



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA – XXI CICLO

EVOLUZIONE DELLE RISPOSTE ANTIVIRALI INNATE:
IL SISTEMA INTERFERONE (IFN) E L'MX IN SPIGOLA
(Dicentrarchus labrax L.)
(TELEOSTEA, PERCICHTHYDAE)

SSD: BIO05

COORDINATORE: Prof. Federico FEDERICI

TUTOR: Dott. Francesco BUONOCORE

DOTTORANDA: Daniela CASANI



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
*EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA – XXI CICLO***

**EVOLUTION OF INNATE ANTIVIRAL RESPONSES:
INTERFERON (IFN) AND MX IN SEA BASS
(*Dicentrarchus labrax L.*)
(TELEOSTEA, PERCICHTHYDAE)**

SSD: BIO05

COORDINATOR: Prof. Federico FEDERICI

TUTOR: Dott. Francesco BUONOCORE

PhD STUDENT: Daniela CASANI

*Agli uomini della mia vita:
mio padre, mio marito, mio figlio.*

Indice

Scopo della tesi	pag. 1
Riassunto	pag. 3
Abstract	pag. 10
Capitolo I - Introduzione	pag. 16
1.1 Evoluzione del sistema immunitario nei Vertebrati	pag. 17
1.2 Il sistema Interferone dei Vertebrati	pag. 27
1.2.1 Introduzione	pag. 27
1.2.2 Nomenclatura degli IFNs	pag. 28
1.2.3 Azione degli IFNs	pag. 29
1.3 Le proteine antivirali nei Vertebrati	pag. 33
1.4 Il sistema immunitario dei Teleostei	pag. 36
1.5 Struttura e funzione dei tessuti linfoidei nei Teleostei	pag. 48
1.5.1 Prima linea di difesa	pag. 48
1.5.2 Organi linfoidei	pag. 49
1.5.3 Il timo	pag. 50
1.5.4 Organi linfoidei secondari	pag. 51
1.6 IFNs nei Teleostei	pag. 52
1.6.1 IRFs nei Teleostei	pag. 56
1.6.2 STATs nei Teleostei	pag. 56
1.7 La proteina Mx nei Teleostei	pag. 57
Capitolo II - Materiali e Metodi	pag. 60
2.1 Il clonaggio	pag. 61
2.1.1 Vettori utilizzati	pag. 61
2.1.2 Microrganismo utilizzato	pag. 61

2.1.3 Terreni di coltura	pag. 62
2.1.4 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio	pag. 62
2.1.5 Purificazione di leucociti di spigola	pag. 63
2.1.6 Estrazione dell'RNA totale	pag. 64
2.1.7 Sintesi del cDNA	pag. 64
2.1.8 Purificazione del DNA da gel d'agarosio	pag. 65
2.1.9 Ligazione di frammenti di DNA	pag. 65
2.1.10 Trasformazione delle cellule competenti	pag. 66
2.1.11 Colture batteriche	pag. 66
2.1.12 Estrazione del DNA plasmidico.	pag. 66
2.1.13 Analisi di sequenza	pag. 67
2.2 Clonaggio del cDNA dell'interferone di spigola	pag. 67
2.2.1 RT-PCR per il primo frammento del gene IFN	pag. 67
2.2.2 Estensione dell'estremità 3'	pag. 68
2.2.3 Estensione dell'estremità 5'	pag. 69
2.3 Clonaggio del gene dell'interferone di spigola	pag. 70
2.3.1 Purificazione del DNA genomico	pag. 70
2.3.2 Primers utilizzati	pag. 71
2.4 Clonaggio della proteina Mx di spigola	pag. 72
2.4.1 Estensione dell'estremità 3'	pag. 73
2.4.2 Estensione dell'estremità 5'	pag. 74
2.5 Analisi d'espressione mediante Q-PCR	pag. 74
2.5.1 Stimolazione in vitro delle cellule di spigola con poly I:C	pag. 79
2.5.2 Stimolazione in vitro con poly I:C delle cellule DLEC di spigola ..	pag. 81
2.6 Modelling della struttura 3D del gene IFN di spigola	pag. 81

Capitolo III - Risultati.	pag. 83
3.1 Analisi della sequenza di cDNA dell'interferone (IFN)	
di spigola (<i>Dicentrarchus labrax</i> L)	pag. 84
3.2 Analisi strutturale del gene IFN	
di spigola (<i>Dicentrarchus labrax</i> L).	pag. 90
3.3 Analisi della sequenza della proteina Mx	
di spigola (<i>Dicentrarchus labrax</i> L)	pag. 93
3.4 Analisi di espressione di IFN e Mx	
in seguito a stimolazione <i>in vitro</i>	pag.102
3.5 Modelling della struttura 3D dell'IFN	
di spigola (<i>Dicentrarchus labrax</i> L)	pag.105
Capitolo IV - Discussione.	pag.107
Capitolo V - Bibliografia.	pag.115
Curriculum vitae	pag.152
Ringraziamenti.	pag.169

Scopo della tesi

Questa ricerca è stata effettuata al fine di studiare l'evoluzione delle risposte antivirali nei Vertebrati, investigando queste risposte immunitarie in un particolare teleosteo: la spigola. Negli ultimi anni attraverso la sequenza di interi genomi di Pesci ed Anfibi si sono ottenute informazioni riguardanti molecole omologhe all'IFN in specie differenti rispetto ai Mammiferi.

I pesci Teleostei costituiscono il più grande gruppo di Vertebrati con più di 20000 specie conosciute e rappresentano un gruppo molto importante sia dal punto di vista biotecnologico, a causa del loro ampio impiego in acquacoltura, che dal punto di vista biologico-comparativo, poiché sono il più antico gruppo animale avente un sistema immunitario che mostra chiare analogie con i sistemi di difesa innati ed adattativi dei Vertebrati Superiori.

Tra i Teleostei, la spigola o branzino (*Dicentrarchus labrax* - Linneo, 1758), è una delle specie più studiate ed è di grande importanza dal punto di vista economico nel Mediterraneo meridionale: per tale motivo è stato scelto come modello animale.

Il mio lavoro di tesi ha portato al clonaggio del cDNA dell'IFN e dell'Mx e alla determinazione della struttura del gene IFN. Inoltre è stata investigata l'espressione di IFN e Mx in seguito a stimolazione *in vitro* con poly I:C ed è stato realizzato un modello tridimensionale dell'IFN di spigola (*Dicentrarchus labrax* L.).

La disponibilità del gene IFN e dell'Mx darà la possibilità di studiare l'attività biologica di queste molecole e di determinare l'effetto di vaccinazioni e immunostimolazioni nella spigola.

Riassunto

Gli interferoni (IFNs) sono delle citochine in grado di indurre uno stato antivirale nelle cellule e, per questo motivo, giocano un ruolo fondamentale nella difesa contro le infezioni virali nei Vertebrati (Samuel C. E., 2001).

Nei Mammiferi sono state identificate tre famiglie di IFNs (tipo I, tipo II e tipo III) che mostrano differenze nelle strutture genica e proteica, nell'uso dei recettori e nell'attività biologica (Kontsek P. et al., 2003; Kotenko S.V. et al., 2003; Pestka S.J.A. et al., 2004).

Gli IFNs di tipo I comprendono differenti sottogruppi omologhi (α , β , ω , ϵ , κ nell'uomo) includendo IFN- α ed IFN- β che sono tra i più studiati; essi sono principalmente prodotti da cellule specializzate del sangue, le cellule dendritiche plasmatiche, in risposta ad una infezione virale (Colonna M. et al., 2002). Negli Uccelli e nei Mammiferi i geni IFNs di tipo I non contengono introni, sono localizzati sullo stesso cromosoma (Coulombel C. et al., 1991; Sheppard P. et al., 2003) e possiedono un recettore eterodimerico comune costituito dalle subunità IFNAR-1 e IFNAR-2 che attiva una via di segnalazione intracellulare JAK/STAT. Essi sono variabili in dimensioni e in numero di ponti disolfuro ma hanno una comune struttura 3D, che, come si è determinato mediante analisi cristallografica, è costituita di 5 α -eliche (Senda T. et al., 1992; Radhakrishnan R. et al., 1996; Karpusas M. et al., 1997).

Gli IFNs di tipo II (IFN- γ) sono citochine immunomodulatorie principalmente sintetizzate e secrete dalle cellule Th1 e dalle cellule NK e regolano sia le risposte immunitarie innate sia le risposte immunitarie cellulo-mediate (Boehm U. et al., 1997). Questo tipo di IFN non è primariamente indotto da virus, esso è codificato da geni che possiedono tre introni e lega un complesso recettoriale contenente due differenti catene (IFNGR1 e IFNGR2) che attiva una via di segnalazione intracellulare JAK/STAT per iniziare l'espressione di una varietà di geni nel nucleo (Schroder K. et al., 2004).

Gli IFNs di tipo III (IFN- λ) regolano sets di geni e mostrano attività biologiche simili a quelle degli IFNs di tipo I, ma sono codificati da geni con 4 introni e sono localizzati su una regione differente del genoma (Kotenko S.V. et al., 2003).

Geni codificanti per proteine omologhe agli IFNs dei Mammiferi sono stati recentemente clonati nel pesce zebra (*Danio rerio*), nel salmone (*Salmo salar*), nel pesce palla (*Takifugu rubripes*), nel pesce palla verde (*Tetraodon nigroviridis*), nel pesce gatto (*Ictalurus punctatus*), nella trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Zou J. et al., 2007; Altmann S.M. et al., 2003; Luftalla G. et al., 2003; Robertsen B. et al., 2003; Long S. et al., 2004), e sono stati classificati come IFNs di tipo I anche se sono costituiti da 5 esoni e 4 introni

(Robertsen B., 2006). In seguito sono stati clonati un IFN di tipo II e un secondo gruppo di IFNs di tipo I in trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Zou J. et al., 2005; Zou J. et al., 2007) ed un recettore per l'IFN è stato identificato nel pesce zebra (*Danio rerio*) (Levraud J.P. et al., 2007).

IFNs ricombinanti prodotti nel salmone e nel pesce gatto mostrano attività antivirale contro tipici virus dei pesci (Robertsen B. et al., 2003; Long S. et al., 2004; Zou et al., 2005; Martin et al., 2007).

Gli IFNs di tipo I producono uno stato antivirale nelle cellule circolanti mediato dalla produzione di proteine indotte dall'IFN stesso che agiscono come mediatori intracellulari, tra queste proteine ci sono la protein chinasi P1, la 2'5'-oligoadenilato sintetasi e l'Mx.

Nei 3 anni di dottorato il mio lavoro si è basato sull'identificazione di omologhi di IFN e Mx in spigola (*Dicentrarchus labrax* L.), un pesce di grande importanza dal punto di vista economico nel Mediterraneo meridionale. Inoltre, ho analizzato la struttura genica dell'IFN e l'espressione di IFN e Mx mediante real time PCR. Infine, è stata realizzato un modello tridimensionale dell'IFN di spigola in collaborazione con il gruppo del Dr. Angelo Facchiano.

Per ottenere alti livelli di mRNA IFN di spigola leucociti di rene cefalico sono stati stimolati *in vitro* con il poly I:C, un induttore dell'IFN nei Mammiferi (Dong et al., 2008). L'intero cDNA dell'IFN di spigola (EMBL accession number AM765846) è costituito da 1047 bp tradotto in una putativa proteina di 185 amminoacidi. Un'analisi della sequenza mostra la presenza di un putativo peptide segnale costituito da 22 amminoacidi, 3 potenziali siti di N-glicosilazione ma nessun sito di O-glicosilazione. L'identità nucleotidica ed amminoacidica maggiore si ha con lo spinarello (*Gasterosteus aculeatus*), seguito da medaka (*Oryzias latipes*) e Fugu (*Takifugu rubripes*), mentre l'identità minore si ha con l'anatra (*Anas platyrhynchos*), seguita da silurana tropicale (*Xenopus tropicalis*) e dal tacchino (*Meleagris gallopavo*). Le percentuali d'identità nucleotidica ed amminoacidica sono abbastanza simili per 2 (1 e 2) delle 3 sequenze identificate in trota, *Oncorhynchus mykiss* (Zou J. et al., 2007). Infine, esse sono più basse con l'IFN- λ umano (IFN di tipo III) rispetto a quelle ottenute con l'IFN- α umano (IFN di tipo I).

Un allineamento multiplo della sequenza amminoacidica IFN di spigola con altre sequenze IFN note è stato fatto per analizzare la conservazione dei residui amminoacidici caratteristici coinvolti nei domini strutturali. Nella sequenza IFN di spigola sono presenti 2 cisteine (Cys²³ and Cys¹²⁶) che risultano conservate in tutte le sequenze di Teleostei (soltanto nel pesce zebra la prima cisteina non si allinea perfettamente con le altre); mentre

sono presenti e conservate 2 ulteriori residui di cisteina nell' IFN- α umano, in una sequenza IFN di trota (IFN3), in una di pesce zebra (IFN2), in due di silurana tropicale (IFN1 e IFN2), e nelle sequenze di uccelli (anatra e tacchino) prese in esame. Questi residui sono importanti poiché mediante analisi strutturale è stato possibile dimostrare che nell'IFN- α umano le 4 cisteine formano 2 ponti disolfuro (Klaus W. et al., 1997), invece nell' IFN- β umano un singolo ponte è formato dalle 2 cisteine presenti (Karpusas M. et al., 1997). Alcuni residui sono conservati in quasi tutte le sequenze di pesci, in particolare: Leu19, Leu20, Phe42, Pro43, Leu46, Tyr47, Glu56, Asp57, Leu72, Trp82, Phe90, Leu101, Phe120, Leu123, Ser134, Ala135, Trp138, Glu139, Arg142, Leu149. La Phe42 è stato dimostrato essere importante per l'attività biologica dell' IFN- α umano (Waine G.J. et al., 1992), invece altri residui conservati sono stati identificati come possibili siti di legame per le subunità recettoriali IFNAR-1 e IFNAR-2 da un database dei domini conservati (Marchler-Bauer A. et al., 2007) e pertanto potrebbero essere putativamente coinvolti nelle interazioni con il corrispondente recettore per l'IFN nei pesci. L'analisi filogenetica effettuata impiegando le sequenze amminoacidiche mostra che l'IFN di spigola è raggruppato con altre sequenze conosciute di Teleostei. Sono presenti 3 raggruppamenti principali: il primo per i Salmoniformi, il secondo per i Cipriniformi ed il terzo per i Tetraodontiformi in cui è inclusa la spigola, un Perciforme. La 3° sequenza di trota e la 2° sequenza di pesce zebra sembrano differire da tutte le altre sequenze dei pesci in quanto compaiono in un cluster differente insieme con le sequenze dell'IFN- α di Uccelli ed Anfibi. L' IFN- λ umano potrebbe essere considerato come un outgroup di questo albero filogenetico.

L'intera sequenza nucleotidica del gene IFN di spigola è costituita da 1475 bp (EMBL accession number AM946399) con 5 esoni e 4 introni. Tutti gli introni iniziano con la tipica sequenza nucleotidica "GT" e terminano con l'usuale sequenza "AG", con solo il primo introne non in fase tra l'esone 1 e l'esone 2.

Il gene IFN di spigola contiene 4 introni in accordo con gli IFNs di altri Teleostei eccetto il medaka che invece contiene 3 introni. Il gene IFN del medaka si è ipotizzato che possa aver perso il terzo introne e che gli esoni 3 e 4 si siano fusi in un unico esone. Le dimensioni degli introni sono alquanto variabili tra le diverse specie. I geni IFN del pesce zebra e della trota sono più grandi degli altri e presentano un introne di più di 2000 bp (l'ultimo nel pesce zebra ed il terzo nella trota). Le dimensioni degli esoni sono molto più conservate rispetto agli introni, in particolar modo il terzo ed il quarto esone mostrano dimensioni comparabili in tutti i geni IFN, eccetto per il medaka.

In spigola sono state ottenute 4 sequenze di cDNA codificanti per la proteina Mx (EMBL accession numbers: AM228974, AM228975, AM228976, AM228977). Tali sequenze vengono tradotte in una putativa proteina di 652 amminoacidi. Queste sequenze mostrano la più alta percentuale d'identità nucleotidica ed amminoacidica con l'orata. Un allineamento multiplo delle sequenze amminoacidiche Mx di spigola con altre sequenze Mx è stato costruito e mostra la conservazione di residui amminoacidici importanti per l'attività biologica di questa molecola.

Per analizzare se l'espressione dell'IFN di spigola potesse esser indotta dal poly I:C è stata eseguita una stimolazione di leucociti di rene cefalico e della linea cellulare DLEC. Inoltre, negli stessi campioni, è stata analizzata l'espressione di Mx, una delle proteine la cui trascrizione è indotta, nei Mammiferi, dal legame dell'IFN al suo recettore attraverso la via di segnalazione JAK-STAT (Samuel C.E. et al., 2001). I prodotti della real time PCR sono stati caricati su gel d'agarosio per confermare la presenza di una sola banda delle dimensioni attese. I risultati sono mostrati nelle Figure I e II.

I controlli per l'incubazione a 6 e 24 ore aggiungendo soltanto PBS sono stati analizzati ma non sono riportati nel grafico in quanto non mostrano differenze significative rispetto ai controlli al tempo 0 (0 ore).

Per i leucociti di rene cefalico un notevole incremento dell'espressione di IFN si osserva dopo 6 ore dalla stimolazione e l'espressione di Mx aumenta dopo 24 ore dalla stimolazione. Per le cellule DLEC un significativo incremento dell'espressione di IFN si osserva dopo 6 ore dalla stimolazione, mentre per l'Mx un significativo incremento dell'espressione si osserva dopo 24 ore dalla stimolazione.

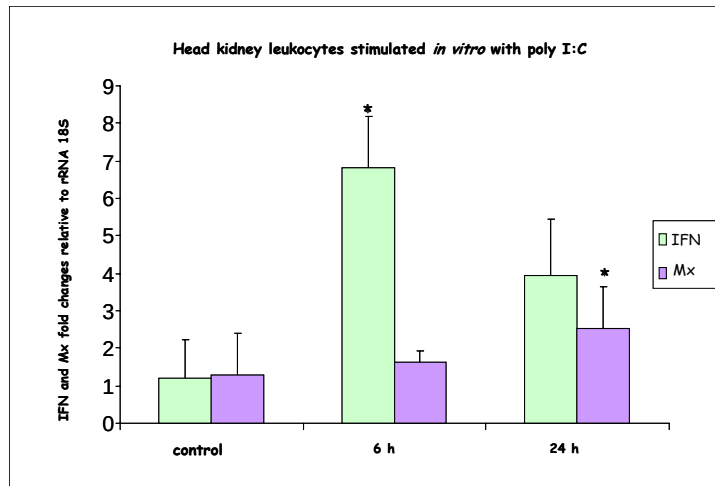


Figura 1. Analisi d'espressione *in vitro* di IFN e Mx. I livelli di IFN e Mx sono espressi come un rapporto riferito ai livelli di rRNA 18S nello stesso campione dopo analisi mediante PCR quantitativa delle cellule di rene cefalico di spigola stimulate con PBS (controllo) e con 20 μ g/ml di poly I:C per 6 e 24 ore (il calibratore è il controllo a 0 ore non stimolato). I dati sono espressi come la media $\pm$ S.E.M. e gli asterischi indicano quando $p < 0.05$ riguardo al controllo al tempo 0.

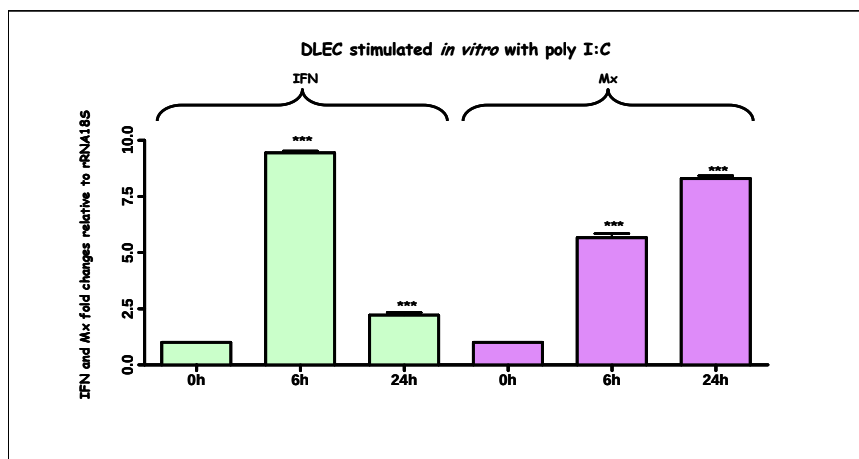


Figura 2. Analisi d'espressione *in vitro* di IFN e Mx. I livelli di IFN e Mx sono espressi come un rapporto riferito ai livelli di rRNA 18S nello stesso campione dopo analisi mediante PCR quantitativa delle cellule DLEC (*Dicentrarchus labrax embryonic cell*) di spigola stimulate con PBS (controllo) e con 20 μ g/ml di poly I:C per 6 ore e 24 ore (il calibratore è il controllo a 0 ore non stimolato). I dati sono espressi come la media $\pm$ S.E.M. e gli asterischi indicano quando $p < 0.001$ riguardo al controllo al tempo 0.

Il modello tridimensionale dell'IFN mostra un dominio "all-alpha" caratterizzato da un'architettura denominata "up-down bundle" costituita da 6 alpha-eliche (ABB'CDE) [Figura III]. I due residui di cisteina presenti nella sequenza IFN di spigola (Cys²³ and Cys¹²⁶) sono nella giusta posizione e distanza per la possibile formazione di un ponte disolfuro che stabilizzerebbe la struttura.

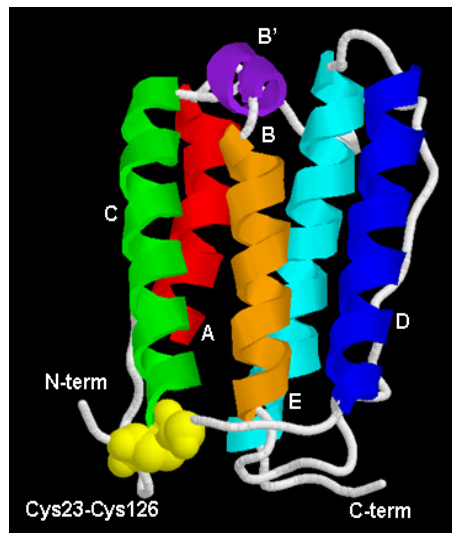


Figura 3. Modello 3D dell'IFN di spigola. Le 6 eliche sono mostrate con colori differenti ed indicate con delle lettere. Il ponte disolfuro è evidenziato in giallo.

In conclusione, la disponibilità delle sequenze geniche di IFN e Mx in spigola permetterà di studiare nel dettaglio anche in questo importante teleosteo le risposte immunitarie antivirali ed evidenziare gli effetti delle vaccinazioni ed immunostimolazioni in questa parte del sistema immunitario.

Abstract

Interferons (IFNs) are secreted cytokines that have a major role in immune defence against virus infections (Samuel C.E., 2001). Three families of IFNs have been identified in mammals (type I, type II and type III) showing differences in gene and protein structure, receptor usage and biological activity (Kontsek P. et al., 2003; Kottenko S.V. et al., 2003; Pestka S.J.A. et al., 2004). Type I IFNs comprise different homologous subgroups (α , β , ω , ϵ , κ in humans) that are mainly produced by specialized blood cells named plasmacytoid dendritic cells in response to viral infection (Colonna M. et al., 2002). Some effects of type I IFNs relate to the modulation of the immune system (Fellous M. et al., 1982; Stark G.R. et al., 1998; Biron C.A. et al., 1999; Samuel C.E., 2001; Buelens C. et al., 2002). In birds and mammals type I IFNs genes do not contain introns, are closely clustered in the same chromosome (Coulombel C. et al., 1991; Sheppard P. et al., 2003) and share a common heterodimeric receptor (IFNAR-1 and IFNAR-2 subunits). They share a common 3D structure, as determined by crystallographic analyses, composed of 5 α -helices (Senda T. et al., 1992; Radhakrishnan R. et al., 1996; Karpusas M. et al., 1997).. Type II IFNs (IFN- γ) are immunomodulatory cytokines mainly synthesized and secreted by Th1 cells and NK cells, and regulate both innate and cell-mediated immune responses (Boehm U. et al., 1997). These IFNs are encoded by genes with three introns and bind to a receptor complex containing two different chains (IFN- γ receptor R1 and R2) which activates the intracellular JAK-STAT signal pathway (Schroder K. et al., 2004). Type III IFNs (IFN- λ) regulate similar sets of genes and exhibit similar biological activity compared to type I IFNs but are encoded by genes with four introns and are located on a different region of the genome (Kottenko S.V. et al., 2003). Recently, interferon genes have been identified from different fish species like the zebrafish (*Danio rerio*) (Altmann S.M. et al., 2003), the spotted green pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) (Lutfalla G. et al., 2003), the Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Robertsen B. et al., 2003) and the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Long S. et al., 2004). They have been classified as type I IFN even though they contain 5 exons and 4 introns (Robertsen B., 2006). More recently, a type II IFN and a second group of type I IFNs have been found in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Zou J. et al., 2005; Zou J. et al., 2007) and an IFN receptor has been identified in zebrafish (Levraud J.P. et al., 2007). Recombinant IFNs produced in salmon and catfish show antiviral activity against typical fish viruses (Robertsen B. et al., 2003; Long S. et al., 2004), whether recombinant rainbow trout IFN- γ enhanced respiratory burst activity in macrophages (Zou J. et al., 2005) and up-regulated molecules involved in antigen-processing and presentation (Martin S.A.M. et al., 2007).

Type I interferons produces an antiviral state in the surrounding cells, mediated by the production of interferon-induced proteins that act as intracellular mediators, which include protein kinase P1, the 2'5'-oligoadenylate synthetase, and the Mx proteins. In higher vertebrates, Mx proteins have been shown to inhibit the replication of several viruses with different behaviours (Nakayama M. et al., 1991; Schneider-Schaulies S.J. et al., 1994; Thimme R. et al., 1995; Zurcher T. et al., 1992).

During my Ph.D the work has been focused on the identification of IFN and Mx homologues from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), a fish of high economic impact for South Mediterranean countries. Moreover, I analysed the IFN gene structure and the expression of both IFN and Mx by real time PCR. Finally, I predicted by template-based modelling the 3D structure of IFN in collaboration with the group of Dr. Angelo Facchiano.

To obtain high levels of sea bass IFN mRNA, HK leukocytes were stimulated *in vitro* with poly I:C, a compound that is a well known inducer of mammalian type I IFNs (Dong et al., 2008). The full-length IFN cDNA (EMBL accession number AM765846) is comprised of 1047 bp and encodes for a putative protein of 185 amino acids.

An analysis of the sea bass IFN cDNA sequence revealed the presence of a putative 22 amino acid signal peptide (most likely cleavage site between Ser²² and Cys²³), three potential N-glycosylation sites but no putative O-glycosylation sites. The highest nucleotide and amino acid identity was with stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), followed by medaka (*Oryzias latipes*) and Fugu (*Takifugu rubripes*), whilst the lowest identity was to mallard (*Anas platyrhynchos*), followed by silurana tropicalis 1 (*Xenopus tropicalis*) and turkey (*Meleagris gallopavo*). The percentages of nucleotide and amino acid identity were similar with two (1 and 2) of the three sequences identified in rainbow trout (Zou J. et al., 2007). Finally, the percentages of nucleotide and amino acid identity were lower with human IFN- λ compared to human IFN- α .

A multiple alignment of the sea bass IFN amino acid sequence with other known IFN sequences was assembled to investigate the conservation of characteristic amino acid residues involved in structural domains. In the sea bass IFN mature sequence two cysteines are present (Cys²³ and Cys¹²⁶) and are conserved in all sequences (only in zebrafish 2 the first cysteine not aligned perfectly but is quite close). In human IFN- α , in rainbow trout 3, in zebrafish 2, in silurana tropicalis 1 and 2, and in bird IFN sequences (mallard and turkey) two additional cysteine residues are present and conserved in the same positions of

the alignment. It has been demonstrated by structural analysis that in human IFN- α the four cysteines form two disulphide bridges (Klaus W. et al., 1997), whereas in human IFN- β a single bond is formed by the two present cysteines (Karpusas M. et al., 1997). Some residues are conserved between almost all fish sequences, in particular: Leu¹⁹, Leu²⁰, Phe⁴², Pro⁴³, Leu⁴⁶, Tyr⁴⁷, Glu⁵⁶, Asp⁵⁷, Leu⁷², Trp⁸², Phe⁹⁰, Leu¹⁰¹, Phe¹²⁰, Leu¹²³, Ser¹³⁴, Ala¹³⁵, Trp¹³⁸, Glu¹³⁹, Arg¹⁴² and Leu¹⁴⁹. Phe⁴² has been shown to be important for biological activity of human IFN- α (Waine G.J. et al., 1992), whereas some of the other conserved residues have been identified as possible binding sites for IFNAR-1 and IFNAR-2 receptor subunits by the conserved domain database (Marchler-Bauer A. et al., 2007) and therefore they could putatively be involved in the interactions with the corresponding fish IFN receptor.

Phylogenetic analysis performed using the amino acid sequences showed that sea bass IFN grouped with other known teleost sequences. Three main branches seem present: one with the Salmoniformes, the second with the Cypriniformes and the third with the Tetraodontiformes in which the sea bass sequence, a Perciformes, is included. The rainbow trout 3 and zebrafish 2 sequences seems different from all the other fish sequences, with the avian and amphibian IFN- α sequences in different clusters compared to the fish sequences. Finally, the human IFN- λ could be considered as an outgroup of the obtained tree.

PCR amplification of genomic DNA, using the primers deduced from the IFN cDNA sequence, gave overlapping products revealing the complete gene nucleotide sequence. The whole contiguous nucleotide sequence comprises 1475 bp (EMBL accession number AM946399) with five exons and four introns. All the introns started with the typical “GT” nucleotide sequence and ended with the usual “AG” sequence, with only the first intron not in phase between exon 1 and exon 2. In the multiple alignment the exon boundaries have been shown above the sequences, but there are no conserved amino acids at the beginning or at the end of these sequences, except the cysteine residue at the end of exon 3. The sea bass IFN gene contains four introns like all others except medaka that contains three introns; the sizes of the introns are quite variable between different species, with sea bass, pufferfish and Fugu that show some affinities.

Zebrafish and rainbow trout IFN genes are bigger than the others showing an intron of more than 2000 bp (the last one in zebrafish and the third in rainbow trout). The medaka IFN gene seems to have lost the third intron and that exon 3 and exon 4 merged together.

Finally, the exon sizes are much more conserved than the intron ones, with the third and fourth exons showing comparable dimensions in all IFN genes, except for medaka.

Four Mx sequences were obtained in sea bass (EMBL accession numbers: AM228974, AM228975, AM228976, AM228977) and they are translated in a putative protein of 652 amino acids. These sequences showed the highest nucleotide and amino acid identity with sea bream. A multiple alignment of the sea bass Mx amino acid sequences with other known Mx sequences was assembled and it showed the conservation of characteristic amino acid residues involved in structural domains.

To investigate whether sea bass IFN expression could be modulated by poly I:C, *in vitro* stimulation of leukocyte of head kidney and DLEC cell line were performed. Moreover, in the same samples, we analysed the expression of sea bass Mx, one of proteins whose transcription is induced in mammals by the binding of the IFN to its receptor through the JAK-STAT pathway (Samuel C.E. et al., 2001). Real-time PCR products were loaded on agarose gel and single bands of the expected sizes were obtained. The results are shown in Figure I and II. Controls for 6 and 24 hours of incubation adding PBS only have been performed but not shown in the graph as no significant differences have been evidenced from the time 0 controls. For leukocytes of head kidney a significant higher level of IFN expression was detected after 6 hours of stimulation and Mx expression increased after 24 hours of stimulation. For DLEC cells a significant higher level of IFN expression was detected after 6 hours of stimulation, a significant higher level of Mx expression was detected after 24 hours of stimulation.

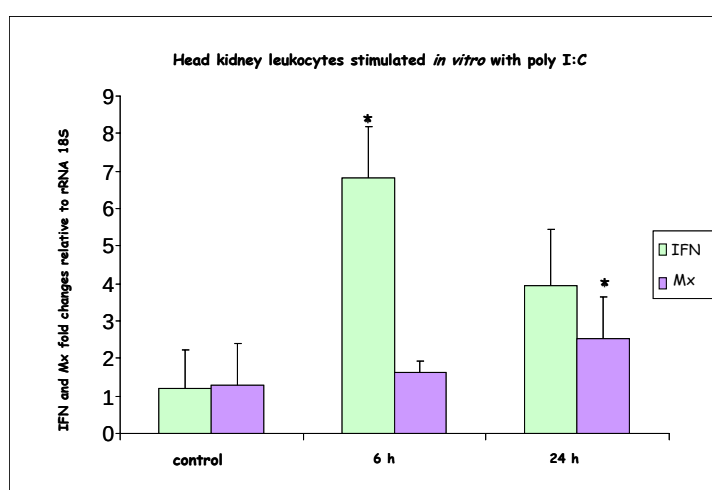


Figure 1. *In vitro* sea bass IFN and Mx expression analysis. IFN and Mx mRNA levels expressed as a ratio relative to 18 S ribosomal RNA levels in the same samples after real-time PCR analysis of head kidney leukocytes stimulated with PBS (control) and with 50 μ g/ml poly I:C for 6 and 24 hours (the calibrator was the non-stimulated 0 h control). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM and asterisks indicates when $p < 0.05$ with respect to the time 0 control.

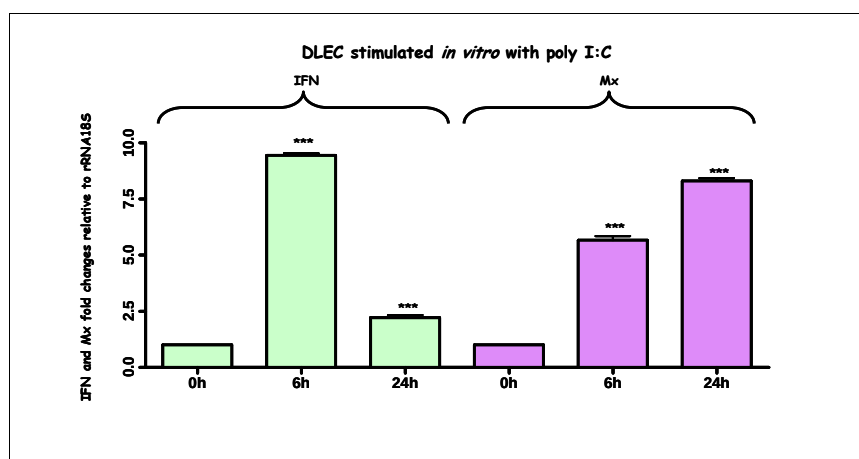


Figure 2. *In vitro* sea bass IFN and Mx expression analysis. IFN and Mx mRNA levels expressed as a ratio relative to 18 S ribosomal RNA levels in the same samples after real-time PCR analysis of DLEC cells stimulated with PBS (control) and with 20 μ g/ml poly I:C for 6 and 24 hours (the calibrator was the non-stimulated 0 h control). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM and asterisks indicates when $p < 0.05$ with respect to the time 0 control.

The IFN 3D model shows an “all-alpha” domain characterized by an “up-down bundle” architecture made of six helices (ABB'CDE) [Figure III]. The two cysteine residues present in sea bass IFN sequence (i.e. Cys²³ and Cys¹²⁶) are in a position and at a distance that suggest the possible formation of a disulfide bridge that may stabilize the structure.

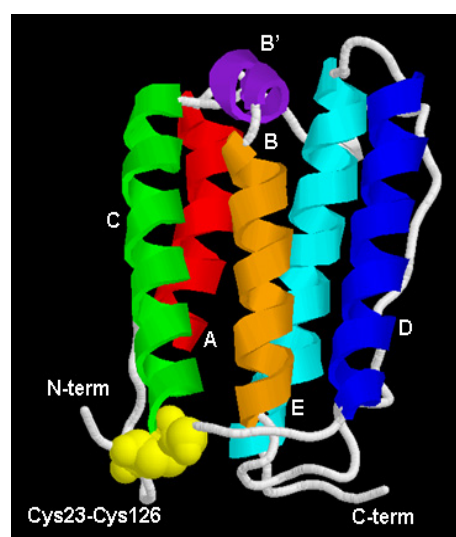


Figure 3. 3D model of sea bass IFN obtained by template-based modelling. The six helices are shown in different colours and indicated with labels. The disulphide bond is evidenced in yellow and in cpk.

In conclusion, the availability of sea bass IFN and Mx sequences gives the opportunity to investigate more in detail antiviral immune responses in this species and could help in studying the effects of vaccination trials against sea bass viral pathogens.

Capitolo I - Introduzione

1.1 Evoluzione del sistema immunitario nei Vertebrati

Gli organismi multicellulari conservano la loro capacità di mantenersi e di riprodursi tanto più a lungo quanto più riescono a resistere agli attacchi potenzialmente dannosi dei microrganismi e dei parassiti. Questa resistenza deriva in parte da rivestimenti esterni con funzione di barriera o da strutture protettive, in parte da un insieme di fattori capaci di riconoscere, isolare, distruggere o limitare l'espansione di elementi estranei presenti nei rivestimenti esterni e nelle mucose che possono penetrare in queste barriere per poi invadere l'organismo. Questa proprietà dell'organismo viene chiamata "immunità". Molto spesso l'immunità viene definita come la capacità di un organismo di resistere alle infezioni (Janeway C.A. et al., 1999), ma in senso più ampio l'immunità è un meccanismo di protezione di un organismo dall'invasione di un agente estraneo (Petrov R.V., 1976; Jarilin A.A., 1999; Rinkevich B., 1999).

Nella prima metà del XX secolo, gli immunologi fecero una distinzione chiara tra due forme di immunità, quella naturale e quella acquisita. La prima fu considerata come una caratteristica ereditata e specie-specifica, la seconda come una forma di resistenza ad un'infezione, avvenuta nel corso della vita di ciascun organismo come conseguenza di un precedente contatto con un potenziale patogeno (Zilber L.A., 1958). Più tardi le due forme di immunità vennero definite in modo diverso: l'immunità naturale prese il nome di "innata" o "non-specifica", quella acquisita di "specificata" o "adattativa".

Nei Vertebrati il sistema immunitario di tipo acquisito affianca quello innato. Linfociti, monociti-macrofagi, cellule dendritiche, trombociti, mastociti ed altre cellule specializzate migrano costantemente lungo i vasi linfatici e sanguigni tra gli organi linfoidi e gli spazi intercellulari di tessuti non-linfoidi. Altre cellule rimangono immobili per formare lo stroma reticolato del midollo osseo, del timo, dei linfonodi e della milza. I fattori umorali (anticorpi, citochine, etc.), sintetizzati da queste cellule, svolgono diverse funzioni regolatorie sia indipendentemente che interagendo con il sistema dell'immunità innata. I principali componenti che formano il sistema immunitario adattativo sono mostrati nella Tabella I-1.

Ricerche sulla risposta immunitaria innata dei Vertebrati hanno evidenziato poche similarità con il sistema immunitario degli invertebrati. Gli insetti, ad esempio, hanno sviluppato una risposta acuta di tipo infiammatorio per certi versi simile a quella riscontrata nei mammiferi ma, con l'esclusione dei recettori toll-like (TLR), scarse sono le omologie per fattori solubili, recettori e molecole regolatorie nell'espressione dei geni.

Come ulteriore esempio si possono citare i mitili che, utilizzando peptidi cationici antibatterici presenti nei fagolisosomi, hanno sviluppato una fagocitosi intracellulare che sembra somigliare a quella dei neutrofili dei mammiferi (Salzet M., 2001). I dati attualmente a disposizione suggeriscono che la risposta immunitaria innata dei vertebrati mandibolati abbia alcune analogie con quella presente negli invertebrati, anche se è difficile ipotizzare una origine comune.

Invece, un alto grado di specificità è stato trovato nel sistema immunitario adattativo dei Vertebrati superiori (Schulenburg H. et al., 2007), dove la combinazione tra recettori altamente variabili del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), anticorpi diversi, recettori per le cellule T e B permettono la discriminazione tra molecole self e non-self (Janeway C. A. et al., 2001). Inoltre, la specificità del sistema adattativo è associata con la memoria immunitaria, che aumenta il grado d'immunità in seguito ad una seconda infezione con lo stesso agente (Kurtz J., 2004). Gli Invertebrati non possiedono un sistema immunitario adattativo e quindi si è assunto che mancano di una difesa immunitaria altamente specifica. Due recenti studi hanno fornito evidenze convincenti che questa assunzione sia sbagliata.

Individui di copepoda *Macrocyclus albidus* aumentano il grado di immunità contro un ceppo aspecifico del loro cestode parassita *Schistocephalus solidus* in seguito ad una precedente esposizione al parassita nel corso della loro vita (Kurtz J. and Franz K., 2003).

Nella pulce d'acqua, *Daphnia magna*, la prole di animali esposti ad un ceppo del loro microparassita *Pasteuria ramosa* mostra un'aumentata resistenza contro questo ceppo specifico ma non contro un secondo ceppo testato (Little T.J. et al., 2003). Inoltre, un certo grado di specificità immunitaria è stata riportata per il *Bombus terrestris*, il quale sviluppa una risposta specie-specifica contro due taxa strettamente connessi del genere *Paenibacillus* (Sadd B.M. and Schmid-Hempel P., 2006).

Components	Vertebrate taxons						
	Agnata	Chondrichthyes	Osteichthyes	Amphibia	Reptilia	Aves	Mammalia
Organs and tissues							
Intestinal lymphoid tissue	+	+	+	+	+	+	+
Thymus	+	+	+	+	+	+	+
Spleen	-	+	+	+	+	+	+
Bone marrow	-	-	-	+	+	+	+
Lymph nodes	-	-	-	-	-	+	+
Cellular elements							
Monocytes-macrophages	+	+	+	+	+	+	+
$\gamma\delta$ T-lymphocytes	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha\beta$ T-lymphocytes	-	+	+	+	+	+	+
B1-lymphocytes	-	+	+	+	+	+	+
B-lymphocytes	-	+	+	+	+	+	+
Plasma cells	-	+	+	+	+	+	+
Receptors							
T cell receptor	-	+	+	+	+	+	+
B cell receptors (IgM, IgD)	-	+	+	+	+	+	+
Class I MHC antigens	-	+	+	+	+	+	+
Class II MHC antigens	-	+	+	+	+	+	+
Fc-receptors	-	+	+	+	+	+	+
Immunoglobulins	-	+	+	+	+	+	+
Complement*	-	+	+	+	+	+	+
Cytokines	+	+	+	+	+	+	+

Note: il segno (+) indica la presenza di un componente, il segno (-) l'assenza di un componente, il segno (+?) indica che i dati non sono chiari.

* Classico pathway di attivazione.

Tabella I-1. Componenti dell'Immunità adattativa (Klimovich V.B., 2002)

(Cooper E., 1995; Galaktionov V.G., 1995; Berek C. and Ziegner M., 1993; Raison R.L. and Dos Remedios N.J., 1998; Rombout J.H., 1993a; Sharma J.M., 1998).

Ai processi di riconoscimento dell'antigene, nell'ambito dell'immunità adattativa dei Vertebrati, partecipano tre tipi cellulari:

1. i linfociti B, che con il loro recettore specifico riconoscono i siti complementari di molecole antigeniche e producono anticorpi (Nezlin R., 1998);
2. i linfociti T (York I.A. and Rock K.L., 1996; Benham A. et al., 1995) di tipo $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$.
3. le cellule presentanti l'antigene (APC), che processano e legano l'antigene (Steinman R.M., 1991) alle molecole di classe I e II del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Solo in questa forma di complesso il peptide-MHC può essere riconosciuto dai linfociti T $\alpha\beta$.

Come detto in precedenza, i processi immunitari coinvolgono entrambi i tipi di immunità: quella rapida (innata) che elimina o isola l'antigene estraneo senza lasciare alcuna memoria nell'organismo e quella più lenta (acquisita), che comporta, nella maggior

parte dei casi, la formazione di una memoria a lungo termine e che provvede ad una risposta più veloce ed efficace nel caso in cui l'organismo venga nuovamente a contatto con lo stesso antigene (Zinkernagel R.M. et al., 1996). Questa proprietà è considerata come un adattamento ed apprendimento alla presenza di un patogeno nell'ambiente ed è proprio per questo che una risposta immunitaria di questo tipo viene definita "adattativa".

Le risposte immunitarie acquisite nei Mammiferi prevedono una serie di fasi successive: una fase di riconoscimento dell'antigene, una fase di attivazione dei linfociti, una fase di eliminazione dell'antigene, una fase in cui la risposta progressivamente declina, e una fase in cui si genera la memoria [Figura I-1].

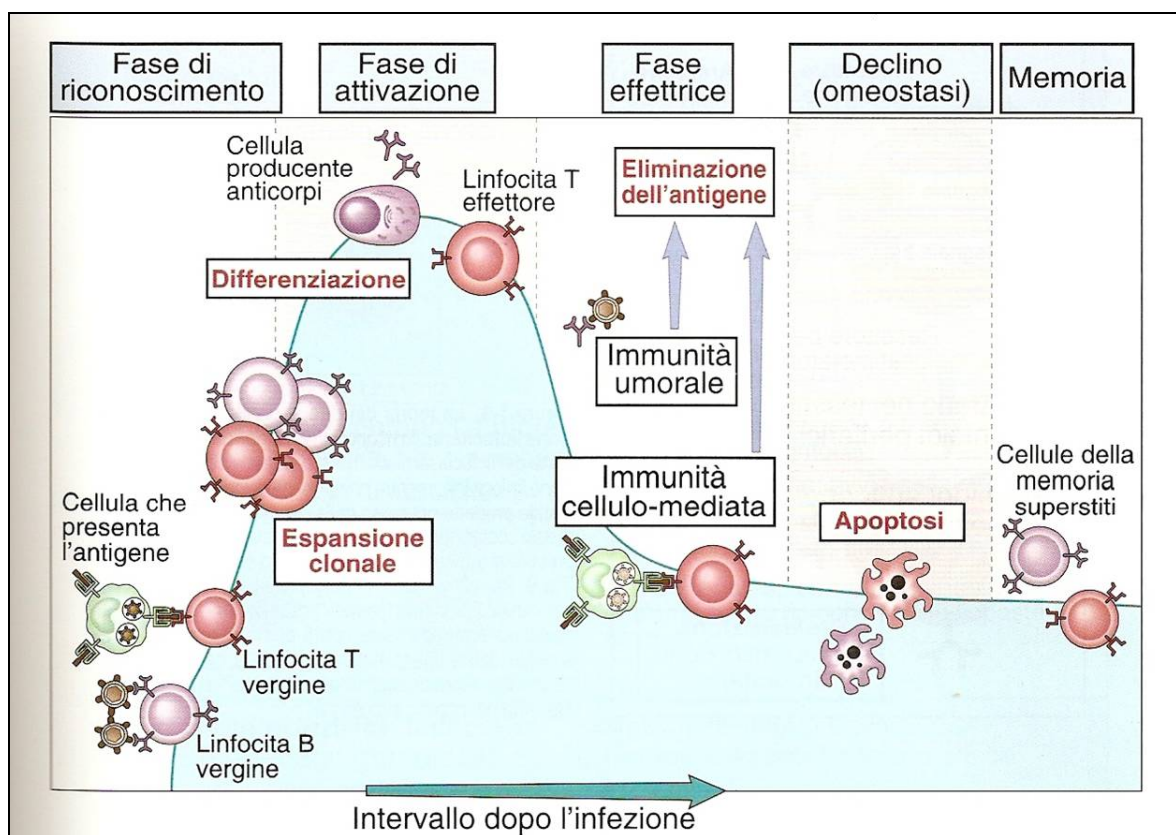


Figura I-1. Fasi della risposta immunitaria acquisita

Ognuna di queste fasi corrisponde a particolari risposte dei linfociti e di altri componenti del sistema immunitario. Nel corso della fase di riconoscimento, i linfociti antigene-specifici localizzano e riconoscono gli antigeni microbici. Nel corso della successiva fase di attivazione linfocitaria, i cloni di linfociti che hanno incontrato l'antigene vanno incontro ad una rapida moltiplicazione cellulare, generando una progenie numerosissima. La fase di eliminazione dell'antigene è denominata fase effettrice della risposta immunitaria. Una volta debellata l'infezione, lo stimolo per l'attivazione

linfocitaria viene ovviamente a mancare; di conseguenza, la maggior parte delle cellule attivate muore attraverso un processo regolato di morte cellulare (apoptosi), grazie al quale le cellule morte vengono rapidamente rimosse dai fagociti senza evocare alcuna reazione infiammatoria. Le cellule superstiti, una volta esauritasi la risposta immunitaria, sono i linfociti della memoria, in grado di sopravvivere in uno stato di quiescenza per mesi o anni, ma pronti a rispondere rapidamente in occasione di un successivo incontro con lo stesso patogeno (Abbas A.K, Lichtman A.H. – Fondamenti di immunologia – Casa editrice PICCIN 2003 cap.1 pag 8-10).

Il sistema immunitario adattativo deve la sua unicità a due geni estremamente variabili codificanti le molecole per i recettori chiave dell'immunità: l'MHC e i recettori linfocitari (Liu Z.G. and Han J., 2001). I geni per l'MHC di classe I e II codificano proteine estremamente polimorfiche e, come atteso dalla loro funzione, sono in grado di presentare una vasta gamma di tipi antigenici diversi. I geni per i recettori dei linfociti T (TcR) e per le immunoglobuline (Ig) sono presenti in cellule della linea germinale in gruppi separati di segmenti allelici multipli. Dopo la fecondazione, nell'embrione avviene la differenziazione dei linfociti T e B, sotto l'effetto dei geni attivatori della ricombinazione somatica (RAG-1 e RAG-2), singoli segmenti di ciascun gruppo si uniscono in interi geni codificando la catena polipeptidica completa (Thompson C.B., 1995). Questa proprietà suggerisce un'altra definizione di immunità acquisita, quella di "immunità combinatoria" (Schluter S.F. et al., 1999): il sistema combinatorio è caratterizzato dalla presenza delle immunoglobuline, del TcR, dei prodotti MHC e degli enzimi necessari per la ricombinazione di geni.

Il sistema immunitario adattativo fece la sua comparsa nei primi Vertebrati mandibolati durante il periodo geologico del Cambriano, cioè circa 450-540 milioni di anni fa, durante una specie di "Big Bang" immunologico, i cui dettagli sono ancora ben lontani dall'essere chiariti (Kasahara M. et al., 2004) [Figura I-2]. I parametri principali per questo tipo di sistema immunitario, come detto in precedenza, sono la presenza dei geni responsabili dell'attivazione dei processi di ricombinazione (RAG-1 e RAG-2) e dei geni codificanti per l'MHC, il TcR e le Ig (Zinkernagel et al., 1996). Nei Vertebrati il recettore per l'antigene è composto da due catene polipeptidiche appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline (IgSF): le catene pesante (H) e leggera (L) per gli anticorpi, e le catene α/β e γ/δ per il TcR (Lefranc M.P. and Lefranc G., 2001).

I membri della superfamiglia delle immunoglobuline (IgSF) sono degli elementi chiave del sistema immunitario adattativo negli gnatostomi. I domini Ig non sono impiegati

soltanto dal TcR, dal BcR (B cell receptor) e dall'MHC ma anche da recettori impiegati dalle cellule natural killer (NK), da recettori specifici sulle cellule fagocitiche in grado di legare anticorpi complessati con i loro antigeni, da recettori per le citochine, da “*cell-adhesion molecules*”, e da altre “*cell-surface molecules*” che determinano le interazioni dei linfociti T e B con le cellule che presentano l'antigene e con le cellule infiammatorie (Cooper M.D. and Alder M.N., 2006).

Alcune sequenze tipo IgSF sono state trovate negli insetti e potrebbero avere funzione di difesa immunitaria (Sun S.C. et al., 1990). Un gene identificato molto interessante è quello che codifica per la “*molecole di adesione cellulare della sindrome di Down*” (Dscam) che ha un ruolo importante nella “*guida al legame neuronale*” (Watson F.L. et al., 2005). Questo membro delle IgSF interviene nella risposta immunitaria innata degli insetti. Un'altra interessante famiglia di molecole IgSF è quella delle proteine connesse con il fibrinogeno (FREPs), trovata nelle lumache (Zhang S.M. et al., 2004). Un'altra famiglia multigenica è stata trovata nella *Florida lancelet*, un anfiosso della branca dei cefalocordati (Cannon J.P. et al., 2002). Questa famiglia di geni codifica proteine con dominio Ig tipo V e un “*dominio che lega la chitina*” (VCBP).

Il TcR è un eterodimero costituito di 2 distinte catene (α/β e γ/δ). Le cellule T sono attivate nel momento in cui un TcR (α/β o γ/δ) insieme al complesso del CD3 riconosce un antigene (Ag). Il TcR α/β riconosce un antigene processato come un peptide presentato dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) espresso sulle cellule che presentano l'antigene (APC), mentre il TcR γ/δ non è limitato all'MHC ma sembra che riconosca gli antigeni in maniera analoga ai processi diretti che avvengono per le Ig (Chien Y.H. et al., 1996).

Il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e quello di classe II (MHC I, MHC II) sono degli eterodimeri formati da glicoproteine di membrana α e β che legano peptidi self e non-self al fine di presentarli sulla superficie cellulare alle cellule T. L' MHC di classe I si trova su quasi tutte le cellule nucleate del corpo, esso interagisce con le cellule T citotossiche CD8⁺ (CTLs). L'MHC di classe II lega i peptidi per la presentazione alle cellule T helper CD4⁺ (Lanzavecchia A. et al., 1990; Konig R. et al., 1992) ed è codificato da due geni, A e B (Brodsky F.M. and Guagliardi L.E., 1991).

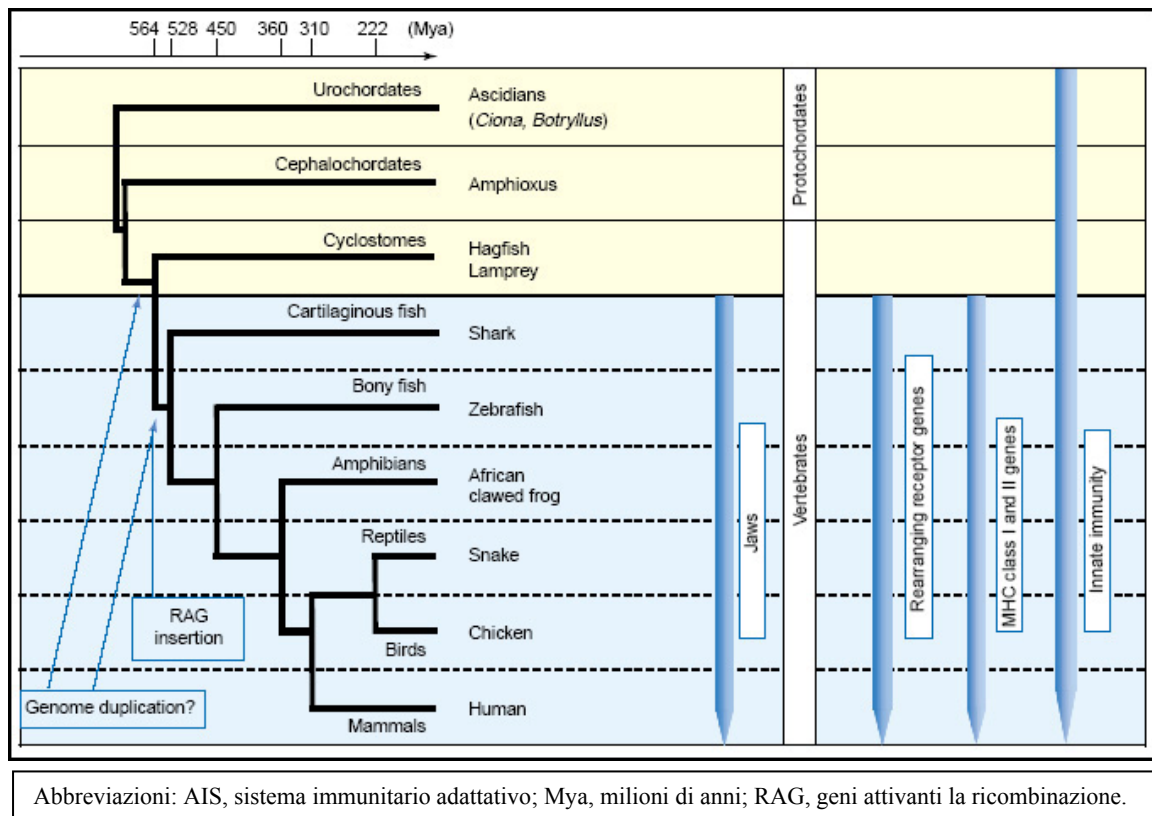


Figura I-2. Filogenesi dei Cordati e dei principali eventi nell'evoluzione del sistema immunitario adattativo (Kasahara M. et al., 2004).

I cordati sono classificati in protocordati e vertebrati: i primi sono composti dagli urocordati e dai cefalocordati; i vertebrati invece si dividono in due gruppi, quelli con e quelli senza mandibola. I vertebrati senza mandibola (lamprede e vermi di mare) sono anche detti ciclostomi o agnati ed è in dubbio se le lamprede ed i vermi di mare discendano da un unico antenato, come mostrato in questa figura (Furlong R.F. and Holland P.W., 2002; Takezaki N. et al., 2003). I geni RAG sono stati individuati solo nei vertebrati con mandibola. La parte gialla rappresenta l'assenza dell'immunità adattativa, mentre quella blu la presenza.

Negli Agnati (lamprede e missine) sono state individuate cellule morfologicamente non distinguibili dai linfociti. Isolotti di tessuto linfoide sono presenti nell'intestino e nel pronefro, ma non è possibile distinguere anatomicamente dei veri e propri organi linfoidi (Du Pasquier L. and Flajnik M., 1998). Molecole che in un primo momento vennero descritte come anticorpi di missine, furono poi definite omologhe al componente C3 del sistema del complemento dei Mammiferi (Hanley P.J. et al., 1992). Dati sul rigetto in seguito ad un allotrapianto in questi animali non sono mai stati successivamente confermati (Raison R.L. and Dos Remedios N.J., 1998). Per queste ragioni, gli Agnati rappresentano il gruppo di organismi filogeneticamente più antico che ha esclusivamente

un sistema immunitario di tipo innato, essi includono lamprede (Petromyzontiformi) e missine (Myxiniiformi). Tuttavia, la presenza del gene *ikaros* nei vermi di mare (*Bonella viridis*) (Cupit P.M. et al., 2003), di CD45, della proteina BCAP, di CD3, di CD9 (Uinuk-Ool T. et al., 2002) e di un nuovo tipo di recettore variabile dei linfociti (VLR) (Pancer Z. et al., 2004) hanno aperto un dibattito sul fatto che forse sia giusto parlare di una primitiva immunità acquisita anche nei vertebrati privi di mandibola.

Nei pesci cartilaginei e nei pesci ossei il sistema immune di tipo adattativo ha caratteristiche primordiali: l'emopoiesi è concentrata nel fegato e nel rene, solo la milza ed il timo sono anatomicamente separati e con una forma definita, mentre le cellule linfoidi sono distribuite in maniera diffusa nell'intestino. Tra queste sono stati identificati i linfociti B con le immunoglobuline ed elementi che presumibilmente possono essere considerati omologhi ai linfociti $T\gamma\delta$ (Rombout J.H., 1993a). Quest'ultimi, in accordo con altri risultati (Boismenu R. and Havran W. L., 1997), sono una popolazione speciale di cellule T, la cui maturazione non avviene nel microclima timico. I linfociti $T\gamma\delta$, come le cellule del sistema immunitario innato, hanno dei recettori con una spiccata specificità, non riconoscono il complesso MHC-peptide, ma l'antigene nativo, senza alcuna partecipazione delle cellule presentanti l'antigene (Chien Y.H. et al., 1996).

Non si sa ancora precisamente se i pesci cartilaginei abbiano i linfociti $T\alpha\beta$. I linfociti T in squalo e in razza sono attivati solo da mitogeni, mentre nei pesci ossei possono essere attivati sia da mitogeni (concanavalina-A) che da colture con cellule allogeniche: essi partecipano alla risposta immune insieme ai macrofagi e ai linfociti B (Clem L.W. et al., 1991; Miller N.W. and Clem L.W., 1984; Vallejo A.N. et al., 1991). Per quanto riguarda la funzione dei linfociti T nei pesci, essi producono fattori umorali coinvolti poi nell'attivazione dei macrofagi (Graham S. and Secombes C.J., 1988) e proliferano in risposta al contatto con i macrofagi che hanno processato e presentato l'antigene (Vallejo A.N. et al., 1991). Bisogna notare che in tutti gli studi citati, i linfociti T sono stati caratterizzati indirettamente in quanto cellule prive di Ig di membrana. Nei pesci esistono markers specifici per questo tipo di popolazione cellulare. L'anticorpo monoclonale DLT15, "*specific anti putative T-cell marker*", (Scapigliati G. et al., 1995) è stato il primo marker specifico per i timociti e per le cellule T periferiche nei pesci e ha fornito l'opportunità di descrivere per la prima volta il contenuto in cellule T negli organi linfoidi e non dei pesci (Romano N. et al., 1997). Altri anticorpi monoclonali diretti contro cellule putative T sono stati prodotti anche per il pesce gatto (Passer B.J. et al., 1996) e per la carpa WCL38 "*against carp intestinal T cells*" (Rombout J.H.W.M. et al., 1998).

