consecutivos. Además, mediante qPCR se obtuvieron siempre valores relativos de expresión similares (cerca de 0,03, con respecto al *e-Fl α*), con independencia del número de subcultivos celulares realizados y de la infección con los distintos virus analizados. Estos resultados indican que en la población clonal la transcripción de *SsMx* es estable, aunque no muy elevada, lo que puede deberse a la incompatibilidad entre niveles altos de transcripción de los genes exógenos y la viabilidad celular, de modo que las células con altos niveles de transcripción mueren durante el proceso de selección (Frese et al., 1995; Landis et al., 1998; Larsen et al., 2004). Fernandez-Trujillo et al. (2011), obtuvieron resultados similares con los valores de expresión de los genes de proteínas Mx de dorada (SauMx1, SauMx2 y SauMx3) incluso inferiores a los presentados en el presente trabajo (0,001-0,01, valores relativos a *e-Fl α*) en poblaciones monoclonales de células CHSE-214.

Capítulo 2

En cuanto a la tasa de crecimiento, las células CHSE-SsMx mostraron un comportamiento similar al de las células no transfectadas. La tasa de crecimiento de células CHSE-214 transfectadas es similar a las publicadas previamente en otros estudios que utilizan este sistema de expresión de proteínas Mx de peces (Larsen et al., 2004; Fernandez-Trujillo et al., 2008b; 2011). Aunque los dos tipos celulares presentan una tasa de crecimiento similar, se observan diferencias significativas en el número de células entre la línea celular CHSE-214 y el clon CHSE-SsMx hasta los 7 días de incubación, lo que se debe a diferencias en la eficiencia de adhesión de ambos tipos celulares. Estos datos demuestran que la expresión del gen exógeno no altera las funciones celulares y, por tanto, los posibles cambios en el título vírico y/o en la síntesis de RNA viral observados en las células CHSE-SsMx se deben exclusivamente a la actividad antiviral de la proteína SsMx, y no a cambios funcionales de las células causados por el proceso de transfección y selección clonal.

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LA PROTEÍNA SsMx

En el presente trabajo se ha evaluado la actividad antiviral de SsMx frente a los virus patógenos de peces IPNV, VHSV y ESV, que presentan distinto tipo de material genético. Estos virus se han seleccionado en base a su infectividad en lenguado senegalés, tipo de genoma y capacidad de replicación en la línea celular CHSE-214.

Los tres virus se inocularon a una MOI de 0,1. La inoculación de una mayor cantidad de virus puede no ser adecuada para demostrar la protección mediada por proteínas Mx en este tipo de sistemas experimentales (Lee et al., 2000; Lin et al., 2006), ya que ésta parece depender de la proporción entre proteína Mx-virus en el interior celular (Fernandez-Trujillo et al., 2013). Además, esta dosis infectiva ha sido utilizada previamente en estudios similares, obteniéndose resultados satisfactorios de inhibición (Larsen et al., 2004; Fernandez-Trujillo et al., 2008b; 2011).

Los ensayos realizados muestran una clara ausencia de ECP en las células que expresan la proteína SsMx después de la infección con IPNV y VHSV, así

como una disminución de al menos 100 veces en la producción de dichos virus a las 72 h p.i., lo que demuestra la actividad antiviral de SsMx frente a ambos virus. La actividad anti-IPNV de la proteína SsMx había sido descrita previamente por nuestro grupo de investigación (Fernandez-Trujillo et al., 2008b); por el contrario, este estudio constituye el primer trabajo que describe la actividad anti-VHSV de la proteína SsMx. Hasta la fecha, sólo se había descrito la actividad antiviral frente a este virus por acción de la proteína Mx de la platija japonesa y las SauMx1 y SauMx3 de dorada (Caipang et al., 2003; Fernandez-Trujillo et al., 2013).

La inhibición de la producción de IPNV por acción de SsMx es similar a la descrita por acción de la proteína Mx1 de salmón atlántico (ASMx1) y las proteínas SauMx2 y SauMx3 de dorada (Larsen et al., 2004; Fernandez-Trujillo et al., 2011). Además, los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación, utilizando un sistema policlonal de expresión constitutiva de *SsMx*, también muestran una disminución en la producción de IPNV (1.000 veces) (Fernandez-Trujillo et al., 2008b).

IPNV y VHSV son virus de multiplicación citoplasmática, por lo que su inhibición es coherente con la localización citoplasmática de la proteína SsMx (Fernandez-Trujillo et al., 2008b). Esta relación entre la localización de la proteína Mx y el lugar de la replicación viral ha sido descrita con anterioridad para otras proteínas Mx de peces (Lee et al., 2000; Caipang et al., 2003; Larsen et al., 2004; Lin et al., 2006).

Los estudios de PCR a tiempo real han demostrado una disminución en la síntesis del RNA que codifica la poliproteína de IPNV (a las 48 h p.i.) y la N de VHSV (24 y 48 h p.i.) por acción de SsMx, por lo que dicha proteína parece inhibir la multiplicación de estos virus actuando, al menos en parte, a nivel de la síntesis de RNA viral. Las diferencias en los tiempos en los que se detectó una disminución significativa en la síntesis de RNA viral pueden deberse a la distinta cinética de replicación de los virus considerados. La disminución en la cantidad relativa del RNA viral que codifica la poliproteína de IPNV por acción de SsMx es similar a la descrita por acción de la proteína SauMx3 de dorada, que inhibe la síntesis de RNA de IPNV a las 48 h p.i. (Fernandez-Trujillo et al., 2011). La inhibición de la síntesis del RNA que codifica la N de VHSV es también parecida a la descrita por acción

Capítulo 2

de la proteína Mx de platija japonesa, que inhibe dicha síntesis a las 24, 48 y 120 h p.i. (Caipang et al., 2003).

Los birnavirus y rhabdovirus pueden afectar a un gran número de especies piscícolas a nivel mundial, por lo que la actividad de las proteínas Mx frente a virus pertenecientes a estas familias ha sido ampliamente estudiada, demostrándose su actividad antiviral en diversas especies de peces (Caipang et al., 2003; Larsen et al., 2004; Wu y Chi 2007; Fernandez-Trujillo et al., 2011; 2013). La mayoría de estos estudios describen la inhibición de la síntesis de RNA vírico en células que expresan la proteína Mx objeto de estudio (Larsen et al., 2004; Skjesol et al., 2009; Wu et al., 2010; Fernandez-Trujillo et al., 2011). Sin embargo, otros autores han descrito un efecto protector de las proteínas Mx en ausencia de cambios en la síntesis de RNA vírico, lo que sugiere un mecanismo antiviral post-transcripcional (Chen et al., 2008; Fernandez-Trujillo et al., 2011). Así, Chen et al. (2008) han descrito un mecanismo post-transcripcional para la Mx de mero (*Epinephelus coioides*), que confiere resistencia frente a nodavirus mediante su interacción con la proteína de la cápside, evitando la formación del virión. La posible interacción de SsMx con alguna de las proteínas de IPNV y VHSV está por determinar.

Por otro lado, se ha comprobado que IPNV y VHSV no inducen la transcripción del gen *Mx* de las células CHSE-214 (*ChsMx*), lo que indica que la Mx endógena no contribuye a la protección frente a estos virus demostrada en las células CHSE-SsMx, siendo ésta debida exclusivamente a la acción de SsMx. Trabajos anteriores han demostrado la ausencia de expresión del gen *ChsMx* tras la infección con IPNV (Jensen y Robertsen, 2000; Larsen et al., 2004; Fernandez-Trujillo et al., 2008b; 2011), pero no tras la infección con VHSV. Este resultado puede deberse a mecanismos antagonistas víricos. En concreto, el efecto antagonista de IPNV frente al sistema IFN I ha sido extensamente estudiado en diversas especies de teleósteos, demostrándose que este virus inhibe la expresión de *ChsMx* (Jørgensen et al., 2007; Skjesol et al., 2009). En concreto, Skjesol et al. (2009) demostraron que las proteínas víricas VP4 y VP5 inhiben la ruta de señalización del IFN I. En el caso de VHSV, se ha descrito un mecanismo similar para la proteína no-estructural (NV) en células EPC y en la platija japonesa, pero no en células CHSE-214 (Kim y Kim, 2012).

El iridovirus ESV se ha seleccionado en el presente estudio como modelo de virus con un genoma dsDNA debido a su eficiente replicación en la línea celular CHSE-214. Los resultados obtenidos muestran la ausencia de actividad antiviral de SsMx frente a este virus, aunque no se descarta la actividad anti-ESV por acción de otros mecanismos mediados por el sistema del IFN I de lenguado. Este resultado coincide con los obtenidos para la proteína Mx de platija japonesa, perca y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) frente al iridovirus de pargo (RSIV), el iridovirus de mero en Taiwan (TGIV) y el Virus de la Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHNV), respectivamente (Caipang et al., 2002; Wu y Chi, 2007; Lester et al., 2012). Por otro lado, algunas proteínas Mx de vertebrados superiores, como la MxA de humanos, poseen un amplio rango de acción antiviral, que incluye virus DNA (Gordien et al., 2001; Netherton et al., 2009). En peces, se ha demostrado la actividad anti-LCDV mediada por el sistema del IFN I tras la inducción con poli I:C en células fibroblásticas de dorada (SAF-1) (Valverde et al., 2011). Sin embargo, la estimulación de células con poli I:C no demuestra de forma directa la actividad antivírica de la proteína Mx, ya que en el efecto antivírico observado pueden participar otras proteínas estimuladas por IFN I. La actividad anti-LCDV de dorada ha sido posteriormente confirmada utilizando un sistema *in vitro* similar al descrito en el presente trabajo, determinándose que SauMx1 y SauMx2 inhiben la multiplicación de LCDV y que SauMx2 es capaz de inhibir la multiplicación de otro iridovirus, ESV (Fernandez-Trujillo et al., 2013), lo que constituye el único caso descrito hasta la fecha de actividad antiviral de una proteína Mx de peces frente a estos virus DNA.

Al contrario de lo descrito para IPNV y VHSV, ESV sí estimula la transcripción de *ChsMx*. Este resultado concuerda con estudios anteriores en los que se ha demostrado que los iridovirus pueden inducir la expresión de Mx sin ser inhibidos por ésta, como ocurre en mero y perca (Chen et al., 2006; Wu y Chi, 2007; Hu et al., 2011; Wu et al., 2012).