La classe predominante di anticorpi nei pesci sono le IgM. In squalo e razza sono stati individuati isotipi che non hanno una struttura canonica (Schluter S.F. et al., 1997).

Gli anticorpi nei pesci sono piuttosto omologhi: l'omologia del loro sito costante arriva fino al 90%; possono interagire con diversi antigeni esterni e con autoantigeni; sono definiti "normali" o "anticorpi naturali" (autoanticorpi), quelli la cui sintesi non ha bisogno dell'immunizzazione e della partecipazione delle cellule T-helper e che vengono prodotti dai linfociti B1, una popolazione cellulare specifica che si differenzia al di fuori del microambiente del midollo osseo (Avrameas S. and Ternynck T., 1995).

Lo sviluppo della risposta immunitaria anticorpale nei pesci teleostei può richiedere settimane in quanto dipende dalla temperatura; gli anticorpi sono generalmente prodotti in basso titolo e hanno una bassa affinità che incrementa leggermente nel corso della risposta. Iniezioni ripetute di un antigene non hanno un sensibile effetto sul titolo e sull'affinità degli anticorpi prodotti: questo può significare che nei pesci i processi di maturazione e formazione di memoria immunologica abbiano componenti e cinetiche diverse (Press C. 1998).

Gli Anfibi, oltre timo e milza, presentano il midollo osseo, le cui cellule hanno geni RAG attivati (Greenhalgh P. et al., 1993), isole di tessuto linfoide morfologicamente distinte attraverso tutta la lunghezza dell'intestino (ma non sono presenti centri germinali) (Manning M.J., 1991), e aggregati linfoidei (che non sono però dei veri e propri linfonodi) nel rene, milza e mesentero. La presenza di linfociti T può essere individuata dalla proliferazione cellulare in reazioni allogeniche, dalla risposta a stimoli mitogeni e dalle risposte in seguito a trapianto; la difficoltà maggiore nello studio dei linfociti T consiste nel fatto che solo in tempi recenti sono stati identificati un numero esiguo di markers antigenici omologhi ai linfociti T dei Mammiferi (Nagata S.A., 1985; Jürgens M. et al., 1995). Allo stesso tempo, alcuni studi di biologia molecolare hanno permesso di stabilire che nel genoma degli Anfibi sono presenti copie multiple codificanti il TcR e le Ig (Charlemagne J. and Tourneier A., 1998). Negli anfibi Urodeli, gli anticorpi hanno un limitato repertorio di specificità, appartengono soprattutto alla classe delle IgM e sono prodotti principalmente in risposta ad un antigene timo-dipendente; esistono anche altre due classi di anticorpi, quella di più alto peso molecolare IgX e quella di più basso peso molecolare IgY, in risposta ad un antigene T-dipendente. La risposta immunitaria si sviluppa lentamente, raggiungendo il picco circa 40 giorni dopo l'immunizzazione. Negli anfibi Anuri e nei Rettili, invece, il picco della risposta primaria corrisponde con la fine del quattordicesimo giorno, mentre quello della risposta secondaria si ha dopo 3 settimane

e, nel contempo si osserva anche un moderato aumento dell'affinità anticorpale (Wilson M. et al., 1995). Alcuni dati indicano che nei pesci, negli anfibi e nei rettili avvengono dei processi di mutazione somatica dei geni per le Ig, ma il meccanismo di selezione cellulare secondo il criterio dell'affinità recettoriale non è stato ancora definito (Hanley P.J. et al., 1992). Da questi dati sembra emergere che nei Vertebrati Inferiori, elementi del sistema immunitario adattativo non contribuiscono in maniera rilevante alla protezione di queste specie dai patogeni, che invece sembrano utilizzare in modo predominante i fattori dell'immunità innata.

Il sistema immunitario adattativo raggiunge un elevato livello di sviluppo ed una maggiore efficienza negli animali omeotermi, sebbene negli Uccelli esso non sia così completamente sviluppato come nei Mammiferi. In alcune specie di uccelli è possibile distinguere i linfonodi; nel pollo, al posto di questi, sono evidenti degli aggregati cellulari con occasionali centri germinativi lungo i vasi linfatici (Sharma J.M., 1998); nella milza i linfociti B formano degli aggregati attorno ai capillari e nei follicoli con i centri germinativi. Negli Uccelli le risposte immuni, che sono mediate o che comunque prevedono la partecipazione dei linfociti T, sono simili per molti aspetti a quelle dei Mammiferi (Le Douarin N., 1986). Gli anticorpi sono di tre classi: IgM, IgA e IgY, sono relativamente omogenei, hanno un limitato repertorio di specificità e la loro affinità è più bassa di quella di altri mammiferi (Warr G.W. et al., 1995; Voss E.W. and Watt R.H., 1977). I linfonodi nei mammiferi sono completamente sviluppati e formati e sono il sito principale di sviluppo della risposta immunitaria, dove avvengono la presentazione dell'antigene e l'interazione tra linfociti T e B; i processi di riproduzione clonale, di ipermutazione e selezione delle cellule che producono anticorpi si sviluppano nei centri germinativi; inoltre il numero delle classi anticorpali nei Mammiferi aumenta a cinque: IgM, IgA, IgG, IgD e IgE. La risposta immune primaria si sviluppa in 5-8 giorni, quella secondaria in 3-5 giorni e gli anticorpi hanno un'elevatissima variabilità di specificità e funzioni regolatorie.

Nel suo insieme, il sistema immunitario dei Vertebrati Superiori può essere considerato un complesso costituito da tre parti con una differente età filogenetica (Murakami M. and Honjo T., 1995) [Figura I-3]: lo "strato" più antico è formato da fattori dell'immunità innata ereditati dagli Invertebrati; il secondo "strato" è formato da componenti del sistema immunitario primordiale dei Vertebrati Inferiori, cioè dai linfociti $T\gamma\delta$ localizzati principalmente nel tessuto mucosale epiteliale e dai linfociti B1 che producono autoanticorpi naturali della classe delle IgM; il terzo "strato", quello più recente, è

composto dai linfociti $T\alpha\beta$, dalle cellule presentanti l'antigene e dai linfociti B, che provvedono alla sintesi degli anticorpi delle cinque classi.

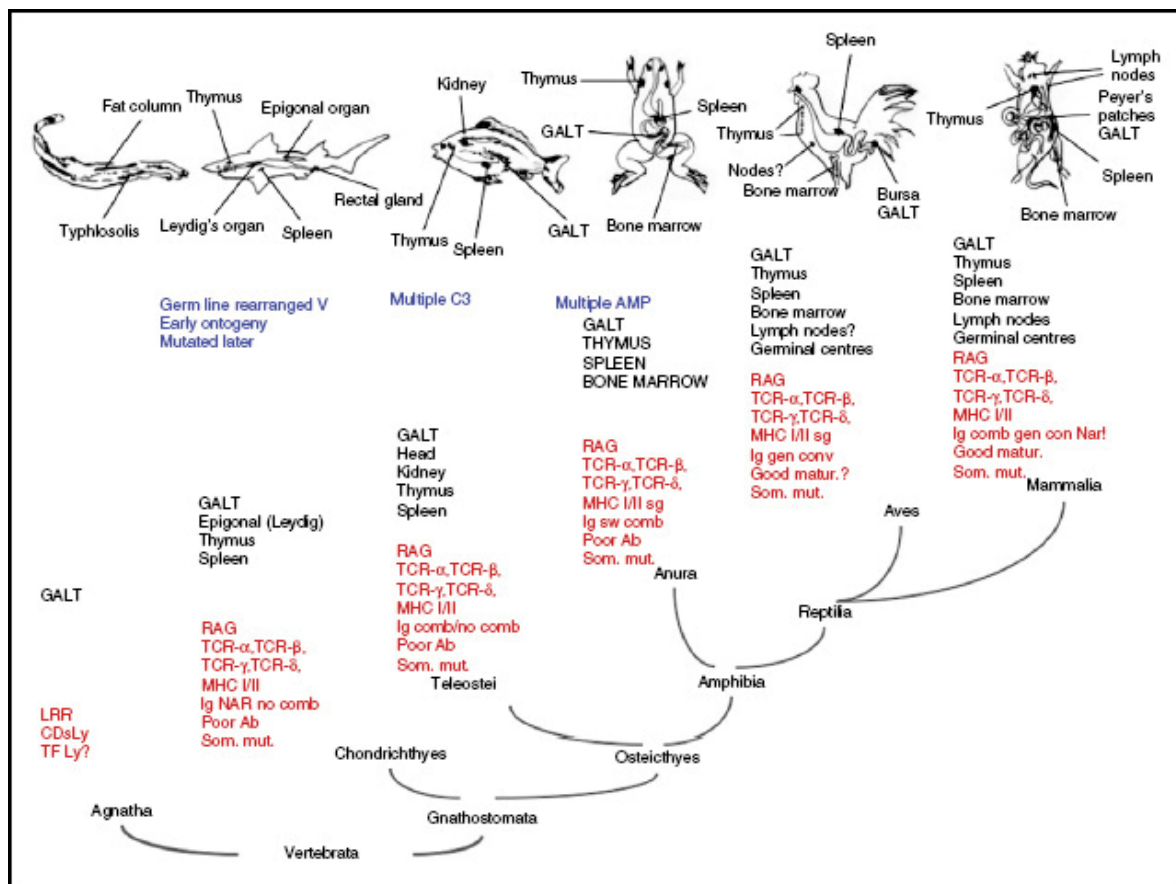


Figura I-3. Evoluzione del sistema immunitario nei Vertebrati (Du Pasquier L., 2005)

1.2 Il Sistema Interferone dei Vertebrati

1.2.1 Introduzione

Gli interferoni (IFNs) sono delle citochine in grado di indurre uno stato antivirale nelle cellule e, per questo motivo, giocano un ruolo fondamentale nella difesa contro le infezioni virali nei Vertebrati (Samuel C. E., 2001).

L'interferone (IFN) è stato scoperto per la prima volta quale componente antivirale in seguito al suo rilascio da cellule di pulcino infettate con il virus dell'influenza inattivato con il calore (Isaacs A. and Lindenmann J., 1957; Nagano Y. and Kojima Y., 1958). Isaac e Lindenmann nel 1957 osservarono come le cellule di pollo infettate con il virus dell'influenza producessero un fattore secretorio in grado di indurre uno stato di resistenza al virus. Queste scoperte, insieme con altre simili effettuate da Nagano e Kojima nel 1958 (Nagano Y. And Kojima Y., 1958), posero le basi per gli studi successivi in questo settore.

Il sistema interferone (IFN) include cellule che sintetizzano IFN in risposta ad uno stimolo esterno come, appunto, l'infezione virale, e cellule che rispondono all'IFN inducendo uno stato antivirale (Pestka S. J. A. et al., 1987; Sarkar S. N. et al., 1999; Stark G. R. et al., 1998).

Oltre all'attività antivirale, grazie alla quale è stato possibile identificarli, gli IFNs possiedono un ampio range di attività biologiche quali l'azione antitumorale e ruoli immunomodulatori (Robertsen B. 2006; Biron C. A. et al., 2001; Martin S.A. et al., 2007)

Da varie ricerche è stato evidenziato come gli IFNs siano una famiglia multigenica di proteine inducibili (Blatt L. M et al., 1996; Diaz M. O. et al., 1996; Roberts R. M. et al. 1998; Stark G. R. et al., 1998; Young H. A. 1996) con caratteristiche strutturali diverse (Stark G. R. et al., 1998; Pestka S.J.A. et al., 1987; Samuel C. E. 1988).

1.2.2 Nomenclatura degli IFNs

Nei Mammiferi sono state identificate tre famiglie di IFNs (tipo I, tipo II e tipo III) che mostrano differenze nelle strutture genica e proteica, nell'uso dei recettori e nell'attività biologica (Kontsek P. et al., 2003; Kotenko S.V. et al., 2003; Pestka S.J.A. et al., 2004).

Gli IFNs di tipo I comprendono differenti sottogruppi omologhi (α , β , ω , ϵ , κ nell'uomo) includendo IFN- α ed IFN- β che sono tra i più studiati; essi sono principalmente prodotti da cellule specializzate del sangue, le cellule dendritiche plasmatiche, in risposta ad una infezione virale (Colonna M. et. Al. 2002). Alcuni effetti dell' IFN di tipo I sono collegati alla modulazione del sistema immunitario come ad esempio l'incremento della capacità delle cellule NK ad uccidere i virus che infettano le cellule (Biron C.A. et al., 1999); la stimolazione della maturazione delle cellule dendritiche (Buelens C. et al., 2002); l'inibizione della proliferazione cellulare (Stark G.R. et al., 1998) e la regolazione dell'espressione di MHC di classe I (Fellous M. et al., 1982).

Tipicamente i geni IFNs di tipo I non contengono introni, sono localizzati sullo stesso cromosoma (Coulombel C. et al., 1991; Sheppard P. et al., 2003) e possiedono un recettore eterodimerico comune costituito dalle subunità IFNAR-1 e IFNAR-2 che attiva una via di segnalazione intracellulare JAK/STAT. Essi sono variabili in dimensioni e in numero di ponti disolfuro ma hanno una comune struttura 3D, che, come si è determinato mediante analisi cristallografica, è costituita di 5 α -eliche (Senda T. et al., 1992; Radhakrishnan R. et al., 1996; Karpusas M. et al., 1997).

Gli IFNs di tipo II (IFN- γ) sono citochine immunomodulatorie principalmente sintetizzate e secrete dalle cellule Th1 e dalle cellule NK e regolano sia le risposte immunitarie innate sia le risposte immunitarie cellulo-mediate (Boehm U. et al., 1997).

Questo tipo di IFN non è primariamente indotto da virus, esso è codificato da geni che possiedono tre introni e lega un complesso recettoriale contenente due differenti catene (IFNGR1 e IFNGR2) che attiva una via di segnalazione intracellulare JAK/STAT per iniziare l'espressione di una varietà di geni nel nucleo (Schroder K. et al., 2004).

Gli IFNs di tipo III (IFN- λ) regolano sets di geni e mostrano attività biologiche simili a quelle degli IFNs di tipo I, ma sono codificati da geni con 4 introni. Inoltre gli IFNs di tipo III si legano a recettori specifici costituiti di due subunità: CRF2-12 (anche chiamato IFN- λ R1) e CRF2-4 (anche conosciuto come IL-10R2) (Kotenko S.V. et al., 2003).

1.2.3 Azione degli IFNs

L'azione antivirale degli IFNs è mediata da una via di segnalazione JAK/STAT a 2 steps (Samuel C.E. 2001; Doly J. et al., 1998).

La sintesi di IFNs è rapidamente indotta in seguito ad infezione virale, cioè nel momento in cui un virus infetta una cellula ospite mediante inserimento di intermedi di RNA a doppio filamento (dsRNA) (Jacobs B.L. and Langland J.O., 1996; Goodbourn S. et al., 2000).

L'IFN è secreto dalla cellula infettata e trasportato dal torrente circolatorio al fine di allertare le altre cellule del corpo. L'effetto antivirale è esercitato attraverso il legame dell'IFN con il suo recettore specie-specifico (Bach E. A. et al., 1997; Heim M. H. 1999; Mogensen K. E. et al., 1999; Pestka S. et al., 1987; Biron C.A. et al., 2001) [Figura 1-4].

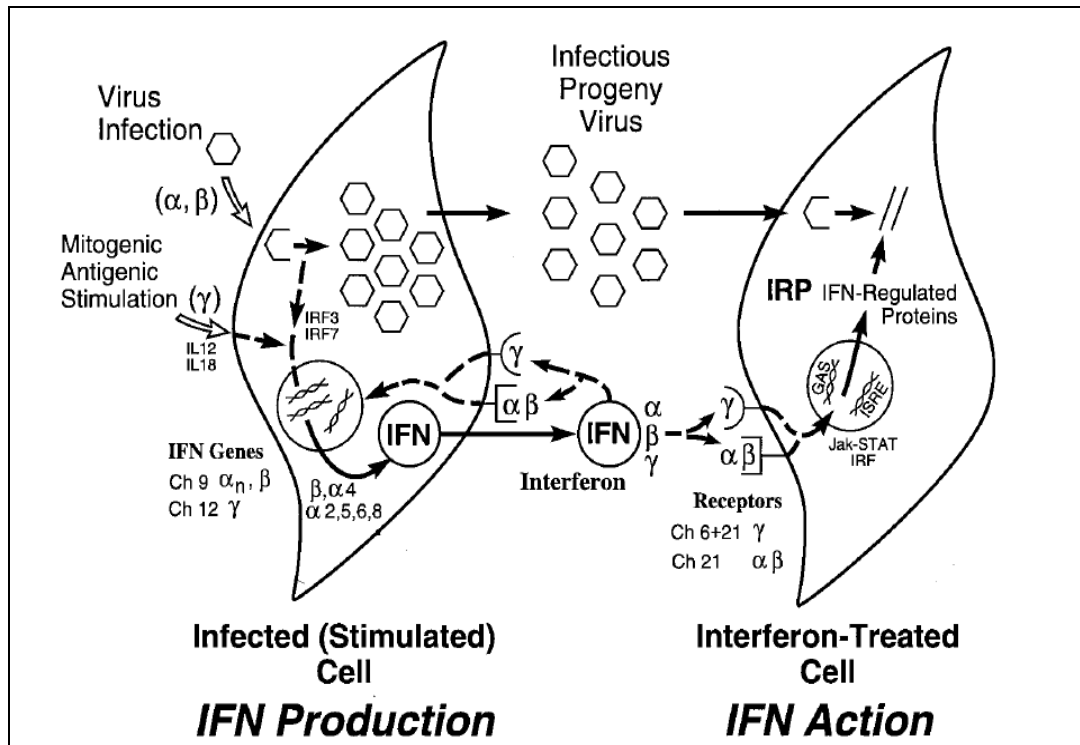


Figura I-4. Sommario schematico del sistema IFN

La trasduzione del segnale attraverso la via di segnalazione JAK/STAT porta alla sintesi di proteine antivirali come la protein chinasi RNA dipendente (PKR), la 2',5'-oligoadenilato sintetasi (OAS), la adenosina deaminasi RNA specifica (ADAR), la proteina MX GTPasi (Samuel C.E. 2001).

Gli IFNs di tipo I hanno un recettore comune costituito di due subunità: IFNAR-1 (subunità legante) e IFNAR-2 (subunità accessoria). L'IFN- γ si lega, invece, ad un recettore distinto da quello utilizzato dagli IFNs tipo I, costituito dalle subunità IFNGR-1 (subunità accessoria) e IFNGR-2 (subunità legante).

La via di segnalazione dell'IFN coinvolge una eterodimerizzazione mediata dall'IFN di tipo I delle subunità dei recettori cellulari di superficie; IFNAR-1 e IFNAR-2 e lo stesso succede per l'IFN- γ con le subunità IFNGR-1 e IFNGR-2 (Bach E. A. et al., 1997; Balachandran S. et al., 1998; Mogensen K. E. et al., 1999; Shtrichman R. and Samuel C.E., 2001; Stark G. R. et al., 1998).

La via di segnalazione mediata dagli IFNs e l'attivazione trascrizionale dell'espressione genica cellulare sono note in maniera particolareggiata. (Darnell J.E. Jr. et al., 1994; Levy D.E., 1999; Schindler C., 1999; Schindler C. et al., 1995; Stark G. R. et al., 1998) [Figura I-5].

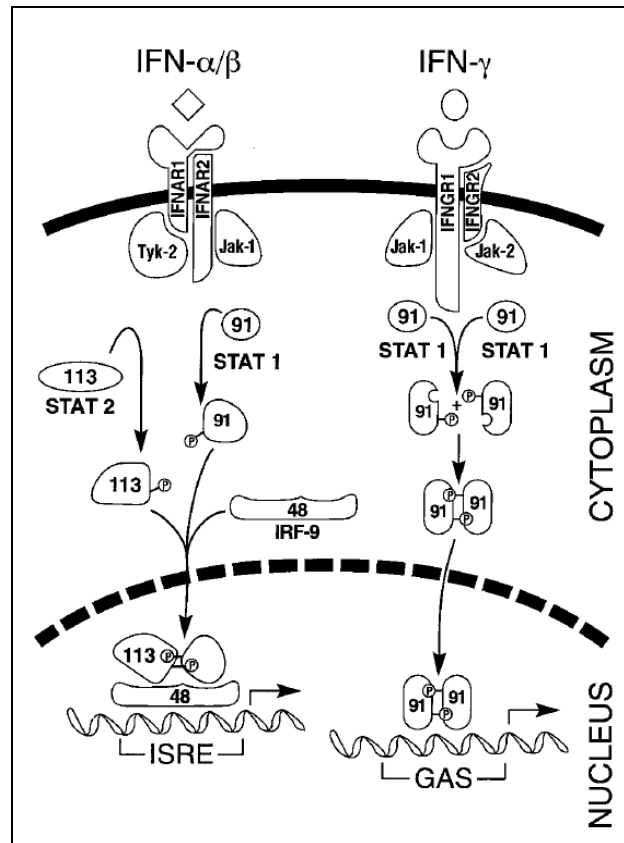


Figura I-5. Schema della segnalazione IFN attraverso la via JAK/STAT

La famiglia di proteine STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) sono fattori trascrizionali citoplasmatici latenti che divengono attivi tramite fosforilazione delle tirosine ad opera degli enzimi JAK (*Janus Tyrosine Kinase*) in risposta alla stimolazione delle citochine. Ci sono 7 diversi membri della famiglia delle proteine STAT: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b, STAT-6; e 4 membri della famiglia delle proteine JAK: JAK-1, JAK-2, JAK-3, TYK-2. Le differenti JAKs e STATs hanno funzioni distinte nella segnalazione delle citochine. I recettori associati alle JAKs si attivano successivamente al legame degli IFNs al loro recettore transmembrana. Delle JAKs e STATs di cui è conosciuta l'attività biologica, le JAK-1, JAK-2 e TYK-2 chinasi ed i fattori trascrizionali STAT-1 e STAT-2 giocano ruoli centrali nella risposta biologica dipendente dall'IFN, inclusa l'induzione dello stato antivirale (Darnell J.E. Jr. 1997; Horvath C.M., 2000; Leonard W.J. and O'Shea J. J., 1998; Stark G.R. e al., 1998).

I vari sottoinsiemi di proteine JAKs sono coinvolti nella segnalazione attraverso 2 tipi di IFNs. Le chinasi JAK-1 e TYK-2 fanno parte della via di segnalazione che utilizza l'IFN di tipo I (α/β), mentre le chinasi JAK-1 e JAK-2 sono attive nella via di segnalazione che utilizza con l'IFN di tipo II (γ) (Bach E.A. et al., 1997; Mogensen K.E. et al., 1999).

TYK-2 interagisce con la subunità recettoriale IFNAR-1, e JAK-1 invece con la subunità IFNAR-2 del recettore per l'IFN α/β ; quest'ultima a sua volta si associa con la subunità IFNGR-1 del recettore per l'IFN di tipo II (γ). Invece JAK-2 opera insieme con la subunità IFNGR-2 del recettore per l'IFN di tipo II (γ).

L'attivazione delle JAKs associate al recettore porta alla successiva fosforilazione delle STATs latenti.

Per quanto riguarda l'IFN di tipo I (α/β), le forme fosforilate di STAT-1 e STAT-2, insieme con una ulteriore proteina non-STAT, p48 (anche conosciuta come *interferon regulatory factor 9* o IRF-9), migrano nel nucleo e costituiscono un complesso noto come ISGF-3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*). Il complesso ISGF-3 si lega con un elemento del DNA detto ISRE (*IFN-stimulated response element*). Invece per l'IFN di tipo II (γ) il fattore STAT-1 fosforilato migra nel nucleo e si lega ad un elemento del DNA detto GAS (*gamma-activated sequence*) (Baglioni C. et al., 1979; Bandyopadhyay S.K. et al., 1995; Levy D. E. 1999).

Gli IRFs (*Interferon Regulatory Factors*) appartengono alla famiglia dei regolatori trascrizionali, come le STATs; essi sono dei fattori regolatori molto importanti nella risposta prodotta dall'IFN (Nathan C. 1997).

La famiglia dei fattori IRFs è costituita da 9 diversi membri: IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-4, IRF-5, IRF-6, IRF-7, IRF-8, IRF-9. Questi fattori sono omologhi tra loro nella regione N-terminale. Le IRFs e le STATs possono funzionare insieme ad altri fattori per stabilire eventi di trasduzione del segnale e di regolazione genica che portano all'induzione dell'espressione proteica che va a costituire lo stato antivirale. IRF-9 è stato inizialmente identificato come un componente del complesso trimetrico ISGF-3, così come STAT-1 e STAT-2. Esso è l'unico componente del complesso ISGF-3 per il quale è stato possibile identificare un segnale di localizzazione nucleare (Lau J.F. et al., 2000; John J. et al., 1991). La proteina STAT-2 sembra formare un complesso citoplasmatico con IRF-9 che è trattenuto nel citoplasma in assenza di stimolazione con agenti virali. Le subunità delle proteine STAT sono localizzate nel citoplasma in cellule non trattate ma vengono ampiamente traslocate nel nucleo in seguito a stimolazione. IRF-9, d'altro canto, si trova sia nel nucleo che nel citoplasma di cellule trattate e non trattate. La pre-associazione di IRF-9 con STAT-2 nel citoplasma ha la capacità di bilanciare il complesso per l'attivazione attraverso dimerizzazione con STAT-1. In questo modo si determina una rapida risposta alla segnalazione prodotta dall'IFN di tipo I. IRF-9 sembra anche giocare un ruolo indipendente dall'ISGF-3 nelle risposte mediate dall'IFN- γ (Kimura T. et al.,

1996). IRF-9 e IRF-1 giocano ruoli essenziali ma non ridondanti nella risposta immunitaria prodotta dall'IFN. IRF-1 si lega direttamente all'ISRE trovato nel promotore di alcuni geni regolatori dell' IFN- α/β (Nguyen H. et al., 1997) e gioca un ruolo importante nelle azioni antivirali dell'IFN (Grieder F.B. and Vogel S.N., 1999; Matsuyama T. et al., 1993; Reis L.F.L. et al., 1992) [Figura I-6].

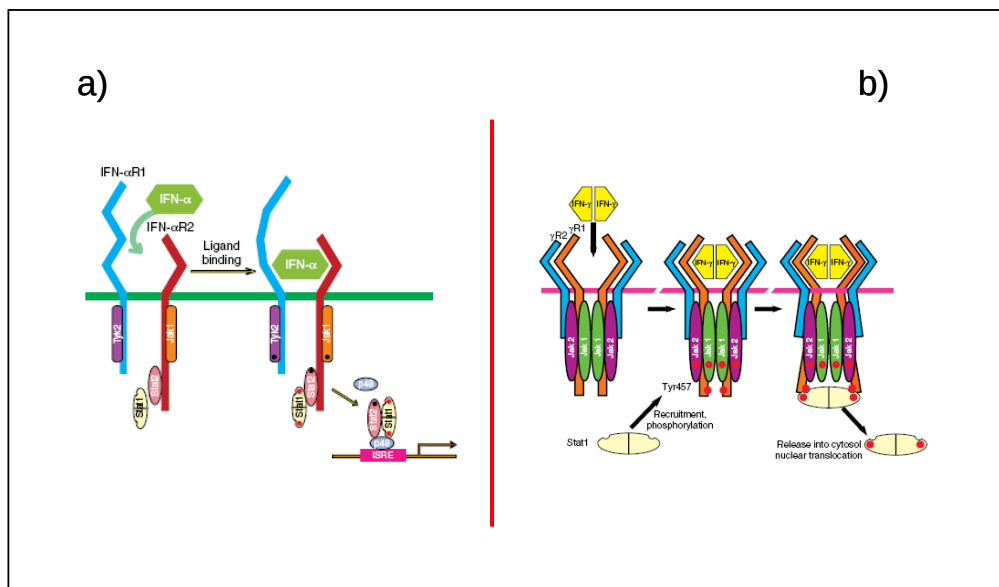


Figura I-6. a) Modello del complesso recettoriale dell'IFN di tipo I.
b) Modello del complesso recettoriale dell' IFN- γ .

1.3 Le proteine antivirali nei Vertebrati

Come si è potuto comprendere da quanto detto in precedenza gli IFNs inducono uno stato antivirale nelle cellule anche attraverso la sintesi di proteine quali: protein chinasi RNA dipendente (PKR), 2',5'-oligoadenilato sintetasi (OAS), adenosina deaminasi RNA specifica (ADAR) e le proteine Mx [Figura 1.7].

La PKR è una protein chinasi RNA dipendente ed indotta dall'IFN (Clemens M. J. and Elia A. al., 1997; Samuel C.E. 1993) conosciuta con diversi nomi, quali: DAI, dsI, P1 chinasi, P1/eIF-2-chinasi; p65, p67, TIK (per gli enzimi murini); p68 o p69 (per gli enzimi umani) (Clemens M. J. et al., 1993). Nelle cellule in cui è stata indotta la sintesi di IFN, PKR è localizzata prevalentemente nel citoplasma e associata con i ribosomi (Pestka S. et al., 1987; Samuel C.E. 1993; Thomis D.C. et al., 1992); comunque una piccola quantità di PKR si trova anche nel nucleo (Jimenez-Garcia L.F. et al., 1993; Thomis D.C. et al., 1992). PKR è attivata mediante autofosforilazione, un processo mediato da dsRNA (Clemens M. J. and Elia A. al., 1997; Proud C.G. 1995; Samuel C.E., 1993). In seguito

alla sua attivazione, PKR catalizza la fosforilazione intramolecolare di almeno sei substrati proteici: la proteina PKR stessa (Thomis D.C. and Samuel C.E., 1993; Thomis D.C. and Samuel C.E., 1995); la subunità del fattore iniziale di sintesi proteica (eIF-2 α) (Samuel C.E. 1979); il fattore che inibisce la trascrizione I κ B (Kumar A. et al., 1994; Offermann M.K. et al., 1995); la proteina Tat codificata dal virus HIV umano (McMillan N.A.J. et al., 1995); la proteina NFAT (Langland J.O. et al., 1999); e la fosfoproteina MPP4 (Patel R.C. et al., 1999). Il fattore di sintesi proteica eIF-2 α è quello maggiormente conosciuto tra i substrati delle PKR sia in termini strutturali che funzionali (Samuel C.E. 2001).

La 2',5'-oligoadenilato sintetasi (OAS) converte l'ATP in oligoadenilati legati al 2' e al 5', attiva la RNasi L per degradare l'mRNA virale (Samuel C.E. 2001).

L'adenosina deaminasi RNA specifica (ADAR) è un enzima in grado di determinare degradazione dell'RNA. L'ADAR catalizza una modificazione covalente dell'RNA attraverso la deaminazione dell'adenosina a inosina (Samuel C.E. 2001).

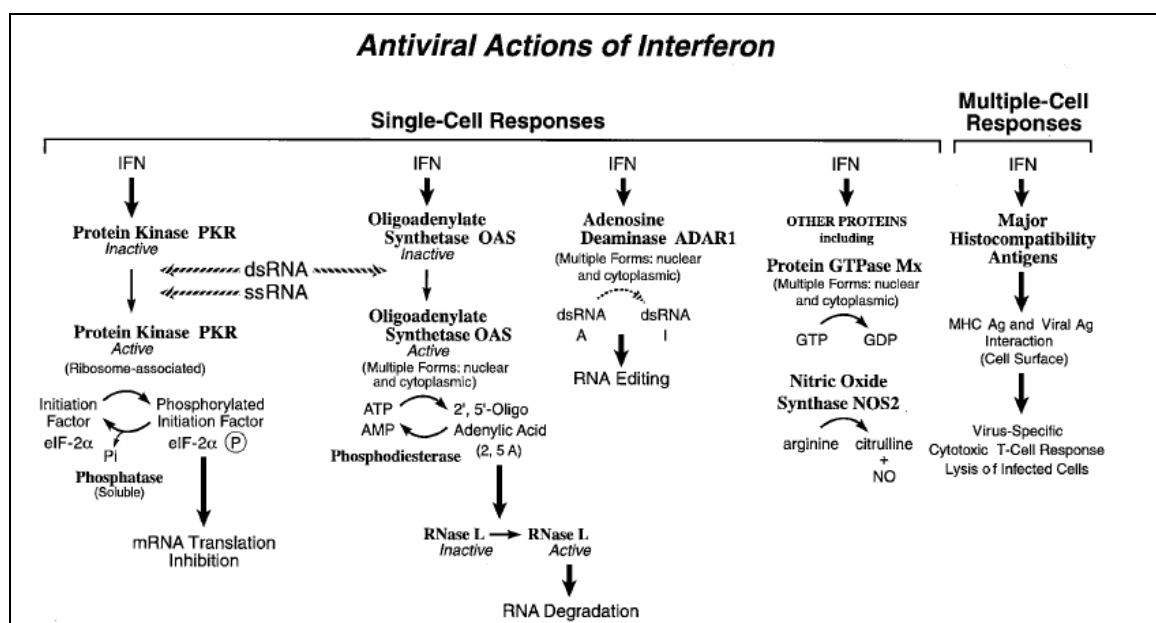


Figura I.7. Funzione delle proteine antivirali.

La Myxovirus resistance (Mx) è una proteina indotta da IFN in grado di prevenire la crescita sia *in vivo* che *in vitro* di certe classi di virus.

Sono GTPasi appartenenti alla superfamiglia delle dinammine con una massa molecolare di circa 80,000 Da, una affinità relativamente bassa per il GTP e un'alta velocità di idrolisi del GTP (Reichelt M. et al., 2004; Arnheiter H. et al., 1996; Haller O. et al., 1998; Horisberger M.A. 1995). Si è ipotizzato che le proteine Mx prevengano la replicazione

virale inibendo il passaggio intracellulare dei nucleocapsidi virali (Haller O and Kochs G., 2002).

L'attività GTPasica è necessaria al fine di determinare l'attività antivirale (Ptossi F. et al., 1993). Le proteine Mx hanno un dominio GTPasico all'N-terminale (Arnheiter H. et al., 1996; Haller O. et al., 1998; Staeheli P. et al., 1993), un “*central interactive domain*” (CID) nella parte centrale, e un dominio effettore con un motivo “*leucine zip*” (LZ) nella regione C-terminale della molecola [Figura 1.8].

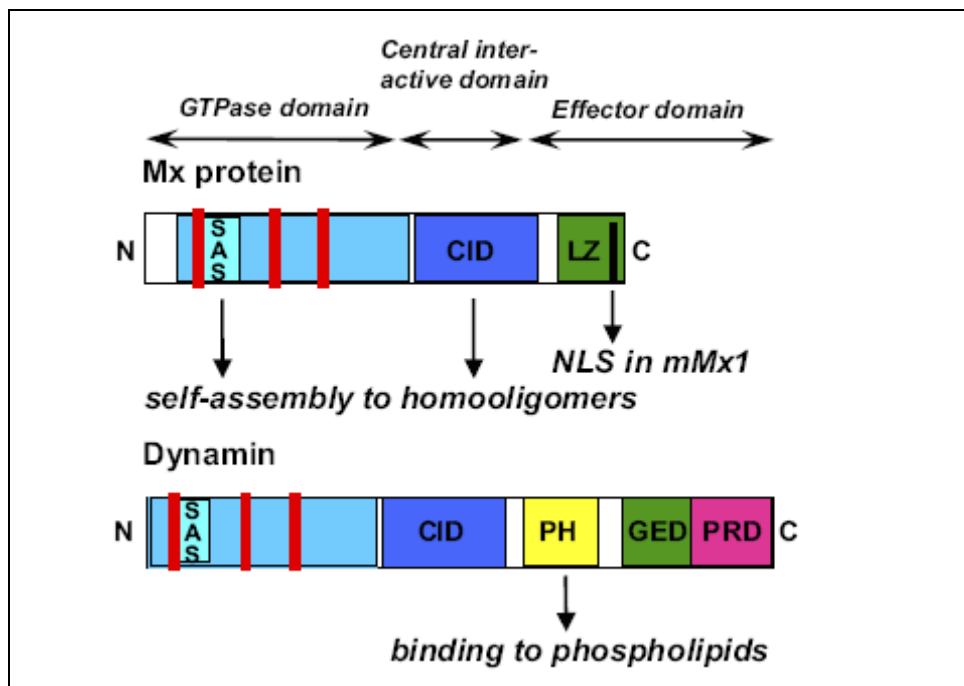


Figura I.8. Diagramma schematico dei domini funzionali delle GTPasi.

La regione N-terminale contiene un motivo di consenso tripartito legante GTP (indicato con le linee rosse nella figura sovrastante) ed esso è altamente conservato mentre la regione C-terminale mostra delle differenze (Kochs G. and Haller O., 1999; Ponten A. et al., 1997). Le proteine Mx non possiedono il dominio PH (*pleckstrin homology domain*) che è coinvolto nei legami di membrana nelle dinammine; possiedono invece un dominio ricco in arginina e prolina (PRD). Un ripiegamento della regione LZ sulla regione CID determina un incremento dell'attività GTPasica, indicando che la regione C-terminale agisce come un dominio effettore GTPasico (GED) (Grimm D. et al., 2007).

Una caratteristica comune di queste GTPasi è la loro abilità nell'assemblarsi in oligomeri altamente ordinati e nel mostrare cooperatività nell'idrolisi del GTP. L'assemblaggio delle proteine Mx sembra essere un punto cruciale per l'attività GTPasica, per la stabilità proteica ed il riconoscimento dei virus.

1.4 Il sistema immunitario dei Teleostei

La risposta innata prevede il riconoscimento del patogeno o della sostanza estranea all'individuo e successivamente una reazione per la sua eliminazione. Un gruppo di cellule molto importanti per quel che riguarda l'immunità innata sono le cellule fagocitiche (monociti, macrofagi e granulociti neutrofili) che riconoscono il patogeno, lo internalizzano ed infine lo distruggono. Essi utilizzano dei sistemi di riconoscimento geneticamente antichi e non specifici, che consentono loro di neutralizzare un'ampia varietà di prodotti microbici agendo come una prima linea di difesa contro le infezioni (Verho S. et al., 2005). La fagocitosi inoltre è coinvolta nell'immunità acquisita per la presentazione da parte di fagociti di antigeni derivanti da patogeni fagocitati e processati da altre cellule del sistema immunitario (Savina A. and Amigorena S., 2007).

L'immunità acquisita o adattativa consiste di una serie di meccanismi di difesa maggiormente evoluti rispetto a quelli dell'immunità innata (barriere fisico-chimiche, alcune proteine ematiche, cellule fagocitiche e natural killer), che vengono stimolati dall'esposizione agli agenti infettivi e che accrescono il loro potenziale difensivo ad ogni successiva esposizione ad un determinato agente patogeno. Le caratteristiche principali dell'immunità acquisita sono una specificità ristretta per le molecole antigeniche, una specializzazione somatica che consente risposte diverse ad antigeni diversi ed una "memoria" che permette una più intensa risposta ad esposizioni ripetute allo stesso agente patogeno ed una maggiore efficienza nell'espressione delle funzioni effettrici (Rocha B. and Tanchot C., 2004). I componenti basilari dell'immunità acquisita sono i linfociti ed il loro prodotto principale: una molecola capace di riconoscere l'antigene che viene o secreta (linfociti B) o esposta sulla membrana (linfociti T). Nei Vertebrati mandibolari e nei Mammiferi, dove il funzionamento del sistema immunitario è maggiormente noto, le risposte adattative immunomodulatorie sono quindi classificabili in due tipi: immunità umorale ed immunità cellulo-mediata.

Le cellule responsabili dell'immunità acquisita umorale sono i linfociti B e i linfociti T helper (Th) produttori di citochine, molecole di tipo ormonale necessarie per la crescita e la differenziazione; invece, l'immunità cellulare consiste di cellule che presentano l'antigene (APC, quali macrofagi, cellule dendritiche, cellule endoteliali, fagociti mononucleati) e di linfociti Th produttori di citochine per l'attivazione dei macrofagi e di linfociti T citotossici (Tc) i quali, come suggerisce il loro nome, uccidono le cellule tumorali, infettate da virus o da altri patogeni endocellulari.

Nell'immunità cellulo-mediata la fase effettrice è avviata dal legame specifico dell'antigene ai linfociti T effettori di memoria, i quali sono quindi localizzati in prossimità delle cellule che recano sulla loro superficie gli antigeni estranei; per questo motivo le reazioni cellulo-mediate sono le più importanti per eliminare batteri o virus che si replicano all'interno delle cellule.

I primi riferimenti riguardo la presenza di un sistema immunitario nei pesci si hanno intorno agli anni '40 (Duff D.C.B. 1942), studi successivi si sono occupati della risposta anticorpale dei pesci ad un antigene virale (Siegel M.M. and Clem L.W., 1965). Nel 1969 è stata riportata la scoperta di attività T-mediate (Leslie G.A. and Clem L.W., 1969), e più tardi quella delle vere e proprie cellule T (Cuchens M.A. and Clem L.W., 1977). Dopo tali studi iniziali, nei Teleostei è stata rilevata la presenza di prodotti d'amplificazione e regolazione leucocitaria. Si è dimostrato, infatti, che supernatanti di leucociti pronefrici di carpa, attivati con fitoemoagglutinina (PHA) contengono un fattore di crescita dei linfociti che induce la proliferazione di linfoblasti purificati (Grondel J.J. and Harmsen E.G., 1984). Negli ultimi venti anni, l'attenzione della ricerca si è rivolta soprattutto verso l'identificazione di marcatori immunitari specifici al fine di poter delineare un profilo sempre più dettagliato dei meccanismi molecolari e delle popolazioni cellulari primariamente coinvolte nella complessa rete di interazioni del sistema immunitario.

Alla luce di quanto appena evidenziato, la produzione ed il conseguente impiego di anticorpi monoclonali diretti contro specifiche popolazioni cellulari ha di molto facilitato la caratterizzazione delle popolazioni leucocitarie presenti in diverse specie di pesci.

Le popolazioni leucocitarie dei Teleostei possono, infatti, essere suddivise in cellule B (Irwin M.J. and Kaattari S.L., 1986; Miller N.W. et al., 1994a; Koumans-Van Diepen J.C.E. et al., 1994), cellule T (Lin G.L. et al., 1992; Miller N.W. et al., 1994b), granulociti (Bly J.E. et al., 1990; Ainsworth A.J. 1992; Hine P.N. et al., 1992; Slierendrecht W.J. et al., 1995; Verburg-Van Kemenade B.M.L. et al., 1995), trombociti (Esteban M.A. et al., 1989; Rombout J.H.W.M. et al., 1996), macrofagi (Meseguer J. et al., 1991; Hardie L.J. et al., 1994; Sveinbjørsson B. and Seljelid R., 1994) e cellule citotossiche non specifiche (Evans D.L. and Jaso-Friedmann L., 1992; Hogan R.J. et al., 1996).

Fino ad oggi sono stati prodotti anticorpi monoclonali contro le immunoglobuline e le cellule B di numerose specie come la carpa, *Cyprinus carpio* (Koumans-Van Diepen J.C.E. et al., 1994; Koumans-Van Diepen J.C.E. et al., 1995); il pesce gatto, *Ictalurus punctatus* (Miller N.W. et al., 1987; Lobb C.J. and Olson M.O.J., 1988); il merluzzo, *Gadus morhua* (Israelsson O. et al., 1991); l'anguilla, *Anguilla anguilla* (Van der Heijden

M.H.T. et al., 1995); il rombo, *Scophthalmus maximus* (Estévez J. et al., 1994); il salmone, *Salmo salar* (Thuvander A. et al., 1990); la trota, *Oncorhynchus mykiss* (Sanchez C. and Dominiguez J., 1991) e la spigola, *Dicentrarchus labrax* (Scapigliati G. et al., 1995; Romestand B. et al., 1995; Palenzuela O. et al., 1996; Dos Santos N.M.S. et al., 1997).

Parecchi di questi anticorpi monoclonali riconoscono la catena pesante delle Ig mentre solo alcuni sono stati sviluppati contro la catena leggera. Uno di questi anticorpo monoclonali in grado di legare la catena leggera delle Ig (DLIg3) è stato impiegato per l'analisi citofluorimetrica della distribuzione di cellule in grado di produrre anticorpi nella spigola. L'analisi ha dimostrato che DLIg3 è presente nel 21% di leucociti del sangue periferico, nel 3% di timociti, nel 30% di splenociti, nel 33% di leucociti da rene cefalico e nel 2% di GALT (Romano N. et al., 1997); questa evidenza è stata confermata da Dos Santos nel 2001 (Dos Santos N.M.S. et al., 2001) e ciò ha messo in risalto che rene cefalico e milza sono i principali organi deputati alla produzione di anticorpi specifici nella spigola (Chistiakov D. A. et al., 2007).

L'immunoprecipitazione con anticorpi monoclonali DLIg3 specifici per le immunoglobuline e le cellule B è stata impiegata per arricchire cellule immunoreattive del sangue periferico, di milza, e di rene cefalico di linfociti B (fino al 77% di leucociti). Le cellule DLIg3 purificate mostrano un'espressione maggiore del gene Ig specifico per le cellule B e un'espressione minore del gene TcR specifico per le cellule T, ciò sta ad indicare quindi un maggiore arricchimento delle cellule B nelle frazioni purificate (Scapigliati G. et al., 2003).

Al contrario, per poche specie sono stati prodotti anticorpi monoclonali diretti contro timociti o cellule putative T; attualmente sono disponibili anticorpi monoclonali contro timociti di carpa, *Cyprinus carpio*, (Yamaguchi K. et al., 1996; Rombout J.H.W.M. et al., 1997) e di ricciola, *Seriola quinqueradiata*, (Nishimura H. et al., 1997). Tali anticorpi non sono specifici per le cellule T periferiche, poiché cross-reagiscono anche con altre popolazioni leucocitarie. I soli anticorpi specifici per timociti e cellule putative T di Teleostei sono disponibili per la spigola DLT15 (Scapigliati G. et al., 1995), il pesce gatto (Passer B.J. et al., 1996) e la carpa WLC38 (Rombout J.H.W.M. et al., 1998).

L'anticorpo monoclonale DLT15, specifico per timociti e cellule T periferiche, è in grado di riconoscere antigeni specifici nelle cellule viventi e in sezioni di tessuto (Scapigliati G. et al., 1995). Il suo impiego nell'immunoistofluorescenza (IIF) e nell'analisi citofluorimetrica dei leucociti ha permesso di fornire la prima valutazione sul contenuto di cellule T in un pesce; 3% nel PBL, 9% negli splenociti, 4% nelle cellule di rene cefalico,

75% nei timociti, 51% nel GALT e 60% nel tessuto linfoide associato alle branchie (Romano N. et al., 1997). DLT15 è stato usato in immunocitochimica per mostrare per la prima in un Teleosteo una attività *in vivo* delle cellule T, per questo esperimento sono stati trapiantati segmenti di muscolo su pesci recipienti allogeni (Abelli L. et al., 1999). L'analisi immunocitochimica con DLT15 dei muscoli allotrapiantati e rigettati di spigola ha mostrato che la maggior parte delle cellule nel tessuto erano DLT15 positivi.

L'anticorpo monoclonale WCL38 (contro cellule T intestinali di carpa) è stato prodotto mediante immunizzazione di topi con molecole di membrana isolate da cellule linfoidi intestinali intraepiteliali di carpa. L'analisi citofluorimetrica mostra come il WCL38 reagisca con il 50-70% delle cellule linfoidi isolate da intestino, branchie o pelle; con meno del 6% delle cellule linfoidi isolate da timo, rene cefalico o milza e con un numero trascurabile di PBL. L'analisi immunochimica ha mostrato che il WCL38 reagisce con una molecola di membrana dimerica sulle cellule linfoidi mucosali. E' stato dimostrato che le cellule linfoidi WCL38 positive sono effettivamente delle cellule T in quanto non reagiscono con cellule B, macrofagi o cellule citotossiche non specifiche. Quindi, come avviene per i Vertebrati Superiori, anche spigola e carpa sembra abbiano una popolazione distinta di cellule putative T nei loro tessuti mucosali (Rombout J.H. et al., 1998; Randelli E. et al., 2008).

Evidenze sperimentali hanno mostrato, inoltre, che il Tessuto Linfoide Associato all'Intestino (GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) dei Teleostei contiene un elevato numero di cellule T (Abelli L. et al., 1997), com'è stato confermato dall'analisi delle sequenze dei cDNA ottenuti a partire da RNA isolati da cellule dell'intestino. I cDNA sono stati impiegati come stampo in reazioni di amplificazione utilizzando primers specifici per la catena β del Recettore delle Cellule T (TcR) ed hanno mostrato un fenotipo $\alpha\beta$ (Scapigliati G. et al., 2000). E' stato suggerito che la presenza di tale popolazione cellulare potrebbe rappresentare il primo passo verso l'evoluzione del sistema adattativo mucosale (Matsunaga T. 1998).

Il complemento è responsabile per la mediazione delle risposte infiammatorie, l'opsonizzazione delle particelle e la lisi della membrana cellulare. Il terzo componente della serie del complemento (C3) è l'elemento chiave del sistema; è presente in tutti i vertebrati e la sua attivazione può seguire la via alternativa (anticorpo-indipendente) o quella classica (anticorpo-dipendente). Il sistema del complemento dei Teleostei è essenzialmente simile a quello dei Vertebrati Superiori.

Nei Teleostei sono state scoperte diverse isoforme del complemento individuate come C3, C5, C7 e C8 in trota *Oncorhynchus mykiss* (Sunyer J.O. et al., 1996; Franchini S. et al., 2001; Zarkadis I.K. et al., 2005; Kazantzi A. et al., 2003), C4 in *Fugu rubripes* (Sambrook J.D. et al., 2003). La trota possiede entrambe le vie del complemento e componenti che sono strutturalmente e funzionalmente simile al C3 e C5 dei mammiferi (Nonaka M. et al., 1981; Koppenheffer T.L. 1987).

Oltre alla caratterizzazione di sequenze geniche per il complemento sono stati eseguiti studi *in vivo* per testare la sua attività, e sono stati preparati inoltre alcuni anticorpi diretti contro subunità specifiche (Boshra H. et al., 2001).

Nei Teleostei, come nei Mammiferi, il complesso maggiore di istocompatibilità o MHC è costituito da:

- Complesso maggiore di istocompatibilità di classe I o MHC I
- Complesso maggiore di istocompatibilità di classe II o MHC II

Sia il gene MHC I che il gene MHC II originariamente erano localizzati sullo stesso cromosoma nei teleostei più antichi ma si sono separati in un teleosteo progenitore piuttosto recente ed ora sono localizzati su due cromosomi differenti (Mannie M.D. 2001). La funzione di queste molecole è quella di identificare antigeni estranei alle cellule T. L'interazione tra il complesso MHC/peptide antigenico (pMHC) ed il TcR sulla superficie dei linfociti T porta al riconoscimento del peptide e successivamente all'induzione della risposta immunitaria contro l'antigene presentato (Mannie M.D. 2001). L' MHC I è responsabile per la presentazione di antigeni endogenamente derivati dalle CTK (cytotoxic T killers) e media le risposte immunitarie antivirali e anticancerose. L'MHC II interagisce con peptici antigenici esogeni, li presenta ai linfociti T helper, e partecipa all'induzione della risposta immunitaria contro batteri patogeni e parassiti (Watts C. 1997).

Queste proteine sono costituite da 4 domini extracellulari, 2 dei quali sono prossimali alla membrana, appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline (Ig) e 2 dei quali distali alla membrana che formano la regione che lega il peptide (PBR) (Bjorkman P.J. et al., 1987). Il PBR lega il peptide antigenico che poi verrà presentato alle cellule T mediante l'interazione con il TcR. Sia l'MHC I sia l'MHC II sono altamente polimorfici, particolarmente nella regione che codifica per il PBR (Chistiakov D.A. et al., 2007). L'espressione dell'MHC II è ristretta solo alle cellule B, alle cellule che presentano l'antigene (macrofagi, cellule dendritiche, etc.) ed al timo (Margulies D.H. 1999; Buonocore F. et al., 2007a) nei Teleostei.

Le cellule T sono i principali effettori della difesa immunitaria cellulo-mediata, riconoscono e rispondono ai peptidi antigenici associati con le molecole MHC I e MHC II.

Il TcR, che come detto in precedenza è un recettore per gli antigeni prodotto dalle cellule T, è un eterodimero costituito dalle catene α/β e γ/δ ed ogni catena contiene un dominio costante (C) e un dominio variabile (V) (Lefranc M.P. and Lefranc G., 2001). Il TcR è presente in tutti i Vertebrati Mandibolati mentre sembra essere assente nei Pesci non Mandibolati (Klausner R.D. et al., 1990). Geni per il TcR α/β sono stati caratterizzati nei Pesci Teleostei e nei Pesci Cartilaginei (Partula S. et al., 1995; Hordvik I. et al., 1996; De Guerra A. and Charlemagne J., 1997; Wilson M.R. et al., 1998; Miracle A.L. et al., 2001; Wermenstam N.E. and Pilstrom L., 2001; Hordvik I. et al., 2004; Imai E. et al., 2005). La passera giappone (*Paralichthys olivaceus*) è stata la prima specie in cui sono stati identificati 4 loci TcR (Nam B.H. et al., 2003).

CD8 e CD4 sono glicoproteine co-recettrici delle cellule T che partecipano al riconoscimento antigenico mediante interazioni con regioni non polimorfiche rispettivamente dell' MHC I e dell'MHC II (Salter R.D. et al., 1990; König R. et al., 1992; Cammarota G. et al., 1992). Le cellule T che esprimono la molecola CD4 hanno prevalentemente fenotipo helper e sono quindi i linfociti T helper in quanto aiutano i linfociti B a produrre anticorpi ed i fagociti a distruggere i microbi inglobati. Le cellule T invece esprimono la molecola CD8 hanno fenotipo citotossico e sono quindi i linfociti T citotossici (CTL) in quanto uccidono le cellule che albergano microbi intracellulari; in altre parole, essi uccidono altre cellule (Germain R.N. 2002).

Il co-recettore CD4 è una glicoproteina transmembrana a singola catena che si lega all'MHC II. Il complesso CD4/MHC II che si forma migliora la segnalazione mediata dal TcR. Le regioni polimorfiche dell'MHC interagiscono con il TcR mentre la regione non-polimorfica interagisce con il co-recettore stesso (Buonocore F. et al., 2008). Esso è stato trovato nei timociti e nelle cellule T helper (Parnes J.R. 1989), come mostrato in parecchie specie di uccelli e mammiferi (Koskinen R. et al., 1999; Clark S.J. et al., 1987; Classon B.J. et al., 1986; Fomsgaard A. et al., 1992; Maddon P.J. et al., 1985; Milde K.F. et al., 1993; Romano T.A. et al., 1999). La proteina CD4 è costituita da 4 domini immunoglobulinici extracellulari, una regione trans membrana e una coda citoplasmatica che si associa con una proteina tirosin-chinasi, $p56^{lck}$, coinvolta nell'attivazione delle cellule T.

Il CD8 è un co-recettore di membrana delle cellule T che si lega all'MHC I e media l'induzione della risposta immunitaria antivirale (Garcia K.C. et al., 1999). Il CD8 consiste

di due subunità α e β codificate da due distinti geni (Littman D.R. et al., 1985), può essere espresso nell'uomo e nel topo come omodimeri $\alpha\alpha$ o eterodimeri $\alpha\beta$. Sia la catena α sia la catena β sono costituite di un dominio variabile (V) extracellulare, una regione di membrana prossimale, un dominio transmembrana e una coda citoplasmatica C-terminale responsabile per la trasduzione del segnale intracellulare. Timociti e linfociti T maturi esprimono principalmente molecole CD8 eterodimeriche (Parnes J.R. 1989), mentre l'omodimero è presente solo nei sottoinsiemi delle cellule natural killer (NK), linfociti intraperitoneali intestinali (IEL) e un sottoinsieme di cellule dendritiche (Nagarajan U.M. et al., 2004). Reazioni citotossiche ed equivalenti cellulari di cellule citotossiche CD8⁺ sono state segnalate nei pesci (Fischer U. et al., 2003) ed il gene CD8 α è stato clonato in parecchie specie di pesci teleostei (Pinto R.D. et al., 2006; Moore L.J. et al., 2005; Randelli E. et al., 2006; Buonocore F. et al., 2006b). Di recente è stato prodotto un anticorpo monoclonale CD8 α nel pesce palla (*Takifugu rubripes*) (Araki K., et al., 2008).

Una fondamentale classe di molecole coinvolte nel sistema immunitario è quella delle citochine che svolgono un ruolo centrale nei sistemi di difesa sia innato che acquisito. L'elevato grado di conservazione delle loro proprietà tra i vari gruppi animali indica come tali proteine siano fattori altamente conservati nel corso dell'evoluzione. Esse certamente sono apparse presto durante lo sviluppo evolutivo dei Vertebrati, circa 400 milioni di anni fa; molte evidenze hanno confermato la presenza di queste molecole nei pesci cartilaginei, che rappresentano il più antico gruppo mostrante un reale sistema immunitario funzionante come quello conosciuto per i mammiferi. Gli studi condotti, specialmente sui Teleostei, hanno confermato la presenza nei pesci di omologhi funzionali delle citochine di mammifero (Secombes C.J. et al., 1996).

Nei mammiferi le cellule fagocitiche rispondono ad antigeni microbici rilevati nel sito d'infezione, con la secrezione di citochine tra le quali il TNF- α , interleuchina-1 (IL-1), IL-6 ed una chemochina CXC, IL-8. Il TNF- α , l'IL-1 e l'IL-6 mostrano ridondanti e pleiotropici effetti che prevedono l'induzione della sintesi delle proteine della fase acuta (APP), l'attivazione dell'endotelio vascolare per permettere una maggiore permeabilità vascolare ed il potenziamento dell'extravasazione cellulare, la stimolazione dei macrofagi, la proliferazione dei fibroblasti e l'attivazione delle cellule B e T.

L'*Interleuchina-1 β* (IL-1 β) della spigola, in particolare, è stata per diverso tempo studiata nel laboratorio dove ho svolto la tesi di Dottorato (Scapigliati G. et al., 2001; Forlenza M. 2002; Randelli E. 2002; Buonocore F. et al., 2004 e 2005 a, b; Scapigliati G. et al., 2004).

L'IL-1 è una citochina pro-infiammatoria costituita da due diverse proteine, IL-1 α e IL-1 β , che secondo molti studi hanno un'attività biologica indistinguibile. Le molte e diverse (pleiotropismo) attività biologiche dell'IL-1 sono state estesamente studiate nei Mammiferi (Dinarello C.A. 1997). L'IL-1 è il principale iniziatore delle risposte immuni e infiammatorie (Dinarello C.A. 1997), le cui attività prevedono, tra le altre, la crescita e la differenziazione delle cellule B, delle cellule T (Smith K.A. et al., 1980) e delle cellule natural killer (Kullberg B.J. and Van der Meer J.W.M., 1995), e la stimolazione dei macrofagi a secernere mediatori solubili pro-infiammatori quali citochine (IL-2 e IL-6) e prostaglandine. I suoi effetti nei Mammiferi includono: la febbre, l'incremento delle metastasi e della risposta epatica nella fase acuta, l'angiogenesi e la proliferazione dei fibroblasti e dei timociti. Nei Teleostei, geni relativi dell'IL-1 β sono stati clonati in molte specie tra le quali: trota (Zou J. et al., 1999a; 1999b), platessa, *Pleuronectes platessa*, (Bird S. et al., 1998), carpa (Engelsma M.Y. et al., 1999; Fujiki K. et al., 2000), orata, *Sparus aurata*, (Pelegrin P. et al., 2000), squalo, *Scyliorhinus caniculus*, (Bird S. et al., 1999).

L'*Interleuchina-4* (IL-4) è una citochina molto importante nelle risposte immunitarie Th2 mediate, essa determina la regolazione di molte citochine come ad esempio IFN- γ , IL-1 e TNF- α . Riguardo l'IL-4 molto lavoro è stato fatto in uomo ed in altre specie di mammifero ma poco nei pesci. In un recente lavoro è stato clonato e caratterizzato il gene che codifica per IL-4 in *Tetraodon nigrovirides*, esso consiste in 4 esoni e 3 introni, la stessa organizzazione che mostra questo gene nei mammiferi e negli uccelli (Li J.H. et al., 2007). E' stata ottimizzata una RT-PCR per stabilire i livelli di espressione di questa citochina nel *Tetraodon nigrovirides* ed i risultati hanno mostrato che IL-4 è costitutivamente espressa in tutti i tessuti analizzati, inclusi rene cefalico, milza, fegato, cervello, branchie, muscolo, cuore, e che in rene cefalico, milza e fegato i livelli risultano piuttosto bassi. Stimolando i pesci con una miscela di mitogeni costituita da concavalina A (ConA), fitoemoagglutinina (PHA), e forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) si è visto che l'espressione era significativamente aumentata in molti dei tessuti presi in esame. Tale risultato indica come IL-4 sia coinvolta nella risposta all'infiammazione indotta da mitogeni. Questo è l'unico lavoro riguardante IL-4 nei teleostei. Al momento non ci sono anticorpi disponibili per questa citochina.

L'*Interleuchina-10* (IL-10) è una citochina regolatoria, molto studiata nei mammiferi, principalmente coinvolta nella soppressione o disattivazione delle risposte immunitarie attivate (Moore K.W. et al., 1993; Moore K.W. et al., 2001; Mosmann T.R. et al., 1994). L'IL-10 regola la crescita, la differenziazione e la funzione di una varietà di cellule

immunitarie includendo i linfociti T e B, NNC e i macrofagi. L'IL-10 è prodotta dai macrofagi (Barnes P.F. et al., 1992) e dalle cellule T-helper 2 e dalle cellule T regolatorie (TR) (Mosmann T.R. and Moore K.W., 1991; Street N.E. and Mosmann T.R., 1991; Ding Y.Z. et al., 2003). IL-10 svolge un ruolo molto importante nell'infiammazione (Bogdan C. et al., 1991) inibendo alcune attività dei macrofagi (Fiorentino D.F. et al., 1991; Cunha F.Q. et al., 1992) e nella produzione di alcune citochine (deWaal Malefyt R. et al., 1993). Il gene IL-10 è stato recentemente scoperto nel genoma del fugu (*Fugu rubripes*) (Zou J. et al., 2003) ed il cDNA è stato clonato in differenti specie di pesci (Savan R. et al., 2003; Inoue Y. et al., 2005; Zhang D.C. et al., 2005; Pinto R.D. et al., 2007; Buonocore F. et al., 2007b). Nessun tipo di marker anticorpale è attualmente disponibile per l' IL-10 nei pesci teleostei.

L'*interleuchina-12 (IL-12)* è una citochina molto importante nell'induzione della risposta infiammatoria prodotta da antigeni batterici, fungini e da protozoi. Essa viene secreta dai macrofagi, dai neutrofili e dalle cellule dendritiche, sebbene i linfociti B siano anche in grado di produrre questa citochina. Nella risposta immunitaria, l'IL-12 stimola la proliferazione e l'attivazione dei linfociti T e delle cellule natural killer (NK) ed induce la produzione di IFN- γ attraverso queste cellule e media la differenziazione delle cellule T native in cellule T helper tipo 1. Questa citochina migliora anche l'attività citotossica delle cellule NK e dei linfociti T citotossici (Stern A.S. et al., 1996). L'IL-12 funzionale è costituita da un eterodimero composto da due subunità legate covalentemente: una catena da 35-kDa chiamata IL-12 p35 e una da 40-kDa chiamata IL-12 p40 (Kobayashi M. et al., 1989). In spigola sono state identificate sequenze corrispondenti a IL-12 p35 (DQ388037 e DQ388038) e IL-12 p40 (DQ388039 e DQ388040) (Nascimento D.S. et al., 2007).

L'*interleuchina-15 (IL-15)* gioca un ruolo importante nel sistema immunitario adattativo nei vertebrati con bioattività simile a quella dell'IL-2. Questa citochina è stata studiata nell'uomo e negli altri mammiferi ma non è molto nota nei pesci teleostei. Sequenze geniche di IL-15 sono state identificate in *Danio rerio* (AB194244, AB194243 e AB196454), *Oncorhynchus mykiss* (AJ555868) e *Tetraodon nigroviridis* (AY374511) (Jaillon O. et al., 2004). Nessun tipo di marker anticorpale è attualmente disponibile per l' IL-15 nei pesci.

Sull'*interleuchina-2 (IL-2)* attualmente sono poche le conoscenze a disposizione sulle caratteristiche immunochemiche e sulle popolazioni cellulari in grado di rispondere a questa importante molecola. Essa non è stata ancora identificata e clonata in nessuna specie di pesce teleosteo. Da studi condotti sul pesce gatto, *Ictalurus punctatus* (Sizemore

R.G. et al., 1984; Lin G.L. et al., 1992; Miller N.W. et al., 1994b), sulla carpa, *Cyprinus carpio* (Koumans-Van Diepen J.C.E. et al., 1994; Verburg-van-Kemenade B.M.L. et al., 1998), e sulla trota, *Oncorhynchus mykiss* (Tillitt D.E. et al., 1988; Graham S. and Secombes C.J., 1990) è stato evidenziato che IL-2 è coinvolta nelle proliferazioni cellulari (LPR). Infatti le cellule IgM⁺ sviluppano una risposta proliferativa se stimolate con lipopolisaccaride (LPS) ma non in seguito a stimolazione con fitoemoagglutina (PHA). Le cellule IgM⁻ invece mostrano LPR in seguito a stimolazione con PHA e non in seguito a stimolazione con LPS (Sizemore R.G. et al., 1984; Koumans-Van Diepen J.C.E. et al., 1994). Come nei Vertebrati superiori, la stimolazione dei leucociti di pesci con PHA determina la secrezione di un fattore di crescita che sembra avere attività simile all'IL-2 (Caspi R.R. and Avtallion R.R., 1984; Grondel H. et al., 1984). Comunque non ci sono evidenze che questo fenomeno sia mediato dalle cellule T come avviene nei Mammiferi.

L'*interleuchina-21* (IL-21) è membro della famiglia dell' IL-2 ed impiega la subunità recettoriale gamma (*γ-chain receptor subunit*) per la trasduzione del segnale. Nell'uomo e nei mammiferi IL-21 è prodotta sia dalle cellule Th1 sia da quelle Th2 e la sua produzione è modulata da diverse citochine quali IFN- α e IL-21 stessa. Questa citochina è una delle più importanti coinvolte nel sistema immunitario per gli effetti pleiotropici sui linfociti T e B, sulle cellule natural killer (NK) e sulle cellule dendritiche. Essa può promuovere l'apoptosi di cellule B a riposo e impropriamente attivate, regola la produzione delle IgG, ed inibisce la sintesi delle IgE attraverso IL-4. Mentre nei mammiferi è stata ben caratterizzata poco si sa circa la sua esistenza e le sue funzioni immunologiche nei pesci ossei. Recentemente una IL-21 è stata identificata nel *Takifugu rubripes* basandosi sulle caratteristiche genomiche comparate tra il genoma umano e quello del fugu (Bird S. et al., 2005; Bei J.X. et al., 2006). Inoltre IL-21 è stata recentemente clonata in *Tetraodon nigrovirides*. Studi di espressione *in vivo* hanno mostrato che mRNAs di IL-21 in *Tetraodon nigrovirides* sono costitutivamente espressi a bassi livelli e solo in alcuni organi (intestino, branchie e gonadi) mentre in seguito a stimolazione con LPS si osserva un aumento dell'espressione di IL-21 in questi organi e l'induzione dell'espressione anche in rene cefalico, milza e pelle: ciò ad indicazione del fatto che IL-21 è un gene inducibile da stress infiammatorio associato con la difesa antibatterica nei pesci (Wang H.J. et al., 2006). Al momento non sono presenti markers anticorpali per IL-21 nei pesci.

Attraverso la comparazione genomica tra uomo e pesci, l'*interleuchina-22* (IL-22) e l'*interleuchina-26* (IL-26) sono state isolate nei pesci. IL-22 e IL-26 sono stati identificati per la prima volta al di fuori dei mammiferi e la loro organizzazione dimostra che questo

cluster di citochine è ben conservato durante l'evoluzione. Entrambe sono state clonate nel pesce zebra, *Danio rerio*. L'analisi d'espressione dei geni IL-22 e IL-26 indica un ruolo attivo di questi geni nelle risposte immunitarie nei pesci. Il gene IL-22 è costitutivamente espresso nell'intestino e nelle branchie di pesci trattati con LPS e poly I:C e non trattati, è anche espresso nel rene cefalico e nella milza in seguito a trattamento con LPS e Poly I:C. Invece il gene IL-26 è espresso solo nell'intestino in seguito a trattamento con Poly I:C e non vi è espressione negli altri tessuti testati (Igawa D. et al., 2006; Stein C. et al., 2007). Al momento non sono presenti markers anticorpali per queste citochine nei pesci.

Un'altra componente importante del sistema immunitario è la cicloossigenasi-2 (COX-2). Nei Teleostei è stata clonata in spigola, *Dicentrarchus labrax* (Buonocore F. et al., 2005a). Questo enzima, la cui espressione nei monociti e macrofagi dei pesci potrebbe essere indotta in risposta alla stimolazione da parte di batteri antigenici (Brubacher J.L., et al., 2000), partecipa negli eventi precoci della reazione proinfiammatoria catalizzando i primi due steps nella sintesi dei prostanoidi. I prostanoidi (prostaglandine, leucotrieni e lipossine) sono metaboliti dell'acido arachidonico che mediano segnali proinfiammatori e apoptotici. Il clonaggio e l'espressione della ciclossigenasi-2 in spigola (*Dicentrarchus labrax* L.) è stato argomento della mia tesi di laurea (Casani D. 2004).

I peptidi antibatterici (AMPs) sono molto diffusi in natura e sono considerati dei componenti ancestrali nell'evoluzione dell'immunità innata; ad essi è riconosciuto un ruolo chiave nelle prime linee di difesa contro l'infezione prodotta da patogeni differenti (Mulero I. et al., 2008). La maggior parte degli AMPs mostrano un'elevata attività antimicrobica, proprietà cationiche, e struttura secondaria antipatica (Lauth X. et al., 2002; Hwang P.M. and Vogel H.J., 1998). Essi sono stati scoperti inizialmente come molecole con una specifica attività antimicrobica, ma recentemente è divenuto evidente che molti di questi peptidi sono dotati di duplice funzione. Oltre alle loro proprietà antibatteriche essi spesso hanno attività immunitarie modulatorie sia nell'immunità innata e sia nell'immunità adattativa (Brown K.L. and Hancock R.E., 2006). I geni codificanti per questi peptidi sono espressi in molti tessuti e tipi cellulari in un'ampia varietà di specie inclusi mammiferi, anfibi, insetti e pesci (Jenssen H. et al., 2006).

Molti AMPs sono stati descritti in numerosi organismi acquatici: defensina (Hubert F. et al., 1996), mitomicina (Charlet M. et al., 1996), miticina (Mitta G. et al., 1999) e miticina (Mitta G. et al., 2000 a, b) nei mitili; peneidina (Destoumieux D. et al., 2000; Kang C.J. et al., 2004) nei gamberetti; tachiplesina e polifemusina nei granchi (Miyata T. et al., 1989); clavanina (Lee I.H. et al., 1997a) e stielina nelle ascidie (Lee I.H. et al.,

1997b); misgurina (Park C.B. et al., 1997), pleurocidina (Cole A.M. et al., 1997), moronecidina (Lauth X. et al., 2002), paradasina (Adermann K. et al., 1998), epicidina (Douglas S.E. et al., 2003), AMPs intestinali delle missine (Oren Z. and Shai Y.A., 1996) e parasina nei pesci (Park I.Y. et al., 1998). Inoltre molti AMPs sono stati identificati nei Teleostei. Nei Salmonidi 2 famiglie sono state identificate dal salmone (*Salmo salar*) (Douglas S.E. et al., 2003) e dalla trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Zhang Y.A. et al., 2004). Nei Perciformi 2 famiglie sono state isolate dal *Morone saxatilis* e dal *Morone chrysops* (Lauth X. et al., 2002). Nei Pesci gli AMPs sono localizzati prevalentemente nei granulociti circolanti ed in molti tessuti compreso il rene cefalico (Robert E. et al., 1999; Smith V.J. et al., 2000; Sarmiento A. et al., 2004; Bennani N. et al., 1995).

La dicentracina è stata isolata da granulociti di rene cefalico in spigola, *Dicentrarchus labrax* (GenBank AY303949; Salerno G. et al., 2007).

L'epicidina (GenBank DQ131605) è stata isolata dal fegato della spigola, *Dicentrarchus labrax* (Rodrigues P.N. et al., 2006). La sequenza genica nei Vertebrati è altamente conservata (Lauth X. et al., 2005). L'epicidina è espressa a bassi livelli. Questo peptide è cationico e adotta una struttura anfipatica in soluzione e così ha la capacità di interagire o distruggere la membrana batterica come i peptici lineari o α -elica. La sua duplice funzione risulta preservata nei Vertebrati; nei Mammiferi essa gioca un importante ruolo nella omeostasi del ferro. Mutazioni nel gene umano mostrano un'associazione con la chemocromatosi, un disordine autosomico recessivo (Roetto A. et al., 2003).

Le chemochine sono una famiglia di piccole proteine inducibili pro-infiammatorie che dirigono la migrazione e l'attivazione di specifici tipi cellulari mediante l'interazione con i loro recettori. Le diverse classi di chemochine vengono divise in base alla disposizione lungo la sequenza dei residui di cisteina (Baggiolini M. 1998). Nella classe delle chemochine CXC (o chemochine α), il cui prototipo è l'IL-8, le prime due cisteine nel tratto N-terminale sono separate da un singolo aminoacido, mentre non è presente nessun residuo intermedio tra le due cisteine nelle chemochine della classe CC (o chemochine β). I recettori delle chemochine appartengono ad una classe ben nota di proteine transmembrana definite anche "serpentine" o recettori multipasso che presentano sette domini transmembrana e sono accoppiati a proteine-G intracellulari. Ci sono evidenze che mostrano che vi è una considerevole ridondanza nelle interazioni chemochina – recettore: la maggior parte dei recettori può legare più di una chemochina e viceversa. Nei pesci teleostei sono state clonate alcune chemochine e loro recettori: queste includono, omologhi delle chemochine CC nella trota *Oncorhynchus mykiss* (CK-1) (Dixon B. et al., 1998), e

nella carpa, *Cyprinus carpio* (Fijiki K. et al., 1999), il recettore delle chemochine CC, CCR7 (Daniels G.D. et al., 1999) ed i recettori delle chemochine CXC, IL-8R (Nam B.H. et al., 2000), CXCR4 (Fijiki K. et al., 1999; Daniels G.D. et al., 1999) e CXCR1/CXCR2 (Fijiki K. et al., 1999) nella carpa, *Cyprinus carpio*.

Altri agenti solubili non-specifici del sistema immunitario dei pesci sono: il *lisozima*, un enzima trovato nel siero, nel muco e nelle uova, che agisce sul peptidoglicano (componente della parete cellulare batterica, specialmente dei batteri Gram-positivi), causandone la lisi; la *proteina C-reattiva*, una proteina comunemente presente nel siero, ma che può aumentare significativamente dopo l'esposizione all'endotossina batterica, andandosi a legare alla superficie batterica per poi provocare l'attivazione del complemento (Nakanishi Y. et al., 1991); le *lectine*, proteine o glicoproteine di origine non-immune, caratterizzate dalla loro interazione con i carboidrati e coinvolte nell'agglutinazione dei microrganismi o nella precipitazione di sostanze solubili (Yano T. 1996).

1.5 Struttura e funzione dei tessuti linfoidei nei Teleostei

1.5.1 Prima linea di difesa

La prima barriera per l'ingresso dei patogeni nei pesci è rappresentata dall'epidermide: i pesci possono avere squame, spine o secrezioni tossiche, ma un ruolo fondamentale è svolto dal muco che permette lo scivolamento di materiale indesiderato e che, come il muco delle branchie e dell'intestino, contiene una varietà di sostanze antimicrobiche come il lisozima, il complemento, la proteina C-reattiva, le lectine e le immunoglobuline (Fletcher T.C. 1982; Ellis A.E. 1989; Yano T. 1996). Non è un caso che proprio l'epidermide ed il muco siano i siti principali per la produzione di peptidi o piccole proteine con attività antibatterica: l'epidermide nei Teleostei è costantemente esposta ad un ambiente ricco di patogeni e, non avendo cheratina, è particolarmente vulnerabile e soggetta ad abrasioni e quindi rappresenta una zona ad alto rischio di infezioni (Cole A.M. et al., 1997; Park I.Y. et al., 1998; Robinette D. et al., 1998; Alexander J.B. 1980; Smith V.J. et al., 2000; Richards R.C. et al., 2001; Fernandes J.M. et al., 2002 a, b).

Una volta entrato nell'ospite, il patogeno o altri antigeni incontrano varie tipologie di leucociti nel sangue, tra cui monociti, granulociti e cellule citotossiche non specifiche insieme a linfociti circolanti del sistema immunitario adattativo. I tipi di cellule leucocitarie dei pesci sono molto simili a quelli dei Mammiferi, seppur con delle

differenze, che si riscontrano tra l'altro anche tra le varie specie di pesce (Ellis A.E. 1977; Rowley A.F. et al., 1988; Hine P.M. 1992). Sono presenti anche i trombociti che svolgono un ruolo nella coagulazione del sangue e nell'emostasi simile a quella svolta dalle piastrine nei Mammiferi.

1.5.2 Organi linfoidi

Nei Mammiferi gli organi linfoidi primari, dove le cellule linfoidi diventano linfociti antigene-reattivi, sono il timo ed il midollo osseo; dal primo prendono origine i linfociti T deputati alla risposta specifica cellulare ed all'immunosorveglianza, dal secondo, in cui avviene la maturazione delle cellule linfocitarie B, prendono origine le cellule granulocitarie, monocitarie, eritrocitarie e trombocitarie. Gli organi secondari rappresentano il microambiente in cui i linfociti interagiscono tra loro e con l'antigene. Nei Mammiferi gli organi secondari sono i linfonodi, la milza e il tessuto associato alle mucose (MALT) come ad esempio le tonsille e le placche di Peyer nell'intestino tenue. Tale organizzazione a livello anatomico del sistema immunitario non è completamente applicabile ai Teleostei, in quanto pur riconoscendo una divisione fisiologica per la produzione di cellule specifiche, gli organi possono essere considerati a funzione mista, in grado cioè di produrre sia le cellule linfocitarie che mielocitarie e per questo sono definiti organi linfomielioidi (Fänge R. 1982; Rombout J.H.W.M. et al., 1993b). Nei Teleostei, inoltre, sono assenti il midollo osseo, i linfonodi e le placche di Peyer. Il rene cefalico è probabilmente l'analogo del midollo osseo (Zapata A. 1979; Lamers C.H.J. 1985), mentre la milza sembra essere maggiormente coinvolta nell'eritropoiesi nella maggioranza delle specie di pesci sinora studiate (Rowley A.F. et al., 1988; Van Muiswinkel W.B. et al., 1991) [Figura I-9].

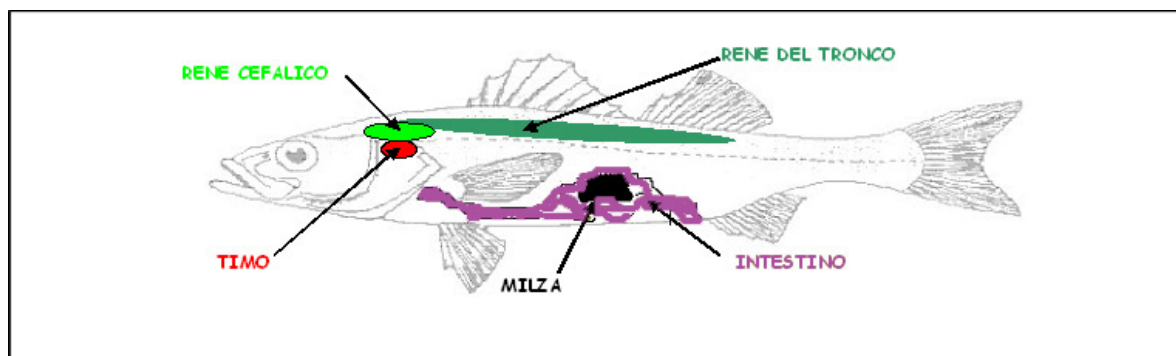


Figura I-9. Rappresentazione schematica degli organi linfomielioidi dei Teleostei

1.5.3 Il Timo

Il timo dei Teleostei è stato molto studiato (Ellsaesser C.F. et al., 1988; Chantanachookhin C. et al., 1991; Chilmonczyk S. 1992) ed è stato dimostrato, come già detto, che nell'adulto risulta essere una struttura linfoide (Abelli L. et al., 1996). Negli Elasmobranchi e nei Pesci più evoluti il timo è divisibile in una zona midollare e una corticale facilmente distinguibili ed è associato alla camera branchiale (Gorgollon P. 1983; Abelli L. et al., 1996), ma nei salmonidi questa distinzione in zona corticale e midollare non è presente (Chilmonczyk S. 1983).

Il timo nei Teleostei è popolato da linfociti e linfoblasti in relazione con cellule epiteliali reticolari (Manning M.J. 1994); nei pesci quest'organo subisce un'involuzione che dipende dall'età, dalle stagioni e dagli ormoni (Picchietti S. 1993). Durante l'ontogenesi del tessuto linfoide della spigola il timo è il primo organo ad essere popolato da cellule putative T (Abelli L. et al., 1996), confermando precedenti osservazioni fatte sulla trota iridea, *Oncorhynchus mykiss* (Tatner M.F. and Manning M.J., 1983; Manning M.J. 1994).

In recente lavoro (Picchietti S. et al., 2007) uova, larve e giovanili di spigola (*Dicentrarchus labrax* L.) sono state analizzate per indagare l'espressione di geni codificanti per il TcR- β ed il CD8- α . Questo studio osserva per la prima volta l'ontogenesi dell'espressione di tali geni, importanti per la funzionalità delle cellule T.

Trascritti di TcR- β nelle larve di spigola compaiono dopo 25 giorni mentre i trascritti di CD8- α compaiono 26 giorni dopo (dopo 51 giorni). La precoce espressione di TcR- β durante l'ontogenesi della spigola conferma i dati ottenuti con altre specie di Teleostei. Nelle larve di trota (*Oncorhynchus mykiss*), che si sviluppano più velocemente rispetto a quelle di spigola, si osservano trascritti di TcR- β dopo due settimane dalla fertilizzazione e ciò è in accordo con il precoce sviluppo del timo (Fisher U. et al., 2005; Hansen J.D. and Zapata A.G., 1998). Ricerche condotte in precedenza hanno evidenziato che il timo è il primo organo a divenire linfoide nei Teleostei (Botham J.W. and Manning M.J., 1981; Padros F. and Crespo S., 1996; Schroder M.B. et al., 1998; Willet C.E. et al., 1999); mentre il rene cefalico può contenere precocemente i precursori ematopoietici ma non i linfociti (Zapata A. et al., 2006). Inoltre la colonizzazione linfoide del timo si è visto che avviene 25 giorni ph, quindi ad uno stadio di sviluppo coincidente con la prima espressione di TcR- β . L'espressione di CD8- α avviene a 51 giorni ph quando il timo è ben sviluppato. Un recente lavoro condotto in trota (*Oncorhynchus mykiss*) mostra come trascritti di CD8- α siano già presenti nel timo 7 giorni dopo la fertilizzazione, cioè circa

una settimana prima dell'inizio dello sviluppo del timo e dell'espressione di TcR- β (Fisher U. et al., 2005). Questi ultimi risultati possono essere interpretati considerando la presenza di trascritti aberranti, che come è noto sono abbondanti nei Teleostei (Lam S.H. et al., 2004), oppure ipotizzando una qualche funzione del CD8- α nello sviluppo precoce della trota prima della formazione del timo (Fisher U. et al., 2005). Studi simili condotti sui Mammiferi mostrano espressione di CD8- α prima della comparsa del timo (Maddox J.F. et al., 1987).

1.5.4 Organi linfoidi secondari

Il rene e la milza sono i principali organi linfoidi secondari dei pesci teleostei, lungo i quali è localizzato il tessuto linfoide nella forma di aggregati sparsi di linfociti e fagociti, come succede nell'intestino e nelle branchie, aree più soggette all'entrata dei patogeni.

Il rene cefalico nei pesci possiede uno stroma ematopoietico fatto di cellule reticolari e fagociti somiglianti a quelli del midollo osseo dei Tetrapodi; probabilmente nei Teleostei il rene cefalico sostituisce il midollo osseo poiché è ricco di cellule staminali (Lamers C.H.J. 1985; Zapata A. 1979): il rene cefalico (pronefro) e il rene del tronco (opistonefro) sono considerati i maggiori organi emopoietici. I linfociti B dei Teleostei potrebbero svilupparsi nel rene cefalico poiché le prime cellule recanti immunoglobuline (Ig⁺) nel salmone Coho, *Oncorhynchus kisutch* sono state trovate in quest'organo (Irwin M.J. and Kaattari S.L., 1986). Studi morfologici (Zapata A. 1979) hanno inoltre fornito indicazioni che il rene cefalico potrebbe essere un organo linfoide primario per i linfociti B. Molti autori concordano nel ritenere che il rene sia il principale sito di differenziamento degli eritrociti, monociti, granulociti e linfociti B (Ellis A.E. 1977; Zapata A. 1979; Bielek E., 1981; Botham J.W. and Manning M.J., 1981).

Negli Elasmobranchi e nei Pesci più evoluti la milza è già una struttura ematopoietica (granulopoietica ed eritropoietica) che fa da organo di accumulo di cellule linfoidi. Nei Teleostei la milza è l'ultimo organo a svilupparsi durante l'istogenesi del sistema linfoide (Ellis A.E. 1977; Tatner M.F. and Manning M.J., 1983) e, come il rene cefalico, gioca un ruolo sia nell'ematopoiesi che nelle reazioni immunitarie (Manning M.J. 1994). In molti Teleostei, differentemente dai Tetrapodi, non c'è una distinzione netta nel parenchima splenico tra polpa bianca e rossa (Manning M.J. 1994). E' stato dimostrato che la milza è sede di cellule B e putative T (Scapigliati G. et al., 1995; Scapigliati G. et al., 1996; Romano N. et al., 1997), quindi potrebbe essere importante come organo linfoide secondario.

Come si evince dal lavoro di Romano N. et al., 2005 la milza è organizzata in aree linfoidi ed eritroidi. Entrambe le aree contengono MMC (*melano-macrophage centres*). Gli MMCs sono un tipo speciale di macrofagi con capacità di accumulare la melanina, morfologicamente ed immunoistologicamente differenti dai regolari macrofagi (Romano N., et al., 1998).

Mediante la disponibilità di appropriati markers, anticorpi monoclonali (mAbs), che riconoscono determinanti antigenici espressi da cellule T (DLT15) e cellule T “nascenti” (DLIg3), prodotti in spigola (*Dicentrarchus labrax* L.) (Scapigliati G. et al., 1999), è stata possibile l'identificazione e la caratterizzazione di alcune popolazioni di linfociti durante l'ontogenesi e l'età adulta della spigola (*Dicentrarchus labrax* L.) (Romano N. et al., 1997; Abelli L. et al., 1996; Abelli L. et al., 1997; Picchietti S. et al., 1997).

Il tessuto linfoide mucosale (MALT) è costituito da elementi linfoidi associati alle mucose dell'intestino, della pelle e delle branchie, che rappresentano la prima barriera di difesa dall'attacco di patogeni (Manning M.J. 1994). In tutti i gruppi di Teleostei la parete intestinale è infiltrata sia di linfociti che di altri leucociti (Manning M.J. 1994), mentre sia nelle branchie che nella pelle sono stati trovati soprattutto linfociti (Peleteiro M.C. and Richards R.M., 1985; Abelli L. et al., 1997). In particolare, nell'epitelio intestinale dei Teleostei sono stati individuati linfociti, granulociti e macrofagi sia singoli sia organizzati in piccoli gruppi (Rowley A.F. et al., 1988; Picchietti S. et al., 1997; Abelli L. et al., 1996).

1.6 Gli IFNs nei Teleostei

Geni codificanti per proteine omologhe agli IFNs dei Mammiferi sono stati recentemente clonati nel pesce zebra (*Danio rerio*), nel salmone (*Salmo salar*), nel pesce palla (*Takifugu rubripes*), nel pesce palla verde (*Tetraodon nigroviridis*), nel pesce gatto (*Ictalurus punctatus*), nella trota (*Oncorhynchus mykiss*), nel pesce zebra (*Danio rerio*) (Zou J. et al., 2007; Altmann S.M. et al., 2003; Luftalla G. et al., 2003; Robertsen B. et al., 2003; Long S. et al., 2004), e sono stati classificati come IFNs di tipo I anche se presentano una struttura genica con 5 esoni e 4 introni (Robertsen B. 2006).

In seguito sono stati clonati un IFN di tipo II e un secondo gruppo di IFNs di tipo I in trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Zou J. et al., 2005; Zou J. et al., 2007), e un recettore per l'IFN nel pesce zebra (*Danio rerio*) (Levraud J.P. et al., 2007).

I geni IFN nei pesci si traducono in putativi precursori proteici contenenti 175-185 amminoacidi e mostrano un putativo peptide segnale di 22-23 amminoacidi. Le sequenze segnale degli IFNs dei pesci hanno un livello di omologia non elevato tra loro e ancora più

basso con le sequenze segnale degli IFNs dei Vertebrati Superiori (Robertsen B. et al., 2003). Una comparazione delle proprietà dei putativi IFNs maturi nei pesci è mostrata nella Tabella I-2.

IFN type	Length (amino acids)	Mass (kDa)	Isoelectric point	Glycosylation motifs	Cystein numbers
Zebrafish	163	19.3	9.7	0	2
Salmon	152	18.2	9.2	1	2
Tetraodon	160	18.1	5.6	3	2
Fugu	164	18.8	4.7	4	2
Channel catfish	162	19.0	9.8	1	3

Tabella I-2. Proprietà dei putativi IFNs maturi nei pesci (Robertsen B. 2006)

Gli IFNs dei pesci sono simili in dimensione agli IFNs dei Mammiferi e hanno una massa molecolare di 18-19 kDa. L'IFN maturo di salmone (*Salmo salar*) è uno tra gli IFNs più corti attualmente conosciuti. L'IFN del pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) sembra privo della sequenza segnale e della metionina che è di solito il primo amminoacido della proteina matura (Robertsen B. 2006). Gli IFNs di salmone (*Salmo salar*), pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) e pesce zebra (*Danio rerio*) hanno un punto isoelettrico basico in contrasto con l'IFN del pesce palla (*Takifugu rubripes*) che invece ha un punto isoelettrico acido. Anche il punto isoelettrico degli IFNs di tipo I dei Vertebrati Superiori mostra ampie variazioni. Potenziali siti di glicosilazione (da 1 a 4) sono stati rilevati in tutti gli IFNs di pesci eccetto nel pesce zebra (*Danio rerio*). La glicosilazione dell'IFN non sembra essersi conservata nel corso dell'evoluzione. Gli IFNs di salmone (*Salmo salar*), pesce zebra (*Danio rerio*) e pesce palla (*Takifugu rubripes*) contengono 2 cisteine mentre il pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) ne ha 3.

Studi funzionali condotti su queste molecole hanno evidenziato alcune proprietà caratteristiche come ad esempio l'induzione in seguito a stimolazione con poly I:C ed altre sostanze chimiche (Altmann S.M. et al., 2003; Robertsen B. et al., 2003; Long S. et al., 2004; Kileng O. et al., 2008) e l'induzione della proteina Mx (Robertsen B. et al., 2003; Lutfalla G. et al., 2003).

Il salmone possiede due geni funzionali IFN (Sasa IFN- α 1 and Sasa IFN- α 2) (Robertsen B. et al., 2003), ciò potrebbe essere il risultato di un evento di tetraploidizzazione avvenuto durante l'evoluzione dei salmonidi (Allendorf F.W. and Thorgaard G.H., 1984). I due geni funzionali IFN di salmone (*Salmo salar*) sono presenti su distinti cloni genomici BAC e uno di questi contiene parecchi pseudogeni IFN.

Cellule di salmone (*Salmo salar*) SHK-1 (*Salmon Head Kidney*) sono state stimulate con gli IFNs ricombinanti di tipo I e di tipo II e l'analisi trascrizionale è stata analizzata mediante microarrays. Le cellule sono state stimulate con gli IFNs ricombinanti per 6 e 24 ore. Gli RNAs sono stati ibridizzati ad un microarray a cDNA specifico di salmone (salmon 17k feature TRAITS/SGP array) al fine di valutare la differenza di espressione genica in seguito al trattamento. 168 cloni mostrano dei livelli di espressione modificati in seguito al trattamento con le proteine ricombinanti; in particolare 72 geni sono indotti in seguito al trattamento con rIFN II, 47 in seguito a trattamento con rIFN I, inoltre 23 geni sono stati indotti in seguito a trattamento con entrambe le proteine ricombinanti indicando una co-regolazione della risposta all'IFN nei pesci (Martin S.A. et al., 2007).

Altri ricercatori (Ooi E.L. et al., 2008a), sempre mediante l'utilizzo di un IFN ricombinante di salmone (rSasaIFN- α 2), hanno indagato l'espressione di questo gene nella linea cellulare CHSE-214 (*homologous Chinook salmon embryonic*). rSasaIFN- α 2 determina una precoce espressione della proteina Mx e mostra alti livelli di attività antivirale contro il virus IPNV (*infectious pancreatic necrosis virus*). Al contrario non è stata osservata protezione antivirale mediata da rSasaIFN- α 2 nella linea cellulare HINAE (*heterologous Japanese flounder embryo*). La ricerca è proseguita esaminando gli effetti immunostimolatori *in vivo* di rSasaIFN- α 2 (Ooi E.L. et al., 2008b). Lo scopo è stato quello di determinare l'efficacia di rSasaIFN- α 2 di salmone (*Salmo salar*) nel migliorare la resistenza *in vivo* della trota al virus IHNV (*infectious hematopoietic necrosis virus*). E' stata anche caratterizzata la risposta di parecchi geni immunitari in trote immunostimate. I risultati ottenuti suggeriscono che gli IFNs ricombinanti possono essere potenzialmente impiegati come agenti terapeutici o come adiuvanti nello sviluppo di vaccini per i pesci.

Nel lavoro di Cuesta A. and Tafalla C., 2008 alcune trote sono state vaccinate contro il virus VHSV (*viral hemorrhagic septicemia virus*) e dopo 30 giorni infettate con il virus medesimo. Si è quindi studiata la risposta immunitaria al virus nelle trote a tempi brevi dall'infezione. Quello che si è osservato è che solo i geni relativi ad una risposta immunitaria non specifica quali IL-1 β , MHC-I α e IFN di tipo I sono significativamente stimolati negli animali vaccinati. Questi risultati rivelano che la vaccinazione a DNA induce uno stato di memoria nei pesci che, contrariamente a quello che accade nei Mammiferi, innesca delle risposte immunitarie non specifiche in seguito ad un tardivo incontro con il virus, probabilmente dovuto al fatto che la risposta immunitaria specifica in questo caso non è sufficiente per controllare l'infezione virale. Il meccanismo attraverso il

quale si instaura questo stato di memoria con effetti tardivi su funzioni immunitarie non specifiche ancora deve essere chiarito.

Si pensa che le funzioni immunitarie svolte dai macrofagi siano di grande importanza nella resistenza all'infezione virale; infatti i macrofagi possono limitare la proliferazione virale all'interno dell'ospite mediante 2 meccanismi differenti: uno intrinseco e/o uno estrinseco (Stohlman S.A. et al., 1982). L'attività antivirale estrinseca è l'abilità dei macrofagi di inibire la replicazione virale in altre linee cellulari suscettibili. Ciò può avvenire attraverso l'azione di fattori differenti, come ad esempio la produzione di IFN. L'attività antivirale intrinseca è invece definita come la permissività o la non-permissività dei macrofagi stessi di sostenere la replicazione virale. Questi 2 meccanismi, che sono generalmente indipendenti, sono di grande importanza nel determinare le conseguenze dell'infezione virale. Alcuni lavori hanno dimostrato che culture primarie di macrofagi di trota (*Oncorhynchus mykiss*) sono suscettibili al virus VHSV (*viral hemorrhagic septicemia virus*) (Estepa A. and Coll J.M., 1991; Tafalla C. et al., 1998). Nel lavoro di Estepa A. and Coll J.M., 1991 sono state infettate cellule di rene cefalico non frazionate e si è ottenuta la totale lisi cellulare dopo una settimana dall'infezione, mentre nel lavoro di Tafalla C. et al., 1998 i leucociti totali del sangue e i macrofagi di rene cefalico non mostravano un apparente effetto citopatico e l'effetto virale aumentava con il tempo nelle culture cellulari indicando suscettibilità. La percentuale di macrofagi infettati era molto bassa, come determinato mediante immunofluorescenza. Questi risultati diversi potrebbero esser dovuti a molti fattori, ma nel caso delle cellule immunitarie probabilmente uno dei fattori più importanti nel determinare le conseguenze di un'infezione virale è lo stato di attivazione/differenziazione delle cellule stesse (McCullough K.C. et al., 1999). Basandosi su questi studi si è dimostrato di grande interesse determinare se i macrofagi RTS-11 siano suscettibili al virus oppure no. Si è dimostrato che le cellule RTS-11 non sono suscettibili al virus VHSV (Tafalla C. et al., 2008). Il meccanismo antivirale che si instaura in questa linea cellulare è sempre basato sull'azione dell'IFN di tipo I e sull'azione di una particolare proteina antivirale, la PKR (*protein chinasi dsRNA dipendente*). In seguito alla sua attivazione, la proteina antivirale fosforila il fattore eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2 α*) e quindi riduce i livelli del fattore eIF2 α attivo determinando una conseguente diminuzione di traduzione di tutti gli mRNA nella cellula.

1.6.1 IRFs nei Teleostei

Gli IRFs (*interferon regulatory factor*) appartengono alla famiglia dei regolatori trascrizionali e sono importanti nell'attivazione trascrizionale degli IFNs e dei geni ISGs (*interferon stimulated gene*), i quali giocano un ruolo critico nella difesa innata contro l'infezione virale nei Vertebrati (vedi paragrafo 1.2). Lo scopo del lavoro di Kileng O. et al., 2009 è stato quello di fornire ulteriori conoscenze riguardanti il sistema IFN in salmone (*Salmo salar*) mediante studi strutturali, filogenetici e funzionali del gene IRF-7. IRF-7 di salmone mostra omologia di sequenza con le famiglie di proteine IRF3/IRF7 dei Vertebrati. La sovra-espressione dell'IRF-7 di salmone ha un effetto positivo sull'attivazione del promotore dell'IFN- α 1 in seguito a stimolazione con poly I:C. Poiché l'IRF-7 di Mammifero è un ISG (*interferon-stimulated gene*), è stata comparata l'espressione dell'IRF-7 di salmone con altri 2 ISGs, Mx e STAT-1 (quest'ultimo non è molto studiato nei pesci). IRF-7, Mx e STAT-1 sono tutti sovra-espressi nella linea cellulare TO di salmone in seguito a stimolazione con rSasalIFN- α 1. IRF-7 è anche indotto dal poly I:C nelle cellule e nei pesci vivi mentre STAT-1 mostra una bassa risposta alla stimolazione con poly I:C. Infine, sono stati forniti dati che suggeriscono come ISAV (*infectious salmon anemia virus*) inibisce o addirittura andrebbe ad eliminare la trascrizione di IRF-7. Con questo lavoro è stato possibile dimostrare la presenza di un IRF-7 in salmone e che esso è in grado di agire come un fattore trascrizionale che attiva il promotore dell'IFN.

In trota (*Oncorhynchus mykiss*) sono stati identificati i geni IRF-3 e IRF-7 (Holland J.W. et al., 2008). Entrambi i geni sono sovra-espressi in seguito a stimolazione con poly I:C, con IFN di tipo I ricombinante di trota (rIFN1), con IFN di tipo II ricombinante di trota (rIFN γ), con LPS e con rIL-1 β nella linea cellulare RTS-11. Il poly I:C e l' rIFN1 inducono l'espressione di IRF3 e IRF7 nella linea cellulare RTG-2. Questi risultati dimostrano come IRF3 e IRF7 sono molecole importanti nella regolazione delle risposte antivirali nei pesci.

1.6.2 STATs nei Teleostei

La famiglia di proteine STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) sono fattori trascrizionali citoplasmatici latenti che divengono attivi tramite fosforilazione delle tirosine ad opera degli enzimi JAK (*Janus Tyrosine Kinase*) in risposta alla stimolazione delle citochine (vedi paragrafo 1.2).

Sono stati condotti degli studi sulle proteine STAT, un componente critico della segnalazione dell'IFN, in particolar modo su STAT-1 nella passera giapponese (*Paralichthys olivaceus*). Essa mostra elevata omologia con le STAT-1 dei Mammiferi (Park E.M. et al., 2008). L'espressione di STAT-1 è stata analizzata mediante real time PCR e ibridazione *in situ* in tutti i principali organi: muscolo, fegato, intestino, stomaco, rene cefalico, pelle, pinna, milza, branchie, occhi, cuore. Si osserva un'elevata espressione di STAT-1 nelle branchie, milza, rene cefalico e cuore. Inoltre, si è osservato un accumulo di STAT-1 in differenti stadi dello sviluppo. Recenti clonaggi di varie citochine (IFNs, IRFs, STATs), oltre quello di STAT-1, in passera giapponese (*Paralichthys olivaceus*) suggeriscono che anche i pesci impiegano una via di segnalazione JAK/STAT. L'identificazione di altri geni STAT permetterà di comprendere nel dettaglio il sistema di trasduzione del segnale nei pesci.

1.7 La proteina Mx nei Teleostei

Similmente alle proteine Mx nei Mammiferi, nei Pesci queste proteine sono espresse o nel citoplasma o nel nucleo (Nygaard R. et al., 2000; Trobridge G.D. et al., 1997a; Bergan V. and Robertsen B., 2004; Larsen R. et al., 2004).

Nei Teleostei i geni Mx sono stati clonati nel pesce persico (*Perca fluviatilis*) (Staeheli P. et al., 1989), in trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Trobridge G.D. and Leong J.A.C., 1995), in salmone (*Salmo salar*) (Robertsen B. et al., 1997; Larsen R. et al., 2004), in passera giapponese (*Paralichthys olivaceus*) (Lee J.Y. et al., 2000; Caipang C.M. et al., 2003), in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Jensen V. and Robertsen B., 2000), nel pesce zebra (*Danio rerio*) (Altmann S.M. et al., 2004), nel pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) (Plant K.P. and Thune R.L., 2004), nell'orata (*Sparus aurata*) (Tafalla C. et al., 2004).

In molte specie sono presenti diverse isoforme di Mx. Tre differenti isoforme sono state clonate e caratterizzate in trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Trobridge et al., 1997a) e nel salmone (*Salmo salar*) (Robertsen B. et al., 1997), mentre soltanto una isoforma è presente nel pesce persico (*Perca fluviatilis*) (Staeheli P. et al., 1989). Recentemente è stato caratterizzato un promotore Mx in trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Collet B. and Secombes C.J., 2001). Sono stati identificati e caratterizzati altri geni indotti dagli IFNs tra i quali *VHSV* (*viral hemorrhagic septicemia virus*) *induced gene-1* (vig-1) (Boudinot P. et al. 1999), *VHSV* (*viral hemorrhagic septicemia virus*) *induced gene-2* (vig-2) (Boudinot P. et al., 2001) e IRF-1 (Yabu T. et al., 1998).

Nei Teleostei, la proteina Mx viene indotta mediante meccanismi diversi in specie diverse, sia *in vivo* che *in vitro*. Nel salmone (*Salmo salar*), RNA a doppio filamento (dsRNA) oppure polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C), inducono la produzione di Mx in fegato, rene cefalico, branchie mentre non è stata osservata espressione di Mx negli animali non trattati (Robertsen B. et al., 1997). In trota (*Oncorhynchus mykiss*) l'espressione di Mx è stata indotta mediante stimolazione con poly I:C oppure mediante infezione con “*hematopoietic necrosis virus*” (IHNV) nel fegato e nel rene cefalico (Trobridge G.D. et al., 1997b). Anche in questo caso non si osserva espressione di Mx nei pesci non trattati. La vaccinazione di trote con DNA plasmidico codificante la proteina G di differenti rhabdovirus induce la produzione di Mx nel rene cefalico e nel fegato (Kim C.H. et al., 2000).

Da uno studio condotto sulla passera giapponese infettata con *Hirame rhabdovirus* (HRV) si osserva un incremento dell'espressione di Mx nei leucociti con un minimo di espressione dopo 48 ore dall'infezione ed un massimo di espressione dopo 72 ore dall'infezione. Inoltre RT-PCR condotte su pesci non infettati da virus mostrano che l'Mx è prevalentemente espresso nel rene cefalico, nella milza, nell'intestino, nel cervello, nei fluidi della cavità peritoneale e nelle branchie, ed è invece minimamente espresso nei leucociti, nel fegato, nel muscolo e nel muco (Lee J.Y. et al., 2000).

Studi condotti in orata (*Sparus aurata*), sempre mediante RT-PCR, hanno evidenziato i livelli di espressione della proteina Mx. Si è osservato che l'Mx è costitutivamente espresso nel rene cefalico, nel fegato, nella milza, nel cuore, nelle branchie, nel cervello e nel muscolo di pesci non infettati da virus. Una vaccinazione intramuscolare delle orate con il poly I:C determina una sovra-espressione di Mx nel fegato, nel rene cefalico, nella milza e nel muscolo. Una espressione costitutiva è stata anche osservata in macrofagi isolati da rene cefalico e leucociti del sangue periferico. Questa espressione aumenta in seguito a stimolazione con poly I:C. L'Mx non è risultato costitutivamente espresso in linee cellulari di orata, SAF-1, ma poly I:C e nodavirus sono in grado di indurre l'espressione di Mx in questa linea cellulare (Tafalla C. et al., 2004).

Nel lavoro di Poisa-Beiro L. et al., 2008 sono stati condotti studi di espressione, sia *in vitro* sia *in vivo*, di geni coinvolti nelle risposte immunitarie ed infiammatorie di orata (*Sparus aurata* L) in seguito a trattamento con nodavirus (NNV). Non si è osservata replicazione del virus nei macrofagi di rene cefalico e leucociti del sangue. Inoltre, l'espressione di geni come il TNF- α , IL1- β , Mx non è stata rilevata sia nei macrofagi di rene cefalico sia nei leucociti del sangue in seguito ad una infezione *in vitro* con nodavirus.

In vivo, il nodavirus è stato rilevato 1 giorno dopo l'infezione (p.i.) mediante RT-PCR nel sangue, nel fegato, nel rene cefalico e nel cervello di orate infettate sperimentalmente. La presenza di nodavirus diminuisce chiaramente nel sangue 3 giorni dopo l'infezione. Un incremento transitorio dell'espressione di TNF- α , IL1- β si osserva nel cervello 3 giorni dopo l'infezione, mentre nel rene cefalico la sovra-espressione di TNF- α si osserva soltanto 1 giorno dopo l'infezione. L'espressione di Mx aumenta invece sia nel cervello che nel rene cefalico delle orate infettate.

A scopo comparativo, è stata analizzata l'espressione degli stessi geni in spigola (*Dicentrarchus labrax*) e, sebbene lo stesso livello di espressione sia stato osservato nel cervello e nel rene cefalico, il grado di espressione era diverso principalmente nel cervello, l'organo chiave dell'infezione, in cui l'espressione maggiore si ha per il TNF- α mentre l'espressione più bassa si ha per l'Mx.

Nel lavoro di Das B.K. et al., 2007 è stato prodotto un antisiero di coniglio mediante un peptide lungo 12 amminoacidi comune alle tre isoforme conosciute di Mx di salmone (*Salmo salar*). L'anticorpo marca le cellule ASK-1 48 ore dopo la stimolazione con poly I:C. Nei Western blots di queste cellule, l'anticorpo marca un doppietto con peso molecolare di circa 75 kDa e un'altra banda di circa 65 kDa, cioè il peso molecolare dell'Mx di salmone. I Western blots del rene cefalico da salmone infettati con IPNV mostrano un risultato simile. Nell'immunoistochimica, l'anticorpo marca tessuti di branchie, rene cefalico e fegato di pesci infettati con IPNV. Questi tessuti esprimono anche alti livelli di IFN e Mx come mostrato da studi condotti con la qRT-PCR.

Successivamente Das e colleghi hanno condotto ulteriori studi e hanno dimostrato che l'antisiero di coniglio, prodotto in precedenza, cross reagisce con la proteina Mx del merluzzo (*Gadus morhua*) (Das B.K. et al., 2008). L'antisiero è stato usato per studiare l'espressione della proteina Mx nei leucociti del sangue e nei tessuti di giovanili di merluzzo in seguito ad iniezione con poly I:C. I dati ottenuti indicano che l'antisiero di coniglio, prodotto dalla proteina Mx di salmone, cross reagisce con una proteina indotta da poly I:C con peso molecolare simile a quello delle proteine Mx di altri vertebrati, specialmente pesci, e che questo anticorpo può essere usato per studiare le risposte dell'Mx nel merluzzo.

Capitolo II - Materiali e Metodi

2.1 Il clonaggio

2.1.1 Vettori utilizzati

Per il clonaggio in *E. coli* è stato utilizzato un vettore che ci ha permesso l'identificazione diretta dei trasformanti mediante Red-White screening.

pGEM-T Easy (Promega): ori, lacZ, lacO, SP6, MCS, T7, f1 ori, Amp^r [Figura II-1]

1. ori - origine di replicazione batterica; lacZ - regione codificante l' α -peptide della β -galattosidasi; lacO - operatore lac; SP6 - promotore e codone di inizio della trascrizione della polimerasi SP6; MCS - sito multiplo di clonaggio; T7 - promotore e codone di inizio della trascrizione della polimerasi T7; f1 ori - origine di replicazione del fago f1; Amp - resistenza all'ampicillina.

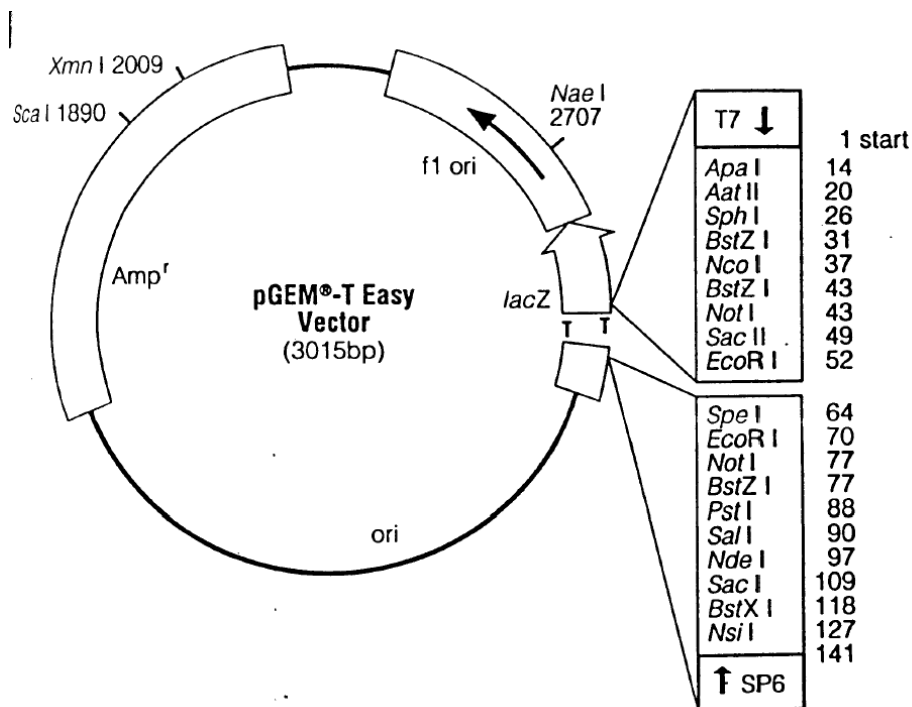


Figura II-1. Vettore impiegato per il clonaggio di IFN di spigola.

2.1.2 Microrganismo utilizzato

Con i prodotti di ligazione sono state trasformate cellule competenti di *E. coli* **JM109** (Promega) il cui genotipo è: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k^- , m_k^+), relA1, supE44, λ^- , Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qZ Δ 15]. È un ceppo permissivo per vettori che portano doppie mutazioni e viene usato per lo screening di ricombinanti ottenuti in vettori che portano il gene lacZ (gene che codifica per la β -galattosidasi).

2.1.3 Terreni di coltura

Composizione per litro di terreno LB (Luria-Bertani):

Tryptone 10 g.

Estratto di lievito 5 g

NaCl 10 g

Lo screening dei trasformanti è stato effettuato su terreno agarizzato Mac Conkey (Sigma) contenente ampicillina.

Composizione per un litro di terreno:

Agar Mac Conkey 50 g

Ampicillina 100 mg

Composizione per litro di terreno SOC Medium:

Tryptone 20 g

Estratto di lievito 10 g

NaCl 1M 10 ml

KCl 1M 2.5 ml

Mg²⁺ 2M 10 ml

Glucosio 1M 10 ml

La soluzione stock di Mg²⁺ 2M è composta di 20.33% (w/v) MgCl₂ e 24.65% (w/v) MgSO₄, sterilizzata su filtri 0.2 µm.

La sterilizzazione dei terreni di coltura è stata effettuata mediante trattamento in autoclave per 20 minuti alla temperatura di 121° C.

2.1.4 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio

La separazione e l'identificazione dei frammenti di DNA è stata effettuata mediante elettroforesi su gel d'agarosio, utilizzando gel a diverse concentrazioni a seconda dei pesi molecolari delle bande da visualizzare.

Per la preparazione di un gel alla concentrazione 1% (w/v) si prendono: 1 g d'agarosio che viene disciolto in 100 ml di tampone TBE (0,89 M Tris-Borato, 20 mM EDTA, pH 8.3), utilizzato anche come tampone della corsa elettroforetica. Le molecole di DNA sono identificate aggiungendo Gel RedTM Nucleic Acid Gel Stain (10 ng/µl) (Biotium), una

sostanza in grado d'intercalarsi fra le basi della doppia elica di DNA, rendendolo così visibile in seguito ad esposizione alla luce ultravioletta.

Le elettroforesi sono state eseguite ad un voltaggio costante di 100 V, utilizzando l'apparato per elettroforesi Power-Pac 300 (BIO-RAD). Il marker di peso molecolare utilizzato è Hyperladder IV (Bioline).

2.1.5 Purificazione di leucociti di spigola

Gli esemplari di spigola utilizzati sono stati prelevati dal centro d'acquacoltura ASA s.p.a. (Civitavecchia, Italia). Per gli esperimenti che verranno descritti, tutte le soluzioni impiegate per lavorare con le cellule di spigola sono state portate ad una osmolarità specifica per questi pesci, 355 mOsm kg⁻¹, con NaCl 2M. Dalle spigole sono prelevati gli organi d'interesse e posti nella Soluzione Salina Bilanciata di Hank (HBSS, 14% (w/v) KCl, 0.6% (w/v) KH₂PO₄, 80% (w/v) NaCl, 3.5% (w/v) NaHCO₃, 12.1% (w/v) NaHPO₄, 10% (w/v) D-Glucosio e 0.015% (w/v) Rosso Fenolo) senza Ca²⁺ e Mg²⁺, contenente 3,33 µg/ml di eparina. Le cellule sono state ottenute mediante frantumazione dell'organo (teasing) usando un pestello e facendole passare attraverso un filtro di nylon da 100 µm (Becton Dickinson Labware, Europa) (Scapigliati G. et al., 1995; 1996; 2000) in HBSS. La sospensione cellulare ottenuta è stata centrifugata a 1800 rpm per 10 minuti a 4° C.

Eliminato il supernatante, il pellet di cellule è stato risospeso in 4 ml della stessa soluzione e centrifugato su un gradiente discontinuo di Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Il Percoll è stato diluito in HBSS con eparina fino ad ottenere una soluzione al 60% (v/v) e portato a 355 mOsm Kg⁻¹ con NaCl 2M. 15,67 ml di Percoll 60% (v/v) sono stati aggiunti a 50 ml di HBSS con eparina per ottenere un Percoll con una densità pari a 1.02 g cm⁻³, mentre 40,58 ml di Percoll 60% (v/v) sono stati miscelati a 8 ml di HBSS con eparina per ottenere una densità di 1.07 g cm⁻³ (Romano et al., 1997). In tubi sterili da 15 ml sono stati caricati 4ml del Percoll a maggiore densità (1.07 g cm⁻³) e sopra a questi altri 4 ml del Percoll a densità minore (1.02 g cm⁻³), a questo punto sono stati aggiunti i 4 ml della sospensione cellulare e centrifugati a 2000 rpm per 25 minuti a 4° C. Le cellule all'interfaccia tra le due soluzioni di Percoll (principalmente leucociti) sono state prelevate e lavate in HBSS senza Ca²⁺ e Mg²⁺, contenente 3,33 µg/ml di eparina, a 1800 rpm per 10 minuti a 4° C.

2.1.6 Estrazione dell'RNA totale

Per l'estrazione dell'RNA totale, al pellet di cellule è stata aggiunta una quantità di Tripure (Roche) pari a 1ml ogni 10 milioni di cellule e queste sono state lisate pipettando il campione ripetutamente. Sono stati poi aggiunti 0.2ml di cloroformio per ogni ml di Tripure iniziale e la soluzione è stata agitata vigorosamente per 15 secondi. Il campione è stato incubato per 10 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugato a 12000 rpm per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa incolore, presente nella parte superiore del tubo da centrifuga, è stata trasferita in un altro tubo per precipitare l'RNA. Per fare ciò sono stati aggiunti 0.5ml di isopropanolo per ogni ml di Tripure iniziale; la soluzione ottenuta è stata quindi agitata invertendo il tubo varie volte per miscelare bene il tutto, incubata per 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugata a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il supernatante è stato eliminato ed è stato aggiunto al precipitato 1ml di etanolo 75% (v/v) per ogni ml di Tripure iniziale. Il tutto è stato agitato vigorosamente per lavare il pellet e poi centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C eliminando il supernatante. L'eccesso di etanolo presente sul pellet di RNA è stato rimosso facendolo evaporare ed il prodotto finale è stato poi risospeso in acqua con dietil-pirocarbonato (DEPC) 0.1%. L'RNA è stato successivamente quantificato misurando l'assorbanza a 260nm (A_{260}) allo spettrofotometro (Jenway 6305 Uv/Vis, Spectrophotometer).

2.1.7 Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando il kit BioScript RNase H minus (Bioline): a 2 µg di RNA totale vengono aggiunti 1 µl di random esameri (0.2 µg/µl - Amersham Pharmacia) ed acqua nuclease-free fino ad un volume totale di 12 µl, ed il tutto viene incubato a 70° C per 5 minuti e poi posto immediatamente in ghiaccio. Successivamente, si aggiungono 0.4 µl di 100 mM dNTPs (25 mM ciascuno della Promega), 4 µl di 5X reaction buffer ed acqua nuclease-free, fino ad un volume totale di 19.75 µl, e 0.25 µl di BioScript (trascrittasi inversa 200 u/µl). La miscela ottenuta viene incubata a 25° C per 10 minuti, poi a 37° C per 60 minuti ed infine a 70° C per 10 minuti, per terminare la reazione.

2.1.8 Purificazione del DNA da gel d'agarosio

Le bande relative ai frammenti d'interesse vengono purificati dal gel di agarosio utilizzando il kit della QIAgen (QIAquick Gel Extraction) seguendo le informazioni fornite dalla casa produttrice. Questo protocollo può essere impiegato per la purificazione di frammenti di DNA di lunghezza compresa tra le 70 bp e le 10 kb.

I frammenti di DNA, dopo essere stati visualizzati con luce ultravioletta, sono ritagliati dal gel cercando di minimizzare la quantità d'agarosio prelevata. Si trasferiscono le porzioni di gel in un tubo da 1.5 ml e si pesano; si aggiunge quindi un volume di Buffer QG pari a tre volte il volume del gel (considerando 100 mg ~ 100 µl) e si lascia incubare il campione a 50°C per 10 minuti, invertendo il tubo più volte ogni 2-3 minuti, per aiutare la dissoluzione del gel. Per frammenti di taglia superiore alle 4 kb o inferiore alle 500 bp viene aggiunto un volume di isopropanolo pari al volume del gel estratto. A questo punto si carica il campione su una colonnina cromatografica, fornita dalla casa produttrice del kit e si centrifuga per 1 minuto a 13000 rpm. Per essere certi di rimuovere ogni traccia di agarosio si aggiungono 0.5 ml di Buffer QG alla colonna e si centrifuga nuovamente il campione per 1 minuto a 13000 rpm. Il lavaggio finale si effettua aggiungendo 0.75 ml di Buffer PE contenente etanolo e centrifugando per 1 minuto a 13000 rpm. Si ricentrifuga per eliminare tutto il buffer PE e, per eluire il DNA, si trasferisce la colonnina cromatografica in un nuovo tubo da 1.5 ml, si aggiungono 10 µl di acqua Nuclease-free e si centrifuga per 1 minuto a 13000 rpm. Il purificato verrà poi caricato su un gel d'agarosio all'1% per determinarne la concentrazione e la purezza.

2.1.9 Ligazione di frammenti di DNA

Gli inserti vengono miscelati con 50ng del vettore di clonaggio pGEM-T Easy, con la T4 DNA Ligasi, 2X Rapid Ligation Buffer (Tris-HCl 60mM, pH 7.8, MgCl₂ 20mM, DTT 20mM, ATP 2mM, 10% polietilen glicole) specifico per questo enzima e con acqua sterile, fino ad un volume totale di 10µl. La reazione è stata realizzata utilizzando un rapporto vettore:inserto di 1:3 e lasciando i campioni per 16 ore a 4°C.