En resumen, en este estudio se ha desarrollado un sistema experimental *in vitro* para la caracterización antiviral de la proteína SsMx y se ha demostrado una clara actividad antiviral de dicha proteína frente a los virus patógenos de peces IPNV y VHSV, así como una reducción en la síntesis del RNA viral que codifica

Capítulo 2

la poliproteína (IPNV) y la nucleoproteína (VHSV). En cambio, SsMx no posee actividad antiviral contra el iridovirus ESV, al menos, en las condiciones utilizadas en este estudio.

CHAPTER 3

ROLE OF THE IFN I SYSTEM AGAINST VHSV INFECTION IN JUVENILE SENEGALESE SOLE (*Solea senegalensis*)

INTRODUCTION

Type I IFN (IFN I) promotes an antiviral state in cells by inducing the expression of several antiviral proteins. In fish, some of the most important interferon stimulated genes (ISGs) with antiviral activity are *Mx*, the interferon-stimulated gene 15 (*ISG15*), and the protein kinase R gene (*PKR*) (Langevin et al., 2013a), which will be considered in this study as markers of the IFN I activity in Senegalese sole (*Senegalese sole*).

Mx proteins are large GTPases involved in intracellular membrane remodeling and intracellular trafficking (Kochs et al., 2005). The expression of teleost *Mx* proteins in response to polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) or viral infection has been described *in vivo* and *in vitro* in several species. Thus, poly I:C induces *Mx* transcription in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Atlantic salmon (*Salmo salar*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), rock bream (*Oplegnatus fasciatus*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (Trobridge et al., 1997; Jensen et al., 2002; Purcell et al., 2004; Plant et al., 2005; Fernandez-Trujillo et al., 2008a; Basanta et al., 2009; Zenke and Kim, 2009). *Mx* induction has also been described after Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) infection in rainbow trout, HIRRV infection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAV) infection in Atlantic salmon, Viral Nervous Necrosis Virus (VNNV) infection in gilthead seabream and seabass (*Dicentrarchus labrax*), as well as after Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) infection in Senegalese sole, Atlantic salmon and brown trout (*Salmo trutta*) (Lee et al., 2000; Kileng et al., 2007; Lockhart et al., 2007; Saint-Jean and Perez-Prieto, 2007; Fernandez-Trujillo et al., 2008a; 2011; Novel et al., 2013). The virus-specific antiviral activity of fish *Mx* proteins has been demonstrated against viruses belonging to several families, such as *Betnodaviridae*, *Birnaviridae*, *Iridoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* and *Togaviridae* (Table 1 in chapter 2). 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. Thus, two general mechanisms have been described in humans

Chapter 3

and teleosts: the inhibition of viral genome synthesis, and the inhibition of viral particle assembly, preventing the production of infective virions (Kochs et al., 2002; Haller et al., 2007; Chen et al., 2008; Wu et al., 2010).

ISG15 is an ubiquitin-like protein composed of two tandem repeats of ubiquitin-like domains; ISG15 can conjugate to cellular target proteins via the C-terminal LRLRGG sequence (ISGylation) (Haas et al., 1987; Loeb and Haas, 1992). However, unlike ubiquitin, ISGylated proteins are not degraded in the proteasome (Dao and Zhang, 2005). The ISGylation and deconjugation are mechanisms controlled by a series of IFN-inducible enzymes. Furthermore, cellular proteins involved in different pathways, including IFN I signaling, as well as viral proteins are the targets for the ISGylation. Interestingly, ISG15 can be secreted, acting as a cytokine that promotes IFN I production by T cells (Knight and Cordova, 1991; Recht et al., 1991). Therefore, ISG15 proteins seem to play a role in the regulation of IFN I signaling, and they also shows antiviral activity (Osiak et al., 2005; Kim et al., 2006). In teleosts, *ISG15* gene transcription has been studied in rainbow trout (O'Farrell et al., 2002), catfish (Liu et al., 2002), crucian carp (*Carassius auratus*) (Zhang et al., 2007b), black rockfish (*Sebastes schlegeli*) (Baeck et al., 2008), Atlantic salmon (Rokenes et al., 2007), Atlantic cod (*Gadus morhua*) (Seppola et al., 2007; Furnes et al., 2009), Japanese flounder (Yasuike et al., 2010), red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Liu et al., 2010), and, more recently, in grouper (*Epinephelus coioides*) (Huang et al., 2013), zebrafish (*Danio rerio*) (Langevin et al., 2013b) and turbot (*Scophthalmus maximus*) (Pereiro et al., 2014). Fish ISG15 proteins contain the critical C-terminal glycine residues, suggesting that they could conjugate to cellular target proteins and have similar antiviral activity as their mammalian counterparts. In fact, antiviral activity of ISG15 has been reported in several fish species (Rokenes et al., 2007; Langevin et al., 2013b).

PKR proteins are involved in many cellular processes, including cell proliferation and cell growth, apoptosis, and tumor suppression, being one of the best known ISGs in humans (Garcia et al., 2006). In mammals, PKR is activated by autophosphorylation triggered by double-strain RNA (dsRNA). Activated PKR induces the phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2 α), leading to a strong inhibition of protein synthesis (Sudhakar et al., 2000). *PKR* genes have

been studied or sequenced to date in different fish species, such as crucian carp (Hu et al., 2004), zebrafish (Rothenburg et al., 2005), Japanese flounder (Zhu et al., 2008), Atlantic salmon (*GenBank* access no. ABU24344), rock bream (Zenke et al., 2010), fugu (*Takifugu rubripes*) (del Castillo et al., 2012), rainbow trout (*GenBank* access no. NP001139363) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Hu et al., 2013). *PKR* transcription has been reported in spleen of rock bream and in leucocytes of fugu after poly I:C inoculation (Zenke et al., 2010; del Castillo et al., 2012). However, the antiviral mechanisms of fish *PKR* have only been described in embryonic cells of Japanese flounder, where over-expression of *PKR* increases eIF-2 α phosphorylation (Zhu et al., 2008).

VHSV is the causal agent of the viral haemorrhagic septicaemia (VHS), an important disease affecting farmed salmonid species. The occurrence of VHSV in wild marine fish has increased recently, and has led to the conclusion that VHSV is enzootic in the marine environment (Skall et al., 2005). The existence of marine reservoirs of VHSV represents a potential risk for the marine farmed fish, including Senegalese sole, which is susceptible to VHSV by experimental infection (Lopez-Vazquez et al., 2011). The induction of the Senegalese sole IFN I system has been studied only after inoculation with poly I:C and IPNV, and its antiviral activity against IPNV infection has also been demonstrated (Fernandez-Trujillo et al., 2008a). However, although Senegalese sole Mx protein (*SsMx*) shows *in vitro* antiviral activity against VHSV (chapter 2 of this PhD Thesis), and VHSV infection activates the *SsMx* promoter in RTG-2 cells (chapter 1), there is no information about the *in vivo* response of the IFN I system to a VHSV infection in this species. Therefore, in this study, the activity of the IFN I system of juvenile Senegalese sole against infections with VHSV isolates pathogenic and non-pathogenic to sole has been evaluated by measuring the transcription of *Mx*, *ISG15* and *PKR*. Additionally, the protection conferred by the IFN I system against the pathogenic VHSV isolate has been tested by stimulating the fish IFN I system with poly I:C prior to the infection.

DISCUSSION

VHSV INFECTION INDUCES *Mx*, *ISG15* AND *PKR* TRANSCRIPTION IN SENEGALESE SOLE

IFN I exerts the antiviral activity by inducing the expression of ISGs via the JAK/STAT pathway; however, the ISG antiviral mechanisms are not fully understood (Langevin et al., 2013a). ISGs have been classically used as indicators for evaluating the IFN I system activation by viral infections or chemical inducers, such as poly I:C.

In this study, the induction of the transcription of different ISGs, such as *Mx*, *ISG15* and *PKR*, has been quantified in Senegalese sole after the inoculation with poly I:C or VHSV isolates with different levels of virulence, a marine isolate, pathogenic to sole under experimental conditions (Lopez-Vazquez et al., 2011), and a freshwater isolate, which replicates in sole, although it does not cause mortality in this fish species (I Bandin, personal communication). The origin of VHSV isolates seems to have a substantial effect on their virulence. In fact, previous studies have shown that VHSV marine isolates are not pathogenic to Atlantic salmon and rainbow trout (King et al., 2001; Brudeseth et al., 2008), whereas turbot is not susceptible to the infection by freshwater VHSV isolates (King et al., 2001). In addition, the geographical origin of VHSV was revised in Skall et al. (2005) suggesting that VHSV has been transmitted to the freshwater aquaculture from marine fish species (primary host), which are still used as freshwater fish feed. After introduction to the freshwater environment, VHSV isolates may, by mutations, have changed their host range from marine to freshwater species, losing virulence for marine species (Skall et al., 2005).

This is the first report of *ISG15* and *PKR* transcriptional induction in Senegalese sole after poly I:C or viral infection, whereas high levels of *SsMx* transcription had been previously reported after poly I:C inoculation (Fernandez-Trujillo et al., 2008a). The induction of the ISG expression has been evaluated by the mRNA quantification, which has been expressed relative to two housekeeping genes, *RPS4* and *UBQ*. These genes express at a constant level in flatfish

Chapter 3

(Senegalese sole and Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*) larvae submitted to different experimental conditions (Infante et al., 2008). Furthermore, the present study indicates that they are also adequate for the relative quantification of gene transcription in juvenile soles, at least after poly I:C treatment and VHSV infection.

In this work, poly I:C inoculation resulted in the transcription of the three ISGs under study, with the *ISG15* gene showing the earliest (at 3 h p.i.) and highest transcriptional levels, which is in concordance with previous studies. In particular, an early *ISG15* transcription after poly I:C stimulation has been reported in Atlantic cod, Japanese flounder, black rockfish peripheral blood leukocytes, crucian carp CAB cells and grouper spleen cells (GS) (Seppola et al., 2007; Zhang et al., 2007b; Baeck et al., 2008; Yasuike et al., 2010; Huang et al., 2013). In addition, studies carried out in Atlantic salmon and turbot have evidenced a high level of *ISG15* transcription after poly I:C induction (Røkenes et al., 2007; Pereiro et al., 2014), and zebrafish *ISG15* transcription was induced after Spring Viraemia of Carp Virus (SVCV) and IHNV infections (Langevin et al., 2013b).

The transcription of *Mx* began 12 h after poly I:C treatment (9 h later than *ISG15* transcription), showing transcriptional levels 10-folds lower than those recorded for the *ISG15* gene. Similar results have been described for *Mx* genes from other fish species, such as channel catfish, rainbow trout, Atlantic salmon, rock bream, gilthead seabream and carp (Plant et al., 2005; Lockhart et al., 2007; Tafalla et al., 2007; Zenke and Kim, 2009; Bravo et al., 2011; Falco et al., 2014). *PKR* transcription has only been detected at 12 h p.i., showing relative values of transcription 100-folds lower than the *ISG15* gene and 3.4-folds over non-stimulated fish. This low transcription level induced by poly I:C has also been described in rock bream and fugu (Zenke et al., 2010; del Castillo et al., 2012). However, these studies were conducted in spleen and leukocytes, whereas the sole ISG transcription was analyzed in head kidney. One-time and low *PKR* transcription could be associated with the activity of PKR (phosphorylation of the eIF-2 α), leading to a strong inhibition of protein synthesis. Therefore, high levels of PKR transcription throughout time could compromise cellular viability.

In general terms, VHSV infection induced the transcription of the three ISGs later than poly I:C. This observation agrees with the results reported in Senegalese

sole for *Mx* transcription after IPNV inoculation (Fernandez-Trujillo et al., 2008b), as well as in other species infected with different viruses (O'Farrel et al., 2002; Purcell et al., 2004; Plant et al., 2005; Lockart et al., 2007; Tafalla et al., 2007; Avunje et al., 2011). However, maximum ISG transcription levels were lower after poly I:C stimulation than after VHSV infection, regardless of the viral isolate used. Thus, although in other species viral infections induced a lower IFN I response than poly I:C (O'Farrel et al., 2002; Purcell et al., 2004; Plant et al., 2005; Lockart et al., 2007; Tafalla et al., 2007; Fernandez-Trujillo et al., 2008; Avunje et al., 2011), in Senegalese sole VHSV seems to be a more potent IFN inducer than poly I:C.

Regarding the magnitude of the induction after VHSV infection, the results showed a similar pattern to that obtained after poly I:C stimulation: powerful induction of *Mx* and *ISG15* transcription and low *PKR* transcription after VHSV infection. Similar levels of *ISG15* transcription after VHSV infection has been described in other flatfish (Avunje et al., 2011; Pereiro et al., 2014). In fact, Verrier et al. (2011) reported that VHSV infection in salmonids induces the transcription of diverse ISGs, such as *Mx*, *VIG* and *TRIM* genes.

The comparison between the response triggered by both VHSV isolates proved that the kinetics and transcription level of the three ISGs tested was similar, although *Mx* and *ISG15* transcription began 24 h later after infection with the non-pathogenic isolate. However, viral nucleoprotein RNA quantification in head kidney showed earlier and higher replication levels of the pathogenic isolate, suggesting that lower levels of RNA of the non-pathogenic VHSV isolate are needed to induce the IFN response at the same level as the pathogenic isolate. This finding might represent an important difference between both isolates regarding the interaction with the host, and could partly account for the lack of virulence of the freshwater VHSV isolate to Senegalese sole. These results are supported by the results obtained from the quantification of titre of infective viral particles in pooled spleen and heart, which are viral target organs, as the titre of the pathogenic VHSV isolate increased at 72 h p.i., whereas the titre of the non-pathogenic VHSV isolate remained stable throughout time, and could be the initial inoculum.

POLY I:C-STIMULATED IFN I SYSTEM PROTECTS SENEGALESE SOLE AGAINST VHSV INFECTION

Cumulative mortality at the end of the experiment in animals inoculated only with the pathogenic VHSV (L15+VHSV group) was 68%, which is similar to the mortality recorded in 20 g Senegalese sole intraperitoneally inoculated with similar virus doses (50% at 60 days p.i.) (Lopez-Vazquez et al., 2011). However, the inoculation of poly I:C prior to infection (poly I:C+VHSV group) resulted in a drastic decrease in mortality (5%), indicating that IFN I system stimulated by poly I:C promotes protection against VHSV infection in Senegalese sole. In fact, viral multiplication in these animals seems to be inhibited, since viral titre in pooled spleen-heart was constant throughout time. On the contrary, viral replication was clearly demonstrated in animals from the L15+VHSV group. Furthermore, viral RNA relative values in poly I:C-treated animals were always significantly lower than those recorded in non-treated fish. Therefore, poly I:C induces an antiviral state that severely compromises the replication of the marine VHSV isolate in Senegalese sole. Previous studies have also established the antiviral state elicited by poly I:C in several fish species against different viruses (Trobridge et al., 1997; Jensen et al., 2002; Lockhart et al., 2004; Plant et al., 2005; Nishizawa et al., 2009; Oh et al., 2012). Specifically, in flatfish it has been reported that poly I:C-treated Japanese flounder was protected against VHSV infection, and poly I:C inoculation in Senegalese sole decreased IPNV replication (Fernandez-Trujillo et al., 2008a; Takami et al., 2010).

The antiviral state triggered by poly I:C in Senegalese sole could be partly due to the induction of *Mx*, *ISG15* and *PKR* transcription. Antiviral activity exerts for these three ISGs has been previously described in several fish species. Specifically, PKR antiviral mechanisms have only been described in Japanese flounder, where over-expression of *PKR* gene inhibited *Scophthalmus maximus* Rhabdovirus (SMRV) multiplication (Zhu et al., 2008); however, the *Mx* antiviral properties had been determined in several fish species (Garcia-Rosado et al., 2010; Verrier et al., 2011). Besides, *ISG15* antiviral activity has been detected in some fish species, such as Atlantic salmon *ISG15*, which interacts with an ISAV protein

(Rokenes et al., 2007), and, more recently, Langevin et al. (2013b) have reported that zebrafish ISG15 conjugates to both, the non-structural (NV) and phosphoprotein (P) IHNV proteins, which are targets for ISGylation.

VHSV INTERFERES WITH ISG INDUCTION PROMOTED BY POLY I:C

The relative quantification of *Mx*, *ISG15* and *PKR* transcription in soles from the poly I:C+VHSV group revealed that, at the very early stages of the infection (3-6 h p.i.), the ISG transcriptional levels were significantly lower than those recorded in animals from the poly I:C+L15 group. This result suggests that VHSV interferes with the IFN I response, likely in order to evade or limit the innate host defences. In fact, Kim and Kim (2012) have suggested that the NV protein of VHSV may suppress the activity of the Japanese flounder *Mx* gene promoter in EPC cells. More recently, these authors reported that the NV protein suppresses the early activation of the nuclear factor kB (NF-k) in host cells (Kim and Kim, 2013). Other reports suggested that the NV protein has an antiapoptotic function at the early stage of virus infection, thus preventing infected cells from undergoing cell death before the virus finishes its multiplication cycle (Ammayappan and Vakharia, 2011). In addition, the antagonistic effect of this viral protein has been described in other rhabdoviruses, having been speculated that it may interact with host cytoskeleton elements, or suppress the IFN I system (Chiou et al., 2000; Choi et al., 2011). The IFN I antagonist effect of non-structural proteins has been previously reported for different viruses. Thus, IPNV VP4 and VP5 proteins and two ISAV proteins block the signaling cascade triggered by IFN I (McBeath et al., 2006; Garcia-Rosado et al., 2008; Skjesol et al., 2009). However, in the present study, further experiments are necessary to confirm the involvement of the NV protein in the VHSV antagonism observed.

Intriguingly, at 12 h p.i. ISG transcription levels were similar in infected (poly I:C+VHSV group) and non-infected fish (poly I:C+L15 group) thus it is tempting to think that a quick inhibition of the VHSV antagonists is carried out by the stimulated IFN I system, which would allow to restore the IFN I response. Actually, the Senegalese sole *Mx* has antiviral activity against VHSV (present

Chapter 3

study, chapter 2), and the NV and P proteins of IHNV is a target of the zebrafish ISG15 (Langevin et al., 2013b). Thus, these two proteins might contribute to counteract the inhibition of the IFN system shown by VHSV.

In summary, in this study we demonstrated the main role of the IFN I system against VHSV in Senegalese sole by several lines of evidence. First, the lower replication level of the non-pathogenic VHSV isolate required to induce the IFN I response at the same level as the pathogenic isolate, which can partly be responsible for the lack of virulence to sole of this isolate. Second, the antiviral state generated by poly I:C in juvenile Senegalese sole that protects them from the infection with a pathogenic VHSV isolate. And third, the probable antagonistic activity carried out by VHSV, which affects the transcription of the three ISGs tested. This antagonistic activity seems to be quickly counteracted. Further analysis on the molecular mechanisms responsible for our findings shall clarify the role of the different IFN stimulated genes and/or pathways involved in the interaction between VHSV and the Senegalese sole IFN I system.

GENERAL REMARKS

GENERAL REMARKS:

This PhD Thesis is a step forward in the knowledge of the Mx protein role within the innate immune system against viral infections in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). It is a comprehensive work comprising *in vitro* studies on the regulation of the Senegalese sole Mx gene (*SsMx*) transcription, and on the SsMx protein antiviral activity, as well as an *in vivo* approach to determine the role of the type I interferon (IFN I) system of Senegalese sole against the infection by Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV).

The issues addressed in this PhD Thesis include:

- The structural characterization of the *SsMx* promoter, including the role of the main regulatory motifs found.
- The assessment of the *SsMx* promoter activity in response to polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C). Both, the dose response and the time-course of the induction, were established in two different *in vitro* systems.
- The evaluation of the *SsMx* promoter activity in response to three different viral infections was also carried out in two different *in vitro* systems.
- The characterization of the antiviral activity of the SsMx protein against three different viruses.
- The description of the early response of interferon stimulated genes (ISGs) of Senegalese sole juveniles after infection with two different VHSV isolates (pathogenic and non-pathogenic to this fish species).
- The confirmation of the protection conferred by the IFN I system of Senegalese sole juveniles against VHSV infection.
- The observation that VHSV may exert an antagonistic activity on the IFNI system of Senegalese sole.