Per calcolare la giusta quantità d'inserto da aggiungere nella reazione di ligazione è stata applicata la seguente equazione:

$$\frac{\text{ng vettore} \times \text{Kb inserto}}{\text{Kb inserto}} \times \frac{3}{1} = \text{ng inserto}$$

2.1.10 Trasformazione delle cellule competenti

Ad un'aliquota di 50 µl di cellule competenti JM109 (Promega) sono stati aggiunti 3 µl (5 ng/µl) dei prodotti della reazione di ligazione descritta precedentemente. Il campione, dopo essere stato lasciato in ghiaccio per 20 minuti, è stato sottoposto ad uno "shock" termico a 42°C per 50 secondi e quindi, posto nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. A questo punto è stato aggiunto il terreno di crescita per i batteri, il SOC medium fino ad un volume di 1 ml ed il campione è stato incubato a 37°C per 1,5 ore. Le cellule presenti nel terreno sono state centrifugate per 1 minuto a 13500 rpm: del supernatante sono stati prelevati 800 µl e nei rimanenti 200 µl è stato risospeso il pellet.

Le cellule sono ora pronte per essere piastrate su terreno selettivo Mac Conkey contenente ampicillina, per isolare i trasformanti ricombinanti mediante il "red-white screening".

2.1.11 Colture batteriche

Una volta aver ottenuto le piastre con i batteri ricombinanti, il passo successivo è quello di incubare le colonie batteriche, contenute sulla piastra precedentemente incubata, in un appropriato terreno di crescita (LB) con l'aggiunta di ampicillina e lasciarle a 37°C per tutta la notte.

2.1.12 Estrazione del DNA plasmidico

Il kit utilizzato è il Miniprep DNA Purification System (Promega). Utilizzando dei tubi da 1,5 ml si recuperano le cellule batteriche centrifugando a 13000 rpm per 5 minuti. Si elimina il supernatante e si continua finchè non termina tutta la coltura batterica. Fatto ciò si aggiungono 250 µl di Cell Resuspension Solution, poi 250 µl di Cell Lysis Solution e si incuba per circa 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente 10 µl di Proteasi Alcalina e 350 µl di Neutralization Solution. Si centrifuga a 14000 rpm per 10 minuti. Si passa sulla colonnina fornita dal kit trasferendovi tutto il supernatante (800 µl per volta), e si centrifuga a 14000 rpm per 1 minuto. Si aggiungono poi 750 µl della soluzione di lavaggio della colonnina. Si centrifuga a 14000 rpm per 1 minuto. Si ripete il lavaggio con altri 250 µl della soluzione di lavaggio e si centrifuga ancora a 14000 rpm per 2 minuti. Si centrifuga poi a vuoto a 14000 rpm per 1 minuti per rimuovere tutto l'etanolo. A questo punto si mette la colonnina su un tubo da 1,5 ml, si aggiungono 100 µl di acqua Nuclease-free e si centrifuga a 14000 rpm per 1 minuto per eluire il DNA plasmidico.

2.1.13 Analisi di sequenza

Le sequenze sono state ottenute mandando il DNA alla ditta MWG mentre per il confronto con le sequenze già note sono stati impiegati i programmi FASTA (Pearson W.R. and Lipman D.J., 1998) e BLAST (Altschul S.F. et al., 1990).

2.2 Clonaggio del cDNA dell'interferone (IFN) di spigola (*Dicentrarchus labrax* L)

2.2.1 RT-PCR per il primo frammento del gene IFN

Negli esperimenti di RT-PCR il cDNA stimolato con poly I:C a 6 ore (20µg/ml) è stato sintetizzato, a partire dall'RNA totale, utilizzando il kit Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech). Dopo aver sciolto il *bead* in acqua 0.1% DEPC, si aggiungono 2 µl primer forward (25 µM), 2 µl primer reverse (25 µM), 1 µl (0.5 µg) primer pd(N)₆ e 500 ng di RNA totale. Il volume finale della reazione è di 50 µl. Ciascun *bead* contiene la Trascrittasi Inversa del Virus della Leucemia Murina di Moloney (MMLV) e la Taq DNA polimerasi con l'apposito buffer. Il campione viene incubato a 42°C per 30 minuti e poi, per inattivare la trascrittasi inversa a 95°C per 5 minuti. Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando il thermal cycler TC312 Techne.

I primers utilizzati per controllare la qualità e la quantità dell'RNA, specifici per il gene della β-actina, sono:

ACT1F : 5' - ACT GTG GGG CGC CCC AGG CAC C - 3'

ACT1R : 5' - CTC CTT AAT GTG ACG CAC GAT TTC - 3'

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione iniziale per 5 minuti a 94°C
 - denaturazione per 45 secondi a 94°C
 - annealing per 45 secondi a 55°C
 - estensione per 45 secondi a 72°C
 - Estensione finale: 10 minuti a 72°C
- } 35 cicli

Per escludere eventuali contaminazioni da DNA sono state effettuate PCR utilizzando il kit *Taq* PCR Master Mix (Qiagen): il campione è costituito dall'RNA totale (500 ng), a cui si aggiungono 2 µl primer forward (25 µM), 2 µl primer reverse (25 µM), 25 µl di *Taq* PCR Master Mix ed acqua distillata (fornita dal kit) per un volume finale di 50 µl.

Inizialmente le PCR sono state eseguite impiegando i primers IFNFR ed IFNRV. Tali primers sono stati ottenuti mediante la strategia del “clonaggio per omologia”. Questa metodologia si basa sull’allineamento delle sequenze note di proteine provenienti da specie diverse e permette di evidenziare la presenza di regioni altamente conservate nel corso dell’evoluzione e quindi di costruire primers degenerati basandosi su queste regioni.

L’allineamento delle sequenze ha messo in evidenza alcune regioni altamente conservate da cui sono stati costruiti i primers di cui sopra:

IFNFR: 5’ – ACAGCTCTGCATCATGGG – 3’

IFNRV: 5’ - CTCCCAGGCT T/G CAGC A/G CT – 3’

[T/G = K; A/G = R]

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione iniziale per 5 minuti a 94°C
 - denaturazione per 45 secondi a 94°C
 - annealing per 45 secondi a 50°C
 - estensione per 45 secondi a 72°C
 - Estensione finale per 10 minuti a 72°C
- } 35 cicli

Il frammento atteso impiegando questa coppia di primers è di 188 bp. I prodotti d’amplificazione (20 µl) sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d’agarosio all’1% (w/v). Il prodotto ottenuto è stato clonato in pGEM-T easy e sono stati sequenziati 10 cloni.

2.2.2 Estensione dell'estremità 3'

L'estremità 3' del cDNA di nostro interesse è stata ottenuta mediante la tecnica della RACE-PCR (rapida amplificazione delle estremità del cDNA). Il cDNA è stato ottenuto a partire dall'mRNA isolato utilizzando il kit First-Strand cDNA Synthesis (Amersham Pharmacia Biotech). 2 µg di mRNA sono stati sciolti in 20 µl di acqua con 0.1% DEPC, riscaldati a 65°C per 10 minuti e quindi posti nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. Al campione sono stati successivamente aggiunti 11 µl del Bulk Reaction Mix, contenenti la Trascrittasi Inversa del Virus della Leucemia Murina di Moloney (MMLV) disciolta nel tampone appropriato, 1 µl (5 µg) dell'oligo-dT adaptor primer (5'-CTCGAGATCGAT GCGGCCGCT₁₅-3') e 1 µl della soluzione 200 mM di ditiotreitolo (DTT). Dopo aver

pipettato gentilmente più volte, il campione è stato incubato a 37° C per 1 ora; una volta ottenuto, il cDNA è stato impiegato come stampo per la successiva 3' RACE - PCR. La reazione di PCR è stata inizialmente eseguita impiegando il primer specifico forward, IFNFRA: 5'-GCCACGTCCTAAAGAAAATGGGCC-3', ottenuto a partire dalla sequenza iniziale, insieme all'oligo-dT adaptor primer.

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione iniziale per 5 minuti a 95° C
 - denaturazione per 45 secondi a 94° C
 - annealing per 45 secondi a 60° C
 - estensione per 45 secondi a 72° C
 - estensione finale per 10 minuti a 72° C
- } 35 cicli

Il prodotto ottenuto è stato clonato in pGEM-T easy e sono stati sequenziati 10 cloni distinti.

2.2.3 Estensione dell'estremità 5'

Nella RACE-PCR dell'estremità 5' il cDNA è stato ottenuto utilizzando l'RNA totale (descritto nel paragrafo 2.1.6) ed il kit First-Strand cDNA Synthesis (Amersham Pharmacia Biotech). 2 µl di mRNA sono stati sciolti in 8 µl di acqua con 0.1% DEPC, riscaldati a 65°C per 10 minuti e quindi posti nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. Al campione sono stati aggiunti 5 µl dello stesso Bulk Reaction Mix, 1 µl (5 µg) dell'oligo-dT primer e 1 µl della soluzione 200 mM di ditiotreitolo (DTT). Dopo aver pipettato gentilmente più volte, il campione è stato incubato a 37° C per 1 ora al termine della quale sono stati aggiunti 2 µl di RNasi H e si è nuovamente incubato il campione a 37° C per 20 minuti per poi purificarlo con il MinElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN), seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Per ultimare la reazione di RACE-PCR, a 5 µl del cDNA è stata aggiunta all'estremità 5' una coda di poly(C) (1 µl di dCTP 2 mM), sfruttando la Deossinucleotidil-Transferasi Terminale (TdT, Promega), mantenuta per 30 minuti a 37° C e poi per 10 minuti a 70° C al fine di inattivarla. Quindi è stata eseguita una PCR utilizzando un primer specifico reverse, ottenuto a partire dalla sequenza iniziale, RQIFNRV (5'- CCAATCACAGGAGCGAAG -3') in coppia con il primer oligo- dG (5'- GGGGGGIGGGIIGGGIIG-3'), dove I sta per inosina.

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione iniziale per 5 minuti a 94° C
 - denaturazione per 45 secondi a 94° C
 - annealing per 45 secondi a 54° C
 - estensione per 45 secondi a 72° C
 - estensione finale per 10 minuti a 72° C
- } 35 cicli

Il prodotto ottenuto è stato clonato in pGEM-T easy e sono stati sequenziati 10 cloni distinti.

2.3 Clonaggio del gene dell'IFN di spigola (*Dicentrarchus labrax* L)

2.3.1 Purificazione del DNA genomico

Per l'estrazione del DNA genomico è stato impiegato 1 ml di sangue di spigola seguendo il protocollo del Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Il sangue è stato aggiunto a 3 ml di Cell Lysis Solution e la soluzione ottenuta è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente viene centrifugata per 10 minuti a 2000 rpm. e il surnatante viene eliminato. A questo punto al pellet è stato aggiunto 1 ml di Nuclei Lysis Solution, la soluzione ottenuta è stata agitata invertendo il tubo varie volte per miscelarla bene. Sono stati poi aggiunti 330 µl di Protein Precipitation Solution e la soluzione è stata agitata vigorosamente per 20 secondi. La soluzione è stata poi centrifugata per 10 minuti a 2000 rpm. Il surnatante è stato trasferito in un tubo nuovo contenente 1 ml di isopropanolo ed il tubo è stato invertito varie volte per facilitare la miscelazione e la precipitazione del DNA. La soluzione è stata centrifugata per 10 minuti a 2000 rpm. Il surnatante è stato eliminato ed è stato aggiunto 1 ml di etanolo al 70%. La soluzione è stata nuovamente centrifugata per 10 minuti a 2000 rpm. L'etanolo è stato aspirato e poi il pellet è stato lasciato all'aria per 10 - 15 minuti per permettere la completa evaporazione dei residui di etanolo. Il DNA è stato reidratato con 100 µl di acqua sterile per 1 ora a 4°C. La concentrazione finale ottenuta è pari a circa 10ng/µl. La qualità del DNA genomico è stata testata mediante elettroforesi su gel di agarosio.

2.3.2 Primers utilizzati

Considerando la sequenza del cDNA dell'IFN di spigola e prendendo in esame l'organizzazione genomica dell'IFN di trota (Zou J. et al., 2007) sono stati disegnati vari primers, riportati nella tabella sottostante, per poter clonare l'intero gene IFN.

PRIMER	SEQUENZA (5'-3')
<i>IFNFR</i>	ACAGCTCTGCATCATGGG
<i>IFNGENFR1</i>	GCCATCGTATCCAGTAG
<i>IFNGENFR1</i>	GCCATCGTATCCAGTAG
<i>IFNGENFR2</i>	GGATCATAAATTCAGACAG
<i>IFNGENRV2</i>	CCCATGATGCAGAGCTGT
<i>IFNGENRV3</i>	CTCCCAGGCTTCAGCGCT
<i>IFNGENFR4</i>	AGCGCTGAAGCCTGGGAGC
<i>IFNGENRV4</i>	GTAGAATATCAAGCCATC

Tabella II-1. Primers impiegati per il clonaggio del gene dell'IFN di spigola.

Impiegando la coppia di primers IFNGENFR1 e IFNGENRV1 si ottiene un prodotto di 320 bp privo di introni; con i primers IFNGENFR2 e IFNGENRV2 si ottiene un prodotto di 450 bp contenente 2 introni; con i primers IFNFR e IFNGENRV3 si ottiene un prodotto di 435 bp contenente 2 introni; con i primers IFNGENFR4 e IFNGENRV4 si ottiene un prodotto di 225 bp privo di introni.

Il programma utilizzato è il seguente:

- denaturazione iniziale per 5 minuti a 94°C
 - denaturazione per 45 secondi a 94°C
 - annealing per 45 secondi a 50°C
 - estensione per 45 secondi a 72°C
 - Estensione finale per 10 minuti a 72°C
- } 35 cicli

Per effettuare le reazioni di PCR è stata impiegata la *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen). Sono stati impiegati 10 ng di DNA genomico per ogni reazione. I prodotti PCR sono stati visualizzati, sequenziati ed analizzati come descritto in precedenza.

2.4 Clonaggio della proteina Mx di spigola (*Dicentrarchus labrax*)

Per il clonaggio di questo gene è stato impiegato un cDNA di rene cefalico di spigola stimolato con poly I:C per 24 ore. Considerando la vicinanza dal punto di vista filogenetico esistente tra spigola ed orata inizialmente sono stati utilizzati primers dell'Mx che hanno funzionato per il clonaggio di questo gene in orata (*Sparus aurata*) (Tafalla C. et al., 2004):

MX5RACE: 5' – CTC TCT CCA TCA GGA TCC ACT TCC TGT GC – 3'

MX3RACE: 5' – AGT CTG GAG ATC GCC TCT CCT GAT GTT CCG – 3'

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione iniziale per 5 minuti a 94°C
 - denaturazione per 45 secondi a 94°C
 - annealing per 45 secondi a 62°C
 - estensione per 45 secondi a 72°C
 - Estensione finale per 10 minuti a 72°C
- } 35 cicli

PRIMER	SEQUENZA (5'-3')
<i>MXSBAFR</i>	GACCTGACGCTCATTGATC
<i>MXORA1RV</i>	CGAGGCAGAGATTTCTCG
<i>MXORA1FR</i>	CTGGTGCATCATATCGAG
<i>MXORA2RV</i>	GACCATGCCCTCGAAGGTC
<i>MXORA2FR</i>	CCGGGGTTCTGCAACTACAAG
<i>MXORA3RV</i>	CCTGAAGCATCTGCAGC
<i>MXSBAFR1</i>	GCTGGAGGCGCTGTGAG
<i>MXSBA6RV</i>	GGAACAACCACCAAGCTG
<i>MXSBARV1</i>	CCTGACAGCGCCTCCAGC
<i>MXSBAFR2</i>	CTCTGAACCAGCAGTATGAGG
<i>MXSB5FR</i>	GGCTTGGGTACACAAGTGA
<i>ADAPTOR</i>	CTCGAGATCGATGCGGCCGC
<i>OLIGO-dG*</i>	GGGGGGIIGGGIIGGGIIG

Tabella II-2. Primers impiegati per il clonaggio della proteina Mx di spigola.

*[I = inosina]

I prodotti d'amplificazione (20 µl) sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all' 1% (w/v). Il prodotto ottenuto, delle dimensioni attese (236 bp), è stato clonato in pGEM-T easy e sono stati sequenziati 10 cloni distinti.

Successivamente sono stati disegnati una serie di primers, riportati nella Tabella II-2, per poter clonare l'intero cDNA Mx partendo dalla prima sequenza ottenuta.

Il programma utilizzato è il seguente:

- denaturazione iniziale per 5 minuti a 94°C
 - denaturazione per 45 secondi a 94°C
 - annealing per 45 secondi a 52°C
 - estensione per 45 secondi a 72°C
 - Estensione finale per 10 minuti a 72°C
- } 35 cicli

Per effettuare le reazioni di PCR è stata impiegata la *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen). Con la coppia di primers MXSBAFR e MXORA1RV, il primo ottenuto dal frammento precedentemente ottenuto e il secondo sfruttando la strategia del clonaggio per omologia, si è ottenuto un frammento di 506 bp. Gli altri frammenti sono stati ottenuti applicando la tecnica appena descritta. I prodotti PCR sono stati visualizzati, sequenziati ed analizzati come descritto in precedenza.

2.4.1 Estensione dell'estremità 3'

L'estremità 3' del cDNA di nostro interesse è stata ottenuta mediante la tecnica della RACE-PCR (rapida amplificazione delle estremità del cDNA) (paragrafo 2.1.15). La reazione di PCR è stata eseguita impiegando il primer forward MXSBA5FR, specifico per Mx di spigola, accoppiato con il primer *adattatore*.

Il programma utilizzato in questo caso è:

- denaturazione iniziale per 5 minuti a 94°C
 - denaturazione per 45 secondi a 94°C
 - annealing per 45 secondi a 50°C
 - estensione per 45 secondi a 72°C
 - Estensione finale per 10 minuti a 72°C
- } 35 cicli

Il prodotto ottenuto è stato clonato in pGEM-T easy e sono stati sequenziati 10 cloni.

2.4.2 Estensione dell'estremità 5'

L'estremità 5' del cDNA di nostro interesse è stata ottenuta mediante la tecnica della RACE-PCR (rapida amplificazione delle estremità del cDNA) (paragrafo 2.1.16). E' stata eseguita una PCR utilizzando un primer specifico reverse MXSBARV1, a partire dalla sequenza iniziale, in coppia con il primer oligo- dG.

Il programma utilizzato anche in questo caso è:

- denaturazione iniziale per 5 minuti a 94°C
 - denaturazione per 45 secondi a 94°C
 - annealing per 45 secondi a 50°C
 - estensione per 45 secondi a 72°C
 - Estensione finale per 10 minuti a 72°C
- } 35 cicli

Il prodotto ottenuto è stato clonato in pGEM-T easy e sono stati sequenziati 10 cloni distinti.

2.5 Analisi d'espressione mediante Q-PCR

Lo studio di espressione di geni d'interesse viene effettuato mediante la tecnica della PCR quantitativa (Q-PCR), una tecnica che fornisce un'informazione precisa sull'effettiva quantità di gene espresso per ogni ciclo PCR.

L'esperimento di "comparative quantitation" è un metodo molto efficiente per paragonare livelli di mRNA tra differenti campioni, quando però non è importante sapere l'assoluta quantità del gene target (*Unknown*), ma il relativo incremento o decremento dell'espressione rispetto ad un campione di riferimento (*Calibrator*). Quindi, per "calibrator" si intende il campione (generalmente un controllo o un non stimolato) a cui il software assegna il valore di 1. La quantità del gene d'interesse (GOI) in ogni campione può subire delle variazioni, causate ad esempio dall'introduzione di quantità diverse di cDNA oppure da differenze nell'efficienza di estrazione dell'RNA o della trascrittasi inversa. Per ridurre gli effetti di queste variazioni viene introdotto un secondo gene (*Normalizer*), che viene espresso in ogni cellula e che non viene né up né down-regolato in seguito ad alcun tipo di trattamento. Quindi, il gene normalizzatore è tipicamente scelto tra queglii "housekeeping genes" che mantengono un'espressione costante.

L'equazione che permette di visualizzare la quantità del gene d'interesse e che viene applicata dal software versione 2.02 dell'apparecchio Mx3000P™ real time PCR (Stratagene) [Figura II-2], è la seguente (nota anche come “ $\Delta \Delta Ct$ method”):

$$\text{Normalized } \frac{\text{Unknown}}{\text{Calibrator}} = \frac{(1 + E_{\text{GOI}})^{-\Delta Ct_{\text{GOI}} (\text{Calibrator} - \text{Unknown})}}{(1 + E_{\text{Normalizer}})^{-\Delta Ct_{\text{Normalizer}} (\text{Calibrator} - \text{Unknown})}}$$



Figura II-2. Mx3000P® QPCR System (Stratagene)

Per Ct si intende il ciclo soglia e cioè il ciclo PCR al quale la fluorescenza misurata dallo strumento è considerata ad un livello significativo al di sopra del segnale di fondo. E' sul Ct che vengono collezionati i valori di fluorescenza per il “ $\Delta \Delta Ct$ method”.

Il software utilizza come valore di default un'efficienza pari al 100%. Non sempre le coppie di primers hanno tale efficienza di amplificazione. A questo si può porre rimedio realizzando una curva standard [Figura II-3] che metta in relazione l'efficienza del GOI con l'efficienza del normalizzatore. Si preparano dalle 5 alle 10 diluizioni del campione e si eseguono per ognuna i triplicati, sia per il normalizzatore che per il GOI.

L'inclinazione (i valori di Rsq) della curva standard permette la determinazione dell'efficienza di amplificazione che deve avere un range compreso tra 90-110%. Tale valore può essere inserito nella sezione “Analysis and terms settings” del software, cambiando i valori di default in base ai risultati ottenuti dalla curva standard.

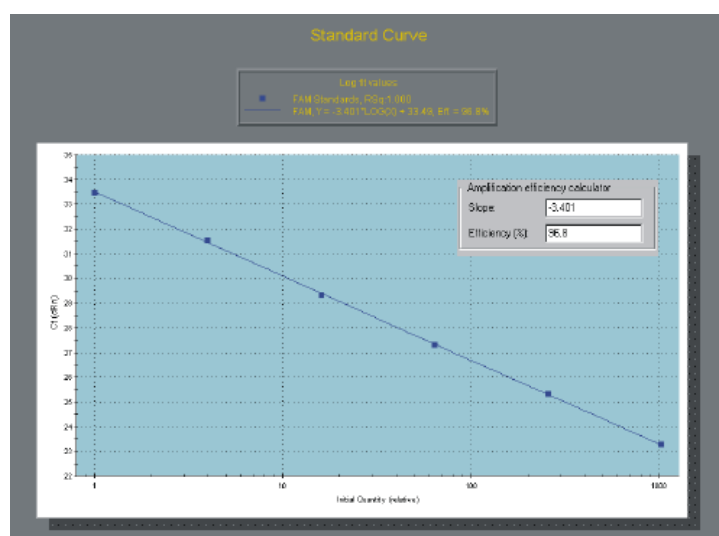


Figura II-3. Esempio di curva standard.

I livelli d'espressione sono stati determinati utilizzando la Brilliant SYBR Green Q-PCR Master Mix (Stratagene), seguendo le istruzioni della casa produttrice ed aggiungendo il ROX come sonda interna di riferimento (*reference dye*).

Il ROX non è collegato all'effetto dell'amplificazione perciò la fluorescenza che emette rimane costante per tutta la reazione di amplificazione e quindi serve come conferma del fatto che in ogni pozzetto è stato messo lo stesso volume di master mix.

Il fluorocromo SYBR Green ha un'affinità maggiore per il DNA a doppio filamento (dsDNA) piuttosto che per il DNA a singolo filamento (ssDNA) o per l'RNA ed è quindi l'ideale per monitorare l'accumularsi dell'amplificato durante la PCR. La fluorescenza emessa dal SYBR Green aumenta di circa 1000 volte quando è legato a dsDNA, rendendo questa sonda, in qualsiasi momento del saggio, un sensibile indicatore della quantità di dsDNA presente nella miscela di reazione [Figura II-4 e Figura II-5].

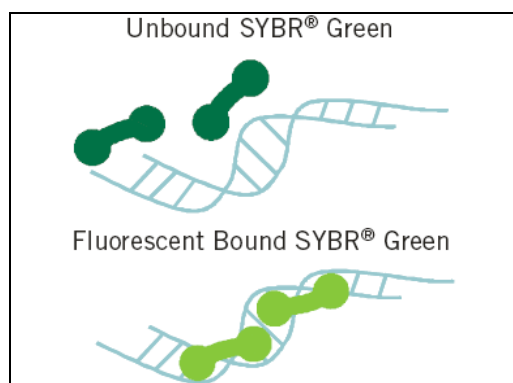


Figura II-4. Meccanismo d'azione del SYBR Green

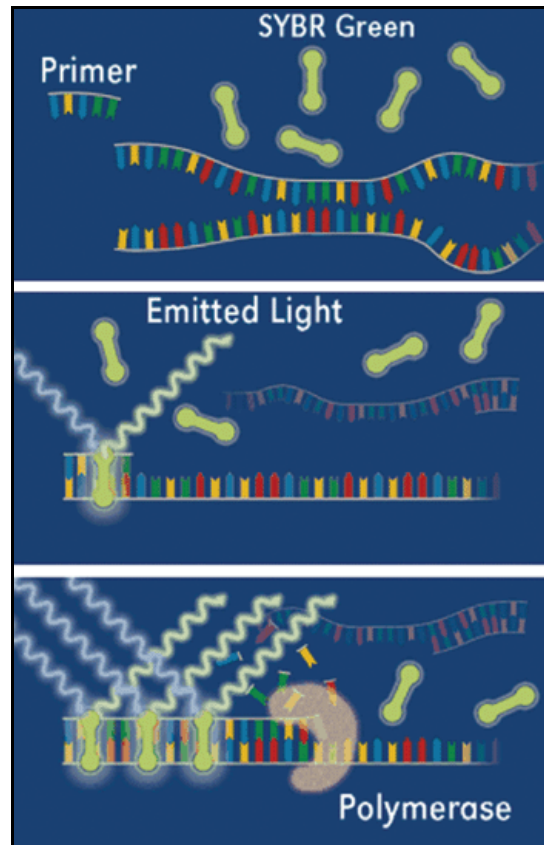


Figura II-5. Meccanismo d'azione delle reazioni di Q-PCR con la sonda SYBR Green

Per distinguere la fluorescenza derivata da prodotti PCR specifici da quella di prodotti PCR aspecifici, le reazioni di Q-PCR con la sonda SYBR Green sono associate alla curva di dissociazione, durante la quale i dsDNA vengono denaturati incrementando gradualmente la temperatura e monitorando ad ogni step i valori di fluorescenza. La riduzione dell'intensità di fluorescenza alla temperatura di Melting del prodotto PCR specifico è un indice qualitativo della proporzione di dsDNA attribuibile realmente all'amplificato di interesse.

Molti prodotti Q-PCR raggiungono la temperatura di Melting di 80-90°C, la diversa temperatura dipende dalle dimensioni e dalla sequenza del gene d'interesse. Idealmente dalla curva di dissociazione si dovrebbe ottenere un singolo picco nel range di temperatura appena considerato e la temperatura di Melting dovrebbe rimanere la stessa per i triplicati presenti in reazione. Se invece compare un secondo picco oltre quello d'interesse significa che è presente anche un altro prodotto di reazione e che i primers impiegati non sono specifici per il gene d'interesse.

A questo punto è necessario considerare i campioni NTC (*no template control*) per capire a cosa corrisponde l'eventuale ulteriore prodotto di reazione. Va ricordato che i campioni NTC sono costituiti da tutti i componenti della reazione eccetto il target (ad

esempio il cDNA d'interesse). Se il secondo picco è presente anche nei pozzetti NTC ciò potrebbe indicare la presenza di dimeri di primers: è accettabile la minima presenza di dimeri di primers, il cui picco nel grafico di dissociazione è inferiore ai 75°C e non presenta un'elevata perdita di fluorescenza. Se invece siamo di fronte ad una contaminazione specifica il secondo picco si andrà a sovrapporre ai corrispondenti picchi ottenuti nei campioni unknown.

Osservando la Figura II-6a è possibile vedere un picco più alto per la maggior parte dei campioni a 78°C ma alcuni campioni hanno picchi a 79°C. I picchi distinti stanno ad indicare la presenza di prodotti PCR multipli. Il picco più basso che si osserva a 75°C invece rappresenta il picco corrispondente ai dimeri di primers. Nell'esempio mostrato in Figura II-6b, la presenza di un singolo picco per tutti i campioni conferma un'amplificazione specifica. I dati ottenuti da questa reazione sono affidabili e significativi per l'analisi e l'interpretazione.

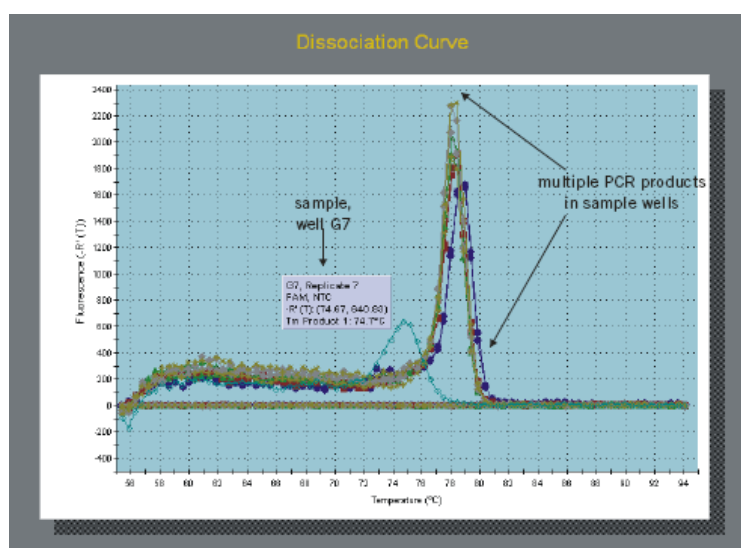


Figura II-6a. Esempi di curve di dissociazione.

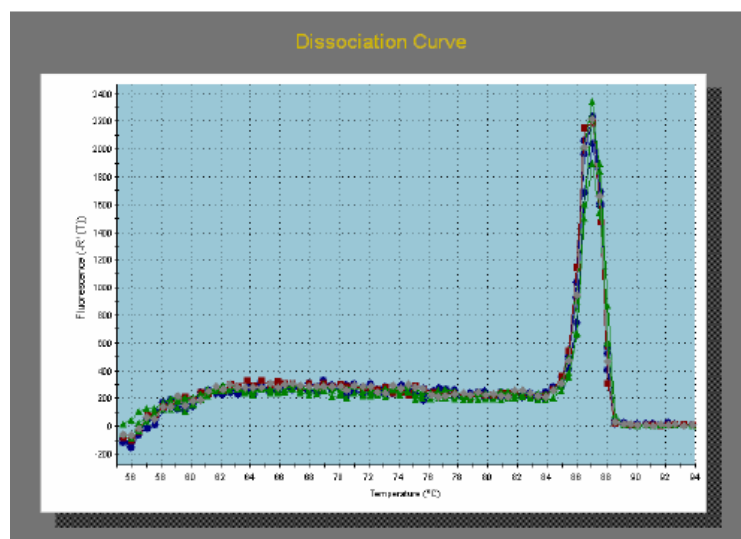


Figura II-6b. Esempi di curve di dissociazione.

Approssimativamente 10 ng di cDNA (in triplicato) sono stati usati in ogni reazione di PCR e per ogni coppia di primers è stato effettuato il controllo negativo (in duplicato), aggiungendo acqua al posto del template.

Il programma utilizzato di solito è:

- denaturazione iniziale per 10 minuti a 95° C
 - denaturazione per 45 secondi a 95° C
 - annealing per 45 secondi a 52° C
 - estensione per 45 secondi a 72° C
 - analisi della curva di melting da 52° C (metodo “all points”)
- } 35 cicli

I valori di fluorescenza vengono raccolti durante la fase di estensione dell'amplificazione e per l'analisi dei dati viene utilizzato il metodo “endpoints” del software Mx3000P™.

2.5.1 Stimolazione “in vitro” delle cellule di spigola con poly I:C

Sono stati disegnati primers specifici sia per i geni di interesse che per l' rRNA 18S scegliendoli in modo da avere prodotti di amplificazione piccoli (circa 200 bp).

RQIFNFR: 5' - GCGTCCAAAGCATCAGCT - 3'

RQIFNRV: 5' - CCAATCACAGGAGCGAAG - 3'

RQMxFR: 5'–GTCTGGAGATCGCCTCT–3'

RQMxRV: 5' – TCTCCATCAGGATCCAC – 3'

RQRIBFR: 5' – CCAACGAGCTGCTGACC – 3'

RQRIBRV: 5' – CCGTTACCCGTGGTCC – 3'

Dall'impianto di acquacoltura ASA S.p.a. di Civitavecchia sono stati prelevati giovanili di spigola di circa 150 g di peso.

Cellule leucocitarie del rene cefalico, prelevato dalle spigole, sono state isolate come descritto nel paragrafo 2.1.5 e sono state risospese in 1 ml di terreno L15 (Gibco), per poterle contare.

Per questo esperimento sono state utilizzate delle fiaschette (Greiner Bio – One) da 50 ml, in ciascuna delle quali vengono inseriti 1×10^5 cells/ml di leucociti di rene cefalico in 5 ml di terreno L15 addizionato con gentamicina. 3 fiaschette sono state incubate a 18 °C per 6 ore e 24 ore con 50 µg/ml di poly I:C (Sigma). I campioni di controllo non sono stati stimolati ma soltanto incubati per gli stessi tempi. Si è proceduto quindi con l'estrazione dell'RNA totale (paragrafo 2.1.6) che è stato usato per fare una RT-PCR con i primers specifici per il gene della β -actina per verificarne l'integrità e successivamente è stata determinata la concentrazione dell'RNA totale e preparato il cDNA.

A questo punto è stata condotta una Q-PCR per indagare l'espressione dei 2 geni d'interesse impiegando come normalizzatore l'rRNA 18S. Approssimativamente 10 ng di cDNA (in triplicato) sono stati usati in ogni reazione di PCR e per ogni coppia di primers è stato effettuato il controllo negativo (in duplicato), aggiungendo acqua al posto del template.

Il programma utilizzato per le tre coppie di primers è:

- denaturazione iniziale per 10 minuti a 95° C
 - denaturazione per 45 secondi a 95° C
 - annealing per 45 secondi a 52° C
 - estensione per 45 secondi a 72° C
 - analisi della curva di melting da 52° C (metodo “all points”).
- } 35 cicli

I valori di fluorescenza vengono raccolti durante la fase di estensione dell'amplificazione e per l'analisi dei dati viene utilizzato il metodo “endpoints” del

software Mx3000PTM. L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata eseguita mediante il programma GraphPad Prism 4.

2.5.2 Stimolazione “in vitro” con poly I:C delle cellule DLEC di spigola

Per questo esperimento sono state utilizzate 5 fiaschette (Greiner Bio – One) da 50 ml. Due fiaschette (4×10^6 cellule in ogni fiaschetta) sono state incubate rispettivamente a 18 °C per 6 ore e 24 ore con 20 µg/ml di poly I:C (Sigma) in terreno L-15 (Gibco). I campioni di controllo sono stati posti in L-15 supplementato con gentamicina fino a raggiungere un volume finale di 5 ml e analizzati alle stesse condizioni dei campioni stimolati. Si è proceduto quindi con l'estrazione dell'RNA totale (paragrafo 2.1.6) con cui si farà l'RT-PCR con i primers specifici per il gene della β -actina per verificarne l'integrità e la concentrazione dell'RNA totale (paragrafo 2.1.8). E' stata eseguita una Q-PCR con i primers specifici per rRNA 18S, IFN e Mx come indicato in precedenza. L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata eseguita mediante il programma GraphPad Prism 4.

2.6 Modelling della struttura 3D del gene IFN di spigola

La determinazione del modello tridimensionale di IFN di spigola è stata effettuata dal gruppo di ricerca del Dott. Angelo Facchiano del CNR - Istituto di Scienze dell'Alimentazione di Avellino, che ha una notevole esperienza in questo campo e che collabora con il laboratorio dove ho svolto la tesi di Dottorato.

Il modello tridimensionale di IFN di spigola è stato ottenuto utilizzando il modello di IFN alfa-2 umano complessato con il recettore per l'IFN umano (IFNAR-2) (PDB code: 2HYM) (Quadt-Akabayov S.R. et al., 2006).

L'identità delle sequenze amminoacidiche di IFN di uomo e spigola è piuttosto bassa (circa il 24%), quindi una procedura accurata è stata impiegata per cercare il miglior allineamento tra le sequenze, come descritto in altri lavori (Facchiano A.M. et al., 2001; Marabotti A. et al., 2004; Scapigliati G. et al, 2004; Costantini S. et al., 2005) e in accordo con regole recentemente messe a punto (Dalton J.A.R. and Jackson R.M., 2004; Wallner B. and Elofsson A., 2005) per migliorare la qualità dei risultati di modelling. La ricerca per l'identità di sequenza nei database è stata effettuata con il programma BLAST (Altschul S.F. et al., 1990).

L'allineamento delle sequenze delle proteine IFN da 20 differenti organismi è stato fatto con il programma 3D-Coffee (O'Sullivan O. et al., 2004), con l'aggiunta di poche

rifiniture manuali per migliorare la posizione delle strutture secondarie. Il MODELLER v7 (Sali A. and Blundell T.L., 1993) compreso nel programma InsightII (Accelrys, San Diego, CA, USA) è stato usato per costruire modelli a 10 atomi dell' IFN di spigola. La struttura migliore tra quelle ottenute è stata selezionata usando il programma ProsaII (Sippl M.J. 1993). Per selezionare il modello migliore sono state valutate anche le proprietà stereochimiche con il programma PROCHECK (Laskowsky R.A. et al., 1993). I modelli sono stati analizzati con il programma DSPP per assegnare le strutture secondarie (Kabsch W. and Sander C., 1983). L'analisi di accessibilità al solvente degli amminoacidi presenti nella regione modellata è stata eseguita con il programma PDBsum (Laskowsky R.A. et al., 2005).

Capitolo III - Risultati

3.1 Analisi della sequenza di cDNA dell'interferone (IFN) di spigola (*Dicentrarchus labrax* L)

L'RNA totale utilizzato per il clonaggio dell' IFN è stato estratto da cellule di rene cefalico (20×10^6) stimulate con 20 µg/ml di poly Inosinic : poly Cytidilic acid (poly I:C) per fornire l'espressione dell'IFN. Infatti, il Poly I:C è un poliribonucleotide sintetico a doppio filamento che fornisce delle risposte immunitarie simili a quelle che si osservano durante l'infezione virale. Esso viene riconosciuto dalle cellule come un DNA estraneo ed è un buon induttore dell'IFN (Robertsen B. 2006; Dong et al., 2008) in altre specie di Teleostei.

La PCR condotta con i primers IFNFR e IFNRV fornisce un prodotto delle dimensioni attese, cioè 188 bp. Tale prodotto è stato sequenziato e mostra similarità con le altre molecole IFN conosciute.

```

→ Oligo-dG
AGCCATCGTATCCAGTAGAGCCATCAATACAGCAATCAATATAGCAATCAGTACAGCAAT
CAGTACAGCAATCAGTACAGCAGTACAGTACAGCCACCAGTATAGCAATCAGTATAGCAAT
CAATACAGCAATCAGTATAGCAATCAGTGCAGCAACCAACACAACACCAGCACTCATCTG
AACTTACTCTATACAAAGTCAATCTCTACCTTTTGAAG
atgctcaacaggattttcttctgtgtgctgtctctcagctctgtacagtgaggtccctcg
  M L N R I F F V C L S L S L Y S A G S S
ctgagctgcagatggatcatggatcataaattcagacagcacagtaaaaactctttggct
  L S C R W I M D H K F R Q H S K N S L A
ctactggatcagatggctaataactccactaacaccactgaggatgctgaagtggaggac
  L L D T M A N N S T N T T E D A E V E D
                                → RQIFNFR
actgtggccttccttaattcttctgtacagacaggcgtccaagcatcagctgaggatcaa
  T V A F P N L L Y R Q A S K A S A E D Q
cttgcttcacagttcagattcttaatgagacggctgccctgtttgaggaggatacagc
  L A F T V Q I L N E T A A L F E E D H S
→ IFNFR
tctgcatcatgggaggagaacacagtgaggagactttgtcaatgttgtaacccggcaggct
  S A S W E E N T V E D F V N V V T R Q A
                                RQIFNRV ←
gacaaccttcgctcctgtattgggagccacggccacaagactaacaagaagctacaaatg
  D N L R S C I G S H G H K T N K K L Q M
                                → IFNFRA                                IFNRV ←
tatttcataaaactttcaagccacgtcataaagaaaatgggccacagcgtgaagcctgg
  Y F M K L S S H V I K K M G H S A E A W
gagctgatcaggaaggaaatcaaaacccatctgatgagagcggaccagctggtttcttct
  E L I R K E I K T H L M R A D Q L V S S
ctactcacaaccaactaa
  L L T T N -
AAGCTGTACCTGTCTGTTAGATTCATTTATTACATGAAGTCTTTTATTATTATTATTTA
TTTATTCATCTATTATTATTCATGTATTATTGAATTGAGCTGTTTGTATTAAATTGATGG
CTTGATATTCTACAGTCAGTATTATATAAATTATTATGTGATTAATTTGTTGATTAT
TTAAGTTTTTTTCATACCTGCAAAAAGCCATAAAAAATATGACTTTCTCCAGCAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Oligo-dT adaptor ←

```

Figura III-1. Sequenza nucleotidica ed amminoacidica dell'IFN di spigola. I primers impiegati per il clonaggio, le sequenze nucleotidiche d'inizio e di fine sono indicate in grassetto, il putativo peptide segnale è in corsivo, i 3 putativi siti di N-glicosilazione sono sottolineati, il segnale di poliadenilazione in grassetto e sottolineato.

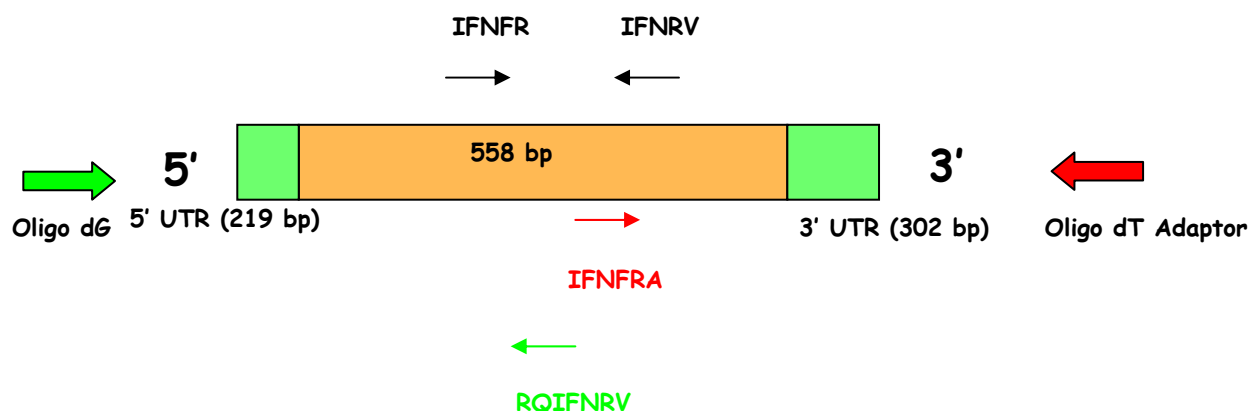


Figura III-2. Schema della posizione dei primers impiegati per il clonaggio del cDNA dell'IFN di spigola.

La 3' RACE-PCR condotta con il primer IFNFRA (basato sull'iniziale sequenza di 188 bp) e l'Oligo-dT primer dà un prodotto di 390 bp. La 5' RACE-PCR invece è stata effettuata impiegando il primer RQIFNRV (basato anch'esso sull'iniziale sequenza di 188 bp) e l'Oligo-dG e dà un prodotto di 600 bp [Figura III-1 e Figura III-2].

L'intero cDNA (EMBL accession number AM765846) è costituito da 1047 bp, tale sequenza è stata confermata mediante PCR usando primers che amplificano la sequenza codificante completa. L'UTR (*un-translated region*) contiene un segnale di poliadenilazione (AATAAA) posizionato 18 bp prima della coda di poly (A).

Un'analisi della sequenza di cDNA dell'IFN di spigola rivela la presenza di un putativo peptide segnale costituito da 22 amminoacidi (MLNRIFFVCLSLSLYSAGSSL), 3 potenziali siti di N-glicosilazione ma nessun potenziale sito di O-glicosilazione.

La comparazione della sequenza nucleotidica ed amminoacidica dell'IFN di spigola con quella in altre specie è mostrata nella Tabella III-1. L'identità nucleotidica ed amminoacidica maggiore si ha con lo spinarello (*Gasterosteus aculeatus*), seguito da medaka (*Oryzias latipes*) e Fugu (*Takifugu rubripes*), mentre l'identità minore si ha con l'anatra (*Anas platyrhynchos*), seguita da silurana tropicale (*Xenopus tropicalis*) e dal tacchino (*Meleagris gallopavo*).

	% Nucleotide identity	% Amino acid identity	% Amino acid similarity
Japanese medaka	72,7	58,8	74,3
Three-spined stickleback	77,9	66,1	79,6
Fugu rubripes	71,4	57,8	74,1
Spotted green pufferfish	68,5	55,7	73,0
Atlantic salmon	53,1	37,1	55,4
Rainbow trout 1	51,5	32,4	48,6
Rainbow trout 2	52,6	35,8	50,5
Rainbow trout 3	46,5	28,0	45,6
Zebrafish 1	51,7	31,4	53,6
Zebrafish 2	48,2	20,9	41,3
Goldfish	49,4	31,3	47,7
Channel catfish	50,2	26,6	47,7
Silurana tropicalis 1	44,9	18,4	37,2
Silurana tropicalis 2	47,8	24,9	38,3
Human α	48,0	23,6	40,9
Mallard	45,0	17,8	32,2
Turkey	46,0	20,6	35,5
Human λ	43,1	16,9	30,1

Tabella III-1. Percentuale d'identità nucleotidica ed amminoacidica e similarità dell'IFN di spigola con altre sequenze IFN note. I valori più alti sono evidenziati in grassetto. EMBL accession numbers: spigola (*Dicentrarchus labrax*) AM765846; medaka (*Oryzias latipes*) CAM32419; spinarello (*Gasterosteus aculeatus*) CAM31707; fugu (*Takifugu rubripes*) CAM82750; pesce palla (*Tetraodon nigroviridis*) CAD67762; salmone (*Salmo salar*) AAP51035; trota 1 (*Oncorhynchus mykiss*) AJ580911; trota 2 (*Oncorhynchus mykiss*) AJ582754; trota 3 (*Oncorhynchus mykiss*) AM235738; pesce zebra 1 (*Danio rerio*) AJ544820; pesce zebra 2 (*Danio rerio*) NP_001104552; pesce rosso (*Carassius auratus*) AAR20886; pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) AY847296; silurana tropicale 1 (*Xenopus tropicalis*) BN001169; silurana tropicale 2 (*Xenopus tropicalis*) BN001170; uomo α (*Homo sapiens*) NM_000605; uomo λ (*Homo sapiens*) NM_172138; anatra (*Anas platyrhynchos*) P51526; tacchino (*Meleagris gallopavo*) P51527.

Le percentuali d'identità nucleotidica ed amminoacidica sono abbastanza simili per 2 (1 e 2) delle 3 sequenze identificate in trota, *Oncorhynchus mykiss* (Zou J. et al., 2007). Infine, esse sono più alte con l'IFN- α (IFN di tipo I) rispetto a quelle ottenute con l'IFN- λ (IFN di tipo III).

Un allineamento multiplo della sequenza amminoacidica IFN di spigola con altre sequenze IFN note è stato fatto per analizzare la conservazione dei residui amminoacidici caratteristici coinvolti nei domini strutturali [Figura III-3].

	<		EXON 1		>			
Diclab	-----	-----	-----MLNRI FFFVCLSLSLY SAGSSLSLSCRW	IMDHKFRQHS	KNSLALLDTM ANNSTNTTE-			
Orylat	-----	-----	H.L V.A.AL.V..A G..F..R...	L-....K.F.	DT..D..EK. V..A..S..G			
Gasacu	-----	-----	C.M .L.FVC....	.SA.....	V-....SHL. RT.MD....L .H....S..-			
Takrub	-----	-----	P-- LL....CV. .Q..P.G...	L-.D....Y.	HK..E.... V....SSV-			
Tetnig	-----	-----	T-- VLL....CVC .Q..P.G...	L-EE..T.Y.	SL..S...N. KS....SSL-			
Salsal	-----	-----	--MYTVQSWT CICLIIC.MQ .VCHC--.D.	.RH.YGHLS.	E-Y.S...Q. GGD-----			
Oncmyk1	-----	-----	-----MQ .VCHC--.D.	.RH.YGHLSA	E-Y.P...Q. GGD-----			
Oncmyk2	-----	-----	--MCT.QSWT CLFLILC.MQ .VCHC--.D.	.QH.FGHLSA	E-Y.SQ.EQ. GGD-----			
Oncmyk3	-----	-----	----MAVLKW LSI..T.FCQ GTAA.KP...	TQFRLGKLND	V-.ID..SD. GGIFP-----			
Danrer1	-----	-----	-----MWT YIFVIYI.V.Q .QS.AST.E.	LG-RYRIITT	E-.N..KN. GKG-----			
Danrer2	-----	-----	-----MEF WQFVAF.CPA LFFAHITSKP	TNCFMR.K.V	.TAYS..ES. GGLFP---RE			
Caraur	-----	-----	---MKTQMWY YMFVMF.T.Q GQC.A--.E.	LG-RYRMISN	E-.S..KE. GKG-----			
Ictpun	-----	-----	---MDIKQSWIC LYFL.FFIVQ ERSEA--.N.	MISQYRAKNN	F-CVS..KE. GGE-----			
Xentro1	MFKRNTFGSY	CCINYAIYVS	ITVTTLHMAS IQTI.L.V.I PIVQ.QN.K.	LQPKQEYLNR	Q-T.KTFEE. NPPE----DY			
Xentro2	-----	-----	---MLPMGQ WS.L.L..T .IVH.Q..K.	LHPKQEYLNT	Q-I.KAFNE. MPLK----T			
Homsapα	-----	-----	-----MALT .ALLVA.LVL .CK..VG.DLPQTHSLG.	RRT.M..AQ.RR.	I-----L			
Homsapλ	-----	-----	-----MKL DMTGDCTPVL VLMAAV.TVT	GA.PVARLHG	ALPDARG.HI AQFKSLSPQE LQAFKRAKDA LEE.----LL			
Anapla	-----	-----	-----MPG PSAPPPPAIY SALA.L.L.T	PPANAF..SP	LRL.DSAFAW D-.Q..RN. .PSP-----			
Melgal	-----	-----	-----MAV PASPQHPRGY GILL.T.LMK	ALAAAAA.NH	LRPQDATFSR D-.Q..RD. .PSP-----			
	EXON 2	>	EXON 3	>				
Diclab	DAEVEDTVAF	PNLLYRQASK	ASAEDQLAFT	VQILNETAAL	FEE----DHS SASWEENTVE	DFNVVVT-RQ	ADNLRSCIGS	
Orylat	..TEDIE.D.	.HH.....	E...N.V... .V.K.V.S...	S. QQI..	K.L.G..N-..	..E.H..VSE		
Gasacu	...NN----.	.N..S....	K.R.S .V.E.M...	.V.....	N...D.Q..D	H.LF...-K.	..S.H..S--	
Takrub	--.P.EM.I.	.QE....TFN	K..LA A..M...V...	LM-----	G...D.KQ..	NL...L.-Q.	QA.MV.	
Tetnig	--.A...AI.	.EV....TFN	R...A A.....	Y.	G....KS.	N...IL.-Q.	G..VA.	
Salsal	ITKQDAP.F.	.TS...HIDD	.EV...VR.L KETIYQITK.	.DG----NMK	.VT.DKKKLD	..L.ILE-..	LE..K..VSP	
Oncmyk1	ITKQDAP.L.	.TS...HIDD	.EF...KVI.L KETIYQITK.	.DG----NMK	.T.DKKKLD	..L.ILE-..	LE..N..VSP	
Oncmyk2	ITKQDAP.L.	.TS...HIYD	.EF...KVR.L NETIYQIIK.	.DGNRNRNRK	.VT.DKKKLD	..L.ILD-..	FE..S..VSP	
Oncmyk3	-LMCAEENVE	QMFPEDLYKN	TEG..VSVVA LEAMRYVEQ.	YNN----SLT	.VT.NKIKLN	M.Q..IY-..	VQ..EL.VVG	
Danrer1	Y.D--LETP.	.SR..TLMD	SKV...VK.L .LT.DHIIH	MDAR--EHMN	.VN.DQ....	..L.ILH-.K	SSD.KE.VAR	
Danrer2	CLKENVRIT.	.KYALQSNN	NQKTGVAKAV YK.MDHIDF.	.AN----SY	PEA.NKRK	D.N.Q.I.Y--R	LTKENQ..MR	
Caraur	YP.G-TK.S.	.GR..NMIDN	.KV...VK.L .LT.DHIIH	MDAR--EHMN	.VQ.NLQ...	H.LT.LN-..	SSD.KE.VAR	
Ictpun	IVQ--VNR.	.HKA.SEID.	.K...VR.L A.ATEQIISV	.NV---SHVD	EVK.DRSALD	E.L.ILNT..	LTE.TK.TST	
Xentro1	.ESCQYDSIE	LPNIDEIY.I	SQM.EMVLAV RGV...MRF	YMK---H.E	.MGCKQQAW	R.QQLLY-Y.	INQ.EA..PE	
Xentro2	EEIC.EHPTD	LPNTESTY.V	SQV.AGALAV REV...MRF	YMK---H.E	.MGCKQQAW.	R.QQLLY-Y.	INQ.EA.VSQ	
Homsapα	FSCLK.RHD.	GFPQEEFGNQ	FQKAETIPVL HEMIQQIFN.	.ST----KD.	..A.D.TLLD	K.YTELY-Q.	LND.EA.VIQ	
Homsapλ	LKDCRCHSRL	FPRTWDLRQL	QVR.RPM.LE AELALTLKV.	EAT----AD	TDPALVDVLD	QPLHTLH-HI	LSQF.A..QP	
Anapla	TQPCPQQH.P	CSFPDITLDT	NDTQQAHTA LHL.QHLFD	LSS----PST	P.H.LHTARH	.LL.QLQ-HH	IHH.ER.FPA	
Melgal	PQPCPQHN.P	CSFNDITLDT	NNTQQADKT. HN..QHLFKI	LSG----PTT	P.H.IDSQRQ	SLL.QIQ-.Y	.QH.EQ.LAD	
	EXON 4	>	EXON 5	>				
Diclab	HGHK-TNK--	-----KLQM	YFMKLSSHVI	KKMGHSAEAW	ELIRKEIKTH	LMRADQLVSS	LLTTN-----	-
Orylat	SLVHKK.R--	-----R.	.KR.LD.IL	.Q.Y....	.T...T.A.	.L..QR.L.P	.ISSK-----	-
Gasacu	...RK...--	-----	.KR..H..L	EQ.....	.M.A.	.KT....L	.SN-----	-
Takrub	P...-RSE--	-----EVER	.NR..N.IL	..DY..A.	...E..E.L	.QTHL...T	.S.P-----	-
Tetnig	P.QS-RS--	-----E.HK	.TRI.T.IL	R.TD..G.	.V.EK.RSL	...HL.LTT	H-----	-
Salsal	AMKPEK----	-----R.KR	.K..NKN.L	R..NY..Q.	T.R.	.Q.L.I.AAQ	MY-----	-
Oncmyk1	AMKPER----	-----R.KR	.K..N.K.L	R..NY..Q.	T.RN	.Q.L.I.AAQ	MY-----	-
Oncmyk2	VVKPEK----	-----R.KR	.RN.NRK.L	R..NY....	T.R.	.Q.L.I..GQ	MY-----	-
Oncmyk3	GVWESSGDG--	---GSVT.KT	.N..-NT.L	.EKE...C.	.IV...REN	.VQFKKFID.	RVKP-----	-
Danrer1	YAKPAHKES--	---YEIRIKR	H.RT.-KKIL	.KQY....	.Q..RVV.S.	.Q.M.IIA.N	ARVNPRV----	-
Danrer2	MRAQG.VDDF	P-ARDDA.KS	.N..-ATLL	RNKDN.FC.	.VV.H.LLGV	S--.IIQPK	-----	-
Caraur	Y-QPSHKES--	---YEK.INR	H.KI.-KKNL	.KEY..Q.	.Q..RAV.H.	.Q.M.IIA.I	A--NRR----	-
Ictpun	YAEERAGHSP--	---TER..RK	H.K..-KKFL	NEANY..DSL	.R..NVVQH.	.W.M.IIAAN	VKQKLLKRTN	-
Xentro1	TAENPVFN--	-----QTISD	QYQA.EQILQ	E--NT.CTR	DI.QS..RGN	.QLVG..A.R	ARRQRLQRT	A
Xentro2	TEENDLL--	-----ESISE	E.NL.ETM.L	E.D-N..CV	DF.HL.TRRN	.QQVL..S.R	RRQRLQRP	Q
Homsapα	GVGVTTETPLM	KEDSILAVRK	.QRI-TLYL	.EKKY.PC.	.VV.A..MRS	FSLSTN.QE.	.RSKE-----	-
Homsapλ	QPTAGPRTRG	-----R.HH	WLYR.--QEA	P.KESPGCLE	ASVTFNLFRL	.T.DLNC.A.	GDLCV-----	-
Anapla	DAARLHRRGP	R-NLHLSINK	.GCI-Q.FL	QNHTY.PC.	DHV.L.AHAC	FQ.IHR.TRT	MR-----	-
Melgal	SHTRSRTRWP	H-NPHLTINK	H.SC.-HAFL	HDNDY..C.	DHV.LRARAW	.LHIHD..RN	TR-----	-

Figura III-3. Allineamento della sequenza amminoacidica di spigola con altre molecole IFN note. Le regioni corrispondono alle sequenze amminoacidiche dei 5 esoni identificati mediante il clonaggio del gene IFN di spigola. Le cisteine in spigola sono evidenziate in grassetto, i putativi siti di N-glicosilazione sono sottolineati e il peptide segnale è in corsivo. Gli EMBL accession numbers sono riportati nella Tabella III-1.

Nella sequenza IFN di spigola sono presenti 2 cisteine (Cys²³ and Cys¹²⁶) e risultano conservate in tutte le sequenze di Teleostei (soltanto nel pesce zebra la prima cisteina non si allinea perfettamente con le altre); mentre sono presenti e conservate 2 ulteriori residui di cisteina nell' IFN- α umano, in una sequenza IFN di trota (IFN3), in una di pesce zebra (IFN2), in due di silurana tropicale (IFN1 e IFN2), e nelle sequenze di uccelli (anatra e tacchino) prese in esame. Questi residui sono importanti poiché mediante analisi strutturale è stato possibile dimostrare che nell'IFN- α umano le 4 cisteine formano 2 ponti disolfuro (Klaus W. et al., 1997), invece nell' IFN- β umano un singolo ponte è formato dalle 2 cisteine presenti (Karpusas M. et al., 1997).

Nella sequenza IFN di spigola sono inoltre presenti un putativo peptide segnale di 22 amminoacidi (MLNRIFFVCLSLSLYSAGSSLS), e 3 potenziali siti di N-glicosilazione (NST, NTT, NET). Alcuni residui sono conservati in quasi tutte le sequenze di pesci, in particolare: Leu19, Leu20, Phe42, Pro43, Leu46, Tyr47, Glu56, Asp57, Leu72, Trp82, Phe90, Leu101, Phe120, Leu123, Ser134, Ala135, Trp138, Glu139, Arg142, Leu149. La Phe42 è stato dimostrato essere importante per l'attività biologica dell' IFN- α umano (Waine et al., 1992), invece altri residui conservati sono stati identificati come possibili siti di legame per le subunità recettoriali IFNAR-1 e IFNAR-2 dal database dei domini conservati (Marchler-Bauer et al., 2007) e pertanto potrebbero essere putativamente coinvolti nelle interazioni con il corrispondente recettore per l'IFN nei pesci.

L'analisi filogenetica [Figura III-4] effettuata impiegando le sequenze amminoacidiche mostra che l'IFN di spigola è raggruppato con altre sequenze conosciute di Teleostei. Sono presenti 3 raggruppamenti principali: il primo per i Salmoniformi, il secondo per i Cipriniformi ed il terzo per i Tetraodontiformi in cui è inclusa la spigola, un Perciforme. La 3° sequenza di trota e la 2° sequenza di pesce zebra sembrano differire da tutte le altre sequenze dei pesci in quanto compaiono in un cluster differente insieme con le sequenze dell'IFN- α di Uccelli ed Anfibi. L' IFN- λ umano potrebbe essere considerato come un outgroup di questo albero filogenetico.