A typical *Mx* promoter with particular features

The *SsMx* promoter shows a typical ISG promoter structure, although it also has some particular features, which make it different from any other fish *Mx* promoter described to date. Specifically, *SsMx* promoter displays three interferon-stimulated response elements (ISREs), which has only been described for the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) *Mx* promoter, with the proximal, ISRE1, being essential for the promoter activation. In addition, it contains a region rich in guanosine-cytosine nucleotides (G-C rich region), which has been demonstrated to be an important area for the *SsMx* transcription regulation (at the same level as the ISRE1). The presence of G-C regions often implies the lack of TATA boxes, as it happens in the *SsMx* promoter, and the presence of multiple transcription start sites, suggesting a complex gene expression regulation system (Deaton and Bird, 2011).

This G-C rich region constitutes a variable microsatellite. Although the presence of microsatellites in promoters has been frequently reported (Almuly et al., 2005; Weizhang and Qionglin, 2008; Kong et al., 2010), this is the first description of a fish *Mx* promoter containing these sequences. Microsatellites in gene promoters are commonly involved in the transcriptional regulation, and allelic differences are frequently related to the promoter activation level (Gazzoli and Kolodner, 2003; Harendza et al., 2003; Stevens et al., 2003; Baseggio et al., 2004; Liu et al., 2005). For this reason, it is tempting to suggest that the polymorphisms founded in the G-C microsatellite of the *SsMx* promoter might have a functional meaning. However, the relation between the different alleles and the level of *SsMx* transcription requires further studies, in which it would be mostly interesting to evaluate if this variability is related to the Senegalese sole resistance to viral infections. If such relationship exists, the microsatellite locus in the *SsMx* promoter could be used as a marker for genetic selection in these species. Therefore, the present PhD Thesis represents the starting point of this new line of investigation.

The response of the Senegalese sole *Mx* promoter depends on cellular factors

The activation of the *SsMx* promoter by poly I:C and viral infections was studied in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) embryo cells (CHSE-214) and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonad tissue cells (RTG-2 cells), both derived from different fish species and tissues. This experimental approach has highlighted the relevant role of specific cellular factors involved in the IFN I-mediated activation, since different induction patterns were obtained depending on the cellular type considered.

Thus, the use of different cell lines to characterize IFN I signaling regulation is a useful approach that may lead to a wider understanding of the IFN I-system control, and, therefore, of the virus-host interactions. In addition, the successful response of the *SsMx* promoter in cells from phylogenetically distant species supports the conservation of the IFN I system signaling pathways in fish, and open this type of approaches to species where specific cell lines are not available.

Transient transfection has been an appropriate approach for the functional characterization of the *SsMx* promoter; however, future studies on the factors involved in *SsMx* induction, and on the interaction between viruses and the IFN I system, will require the development of stable cellular systems that allow to address further questions on IFN signaling regulation.

***SsMx* antiviral specificity**

As it has been demonstrated in chapter 1, the *Mx* induction by viral infections clearly depends on the cell type. For this reason, the evaluation of the antiviral activity of the *SsMx* protein required *in vitro* systems constitutively expressing the *Mx* protein under study, that is, systems where *SsMx* transcription does not depend on the IFN I pathway and, therefore, the *Mx* activity depends only on the virus considered. This kind of systems, consisting of transfected cells expressing exogenous *Mx* proteins, has been successfully used in previous studies (Larsen et al., 2004; Kibenge et al., 2005; Fernandez-Trujillo et al., 2008b; 2011; 2013). In this work, a monoclonal population of CHSE-214 cells expressing *SsMx*

General remarks

(CHSE-SsMx) under the control of the Cytomegalovirus (CMV) promoter has been established and characterized. Using this experimental system, it was evidenced that the SsMx protein clearly protects the expressing cells against Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and VHSV infection by reducing the viral RNA production, although other complementary mechanisms cannot be ruled out. On the contrary, SsMx did not protect the cells against the DNA virus considered, the European Sheatfish Virus (ESV). To complete the antiviral spectrum of the SsMx protein, further experiments will test its antiviral activity against other viruses, as well as against different viral isolates showing differences in virulence.

Similar ISG transcriptions with lower replication level of the non-pathogenic VHSV isolate

Two different *in vivo* challenges were designed in order to: (i) study the induction of several ISGs triggered by VHSV infection, and (ii) study the anti-VHSV activity of the IFN I system stimulated by poly I:C. This virus was considered a good model to perform the *in vivo* study because the anti-VHSV activity of the SsMx protein was clearly demonstrated *in vitro* (chapter 2), and marine VHSV isolates may cause mortality in economically important flatfish species, such as turbot (*Scophthalmus maximus*) or Japanese flounder. Furthermore, these isolates also cause mortality in Senegalese sole under experimental conditions (Ross et al., 1995; Issiki et al., 2001; Lopez-Vazquez et al., 2011; 2007).

Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) is an infectious disease that causes high mortality in salmonids, although its etiologic agent (VHSV) has also been isolated from an increasing number of wild marine fish species (Mei et al., 2014). In general, marine fish, like Senegalese sole, are only susceptible to marine VHSV isolates, suggesting that marine and freshwater isolates vary substantially in their host specificity (King et al., 2001; Brudeseth al., 2008), which may likely imply differences regarding their interaction with the IFN I system (i.e. different stimulation pattern of ISGs, different specificity of antiviral proteins, or different success of viral antagonistic strategies). For this reason, two VHSV isolates with different origin (marine and freshwater) have been used in this study.

To carry out the experiments, new RT-qPCR protocols to quantify the *protein kinase R (PKR)* and *ISG15* transcription in Senegalese sole have been developed, and both cDNAs have been partially sequenced (data non-shown). Thus, the characterization of these two genes (structure, regulation and activity) in Senegalese sole is a new line of research opened by this PhD work.

According to our results, both isolates stimulate the transcription of *Mx*, *ISG15* and *PKR* at the same level at all times post-infection (p.i.) tested, being *ISG15* the one showing the earliest and highest response, and thus suggesting that this ISG may have a key role in the first stage of the IFN I-stimulated system in sole, which is worthy to look into.

However, the quantification of viral genome in head kidney indicates that a lower level of viral replication is required for the non-pathogenic isolate to induce the IFN I response. Hence, this differential amount of viral genome required to trigger the IFN I system may, at least partly, account for the differential pathogenicity showed by the two VHSV isolates.

IFN I system protects Senegalese sole juveniles from VHSV infection

The current PhD Thesis has also demonstrated that poly I:C induces an antiviral state that prevents mortality caused by the marine isolate and inhibits the replication of VHSV in Senegalese sole. The inhibition of viral replication after poly I:C inoculation has also been reported for several viruses in several fish species (reviewed in Langevin et al., 2013a). In general, resistance to a viral infection can be based on multiple immune mechanisms, including the IFN pathways. In this case, the stimulation of the IFN I system is sufficient to protect Senegalese sole against VHSV, which highlights the role of this system in the antiviral defense of this species.

IPNV and VHSV antagonistic effect

VHSV, did not activate the *SsMx* promoter in transfected CHSE-214 cells (chapter 1), and it also failed in stimulating the transcription of the endogenous CHSE-214 *Mx* gene (chapter 2). In addition, the experimental infection conducted in chapter 3 showed that VHSV infection interferes with the previously stimulated sole IFN I system, decreasing the transcription of several ISGs (*Mx*, *ISG15* and *PKR*) in the early infection stage. Taken together, all these results suggest the interference of VHSV infection with the IFN I-induced system. This putative antagonistic effect must be through the interaction between VHSV proteins or genome with host subcellular factors. In fact, it has been demonstrated that a non-structural VHSV protein (NV) is involved in blocking the IFN I system activity against viral infections in epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cells and in Japanese flounder (Ammayappan and Vakharia 2011; Kim and Kim, 2012; 2013).

Interestingly, we also observed that this antagonism is counteracted *in vivo*, since, an increase on the ISG transcriptions, in the last time points assayed, was observed in the VHSV inoculated group, previously stimulated with poly I:C. Further experiments are necessary to complete the characterization of this interaction, which represents one of the most interesting lines of research initiated by the present study.

On the other hand, the IPNV antagonistic effect is well-established in other fish species (Collet et al., 2007; Jørgensen et al., 2007; Skjesol et al., 2009; Lester et al., 2012), and has also been suggested in Senegalese sole by Fernandez-Trujillo et al. (2008a). Therefore, it was not surprising the absence of response of the *SsMx* promoter after IPNV infection (chapter 1).

Final remark

Although biotechnological developments in the aquaculture industry are not as fast as those in land-based food production systems, it is evident that the application of this technology to the culture of fish species may significantly contribute to improve this activity (Hew and Fletcher, 2001; Melamed et al., 2002; De-Santis et al., 2007). Some of the biotechnological approaches that have been addressed to date in order to control viral infections in fish farms include the use of DNA vaccines, immunostimulants, antisense technology, as well as the identification of markers for disease resistance and transgenesis (Hew and Fletcher, 2001; Dunham, 2009). Now that the antiviral activity of Mx and other ISGs has been established for a variety of fish species, it would be of great interest to develop an Mx/ISG-based technology in order to control viral diseases. These genes might be useful as transgenes, as blueprint to design/engineer novel antiviral substances, or as markers for genetic selection. Progress on these issues will probably allow the development of new tools to fight virus infections in fish aquaculture.

Particularly, Senegalese sole is an important and promising commercial fish species that represents an interesting candidate to explore these new strategies in order to improve their natural resistance to viral diseases.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) El promotor del gen que codifica la proteína Mx de lenguado senegalés (*SsMx*) posee los elementos característicos de los promotores de genes inducidos por interferón tipo I (IFN I). Destaca la presencia de tres elementos de respuesta estimulados por IFN I (ISRE), siendo el más próximo al codón de inicio de la transcripción (ISRE1) el implicado principalmente en la regulación de la transcripción de *SsMx*.
- 2) La región rica en nucleótidos G-C del promotor del gen *SsMx* contiene un microsatélite que presenta variabilidad, lo que constituye la primera descripción de este tipo de elementos en promotores de genes *Mx* de teleósteos. Esta región está implicada en el control de la transcripción de *SsMx* al mismo nivel que el ISRE1.
- 3) El tipo celular influye en la activación diferencial del promotor de *SsMx* en respuesta a distintas infecciones víricas.
- 4) La proteína SsMx presenta una clara actividad antiviral *in vitro* frente a las infecciones por los virus RNA, Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) y Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV), careciendo de actividad frente al virus DNA, Virus de Siluros Europeos (ESV). Dicha actividad antivírica se produce, al menos en parte, a nivel de la síntesis de RNA vírico.
- 5) *In vivo*, un menor nivel de replicación del aislado de VHSV no patógeno para lenguado induce niveles de transcripción de los genes estimulados por IFN I *Mx*, *ISG15* y *PKR* similares a los inducidos por el aislado patógeno, que presenta niveles de replicación superiores.
- 6) La estimulación del sistema del IFN I por poli I:C protege a juveniles de lenguado frente a una infección por un aislado patógeno de VHSV, indicando el papel primordial de este sistema en la defensa frente a este virus.
- 7) La infección por un aislado de VHSV patógeno disminuye los niveles de transcripción temprana de *Mx*, *ISG15* y *PKR* en lenguados previamente estimulados con poli I:C, lo que sugiere que VHSV tiene actividad antagonista frente al sistema inmune mediado por IFN I de lenguado.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1) The promoter of the Senegalese sole Mx gene (*SsMx*) contains the typical elements described for type I interferon (IFN I)-induced genes, showing three IFN-stimulated response elements (ISREs). The most proximal to the start codon (ISRE1), is the main ISRE involved in the *SsMx* promoter activity.
- 2) The G-C-rich region of the *SsMx* promoter contains a variable microsatellite, which has not been previously described in any teleost *Mx* gene promoter. This region is involved in the *SsMx* transcriptional control at the same level as the ISRE1.
- 3) The cellular type affects the differential activation of the *SsMx* promoter by different viral infections.
- 4) *In vitro*, SsMx protein shows a clear antiviral activity against the RNA viruses, Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV), whereas it lacks antiviral activity against a DNA virus, the European Sheatfish Virus (ESV). The recorded antiviral activity is caused, at least partially, by reducing viral RNA synthesis.
- 5) *In vivo*, a lower replication level of the VHSV isolate non-pathogenic to sole induces the transcription of the IFN-stimulated genes *Mx*, *PKR* and *ISG15* at the same level as the pathogenic isolate, which displays higher replication levels.
- 6) The IFN I system stimulated by poly I:C protects juvenile Senegalese sole against the infection with a pathogenic VHSV isolate, indicating the main role of this system against this virus.
- 7) The early transcription of *Mx*, *PKR* and *ISG15* stimulated by poly I:C in juvenile sole is reduced by the subsequent inoculation of a pathogenic VHSV isolate, suggesting that VHSV exerts antagonism against the Senegalese sole IFN I system.

BIBLIOGRAFÍA

- Accola MA, Huang B, Al Masri A, McNiven MA (2002).** The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Bio Chem*, 277: 21829-21835.
- Aggad D, Mazel M, Boudinot P, Mogensen KE, Hamming OJ, Hartmann R (2009).** The two groups of zebrafish virus induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains. *J Immunol*, 183: 3924-3931.
- Ahne W, Schlotfeldt HJ, Thomsen I (1989).** Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *J Vet Med*, 36: 333-336.
- Ahne W, Ogawa M, Schlotfeldt HJ (1990).** Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish *Silurus glanis*. *J Vet Med*, 37: 187-190.
- Almuly R, Poleg-Danin Y, Gorshko S, Gorshkova G, Rapoport B, Soller M, Kashi Y, Funkenstein B (2005).** Characterization of the 5' flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: Analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter. *Fisheries Sci*, 71: 479-490.
- Altmann SM, Mellon MT, Johnson MC, Paw BH, Trede NS, Zon LI (2004).** Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev Comp Immunol*, 28: 295-306.
- Ammayappan A, Vakharia VN (2011).** Nonvirion protein of novirhabdovirus suppresses apoptosis at the early stage of virus infection. *J. Virol*, 85: 8393-8402.
- Anne V, Thomas, Melanie P, Aurore D, Broers, Hussein Zezafoun, Daniel JM (2006).** Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenet*, 58: 383-389.
- APROMAR (2013).** La Acuicultura Marina de Peces en España. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos.
- Ariel E, Nicolajsen N, Christophersen M-B, Holopainen R, Tapiovaara H, Jensen BB (2009).** Propagation and isolation of ranaviruses in cell culture. *Aquaculture*, 294: 159-164.

Bibliografía

- Asano A, Jin HK, Watanabe T (2003).** Mouse Mx2 gene: organization, mRNA expression and the role of the interferon-response promoter in its regulation. *Gene*, 306: 105-113.
- Avunje S, Wi-Sik K, Chang-Su P, Myung-Joo O, Sung-Ju 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.
- Baeck GW, Kim JW, Park CI (2008).** Identification and expression analysis of an interferon stimulated gene 15 (ISG15) from black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 679-681.
- Basanta KD, Ellis AE, Collet B (2009).** Induction and persistence of Mx protein in tissues, blood and plasma of Atlantic salmon Parr, *Salmo salar*, Injected with poly I:C. *Fish Shellfish Immunol*, 26: 40-48.
- Baseggio L, Bartholin L, Chantome A, Charlot C, Rimokh R, Salles G (2004).** Allele-specific binding to the 308 single nucleotide polymorphism site in the tumour necrosis factor- α promoter. *Immunogenet*, 31: 15-19.
- Biacchesi S, Thoulouze MI, Bearzotti M, Yu YX, Bremont M (2000).** Recovery of NV knockout Infectious Hematopoietic Necrosis Virus expressing foreign genes. *J Virol*, 74: 11247-11253.
- Biron CA, Sen GC (2001).** Interferons and other cytokines. En: *Fields Virology* (ed by DM Knipe & PM Howley), 321-351. Philadelphia: Lippincott-Raven (USA).
- Bloch B, Larsen JL (1993).** An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Dis Aquat Organ*, 15: 235-240.
- Bly JE, Quiniou SM, Clem LW (1997).** Environmental effects on fish immune mechanisms. *Dev Biol Stand*, 90: 33-43.
- 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 MoxA 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.
- Braunwald J, Nonnenmacher H, Tripier-Darcy F (1985).** Ultrastructural and biochemical study of Frog Virus 3 uptake by BHK-21 cells. *J Gen Virol*, 66: 283-293.
- Bravo J, Acosta F, Padilla D, Grasso V, Real F (2011).** Mx expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) in response to poly I:C, bacterial LPS and chromosomal DNA: preliminary study. *Fish Shellfish Immunol*, 31: 170-172.
- Brudeseth BE, Skall HF, Evensen Ø (2008).** Differences in virulence of marine and freshwater isolates of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus *in vivo* correlate with *in vitro* ability to infect gill epithelial cells and macrophages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Virol*, 82: 10359-10365.
- Caipang CMA, Hirono I, Aoki T (2002).** Viral resistance of a recombinant Japanese flounder Mx-transfected fish cell. *Fish Sci*, 68: 1217-1218.
- Caipang CMA, Hirono I, Aoki T (2003).** *In vitro* inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. *Virology*, 317: 373-382.
- Campbell S, McBeath A, Secombes C, Snow M, Collet B (2011).** Interferon response following infection with genetically similar isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) exhibiting contrasting virulence in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol*, 30: 287-294.
- Chang KC, Hansen E, Foroni 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 Y, Su Y, Lin JH, 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.
- Chen YM, Su YL, Shie PS, Huang SL, Yang HL, Che TY (2008).** Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein. *Dev Comp Immunol*, 32: 825-836.

Bibliografía

- Chin KC, Cresswell P (2001).** Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 15125-15130.
- Chinchar G, Essbauer S, He JG, Hyatt A, Miyazaki T, Seligy V, Williams T (2005).** Family Iridoviridae. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight report of the international committee on the Epizootic Haematopoietic Necrosis manual of diagnostic tests for aquatic animals. Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego, California, USA, 145-161.
- Chiou PP, Kim CH, Ormonde P, Leong JA (2000).** Infectious hematopoietic necrosis virus matrix protein inhibits host-directed gene expression and induces morphological changes of apoptosis in cell cultures. *J Virol*, 74: 7619-7627.
- Choi MK, Moon CH, Ko MS, Lee UH, Cho WJ, Cha SJ, Do JW, Heo GJ, Jeong SG, Hahm YS (2011).** A nuclear localization of the Infectious Haematopoietic Necrosis Virus NV protein is necessary for optimal viral growth. *PLoS One*, 6: 22362.
- Collet B, Secombes CJ (2001).** The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter: structural and functional characterization. *J Biochem*, 268: 1577-1584.
- Collet B, Boudinot P, Benmansour A, Secombes CJ (2004).** An Mx1 promoter-reporter system to study interferon pathways in rainbow trout. *Dev Comp Immunol*, 28: 793-801.
- Collet B, Munro ES, Gahlawat S, Acosta F, Garcia J, Roemelt C, Zou J, Secombes CJ, Ellis AE (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 (2014).** Innate immune response of salmonid fish to viral infections. *Develop Comp Immunol*, 43: 160-173.
- Cutrin JM, Oliveira JG, Barja JL, Dopazo CP (2000).** Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish, and other reservoirs in Northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol*, 66: 839-843.