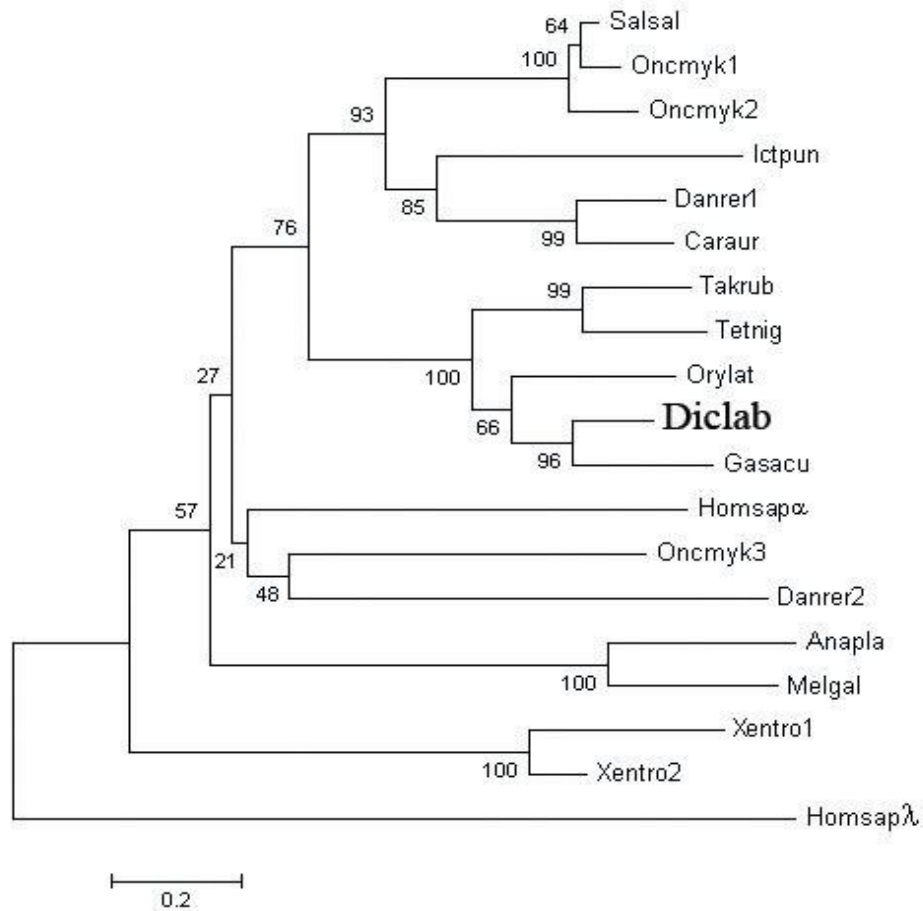


Figura III-4. Albero filogenetico che mostra la relazione esistente tra la sequenza IFN di spigola con le altre molecole IFN note. L'albero è costruito usando il metodo "neighbour-joining" ed il valore di bootstrap è pari a 10000. 0.2 indica la distanza genetica. Gli EMBL accession numbers sono riportati nella Tabella III-1.

3.2 Analisi strutturale del gene IFN di spigola (*Dicentrarchus labrax* L)

L'analisi strutturale del gene IFN di spigola è stata fondamentale per poter osservare l'organizzazione esoni/introni del gene al fine di classificarlo in riferimento a quanto già osservato per i Mammiferi.

L'amplificazione mediante PCR del DNA genomico, usando dei primers dedotti dalla sequenza del cDNA dell'IFN, fornisce dei prodotti in grado di rivelare la sequenza nucleotidica completa del gene.

Il clonaggio è stato eseguito impiegando una serie di primers che hanno permesso l'identificazione di tutto il gene. IFNGENFR1 e IFNGENRV1 forniscono un prodotto di 320 bp con nessun introne al suo interno; IFNGENFR2 e IFNGENRV2 un prodotto di 450 bp contenente 2 introni (introne 1 e introne 2); IFNFR e IFNGENRV3 un prodotto di 435 bp contenente 2 introni (introne 3 e introne 4); IFNGENFR4 e IFNGENRV4 infine un prodotto di 225 bp con nessun introne. Infine, è stata eseguita una PCR con i primers IFNGENFR1 e IFNGENRV4 che dà un prodotto di 1500 bp corrispondente all'intero gene IFN. L'intera sequenza nucleotidica del gene IFN di spigola è costituita da 1475 bp (EMBL accession number AM946399) con 5 esoni e 4 introni [Figura III-5].

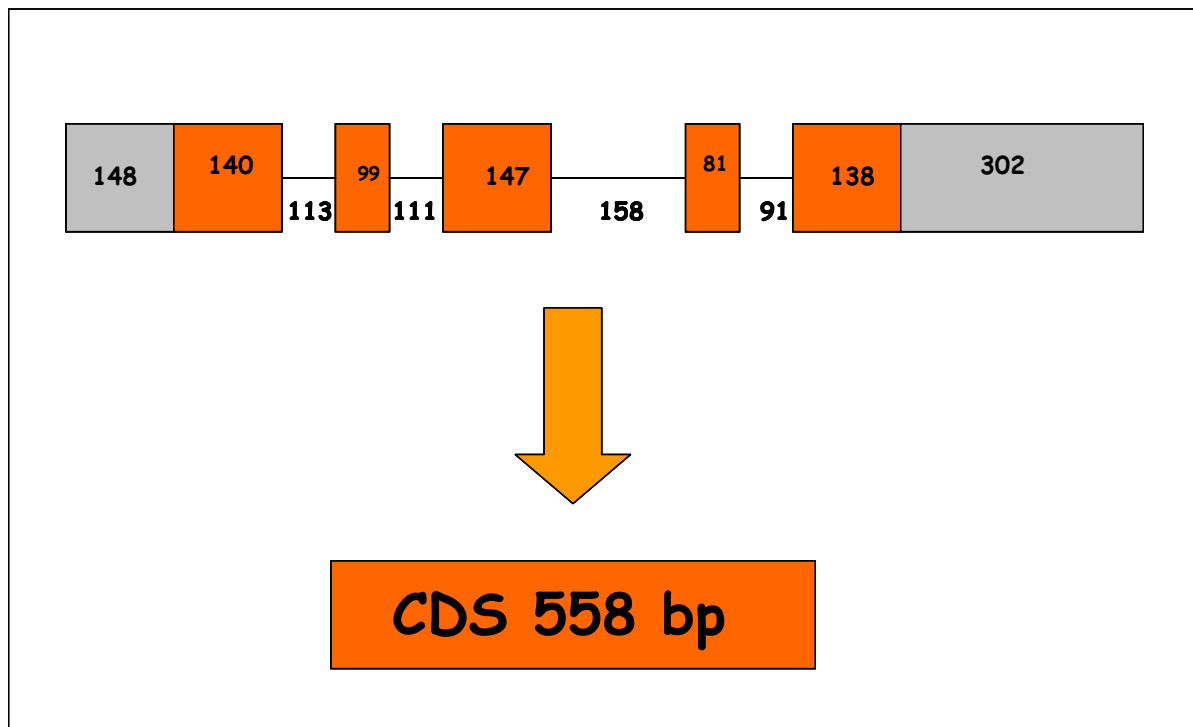


Figura III-5. Organizzazione esoni/introni del gene IFN di spigola.

Tutti gli introni iniziano con la tipica sequenza nucleotidica “GT” e terminano con l’usuale sequenza “AG”, con solo il primo introne non in fase tra l’esone 1 e l’esone 2. Nell’allineamento multiplo mostrato in Figura III-3 sono evidenziati i confini dei singoli esoni, non risultano amminoacidi conservati all’inizio o alla fine di questa sequenza, eccetto la cisteina alla fine dell’esone 3.

Nella Figura III-6 viene schematicamente comparata l’organizzazione esoni/introni del gene IFN in spigola con quelle di altre specie.

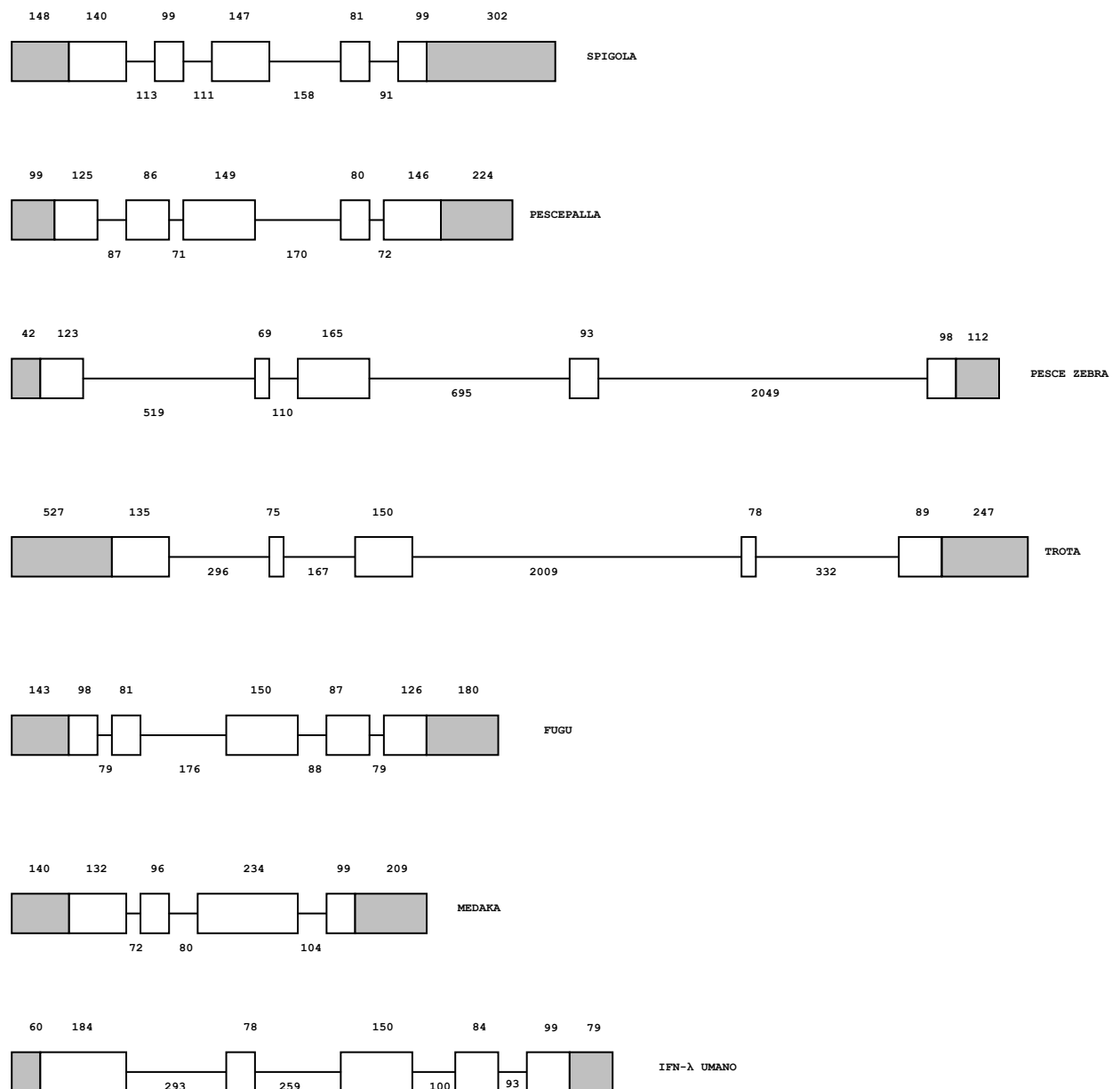


Figura III-6. Una rappresentazione schematica dell’organizzazione esoni/introni del gene IFN di spigola e di altri geni IFN noti. I rettangoli bianchi rappresentano le regioni codificanti mentre i rettangoli grigi rappresentano le regioni UTR dell’ mRNA. EMBL accession numbers: spigola (*Dicentrarchus labrax*) AM946399; pesce palla (*Tetraodon nigroviridis*) AJ544889; pesce zebra (*Danio rerio*) AJ544820; trota (*Oncorhynchus mykiss*) AM489415; fugu (*Takifugu rubripes*) AJ583023; medaka (*Oryzias latipes*) BN001095; IFN-λ umano (*Homo sapiens*) NT_011109.

Il gene IFN di spigola contiene 4 introni in accordo con gli IFNs di altri Teleostei quali pesce palla e Fugu. Il medaka invece contiene 3 introni, si è ipotizzato che esso possa aver perso il terzo introne e che gli esoni 3 e 4 si siano fusi in un unico esone. Inoltre le dimensioni degli introni sono alquanto variabili tra le diverse specie. I geni IFN del pesce zebra e della trota sono più grandi degli altri pur mantenendo un'organizzazione esoni/introni identica a quella degli altri Teleostei. Questi ultimi hanno un introne di più di 2000 bp (l'ultimo nel pesce zebra ed il terzo nella trota). Le dimensioni degli esoni sono molto più conservate rispetto agli introni, in particolar modo il terzo ed il quarto esone mostrano dimensioni comparabili in tutti i geni IFN, eccetto per il medaka.

3.3 Analisi della sequenza della proteina Mx di spigola (*Dicentrarchus labrax* L)

Il clonaggio della proteina Mx è stato effettuato impiegando il metodo del “clonaggio per omologia”. Sfruttando l’elevata vicinanza filogenetica esistente tra spigola ed orata sono stati impiegati primers dell’Mx che hanno funzionato per il clonaggio in orata (Tafalla C. et al., 2004). Successivamente impiegando una serie di primers disegnati sulla sequenza preesistente e con la tecnica della RACE-PCR è stato possibile effettuare il clonaggio dell’intera sequenza Mx. L’intera sequenza Mx è costituita da 2398 bp di cui 1959 bp codificanti [Figura III-7 e Figura III-8]. Tale sequenza viene tradotta in una putativa proteina di 652 amminoacidi. In spigola sono state ottenute 4 sequenze Mx riportate in Figura III-9 (EMBL accession numbers: AM228974, AM228975, AM228976, AM228977).

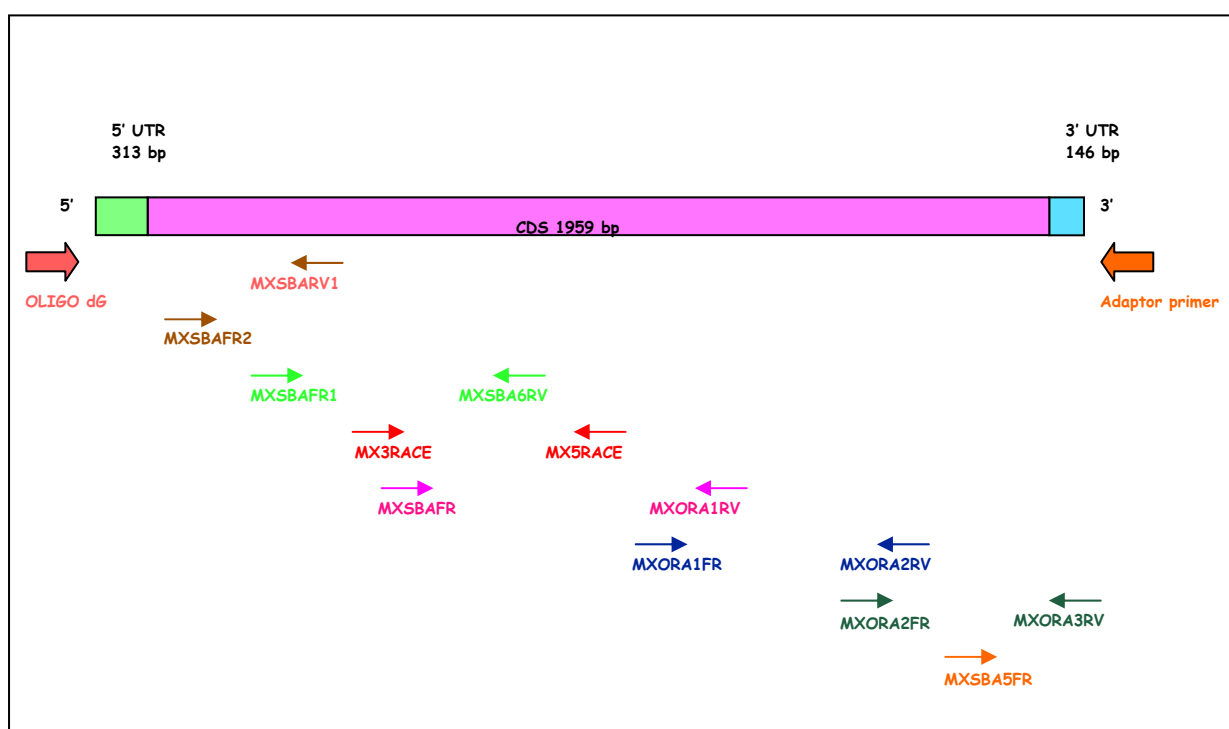


Figura III-7. Schema della posizione dei primers impiegati per il clonaggio della proteina Mx.

tctgacagcgctccagcaagaagttggggaagcggaagaggaagatctacaggacggt
 gtgactggcttgggtacacaagtgaagctgaacaccagtagcactgtgggcaacaatggc
 actggggccacctgaaagagatgtttaaaccaccttaaatcctactaccaaatgtgctgc
 cagcgtctggctgaccagatccccctggatccgctaccagatgttgacaggagtctgct
 gtccagctgcagagggagatgctgcagatgcttcaggacaaaagagaaaaacaaggagaca
 agaagtcctcatc
atgaacgctctgaaccagcagtatgaggagaaggtgcgtccctgcattgacctcattgac
M N A L N Q Q Y E E K V R P C I D L I D
 tcccttcgctctctgggtgtagagaaggacttggcgctacctgctatcgccgtgattgga
 S L R S L G V E K D L A L P A I A V I G
 gaccaaagctcggggaagagctccgtgctggagcgctgtcaggggtggctctgcccga
 D Q S S G K S S V L E A L S G V A L P R
 gggagtggtgattgtgacaagatgtcctctcgaactaaagatgaagagaaagaatgaagga
 G S G I V T R C P L E L K M K R K N E G
 gaggagtggtaacgaaagataacctacattggctttgaggaaaatataaaggacctgca
 E E W Y G G K I T Y I G F E E N I K D P A
 gatgtggaaaaaagattcgcagaagctcagaataaaatagctgggcccgggtcagggatc
 D V E K K I R E A Q N K I A G P G S G I
 agtgaagacctcatcgtctggagatcgctctcctgatgttcggacctgacgtcatt
 S E D L I S L E I A S P D V P D L T L I
 gatctgcccggcatcgccaggggtggctgtaaaggacagccagagaacattggagaccag
 D L P G I A R V A V K G Q P E N I G D Q
 attagagacttatccagaagttcatcacaacaagaaccatcagcttggtggtgtgtt
 I K R L I Q K F I T K Q E T I S L V V V
 ccttgtaacgtggacatagcaaccacagaggctttgaacatggcccagcggtggtatcct
 P C N V D I A T T E A L N M A Q R V D P
 gatggagagagactttgggtatcttgaccaagcctgatctggtggacaaaggacggaa
 D G E R T L G I L T K P D L V D K G T E
 gagaccgtggtgacattgtccataatgaggtcatccacctgaagaagggtacgtgatc
 E T V V D I V H N E V I H L K K G Y V I
 gtcaagtgcaggggtcagaaggagatcacagagaaggtttcttactgaagcaatagaa
 V K C R G Q K E I T E K V S L T E A I E
 agagagaaagccttctcaatgatcatgtgttttccacactctctacaatgacggccat
 R E K A F F N D H V F F H T L Y N D G H
 gccactgttctaaactggctgagaaactcacacttgagctgggtgcatacatcgagaaa
 A T V P K L A E K L T L E L V H H I E K
 tctctgctcgattagaagagcagatagagaagaaactaatagagactcaggtagagctc
 S L P R L E E Q I E K K L I E T Q V E L
 aacaaatattggcaatggacccccacctgacacatcagagagacttggtttcctcattgat
 N K Y G N G P P P D T S E R L G F L I D
 agagtgcagcatttacacaggatgctatcagcctcacctcaggagaggaactcaaactc
 R V T A F T Q D A I S L T S G E E L K S
 ggagtgcaggtcaatatctttccatgctcaggaaagagtttgcagcatggaagaaatg
 G V R L N I F S M L R K E F A A W K E M
 atagagcgggtctggagtaacattcaactggaatattgagaaagaggtggctcagtatgag
 I E R S G V T F N W N I E K E V A Q Y E
 cgaaagtaccgtggaagagaactgccggggttcataactacaagacctttgaggtcatg
 R K Y R G R E L P G F I N Y K T F E V M
 gtccccgggttcgtcaactacaagacctttgagggcatggtcaaggagcagatcaaacag
 V P G F V N Y K T F E G M V K E Q I K Q
 ctggaagagccagctgtgctgaaactcaaagaagtggcagaaattgtgaggaagagcctt
 L E E P A V L K L K E V A E I V R K E L
 ttcaaggtggcacaaaaacagctttgttgattccctaacctgatgcgagcagccaagatg
 F K V A Q N S F V G F P N L M R A A K M
 atgattgaagccatcagaaaggagaaggagattgtagcagagtccatgctgagaaccag
 M I E A I R K E K E I V A E S M L R T Q
 tttaagatggagtcgattgtttactcaggacagcacatacagcaagaagttggggaag
 F K M E S I V Y T Q D S T Y S K K L G K
 cggaagaggggaagatctacaggacggtgtgactggcttgggtacacaagtgaagctgaac
 R K R E D L Q D G V T G L G T Q V K L N
 accagtagcactgtgggcaacaatggcactggggccacctgaaagagatgttaaacac
 T S S T V G N N G T G A T L K E M L K H
 cttaaatcctactaccaaatgtggtggccagctctggctgaccagatccccctgggtgatc
 L K S Y Y Q I A G Q R L A D Q I P L V I
 cgctaccagatgttgacaggagtctgctgtccagctgcagagggagatgctgcagatgctt
 R Y Q M L Q E S A V Q L Q R E M L Q M L
 caggacaaagagaaaaacaagtcctgcttcacgaagactctggcataacaaacaagaga
 Q D K E K N K V L L H E D S G I T N K R
 atccaccttcagaagcgcttgagcgctctcaaaggcacgccttctgttgactgacttc
 I H L Q K R L E R L S K A R L L L T D F
 agcatgaacataacaacttaacacacacaactgtag
S M N I Y N F N T T Q L -
 tgcaaacagatttgaatagaagaagaagctcagatatttatattggttacatagatttt
 tatgttttgggcataattagtcgtgtattttattaaaagtgatataaaaagaaaaaaa
 aaaaaa

Figura III-8. Sequenza nucleotidica ed amminoacidica dell' Mx di spigola.
 I codoni d'inizio e di fine sono indicati in grassetto (AM228974).

AM228976	MNALNQYEEKVRPCIDLIDSLRSLGVEKDLALPAIAVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPR	60
AM228977	MNALNQYEEKVRPCIDLIDSLRSLGVEKDLALPAIAVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPR	60
AM228974	MNALNQYEEKVRPCIDLIDSLRSLGVEKDLALPAIAVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPR	60
AM228975	MNALNQYEEKVRPCIDLIDSLRSLGVEKDLALPAIAVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPR	60

AM228976	GSGIVTRCPLLELMKRKNEGEWEYKITYIGFEENIKDPADVEKKIREAQNKIAGPGSGI	120
AM228977	GSGIVTRCPLLELMKRKNEGEWEYKITYIGFEENIKDPADVEKKIREAQNKIAGPGSGI	120
AM228974	GSGIVTRCPLLELMKRKNEGEWEYKITYIGFEENIKDPADVEKKIREAQNKIAGPGSGI	120
AM228975	GSGIVTRCPLLELMKRKNEGEWEYKITYIGFEENIKDPADVEKKIREAQNKIAGPGSGI	120

AM228976	SEDLISLEIASPDVDPDLTLIDLPGIARVAVKGQPENIGDQIKRLIQKFITKQETISLVVV	180
AM228977	SEDLISLEIASPDVDPDLTLIDLPGIARVAVKGQPENIGDQIKRLIQKFITKQETISLVVV	180
AM228974	SEDLISLEIASPDVDPDLTLIDLPGIARVAVKGQPENIGDQIKRLIQKFITKQETISLVVV	180
AM228975	SEDLISLEIASPDVDPDLTLIDLPGIARVAVKGQPENIGDQIKRLIQKFITKQETISLVVV	180

AM228976	PCNVDIATTEALNMAQRVDPDGERTLGILTKPDLVDKGTEETVVDIVHNEVIHLKKGYMI	240
AM228977	PCNVDIATTEALNMAQRVDPDGERTLGILTKPDLVDKGTEETVVDIVHNEVIHLKKGYMI	240
AM228974	PCNVDIATTEALNMAQRVDPDGERTLGILTKPDLVDKGTEETVVDIVHNEVIHLKKGYMI	240
AM228975	PCNVDIATTEALNMAQRVDPDGERTLGILTKPDLVDKGTEETVVDIVHNEVIHLKKGYMI	240
*****:		
AM228976	VKCRGQKEITEKVSLEAIEREKAFFNDHVFHTLYNDGHATVPKLAEKLTLELVHHIEK	300
AM228977	VKCRGQKEITEKVSLEAIEREKAFFNDHVFHTLYNDGHATVPKLAEKLTLELVHHIEK	300
AM228974	VKCRGQKEITEKVSLEAIEREKAFFNDHVFHTLYNDGHATVPKLAEKLTLELVHHIEK	300
AM228975	VKCRGQKEITEKVSLEAIEREKAFFNDHVFHTLYNDGHATVPKLAEKLTLELVHHIEK	300

AM228976	SLPRLEEQIEKKLIETQVELNKYGNPPDPDTSERLGLIDRVTAFTQDAISLTSGEELKS	360
AM228977	SLPRLEEQIEKKLIETQVELNKYGNPPDPDTSERLGLIDRVTAFTQDAISLTSGEELKS	360
AM228974	SLPRLEEQIEKKLIETQVELNKYGNPPDPDTSERLGLIDRVTAFTQDAISLTSGEELKS	360
AM228975	SLPRLEEQIEKKLIETQVELNKYGNPPDPDTSERLGLIDRVTAFTQDAISLTSGEELKS	360

AM228976	GVRNLIFSMLRKEFAAWKEMIERSGVTFNWNIEKEVAQYERKYRGRELPGFINYKTFEVM	420
AM228977	GVRNLIFSMLRKEFAAWKEMIERSGVTFNWNIEKEVAQYERKYRGRELPGFINYKTFEVM	420
AM228974	GVRNLIFSMLRKEFAAWKEMIERSGVTFNWNIEKEVAQYERKYRGRELPGFINYKTFEVM	420
AM228975	GVRNLIFSMLRKEFAAWKEMIERSGVTFNWNIEKEVAQYERKYRGRELPGFINYKTFEVM	420

AM228976	VPGFVNYKTTFEGMVKEQIKQLEEPAVLKLKEVAEIVKELFKVAQNSFVGFPNLMRAAKM	480
AM228977	VPGFVNYKTTFEGMVKEQIKQLEEPAVLKLKEVAEIVKELFKVAQNSFVGFPNLMRAAKM	480
AM228974	VPGFVNYKTTFEGMVKEQIKQLEEPAVLKLKEVAEIVKELFKVAQNSFVGFPNLMRAAKM	480
AM228975	VPGFVNYKTTFEGMVKEQIKQLEEPAVLKLKEVAEIVKELFKVAQNSFVGFPNLMRAAKM	480
*****:		
AM228976	MIEAIRKEKEIVAESMLRTQFKMESIVYTQDSTYSKKLGKRKREDLQDGVTLGLTQVKLN	540
AM228977	MIEAIRKEKEIVAESMLRTQFKMESIVYTQDSTYSKKLGKRKREDLQDGVTLGLTQVKLN	540
AM228974	MIEAIRKEKEIVAESMLRTQFKMESIVYTQDSTYSKKLGKRKREDLQDGVTLGLTQVKLN	540
AM228975	MIEAIRKEKEIVAESMLRTQFKMESIVYTQDSTYSKKLGKRKREDLQDGVTLGLTQVKLN	540

AM228976	TSSTVGNNGTGATLKEMLKHLKSYQIAGQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLQREMLQML	600
AM228977	TSSTVGNNGTGATLKEMLKHLKSYQIAGQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLQREMLQML	600
AM228974	TSSTVGNNGTGATLKEMLKHLKSYQIAGQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLQREMLQML	600
AM228975	TSSTVGNNGTGATLKEMLKHLKSYQIAGQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLQREMLQML	600

AM228976	QDKEKNKVLLHEDSGITNKRIHLQKRRLERLSKARLLLTDFSMNIYNFNTTQL	652
AM228977	QDKEKNKVLLHEDSGITNKRIHLQKRRLERLSKARLLLTDFSMNIYNFNTTQL	652
AM228974	QDKEKNKVLLHEDSGITNKRIHLQKRRLERLSKARLLLTDFSMNIYNFNTTQL	652
AM228975	QDKEKNKVLLHEDSGITNKRIHLQKRRLERLSKARLLLTDFSMNIYNFNTTQL	652

Figura III-9. Allineamento amminoacidico delle 4 sequenze Mx di spigola (EMBL accession umbers: AM228974, AM228975, AM228976, AM228977).

La percentuale d'identità nucleotidica ed amminoacidica dell'Mx di spigola con altre specie di Teleostei mostra percentuali abbastanza elevate d'identità in cui la maggiore è con l'orata [Tabella III-2].

	% Nucleotide identity	% Amino acid identity	% Amino acid similarity
Sea bream	69.5	75	83.4
Atlantic halibut	63.7	68.5	80
Channel catfish	54.6	66.1	78.5
Zebrafish	55.6	62.1	73.9
Fugu rubripes	60	67.3	78
Goldfish	55	65.4	75.9
Atlantic salmon	58	72	81.5
Rainbow trout	58.4	72	80.6
Japanese flounder	61.5	69.8	79.8
Sheep	51	43	59.4
Horse	51	48.7	64.6
Pig	52.3	48.6	64.3
Chicken	52.7	40.4	55.5
Human	53.1	50.4	65.1

Tabella III-2. Percentuale d'identità nucleotidica ed amminoacidica. EMBL accession numbers: spigola Mx1 (*Dicentrarchus labrax* L) AM228974, spigola Mx2 (*Dicentrarchus labrax* L) AM228975, spigola Mx3 (*Dicentrarchus labrax* L) AM228976, spigola Mx4 (*Dicentrarchus labrax* L) AM228977, orata (*Sparus aurata*) AF491302, passera giapponese (*Paralichthys olivaceus*) AB110446, halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) AF245513, salmone (*Salmo salar*) U66475, trota (*Oncorhynchus mykiss*) U30253, pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) EU100456, pesce zebra (*Danio rerio*) AF533769, Fugu (*Takifugu rubripes*) AF525215, pesce rosso (*Carassius auratus*) AY303813, pecora (*Ovis aries*) AY859475, cavallo (*Equus caballus*) U55216, maiale (*Sus scrofa*) AB164037, pollo (*Gallus gallus*) NM_204609, uomo (*Homo sapiens*) NM_002462.

L'allineamento amminoacidico della proteina Mx di spigola con quelle appartenenti a diverse specie di Teleostei sono riportati in Figura III-10.

L'alto numero di residui conservati mostra come l'Mx sia una molecola che non varia nel corso dell'evoluzione.

Pig	--MVYSSCESKEPDSVSASNHL-----	20
Human	--MVVSEVDIAKADPAAASHPL-----	20
Horse	--MVHSEAKMTRPDSASASKQ-----	20
Sheep	MSMSYRALKFRRHAPTSTQHHPKEDMNFHQPPGLPGFALGQTMSPPPWQMGESNPDFLP	60
Zebrafish	-----	
Goldfish	-----	
Channel catfish	-----	
Sea bass Mx1	-----	
Sea bass Mx2	-----	
Sea bass Mx4	-----	
Sea bass Mx3	-----	
Sea bream	-----	
Atl. halibut	-----	
Jap. flounder	-----	
Atl. salmon	-----	
Rainbow trout	-----	
Fugu rubripes	-----	
Chicken	---MNNPWSNFSSAFGCPIQIPKQNSNVPPSLPVPVGVFGVPLRSGCSNQMAFCAPELT	56
Pig	----LLNGNDELVEKS----HKTGPENNLYSQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEQDLALPA	72
Human	----LLNGDATVAQKN----PGSVAENNLCSQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEQDLALPA	72
Horse	----LLNGNADIQETN----QKRSIEKNLCSQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEQDLALPA	72
Sheep	NNFNQLNLDPPQPEADGGQQRSGSENNLYRKYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEQDLALPA	120
Zebrafish	-----MEKLSYTFSSQYEEKIRPCIDTIDNLSRLGVEKDLALPA	39
Goldfish	-----MEKMSYTFSSQYEEKIRPCIDTIDNLSRLGVEKDLALPA	39
Channel catfish	-----MSASLSEQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	36
Sea bass Mx1	-----MN-ALNQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	35
Sea bass Mx2	-----MN-ALNQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	35
Sea bass Mx4	-----MN-ALNQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	35
Sea bass Mx3	-----MN-ALNQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	35
Sea bream	-----MN-TLNQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	35
Atl. halibut	-----MN-SLNEQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	35
Jap. flounder	-----MN-SLNEQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	35
Atl. salmon	-----MNNTLNQHYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	36
Rainbow trout	-----MNNTLNQHYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	36
Fugu rubripes	-----MN-SLNQYEEKVRPCIDLIDSLRALGVEKDLALPA	35
Chicken	DRKPEHEQKVSRLNDREEDKDEAAACSLDNQYDRKIQPCIDLVDSLRKLDIGNDLMLPA	116
: :*::::**** :*. * *.: . * * *		
Pig	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVLKLLKLVNEEEDWKGVSYR----	128
Human	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVLKLLKLVNE-DKWRGKVSQY----	127
Horse	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVLKLLKLVKE-DEWKGVSYR----	127
Sheep	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIITRCPLVLKLTKECE---WTGKITR-----	173
Zebrafish	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVPLPRGSGIVTRCPLVKMIRTKDQ-DRWHGRISYK----	94
Goldfish	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMIRTKGE-GKWHAKISYQ----	94
Channel catfish	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMKRSREE-DFWHGKIKYKDH	95
Sea bass Mx1	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMKRKNeg-EEWYGKITIYI----	90
Sea bass Mx2	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMKRKNeg-EEWYGKITIYI----	90
Sea bass Mx4	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMKRKNeg-EEWYGKITIYI----	90
Sea bass Mx3	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMKRKNeg-EEWYGKITIYI----	90
Sea bream	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMKRKNeg-EEWYGKISYQ----	90
Atl. halibut	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVSLPRGKIVTRCPLVKMKRRKSG-DDWYGKISYR----	90
Jap. flounder	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGKIVTRCPLVKMKRRKAG-NVWYGKISYR----	90
Atl. salmon	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMKRKNeg-EEWHGKISYQ----	91
Rainbow trout	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMKRKNeg-EEWHGKISYQ----	91
Fugu rubripes	IaVIGDQSSGKSSVLEALSGVALPRGSGIVTRCPLVKMKRRKVG-EPWYGNISYL----	90
Chicken	IaVIGDRNSGKSSVLEALSGVALPRDKGIVTRCPLVKLKKMTAP-QEWGVVIYR----	171
*****:*****.*****:***** **:		
* : : *		
Pig	-DSEIELSDASQVEKEVSAQAIAIEGEGVGSHELISLEVSSPHVPDLTLIDLPGITRVA	187
Human	-DYEIEISDASEVEKEINKAQNAIEGEGMGISHELITLIESSRDVPDLTLIDLPGITRVA	186
Horse	-DIEVEISNALDVEEQVRKAQNVLAGEGVGSQELVTLEVSSPHVPDLTLIDLPGITRVA	186
Sheep	-NVTQQLHNPSEVEREIRRAQNI IAGNGVGSHELINLEVTSPFVDPDLTLIDLPGITRVA	232
Zebrafish	-TCEEDFDPAEVEKKIRQAQDEMAGAGVGISEELISLQITSADVPDLTLIDLPGIARVA	153
Goldfish	-DYEEDIDDPAEVEKKIRQAQDEMAGAGVGISDELISLQITSANVPDLTLIDLPGIARVA	153
Channel catfish	EDYEEIQNPADEKKIREAQDHMAGVGISDELISLEVTSADVPDLTLIDLPGIARVA	155
Sea bass Mx1	-GFEENIKDPADVEKKIREAQNKIAGPGSGISEDLSLEIASPDVPDLTLIDLPGIARVA	149
Sea bass Mx2	-GFEENIKDPADVEKKIREAQNKIAGPGSGISEDLSLEIASPDVPDLTLIDLPGIARVA	149
Sea bass Mx4	-GFEENIKDPADVEKKIREAQNKIAGPGSGISEDLSLEIASPDVPDLTLIDLPGIARVA	149
Sea bass Mx3	-GFEENIKDPADVEKKIREAQNKIAGPGSGISEDLSLEIASPDVPDLTLIDLPGIARVA	149
Sea bream	-DHEEELDDPAEVEKKIREAQDEMAGVGMSDDLSLEIASPDVPDLTLIDLPGIARVA	149
Atl. halibut	-DYEEIHDPADEKMIQAQDKMAGAGVGISDDLSLEIASPDVPDLTLIDLPGITRVA	149
Jap. flounder	-DYEEIHDPADEKMIQAQDKMAGVGISDDLSLEIASPDVPDLTLIDLPGITRVA	149
Atl. salmon	-DHEEIEDPDSVEKKIREAQDEMAGVGISDDLSLEIGSPDVPDLTLIDLPGIARVA	150
Rainbow trout	-DHEEIEDPDSVEKKIREAQDEMAGVGISDDLSLEIGSPDVPDLTLIDLPGIARVA	150
Fugu rubripes	-EKEEVIEDPADVEKKIQAQDEMAGVGISDDLSLEIASPEVDPDLTLIDLPGIARVA	149
Chicken	-NTEIQLQNASEVKKAIRKAQDIVATNGSISGELISLEIWSPDVPDLTLIDLPGIAREA	230
: :. :*: : ** :** . . ** :*:::: * .*****:* *		

Pig	VGNQPYDIEYQIKSLIKKYICKQETINLVVPCNVDIATTEALRMAQEVDPEGDRTIGIL	247
Human	VGNQPADIGYKIKTLIKKYIQRQETISLVVPSNVDIATTEALSMAQEVDPEGDRTIGIL	246
Horse	VGNQPADIGRQIKRLIRKYIQRQETINLVVPSNVDIATTEALSMAQEVDPEGDRTIGIL	246
Sheep	VENQPQDIGLQIKALIKTYIQRQETINLVVPCNVDIATTEALSMAQEVDPPGDRTIGIL	292
Zebrafish	VKGQPENIGDQIKRLIRKFVTRQETINLVVPCNVDIATTEALQMAQEDPPDGERTLGIL	213
Goldfish	VKGQPENIGDQIKRLIRKFVTKQETINLVVPCNVDIATTEALQMAQEDPEGERTLGIL	213
Channel catfish	VKGQPENIGEIKRLIKKFITQETINLVVPSNVDIATTEALKMAQEVDPPDGERTLGIL	215
Sea bass Mx1	VKGQPENIGDQIKRLIQKFITQETISLVVPCNVDIATTEALNMAQRVDPDGERTLGIL	209
Sea bass Mx2	VKGQPENIGDQIKRLIQKFITQETISLVVPCNVDIATTEALNMAQRVDPDGERTLGIL	209
Sea bass Mx4	VKGQPENIGDQIKRLIQKFITQETISLVVPCNVDIATTEALNMAQRVDPDGERTLGIL	209
Sea bass Mx3	VKGQPENIGDQIKRLIQKFITQETISLVVPCNVDIATTEALNMAQRVDPDGERTLGIL	209
Sea bream	VKGQPENIGEIKRLIQKFITQETISLVVPSNVDIATTEALKMAQEVDPPDGERTLGIL	209
Atl. halibut	VLGQPENIEHQIKRLIRTFITRQETISLVVPCIVDIATTEALKMAQEVDPPDGERTLGIL	209
Jap. flounder	VSGQPENIEHQIKRLIHKFITQETISLVVPCIVDIATTEALKMAQEADPPDGERTLGIL	209
Atl. salmon	VKGQPENIGEIKRLIRKFITQETINLVVPCNVDIATTEALKMAQEVDPEGERTLGIL	210
Rainbow trout	VKGQPENIGEIKRLIRKFIMQETISLVVPCNVDIATTEALKMAQEVDPEGERTLGIL	210
Fugu rubripes	VKGQPENIGEIKRLIRKFITQETISLVVPCNVDIATTEALKMAQEVDPPDGERTLGIL	209
Chicken	VGNQPQDNGQQIKTLLKKYIGCKETIIVVVPCNVDIATTEALKMAQEVDPTGERTLGVL	290
* . ** : : ** *::: : *** :***. ***** ** * *::*:*		
Pig	TKPDLVDKGTEDKIVDVARNLVFHLKKGMYIVKCRGQQDIQEQLSLAKALQKEQAFENH	307
Human	TKPDLVDKGTEDKVVDDVRNLVFLHKKGYMIVKCRGQQEIQDQLSLSEALQREKIFFENH	306
Horse	TKPDLVDKGTTEEQVVDVVRNLVFLHKKGYMIVKCRGQQDIQDRLSLAEALQREKAFENH	306
Sheep	TKPDLVDKGTTEKGVLMQNLTYHLKKGMYIVKCRGQQDITNKLSEALQREKVMFFQTH	352
Zebrafish	TKPDLVDKGTTEGTVVDIVHNEVHLTKGYMIVRCRGQKEIMDQVTLNEATESETAFKDH	273
Goldfish	TKPDLVDKGTTEGTVVDIVHNEVHLTKGYMIVRCRGQKEIIDHVTLNEATATENAFQDH	273
Channel catfish	TKPDLVDKGTTEETVVDIVHNEVHLTKGYMIVRCRGQKEIMDRVSLHEATEKEKDFKDH	275
Sea bass Mx1	TKPDLVDKGTTEETVVDIVHNEVHLKKGMYIVKCRGQKEITEKVSLEAIEREKAFENDH	269
Sea bass Mx2	TKPDLVDKGTTEETVVDIVHNEVHLKKGMYIVKCRGQKEITEKVSLEAIEREKAFENDH	269
Sea bass Mx4	TKPDLVDKGTTEETVVDIVHNEVHLKKGMYIVKCRGQKEITEKVSLEAIEREKAFENDH	269
Sea bass Mx3	TKPDLVDKGTTEETVVDIVHNEVHLKKGMYIVKCRGQKEITEKVSLEAIEREKAFENDH	269
Sea bream	TKPDLVDKGTGETVVDIVHNEVHLKKGMYIVKCRGQKEIAEKVSLEATEREKAFKDH	269
Atl. halibut	TKPDQVDKGAEESVIDIVHNEVPLTKGYMIVRCRGQKEITEKESLSEALEREKTFTEH	269
Jap. flounder	TKPDQVDKGAEESVIDIVHNEVHLKKGMYIVRCRGQKEITEKVSLEALEREKAFADH	269
Atl. salmon	TKPDLVDKGTTEETVVDIVHNEVHLTKGYMIVKCRGQKEIMERVSLSEATEREKAFKEH	270
Rainbow trout	TKPDLVDKGTTEETVVDIVHNEVHLTKGYMIVKCRGQKEIMERVSLSEATEREKAFKEH	270
Fugu rubripes	TKPDLVDKGTTEETVVDIHNNEVHLKKGMYIVRCRGQKEIIDKVSLEATESETAFKDH	269
Chicken	TKPDLVNEGTEETVLKIIQNEVPLRKGMYIVKCYGQMDFCNELSFTSAIQEREFFETH	350
*** *::*: :::: * * ***:* * * :. :. :. * * * :		
Pig	AHFRDLLEEGRATIPCLAERLTSELIMHICKTLPLENQIKESHQKITEELQKYGSDIPE	367
Human	PYFRDLLEEGKATVPCLAELTSELITHICKSLPLENQIKETHQRITEELQKYGVDIPE	366
Horse	PYFRGLLEEGRASVPCLAERLTTELITHICKSLPLENQIKESYQNLSEALQKYGTDIPE	366
Sheep	PYFRVLLDEGKATVPLLAERLTTELIVHINKSLPLENQIKKHQRATEELQYGGDIPD	412
Zebrafish	PHFSKLYEEGFATIPKLAELTIELVHHIQKSLPRLEEQIETKLAETQKELEYGNGPPS	333
Goldfish	PQFSKLYEEGFATIPKLAELTIELVHHIQKSLPRLEEQIETKLAETQKELEYGNGPPS	333
Channel catfish	PHFSTLYEEGMATIPNLAELTLELVHHIELSLPRLEEQIDIKLADSQAELDRYGSPPPT	335
Sea bass Mx1	VFFHTLYNDGHATVPKLAELTLELVHHIEKSLPRLEEQIEKKLIETQVELNKYGNNGPPP	329
Sea bass Mx2	VFFHTLYNDGHATVPKLAELTLELVHHIEKSLPRLEEQIEKKLIETQVELNKYGNNGPPP	329
Sea bass Mx4	VFFHTLYNDGHATVPKLAELTLELVHHIEKSLPRLEEQIEKKLIETQVELNKYGNNGPPP	329
Sea bass Mx3	VFFHTLYNDGHATVPKLAELTLELVHHIEKSLPRLEEQIEKKLIETQVELNKYGNNGPPP	329
Sea bream	VHFHTLYNDGHATVPKLAELTLELVHHIQMSLPRLEDQIEKKLARITELVKYGDGLPS	329
Atl. halibut	AHFYTYLNEGLATVPKLAELTIELVHHIEKSLPRLEEQVEEKLAQTQAEMDRYGSPPS	329
Jap. flounder	AHFHTLYNEGHATVPKLAELTIELVHHIEKSLPRLEEQVEEKLAQTQAELERYGSPPS	329
Atl. salmon	AHLSTLYDEGHATIPKLAELTLELVHHIEKSLPRLEEQIEAKLAETHAELERYGTGPPE	330
Rainbow trout	AHLSTLYDEGHATIPKLAELTLELVHHIEKSLPRLEEQIEAKLSETHAELERYGTGPPE	330
Fugu rubripes	AHFQTYLDDGQATILKLAELTLELVNHIEKSLPRLEEQIEEKLAHTRAELEERYGTGPS	329
Chicken	KHFTLLDENKATIPHLANKLTDELVGRIKTLPAIEKQVHDALQQAKKELQYTGSTHP	410
: * :. :*: :*:** **: : * :*: :*::.		
Pig	DESGKMFFLIDKIDAFNSDITALIQGEELVVEYECRLFTKMRNEFCRWSAVVEKNFKNGY	427
Human	DENEKMFFLIDKINAFNQDITALMQGEETVGEEDIRLFTLRHEFHKWTSTIENNFOEGH	426
Horse	DETEKTFFLIVKITTFNQNITSFVQGEELVGPNDTRLFNKIRQEFQKWSGVIENTNFRKGG	426
Sheep	NEGDKMFFLIEKIKLFNEDIEKLEEGEIVIETESRLCNRIREEFTRWVLIITNIEKVG	472
Zebrafish	EPAARLSFFIDKVTAFNQDMLNLTGEDVCKTDTLLFPPELRQEFQAKWSHILDRSGDSFN	393
Goldfish	DPVVRLSFLIDKVTAFTHDMFNLTTEGEVCKSSDLLVPPELRQEFQKWSHILDRSGDSFN	393
Channel catfish	EPAERICFLIDKVTAFQDTINLTTEGELKNIQHLNIFSSLRQFALWKMHLDDSGETFK	395
Sea bass Mx1	DTSERLGLIDRVTAFTQDAISLTSGEELKSGVRLNIFSMRLKEFAAWKEMIERSGVTFN	389
Sea bass Mx2	DTSERLGLIDRVTAFTQDAISLTSGEELKSGVRLNIFSMRLKEFAAWKEMIERSGVTFN	389
Sea bass Mx4	DTSERLGLIDRVTAFTQDAISLTSGEELKSGVRLNIFSMRLKEFAAWKEMIERSGVTFN	389
Sea bass Mx3	DTSERLGLIDRVTAFTQDAISLTSGEELKSGVRLNIFSMRLKEFAAWKEMIERSGVTFN	389
Sea bream	DAAERLVFLIDRMTAFTQDAISLAAGEELRS---LKIFSMRLQVFAAWKESIDQYGVKNF	386
Atl. halibut	DPAERLAFIDKVTAFQDAISLAAGEELRCGDHLNVFSMLRSEFRKWSNCDKTGHNFN	389
Jap. flounder	DPAERLVFLIDKVTAFQDAISLAAGEELRCGDHLNVFSMLRSEFGKWNTHLDRTHGNFN	389
Atl. salmon	DSAERMYFLIDKVTAFTHDAINLTSGEELKSGVRLNVFSTLRKEFGKWLHLDRHSGENFN	390
Rainbow trout	DSAERLYFLIDKVTAFQDAINLTSGEEMKSGVRLNVFSTLRKEFGKWLHLERSGEIFN	390
Fugu rubripes	DPAEKVTFLMDKLTAFTHDAISLTGEDICCGENINIFSTLRQKFGEWIRHLDISGVKFN	389
Chicken	TVSDKTIFFLVGLIKAFNEDISQTMHGKESWFGNEIRLFPKIRREFRTWGVKLESSAKVE	470
: *:: : * . : *:: : : * * * :		

Pig	DAICKQIQLFENQYRGREL-----GFVNYKTFETI IKKQVSVLEEPAVDML	474
Human	KILSRKIQKFENQYRGREL-----GFVNYRTFETIVKQIKALEEPAVDML	473
Horse	EAIRQIWTFFENQYRGREL-----GFVNYRTFETI IKQIQIKLEEPALDML	473
Sheep	SILNEEVSKYETKYRGKELL-----GFVNYKTFETVVKHYLGQLIDPALKML	519
Zebrafish	KKIEKEVDNVEVYKRGREL-----GFVNYKTFEGLVRDQIKLEEPALKTL	440
Goldfish	KKIEKEVDNVEAKYRGREL-----GFSNYKTLEGLVREQIKLEEPALKTL	440
Channel catfish	SRIEKEVNEYEEKYRGREL-----GFVNYKTFEIVVKDQIKLEEPALRRL	442
Sea bass Mx1	WNIEKEVAQYERKYRGRELPGFVNYKTFEVMVPGFVNYKTFEGMVKEQIKLEEPAVLKL	449
Sea bass Mx2	WNIEKEVAQYERKYRGRELPGFVNYKTFEVMVPGFVNYKTFEGMVKEQIKLEEPAVLKL	449
Sea bass Mx4	WNIEKEVAQYERKYRGRELPGFVNYKTFEVMVPGFVNYKTFEGMVKEQIKLEEPAVLKL	449
Sea bass Mx3	WNIEKEVAQYERKYRGRELPGFVNYKTFEVMVPGFVNYKTFEGMVKEQIKLEEPAVLKL	449
Sea bream	WNVERQVAEYERKYRGREL-----GFVNYKTFEGMVKEQIKLEEPAVLKL	433
Atl. halibut	IKIEKKVEDYEERYRGREL-----GFVNYKTFEVMVSEQMKQLEEPAVKKL	436
Jap. flounder	MKIDKKVEDYEERYRGREL-----GFVNYKTFEVMVNEQMKQAGEPSVKKL	436
Atl. salmon	QRIEDEVADYEKTYRGREL-----GFVNYKTFEVMVMDQIKLEEPAVKKL	437
Rainbow trout	QRIEVEDDYKTYRGREL-----GFVNYKTFEVMVMDQIKLEEPAVKKL	437
Fugu rubripes	ERLEREVQYEVKYRGREL-----GFVNYKTFEYVMKEQVQKLEEPAVRNL	436
Chicken	EIVCSKLPKYEDQYRGREF-----DFISYWTFFEDI IKQITKLEEPAVAML	517
	: : : * **::: . * . * * : : : *:: *	
Pig	HTVTDLVRLAFTDVSETNFNEFFNLHRTAKSKIEDIKLEQEKEAETSIRLHFQMEQIVYC	534
Human	HTVTDMLVRLAFTDVSIKNFEEFFNLHRTAKSKIEDIRAEQEREGEKILRLHFQMEQIVYC	533
Horse	HRISDLVRDTFTKVSEKNFSEFFNLHRTTKSKLEDIKLEQENEAESIRLHFQMEKIVYC	533
Sheep	QKAMEIIWQTFKDTAKKHFAEFCNLHQTVQNKIEDIKTKQMAEANLIQLQFRMEKLVFC	579
Zebrafish	KTVSDVVRKKFIQLAQCSFIFGPNLLKIAKTKIEGKLNKESLAESMLKTQFKMELIVYS	500
Goldfish	KTVSDVVRKKFIQLAQYSFIFGPNLLKIAKTKIEAIKQDKESQAESMLRTQFKMELIVYS	500
Channel catfish	KRISDLIRKGFILQANSLFVGFNLMRAAKMMIEAIRKEKEIVAESMLRTQFKMELIYT	502
Sea bass Mx1	KEVAEIVRKELFKVAQNSFVGFNLMRAAKMMIEAIRKEKEIVAESMLRTQFKMESIVYT	509
Sea bass Mx2	KEVAEIVKKELFKVAQNSFVGFNLMRAAKMMIEAIRKEKEIVAESMLRTQFKMESIVYT	509
Sea bass Mx4	KEVAEIVKKELFKVAQNSFVGFNLMRAAKMMIEAIRKEKEIVAESMLRTQFKMESIVYT	509
Sea bass Mx3	KEVAEIVRKELFKVAQNSFVGFNLMRAAKMMIEAIRKEKEIVAESMLRTQFKMESIVYT	509
Sea bream	KEVSEIVKDELFLAESSFVGFPHLIRIAKMKIEAIRKEKEITAELLRTQFKMELIVYS	493
Atl. halibut	KDIGDAVRRMFLQLASSSFTGFPNLIKTAKAKIETIKQEKEPIAESMLRTQFKMETMVYS	496
Jap. flounder	KDIGDAVRRVFLQLAASSSFTGFPNLIKTAKAKIETIKQEKESIAESMLRTQFKMEMMVYS	496
Atl. salmon	KEISDAVRKVFLLLAQSSSFTGFPNLKSAKTIEAIAKQVNESTAESMLRTQFKMELIVYT	497
Rainbow trout	KEISDAVRKVFLLLAQSSSFTGFPNLKSAKTIEAIAKQVNESTAESMLRTQFKMELIVYT	497
Fugu rubripes	KDIGDVRKVFIHLAQTSAFLPNLLIKTAKAKIETIKQRMKDAEKLRTQFKMELIVYT	496
Chicken	NKVIYMVEEKFLQLANKRFANFQNLNNAQARIGCISDRQATTAKNCILTQFKMERIYC	577
	: : : : : * : * . : : * : : * : * : *	
Pig	QDQVYRGALQKVREKEAE-----KNRKSQY-FLSPAPSSDPSIAEIFQHLLIAYH	585
Human	QDQVYRGALQKVREKELE-----KKKSWDFGAFQSSSATDSSMEEIFQHLLMAYH	585
Horse	QDHVYRGTLQKVRENEMEE-----KKKK--TINVWGQNTSTESSMAEILEHLNAYQ	583
Sheep	QDQIYGVVLNKVREEIFNSVG-----KASENPQSKHPFLNNQSSSVSSIVEIGVHLNAYF	633
Zebrafish	QDGTYSQSLKHAKDKLEEMEKER--PQPKIKPLLLSSFDLGTDNHATLREMLHLKSYY	557
Goldfish	QDGTYSQSLQHAKDKLEEIENDKQQLPQFNAKKLNFSVDVSTGTATHLREMLHLKSYY	560
Channel catfish	QDSMYSDTLSTLKVKEEEGERQK--VGILPNSYSISCSLYNHSNNRATLEELMRHLKSYY	560
Sea bass Mx1	QDSTYSKKLGKRKRREDLQDGVGTG---LGTQVKLNTSSTVGNGGTGATLKEMLKHLKSYY	565
Sea bass Mx2	QDSTYSKKLGKRKRREDLQDGVGTG---LGTQVKLNTSSTVGNGGTGATLKEMLKHLKSYY	565
Sea bass Mx4	QDSTYSKKLGKRKRREDLQDGVGTG---LGTQVKLNTSSTVGNGGTGATLKEMLKHLKSYY	565
Sea bass Mx3	QDSTYSKKLGKRKRREDLQDGVGTG---LGTQVKLNTSSTVGNGGTGATLKEMLKHLKSYY	565
Sea bream	QDRYSSSLSDSKKEEDEE-----EEREKRYGIFNMNDNHATLKEMLHLKSYY	543
Atl. halibut	QDRYSSSLSERKRKRKEE-----SDEQRMKKSTKCYMDNHATLQELILHLRSYY	547
Jap. flounder	QDRYSSSLSDRK--RENE-----EERKTKTKPKYFMDNHATLQELMLHLKSYY	545
Atl. salmon	QDSTYSHSLSERKKEEEDDR-----PLPTIKIRSTIFSTDNHATLQEMMLHLKSYY	548
Rainbow trout	QDSTYSHSLCERKKEEDEDQ-----PLT--ERSTIFSTDNHATLQEMMLHLKSYY	546
Fugu rubripes	QDRYSSSLSDSKKEEQEDK-CV---QTKIVRPPAFRFPFKQDNHATLTELMLHLKSYY	551
Chicken	QDNIYADDLKAARAEIGSKD-----TKIKDLAFGCASRQCPSPFALEVMVSHKAYF	627
	** * * : . . * : * : *	
Pig	QEVGKRISSHIPLIIQFFILRTFGQQLQKSMQLQLLQNKDQYDWLLRERSDTSKDRKFLKE	645
Human	QEASKRISSHIPLIIQFFMLQTYGQQLQKAMQLQLQDKDQYDWLLRERSDTSKDRKFLKE	645
Horse	HEAGNRLSTHIIPLIIQFFVLQTFGQQLQKSMQLQLLQDRDQYDWLLKERNDTCDKRFKFLKE	643
Sheep	TETSKRLANQIPFIIQYFMLQENGDKVQKAMQQLQETQHYSWLLQEQSDTATKRFKFLKE	693
Zebrafish	TIASKRLADQIPMVIRYMLLQEAALQQRNMLQLLQDKDQYDWLLKEDDCDIGQKRENLLS	617
Goldfish	TIASKRLADQIPMVIRYLLQEAALQQRNMLQLLQDKDQYDWLLKEDDFDIGQKRESLLS	620
Channel catfish	SIASKRLADQIPLVIRYLLQESAAQLQREMLQMLQDKNAIDHLLKEDHIDGNKRNLQS	620
Sea bass Mx1	QIAGQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLQREMLQMLQDKENKVLHEDSGITNKRIHLQK	625
Sea bass Mx2	QIAGQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLQREMLQMLQDKENKVLHEDSGITNKRIHLQK	625
Sea bass Mx4	QIAGQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLQREMLQMLQDKENKVLHEDSGITNKRIHLQK	625
Sea bass Mx3	QIAGQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLQREMLQMLQDKENKVLHEDSGITNKRIHLQK	625
Sea bream	KIASQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLQREMLQMLQDKENSEFLLKEDFDIGSKRANLQS	603
Atl. halibut	RIASQRLADQIPLVIRYQMLHQAALQREMLQMIQDKENFEFLKEDRDIGSKRAALQS	607
Jap. flounder	RIASQRLADQIPLIIRYHLLQSAVQLQREMLQMLQDKENLELLKELDIGCKRAALQS	605
Atl. salmon	RISSQRLADQIPMVIRYLVLEFASQLQREMLQTLQEKDNIEQLLKEDFDIGSKRAALQN	608
Rainbow trout	WISSQRLADQIPMVIRYLVLEFASQLQREMLQTLQEKDNIEQLLKEDFDIGSKRAALQS	606
Fugu rubripes	RIASQRLSDQIPLMIRYHMLQEFQIQLQREMLQMLQDKENLEFLKEDLDVGTCKRAALQS	611
Chicken	TGASKRLSNQIPLIILSTVLHDFGNYLQTSMLHLLQKKEEINYLQEDHEAANQKLLTS	687
	. : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Pig	RLMRLTQARR-----RLAKFPG-----	662
Human	RLARLTQARR-----RLAQFPG-----	662
Horse	RLARLAQARR-----RLAKFPG-----	660
Sheep	KIFRLTQAQQ-----ALYEFPHFKSI-----	714
Zebrafish	RQTRLIEGTQPLGHLLEVTFIDYCNILMQ---	646
Goldfish	RQKRLMKARS-----LLVTF-----	635
Channel catfish	RQKRLMEARN-----YLVKF-----	635
Sea bass Mx1	RLERLSKARL-----LLTDFSMNIYNFNTTQL	652
Sea bass Mx2	RLERLSKARL-----LLTDFSMNIYNFNTTQL	652
Sea bass Mx4	RLERLSKARL-----LLTDFSMNIYNFNTTQL	652
Sea bass Mx3	RLERLSKARL-----LLTDFSMNIYNFNTTQL	652
Sea bream	RLKRLTQART-----YLAEL-----	618
Atl. halibut	RHKRLMKARA-----YLVKF-----	622
Jap. flounder	RHKRLMKART-----YLVKF-----	620
Atl. salmon	KLKRLMKARS-----YLVEF-----	623
Rainbow trout	KLKRLMKARS-----YLVEF-----	621
Fugu rubripes	RQKRLTQARE-----YLVKF-----	626
Chicken	RISHLNKAYQ-----YLVDFKSL-----	705
	: : * : . :	

Figura III-10. Allineamento amminoacidico della regione N-terminale dell'Mx di spigola con sequenze Mx di altri teleostei. Sono indicate in grassetto rispettivamente gli elementi di consenso che legano il GTP, il sito caratteristico della famiglia delle dinamine ed il putativo motivo a cerniera della leucina; invece sottolineato i siti di potenziali glicosilazione. Gli EMBL accession numbers sono riportati nella Tabella III-2.

La proteina Mx di spigola mostra dei motivi caratteristici delle proteine Mx di Mammiferi. E' presente un motivo tripartito che lega il GTP, GXXXSGKS, DXXG e TKXD. Inoltre si ritrova il motivo caratteristico della famiglia delle dinamine LPRGSGIVTR. Nella regione carbossiterminale della proteina è conservato un putativo motivo *leucine zipper*. Nella sequenza Mx di spigola non sono stati identificati potenziali siti di N-glicosilazione (Tafalla C. et al., 2004).

L'albero filogenetico, costruito mediante il programma di computer MEGA 3.1, mostra la formazione di 2 clusters distinti per i Mammiferi e i Pesci [Figura III-11]. Per questi ultimi vediamo che l'Mx di spigola mostra similarità elevata con quello di orata in accordo con quanto evidenziato nella percentuale d'identità.

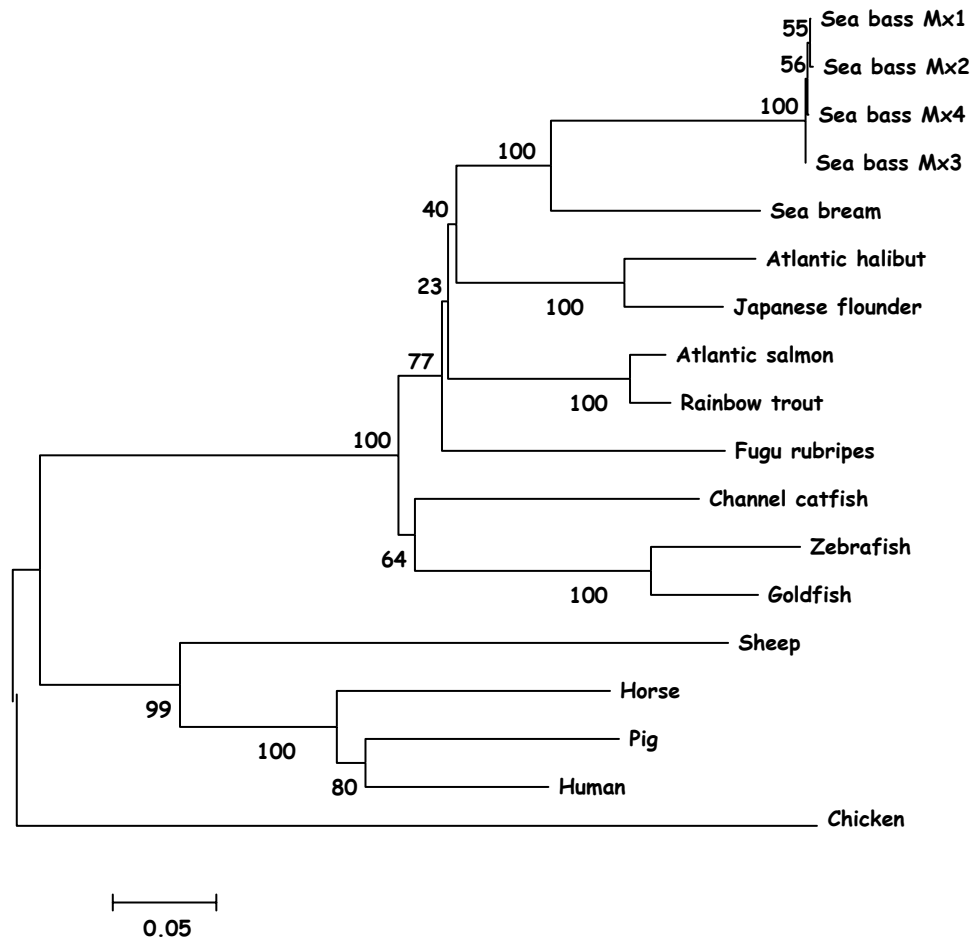


Figura III-11. Albero filogenetico della proteina Mx di spigola con proteine Mx di altre specie. Gli EMBL accession numbers sono riportati nella Tabella III-2.

3.4 Analisi d'espressione di IFN e Mx in seguito a stimolazione *in vitro*

Un'altro aspetto investigato ha riguardato l'analisi di espressione di tipo quantitativo dell'IFN e dell'Mx in seguito a stimolazione *in vitro* con poly I:C. Tale studio è stato effettuato mediante la tecnica della PCR quantitativa (Q-PCR). Poiché il software impiegato per l'analisi dei dati ottenuti dalla real time PCR utilizza come valore di default un'efficienza pari al 100% e non sempre le coppie di primers hanno tale efficienza di amplificazione, a questo si può porre rimedio realizzando una curva standard che metta in relazione l'efficienza del GOI (*gene of interest*) con l'efficienza del normalizzatore. L'inclinazione della curva standard permette la determinazione dell'efficienza di amplificazione. Il valore ottenuto può essere inserito nel software, cambiando i valori di default in base ai risultati ottenuti dalla curva standard.

Nella Figura III-12 sono mostrate le curve standard eseguite impiegando come housekeeping gene una volta l'actina e una volta l'rRNA18S accoppiati con i geni d'interesse, IFN e Mx. Da queste curve risulta un'efficienza maggiore quando si impiega come housekeeping gene l'rRNA18S.

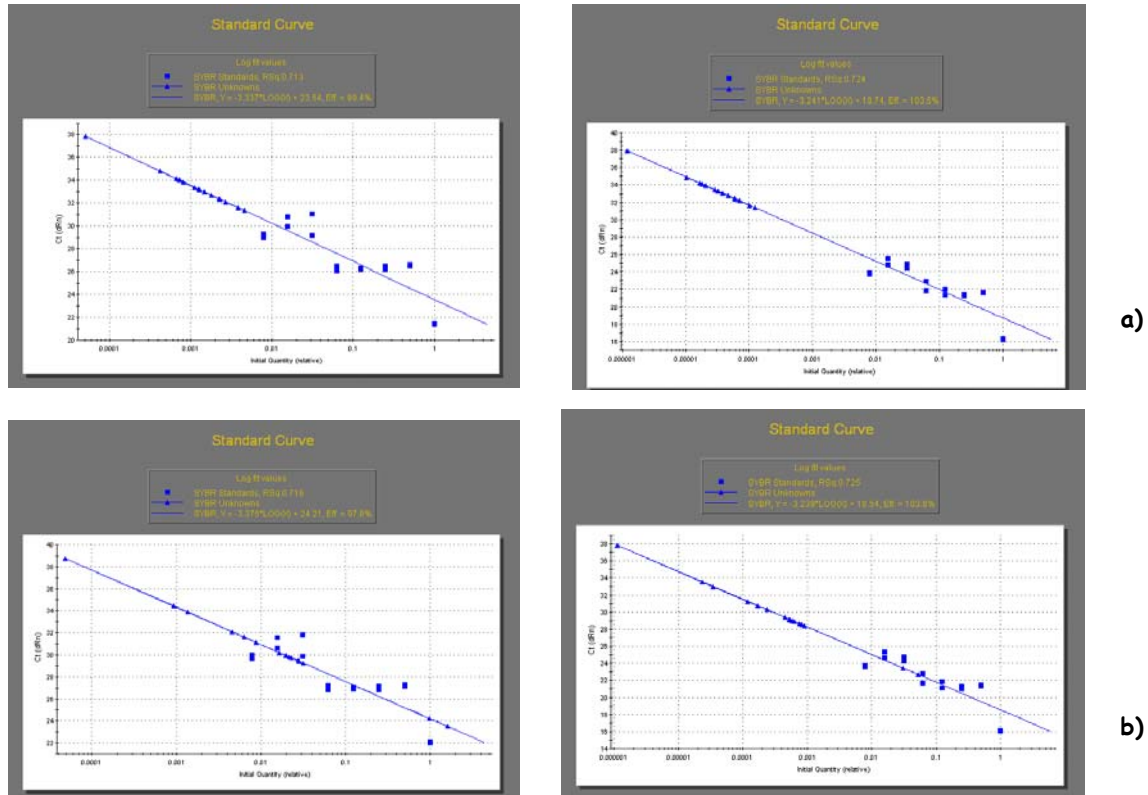


Figura III-12. a) Curva standard per actina, rRNA18S, IFN.
b) Curva standard per actina, rRNA18S, Mx.

A questo punto si è potuto procedere con l'analisi d'espressione in seguito a stimolazione *in vitro*.

Un primo esperimento è stato eseguito effettuando una stimolazione delle cellule di rene cefalico di spigola con poly I:C (50 µg/ml) per 6 e 24 ore alla temperatura di 18°C. I prodotti della real time PCR sono stati caricati su gel d'agarosio per confermare la presenza di una sola banda delle dimensioni attese. I risultati ottenuti dall'esperimento di real time PCR sono mostrati in Figura III-13. I controlli per l'incubazione a 6 ore aggiungendo soltanto PBS sono stati analizzati ma non sono riportati nel grafico in quanto non mostrano differenze significative rispetto ai controlli al tempo 0 (0 ore). Dopo 6 ore di stimolazione l'espressione di IFN è maggiore rispetto a quella dello stesso gene dopo 24 ore. Per l'Mx, invece, dopo 6 ore dalla stimolazione si ha un'espressione minore rispetto a quella osservata dopo 24 ore.

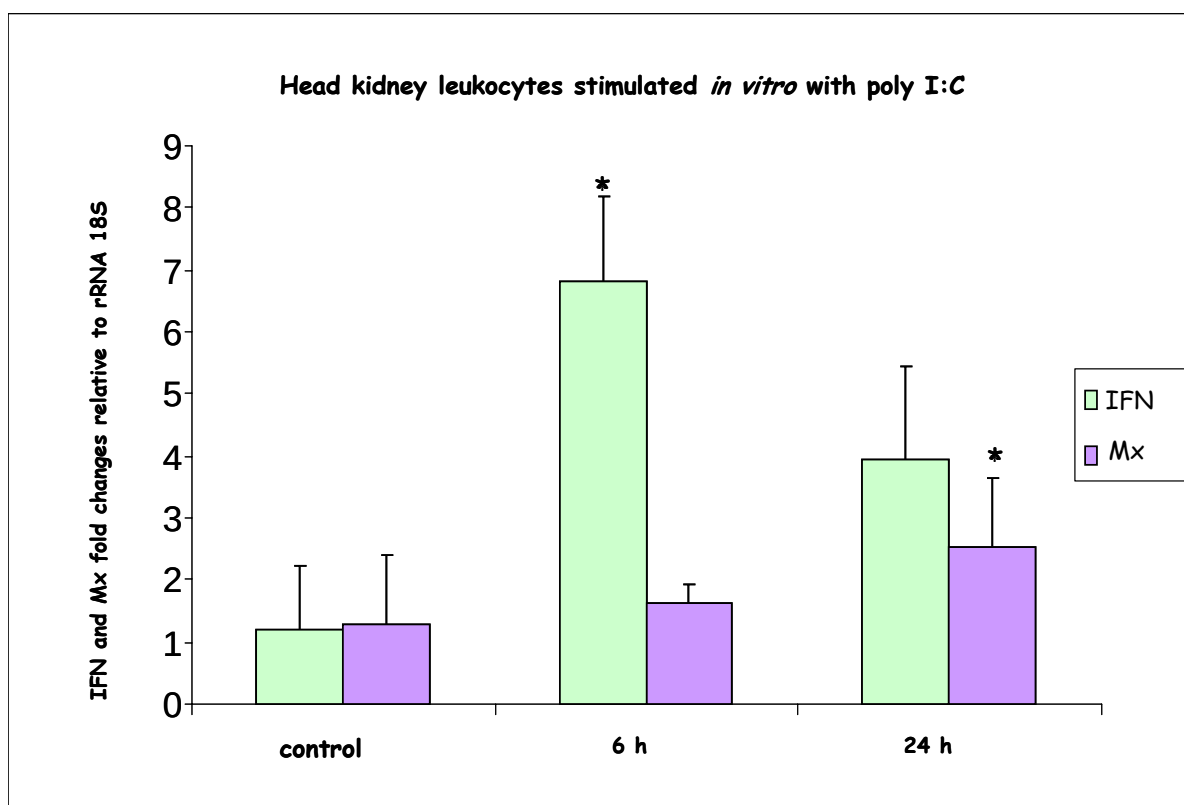


Figura III-13. Analisi d'espressione *in vitro* di IFN e Mx. I livelli di IFN e Mx sono espressi come un rapporto riferito ai livelli di rRNA 18S nello stesso campione dopo analisi mediante PCR quantitativa delle cellule di rene cefalico di spigola stimulate con PBS (controllo) e con 20 µg/ml di poly I:C per 6 e 24 ore (il calibratore è il controllo a 0 ore non stimolato). I dati sono espressi come la media $\pm$ S.E.M. e gli asterischi indicano quando $p < 0.05$ riguardo al controllo al tempo 0.

Successivamente è stata analizzata l'espressione di IFN ed Mx nelle cellule DLEC (*Dicentrarchus labrax embrionic cell*). Le cellule DLEC sono una linea cellulare embrionale di spigola ottenute nel nostro laboratorio (Buonocore F. et al., 2006a). I risultati ottenuti dall'esperimento di real time PCR sono mostrati in Figura III-14. I controlli per l'incubazione a 6 ore aggiungendo soltanto PBS sono stati analizzati ma non sono riportati nel grafico in quanto non mostrano differenze significative rispetto ai controlli al tempo 0 (0 ore). Livelli alti dell'espressione di IFN e di Mx si osservano dopo 6 ore dalla stimolazione, con un incremento molto più evidente per IFN piuttosto che per Mx.

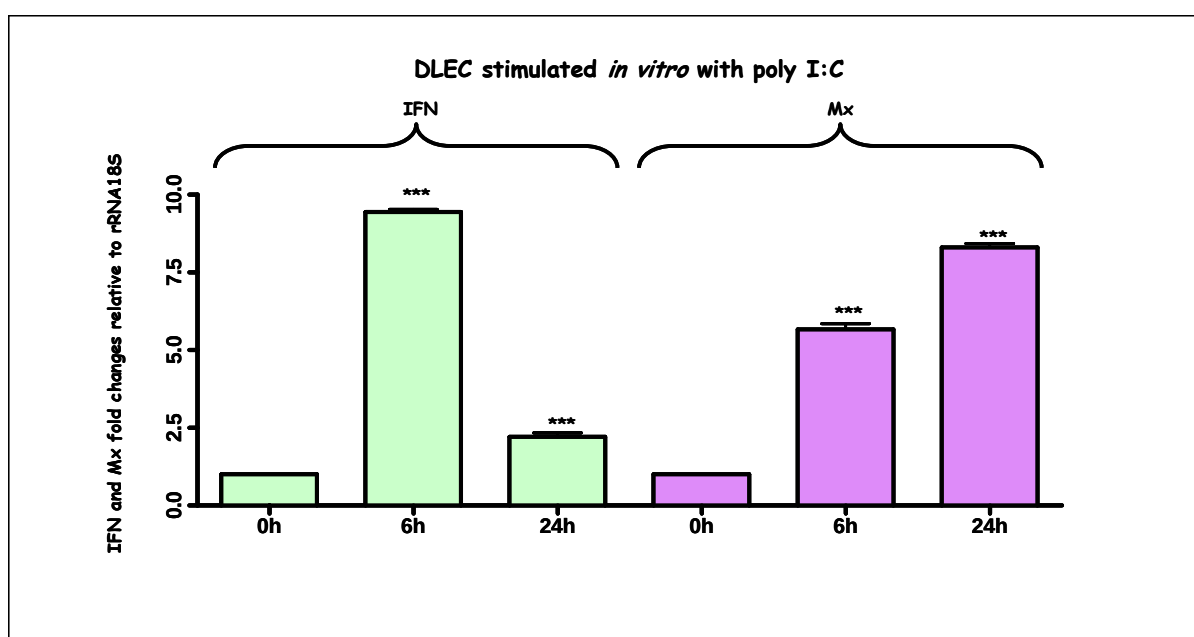


Figura III-14. Analisi d'espressione *in vitro* di IFN e Mx. I livelli di IFN e Mx sono espressi come un rapporto riferito ai livelli di rRNA 18S nello stesso campione dopo analisi mediante PCR quantitativa delle cellule DLEC (*Dicentrarchus labrax embrionic cell*) di spigola stimulate con PBS (controllo) e con 20 μ g/ml di poly I:C per 6 ore e 24 ore (il calibratore è il controllo a 0 ore non stimolato). I dati sono espressi come la media $\pm$ S.E.M. e gli asterischi indicano quando $p < 0.001$ riguardo al controllo al tempo 0.

3.5 Modelling della struttura 3D dell'IFN di spigola (*Dicentrarchus labrax*)

La ricerca in BLAST mostra che la sequenza IFN di spigola è significativamente simile ad altre proteine IFN di organismi differenti (E-value di 10^{-15} con le sequenze di pesce e circa 10^{-6} - 10^{-3} con le sequenze di mammiferi). Questa ricerca ha permesso di trovare la struttura sperimentale dell'IFN- α 2 umano complessato con il suo recettore IFNAR-2 che potrebbe essere usato come riferimento per il modelling dell'IFN di spigola. L'allineamento pairwise tra le sequenze di uomo e di spigola mostra una bassa identità amminoacidica (circa 24%) [Figura III-15]. Questo livello di omologia richiede un'attenta analisi per prevedere la struttura tridimensionale della proteina. In questi casi, il problema principale è trovare il corretto allineamento di sequenza. Le sequenze con una bassa identità possono essere differentemente allineate e i gaps richiesti per allineare bene le sequenze potrebbero trovarsi nel mezzo degli elementi che determinano la struttura secondaria, con la conseguenza di ottenere un modello sbagliato (Tramontano A. 1998; Kopp J. and Schwede T., 2004). Pertanto, è stata applicata una procedura per l'allineamento recentemente descritta in alcuni lavori del nostro gruppo di ricerca (Buonocore F. et al., 2007a; Buonocore et al., 2008). A partire dall'allineamento ottenuto mostrato in Figura III-15, 10 modelli strutturali sono stati creati per la regione amminoacidica 23-185 di spigola.

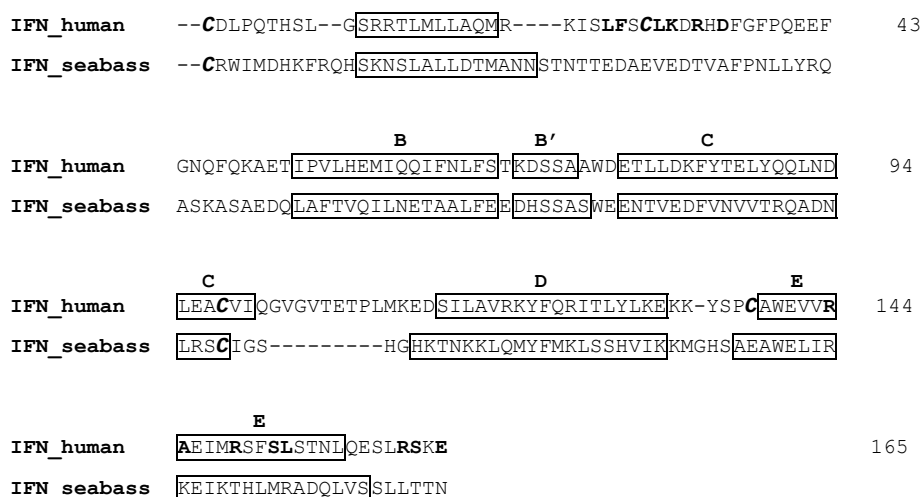


Figura III-15. Struttura secondaria e primaria dell'IFN di uomo e di spigola, allineato come per la procedura di modelling. I residui di cisteina sono riportati in corsivo e grassetto. Le eliche indicate con dei riquadri e delle lettere. I residui di interazione dell' IFN- α 2 umano con il suo recettore IFNAR-2 sono indicati in grassetto.

Il modello scelto per l'IFN di spigola è mostrato nella Figura III-16.

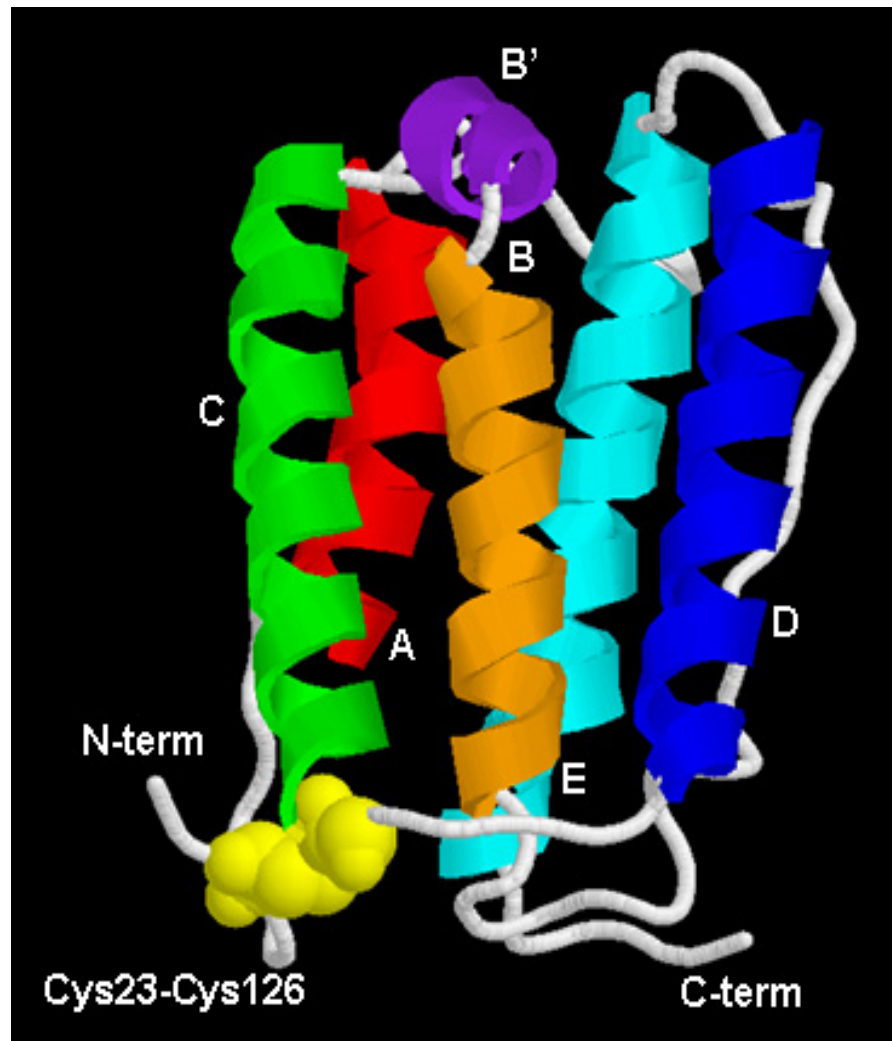


Figura III-16. Modello 3D dell'IFN di spigola. Le 6 eliche sono mostrate con colori differenti ed indicate con delle lettere. Il ponte disolfuro è evidenziato in giallo.

I modelli di uomo e di spigola sono stati comparati mediante sovrapposizione strutturale, valutazione dell' RMSD ed degli elementi strutturali secondari. La sovrapposizione delle regioni strutturalmente conservate dei modelli di uomo e spigola ha fornito un valore di RMSD di 0.49 Angstroms.

Questo valore indica che sia l'architettura totale della molecola che le 6 alpha eliche sono ben conservate.

Capitolo IV - Discussione

Negli ultimi anni ha assunto sempre più importanza lo studio del sistema immunitario nei Vertebrati e in particolare molte ricerche si sono incentrate sulle risposte antivirali. Diversi omologhi dell'IFN di tipo I e II sono stati clonati, ottenendo risultati che ci suggeriscono una certa somiglianza tra l'IFN di tipo I dei Pesci e quello dei Vertebrati Superiori; tuttavia sono state evidenziate anche delle differenze importanti.

Il lavoro di tesi da me intrapreso si è incentrato sul clonaggio del cDNA dell' IFN e dell'Mx, e sullo studio della struttura del gene IFN in spigola (*Dicentrarchus labrax* L). Inoltre è stata analizzata l'espressione di IFN e Mx in seguito a stimolazione *in vitro* con poly I:C ed è stata costruita la struttura tridimensionale dell'IFN.

Il cDNA IFN di spigola consiste di 1047 bp che vengono tradotti in una putativa proteina di 185 amminoacidi. Un'analisi della sequenza mostra la presenza di 2 residui di cisteina e 3 potenziali siti di N-glicosilazione. L'IFN di spigola differisce dall'IFN- α umano (che possiede 4 residui di cisteina), dall'IFN- λ umano (che possiede 6 residui di cisteina) e dall'IFN- β umano (che possiede 2 residui di cisteina ma in posizioni differenti) e non possiede il motivo CAWE che è usualmente presente nella regione C-terminale degli IFNs di tipo I dei Vertebrati Superiori (Zou J. et al., 2007). Il confronto della sequenza nucleotidica ed amminoacidica di spigola con quella di altre specie di pesci mostra un ampio range della percentuale d'identità: da 46.5% a 77.9% e da 26.6% a 66.1%, rispettivamente. Nell'analisi filogenetica le sequenze IFN di pesci formano un cluster comune (eccetto IFN3 di trota e IFN2 del pesce zebra) [Figura III-4].

L'IFN di spigola sembra essere maggiormente collegato all'IFN- α umano piuttosto che all'IFN- λ come ottenuto da altri studi omologhi in trota (Zou J. et al., 2007). L'analisi della struttura genica mostra un'altra caratteristica peculiare dell'IFN di spigola comparato agli omologhi di tipo I di Mammifero: la presenza di 4 introni, potenzialmente lo stato ancestrale per tutti gli IFNs e ancora presenti nell'IFN- λ nei Mammiferi.

Nel lavoro di Zou J. et al., 2007 condotto in trota (*Oncorhynchus mykiss*) sono stati caratterizzati 3 omologhi di IFN di tipo I appartenenti a 2 gruppi o sottoclassi distinti. I 3 omologhi si differenziano per la presenza o assenza di residui di cisteina ed inoltre mostrano differenti pattern d'espressione in tessuti diversi. In spigola, al momento abbiamo evidenziato la presenza di una sola sequenza di IFN di tipo I, ma ulteriori studi verificheranno questo risultato. Nei Mammiferi, l'IFN- α è prodotto in seguito all'infezione virale di leucociti mentre l'IFN- β è sintetizzato da molti tipi cellulari, in particolar modo da fibroblasti (Derynck R. et al., 1980; Goeddel D.V. et al., 1981). Nell'uomo e nel topo è stato recentemente osservato che il principale produttore di IFN- α è un sottotipo di cellule

dendritiche; esse sono pari a meno dell'1% dei leucociti circolanti nel sangue (Siegal F.P. et al., 1999). Queste cellule dendritiche giocano un ruolo cruciale nel presentare l'antigene virale alle cellule Th e CTL e sono in grado di sintetizzare 100 volte più IFN- α rispetto ad altri tipi di cellule infettate da virus.

Recenti studi hanno ipotizzato la presenza di cellule dendritiche nei pesci (Ohta Y. et al., 2004), studi futuri permetteranno di comprendere se nei pesci siano effettivamente presenti queste cellule e se sono espresse solo alcune isoforme IFN da particolari tipi cellulari proprio come avviene nei Mammiferi.

La scoperta di gruppi o sottoclassi di IFN di tipo I in trota ha incoraggiato la ricerca di molecole equivalenti in altre specie di pesci. Per iniziare sono state studiate specie per le quali era stato sequenziato l'intero genoma. Mediante l'analisi *in silico* è stato osservato che mentre il gruppo I di IFN nei pesci sembra essere presente universalmente nei teleostei, il gruppo II è stato trovato, al momento, solo nelle specie più primitive come trota e pesce zebra.

Una grande differenza tra i geni IFN di tipo I dei Pesci e dei Vertebrati Superiori è data dalla presenza di introni nei primi e dalla loro assenza nei secondi. La mancanza di introni negli IFNs di tipo I dei Vertebrati Superiori suggerisce che i geni IFN- α/β sono stati introdotti nei genomi degli Amnioti mediante un evento di retroposizione che è avvenuto durante l'evoluzione dei Vertebrati (Lutfalla G. et al., 2003). Tale evento di retroposizione ha portato alla sostituzione del singolo locus del gene IFN di tipo I (Zou J. et al., 2007). Il futuro sequenziamento di geni IFN nei Rettili potrà determinare il tempo dell'evento di retroposizione e se esso è stato un evento casuale o potenzialmente coincidente con la comparsa di importanti cambiamenti fisiologici nei Vertebrati [Figura IV-1].

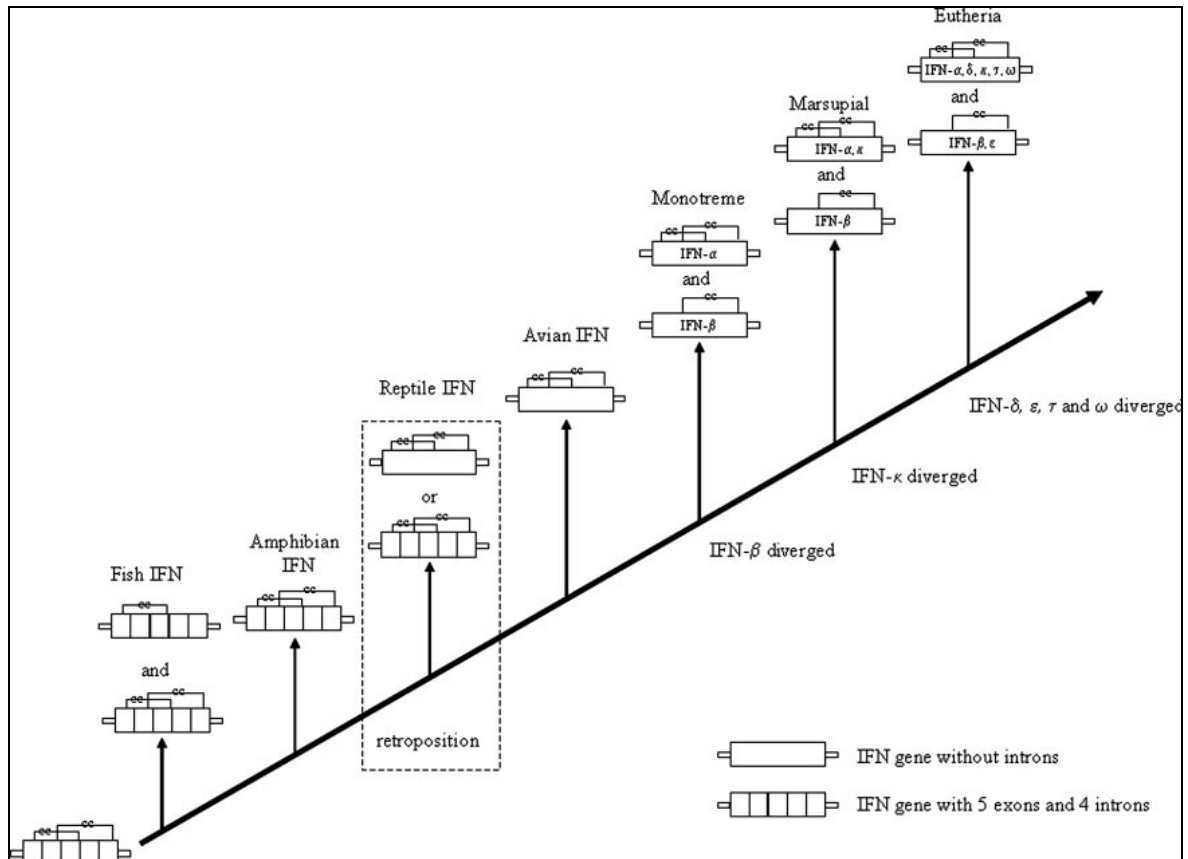


Figura VI-1. Modello schematico proposto per l'evoluzione dell'IFN nei Vertebrati.
(Zou J. et al., 2007)

Nella Figura IV-2 è mostrato un albero filogenetico che mostra chiaramente come gli IFNs dei Pesci formano un cluster separato dagli IFNs dei Vertebrati. Da questa analisi è evidente che Pesci e Anfibi non hanno le equivalenti sottoclassi di IFNs di tipo I osservate nei Mammiferi, quali gli IFN- α , β , δ , ϵ , κ , τ e ω . Non è ancora noto quale selezione sia a vantaggio della presenza di copie multiple degli IFNs di tipo I. Un'ipotesi è che durante l'evoluzione i Vertebrati abbiano prodotto un repertorio di IFNs per combattere l'aumentato numero di patogeni o per rispondere a cambiamenti immuno-fisiologici.

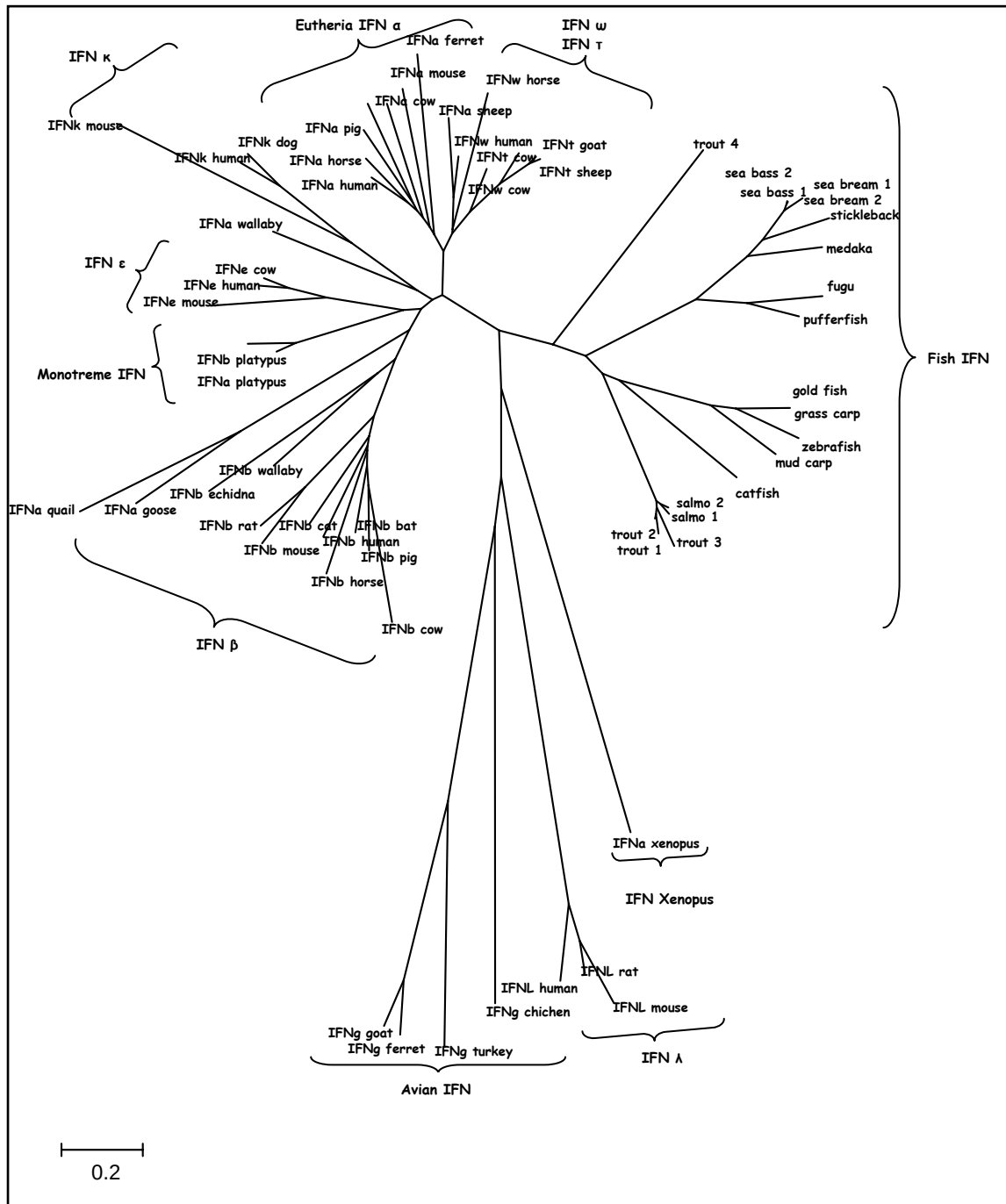


Figura IV-2. Albero filogenetico per l'IFN di tipo I nei Vertebrati ottenuto mediante il programma Mega 3.1. EMBL accession numbers: IFN- α : human, J00207; cow, M10954; horse, M14542; mouse, AL928605; sheep, OAU26254; pig, AY345969; bat, AB259762; wallaby, AY165859; echidna, AY194919; xenopus, BN001167. IFN- β : human, NM_002176; cow, NM_174350; cat, AB021707; horse, M14546; mouse, NM_010510; rat, D87919; pig, M86762; bat, AB259763; wallaby, AY165862; echidna, AY194920; platypus, BN001096. IFN- κ , human, NM_020124; mouse, NM_199157; dog, XM_538690. IFN- τ : cow, AY996048; sheep, DQ149979; goat, AY357327. IFN- ω : human, X58822; cow, M11002; horse, M14544. IFN- ϵ : human, NM_176891; mouse, NM_177348; cow, XP_586616; IFN- λ : human, BC130316; mouse, AY869695; rat, XP_001078329. Fish IFN: sea bass, AM765846, AM765847; zebrafish, AJ544820; trout, AJ580911, AM489415, AJ582754, AM235738; medaka, BN001095; stickleback, BN001087; Fugu, AJ583023; catfish, AY847295; salmon, AY216594, AY216595; pufferfish, ; gold fish, ; grass carp, ; mud carp, . Avian IFN: IFN- α : goose, AY524422; duck, AB302328; quail, AB154298; ferret, EU091340. IFN- β : ferret, EF581890. IFN- γ : chicken, AY820753; turkey, AJ000725; ferret, EF492064; goat, EF375708.

Un'altra differenza tra il sistema IFN dei Pesci e dei Vertebrati Superiori si trova nei recettori specie-specifici con i quali la molecola si va a legare; sembrerebbe infatti che Pesci e Vertebrati Superiori possiedano recettori diversi. L'IFNAR-1 non è stato trovato nel cluster genico del putativo recettore del'IFN di tipo I del pesce palla per cui si può ipotizzare che sia assente nei Pesci (Lutfalla G. et al., 2003). Ciò suggerisce che IFNAR-1 si è evoluto negli amnioti dopo la retroposizione del gene IFN α/β (Lutfalla G. et al., 2003). La bassa omologia tra gli IFNs di tipo I dei Vertebrati e lo sviluppo di molti IFNs di tipo I nei Mammiferi, probabilmente riflette una co-evoluzione degli IFNs con i loro recettori, con il sistema immunitario, con cellule e organi immunitari, e con patogeni virali (Levraud J.P. et al., 2007).

Una delle risposte antivirali delle cellule, in seguito all'espressione di IFN, è la produzione della proteina Mx. La proteina Mx di spigola è costituita da 1959 bp di sequenza codificante tradotte in una putativa proteina di 652 amminoacidi. La molecola mostra motivi caratteristici delle proteine Mx. E' presente un motivo GTP-asico tripartito (GXXXSGKS/T, DXXG e TKXD) ed un altro caratteristico della famiglia delle dinamine LPRG(S/K)GIVTR. Un putativo leucine zipper, conservato in tutte le altre proteine Mx, si osserva anche nella regione C-terminale della proteina Mx di spigola. Come si osserva per l'orata, anche in spigola non compaiono siti di N-glicosilazione (come ad esempio il sito NXT/S che invece è presente in altri teleostei, come si osserva dall'allineamento amminoacidico di Figura III-8). L'omologia più alta con altre sequenze Mx è nella regione N-terminale della proteina. Questa regione della proteina si pensa abbia una funzione regolatoria, mentre la regione C-terminale corrisponde al dominio effettore (Melén K. et al., 1994). Il cDNA dell'Mx di spigola non mostra il segnale di poliadenilazione AATAAA come si osserva anche in trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Trobridge G.D. et al., 1995), in salmone (*Salmo salar*) (Robertsen B. et al., 1997) e in passera giapponese (*Paralichthys olivaceus*) (Lee J.Y. et al., 2000). L'albero filogenetico mostra 2 clusters separati per Mammiferi e Pesci [Figura III-9]. In particolare si osserva che l'Mx di spigola mostra similarità elevata con quello di orata. La dimostrazione dell'attività antivirale delle proteine Mx nei Pesci costituisce un'importante step nella comprensione del meccanismo antivirale prodotto dal sistema IFN dei Pesci (Caipang C.M. et al., 2003; Larsen R. et al., 2004). Inoltre attesta come l'attività antivirale sia una proprietà conservata rispetto alle proteine Mx dei Vertebrati.

Per investigare l'attività biologica delle sequenze ottenute in precedenza ho studiato l'espressione di IFN e Mx in seguito a stimolazione *in vitro*. Per questo esperimento sono stati impiegati leucociti di rene cefalico e cellule DLEC di spigola stimulate *in vitro* con poly I:C per simulare l'infezione virale. In entrambe le sperimentazioni si osservano livelli d'espressione dell'IFN notevolmente aumentati dopo 6 ore. Un significativo incremento dell'espressione di Mx si osserva dopo 24 ore dalla stimolazione. Questa elevata induzione di IFN è in accordo con quanto precedentemente trovato in altri teleostei come pesce zebra, salmone, trota stimolati con poly I:C (Altmann S.M. et al., 2003; Robertsen et al., 2003; Zou et al., 2007). Inoltre, l'incremento dell'espressione di Mx costituisce una buona indicazione che questo gene è indotto dalla presenza di trascritti IFN come succede nei Mammiferi.

Infine, il modello tridimensionale dell'IFN è risultato costituito da un dominio "all-alpha" caratterizzato da un'architettura denominata "up-down bundle" costituita da 6 alpha-eliche (ABB'CDE). I due residui di cisteina presenti nella sequenza IFN di spigola (Cys23 and Cys126) sono nella giusta posizione e distanza per la possibile formazione di un ponte disolfuro che stabilizzerebbe la struttura.

In altri pesci sono stati condotti una serie di esperimenti che hanno permesso di analizzare l'attivazione del sistema IFN gettando le basi per applicare questi risultati all'acquacoltura. Uno dei problemi che si verificano negli impianti d'acquacoltura è l'infezione da virus. Molti tentativi sono stati compiuti per cercare di sviluppare dei vaccini efficaci ed economicamente appropriati ma con scarsi risultati (De Kinkelin P. et al., 1995, Leong J.C. et al., 1995). Alcuni anni fa, è stata presa in considerazione la vaccinazione a DNA come un metodo efficiente per conferire protezione ai pesci contro l'attacco da rabdovirus (Anderson E.D. et al., 1996, Leong J.C. et al., 1997, Lorenzen N. and La Patra S.E., 2005). I vaccini a DNA si sono dimostrati efficienti contro diversi rabdovirus: VHSV (*viral hemorrhagic septicemia virus*) (Eaton W.D. et al., 1991, Ogut H. et al., 2004, Traxler G.S. et al., 1997), IHNV (*infectious hematopoietic necrosis virus*) (Hopper K. 1989, Schlotfeldt H.J. and Ahne W., 1988, Vestergaard-Jorgensen P.E. 1982), SVCV (*spring viremia of the carp virus*) (Kim C.H. et al., 2000), HIRRV (*hirame rhabdovirus*) (Takano T. et al., 2004), SHRV (*snakehead rhabdovirus*) (Kim C.H. et al., 2000). Anche se la protezione fornita da questi vaccini è alta e relativamente di lunga durata, essi ancora non sono impiegati di routine in quanto esistono problemi di sicurezza, difficoltà nella produzione del vaccino su larga scala (metodi di vaccinazione di massa) e costi abbastanza alti per gli impianti.

Attualmente, il meccanismo immunitario responsabile della protezione dall'infezione mediata da tali vaccini non è stato del tutto chiarito. Molti studi si basano sull'analisi di quali citochine e geni immunitari si attivano in risposta al vaccino. E' quindi ovvio come l'interesse della ricerca scientifica in ambito di acquacoltura si stia sempre più indirizzando verso lo studio della risposta del sistema IFN all'infezione virale. Inoltre, si è evidenziato come anche delle sostanze chimiche sono in grado di attivare questo complesso sistema immunitario proprio come avviene nel caso del poly I:C.

Le imidazochinoline, ad esempio, hanno una potente azione antivirale e antitumorale in parecchi modelli animali. L'imiquimodo, un componente delle imidazochinoline, costituisce attualmente un appropriato trattamento per le verruche ai genitali esterni causate dall'infezione del papilloma virus umano (Miller R.L. et al., 1999; Richwald G.A. 1999). Molte delle proprietà antivirali delle imidazochinoline sono da ascrivere all'induzione dell'IFN- α nelle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) e recentemente, cellule dendritiche plasmacitiche (pDCs) sono state confermate come le cellule predominanti nel sangue in grado di produrre IFN- α in risposta alle imidazochinoline (Gibson S.J. et al., 2002). Comunque, le imidazochinoline inducono anche altre citochine nei Mammiferi come TNF- α , IL-6, IL-12 nei macrofagi (Hemmi H. et al., 2002). Le citochine rispondono all'azione delle imidazochinoline e sono probabilmente espresse dalle cellule che contengono TLR7 e/o TLR8, recettori presenti esclusivamente sulle cellule del sistema immunitario. TLR7 è espresso dalle cellule B, dai macrofagi, e dai neutrofili oltre che dalle pDCs (Hayashi F. et al., 2003; Hemmi H. et al., 2002; Hornung V. et al., 2002; Liu Y.J. 2005). TLR8 è espresso invece dai monociti, dalle cellule dendritiche mieloidi e dai neutrofili (Hayashi F. et al., 2003; Liu Y.J. et al., 2005). Gli studi condotti suggeriscono che il poly I:C stimola prevalentemente cellule nucleate mentre le imidazochinoline stimolano soltanto le cellule immunitarie che esprimono TLR7 o TLR8, in particolare pDCs. Di conseguenza, le imidazochinoline e il poly I:C possono essere usate per stimolare differenti parti del sistema immunitario innato antivirale e ciò dovrebbe essere riflesso dalla risposta delle citochine da essi indotte.

In conclusione la disponibilità delle sequenze geniche di IFN e Mx in spigola permetterà di studiare nel dettaglio anche in questo importante teleosteo le risposte antivirali e quindi evidenziare lo stato di salute dell'animale a seguito di vaccinazioni e immunostimolazioni.

Capitolo V - Bibliografia

Capitolo V - Bibliografia

- Abbas A.K., Lichtman A.H.** – Fondamenti di immunologia – Casa editrice PICCIN 2003
cap.1 pag. 8-10
- Abelli L., Picchietti S., Romano N., Mastrolia L., Scapigliati G.** 1996.
Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* 6: 493-505
- Abelli L., Picchietti S., Romano N., Mastrolia L., Scapigliati G.** 1997.
Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* 7: 235-246
- Abelli L., Baldassini M.R., Mastrolia L., Scapigliati G.** 1999. Immunodetection of lymphocyte subpopulations involved in allograft rejection in a teleost, *Dicentrarchus labrax* L. *Cell. Immunol.* 191(2): 152-60
- Adermann K., Raida M., Paul Y., Abu-Raya S., Bloch-Shilderman E., Lazarovici P., Hochman J., Wellhoner H.** 1998. Isolation, characterization and synthesis of a novel paraxin isoform. *FEBS Lett.* 435: 173–177
- Ainsworth A.J.** 1992. Fish granulocytes: morphology, distribution and function. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2: 123
- Alexander J.B.** 1980. Precipitins in the serum of the Atlantic salmon. *Dev. Comp. Immunol.* 4: 641–651
- Allendorf F.W. and Thorgaard G.H.** 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In: Turner BJ, editor. *Evolutionary Genetics of Fishes*. New York: Plenum; p. 1-53
- Altmann S.M., Mellon M.T., Distel D.L., Kim C.H.** 2003. Molecular and functional analysis of an interferon gene from zebrafish, *Danio rerio*. *J. Virol.* 77: 1992-2002
- Altmann S.M., Mellon M.T., Johnson M.C., Paw B.H., Trede N.S., Zon L.I., et al.** 2004. Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Comp. Immunol.* 28(4): 295-306
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D.J.** 1990. Best local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Anderson E.D., Mourich D.V., Fahrenkrug S.C., LaPatra S.C., Shepherd J., Leong J.C.** 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5: 114–22
- Araki K., Akatsu K., Suetake H., Kikuchi K., Suzuki Y.** 2008. Characterization of CD8⁺ leukocytes in fugu (*Takifugu rubripes*) with antiserum against fugu CD8 α . *Dev. Comp. Immunol.* 32: 850–858

- Arnheiter H., Frese M., Kamadur R., Meier E., Haller O.** 1996. Mx transgenic mice-animal models of health. *Curr. Top. Microbiol.* 206:119-147
- Avrameas S. and Ternynck T.** 1995. Natural antibodies: the other side of the immune system. *Res. Immunol.* 146: 235-248
- Bach E.A., Aguet M., Schreiber R.D.** 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 563– 591
- Baggiolini M.** 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392 (6676): 565-568
- Baglioni C., Maroney P. A., West D. K.** 1979. 2',5' Oligo(A) polymerase activity and inhibition of viral RNA synthesis in interferon treated HeLa cells. *Biochemistry* 18: 1765– 1770
- Balachandran S., Kim C.N., Yeh W.C., Mak T.W., et al.** 1998. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J.* 23: 6888–6902
- Bandyopadhyay S. K., Leonard G. T., Bandyopadhyay T., Stark G. R., Sen G. C.** 1995. Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-inducible response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3. *J. Biol. Chem.* 270: 19624–19629
- Barnes P.F., Chatterjee D., Abrams J.S., Lu S., Wang E., Yamamura M., et al.** 1992. Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. *J. Immunol.* 149: 541-7
- Bei J.X., Suetake H., Araki K., Kikuchi K., Yoshiura Y., Lin H.R., et al.** 2006. Two interleukin (IL)-15 homologues in fish from two distinct origins. *Mol. Immunol.* 43:860-9
- Benham A., Tulp A., Neejes J.** 1995. Synthesis and assembly of MHC-peptide complexes. *Immunol. Today.* 16: 359-362
- Bennani N., Schmid-Alliana A., Lafaurie M.** 1995. Evaluation of phagocytic activity in a teleost fish, *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 237–246
- Berek C. and Ziegner M.** 1993. The maturation of the immune response. *Immunol. Today* 14: 400-404
- Bergan V. and Robertsen B.** 2004 Characterization of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Mx protein expression. *Dev. Comp. Immunol.* 28(10): 1037-47
- Bielek E.** 1981. Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio*; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell and Tissues Research.* 220: 163-180

- Bird S., Zou J., Secombes C.J.** 1998. Evolution of IL-1 β gene in vertebrates (*Pleuronectes platessa*). EMBL accession N° AJ010640
- Bird S., Zou J., Secombes C.J.** 1999. Evolution of IL-1 β gene in vertebrates (*Scyliorhinus caniculus*). EMBL accession N° AJ251201
- Bird S., Zou J., Kono T., Sakai M., Dijkstra J.M., Secombes C.** 2005. Characterisation and expression analysis of interleukin 2 (IL-2) and IL-21 homologues in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, following their discovery by synteny. *Immunogenetics* 56: 909-23
- Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P.** 1999. Natural killer cells in antiviral defence: function and regulation by innate cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* 17: 189-220
- Biron C. A. and Sen G.C.** 2001. Interferons and other cytokines, p.321–351. In Knipe D. M., Howley P.M., Griffin D.E., Martin M., Roizman B., and Straus S.E.(ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa
- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L.,Wiley D.C.** 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512–518
- Blatt L.M., Davis J.M., Klein S.B., Taylor M.W.** 1996. The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon-alpha species, consensus interferon. *J. Interferon Cytokine Res.* 16: 489–499
- Bly J.E., Miller N.W., Clem L.** 1990. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* 14: 211
- Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J.C.** 1997. Cellular responses to interferon- γ . *Ann. Rev. Immunol.* 15: 749-795
- Bogdan C., Vodovotz Y., Nathan C.** 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174:1549-55
- Boismenu R. and Havran W.L.** 1997. A congenital view of $\gamma\delta$ T-Cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 57-63
- Boshra H., Bosh N., Sunyer J.O.** 2001. Purification, generation of antibodies and functional characterization of trout C3-1, C3-3, C3-4, C4-1, C4-2, C5, factor B and factor D complement molecules. In: *Proceedings of the 5th Nordic Symposium on Fish Immunology*, Sundvollen Norway, p. 29

- Botham J.W. and Manning M.J.** 1981. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity. *J. Fish Biol.* 19: 403-414
- Boudinot P., Massin P., Blanco M., Riffault S., Benmansour A.** 1999. Vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoaA family. *J. Virol.* 73: 1846–52
- 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(5): 383–97
- Brodsky F.M. and Guagliardi L.E.** 1991. The cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 707-44
- Brown K.L. and Hancock R.E.** 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 24-30
- Brubacher J.L., Secombes C.J., Zou J., Bols N.C.** 2000. Constitutive and LPS-induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* 24: 565–574
- Buelens C., Bartholome E.J., Amraoui Z., Boutriaux M., Salmon I., Thielemans K., Willems F., Goldman M.** 2002. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood* 99: 993-998
- Buonocore F., Mazzini M., Forlenza M., Randelli E., Secombes C.J., Zou J., Scapigliati G.** 2004. Expression in *E. coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-1 β , a possible immuno-adjuvant in aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 6(1): 53-59
- Buonocore F., Randelli E., Casani D., Mazzini M., Cappuccio I., Secombes C.J., Scapigliati G.** 2005a. cDNA cloning and expression analysis after vaccination of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) - *Aquaculture* 245: 301-310
- Buonocore F., Forlenza M., Randelli E., Benedetti S., Bossù P., Meloni S., Secombes C.J., Mazzini M., Scapigliati G.** 2005b. Biological Activity of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Recombinant Interleukin-1beta. *Mar. Biotechnol.* 7(6): 609-617
- Buonocore F., Libertini A., Prugnoli D., Mazzini M., Scapigliati G.** 2006a. Production and characterization of a continuous embryonic cell line from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mar. Biotech.* 8: 80-85

- Buonocore F., Randelli E., Bird S., Secombes C.J., Constantini S., Facchiano A., et al.** 2006b. The CD8a from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cloning, expression and 3D modelling. *Fish Shellfish Immunol.* 20: 637-46
- Buonocore F., Randelli E., Bird S., Secombes C.J., Facchiano A., Costantini S., et al.** 2007a. Interleukin-10 expression by real-time PCR and homology modelling analysis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 270: 512-22
- Buonocore F., Randelli E., Casani D., Costantini S., Facchiano A.M., Scapigliati G., Stet R.J.M.** 2007b. Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II b chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 23: 853-866
- Buonocore F., Randelli E., Casani D., Guerra L., Picchiatti S., Costantini S., Facchiano A.M., Zou J., Secombes C.J., Scapigliati G.** 2008. A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Molecular characterization and structural analysis. *Mol. Immunol.* 45: 3168–3177
- Caipang C.M., Hirono I., Aoki T.** 2003. In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. *Virology* 317(2): 373-82
- Cammarota G., Scheirle A., Takacs B., Doran D.M., Knorr R., Bannwarth W., Guardiola J., Sinigaglia F.** 1992. Identification of a CD4 binding site on the 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* 356: 799–801
- Cannon J.P., Haire R.N., Litman G.W.** 2002. Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. *Nat. Immunol.* 3: 1200–1207
- Casani D.** 2004. Clonaggio ed espressione del gene della ciclo-ossigenasi (COX-2) di spigola (*Dicentrarchus labrax* L.). *Tesi di laurea*, Facoltà di Scienze M.M. F.F. N.N. dell'Università degli Studi della Tuscia
- Caspi R.R. and Avtallion R.R.** 1984. Evidence for the existence of an IL-2like lymphocyte growth factor in a bony fish, *Cyprinus carpio*. *Dev. Comp. Immunol.* 8: 51-60
- Chantanachookhin C., Seikai T., Tanaka M.** 1991. Comparative study on the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture.* 99: 143-156
- Charlemagne J. and Tourneier A.** 1998. Immunology of Amphibians. *Handbook of vertebrate immunology*, Pastoret P.P. et al. Eds., Acad. 63-72
- Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hétru C., Hoffmann J.A., Bulet P.** 1996. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* 271: 21808–21813

- Chien Y.H., Jores K., Crowley M.P.** 1996. Recognition by $\gamma\delta$ T-Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 511-532
- Chilmonczyk S.** 1983. The thymus of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. Light and electron microscopy study. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 59-68
- Chilmonczyk S.** 1992. The thymus in fish: developmental and possible function in the immune response. *Ann. Rev. Fish Disease* 2: 181-200
- Chistiakov D.A., Hellemans B., Volckaert F.A.M.** 2007. Review on the immunology of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 117: 1-16
- Clark S.J., Jefferies W.A., Barclay A.N., Gagnon J., Williams A.F.** 1987. Peptide and nucleotide sequences of rat CD4 (W3/25) antigen: evidence for derivation from a structure with four immunoglobulin- related domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1649-53
- Classon B.J., Tsagaratos J., McKenzie I.F., Walker I.D.** 1986. Partial primary structure of the T4 antigens of mouse and sheep: assignment of intrachain disulfide bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4499-4403
- Clem L.W., Miller N.W, Bly J.E.** 1991. Evolution of lymphocyte subpopulations, their interaction and temperature sensitivities. *Phylogenesis of Immune Functions*, Warr G. and Cohen N. Eds., Boca Raton: CRC. 191-213
- Clemens M.J., Hershey J.W.B., Hovanessian A.C., Jacobs B.L., Katze M.G., R. J. Kaufman, Lengyel P., Samuel C.E., Sen G.C., Williams B.R.G.** 1993. PKR: proposed nomenclature for the RNA-dependent protein kinase induced by interferon. *J. Interferon Res.* 13: 241
- Clemens M. J. and Elia A.** 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 503-524
- Cole A.M., Weis P., Diamond G.** 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.* 272: 12008-12013
- Collet B. and Secombes C.J.** 2001. The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter. Structural and functional characterization. *Eur. J. Biochem.* 268: 1577-84
- Colonna M., Krug A., Cella M.** 2002. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 373-379
- Cooper E.** 1995. *Sravnitel'naya immunologiya* (Comparative Immunology). Moscow
- Cooper M.D. and Alder M.N.** 2006. The evolution of adaptive immune system. *Cell.* 124: 815-822

- Costantini S., Colonna G., Rossi M., Facchiano A.M.** 2005. Modelling of HLA-DQ2 and simulations of its interaction with gluten peptides to explain molecular recognition in celiac disease. *J. Molec. Graph. Model.* 23: 419-431
- Coulombel C., Vodjdani G., Doly J.** 1991. Isolation and characterization of a novel interferon- α encoding gene, IFN- α 11, within a murine IFN cluster. *Gene* 104: 187-195
- Cuchens M. A. and Clem L. W.** 1977. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cell. Immunol.* 43: 219
- Cuesta A. and Tafalla C.** 2008. Transcription of immune genes upon challenge with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in DNA vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Vaccine (In press)
- Cunha F.Q., Moncada S., Liew F.Y.** 1992. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 1155-9
- Cupit P.M., Hansen J.D., McCarty A.S., White G., Chioda M., Spada F. et al.** 2003. Ikaros family members from the agnathan *Myxine glutinosa* and the urochordate *Oikopleura dioica*: emergence of an essential transcription factor for adaptive immunity, *J. Immunol.* 171: 6006–6013
- Daniels G.D., Zou J., Charlemagne J., Partula S., Cunningham C., Secombes C.J.** 1999. Cloning of two chemokine receptor homologs (CXCR4 and CC-R7) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Leukoc. Biol.* 65(5): 684-690
- Darnell J.E. Jr., Kerr I.M., Stark G.M.** 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415–1421
- Darnell J.E. Jr.** 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277 (5332): 1630-1635
- Das B.K., Nayak K.K., Collet B., Snow M., Ellis A.E.** 2007. Expression of Mx protein in tissues of Atlantic salmon postsmolts-an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 1209-1217
- Das B.K., Urquhart K., Ellis A.E., Collet B.** 2008. Induction of Mx protein in Atlantic cod with poly I:C: Immuno-cross reactive studies of antibodies to Atlantic salmon Mx with Atlantic cod. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 321-324
- De Guerra A. and Charlemagne J.** 1997. Genomic organisation of the TcR β -chain diversity (D β) and joining (J β) segments in the rainbow trout: presence of many repeated sequences. *Mol. Immunol.* 34: 653–662