- Dao CT, Zhang DE (2005).** ISG15: a ubiquitin-like enigma. *Front Biosci*, 10: 2701-2722.
- Deaton AM, Bird A (2011).** CpG islands and the regulation of transcription. *Gene Dev*, 25: 1010-1022.
- De-Santis C, Jerry DR (2007).** Candidate growth genes in finfish - Where should we be looking?. *Aquaculture*, 272: 22-38.
- del Castillo S, Hikima JI, Ohtani M, Jung TS, Aoki T (2012).** Characterization and functional analysis of two PKR genes in fugu (*Takifugu rubripes*). *Fish Shellfish Immunol*, 32: 79-88.
- DeWitte-Orr SJ, Leong JA, Bols NC (2007).** Induction of antiviral genes Mx and vig-1 by dsRNA and Chum salmon reovirus in rainbow trout monocyte/macrophage and fibroblast cell lines. *Fish Shellfish Immunol*, 23: 670-682.
- Diaz-Rosales P, Romero A, Balseiro P, Dios S, Novoa B, Figueras A (2012).** Microarray-based identification of differentially expressed genes in families of turbot (*Scophthalmus maximus*) after infection with Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV). *Mar Biotechnol*, 14: 515-29.
- Duncan R, Mason CL, Nagy E, Leong JA, Dobos P (1991).** Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology*, 181: 541-552.
- Dunham RA (2009).** Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation. *Comp Immunol Microb*, 32: 139-161.
- Falco A, Miest JJ, Pionnier N, Pietretti D, Forlenza M, Wiegertjes GF, Hoole D (2014).** B-Glucan-Supplemented diets increase poly(I:C)-induced gene expression of Mx, possibly via Tlr3-mediated recognition mechanism in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol*, 36: 494-502.
- Fernandez-Trujillo MA, Porta J, Borrego JJ, Alonso MC, Alvarez MC, Bejar J (2006).** Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol*, 21: 577-582.

Bibliografía

- Fernandez-Trujillo MA (2008).** Clonación y valoración funcional del inmunogen Mx de lenguado (*Solea senegalensis*). Tesis doctoral, Universidad de Málaga.
- Fernandez-Trujillo MA, Ferro P, Garcia-Rosado E, Infante C, Alonso MC, Bejar J, Borrego JJ, Manchado M (2008a).** Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Fish Shellfish Immunol*, 24: 279-285.
- Fernandez-Trujillo MA, Garcia-Rosado E, Alonso MC, Borrego JJ, Alvarez MC, Bejar J (2008b).** *In vitro* inhibition of sole aquabirnavirus by Senegalese sole Mx. *Fish Shellfish Immunol*, 24: 187-193.
- Fernandez-Trujillo MA, Garcia-Rosado E, Alonso MC, Borrego JJ, Alvarez MC, Bejar J (2011).** 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.
- Fernandez-Trujillo MA, Garcia-Rosado E, Alonso MC, Castro D, Alvarez MC, Bejar J (2013).** Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) show *in vitro* antiviral activity against RNA and DNA viruses. *Mol Immunol*, 56: 630-636.
- Frese M, Kochs G, Meier-Dieter U, Siebler J, Haller O (1995).** Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus. *J Virol*, 69: 3904-3909.
- Furnes C, Kileng O, Rinaldo CH, Seppola M, Jensen I (2009).** Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) possesses three homologues of ISG15 with different expression kinetics and conjugation properties. *Dev Comp Immunol*, 33: 1239-1246.
- Furnes C, Robertsen B (2010).** Molecular cloning and characterization of bloodthirsty from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Shellfish Immunol*, 29: 903-909.
- Gallardo-Galvez JB, Mendez T, Bejar J, Alvarez MC (2011).** Endogenous transposases affect differently *Sleeping Beauty* and *Frog Prince* transposons in fish cells. *Mar Biotechnol*, 13: 695-705.

- Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E (2006).** Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol*, 70: 1032-1060.
- Garcia-Rosado E, Markussen T, Kileng O, Bækkevold ES, Robertsen B, Mjaaland S, Rimstad E (2008).** Molecular and functional characterization of two infectious salmon anaemia virus (ISAV) proteins with type I interferon antagonizing activity. *Virus Res*, 133: 228-238.
- Garcia-Rosado E, Alonso MC, Fernandez-Trujillo MA, Manchado M, Bejar J (2010).** Characterization of flatfish Mx proteins. En: *Veterinary Immunology and Immunopathology* (ed by L Nermann & S Meier) New York (USA), 99-128. Nova Science Publishers Inc.
- Gazzoli I, Kolodner RD (2003).** Regulation of the human MSH6 gene by the Sp1 transcription factor and alteration of promoter activity and expression by polymorphisms. *Mol Cell Biol*, 23: 7992-8007.
- Gerardin JA, Baise EA, Pire GA, Leroy MP, Desmecht DJ (2004).** Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene*, 326: 67-75.
- Goudet J (2001).** FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/Fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Gongora C, Degols G, Espert L, Hua TD, Mechti N (2000).** A unique ISRE, in the TATA-less human ISG20 promoter, confers IRF-1-mediated responsiveness to both interferon type I and type II. *Nucleic Acids Res*, 28: 2333-2341.
- Gonzalez-Mariscal JA (2014).** Caracterización de los promotores de las proteínas antivirales Mx1, Mx2 y Mx3 de dorada (*Sparus aurata*). Tesis doctoral, Universidad de Málaga.
- Gonzalez-Mariscal JA, Gallardo-Galvez JB, Mendez T, Alvarez MC, Bejar J (2014).** Cloning and characterization of the Mx1, Mx2 and Mx3 promoters from gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol*, 38: 311-317.

Bibliografía

- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000).** Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*, 81: 2341-2364.
- Gordien E, Rosmordue O, Peltekian C, Garreau F, Brechot C, Kremsdorf D (2001).** Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J Virol*, 75: 2684-2691.
- Haas AL, Ahrens P, Bright PM, Ankel H (1987).** Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J Biol Chem*, 262: 11315-11323.
- Haller O, Kochs G (2002).** Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, 3: 710-717.
- Haller O, Stertz S, Kochs G (2007).** The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect*, 9: 1613-1643.
- Hansen J, Pasquier L, Lefranc M, Lopez V (2009).** The B7 family of immunoregulatory receptors: a comparative and evolutionary perspective. *Mol Immunol*, 46: 457-472.
- Harendza S, Lovett DH, Panzer U, Lukacs Z, Kuhl P, Stahl RA (2003).** Linked common polymorphisms in the gelatinase a promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness. *J Biol Chem*, 278: 20490-20499.
- Heppell J, Berthiaume L, Tarrab E, Lecomte J, Arella M (1992).** Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J Gen Virol*, 73: 2863-2870.
- Hew CL, Fletcher GL (2001).** The role of aquatic biotechnology in aquaculture. *Aquaculture*, 197: 191-204.
- Horisberger MA, McMaster GK, Zeller H, Wathelet MG, Dellis J, Content J (1990).** Cloning and sequence analyses of cDNAs for interferon- and virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: Functional study of the corresponding gene promoter. *J Virol*, 64: 1171-1181.
- Horisberger MA, Gunst MC (1991).** Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology*, 180: 185-190.

- Hu CY, Zhang YB, Huang GP, Zhang QY, Gui JF (2004).** Molecular cloning and characterisation of a fish PKR-like gene from cultured CAB cells induced by UV inactivated virus. *Fish Shellfish Immunol*, 17: 353-366.
- Hu GB, Xia J, Lou H-M, Chen XL, Li J, Liu QM (2011).** An IRF-3 Homolog that is up-regulated by DNA virus and poly I:C in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol*, 31: 1224-1231.
- Hu YS, Li W, Li DM, Liu Y, Fan LH, Rao ZC, Lin G, Hu CY (2013).** Cloning, expression and functional analysis of PKR from grass carp (*Ctenopharyngodon Idellus*). *Fish Shellfish Immunol*, 35: 1874-1881.
- Huang X, Huang Y, Cai J, Wei S, Ouyang Z, Qin Q (2013).** Molecular cloning, expression and functional analysis of ISG15 in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*, 34: 1094-1102.
- 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.
- Infante C, Matsuoka MP, Asensio E, Cañavate JP, Reith M, Manchado M (2008).** Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *Mol Biol*, 9: 28.
- Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T, Miyazaki T (2001).** An outbreak of VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis Aquat Organ*, 47: 87-99.
- Jacobs BL, Langland JO (1996).** When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*, 219: 339-349.
- 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 Interf Cytok Res*, 20: 701-710.

Bibliografía

- Jensen I, Robertsen B (2002).** Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol*, 13: 221-241.
- Jensen I, Albuquerque A, Sommer AI, Robertsen B (2002a).** Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against Infection by Infectious Salmon Anaemia Virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol*, 13: 311-326.
- Jensen I, Larsen R, Robertsen B (2002b).** An antiviral state induced in Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) by transfection with the double-stranded RNA poly I:C. *Fish Shellfish Immunol*, 13: 367-78.
- Johansen A, Collet B, Sandaker E, Secombes CJ, Jørgensen JB (2004).** Quantification of Atlantic Salmon Type-I Interferon using an Mx1 Promoter Reporter Gene Assay. *Fish Shellfish Immunol*, 16: 173-184.
- Jørgensen JB, Johansen A, Hegseth MN, Zou J, Robertsen B, Collet B, Secombes CJ (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.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007).** Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*, 16: 1099-1106.
- Kibenge MJT, Munir K, Kibenge FSB (2005).** Constitutive expression of Atlantic salmon Mx1 protein in CHSE-214 cells confers resistance to Infectious Salmon Anaemia Virus. *Virology*, 2: 75.
- Kileng O, Brundtland MI, Robertsen B (2007).** Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish Shellfish Immunol*, 23: 378-89.
- Kim KI, Yan M, Malakhova O, Luo JK, Shen MF, Zou W, de la Torre JC, Zhang DE (2006).** Ube1L and protein ISGylation are not essential for alpha/beta interferon signaling. *Mol Cell Biol*, 26: 472-479.

- Kim MS, Kim KH (2012).** Effects of NV gene knock-out recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) on Mx gene expression in epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*, 32: 459-463.
- Kim MS, Kim KH (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.
- King JA, Snow M, Skall HF, Raynard RS (2001).** Experimental susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* and turbot *Scophthalmus maximus* to European freshwater and marine isolates of Viral Haemorrhagic Septicaemia virus. *Dis Aquat Organ*, 47: 25-31.
- Kinkelin P, Dorson M (1973).** Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. *J Gen Virol*, 19: 125-127.
- Knight E, Cordova B (1991).** IFN-induced 15-kDa protein is released from human lymphocytes and monocytes. *J Immunol*, 146: 2280-2284.
- 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 JE, Haller O (2005).** Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. *Methods Enzymol*, 404: 632-643.
- Kong HJ, Nam B-H, Kim Y-O, Kim W-J, Cho HK, Lee CH, Lee S-J, Kim K-K (2010).** Characterization of the flounder IL-6 promoter and its regulation by the p65 NF- κ B subunit. *Fish Shellfish Immunol*, 28: 961-964.
- Kontsek P, Karayianni-Vasconcelos G, Kontsekova E (2003).** The human interferons system: characterization and classification after discovery of novel members. *Acta Virol*, 47: 201-215.