- De Kinkelin P., Bearzotti M., Castric J., Nougayrede P., Lecocq-Xhonneux F., Thiry M.** 1995. Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicemia in France. *Vet. Res.* 26: 379–87
- Derynck R., Content J., DeClercq E., Volckaert G., Tavernier J., Devos R., Fiers W.** 1980. Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. *Nature* 285: 542–547.
- Destoumieux D., Munoz M., Bulet P., Bachère E.** 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1260–1271
- deWaal Malefyt R., Yssel H., deVries JE.** 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 150: 4754–65
- Diaz M.O., Bohlander S., Allen G.** 1996. Nomenclature of the human interferon genes. *J. Interferon Cytokine Res.* 16: 179–180
- Dinarello C.A.** 1997. Interleukin-1. *Cytokines and Growth Factors Review* 8: 253–265
- Ding Y.Z., Fu S., Zamarin D.** 2003. Interleukin-10. In: Thomson A.W., Lotze M.T., editors. *The cytokine handbook*. 4th ed. London: Academic Press; p. 603–25
- Dixon B., Shum B., Adams E.J., Magor K.E., Hedrick R.P., Muir D.G., Parham P.** 1998. CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol. Rev.* 166(1-2): 341–348
- Doly J, Civas A, Navarro S, Uze G.** 1998 Type I interferons: expression and signalization. *Cell Mol. Life Sci.* 54(10): 1109–21
- Dong L.W., Kong X.N., Yan H.X., Yu L.X., Chen L., Yang W., Liu Q., Huang D.D., Wu M.C., Wang H.Y.** 2008. Signal regulatory protein alpha negatively regulates both TLR3 and cytoplasmic pathway in type I interferon induction. *Mol. Immunol.* 45: 3025–3035
- Dos Santos N.M.S., Taverne N., Taverne-Thiele J.J., De Sousa M., Rombout J.H.W.M.** 1997. Characterization of monoclonal antibodies specific for sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) IgM indicates the existence of B cell subpopulations. *Fish Shellfish Immunol.* 7: 175–191
- Dos Santos N.M.S., Taverne-Thiele J.J., Barnes A.C., Ellis A.E., Rombout J.H.W.M.** 2001. Kinetics of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) systemic and mucosal antibody secreting cell response to different antigens (*Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, *Vibrio anguillarum* and DNP). *Fish Shellfish Immunol.* 11: 317–331

- Douglas S.E., Gallant J.W., Liebscher R.S., Dacanay A., Tsoi S.C.M.** 2003. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 589–601
- Du Pasquier L. and Flajnik M.** 1998. Origin and evolution of the vertebrate immune system. *Fundamental Immunology*. Paul W.E. Edition, Philadelphia – N-Y: Lippincott-Raven, 4th Ed. 605-650
- Du Pasquier L.** 2005. Meeting the demand for innate and adaptive immunities during evolution. *Scan. J. Immunol.* 62: 39-48
- Duff D.C.B.** 1942. The oral immunisation of trout against *Bacterium salmonicida*. *J. Immunol.* 44: 87
- Eaton W.D., Hulett J., Brunson R., True K.** 1991. The first isolation in North America of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in coho salmon from the same watershed. *J. Aquat. Anim. Health* 3: 114–7
- Ellis A.E.** 1977. The leukocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.* 11: 435-491
- Ellis A.E.** 1989. The immunology of teleosts. *Fish Pathology*. R.J. Roberts eds, Baillière Tindall, London. 135-152
- Ellsaesser C.F., Bly J.E., Clem L.W.** 1988. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the thymus of the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 787-799
- Engelsma M.Y., Stet R.J.M., Verburg-van Kemenade B.M.L.** 1999. The genomic organization of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 β . EMBL, accession number AJ245635
- Esteban M.A., Meseguer J., Garcia Ayala A., Agulleiro B.** 1989. Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* 52: 407
- Estepa A. and Coll J.M.** 1991. Infection of mitogen stimulated colonies from trout kidney cell cultures with salmonid viruses. *J. Fish Dis.* 14: 555–562
- Estévez J., Leiro J., Santamarina M.T., Dominguez J., Ubeira F.M.** 1994. Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41: 353
- Evans D.L. and Jaso-Friedmann L.** 1992. Non specific cells as effectors of immunity in fish. *Annual review of fish disease.* 2: 109-121
- Facchiano A.M., Stiuso P., Chiusano M.L., Caraglia M., Giuberti G., Marra M. et al.** 2001. Homology modelling of the human eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *Protein Eng.* 14: 881-890

- Fange R.** 1982. A comparative study of limphomyeloid tissue in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 2: 23
- Fellous M., Nir U., Wallach D., Merlin G., Rubinstein M., Revel M.** 1982. Intereferon-dependent induction of mRNA for the histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3082-3086
- Fernandes J.M., Kemp G.D., Molle G., Smith V.J.** 2002a. Antimicrobial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem. J.* 368: 611–620
- Fernandes J.M. and Smith V.J.** 2002b. A novel antimicrobial function for a ribosomal protein from skin secretions of rainbow trout. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 167–171
- Fijiki K., Shin D.H., Nakao M., Yano T.** 1999. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemochine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization. *Immunogenetics.* 49(10): 909-914
- Fiorentino D.F., Zlotnik A., Mosmann T.R., Howard M., O'Garra A.** 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147: 3815-22
- Fischer U., Utke K., Ototake M., Dijkstra J.M., Kollner B.** 2003. Adaptive cell-mediated cytotoxicity against allogeneic targets by CD8-positive lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* 27: 323-37
- Fisher U., Dijkstra J.M., Kollner B., Kiryu I., Koppang E.O., Hordvik I., et al.** 2005. The ontogeny of MHC I class I expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 18: 49–60
- Fletcher T.C.** 1982. Non-specific defence mechanisms of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 6(S2): 123-132
- Fomsgaard A., Hirsch V.M., Johnson P.R.** 1992. Cloning and sequences of primate CD4 molecules: diversity of the cellular receptor for simian immunodeficiency virus/human immunodeficiency virus. *Eur. J. Immunol.* 22: 2973-81
- Forlenza M.** 2002. Clonaggio ed espressione dell'IL-1 β di spigola, *Dicentrarchus labrax* (TELEOSTEA, PERCICHTHYDAE). *Tesi di laurea*, Facoltà di Scienze M.M. F.F. N.N. dell'Università degli Studi della Tuscia
- Franchini S., Zarkadis I.K., Sfyroera G., Sahu A., Moore W.T., Mastellos D., et al.** 2001. Cloning and purification of the rainbow trout fifth component of complement (C5). *Dev. Comp. Immunol.* 25: 419-30

- Fujiki K., Shin D.H., Nakao M., Yano T.** 2000. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta high affinity immunoglobulin E Fc receptor γ subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 229-242
- Furlong R.F. and Holland P.W.** 2002. Bayesian phylogenetic analysis supports monophyly of ambulacraria and of cyclostomes. *Zoolog. Sci.* 19: 593-599
- Galaktionov V.G.** 1995. *Ocherki evolyutsionnoi immunologii* (Notes about the Evolutionary Immunology). Moscow
- Garcia K.C., Teyton L., Wilson I.A.** 1999. Structural basis of T cell recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 17: 369–397
- Germain R.N.** 2002. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 309–322
- Gibson S.J., Lindh J.M., Riter T.R., Gleason R.M., Rogers L.M., Fuller A.E., et al.** 2002. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol.* 218: 74-86
- Goeddel D. V., Leung D. W., Dull T. J., Gross M., Lawn R. M., McCandliss R., Seeburg P. H., Ullrich A., Yelverton E., Gray P. W.** 1981. The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs. *Nature* 290: 20–26
- Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E.** 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 81:2341-64
- Gorgollon P.** 1983. Fine structure of the thymus in the adult cling fish *Sicyases sanguineus* (Pisces, Gobiesocidae). *J. Morphol.* 177: 25-40
- Graham S. and Secombes C.J.** 1988. The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leukocytes. *Immunology.* 65: 293-297
- Graham S. and Secombes C.J.** 1990. Cellular requirements for lymphokinesecretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 14: 59-68
- Greenhalgh P., Olesen C.E., Steiner L.A.** 1993. Characterization and expression of recombinant activating genes (RAG-1 and RAG-2) in *Xenopus laevis*. *J. Immunol.* 151: 3100-3110
- Grieder F.B. and Vogel S.N.** 1999. Role of interferon and interferon regulatory factors in early protection against Venezuelan equine encephalitis virus infection. *Virology* 257:106–118
- Grimm D., Staeheli P., Hufbauer M., Koerner I., Martinez-Sobrido L., Solorzano A., Garcia-Saster A., Haller O., Kochs G.** 2007. Replication fitness determines high

- virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 6806-6811
- Grondel J.L. and Harmsen E.G.** 1984. Phylogeny of interleukins: growth factors produced by leucocytes of the cyprinid fish, (*Cyprinus carpio* L.). *Immunology* 52: 477
- Haller O., Frese M., Kochs G.** 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epizootol.* 17: 220-230
- Haller O. and Kochs G.** 2002. Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3(10): 710-7
- Hanley P.J., Hook J.W., Raftos D.A., Gooley A.A., Trent R., Raison R.L.** 1992. Hagfish humoral defence protein exhibits structural and functional homology with mammalian complement component. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 89: 7910-7914
- Hansen J.D. and Zapata A.G.** 1998. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol. Rev.* 166: 199–220
- Hardie L.J., Fletcher T.C., Secombes C.J.** 1994. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 41: 113
- Hayashi F., Means T.K., Luster A.D.** 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102: 2660-9
- Heim M.H.** 1999. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J. Receptor Signal Transduction Res.* 19: 75–120
- Hemmi H., Kaisho T., Takeuchi O., Sato S., Sanjo H., Hoshino K., et al.** 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3: 196-200
- Hine P.M.** 1992. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2: 79-98
- Hogan R.J., Stuge T.B., Clem L.W., Miller N., Chinchar V.G.** 1996. Anti-viral cytotoxic cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* 20: 115
- Holland J.W., Bird S., Williamson B., Woudstra C., Mustafa A., Wang T., Zou J., Blaney S.C., Collet B., Secombes C.J.** 2008. Molecular characterization of IRF3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Functional analysis and transcriptional modulation. *Mol. Immunol.* 46: 269–285
- Hopper K.** 1989. The isolation of VHSV from salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *Am. Fish Soc. Fish Health News* 17: 1
- Hordvik I., Jacob A.L.J., Charlemagne J., Endresen C.** 1996. Cloning of T cell antigen receptor beta chain cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 45: 9–14

- Hordvik I., Torvund J., Moore L., Endresen C.** 2004. Structure and organisation of the T cell receptor alpha chain genes in Atlantic salmon. *Mol. Immunol.* 41: 553–559
- Horisberger M.A.** 1995. Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152(4 Pt 2): S67-71
- Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdorfer B., Giese T., et al.** 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1e10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168: 4531-7
- Horvath C.M.** 2000. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* 25: 496–502
- Hubert F., Noël T., Roch Ph.** 1996. A new member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.* 240, 302–306
- Hwang P.M. and Vogel H.J.** 1998. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell Biol.* 76: 235-46
- Igawa D., Sakai M., Savan R.** 2006. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. *Mol. Immunol.* 43: 999-1009
- Imai E., Ishikawa J., Moritomo T., Tomana M.** 2005. Characterisation of T cell antigen receptor α chain isotypes in the common carp. *Fish Shellfish Immunol.* 19: 205–216
- Inoue Y., Kamota S., Ito K., Yoshiura Y., Ototake M., Moritomo T., et al.** 2005. Molecular cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-10 cDNAs. *Fish Shellfish Immunol.* 18: 335-44
- Irwin M.J. and Kaattari S.L.** 1986. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12: 39-45
- Isaacs A. and Lindenmann J.** 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 147: 258–267
- Israelsson O., Petersson A., Bengten E., Wiersma E.J., Andersson J., Gezelius G., Pilström L.** 1991. Immunoglobulin concentration in Atlantic cod *Gadus morhua*. Serum and cross-reactivity between anti-cod antibodies and immunoglobulins from other species. *J. Fish Biol.* 39: 265
- Jacobs B.L. and Langland J.O.** 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular response to double-stranded RNA. *Virology* 219(2): 339-49

- Jaillon O., Aury J.M., Brunet F., Petit J.L., Stange-Thomann N., Mauceli E., et al.** 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate protokaryotype. *Nature* 431: 946-57
- Janeway C.A. Jr, Travers P., Walport M., Capra J.D.** 1999. *Immunobiology*. CB-Garland-Churchill-Livingstone. 4th Edition
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.** 2001. *Immunobiology*, fifth ed. Garland Publication, New York
- Jarilin A.A.** 1999. *Osnovy immunologii* (Bases of Immunology). Moscow
- Jensen V. and Robertsen B.** 2000. Cloning of a Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 20: 701-10
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.** 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 491–511
- Jimenez-Garcia L.F., Green S.R., Mathews M.B., Spector D.L.** 1993. Organization of the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI and virus-associated VA RNA1 in adenovirus-2-infected He-La cells. *J. Cell Sci.* 106: 11–22
- John J., McKendry R., Pellegrini S., Flavell D., Kerr L.M., Stark G.R.** 1991. Isolation and characterization of a new mutant human cell line unresponsive to alpha and beta interferons. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4189–4195
- Jürgens M., Wollenberg A., Hanau D., de la Salle H., Bieber T.** 1995. Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, Fc epsilon RI. *J. Immunol.* 155(11): 5184-9
- Kabsch W. and Sander C.** 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22: 2577-2637
- Kang C.J., Wang J.X., Zhao X.F., Yang X.M., Shao H.L., Xiang J.H.** 2004. Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 16: 513–525
- Karpusas M., Nolte M., Benton C.B., Meier W., Lipscomb W.N., Goelz S.** 1997. The crystal structure of human interferon beta at 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11813-11818
- Kasahara M., Suzuki T., Du Pasquier L.** 2004. On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Trends Immunol.* 25: 105-111

- Kazantzi A., Sfyroera G., Holland M.C., Lambris J.D., Zarkadis I.K.** 2003. Molecular cloning of the beta subunit of complement component eight of rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 167-74
- Kileng Ø., Albuquerque A., Robertsen B.** 2008. Induction of interferon system genes in Atlantic salmon by the imidazoquinoline S-27609, a ligand for Toll-like receptor 7. *Fish & Shellfish Immunol.* 24: 514-522
- Kim C.H., Johnson M.C., Drennan J.D., Simon B.E., Thomann E., Leong J.A.C.** 2000. DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce non-specific immunity and Mx protein synthesis in fish. *J. Virol.* 74: 7048-54
- Kimura T., Kadokawa Y., Harada H., Matsumoto M., Sato M., Kashiwazaki Y., Tarutani M., Tan R.S., Takasugi T., Matsuyama T., Mak T.W., Noguchi S., Taniguchi T.** 1996. Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 gamma) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies. *Genes Cells* 1: 115-124
- Klaus W., Gsell B., Labhardt A.M., Wipf B., Senn H.** 1997. The three-dimensional high resolution structure of human interferon α -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.* 274: 661-675
- Klausner R.D., Lippincott-Schwartz J., Bonifacino J.S.** 1990. The T-cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 403-431
- Klimovich V.B.** 2002. Actual problems of evolutionary immunology. *J. Evol. Bioch. Physiol.* 38(5): 562-574
- Kobayashi M., Fitz L., Ryan M., Hewick R.M., Clark S.C., Chan S., Loudon R., Sherman F., Perussia B., Trinchieri G.** 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170: 827-845
- Kochs G. and Haller O.** 1999. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (*Orthomyxoviridae*). *J. Biol. Chem.* 274: 4370-4376
- Konig R., Huang L., Germain R.N.** 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 346: 796-798
- Kontsek P., Karayianni-Vasconcelos G., Kontsekova E.** 2003. The human interferon system: characterisation and classification after discovery of novel members. *Acta Virol.* 47: 201-215
- Kopp J. and Schwede T.** 2004. Automated protein structure homology modeling: a progress report. *Pharmacogenomics* 5(4): 405-16

- Koppenheffer T.L.** 1987. Serum complement systems of ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 11: 279-286
- Koskinen R., Lamminmaki U., Tregaskes C.A., Salomonsen J., Young J.R., Vainio O.** 1999. Cloning and modeling of the first nonmammalian CD4. *J. Immunol.* 162: 4115-21
- Kotenko S.V., Gallagher G., Baurin V.V., Lewis-Antes A., Shen M., Shah N.K., Langer J.A., Sheikh F., Dickensheets H., Donnelly R.P.** 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4: 69-77
- Koumans-van Diepen J.C.E., Harmsen E.G.M., Rombout J.H.W.M.** 1994. Immunocytochemical analysis of mitogen responses of carp (*Cyprinus carpio* L.) peripheral blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 42: 209-19
- Koumans-Van Diepen J.C.E., Egberts E., Peixoto B.R., Taverne N., Rombout J.H.W.M.,** 1995. B cells and immunoglobulin heterogeneity in carp (*Cyprinus carpio* L.): an immuno (cyto) chemical study. *Dev. Comp. Immunol.* 19: 97
- Kullberg B.J. and Van der Meer J.W.M.** 1995. Cytokines on the treatment of infectious disease: options for the modulation of host defence. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands
- Kumar A., Haque J., Lacoste J., Hiscott J., Williams B.R.** 1994. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 6288–6292
- Kurtz J. and Franz K.** 2003. Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425: 37–38
- Kurtz J.** 2004. Memory in the innate and adaptive immune systems. *Microbes Infect.* 6: 1410–1417
- Lam S.H., Chua H.L., Gong Z., Lam T.J., Sin Y.M.** 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* 28: 9–28
- Lamers C.H.J.** 1985. The reaction of the immune system of fish to vaccination. *Tesi di Dottorato*, Agricultural University Wageningen, The Netherlands
- Langland J.O., Kao P.N., Jacobs B.L.** 1999. Nuclear factor-90 of activated T-cells: a double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *Biochemistry* 38: 6361–6368
- Lanzavecchia A.** 1990. Receptor mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 773-3

- Larsen R., Røkenes T.P., Robertsen B.** 2004 Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *J. Virol.* 78(15): 7938-4
- Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M.** 1993. PROCHECK - A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291
- Laskowski R.A., Crislyakov V.V., Thornton J.M.** 2005. PDBsum more: New summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 33, D266-D268
- Lau J.F., Parisien J.P., Horvath C.M.** 2000. Interferon regulatory factor subcellular localization is determined by a bipartite nuclear localization signal in the DNA-binding domain and interaction with cytoplasmic retention factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7278–7283
- Lauth X., Shike H., Burns J.C., Westerman M.E., Ostland V.E., Carlberg J.M., Van Olst J.C., Nized V., Taylor S.W., Shimizu C., Bulet P.** 2002. Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *J. Biol. Chem.* 277: 5030–5039
- Lauth X., Babon J.J., Stannard J.A., Singh S., Nizet V., Carsberg J.M., Ostland V.E., Pennington M.W., Norton R.S., Westerman M.E.** 2005. Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections. *J. Biol. Chem.* 280: 9272–9282
- Le Douarin N.** 1986. The microenvironment of T and B lymphocyte differentiation in avian embryos. *Curr. Top. Dev. Biol.* 20: 291-313
- Lee I.H., Cho Y., Lehrer R.I.** 1997a. Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 118: 515–521
- Lee I.H., Zhao C., Cho Y., Harwig S.S.L., Cooper E.L., Lehrer R.I.** 1997b. Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett.* 400: 158–162
- Lee J.Y., Hirono I., Aoki T.** 2000. Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev. Comp. Immunol.* 24(4): 407-15
- Lefranc M.P. and Lefranc G.** 2001. The T Cell Receptor *FactsBook*. Academic 629 Press, Burlington, USA
- Leonard W.J. and O'Shea J. J.** 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 293–322

- Leong J.C., Bootland L., Anderson E., Chiou P.W., Drolet B., Kim C., et al.** 1995. Viral vaccines for aquaculture. *J. Mar. Biotechnol.* 3:16–23
- Leong J.C., Anderson E., Bootland L.M., Chiou P.W., Johnson M., Kim C., et al.** 1997. Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Dev. Biol. Stand.* 90: 267–77
- Leslie G.A. and Clem L.W.** 1969. Production of anti-hapten antibodies by several classes of lower vertebrates. *J. Immunol.* 103: 613
- Levraud J.P., Boudinot P., Colin I., Benmansour A., Peyrieras N., Herbomel P., Luftalla G.** 2007. Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system. *J. Immunol.* 178: 4385-4394
- Levy D.E.** 1999. Physiological significance of STAT proteins: investigations through gene disruption in vivo. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 1559–1567
- Li J.H., Shao J.Z., Xiang L.X., Wen Y.** 2007. Cloning, characterization and expression analysis of pufferfish interleukin-4 cDNA: the first evidence of Th2-type cytokine in fish. *Mol. Immunol.* 44: 2078-86
- Lin G.L., Ellsaesser C.F., Clem L.W.** 1992. Phorbol ester/calcium ionophore activate fish leukocytes and induce long-term cultures. *Dev. Comp. Immunol.* 16: 153-63
- Little T.J., O'Connor B., Colegrave N., Watt K., Read A.F.** 2003. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Curr. Biol.* 13: 489–492
- Littman D.R., Thomas Y., Maddon P.J., Chess L., Axel R.** 1985. The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell* 40: 237-46
- Liu Y.J.** 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 275-306
- Liu Z.G. and Han J.** 2001. Cellular responses to tumor necrosis factor. *Current Issues in Molecular Biology* 3 (4): 79-90
- Lobb C.J. and Olson M.O.J.** 1988. Immunoglobulin heavy H chain isotypes in a Teleost fish. *J. Immunol.* 141: 1236
- Long S., Wilson M., Bengten E., Bryan L., Clem L.W., Miller N.W., et al.** 2004. Identification of a cDNA encoding channel catfish interferon. *Dev. Comp. Immunol.* 28(2): 97-111
- Lorenzen N. and LaPatra S.E.** 2005. DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. Sci. Technol. OIE*

- Lutfalla G., Crollius H.R., Stange-Thomann N., Jaillon O., Mogensen K., Monneron D.** 2003. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* 4(1): 29
- Maddon P.J., Littman D.R., Godfrey M., Maddon D.E., Chess L., Axel R.** 1985. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* 42: 93-104
- Maddox J.F., Mackay C.R., Brandon M.R.** 1987. Ontogeny of ovine lymphocytes. I. An immunohistological study on the development of T lymphocytes in the sheep embryo and fetal thymus. *Immunol.* 62: 97–105
- Mannie M.D.** 2001. T cell-mediated antigen presentation: a potential mechanism of infectious tolerance. *Immunol. Res.* 23, 1–21
- Manning M.J.** 1991. Histological organization of the spleen: implication for immune functions in amphibians. *Res. Immunol.* 142: 355-359
- Manning M.J.** 1994. Fishes. In: Turner R J, Ed. *Immunol. Comp. Approach.*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 69
- Marabotti A., D’Auria S., Rossi M., Facchiano A.M.** 2004. Theoretical model of the three-dimensional structure of a sugar binding protein from *Pyrococcus horikoshii*: structural analysis and sugar binding simulations. *Biochem. J.* 280: 677-684
- Marchler-Bauer A., Anderson J.B., Derbyshire M.K., DeWeese-Scott C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hao L., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Krylov D., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Lu F., Lu S., Marchler G.H., Mullokandov M., Song J.S., Thanki N., Yamashita R.A., Yin J.J., Zhang D., Bryant S.H.** 2007. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 35: D237–D240
- Margulies D.H.** 1999. Major histocompatibility complex organization. In: Paul, W.E. (Ed.), *Fundamental Immunology*. Lippincott, Philadelphia, pp. 263–285
- Martin S. A. M., Taggart J. B., Seear P., Bron J. E., Talbot R., Teale A. J., Sweeney G. E., Høyheim B., Houlihan D. F., Tocher D. R., Zou J., Secombes C. J.** 2007. Interferon type I and type II responses in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) SHK-1 cell line by the salmon TRAITS/SGP microarray. *Physiol. Genomics* 32: 33–44
- Matsunaga T.** 1998. Did the first adaptive immunity evolve in the gut of jawed fish? *Cytogenet. Cell Genet.* 80: 138

- Matsuyama T., Kimura T., Kitagawa M., Pfeffer K., Kawakami T., Watanabe N., Kündig T. M., Amakawa R., Kishihara K., Wakeham A., et al.** 1993. Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* 75: 83–97
- McCullough K.C., Basta S., Knotig S., Gerber H., Schaffner R., Kim Y.B., Saalmuller A., Summerfield A.** 1999. Intermediate stages in monocytemacrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunol.* 98: 203–212
- McMillan N.A.J., Chun R.F., Siderovski D.P., Galabru J., Toone W., Samuel C.E., Mak T., Hovanessian A., Jeang K., Williams B.R.G.** 1995. HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, doublestranded- RNA-dependent kinase, PKR. *Virology* 213: 413–424
- Melén K., Ronni T., Lotta T., Julkunen I.** 1994. Enzymatic characterization of interferon-induced antiviral GTPases murine Mx1 and human MxA proteins. *J. Biol. Chem.* 269(3): 2009-15
- Meseguer J., Esteban M.A., Agulleiro B.,** 1991. Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* 54: 299-309
- Milde K.F., Conner G.E., Mintz D.H., Alejandro R.** 1993. Primary structure of the canine CD4 antigen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1172: 315-8
- Miller N.W. and Clem L.W.** 1984. Temperature-mediated processes in Teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus dependent and thymus-independent antigens. *J. Immunol.* 133: 2356-2359
- Miller N.W., Van Ginkel J., Ellsaesser F., Clem L.W.** 1987. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* 11: 739
- Miller N.W., Ryczyn M.A., Stuge T.W., Luft J.C., Wilson M.R., Bly J.E., et al.** 1994a. In vitro culture approaches for studying immune cell function(s) in ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 18: 132-41
- Miller N.W., Ryczyn M.A., Wilson M.R., Warr G.W., Naftel J.P., Clem L.W.** 1994b. Development and characterization of channel catfish long term B cell lines. *J.Immunol.* 126: 2180
- Miller R.L., Imbertson L.M., Reiter M.J., Gerster J.F.** 1999. Treatment of primary herpes simplex virus infection in guinea pigs by imiquimod. *Antiviral. Res.* 44: 31-42

- Miracle A.L., Anderson M.K., Litman R.T., Walsh C.J., Luer C.A., Rothenberg E.V., Litman G.W.** 2001. Complex expression patterns of lymphocyte-specific genes during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire. *Int. Immunol.* 13: 567–580
- Mitta G., Hubert F., Noël T., Roch Ph.** 1999. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* 265: 71–78
- Mitta G., Vandenbulck F., Noël T., Romestand B., Beauvillain J.C., Salzet M., Roch Ph.** 2000a. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell Sci.* 113: 2759–2769
- Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Salzet M., Roch Ph.** 2000b. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* 275: 12954–12962
- Miyata T., Tokunaga F., Yoneya T., Yoshikawa K., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y.** 1989. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.* 106: 663–668
- Mogensen K.E., Lewerenz M., Reboul J., Lutfalla G., Uze' G.** 1999. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J. Interferon Cytokine Res.* 19: 1069–1098
- Moore K.W., O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira P., Mosmann T.R.** 1993. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 165-90
- Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A.** 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 683-765
- Moore L.J., Somamoto T., Lie K.K., Dijkstra J.M., Hordvik I.** 2005. Characterization of salmon and trout CD8a and CD8b. *Mol. Immunol.* 42: 1225-34
- Mosmann T.R. and Moore K.W.** 1991. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol. Today* 12: 49-53
- Mosmann T.R.** 1994. Properties and functions of interleukin-10. *Adv. Immunol.* 56: 1-26
- Mulero I., Noga E.J., Meseguer J., Garcia-Ayala A., Mulero V.** 2008. The antimicrobial peptides piscidins are stored in the granules of professional phagocytic granulocytes of fish and are delivered to the bacteria-containing phagosome upon phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 32(12): 1531-8
- Murakami M. and Honjo T.** 1995. Involvement of B1 cells in mucosal immunity and autoimmunity. *Immunol. Today.* 16: 534-539

- Nagano Y. and Kojima Y.** 1958. Inhibition de l'infection vaccinale par le virus homologue. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 152: 1627–1630
- Nagarajan U.M., O'Connell C., Rank R.G.** 2004. Molecular characterisation of guinea-pig (*Cavia porcellus*) CD8a and CD8b cDNA. *Tissue Antigens* 63: 184-9
- Nagata S.A.** 1985. Cell surface marker of thymus dependent lymphocytes in *Xenopus laevis* is identifiable by mouse monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 15: 837-841
- Nakanishi Y., Kodama H., Murai T., Mikami T., Izawa H.** 1991. Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *American J. Vet. Res.* 52: 397-401
- Nakayama M., Nagata K., Kato A., Ishihama A.** 1991. Interferon-inducible mouse Mx1 protein that confers resistance to influenza virus is GTPase. *J. Biol. Chem.* 266: 21404–8
- Nam B.H., Yamamoto E., Hirono I., Aoki T.** 2000. A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with HIRAME rhabdovirus. *Dev. Comp. Immunol.* 24: 13-24
- Nam B.H., Hirono I., Aoki T.** 2003. The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR α , β , γ and δ chains. *J. Immunol.* 170: 3081–3090
- Nascimento D.S., do Vale A., Tomas A.M., Zou J., Secombes C.J., Dos Santos N.M.S.** 2007. Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits. *Mol. Immunol.* 44: 2277–2291
- Nathan C.** 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Investig.* 100: 2417–2423
- Nezlin R.** 1998. The immunoglobulins, structure and function. New York: Acad
- Nguyen H., J. Hiscott, Pitha P. M.** 1997. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 293–312
- Nishimura H., Ikemoto M., Kawai K., Kusuda R.** 1997. Cross-reactivity of anti-yellowtail thymic lymphocyte monoclonal antibody (YeT-2) with lymphocytes from other fish species. *Arch. Histol.Cytol.* 60: 113
- Nonaka M., Yamaguchi N., Natsuume-Sakai S., Takahashi M.** 1981. The complement system of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). 1. Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement. *J. Immunol.* 126: 1489-1494
- 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(5): 435-50

- O'Sullivan O., Suhre K., Abergel C., Higgins D.G., Notredame C.** 2004. 3DCoffee: combining protein sequences and structures within multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 340: 385-395
- Offermann M.K., Zimring J., Mellits K.H., Mathews M.B., et al.** 1995. Activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase and induction of vascular cell adhesion molecule-1 by poly(I).poly(C) in endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* 232: 28–36
- Ogut H. and Reno P.W.** 2004. Early kinetics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) infection in rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health* 16: 152–60
- Ohta Y., Landis E., Boulay T., Phillips R.B., Collet B., Secombes C.J., Flajnik M.F., Hansen J.D.** 2004. Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish. *J. Immunol.* 173: 4553–4560
- Ooi E.L., Verjan N., Hirono I., Nochi T., Kondo H., Aoki T., Kiyono H., Yuki Y.** 2008a. Biological characterisation of a recombinant Atlantic salmon type I interferon synthesized in *Escherichia coli*. *Fish & Shellfish Immunol.* 24: 506-513
- Ooi E.L., Verjan N., Haraguchi I., Oshima T., Kondo H., Hirono I., Aoki T., Kiyono H., Yuki Y.** 2008b. Innate immunomodulation with recombinant interferon- α enhances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis virus. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 1211–1220
- Oren Z. and Shai Y.A.** 1996. Class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *Eur. J. Biochem.* 237: 303–310
- Padros F. and Crespo S.** 1996. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. *Aquaculture* 144: 1–16
- Palenzuela O., Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P.** 1996. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 6: 81
- Pancer Z., Amemiya C.T., Ehrhardt G.R., Ceitlin J., Gartland G.L., Cooper M.D.** 2004. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature.* 430: 174-180
- Park C.B., Lee J.H., Park I.Y., Kim M.S., Kim S.C.** 1997. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS Lett.* 411: 173–178
- Park E.M., Kang J.H., Seo J.S., Kim G.D., Chung J., Choi T.J.** 2008. Molecular cloning and expression analysis of the STAT1 gene from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *BMC Immunol.* 9: 31

- Park I.Y., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C.** 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett.* 437: 258-262
- Parnes J.R.** 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol.* 44: 265-311
- Partula S., De Guerra A., Fellah J.S., Charlemagne J.** 1995. Structure and diversity of the T cell antigen receptor β -chain in a teleost fish. *J. Immunol.* 155: 699-706
- Passer B.J., Chen C.H., Miller N.W., Cooper M.D.** 1996. Identification of a T cell lineage antigen in the catfish. *Dev. Comp. Immunol.* 20: 441
- Patel R.C., Vestal D.J., Xu Z., Bandyopadhyay S., Guo W., Erme S.M., Williams B.R., Sen G.C.** 1999. DRBP76, a double-stranded RNA binding nuclear protein, is phosphorylated by the interferon-induced protein kinase, PKR. *J. Biol. Chem.* 274: 20432-20437
- Pearson W.R. and Lipman D.J.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448
- Pelegri P., Mulero V., Meseguer J.** 2000. Identification and preliminary characterization of a gilthead sea bream (*Sparus Aurata L.*) interleukin-1 β cDNA. *Dev. Comp. Immunol.* 24 Suppl 1: S64
- Peleteiro M.C. and Richards R.M.** 1985. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Disc.* 8: 161-172
- Pestka S.J.A., Langer J.A., Zoon K.C., Samuel C.E.** 1987. Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 317-332
- Pestka S.J.A., Krause C.D., Walter M.R.** 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202: 8-32
- Petrov R.V.** 1976. *Immunologiya i immunogenetika* (Immunology and Immunogenetics). Moscow
- Picchiatti S.** 1993. Analisi istologica e citologica dello sviluppo del timo nella spigola *Dicentrarchus labrax L.* Tesi di laurea, Facoltà di Scienze M.M. F.F. N.N. dell'Università degli Studi della Tuscia
- Picchiatti S., Terribili F.R., Mastrolia L., Scapigliati G., Abelli L.** 1997. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing GALT of the sea bass *Dicentrarchus labrax (L.)*. *Anat. Embriol.* 196: 457-463
- Picchiatti S., Guerra L., Selleri L., Buonocore F., Abelli L., Scapigliati G., Mazzini M., Fausto A.M.** 2007. Compartmentalisation of T cells expressing CD8a and TCR β in developing thymus of sea bass *Dicentrarchus labrax (L.)* *Dev. Comp. Immunol.* 32: 92-99

- Pinto R.D., Nascimento D.S., Dos Santos N.M.S.** 2006. Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) CD8alpha. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110: 169-77
- Pinto R.D., Nascimento D.S., Reis M.I.R., do Vale A., dos Santos N.M.S.** 2007. Molecular characterisation, 3D modelling and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) interleukin-10. *Mol. Immunol.* 44: 2066-75
- Plant K.P. and Thune R.L.** 2004. Cloning and characterisation of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Mx gene. *Fish Shellfish Immunol.* 16(3): 391-405
- Poisa-Beiro L., Dios S., Montes A., Aranguren R., Figueras A., Novoa B.** 2008. Nodavirus increases the expression of Mx and inflammatory cytokines in fish brain *Mol. Immunol.* 45: 218–225
- Ponten A., Sick C., Weeber M., Haller O., Kochs G.** 1997. Dominant-negative mutants of human MxA protein:domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J. Virol.* 71: 2591-2599
- Press C. McL.** 1998. Immunology of fishes. *Handbook of vertebrate immunology*, Pastoret P.P. et al. Eds, Acad. 3-62
- Proud C.G.** 1995. PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem. Sci.* 20:241–246
- Ptossi F., Blank A., Schroder A., Schwarz A., Hussi P., Schwemmle M., Pavlovic J., Staeheli P.** 1993. A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J. Virol.* 67: 6726-6732
- Quadt-Akabayov S.R., Chill J.H., Levy R., Kessler N., Anglistter J.** 2006. Determination of the human type I interferon receptor binding site on human interferon- α 2 by cross saturation and an NMR-based model of the complex. *Protein Science* 15: 2656-2668
- Radhakrishnan R., Walter L.J., Hruza A., Reichert P., Trotta P.P., Nagabhushan T.L., Walter M.R.** 1996. Zinc mediated dimer of human interferon-alpha 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure* 4: 1453-1463
- Raison R.L. and Dos Remedios N.J.** 1998. The hagfish immune system. *The biology of Hagfish*. Jorgensen J.M. et al. Eds., London: Chapman & Hall, 334-344
- Randelli E.** 2002. Biotecnologie animali: attività biologica *in vivo* e *in vitro* dell'IL-1 β ricombinante di spigola, *Dicentrarchus labrax* (TELEOSTEA, PERCICHTHYDAE). *Tesi di laurea*, Facoltà di Scienze M.M. F.F. N.N. dell'Università degli Studi della Tuscia
- Randelli E., Foglietta A., Mazzini M., Scapigliati G., Buonocore F.** 2006. Cloning and expression analysis of the co-receptor CD8a in sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 256: 631-7

- Randelli E., Buonocore F., Scapigliati G.** 2008. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 25(4): 326-40
- Reichelt M., Stertz S., Krijnse-Locker J., Haller O., Kochs G.** 2004. Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic* 5: 772-784
- Reis L.F.L., Harada H., Wolchok J. D., Taniguchi T., Vilcek J.** 1992. Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta and IFN-inducible genes. *EMBO J.* 11: 185–193
- Richards R.C., O'Neil D.B., Thibault P., Ewart K.V.** 2001. Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 549-555
- Richwald G.A.** 1999. Imiquimod. *Drugs Today* 35: 497-511
- Rinkevich B.** 1999. Invertebrates versus vertebrates innate immunity: in the light of evolution. *Scand. J. Immunol.*, 50: 456-460
- Robert E., Hancock W., Chapple D.S.** 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317–1323
- Roberts R.M., Liu L., Guo Q., Leaman D., Bixby J.** 1998. The evolution of the type I interferons. *J. Interferon Res.* 18: 805–816
- Robertsen B., Trobridge G., Leong J.C.** 1997 Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 21(5): 397-412
- Robertsen B., Bergan V., Rokenes T., Larsen R., Albuquerque A.** 2003. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J. Interferon Cytokine Res.* 23: 601-612
- Robertsen B.** 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20: 172-191
- Robinette D., Wada S., Arroll T., Levy M.G., Miller W.L., Noga E.J.** 1998. Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 467-475
- Rocha B. and Tanchot C.** 2004. CD8 T cell memory. *Seminars in immunology.* 16: 305-314
- Rodrigues P.N., Vazquez-Dorado S., Neves J.V., Wilson J.M.** 2006. Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dev. Comp. Immunol.* 30: 1156–1167
- Roetto A., Papanikolaou G., Politou M., Alberti F., Girelli D., Christakis J., Loukopoulos D., Camaschella C.** 2003. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile chemochromatosis. *Nat. Genet.* 33: 21–22

- Romano N., Abelli L., Mastrolia L., Scapigliati G.** 1997. Immunocytochemical detection and cytomorphology of lymphocyte subpopulations in a teleost fish *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell Tissue Res.* 289: 163-171
- Romano N., Picchietti S., Taverne-Thiele J.J., Taverne N., Abelli L., Mastrolia L., Verburg-van Kemenade B.M., Rombout J.H.W.M.** 1998. Distribution of macrophages during fish development: an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Anat Embryol (Berl)*. 198(1): 31-41
- Romano T.A., Ridgway S.H., Felten D.L., Quaranta V.** 1999. Molecular cloning and characterization of CD4 in an aquatic mammal, the white whale *Delphinapterus leucas*. *Immunogenetics* 49: 376-83
- Rombout J.H.W.M.** 1993a. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Develop. Compar. Immunol.* 17: 55-66
- Rombout J.H.W.M., Taverne-Thiele A.J., Villena M.I.** 1993b. The gut associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 453
- Rombout J.H.W.M., Koumans-van Diepen J.C.E.K., Emmer P.M., Taverne-Thiele J.J., Taverne N.** 1996. Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. *J. Fish. Biol.* 49: 521
- Rombout J.H.W.M., Van der Wal J.W., Companjen A., Taverne N., Taverne-Thiele J.J.** 1997. Characterization of a T cell lineage marker in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 22: 63
- Rombout J.H.W.M., Joosten P.H.M., Engelsma M.Y., Vos A.P., Taverne N., Taverne-Thiele J.J.** 1998. Indications for a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 22: 63-77
- Romestand B., Breuil G., Bourmaud C., Coeudacier J.L., Bouix G.** 1995. Development and characterization of monoclonal antibodies against sea bass immunoglobulins *Dicentrarchus labrax* L. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 347
- Rowley A.F., Hunt T.C., Page M., Mainwaring G.** 1988. Vertebrate blood cells. Rowley A.F and Ratcliffe N.A. Eds., Cambridge University press, 18-127
- Sadd B.M. and Schmid-Hempel P.** 2006. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr. Biol.* 16: 1206–1210
- Salerno G., Parrinello N., Roch P., Cammarata M.** 2007. cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin

- family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 146: 521–529
- Sali A. and Blundell T.L.** 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234: 779-815
- Salter R.D., Benjamin R.J., Wesley P.K., Buxton S.E., Garret T.P.J., Clayberger C., Krensky A.M., Norment A.M., Littman D.R., Parham P.** 1990. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the 3 domain of HLA-A2. *Nature* 345: 41– 46
- Salzet M.** 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol.* 22(6): 285-288
- Sambrook J.G., Campbell R.D., Elgar G.** 2003. Characterisation of a gene cluster in Fugu rubripes containing the complement component C4 gene. *Gene* 312: 73-83
- Samuel C. E.** 1979. Mechanism of interferon action. Phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated protein kinase possessing site-specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 600–604
- Samuel C.E.** 1988. Mechanisms of the Antiviral Actions of IFN. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35: 27–72
- Samuel C. E.** 1993. The eIF-2 α protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *J. Biol. Chem.* 268: 7603–7606
- Samuel C.E.** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (4): 778-809
- Sanchez C. and Dominiguez J.** 1991. Trout immunoglobulin populations differing in light chains revealed by monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* 28: 1271
- Sarkar S.N., Ghosh A., Wang H.W., Sung S.S., Sen G.C.** 1999. The nature of the catalytic domain of 2'-5'-oligoadenylate synthetases. *J. Biol. Chem.* 274(36): 25535-42
- Sarmiento A., Marques F., Ellis A.E., Afonso A.** 2004. Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 16: 79–92
- Savan R., Igawa D., Sakai M.** 2003. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Eur J Biochem* 270: 4647-54
- Savina A. and Amigorena S.** 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* 219: 143-56
- Scapigliati G., Mazzini M., Mastrolia L., Romano N., Abelli L.** 1995. Production and characterization of a monoclonal antibody against thymocytes of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostea, Percichthyidae). *Fish Shellfish Immunol.* 5: 393

- Scapigliati G., Romano N., Picchietti S., Mazzini M., Mastrolia L., Scalia D., Abelli L.** 1996. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalization of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassay. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 383-401
- Scapigliati G., Romano N., Abelli L.** 1999. Monoclonal antibodies in teleost fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture* 172: 23-28
- Scapigliati G., Romano N., Abelli L., Meloni S., Ficca A.G., Buonocore F., Bird S., Secombes C.J.** 2000. Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* 10: 329-341
- Scapigliati G., Buonocore F., Bird S., Zou J., Pelegrin P., Falasca C., Prugnoli D., Secombes C.J.** 2001. Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 beta. *Fish Shellfish Immunol.* 11(8): 711-726
- Scapigliati G., Meloni S., Buonocore F., Bossù P., Prugnoli D., Secombes C.J.** 2003. Immunopurification of B lymphocytes from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Mar. Biotechnol. (NY)*. 5(3): 214-21
- Scapigliati G., Costantini S., Colonna G., Facchiano A., Buonocore F., Bossù P., Cunningham C., Holland J.W., Secombes C.J.** 2004. Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Dev. Comp. Immunol.* 28(5): 429-441
- Schindler C. and Darnell J.E.Jr.** 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 621–651
- Schindler C.** 1999. Cytokines and JAK-STAT signaling. *Exp. Cell Res.* 253: 7–14
- Schlotfeldt H.J. and Ahne W.** 1988. Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1. *J. App. Ichthyol.* 4: 147–8
- Schluter S.F., Bernstein R.M., Bernstein H., Marchalonis J.J.** 1997. Molecular origins and evolution of immunoglobulin heavy-chain genes of jawed vertebrates. *Immunol. Today.* 18: 543-549
- Schluter S.F., Bernstein R.M., Bernstein H., Marchalonis J.J.** 1999. “Big Bang” emergence of the combinatorial immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 107-111
- Schneider-Schaulies S.J., Schneider-Schaulies A., Schuster A., Bayer M., Pavlovic J., ter Meulen V.** 1994. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J. Virol.* 68: 6910–7

- Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A.** 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukocyte Biol.* 75: 163-189
- Schroder M.B., Villena A.J., Jorgensen T.O.** 1998. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 22: 507-17
- Schulenburg H., Boehnisch C., Michiels N.K.** 2007. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Mol. Immunol.* 44: 3338-3344
- Secombes C.J., Hardie L.J., Daniels G.** 1996. Cytokines in fish: an update. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 291
- Senda T., Shimazu T., Matsuda S., Kawano G., Shimizu H., Nakamura K.T., Mitsui Y.** 1992. Three-dimensional crystal structure of recombinant murine interferon-beta. *EMBO J.* 11, 3193-3201
- Sharma J.M.** 1998. Avian Immunology. *Handbook of Vertebrate Immunology*. Pastoret P.P. et al., Eds., Acad. 73-136
- Sheppard P., Kindsvogel W., Xu W., Henderson K., Schlutsmeyer S., Whitmore T.E., Kuestner R., Garrigues U., Birks C., Roraback J., Ostrander C., Dong D., Shin J., Presnell S., Fox B., Haldeman B., Cooper E., Taft D., Gilbert T., Grant F.J., Tackett M., Krivan W., McKnight G., Clegg C., Foster D., Klucher K.M.** 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4: 63-68
- Shtrichman R. and Samuel C.E.** 2001. Role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 251-259
- Siegal F. P., Kadowaki N., Shodell M., Fitzgerald-Bocarsly P.A., Shah K., Ho S., Antonenko S., Liu Y.J.** 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835-1837
- Siegel M.M. and Clem L.W.**, 1965. Antibody response of fish to viral antigens. *Ann. NY. Acad. Sci.* 126:662
- Sippl M.J.** 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 17: 355-362
- Sizemore R.G., Miller N.W., Cuchens M.A., Lobb C.J., Clem L.W.** 1984. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.* 133: 2920-4
- Slierendrecht W.J., Lorenzen N., Glamann J., Koch C., Rombout J.H.W.M.** 1995. Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 46: 113
- Smith K.A., Lachman L.B., Oppenheim J.J., Favata M.M.** 1980. The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* 151: 1551-1556
- Smith V.J., Fernandes J.M.O., Jones S.J., Kemp G.D., Tatner M.F.** 2000. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 243-260
- Staeheli P., Yu Y.X., Grob R., Haller O.** 1989. A double-stranded RNA-inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3117-21
- Staeheli P., Pitossi F., Pavlovic J.** 1993. Mx proteins: GTPase with antiviral activity. *Trends Cell. Biol.* 3: 268-272
- Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H., Schreiber R.D.** 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 227-264
- Stein C., Caccamo M., Laird G., Leptin M.** 2007. Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biol.* 8: R251
- Steinman R.M.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271-96
- Stern A.S., Magram J., Presky D.H.** 1996. Interleukin-12 an integral cytokine in the immune response. *Life Sci.* 58: 639-654
- Stohlman S.A., Woodward J.G., Frelinger J.A.** 1982. Macrophage antiviral activity: extrinsic versus intrinsic activity. *Infect. Immunol.* 36: 672-677
- Street N.E. and Mosmann T.R.** 1991. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.* 5:171-7
- Sun S.C., Lindstrom I., Boman H.G., Faye I., Schmidt O.** 1990. Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* 250: 1729-1732
- Sunyer J.O., Zarkadis I.K., Sahu A., Lambris J.D.** 1996. Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 8546-51
- Sveinbjørsson B. and Seljelid R.** 1994. Aminated (b)-1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros macrophages in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41: 113
- Tafalla C., Figueras A., Novoa B.** 1998. *In vitro* interaction of viral haemorrhagic septicaemia virus and leukocytes from trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62: 359-366

- Tafalla C., Aranguren R., Secombes C.J., Figueras A., Novoa B.** 2004. Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish Shellfish Immunol.* 16(1): 11-24
- Tafalla C., Sanchez E., Lorenzen N., DeWitte-Orr S.J., Bols N.C.** 2008. Effects of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte cell line RTS-11. *Mol. Immunol.* 45: 1439–1448
- Takano T., Iwahori A., Hirono I., Aoki T.** 2004. Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 17: 367–74
- Takezaki N., Figueroa F., Zaleska-Rutczynska Z., Klein J.** 2003. Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes. *Mol. Biol. Evol.* 20(2): 287-92
- Tatner M.F. and Manning M.J.** 1983. The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12: 93-105
- Thimme R., Frese G., Kochs G., Haller O.** 1995. Mx1 but not MxA confers resistance against tick-borne Dhori virus in mice. *Virology* 211: 296–301
- Thomis D.C., Doohan J.D., Samuel C.E.** 1992. Mechanism of interferon action: cDNA structure, expression and regulation of the interferon- induced, RNA-dependent PI/eIF-2 α protein kinase from human cells. *Virology* 188:33–46
- Thomis D.C. and Samuel C.E.** 1993. Mechanism of interferon action: evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase PKR. *J. Virol.* 67: 7695–7700
- Thomis D.C. and Samuel C. E.** 1995. Mechanism of interferon action: characterization of the intermolecular autophosphorylation of PKR, the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* 69: 5195– 5198
- Thompson C.B.** 1995. New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of immune system. *Immunity.* 3: 531-539
- Thuvander A., Fossum C., Lorenzen N.** 1990. Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin: characterization and applicability in immunoassays. *Dev. Comp. Immunol.* 14: 415
- Tillitt D.E., Giesy J.P., Fromm P.O.** 1988. In vitro mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 89: 25-35
- Tramontano A.** 1998. Homology modeling with low sequence identity. *Methods* 14(3): 293-300

- Traxler G.S., Roome J.R., Lauda K.A., LaPatra S.** 1997. Appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and neutralizing antibodies in sockeye salmon *Onchorynchus nerka* during their migration and maturation period. *Dis. Aquat. Org.* 28: 31–8
- Trobridge G.D. and Leong J.A.C.** 1995 Characterization of a rainbow trout Mx gene. *J Interferon Cytokine Res.* 15(8): 691-702
- Trobridge G.D., Chiou P.P., Leong J.A.C.** 1997a. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J. Virol.* 71(7): 5304-11
- Trobridge G.D., Chiou P.P., Kim C.H., Leong J.A.C.** 1997b. Induction of the Mx protein of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* *in vitro* and *in vivo* with poly I:C dsRNA and infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Organ.* 30: 91–8
- Uinuk-Ool T., Mayer W.E., Sato A., Dongak R., Cooper M.D., Klein J.** 2002. Lamprey lymphocyte-like cells express homologs of genes involved in immunologically relevant activities of mammalian lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 14356-14361
- Vallejo A.N., Miller N.W., Clem L.W.** 1991. Phylogeny of immune recognition: processing and presentation of structurally defined antigens. *Develop. Immunol.* 1: 137-148
- Van der Heijden M.H.T., Rooijakkers J., Booms G., Rombout J.H.W.M., Boon J.H.** 1995. Production, characterization and applicability in immunoassays of monoclonal antibodies to European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) immunoglobulin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45: 151
- Van Muiswinkel W.B., Lamers C.H.J., Rombout J.H.W.** 1991. Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Research Immunol.* 142: 362-366
- Verburg-van-Kemenade B.M.L., Weyts F.A.A., Debets R., Flik G.** 1995. Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev. Comp. Immunol.* 19: 59-70
- Verburg-van-Kemenade B.M.L., Saeij J.P., Flik G., Willems P.H.** 1998. Ca²⁺ signals during early lymphocyte activation in carp *Cyprinus carpio* L. *J. Exp. Biol.* 201:591-8
- Verho S., Jarvinen S., Nikoskelainen S., Lilius E.M.** 2005. Biological effect of vaccination can be assessed directly from diluted whole blood of rainbow trout using homologous blood phagocytes as immunosensors. *Fish Shellfish Immunol.* 19: 175-83
- Vestergaard-Jorgensen P.E.** 1982. Egtved virus: occurrence of inapparent infections with virulent virus in free-living rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson at low temperature. *J. Fish. Dis.* 5:251–5

- Voss E.W. and Watt R.H.** 1977. Comparison of the microenvironment of chicken and rabbit antibody active site. *Adv. Exp. Med. Biol.* 88: 391-401
- Waine G.J., Tymms M.J., Brandt E.R., Cheetham B.F., Linnane A.W.** 1992. Structure-function study of the region encompassing residues 26–40 of human interferon- α 4: identification of residues important for antiviral and antiproliferative activities. *J. Interferon Res.* 12: 43–48
- Wallner B. and Elofsson A.** 2005. All are not equal: a benchmark of different homology modelling programs. *Protein Sci.* 14: 1315-1327
- Wang H.J., Xiang L.X., Shao J.Z., Jia S.** 2006. Molecular cloning, characterization and expression analysis of an IL-21 homologue from *Tetraodon nigroviridis*. *Cytokine* 35: 126-34
- Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A.** 1995. IgY: clues to modern antibodies. *Immunol. Today* 16: 392-398
- Watson F.L., Puttmann-Holgado R., Thomas F., Lamar D.L., Hughes M., Kondo M., Rebel V.I., Schmucker D.** 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* 309: 1874–1878
- Watts C.** 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 821–850
- Wermenstam N.E. and Pilstrom L.** 2001. T-cell antigen receptors in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): structure, organisation and expression of TCR α and β genes. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 117–135
- Willet C.E., Corte A., Zuasti A., Zapata A.G.** 1999. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Dev. Dyn.* 214: 223–36
- Wilson M.R., Marcuz A., Du Pasquier L.** 1995. Somatic mutations during an immune response in *Xenopus tadpoles*. *Dev. Immunol.* 4: 227-234
- Wilson M.R., Zhou H., Bengten E., Clem L.W., Stuge T.B., Warr G.W., Miller N.W.** 1998. T-cell receptors in channel catfish: structure and expression of TCR α and β genes. *Mol. Immunol.* 35: 545–557
- Yabu T., Hirose H., Hirono I., Katagiri T., Aoki T.** 1998. Molecular cloning of a novel interferon regulatory factor in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 7: 138–44
- Yamaguchi K., Kodama H., Miyoshi M., Nishi J., Mukamoto M., Baba T.** 1996. Inhibition of cytotoxic activity carp lymphocytes (*Cyprinus carpio*) by anti-thymocyte monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51: 211

- Yano T.** 1996. The non-specific immune system: humoral defence. *Fish Immune System*. Eds Iwama G. and Nakanishi T., Avademic press, San Diego. 105-157
- York I.A. and Rock K.L.** 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Ann. Rev. Immunol.* 14: 369-399
- Young H.A.** 1996. Regulation of interferon- γ gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 16: 563-568
- Zapata A.** 1979. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* 3: 55
- Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutie'rrrez-de Frias C., Corte's A.** 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20: 126-36
- Zarkadis I.K., Duraj S., Chondrou M.** 2005. Molecular cloning of the seventh component of complement in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 95-102
- Zhang D.C., Shao Y.Q., Huang Y.Q., Jiang S.G.** 2005. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the zebrafish (*Danio rerio*). *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 571-6
- Zhang S.M., Adema C.M., Kepler T.B., Loker E.S.** 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* 305 : 251-254
- Zhang Y.A., Zou J., Chang C.I., Secombes C.J.** 2004. Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 101: 259-269
- Zilber L.A.** 1958. *Osnovy immunologii* (Bases of Immunology), 3rd Edition, Moscow, 99-104
- Zinkernagel R.M., Bachmann M.F., Kundig T.M., Oehen S., Pirchet H., Hengartner H.** 1996. On immunological memory. *Ann. Rev. Immunol.* 14: 333-367
- Zou J., Grabowski P.S., Cunningham C., Secombes C.J.** 1999a. Molecular cloning of interleukin-1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site. *Cytokine.* 11: 552-560
- Zou J., Cunningham C., Secombes C. J.** 1999b. The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 β gene has a different organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *Europ. J. Biochem.* 259: 901-908
- Zou J., Clark M.S., Secombes C.J.** 2003. Characterisation, expression and promoter analysis of an interleukin 10 homologue in the puffer fish, *Fugu rubripes*. *Immunogenetics* 55: 325-35
- Zou J., Carrington A., Collet B., Dijkstra J.M., Yoshiura Y., Bols N., Secombes C.J.** 2005. Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus*

mykiss: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *J. Immunol.* 175(4): 2484-94

Zou J., Tafalla C., Truckle J., Secombes C. J. 2007. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in Vertebrates. *J. Immunol.* 179: 3859-3871

Zurcher T., Pavlovic J., Staeheli P. 1992. Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology* 187: 796–800

Curriculum vitae

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI

65° Congresso Nazionale Unione Zoologica Italiana (Taormina-Giardini Naxos (ME) 21-25 settembre 2004):

- 1) F. Buonocore, E. Ovidi, D. Casani, E. Randelli, S. Benedetti, S. Meloni, G. Scapigliati, M. Mazzini – Produzione di immunoglobuline nella spigola (*Dicentrarchus labrax*) dopo vaccinazione contro *Vibrio anguillarum* tramite marcatori molecolari e cellulari. (Poster)

Congresso “Biotechnologies for quality” (Barcellona (Spagna) / 20-23 Ottobre 2004):

- 2) F. Buonocore, E. Randelli, D. Casani, M. Mazzini, I. Cappuccio, C.J. Secombes and G. Scapigliati – Cloning of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and its regulation by LPS, IL-1 β and vaccination. (Poster)
- 3) E. Francolini, U. Luzzana, S. Ceulemans, P. Coutteau, L. Alborali, C. Salogni, G. Scapigliati, D. Casani, F. Buonocore, E. Randelli – Effect of a nutritional supplement, sanoguard aquastim F, on the immunitary response in rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) fry after ERM vaccination. (Poster)

10° Congresso Internazionale della International Society for Developmental & Comparative Immunology (ISDCI) - Charleston (South Carolina - USA)/1-6 luglio 2006):

- 1) E. Randelli, F. Buonocore, D. Casani, M. Mazzini and Giuseppe Scapigliati - Cloning, expression and biological activity of sea bass *Dicentrarchus labrax* MHC Class II b. (Comunicazione)
- 2) F. Buonocore, E. Randelli, D. Casani, G. Zarletti, S. Bird, C. J. Secombes, S. Constantini, A. Facchiano, M. Mazzini, G. Scapigliati - T-cell co-receptors:

cloning, expression, biological activity and structural analysis of the CD8a from sea bass *Dicentrarchus labrax*. (Comunicazione)

67° Congresso Nazionale Unione Zoologica Italiana (Napoli/12-15 Settembre 2006):

- 4) F. Buonocore, E. Randelli, D. Casani, A. Facchiano, S. Costantini, M. Mazzini, G. Scapigliati – Clonaggio, analisi strutturale e studi di espressione della catena β del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II del teleosteo *Dicentrarchus labrax* L. (Poster)
- 5) E. Randelli, F. Buonocore, D. Casani, R. Stet, A. Facchiano, S. Costantini, G. Scapigliati - Cloning, expression and structural analysis of the MHC class II b from Sea bass *Dicentrarchus labrax*. (Comunicazione)

VIII Incontro Scientifico (SIICS) – Area di ricerca (CNR) (Napoli/1-2 Marzo 2007):

- 1) E. Randelli, F. Buonocore, D. Casani, R.J.M. Stet, A. Facchiano, S. Costantini, G. Scapigliati – Cloning, expression and structural analysis of the MHC class II β from sea bass *Dicentrarchus labrax*. (Comunicazione)

7th International Nordic symposium on fish immunology (Stirling – Scozia/18-22 giugno 2007):

- 2) E. Randelli, D. Casani, F. Buonocore, G. Scapigliati and the IMAQUANIM consortium - Quantitative expression of CD4 and CD8 coreceptors in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after viral and bacterial challenge. (Poster)
- 3) F. Buonocore, E. Randelli, V. Scala, D. Casani, A. Facchiano, S. Costantini, G. Scapigliati - Modelling cellular receptors: the T-cell receptor/MHC class I/CD8 complexes in sea bream (*Sparus aurata*). (Comunicazione)

68° Congresso Nazionale Unione Zoologica Italiana (Lecce/24-27 settembre 2007):

- 1) F. Buonocore, E. Randelli, D. Casani, V. Scala, S. Bird, C. J. Secombes, M. Mazzini, G. Scapigliati - Studi sull'adattamento del sistema immunitario dei Teleostei antartici a basse temperature: l'interleuchina-1 e il recettore delle cellule T nel *Chionodraco hamatus* (Perciformes, Channichthyidae). (Comunicazione)

IX Incontro Scientifico - Società Italiana di Immunobiologia Comparata e dello Sviluppo (Varese/27-29 febbraio 2008):

- 1) G. Scapigliati, E. Randelli, D. Casani, F. Buonocore – Immune defence and interactions with the environment. (Comunicazione)
- 2) E. Randelli, F. Buonocore, D. Casani, S. Costantini, A. M. Facchiano, J. Zou, C.J. Secombes, G. Scapigliati – A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterisation and structural considerations. (Comunicazione)
- 3) D. Casani, F. Buonocore, E. Randelli, V. Scala, J. Zou, C.J. Secombes, G. Scapigliati – Cloning and expression analyses of fish interferon (IFN) in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after Poly I:C induction. (Comunicazione)

8th International Congress on the Biology of Fish (Portland, Oregon, USA / 28 Luglio – 1 Agosto 2008)

- 1) G. Scapigliati, E. Randelli, D. Casani, I. Boschi, F. Buonocore – Fish immune system and interactions with environment. (Comunicazione)

69° Congresso Nazionale Unione Zoologica Italiana (Senigallia (AN)/22-25 Settembre 2008):

- 1) F. Buonocore, D. Casani, E. Randelli, S. Costantini, A. Facchiano, J. Zou, C. Secombes, M. Mazzini, G. Scapigliati – Evoluzione delle risposte antivirali nei vertebrati: caratterizzazione molecolare dell'interferone nella spigola (*Dicentrarchus labrax* L). (Comunicazione)
- 2) E. Randelli, D. Casani, G. Wiegertjes, A.M. Fausto, G. Scapigliati, F. Buonocore – Analisi di sequenze EST da timo di spigola (*Dicentrarchus labrax* L): studio di geni coinvolti nella risposta immunitaria innata ed acquisite di tipo T. (Poster)

PUBBLICAZIONI

2005:

- 1) F. Buonocore, E. Randelli, D. Casani, M. Mazzini, I. Cappuccio, C.J. Secombes and G. Scapigliati - cDNA cloning and expression analysis after vaccination of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) - *Aquaculture* (2005) Vol. 245 p. 301-310.