Bibliografía

- Landis HA, Simon-Jodicke A, Kloti A, Di Paolo C, Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, Hefti HP, 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.
- Langdon JS Humphrey JD (1987).** Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch *Perca fluviatilis* L. in Australia. *J Fish Dis*, 10: 297-298.
- Langdon JS, Humphrey JD, Williams LM (1988).** Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *J Fish Dis*, 11: 93-96.
- Langevin C, Aleksejeva E, Passoni G, Palha N, Levraud JP (2013a).** The antiviral innate response in fish: Evolution and conservation of the IFN system. *J Mol Biol*, 425: 4904-4920.
- Langevin C, van der Aa LM, Houel A, Torhy C, Briolat V, Lunazzi A, Harmache A, Bremont M, Levraud JP, Boudinot P (2013b).** Zebrafish ISG15 exerts a strong antiviral activity against RNA and DNA viruses and regulates the interferon response. *J Mol Biol*, 245: 4904-4920.
- Larsen R, Rokenes TP, 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 CP, Toranzo AE, Barja J (1990).** Fish viral infections in the Northwest of Spain. *Microbiol*, 6: 21-29.
- Lee JY, Hiromo I, Aoki T (2000).** Cloning and analysis of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev Comp Immunol*, 24: 407-415.
- Lee SH, Vidal SM (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.

- Levy D, Larner A, Chaudhuri A, Babiss LE, Darnell JE Jr (1986).** Interferon stimulated transcription: isolation of an inducible gene and identification of its regulatory region. *Proc Natl Acad Sci*, 83: 8929-8933.
- 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.
- Limin P, Yang C, Su J (2012).** Protective roles of grass carp *Ctenopharyngodon idella* Mx isoforms against grass carp reovirus. PLoS ONE (Open access) 7: 52142.
- Lin C, Christopher JA, Lin C, Chang C (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 virus. *Virology*, 16: 203-204.
- Liu CS, Sun Y, Zhang M, Sun L (2010).** Identification and analysis of a *Sciaenops ocellatus* ISG15 homologue that is involved in host immune defense against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol*, 29: 167-174.
- Liu M, Reimschuessel R, Hassel BA (2002).** Molecular cloning of the fish interferon stimulated gene, 15 kDa (ISG15) orthologue: a ubiquitin-like gene induced by nephrotoxic damage. *Gene*, 298: 129-139.
- Liu W, Innocenti F, Wu MH, Desai AA, Dolan ME, Cook EH, Ratain MJ (2005).** A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res*, 65: 46-53.
- Liu YJ (2005).** IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*, 23: 275-306.
- Lockhart K, Gahlawat SK, Soto-Mosquera D, Bowden TJ, Ellis AE (2004).** IPNV carrier Atlantic salmon growers do not express Mx mRNA and poly I:C-induced Mx response dose not cure the carrier state. *Fish Shellfish Immunol*, 17: 347-352.

Bibliografía

- Lockhart K, McBeath AJ, Collet B, Snow M, Ellis AE (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.
- Loeb KR, Haas AL (1992).** The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem*, 267: 7806-7813.
- Lopez-Jimena B, Garcia-Rosado E, Infante C, Cano I, Manchado M, Castro D, Borrego JJ, Alonso MC (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.
- Lopez-Vazquez C, Dopazo CP, Oliveira JG, Barja JL, Bandin I (2006).** Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Virol Methods*, 133: 167-174.
- Lopez-Vazquez C, Dopazo CP, Barja JL, Bandin I (2007).** Experimental infection of turbot (*Psetta maxima*) with strains of viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from wild and farmed marine fishes. *J Fish Dis*, 29:1-10.
- Lopez-Vazquez C, Conde M, Dopazo CP, Barja JL, Bandin I (2011).** Susceptibility of juvenile sole *Solea senegalensis* to marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus from wild and farmed fish. *Dis Aquat Organ*, 93: 111-116.
- Magnadottir B (2006).** Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*, 20: 137-151.
- Maraver A, Oña A, Abaitua F, Gonzalez D, Clemente R, Ruiz-Diaz JA, Caston JR, Pazos F, Rodriguez JF (2003).** The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J Virol*, 77: 6438-6449.
- Martinez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S (1988).** A protein salting-out method applied in genomic DNA isolation from fish whole blood. *BioTechniques*, 24: 238-239.

- Masoero L, Ercolini C, Caggiano M, Rossa A (1986).** Osservazioni preliminary sulla linfocisti in una maricoltura intensiva italiana, *Riv Ital Piscic Ittiopac*, 21: 70-74.
- McBeath AJ, Collet B, Paley R, Duraffour S, Aspehaug V, Biering E, Secombes CJ, Snow M (2006).** Identification of an interferon antagonist protein encoded by segment 7 of infectious salmon anaemia virus. *Virus Res*, 115: 176-184.
- McKnight IJ, Roberts RJ (1976).** The pathology of infectious pancreatic necrosis: I. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br Vet J*, 132: 76-85.
- Melamed P, Gong Z, Fletcher G, Hew CL (2002).** The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204: 255-269.
- Mei H, Yan XC, Liang Y, Sun XW, Teng CB (2014).** Evolution of the Viral Hemorrhagic Septicemia Virus: divergence, selection and origin. *Mol Phylogenet Evol*, 77: 34-40.
- Melen K, Julkunen I (1994).** Mutational analysis of murine Mx1 protein: GTP binding core domain is essential for anti-influenza A activity. *Virology*, 205: 269-279.
- Meyer FP (1991).** Aquaculture disease and health management, *J Anim SCI*, 69: 4201-4208.
- Morrison DA (1977).** Transformation in *E. coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J Bacteriol*, 132: 349-351.
- Nakade K, Handa H, Nagata K (1997).** Promoter structure of the MxA gene that confers resistance to influenza virus. *FEBS Lett*, 418: 315-318.
- Netherton CL, Simpson J, Haller O, Wileman TE, Takamatsu H-H, Monaghan P, Taylor G (2009).** Inhibition of a large double-stranded DNA virus by MxA protein. *J Virol*, 83: 2310-2320.
- Nishizawa T, Mori K, Nakai T, Iwao F, Kiyokuni M (1994).** Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis Aquat Organ*, 18: 103-107.

Bibliografía

- Nishizawa T, Takami I, Kokawa Y, Yoshimizu M (2009).** Fish immunization using a synthetic double-stranded RNA Poly (I:C), an interferon inducer, offers protection against RGNNV, a fish nodavirus. *Dis Aquat Organ*, 83: 115-22.
- Novel P, Fernandez-Trujillo MA, Gallardo-Galvez JB, Cano I, Manchado M, Buonocore F, Randelli E, Scapigliati G, Alvarez MC, Bejar J (2013).** Two Mx genes identified in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) respond differently to VNNV infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 153: 240-248.
- Novoa B, Figueras AJ, Ledo A, Barja JL, Toranzo AE (1991).** Incidence of birnavirus in cultured turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in Northwest Spain. *FHS/AFS Newsletter*, 19: 2-3.
- Novoa B, Figueras AJ, Puentes CF, Ledo A, Toranzo AE (1993).** Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain. *Dis Aquat Organ*, 15: 163-169.
- Nygaard R, Husgard S, Sommer A-I, Leong J-A C, Robertsen B (2000).** Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish Shellfish Immunol*, 10: 435-450.
- 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.
- Oh MJ, Takami I, Nishizawa T, Kim WS, Kim CS, Kim SR, Park MA (2012).** Field tests of poly(I:C) immunization with Nervous Necrosis Virus (NNV) in seven band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *J Fish Dis*, 35: 187-191.
- Olmedo M, Peleteiro JB, Cal R, Linares F (2003).** Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1958) en Galicia. Actas IX congreso Nacional de Acuicultura, Junta de Andalucía, Cádiz, España, p 305.

- Olveira JG, Soares F, Engrola S, Dopazo CP, Bandin I (2008).** Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 20: 215-219.
- Olveira JG, Souto S, Dopazo CP, Bandin I (2013).** Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. *Aquaculture*, 406: 125-130.
- Ooi EL, Hirono I, Aoki T (2006).** Functional characterisation of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Mx promoter. *Fish Shellfish Immunol*, 21: 293-304.
- Osiak A, Utermöhlen O, Niendorf S, Horak I, Knobloch KP (2005).** ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. *Mol Cell Biol*, 25: 6338-6345.
- Peña A, Niels CB, H Marshall S (2010).** An evaluation of potential reference genes for stability of expression in two salmonid cell lines after infection with either *Piscirickettsia salmonis* or IPNV. *BMC Research Notes*, 3: 101.
- Person Le Ruyet J, Alexandre J, Le Roux A (1980).** Methode de production de juveniles de sole *Solea solea* L. sur un aliment compose sec et en mer chauffee et recyclee. En: Symposium sur les recents developpements de l'utilisation des eaux rechauffees et des eaux recycles en aquaculture intensive, Norvege, ref E 66.
- Pereiro P, Costa MM, Diaz-Rosales P, Dios S, Figueras A, Novoa B (2014).** The first characterization of two type I interferons in turbot (*Scophthalmus maximus*) reveals their differential role, expression pattern and gene induction. *Develop Comp Immunol*, 45: 233-244.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004).** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol*, 202: 8-32.
- Plant KP, Harbottle H, Thune RL (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.

Bibliografía

- Plant KP, Thune RL (2008).** Genomic organisation of the channel catfish Mx1 gene and characterisation of multiple channel catfish Mx gene promoters. *Fish Shellfish Immunol*, 24: 575-583.
- Pozet F, Morand M, Mussa A, Torhy C, de Kinkelin P (1992).** Isolation and preliminary characterization of apathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis Aquat Organ*, 14: 35-42.
- Purcell MK, Kurath G, Garver KA, Herwig RP, Winton JR (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.
- Queller DC, Strassman JE, Hughes CR (1993).** Microsatellites and Kinship. *Trends Ecol Evol*, 8: 285-288.
- Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A (2008).** Type I interferon-dependent and independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *J Immunol*, 38: 619-630.
- Recht M, Borden EC, Knight E (1991).** A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma. *J Immunol*, 147: 2617-2623.
- Reddacliff LA, Whittington RJ (1996).** Pathology of Epizootic Haematopoeitic Necrosis Virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redbfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J Comp Pathol*, 115: 103-115.
- Reed LJ, Muench H (1938).** A simple method of estimating 50 per cent end-points. *Am J Hyg*, 27: 493-497.
- Reich N, Evans B, Levy D, Fahey D, Knight E, Darnell J (1987).** Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15 kDa protein depends on an upstream enhancer element. *Proc Natl Acad Sci*, 84: 6394-6398.
- Reid LE, Brasnett AH, Gilbert CS, Porter ACG, Gewert DR, Stark GR, Kerr IM (1989).** A single DNA response element can confer inducibility by both α - and γ -interferons. *Proc Natl Acad Sci*, 86: 840-844.
- Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S (2001).** The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J*, 20: 2140-2151.

- Robertsen B (2006).** The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*, 20: 172-191.
- Robertsen B (2008).** Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 351-357.
- Rodriguez JL, Souto BF (2003).** Engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup 1958) en Galicia con temperatura controlada. Actas IX congreso Nacional de Acuicultura, Junta de Andalucía, Cádiz, España, p 407-409.
- Rodriguez Saint-Jean S, Vilas P, Gutierrez MC, Perez-Prieto SI (1997).** Isolation and preliminary characterization of a birnavirus from the sole *Solea senegalensis* in Southwest Spain. *J Aquat Anim Health*, 9: 295-300.
- Rodriguez Saint-Jean S, Borrego JJ, Perez-Prieto SI (2003).** Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Adv Virus Res*, 62: 113-165.
- Rodriguez Saint-Jean S, Perez-Prieto SI (2006).** Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines. *Vet Immunol Immunopathol*, 110: 1-10.
- Rokenes TP, Larsen R, Robertsen B (2007).** Atlantic salmon ISG15: expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections. *Mol Immunol*, 44: 950-959.
- Ross K, McCarthy U, Huntly PJ, Wood BP, Stuart D, Rough EI, Smail DA, Bruno DW (1995).** An outbreak of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 14: 213-214.
- Rothenburg S, Deigendesch N, Dittmar K, Koch-Nolte F, Haag F, Lowenhaupt K, Rich A (2005).** A PKR-like eukaryotic initiation factor 2 kinase from zebrafish contains Z-DNA binding domains instead of dsRNA binding domains. 2005 by The National Academy of Sciences of the USA 1602-1607 PNAS vol. 102 no. 5

Bibliografía

- Rothenburg S, Deigendesch N, Dey M, Dever TE, Tazi L (2008).** Double-stranded RNA-activated protein kinase PKR of fishes and amphibians: varying the number of double-stranded RNA binding domains and lineage-specific duplications. *BMC Biol*, 6: 12.
- Rothenburg S, Chinchar V, Dever T (2011).** Characterization of a ranavirus inhibitor of the antiviral protein kinase PKR. *BMC Microbiol*, 18: 11-56.
- Russell FS (1976).** The eggs and planktonic stages of British marine fishes. Academic press, New York (USA).
- Samuel CE (2001).** Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*, 14: 778-809.
- Saint-Jean SR, Perez-Prieto SI (2007).** Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines. *Vet Immunol Immunopathol*, 110: 1-10.
- 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.
- Schutze H, Mundt E, Mettenleiter TC (1999).** Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes*, 19: 59-65.
- Seppola M, Stenvik J, Steiro K, Solstad T, Robertsen B, Jensen I (2007).** Sequence and expression analysis of an interferon stimulated gene (*ISG15*) from Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) *Dev Comp Immunol*, 31: 156-171.
- Skall HF, Olesen NJ, 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 MN, Robertsen B, Jorgensen JB (2009).** The interplay between infectious pancreatic virus (IPNV) and the IFN system: IFN signalling is inhibited by IPNV infection. *Virus Res*, 143: 53-60.
- Skjesol A, Skjæveland I, Elnæs M, Timmerhaus G, Fredriksen BN, Jørgensen SM, Krasnov A, Jørgensen JB (2011).** IPNV with high and low virulence: Host immune responses and viral mutations during infection. *Virology J*, 8: 396.

- Song H, Santi N, Evensen O, Vakharia VN (2005).** Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *J Virol*, 16: 10289-10299.
- Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW (2003).** Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res*, 63: 812-816.
- Su J, Huang T, Dong J, Heng J, Zhang R, Peng L (2010).** Molecular cloning and immune responsive expression of *MDA5* gene, a pivotal member of the *RLR* gene family from grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Shellfish Immunol*, 28: 712-718.
- Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ (2000).** Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* 39: 12929-12938.
- Sun B, Robertsen B, Wang Z, Liu B (2009).** Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Dev Comp Immunol*, 33: 547-558.
- Sunarto A, Liongue C, McColl KA, Adams MM, Bulach D, Crane MSJ (2012).** Koi herpesvirus encodes and expresses a functional interleukin-10. *J Virol*, 86: 11512-11520.
- Suzuki S, Nakata T, Kamakura M, Yoshimoto M, Furukawa Y, Yamashita Y, Kusuda R (1997).** Isolation of birnavirus from Agemaki (jack knife clam) *Sinonovacula constricta* and survey of the virus using PCR technique. *Fish Sci*, 63: 563-566.
- Takami I, Kwon SR, Nishizawa T, Yoshimizu M (2010).** Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) by Poly(I:C) immunization. *Dis Aquat Organ*, 89: 109-115.
- Takeuchi O, Akira S (2007).** Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Res*, 220: 214-224.

Bibliografía

- Tafalla C, Chico V, Perez L, Coll JM, 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.
- Thomas AV, Palm M, Broers AD, Zezafoun H, Desmecht DJ (2006).** Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenet*, 58: 383-389.
- Thoulouze MI, Bouguyon E, Carpentier C, Bremont M (2004).** Essential role of the NV protein of novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *J Virol*, 78: 4098-4107.
- Tordo N, Benmansour A, Calisher C, Dietzgen RG, Fang RX, Jackson AO, Kuraath G, Nadin-Davis S, Tesh RB, Walker PJ, (2005).** Family *Rhabdoviridae*. In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Fauquet CM, mayop MA, maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds). Elsevier academic Press, San Diego (USA).
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000).** Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res*, 10: 967-981.
- Tran Thi Duc T, Desmecht D, Cornet A (2012).** Functional characterization of new allelic polymorphisms identified in the promoter region of the human MxA gene. *Int J Immunogenet*, 49: 316-319.
- Trobridge GD, Chiou PP, Leong JAC (1997).** Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J Virol*, 71: 5304-5311.
- Valverde EJ, Alonso MC, Garcia-Rosado E, Borrego JJ, Castro D (2011).** IFN-mediated antiviral activity againsts Lymphocystis disease virus (LCDV) in SAF-1 cells. 15th EAFP International conference on diseases of fish and shellfish, p 228.
- Verrier ER, Langevin C, Benmansour A, Boudinot P (2011).** Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Dev Comp Immunol*, 35: 1204-1214.

- Walker PJ, Benmansour A, Dietzgen R, Fang RX, Jackson AO, Kurath G, Leong JC, Nadin-Davies S, Tesh RB, Tordo N (2000).** Family *Rhabdoviridae*. En: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. (ed. by Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR & Wickner RB), 563-583. Academic Press, San Diego, CA (USA).
- Weir BS, Cockerham A (1984).** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evol*, 38: 1358-1370.
- Weizhang J, Qionglin G (2008).** Gene structures and promoter characteristics of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2 and IRF-7 from snakehead *Channa argus*. *Mol immunol*, 45: 2419-2428.
- Wolf K (1988).** Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, Nueva York (USA). 476.
- Wu MS, Chen CW, Liu YC, Huang HH, Lin CH, Tzeng CS, Chang CY (2012).** Transcriptional analysis of orange-spotted grouper reacting to experimental grouper iridovirus infection *Dev Comp Immunol*, 37: 233-242
- Wu YC, Chi SC (2007).** Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene. *Fish Shellfish Immunol*, 23: 97-108.
- Wu YC, Lu YF, Chi SC (2010).** Antiviral mechanism of barramundi Mx against betanodavirus involves the inhibition of viral RNA synthesis through the interference of viral RdRp. *Fish Shellfish Immunol*, 28: 467-475.
- Yap WH, Tay A, Brenner S, Venkatesh B (2003).** Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) Mx gene and functional characterization of its promoter. *Immunogenet*, 54:705-713.
- Yasuike M, Kondo H, Hirono I, Aoki T (2010).** Identification and characterization of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* interferon-stimulated gene 15 (Jf-ISG15). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 34: 83-91.
- Zenke K, Kim KH (2009).** Molecular cloning and expression analysis of three Mx isoforms of rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Fish Shellfish Immunol*, 26: 599-605.

Bibliografía

- Zenke K, Nam YK, Kim KH (2010).** Molecular cloning and expression analysis of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Vet Immunol Immunopathol*, 133: 290-295.
- Zhang D, Hetherington CJ, Tan S, Dziennis SE, Gonzalez DA, Chen H, et al (1994).** Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14. *J Biol Chem*, 269: 11425-11434.
- Zhang YB, Jiang J, Chen YD, Zhu R, Shi Y, Zhang QY, Gui JF (2007a).** The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus* blastulae (CAB) cells. *Dev Comp Immunol*, 31: 232-243.
- Zhang YB, Wang YL, Gui JF (2007b).** Identification and characterization of two homologues of interferon-stimulated gene ISG15 in crucian carp. *Fish Shellfish Immunol*, 23, 52-61.
- Zhu R, Zhang YB, Zhang QY, Gui JF (2008).** Functional domains and the antiviral effect of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR from *Paralichthys olivaceus*. *J Virol*, 82: 6889-6901.
- Zou J, Carrington A, Collet B, Dijkstra JM, Yoshiura Y, Bols N, Secombes CJ (2005).** Identification and bioactivities of IFN-g in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *J Immunol*, 175: 2484-2494.
- Zou J, Secombes CJ (2011).** Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev Comp Immunol*, 35: 1376-1387.