2007

- 1) F. Buonocore, E. Randelli, D. Casani, S. Costantini, A. Facchiano, G. Scapigliati, R. J. Stet – Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II beta chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 2007, 23: 853-866. IF 2006: 2.7
- 2) D. Casani, E. Randelli, F. Buonocore, G. Scapigliati – Le difese immunitarie in acquacoltura: nuovi approcci per migliorare le difese alle malattie. “*Il Pesce*” nr. 3-2007 (Maggio/Giugno).

2008

- 1) E. Randelli, V. Scala, D. Casani, S. Costantini, A. Facchiano, M. Mazzini, G. Scapigliati, F. Buonocore - T cell Receptor beta chain from sea bream (*Sparus aurata*): molecular cloning, expression and modelling of the complexes with MHC class I. *Molecular Immunology* 45 (2008) 2017–2027
- 2) F. Buonocore, E. Randelli, D. Casani, L. Guerra, S. Picchietti, S. Costantini, A. M. Facchiano, J. J. Zou, C. J. Secombes, G. Scapigliati – A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): molecular characterisation and structural analysis. *Molecular Immunology* 45 (2008) 3168–3177
- 3) F. Buonocore, E. Randelli, V. Scala, M.C. Belardinelli, D. Casani, A. M. Facchiano, S. Costantini, G. Scapigliati - Evolution of cell-mediated immune defences: cloning and structural characterisation of the T cell receptor beta chain from the icefish *Chionodraco hamatus* (Perciformes: Channichthyidae). *Journal of zoology*. Accepted
- 4) D. Casani, E. Randelli, S. Costantini, A. M. Facchiano, J. Zou, S. Martin, C. J. Secombes, G. Scapigliati, F. Buonocore - Molecular characterisation and structural analysis of an interferon homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Molecular immunology*. In press
- 5) E. Randelli, F. Buonocore, D. Casani, A. M. Fausto, G. Scapigliati - An “immunome” gene panel for transcriptomic analysis of immune defence activities in the teleost sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Italian Journal of Zoology*. In press

CORSI FORMATIVI, CONFERENZE

WORKSHOP “(Shell)Fish Immunology” 22-27 Giugno 2008 svolto presso Wageningen

Institute of Animal Sciences - Cell Biology and Immunology Group – Olanda

ESPERIENZE ALL’ESTERO

3 mesi (05/06/2006 – 01/09/2006) presso la “*School of Biological Sciences*” – Scottish

Fish Immunology Research Center - University of Aberdeen – Scozia (UK).

EMBL Accession Number

- 1) **AM765846** *Dicentrarchus labrax* mRNA for interferon (ifn gene), clone 1
- 2) **AM765847** *Dicentrarchus labrax* mRNA for interferon (ifn gene), clone 2
- 3) **AM690338** *Dicentrarchus labrax* partial ifn gene for interferon, isolate 1, exons 1-3
- 4) **AM690339** *Dicentrarchus labrax* partial ifn gene for interferon, isolate 2, exons 1-3
- 5) **AM946399** *Dicentrarchus labrax* partial ifn gene for interferon, clone 1, exons 1-5
- 6) **AM946400** *Dicentrarchus labrax* partial ifn gene for interferon, clone 2, exons 1-5
- 7) **AM849811** *Dicentrarchus labrax* mRNA for T-cell surface glycoprotein CD4 (CD4 gene), clone 1
- 8) **AM490438** *Sparus aurata* mRNA for T-cell receptor beta chain (tcrb gene), clone 6
- 9) **AM490437** *Sparus aurata* mRNA for T-cell receptor beta chain (tcrb gene), clone 5
- 10) **AM490436** *Sparus aurata* mRNA for T-cell receptor beta chain (tcrb gene), clone 4
- 11) **AM490435** *Sparus aurata* mRNA for T-cell receptor beta chain (tcrb gene), clone 3
- 12) **AM261210** *Sparus aurata* mRNA for T-cell receptor beta chain precursor (tcr-beta gene), clone 2
- 13) **AM261209** *Sparus aurata* mRNA for T-cell receptor beta chain precursor (tcr-beta gene), clone 1
- 14) **AM113471** *Dicentrarchus labrax* mRNA for MHC class II antigen beta chain, clone 6
- 15) **AM113470** *Dicentrarchus labrax* mRNA for MHC class II antigen beta chain, clone 5
- 16) **AM113469** *Dicentrarchus labrax* mRNA for MHC class II antigen beta chain, clone 4
- 17) **AM113468** *Dicentrarchus labrax* mRNA for MHC class II antigen beta chain, clone 3
- 18) **AM113467** *Dicentrarchus labrax* mRNA for MHC class II antigen beta chain, clone 2
- 19) **AM113466** *Dicentrarchus labrax* mRNA for MHC class II antigen beta chain, clone 1
- 20) **AM492776** *Chionodraco hamatus* partial mRNA for T-cell antigen receptor beta chain (T-cell receptor gene), clone 2
- 21) **AM228979** *Sparus aurata* partial mRNA for Mx protein, allele 2
- 22) **AM228978** *Sparus aurata* partial mRNA for Mx protein, allele 1
- 23) **AJ630649** *Dicentrarchus labrax* mRNA for cyclo-oxygenase-2 (cox-2 gene)



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm



Molecular characterisation and structural analysis of an interferon homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)

Daniela Casani^a, Elisa Randelli^a, Susan Costantini^b, Angelo M. Facchiano^b, Jun Zou^c, Sam Martin^c, Chris J. Secombes^c, Giuseppe Scapigliati^a, Francesco Buonocore^{a,*}

^a Department of Environmental Sciences, University of Tuscia, Largo dell'Università, 01100 Viterbo, Italy

^b Laboratory of Bioinformatics and Computational Biology - CNR, Istituto di Scienze dell'Alimentazione, I-83100 Avellino, Italy

^c Scottish Fish Immunology Research Centre, Aberdeen University, AB24 2TZ Aberdeen, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2008

Received in revised form 8 September 2008

Accepted 11 September 2008

Available online xxx

Keywords:

IFN

Dicentrarchus labrax

Sea bass

Mx

Gene structure

Real time PCR

3D structure

ABSTRACT

The interferons (IFNs) are a large family of soluble cytokines involved in the immune response against viral pathogens. Three families of IFNs have been identified in mammals (type I, type II and type III) and, recently, homologues of type I and type II genes have been found in various teleost fish species. In this paper we report the cloning of a cDNA encoding an type I IFN molecule from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), its expression analysis and gene structure and, finally, its 3D structure obtained by template-based modelling. The sea bass IFN cDNA consists of 1047 bp that translates in one reading frame to give the entire molecule containing 185 amino acids. The analysis of the sequence revealed the presence of a putative 22 amino acid signal peptide, two cysteine residues and three potential N-glycosylation sites. The sea bass IFN gene contains four introns as with other type I IFN teleost genes, except medaka that contains three introns. Real time PCR was performed after poly I:C stimulation of DLEC cell line to investigate the expression of sea bass IFN and Mx and an induction was observed for both genes. The predicted 3D structure of sea bass IFN is characterized by an "all-alpha" domain that shows an "up-down bundle" architecture made of six helices (ABB'CDE). The two cysteine residues present in the sequence (i.e. Cys²³ and Cys¹²⁶) are in a position and at a distance that suggest the possible formation of a disulfide bridge that may stabilize the structure. Our results will give the opportunity to investigate more in detail antiviral immune responses in sea bass and add to studies on the evolution of the IFN system in teleosts and vertebrates more generally.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Interferons (IFNs) are secreted cytokines that have a major role in immune defence against virus infections (Samuel, 2001). Three families of IFNs have been identified in mammals (type I, type II and type III) showing differences in gene and protein structure, receptor usage and biological activity (Kontsek et al., 2003; Kotenko et al., 2003; Pestka et al., 2004). Type I IFNs comprise different homologous subgroups (α , β , ω , ϵ , κ in humans) that are mainly produced by specialized blood cells named plasmacytoid dendritic cells in response to viral infection (Colonna et al., 2002). Some effects of type I IFNs relate to the modulation of the immune system (Fellous et al., 1982; Stark et al., 1998; Biron et al., 1999; Samuel, 2001; Buelens et al., 2002). In birds and mammals type I IFNs genes do not contain introns, are closely clustered in the same chromosome (Coulombel et al., 1991; Sheppard et al., 2003)

and share a common heterodimeric receptor (IFNAR-1 and IFNAR-2 subunits). They share a common 3D structure, as determined by crystallographic analyses, composed of 5 α -helices (Senda et al., 1992; Radhakrishnan et al., 1996; Karpusas et al., 1997). Type II IFNs (IFN- γ) are immunomodulatory cytokines mainly synthesized and secreted by Th1 cells and NK cells, and regulate both innate and cell-mediated immune responses (Boehm et al., 1997). These IFNs are encoded by genes with three introns and bind to a receptor complex containing two different chains (IFN- γ receptor R1 and R2) which activates the intracellular JAK-STAT signal pathway (Schroder et al., 2004). Type III IFNs (IFN- λ) regulate similar sets of genes and exhibit similar biological activity compared to type I IFNs but are encoded by genes with four introns and are located on a different region of the genome (Kotenko et al., 2003).

Recently, interferon genes have been identified from different fish species like the zebrafish (*Danio rerio*) (Altmann et al., 2003), the spotted green pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) (Lutfalla et al., 2003), the Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Robertsen et al., 2003) and the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Long et al., 2004). They have been classified as type I IFN even though they contain 5 exons

* Corresponding author. Tel.: +39 0761 357644; fax: +39 0761 357179.
E-mail address: fbuono@unitus.it (F. Buonocore).

and 4 introns (Robertsen, 2006). More recently, a type II IFN and a second group of type I IFNs have been found in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Zou et al., 2005, 2007) and an IFN receptor has been identified in zebrafish (Levraud et al., 2007). Recombinant IFNs produced in salmon and catfish show antiviral activity against typical fish viruses (Robertsen et al., 2003; Long et al., 2004), whether recombinant rainbow trout IFN- γ enhanced respiratory burst activity in macrophages (Zou et al., 2005) and up-regulated molecules involved in antigen-processing and presentation (Martin et al., 2007).

In this paper we report the identification of a cDNA encoding an IFN homologue from sea bass (*D. labrax* L.), a fish of high economic impact for South Mediterranean countries. Moreover, we analysed its gene structure and its expression by real time PCR. Finally, we predicted by template-based modelling the 3D structure of this molecule and hypothesized its possible residues of interaction with the putative sea bass IFN receptor on the basis of the correspondent human complex.

2. Materials and methods

2.1. Sea bass cDNA IFN cloning and sequencing

Leukocytes were obtained from a juvenile sea bass (150 g of weight) head kidney (HK) as described by Scapigliati et al. (2001), and were stimulated for 6 h with 20 μ g/ml of polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C, Sigma) in L-15 medium (Gibco). Total RNA

Table 1

Primers used for cDNA and genomic DNA cloning, and expression analyses of sea bass IFN and Mx.

Primer name	Sequence (5'–3')	Use
IFNFR	ACAGCTCTGCATCATGGG	cDNA and genomic DNA cloning
IFNRV	CTCCAGGCT T/G CAGC A/G CT	cDNA cloning
Oligo-dG	GGGGGGGGGGIIGGGIIG	cDNA cloning
RQIFNRV	CCAATCAGAGAGCGAAG	cDNA cloning and Real Time PCR
IFNFRA	GCCACGTCTAAAGAAAATGGGCC	cDNA cloning
Oligo-dT adaptor	CTCAGATCGATCGCGCCGCT ₁₅	cDNA cloning
IFNGENFR1	GCCATCGTATCCAGTAG	Genomic DNA cloning
IFNGENRV1	CTGTCTGAATTTATGATCC	Genomic DNA cloning
IFNGENFR2	GGATCATAAATTCAGACAG	Genomic DNA cloning
IFNGENRV2	CCCATGATGCAGAGCTGT	Genomic DNA cloning
IFNGENRV3	CTCCAGGCTTCAGCGCT	Genomic DNA cloning
IFNGENFR4	AGCGCTGAAGCTGGGAGC	Genomic DNA cloning
IFNGENRV4	GTAGAATATCAAGCCATC	Genomic DNA cloning
RQIFNR	GCGTCAAAGCATCAGCT	Real Time PCR
RQMxFR	GTCTGGAGATCGCTCT	Real Time PCR
RQMxRV	TCTCCATCAGGATCCAC	Real Time PCR
RQRIEFR	CCAACGAGCTGCTGACC	Real Time PCR
RQRIERV	CCGTACCCGTGGTCC	Real Time PCR

was extracted with Tripure (Roche) and two primers (IFNFR and IFNRV, see Table 1) corresponding to highly conserved regions of known IFN genes were used in RT-PCR performed with Ready-To-Go RT-PCR Beads (GE Healthcare) as described in Buonocore et al. (2007). The cycling protocol was one cycle of 94 °C for 5 min, 35

(a)
→ **Oligo-dG**
AGCCATCGTATCCAGTAGAGCCATCAATACAGCAATCAATATAGCAATCAGTACAGCAAT
CAGTACAGCAATCAGTACAGCAGTCAGTACAGCCACCAGTATAGCAATCAGTATAGCAAT
CAATACAGCAATCAGTATAGCAATCAGTGCAGCAACCAACACACCAGCACTCATCTG
AACTTACTCTATACAAAGTCAATCTCTACCTTTTGGAA
atgctcaacaggattttctttgtgtgcctgtctctcagtcgtacagtcagggctcctcg
M L N R I F F V C L S L S L Y S A G S S
ctgagctgcagatggatcatggatcataaattcagacagcagtaaaaactctttggct
L S C R W I M D H K F R Q H S K N S L A
ctactggatagatggctaataactccactaacaccactgaggatgctgaagtggaggac
L L D T M A N N S T N T T E D A E V E D
→ **RQIFNR**
actgtggccttccctaattcttctgtacagacag**gcgtccaaagcatcagct**gaggatcaa
T V A F P N L L Y R Q A S K A S A E D Q
cttgcccttcacagttcagattcttaattgagacggctgccctgtttgaggaggatc**cacagc**
L A F F T V Q I L N E T A A L F E E D H S
→ **IFNFR**
tctgcatcatgggaggagaacacagtgaggagactttgtcaatgttgtaacccggcaggt
S A S W E E N T V E D F V N V V T R Q A
RQIFNRV ←
gacaac**cttcgctcctgtattggg**agccacggccacaagactaacaagaagctacaaatg
D N L R S C I G S H G H K T N K K L Q M
→ **IFNFRA** **IFNRV** ←
tatttcatgaactttcaag**gccacgtcataaagaaaatgggccacagcgtgaagcctgg**
Y F M K L S S H V I K K M G H S A E A W
gagctgatcaggaagaaatcaaaacccatctgatgagagcggaccagctggtttcttct
E L I R K E I K T H L M R A D Q L V S S
ctactcacaaccaactaa
L L T T N -
AAGCTGTTACCTGCTGTAGATTCATTTATTACATGAAGTCTTTTATTATTATTATTA
TTTATTCATCTATTTATTCATGTATTTATTTGAATTGAGCTGTTTGTATTAAATTGATGG
CTTGATATTCTACAGTCAGTATTTATATAAATTATTATGTTGATTAATTTGTTGATTTAT
TTAAGTTTTTTTCATACCTGCAAAAAGCC**ATAAAA**ATATGACTTTCTCCAGCAAAAAA
AAAAA
Oligo-dT adaptor ←

Fig. 1. (a) The cDNA and encoded amino acid sequence of sea bass IFN. The primers used for the cloning are indicated in bold. The start and stop nucleotide sequences are in bold, the putative signal peptide is in italics, the three putative N-glycosylation sites are underlined, the polyadenylation signal is in bold and underlined. (b) The genomic organisation of sea bass IFN. The primers used for the cloning are indicated in bold. The four introns are evidenced.

(b) **–IFNGENFR1**
AGCCATCGTATCCAGTAGAGCCATCAATACAGCAATCAATATAGCAATCAGTACAGCAAT
CAGTACAGCAATCAGTACAGCAGTCAGTACAGCCACAGTATAGCAATCAGTATAGCAAT
CAATACAGCAATCAGTATAGCAATCAGTGCAGCAACCAACACACACAGCACTCATCTG
AACTTACTCTATACAAAGTCAATCTCTACCTTTTGGAA
 atgctcaacaggattttcttctgtgtgcctgtctctcagtcgtacagtgaggctcctcg
 M L N R I F F V C L S L S L Y S A G S S
IFNGENRV1←
–IFNGENFR2
 ctgagctgcagatggatcatggatcataaattcagacagcacagtaaaaactctttggct
 L S C R W I M D H K F R Q H S K N S L A
 ctactggatagcagtg
 L L D T M
 gtaagtggacttcttattgtttaagtcagtggaattatctgaactgaatgagtttacttta
 ctgtctgtttactccaacacatgatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgatgcag **intron 1 113bp**
 ctaataactccactaacaccactgaggatgctgaagtggaggacactgtggccttcctaat
 A N N S T N T T E D A E V E D T V A F P N
 cttctgtacagacaggcgtccaaagcatca
 L L Y R Q A S K A S
 gtaagtcatcctcaacttctgtctaaagtgaatacaaaaatataaacagtgattattgattt
 gtgtgggtgtgtatctgttatatattcttctacttcttcttcttccag **intron 2 111bp**
 gctgaggatcaacttgcttcacagttcagattcctaataagagcggctgcctgtttgag
 A E D Q L A F T V Q I L N E T A A L F E
IFNGENREV2←
–IFNFR
 gaggatcacagctctgcacatggaggagagaacacagtgaggactttgtcaatgttgta
 E D H S S A S W E E N T V E D F V N V V
 acccggcagcgtgacaaccttcgctcctgt
 T R Q A D N L R S C
 gtgagctcagtggaattacataaccttacttgttcccttacatttaaaacttaagacaa
 acattagtcagctaaatcctgttgactgaaaggatccattaatagtgcatgtgccaaatg
 aacagggttttaattcatgttgttgaattcatttag **intron 3 158bp**
 attgggagccacggccacaagactaacaagaagctacaaatgtatttcatgaaactttca
 I G S H G H K T N K K L Q M Y F M K L S
 agccacgtcataaagaaaatg
 S H V I K K M
 gtagggttgtgtatctatctatatttctatgtatcaatctatctacagtatctatcatgttc
 taataatgctaataattcttctgtctgtag **intron 4 91bp**
IFNGENRV3←
–IFNGENFR4
 ggccacagcgtgaagcctgggagctgatcaggaaggaaatcaaaacccatctgatgaga
 G H S A E A W E L I R K E I K T H L M R
 ggggaccagctggtttcttctactcacaaccaactaa
 A D Q L V S S L L T T N –
 AAGCTGTTACCTGTCTGTTAGATTTCATTTATTACATGAAGTCTTTTATTTATTTATTTA
 TTTATTCATCTATTTATTCATGTATTATTGAATTGAGCTGTTGTATTTAAATTGATGG
CTTGATATTCTACAGTCAGTATTTATATAAATTATTATGTTGATTAATTTGTTGATTAT
IFNGENRV4←
 TTAAGTTTTTTTCATACCTGCAAAAAGCCAATAAAAATATGACTTTCTCCAGCAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 1. (Continued)

cycles of 94 °C for 45 s, 50 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, followed by one cycle of 72 °C for 10 min. PCR products (10 µl) were visualised on 1% (w/v) agarose gels containing ethidium bromide (10 ng/ml) using hyperladder IV (Bioline) as size marker. Controls for the presence of DNA contamination were performed using the RNA samples as template. Plasmid DNA from at least six independent clones was sequenced using MWG DNA Sequencing Services. Sequences generated were analysed for similarity with other known sequences using the FASTA (Pearson and Lipman, 1988) and BLAST (Altschul et al., 1990) programs.

Further primers were designed based on the initial sea bass IFN sequence for 5'- and 3'- rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR (IFNFRA and RQIFNRV, see Table 1). cDNA was synthesised using total head kidney RNA stimulated with poly I:C with a First-strand cDNA Synthesis kit (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. For 3' RACE-PCR, cDNA was transcribed using an oligo-dT adaptor primer (see Table 1), and the PCR was per-

formed with the IFNFRA primer and the oligo-dT adaptor primer. For 5' RACE-PCR, cDNA was transcribed from total RNA using the oligo-dT primer, treated with *E. coli* RNase H (Promega), purified using a PCR Purification Kit (QIAGEN), and tailed with poly(C) at the 5' end with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT, Promega). PCR was performed with RQIFNRV primer and an oligo-dG primer (see Table 1). Cloning, sequencing and similarity searches related to the obtained products were as described above. The obtained cDNA sequence was analysed for the presence of a signal peptide, using SignalP software (Nielsen et al., 1997), and for N- (with the NetNGlyc 1.0 Server) and O-linked glycosylation sites (Julenius et al., 2005). Alignment of the sea bass IFN amino acid sequences to their counterparts from other species was carried out using MEGA 3.1 Software (Kumar et al., 2004). A phylogenetic tree was constructed by the "neighbour-joining" method using MEGA 3.1 Software (Kumar et al., 2004) on full-length amino acid sequences and bootstrap values calculated.

2.2. Sea bass genomic DNA isolation and IFN gene cloning and sequencing

Genomic DNA was isolated from whole blood of a juvenile sea bass (150 g of weight) with the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) as described in Buonocore et al. (2003). Genomic DNA was resuspended in 30–100 µl of sterilized water at a final concentration of 10 ng µl⁻¹ and the 260:280 nm ratio determined. The quality of the DNA was checked by running 1 µl of DNA on an ethidium bromide stained agarose gel (0.5%, w/v). Based on the sea bass IFN cDNA sequence and on the genomic organisation of trout IFN (Zou et al., 2007) several primers (Table 1) were constructed to obtain the entire IFN gene. The cycling protocol was one cycle of 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C for 45 s, 50 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, followed by one cycle of 72 °C for 10 min using the Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen). 10 ng of genomic DNA were used for each PCR reaction. PCR products were visualised, sequenced and analysed as described above.

2.3. In vitro IFN and Mx expression analysis

The *in vitro* IFN and Mx expression was studied with DLEC cells, an embryonic cell line from sea bass (Buonocore et al., 2006a). Cells were cultured in L-15 medium (Gibco) containing 10% FCS, were adjusted to 1 × 10⁵ cells/ml and incubated at 18 °C for 6 h with 20 µg/ml of poly I:C (Sigma). The DLEC control samples were stimulated with L-15 alone and analysed at the same time points. Total RNA was isolated with Tripure (Roche) as described above, resuspended in DEPC treated water and used for real time PCR. For reverse transcription, the BioScript RNase H minus (Bioline) enzyme was used as described by Buonocore et al. (2007). Specific PCR primers were designed for the amplification of about 200 bp products from IFN, Mx and 18S ribosomal RNA (see Table 1). Approximately 10 ng of cDNA template was used in each PCR reaction. The PCR conditions were 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 45 s, 52 °C for 45 s and 72 °C for 45 s. Triplicate reactions were performed for each template cDNA and the template was replaced with water in all blank control reactions. The analysis was carried out using the endpoints method option of the Mx3000P™ software that causes the collection of the fluorescence data at the end of each extension stage of amplification. A relative quantization was performed, comparing the levels of the target transcripts (IFN and Mx) to a reference transcript (calibrator, the time 0 controls). A normalizer target (the 18S ribosomal RNA transcript) was included to correct the differences in total cDNA input between samples. The results were expressed as the mean ± S.E.M. of the results obtained from six fishes and the differences from the control were considered significant if *p* < 0.05 using the one-way ANOVA test.

2.4. 3D modelling of sea bass IFN

The three-dimensional model of sea bass IFN was created using the template model of human IFN-α2 complexed with human interferon receptor (IFNAR-2, PDB code: 2HYM) (Quadt-Akabayov et al., 2006). As the amino acid sequence identity between the human and sea bass IFN was quite low (about 24%), an accurate procedure was used to search the best alignment of sequences (Dalton and Jackson, 2004) as described in Buonocore et al. (2008). The alignment of IFN protein sequences from 20 different organisms was made with 3D-Coffee program (O'Sullivan et al., 2004). The MODELLERv7 module (Sali and Blundell, 1993) implemented in the InsightII program (Accelrys, San Diego, CA, USA) was used to build 10 full-atom models of sea bass IFN by setting 4.0 Ångströms as root mean square deviation (RMSD) among the structures of the templates and fully optimized models. The best model among those

Table 2

Percentage of nucleotide identity and amino acid identity and similarity of sea bass IFN with other known IFN sequences.

	% Nucleotide identity	% Amino acid identity	% Amino acid similarity
Japanese medaka	72.7	58.8	74.3
Three-spined stickleback	77.9	66.1	79.6
<i>Fugu rubripes</i>	71.4	57.8	74.1
Spotted green pufferfish	68.5	55.7	73.0
Atlantic salmon	53.1	37.1	55.4
Rainbow trout 1	51.5	32.4	48.6
Rainbow trout 2	52.6	35.8	50.5
Rainbow trout 3	46.5	28.0	45.6
Zebrafish 1	51.7	31.4	53.6
Zebrafish 2	48.2	20.9	41.3
Goldfish	49.4	31.3	47.7
Channel catfish	50.2	26.6	47.7
Silurana tropicalis 1	44.9	18.4	37.2
Silurana tropicalis 2	47.8	24.9	38.3
Human α	48.0	23.6	40.9
Mallard	45.0	17.8	32.2
Turkey	46.0	20.6	35.5
Human λ	43.1	16.9	30.1

The highest values are evidenced in bold (for the accession numbers see Fig. 2).

obtained was selected using the Prosail program (Sippl, 1993) and the PROCHECK program (Laskowski et al., 1993). Secondary structures were assigned by the DSSP program (Kabsch and Sander, 1983). The amino acids at the protein interface between human IFN-α2 and IFNAR2 were identified using the PDBsum database (Laskowski et al., 2005).

3. Results

3.1. Sea bass cDNA IFN sequence analysis

To obtain high levels of sea bass IFN mRNA, HK leukocytes were stimulated *in vitro* with poly I:C, a compound that is a well known inducer of mammalian type I IFNs (Dong et al., 2008). PCR with primers IFNFR and IFNRV gave a product of the expected size (188 bp, see Fig. 1a) that when sequenced showed similarity with other known IFN molecules (data not shown). 3'-RACE-PCR performed with IFNFRA (based on the initial 188 bp sequence) and the oligo-dT adaptor primer gave a product of 390 bp (see Fig. 1a). 5'-RACE-PCR performed with RQIFNRV (based on the initial 188 bp sequence) and oligo-dG gave a product of about 600 bp (see Fig. 1a). The full-length cDNA (EMBL accession number AM765846) is comprised of 1047 bp from the three overlapping products and was confirmed by PCR using primers that amplify the complete coding sequence (data not shown). The 3'-UTR contained a polyadenylation signal (AATAAA) 18 bp upstream of the poly(A) tail (Fig. 1a).

An analysis of the sea bass IFN cDNA sequence (Fig. 1a) revealed the presence of a putative 22 amino acid signal peptide (most likely cleavage site between Ser²² and Cys²³), three potential N-glycosylation sites but no putative O-glycosylation sites. Comparison of the sea bass IFN nucleotide and amino acid sequence to its counterparts in other species is shown in Table 2. The highest nucleotide and amino acid identity was with stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), followed by medaka (*Oryzias latipes*) and Fugu (*Takifugu rubripes*), whilst the lowest identity was to mallard (*Anas platyrhynchos*), followed by silurana tropicalis 1 (*Xenopus tropicalis*) and turkey (*Meleagris gallopavo*). The percentages of nucleotide and amino acid identity were similar with two (1 and 2) of the three sequences identified in rainbow trout (Zou et al., 2007). Finally, the percentages of nucleotide and amino acid identity were lower with human IFN-λ compared to human IFN-α.

	<	EXON 1	>>	
Diclab	-----	MLNRI FFVCLSLSLY SAGSSLSRWR	IMDHKFRQHS KNSLALLDTM ANNSTNTTE-	
Orylat	-----	.H.L V.A.ALV..A G..F..R...	L....K.F. DT..D..EK. V..A..S..G	
Gasacu	-----	.C.M .L.FVC.... .SA.....	V....SHL. RT.MD....L .H....S..-	
Takrub	-----	.P-- LL....CV. .Q..P.G...	L..D....Y. HK..E.... V....SSV-	
Tetnig	-----	.T-- VLL....CVC .Q..P.G...	L-EE..T.Y. SL..S..N. KS....SSL-	
Salsal	-----	MYTVQSWT CICIIC.MQ .VCHC--D.	.RH.YGHLS E-Y.S..Q. GGD-----	
Oncmyk1	-----	-----MQ .VCHC--D.	.RH.YGHLSA E-Y.P..Q. GGD-----	
Oncmyk2	-----	MCT.QSWT CLFLILC.MQ .VCHC--D.	.QH.FGHLSA E-Y.SQ.EQ. GGD-----	
Oncmyk3	-----	MAVLKW LSI..T.FCQ GTAA.KP..	TQFRLGKLD V-ID..SD. GGIFP----	
Danrer1	-----	MWT YIFVIYVI.Q .QS.AST.E.	LG-RYRIIT E-.N..KN. GKG-----	
Danrer2	-----	MEF WQVFAV.CPA LFFAHITSKP	TNCFMR.K.V .TAYS..ES. GGLFP---RE	
Caraur	-----	MKTQMWY YMFVMT.Q GQC.A--E.	LG-RYRMISN E-.S..KE. GKG-----	
Ictpun	-----	MDIKQSWIC LYFL.FFIVQ ERSEA--N.	MISQYRAKN F-CVS..KE. GGE-----	
Xentro1	MFKRNTFGSY CCINYAIYVS	ITVTTLMHAS IQTL.L.V.I	PIVQ.QN.K. LQPKQEYLN Q-T.KTFEE.	NPPE----DY
Xentro2	-----	MLPMGQ WS.L.L..T	.IVH.Q..K. LHPKQEYLN Q-I.KAFNE.	MPLK----T
Homsapα	-----	MALT .ALIVA.LVL .CK..VG.DLPQTHSLG.	RRT.M..AQ.RR. I-----L	
Homsapλ	-----MKL	DMTGDCTPVL VLMAAV.TVT	GA.PVARLHG ALPDARG.HI AQFKSLSPQE	LQAFKRAKDA LEE-----LL
Anapla	-----MPG	PSAPPPAIY SALA.L.L.T	PPANAF..SP LRL.DSAFAD	D-.Q..RN. .PSP-----
Melgal	-----MAV	PASQHPRGY GILL.T.LMK	ALAAAA.NH LRPQDATFSR	D-.Q..RD. .PSP-----
	EXON 2	><	EXON 3	><
Diclab	DAEVEDTVAF PNLLYQASK	ASAEDQLAFT VQILNETAAL	FEE----DHS SASWEENTVE	DFVNVVT-RQ ADNLRSCIGS
Orylat	.TEDIE.D. .HH.....	E...N.V... .V.K.VS..	-----S. QOI..	K.LG..N.. .E.H..VSE
Gasacu	...NN---. .N.S....	...K.R.S .E..E.M...	.V-----N. D.Q..	D.H.F..-K. .S.H..S--
Takrub	--P.EM.I. .QE....TFN	...K..LA A..M..V..	LM-----G...D.KQ..	NL..L..-Q. QA.MV.
Tetnig	--A...AI. .EV....TFN	...R...A A.....	-----Y. G....KS..	N...IL..-Q. G..VA.
Salsal	ITKQDAP.F. .TS...HIDD	.EV...VR.L KETIQITK.	.DG----NMK .VT.DKKKLD	.L.ILE.. LE..K..VSP
Oncmyk1	ITKQDAP.L. .TS...HIDD	.EF..KVI.L KETIQITK.	.DG----NMK .T.DKKKLD	.L.ILE.. LE..N..VSP
Oncmyk2	ITKQDAP.L. .TS...HIYD	.EF..KVR.L NETIQIILK.	.DGNRRNRK .VT.DKKKLD	.L.ILD.. FE..S..VSP
Oncmyk3	LMCAEENVE QMFPELDLYKN	TEG..VSVVA LEAMRYVEQ.	YNN----SLT .VT.NKIKLN	M.Q..IY.. VQ..EL.VVG
Danrer1	Y.D--LETP. .SR..TLMD	SKV...VK.L .LT.DHIIH	MDAR--EHMN .VN.DQ....	.L.IHL..K SSD.KE.VAR
Danrer2	CLKENVRIT. .KYALQSNN	NQKTGVAKAV YK.MDHIDF.	.AN----SY PEA.NKRK.D	N.Q.I.Y--R LTKENQ..MR
Caraur	YP.G-TK.S. .GR..NMIDN	.KV...VK.L .LT.DHIIR	MDAR--EHMN .VQ.NLQ..	H.LT.LN.. SSD.KE.VAR
Ictpun	IVQ--VNRP. .HKA.SEID.	.K....VR.L A.ATEQIISV	.NV---SHVD EVK.DRSALD	E.L.ILNT.. LTK.TK.TST
Xentro1	.ESCQYDSIE LPNIDEIY.I	SQM.EMVLAV RGV...MRF	YMK---H.E .MGCKQQAW.	R.QQLLY-Y. INQ.EA..PE
Xentro2	EEIC.EHPTD LPNTESTY.V	SQV.AGALAV REV...MRF	YMK---H.E .MGCKQQAW.	R.QQLLY-Y. IHQ.EA.VSQ
Homsapα	FSCLK.RHD. GFPQEEFNGQ	FQKAETIPVL HEMIQQIFN.	.ST---KD. .A.D.TLLD	K.YTELY-Q. LND.EA.VIQ
Homsapλ	LKDCRCHSRL FPRTWDLRQL	QVR.RPM.LE AELALTLKV.	EAT----AD TDPALVDVLD	QPLHTLH-HI LSQF.A..QP
Anapla	TQPCPQQH.P CSFPDITLDT	NDTQQAHTA LHL.QHLFDT	LSS----PST P.H.LHTARH	.LL.QLQ-HH IHH.ER.FPA
Melgal	PQPCPQHN.P CSFNDITVLD	NNTQQADKT. HN..QHLFKI	LSG---PTT P.H.IDSQRQ	SLL.QIQ--Y .QH.EQ.LAD
	EXON 4	><	EXON 5	>
Diclab	HGHK-TNK--	-----KLQM YFMKLSSHVI	KKMGSAAEAW ELIRKEIKTH	LMRADQLVSS LLTTN-----
Orylat	SLVHKK.R--	-----R. .KR.LD.IL	.Q.Y.... .T...T.A.	.L..QR.L.P .ISSK-----
Gasacu	...RK...--	-----KR..L.H	EQ.....S. M.A.	.KT...L. .SN-----
Takrub	P...-RSE--	-----EVER .NR..N.IL	...DY..A. E..E.L	.QTHL...T .S.P-----
Tetnig	P.QS-RS--	-----E.HK .TRI.T.IL	R.TD...G. .V.EK.RSL	...HL.LTT H-----
Salsal	AMKPEK----	-----R.KR .K..NKN.L	R..NY..Q. T.R.	.Q.L.I.AAQ MY-----
Oncmyk1	AMKPEK----	-----R.KR .K..N.K.L	R..NY..Q. G..T.RN	.Q.L.I.AAQ MY-----
Oncmyk2	VVKPEK----	-----R.KR .RN.NRK.L	R..NY.... .T.R.	.Q.L.I..GQ MY-----
Oncmyk3	GVWESSGDG--	---GSVT.KT .N..-NT.L	.EKE...C. .IV....REN	.VQFKKFID. RVKP-----
Danrer1	YAKPAKHES--	---YEIRIKR H.RT.-KKIL	.KQY.... .Q..RVV.S	.Q.M.IIA.N ARVNPRV---
Danrer2	MRAQG.VDDF	P-ARDDA.KS .N..-ATLL	RNKDN.FC. .VV.H.LLGV	.S---IIQPK .-----
Caraur	Y-QPSHKES--	---YEK.INR H.KI.-KKNL	.KEY..Q. .Q..RAV.H.	.Q.M.IIA.I A--NRR----
Ictpun	YAERAGHSP--	---TER..RK H.K.-KKFL	NEANY..DSL .R..NVVQH.	.W.M.IIAAN VQKQLKRTN-
Xentro1	TAENPVFN--	-----QTISD QYQA.EQILQ	E--NT.CTR DI.QS..RGN	.QLVG..A.R ARQRLLQRT A
Xentro2	TEENDLL---	-----ESISE E.NL.EQILQ	E.D-N..CV. DF.HL.TRRN	.QQVL..S.R .RRQRLLQRP Q
Homsapα	GVGVTEETPLM	KEDSILAVRK .QRI-TLYL	.EKKY.PC. .VV.A..MRS	FSLSTN.QE. .RSKE-----
Homsapλ	QPTAGPRTRG	-----R.HH WLYR.--QEA	P.KESPGCLE ASVTFNLFRL	.T.DLNC.A. GDLCV-----
Anapla	DAARLHRRGP	R-NLHLSINK .GCI-Q.FL	QNHTY.PC. .DHV.L.AHAC	FQ.IHR.TRT MR-----
Melgal	SHTSRTRWP	H-NPHLTINK H.SC.-HAFL	HDNDY..C. .DHV.LRARAW	.LHIDH..RN TR-----

Fig. 2. Alignment of the predicted sea bass IFN amino acid sequence with other known IFN molecules. Regions corresponding to the amino acid sequences of the five exons have been evidenced above the sequence. Sea bass cysteines are evidenced in bold, the putative N-glycosylation sites are underlined and the signal peptide is in italics. Accession numbers: sea bass (*Dicentrarchus labrax*) AM765846; Japanese medaka (*Oryzias latipes*) CAM32419; three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) CAM31707; *Fugu rubripes* (*Takifugu rubripes*) CAM82750; spotted green pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) CAD67762; Atlantic salmon (*Salmo salar*) AAP51035; rainbow trout 1 (*Oncorhynchus mykiss*) AJ580911; rainbow trout 2 (*Oncorhynchus mykiss*) AJ582754; rainbow trout 3 (*Oncorhynchus mykiss*) AM235738; zebrafish 1 (*Danio rerio*) AJ544820; zebrafish 2 (*Danio rerio*) NP.001104552; goldfish (*Carassius auratus*) AAR20886; channel catfish (*Ictalurus punctatus*) AY847296; *Silurana tropicalis* 1 (*Xenopus tropicalis*) BN001169; *Silurana tropicalis* 2 (*Xenopus tropicalis*) BN001170; human α (*Homo sapiens*) NM.000605; human λ (*Homo sapiens*) NM.172138; mallard (*Anas platyrhynchos*) P51526; turkey (*Meleagris gallopavo*) P51527.

A multiple alignment of the sea bass IFN amino acid sequence with other known IFN sequences was assembled (Fig. 2) to investigate the conservation of characteristic amino acid residues involved in structural domains. In the sea bass IFN mature sequence two cysteines are present (Cys¹ and Cys¹⁰⁴) and are conserved in all sequences (only in zebrafish 2 the first cysteine not aligned perfectly but is quite close). In human IFN- α , in rainbow trout 3, in zebrafish 2, in silurana tropicalis 1 and 2, and in bird IFN sequences (mallard and turkey) two additional cysteine residues are present and conserved in the same positions of the alignment. It has been demonstrated by structural analysis that in human IFN- α the four cysteines form two disulphide bridges (Klaus et al., 1997), whereas in human IFN- β a single bond is formed by the two present cysteines (Karpusas et al., 1997). Some residues are conserved between almost all fish sequences, in particular: Leu¹⁹, Leu²⁰, Phe⁴², Pro⁴³, Leu⁴⁶, Tyr⁴⁷, Glu⁵⁶, Asp⁵⁷, Leu⁷², Trp⁸², Phe⁹⁰, Leu¹⁰¹, Phe¹²⁰, Leu¹²³, Ser¹³⁴, Ala¹³⁵, Trp¹³⁸, Glu¹³⁹, Arg¹⁴² and Leu¹⁴⁹. Phe⁴² has been shown to be important for biological activity of human IFN- α (Waine et al., 1992), whereas some of the other conserved residues have been identified as possible binding sites for IFNAR-1 and IFNAR-2 receptor subunits by the conserved domain database (Marchler-Bauer et al., 2007) and therefore they could putatively be involved in the interactions with the corresponding fish IFN receptor.

Phylogenetic analysis (Fig. 3) performed using the amino acid sequences showed that sea bass IFN grouped with other known teleost sequences. Three main branches seem present: one with the Salmoniformes, the second with the Cypriniformes and the third with the Tetraodontiformes in which the sea bass sequence, a Perciformes, is included. The rainbow trout 3 and zebrafish 2 sequences seems different from all the other fish sequences, with the avian and amphibian IFN- α sequences in different clusters compared to the fish sequences. Finally, the human IFN- λ could be considered as an outgroup of the obtained tree.

3.2. Sea bass IFN gene structure analyses

PCR amplification of genomic DNA, using the primers deduced from the IFN cDNA sequence, gave overlapping products revealing the complete gene nucleotide sequence. PCR performed with IFNGENFR1 and IFNGENRV4 (Table 1) gave a 1.5 kb product that corresponded to the whole gene (Fig. 1b). IFNGENFR1 and IFNGENRV1 (Table 1) gave a 320 bp product with no introns (Fig. 1b); IFNGENFR2 and IFNGENRV2 (Table 1) gave a 450 bp product containing intron 1 and intron 2 (Fig. 1b); IFNFR and IFNGENRV3 (Table 1) gave a 435 bp product containing intron 3 and intron 4 (Fig. 1b); IFNGENFR4 and IFNGENRV4 (Table 1) gave a 225 bp product with no introns (Fig. 1b). The whole contiguous nucleotide sequence comprises 1475 bp (EMBL accession number AM946399) with five exons and four introns. All the introns started with the typical "GT" nucleotide sequence and ended with the usual "AG" sequence, with only the first intron not in phase between exon 1 and exon 2 (Fig. 1b). In the multiple alignment of Fig. 2 the exon boundaries have been shown above the sequences, but there are no conserved amino acids at the beginning or at the end of these sequences, except the cysteine residue at the end of exon 3. In Fig. 4, the IFN gene organisation and intron/exon sizes in sea bass and other known IFN genes have been schematically represented. The sea bass IFN gene contains four introns like all others except medaka that contains three introns; the sizes of the introns are quite variable between different species, with sea bass, pufferfish and Fugu that show some affinities. Zebrafish and rainbow trout IFN genes are bigger than the others showing an intron of more than 2000 bp (the last one in zebrafish and the third in rainbow trout). The medaka IFN gene seems to have lost the third intron and that

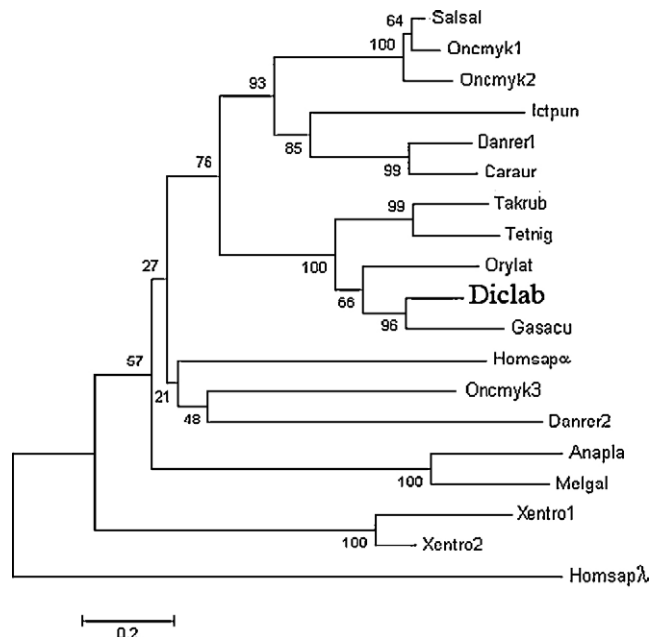


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the relationship between sea bass IFN sequence with other known IFN molecules. The rooted tree was constructed by the "neighbour-joining" method and was bootstrapped 10,000 times. 0.2 indicates the genetic distance.

exon 3 and exon 4 merged together. Finally, the exon sizes are much more conserved than the intron ones, with the third and fourth exons showing comparable dimensions in all IFN genes, except for medaka.

3.3. In vitro IFN and Mx expression analysis

To investigate whether sea bass IFN expression could be modulated by poly I:C, *in vitro* stimulation of DLEC cell line was performed. Moreover, in the same samples, we analysed the expression of sea bass Mx, one of proteins whose transcription is induced in mammals by the binding of the IFN to its receptor through the JAK-STAT pathway (Samuel, 2001). Real time PCR products were loaded on agarose gel and single bands of the expected sizes were obtained. The results are shown in Fig. 5. Controls for 6 h of incubation adding PBS only have been performed but not shown in the graph as no significant differences have been evidenced from the time 0 controls. A significant higher level of both IFN and Mx expression was detected after 6 h of stimulation, with the IFN increase much more evident than the Mx one.

3.4. 3D modelling of sea bass IFN

BLAST searching within the non-redundant database of all known protein sequences shows that the sea bass IFN sequence is significantly similar to other IFN proteins from different organisms (*E*-value lower than 10^{-15} with fish sequences and about 10^{-6} to 10^{-3} with mammalian sequences). This search also found the experimental structure of human IFN- α 2 complexed with IFNAR-2 that could be used as reference for template-based modelling of sea bass IFN. Therefore, we applied an accurate alignment procedure recently described (Dalton and Jackson, 2004) and already used in our previous papers (Buonocore et al., 2006b, 2007, 2008).

Starting from the obtained alignment (see Fig. 6), 10 structural models were created for sea bass IFN 23–185 amino acid region. The best model chosen for sea bass IFN with its secondary structure elements is shown in Fig. 7. This model shows an "all-alpha"

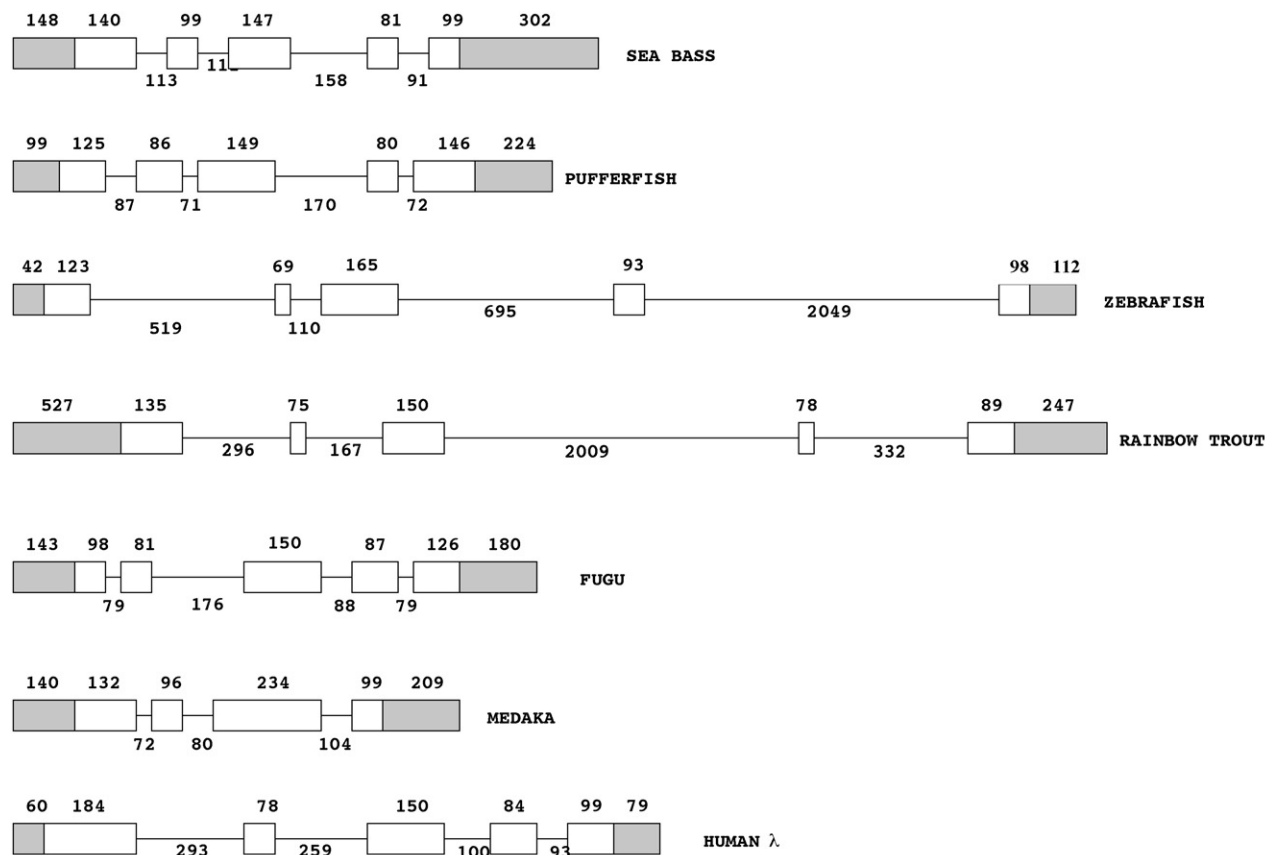


Fig. 4. A schematic representation of the IFN gene organisation and intron/exon sizes in sea bass and other known IFN genes. The open boxes are the coding sequences, whether the grey boxes represent the untranslated regions of the mRNA. Accession numbers: sea bass (*Dicentrarchus labrax*) AM946399; spotted green pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) AJ544889; zebrafish (*Danio rerio*) AJ544820; rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) AM489415; Fugu rubripes (*Takifugu rubripes*) AJ583023; Japanese medaka (*Oryzias latipes*) BN001095; human λ (*Homo sapiens*) NT.011109.

domain characterized by an “up-down bundle” architecture made of six helices (ABB'CDE). The two cysteine residues present in sea bass IFN sequence (i.e. Cys²³ and Cys¹²⁶) are in a position and at a distance that suggest the possible formation of a disulfide bridge that may stabilize the structure. The human and sea bass models were compared by structural superimposition, RMSD eval-

uation and secondary structural elements to show differences. The presence of gaps in the alignment made it difficult to perform a complete structural comparison of the sea bass model with the template human structure. Superimposition of structurally conserved regions of human and sea bass models gave an RMSD value of 0.49 Angstroms. This value indicates that the fold architecture is well

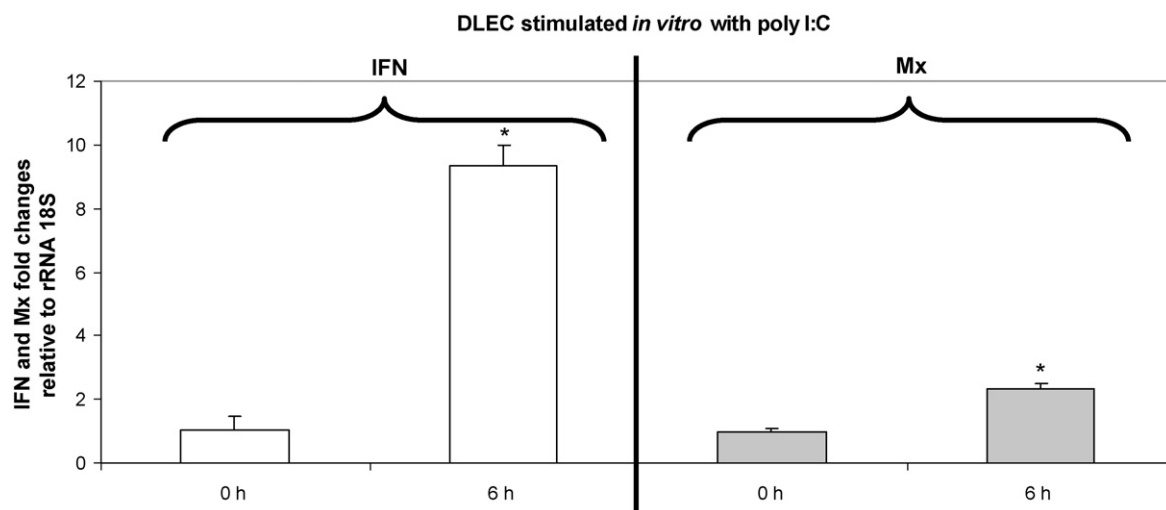


Fig. 5. In vitro sea bass IFN and Mx expression analysis. IFN and Mx mRNA levels expressed as a ratio relative to 18S ribosomal RNA levels in the same samples after real time PCR analysis of DLEC cells stimulated with PBS (control) and with 20 μ g/ml poly I:C for 6 h (the calibrator was the non-stimulated 0 h control). Data were expressed as the mean $\pm$ S.E.M. and asterisks indicates when $p < 0.05$ with respect to the time 0 control.

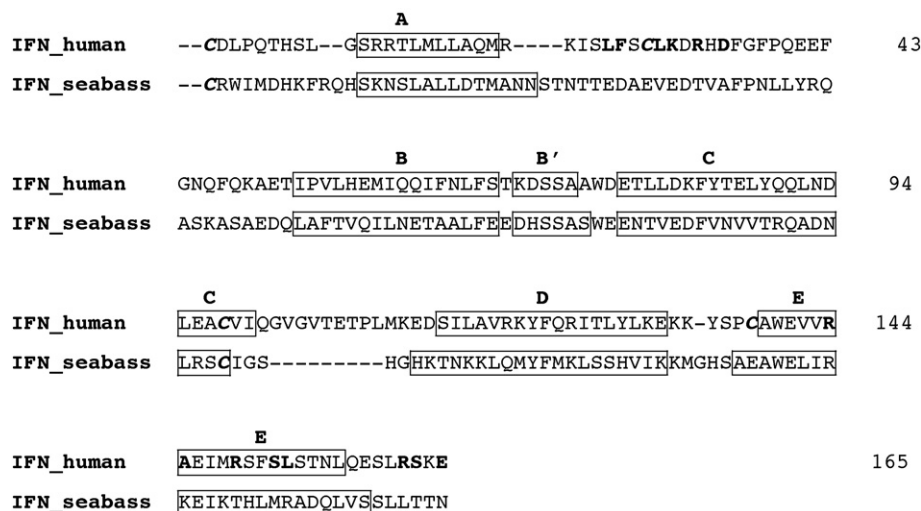


Fig. 6. Primary and secondary structures of human and sea bass IFN, aligned as for the modelling procedure. The cysteine residues are reported in italic and bold. Helices are indicated with continuous line boxes and evidenced with labels. The interaction residues of human IFN- α 2 with IFNAR-2 are reported in bold.

conserved. The comparison of the secondary structural elements (Fig. 6) reveal that six helices are well conserved, with few external residues needing to be added or excluded.

4. Discussion

In this paper, we report the cloning of an IFN cDNA homologue from sea bass (*D. labrax*), the analysis of its gene organisation and *in vitro* expression after stimulation with poly I:C. Finally, we constructed by homology the IFN tertiary structure and investigated the amino acids that could putatively be involved in the interaction with the IFN receptor.

The sea bass IFN cDNA consists of 1047 bp that translates in one reading frame to give the entire molecule containing 185 amino acids. An analysis of the sea bass sequence shows the presence of two cysteine residues and three potential *N*-glycosylation sites. Sea bass IFN differs either from human IFN- α (4 cysteine residues), human IFN- λ (6 cysteine residues) and human IFN- β (2 cysteine residues but in different positions) and does not possess the “CAWE” motif that is usually present at the C-terminal region of the higher vertebrate type I IFNs (Zou et al., 2007). With regard to the glycosylation, it seems not to be important for biological activities of human IFN- α , but is believed to play a role in regulating protein solubility and stability of human IFN- β (Karpusas et al., 1998). Comparison of the sea bass IFN nucleotide and amino acid sequence to its counterparts in other fish species (Table 2) showed a high range of percentage identity: from 46.5% to 77.9% and from 26.6% to 66.1%, respectively. In the phylogenetic tree of Fig. 3 most fish IFN sequences clustered together (except for rainbow trout 3 and zebrafish 2), even if in different branches, and, sea bass IFN seems more related to human IFN- α than to human IFN- λ as expected from previous analysis of fish IFN genes (Zou et al., 2007). An analysis of the genome structure showed another peculiar characteristic of sea bass IFN compared to mammalian type I homologues: the presence of four introns (see Fig. 4), potentially the ancestral state for all IFNs and still seen in IFN- λ in mammals. The sea bass IFN 3D structure (see Fig. 7) predicted by template-based modelling present the typical IFN family fold. Moreover, we investigated the possible residues of interaction of sea bass IFN with its receptor on the basis of the human complex between IFN- α 2 and IFNAR-2 receptor molecules (PDB code: 2HYM) (Quadt-Akabayov et al., 2006). In the human complex the interaction residues of IFN- α 2 are located in the AB loop, in the E helix and in the C-terminal region. The percentage of solvent exposure for each residue of interaction in human IFN- α 2 and for the related sea bass residues identified on the basis of the alignment was evaluated and the results are reported in Table 3. Significant differences can be appreciated in the solvent exposure values of various amino acids and only one residue is perfectly conserved, Arg¹⁴⁴ in human and Arg¹⁶⁴ in sea bass. This should strengthen the possibility that the complex is stabilized slightly in a different way in sea bass with respect to human.

In vitro IFN and Mx expression was studied using DLEC sea bass cell line stimulated with poly I:C to simulate a virus infection. The IFN level of expression increased ten times after 6 h and this high

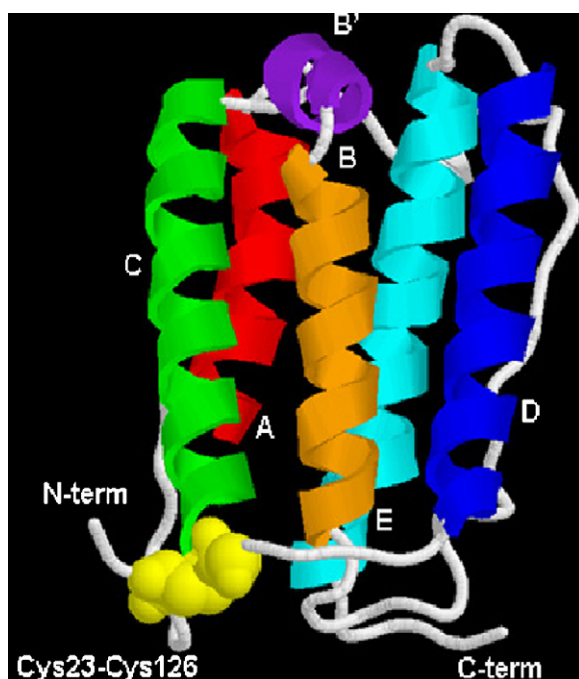


Fig. 7. 3D model of sea bass IFN obtained by template-based modelling. The six helices are shown in different colours and indicated with labels. The disulphide bond is evidenced in yellow and in cpk. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Table 3

The percentage of solvent exposure of the human and sea bass IFN amino acids interacting with the IFN receptor.

Amino acid	% Solvent exposure in human IFN	Amino acid	% Solvent exposure in sea bass IFN
<i>Loop AB</i>			
Leu 26	27.5	Glu 54	39.5
Phe 27	96.6	Asp 55	89.0
Cys 29	10.9	Glu 57	25.6
Leu 30	90.1	Val 58	90.0
Lys 31	83.6	Glu 59	75.2
Arg 33	88.5	Thr 61	83.3
Asp 35	67.9	Ala 63	60.7
<i>Helix E</i>			
Arg 144	11.2	Arg 164	11.0
Ala 145	21.5	Ala 165	28.4
Arg 149	66.6	Thr 169	29.8
Ser 152	22.6	Met 172	51.7
Leu 153	27.3	Arg 173	33.4
<i>C-terminus</i>			
Arg 162	96.9	Leu 182	95.0
Ser 163	71.4	Thr 183	67.0
Glu 165	115.8	Asn 185	141.1

The amino acid evidenced in bold is conserved in human and sea bass IFN.

induction is in agreement with previous findings in other teleosts like zebrafish, Atlantic salmon and rainbow trout (Altmann et al., 2003; Robertsen et al., 2003; Zou et al., 2007) stimulated with poly I:C as well. Moreover, the increase of Mx expression is a good indication that this gene is induced by the presence of IFN transcripts like it happens in mammals.

In conclusion, the availability of this new sea bass type I IFN sequence gives the opportunity to investigate more in detail antiviral immune responses in this species and could help in studying the effects of vaccination trials against sea bass viral pathogens. Whether other types of IFNs are present in sea bass it remains to be determined although it is anticipated that at least type II IFN will also be present as seen in other fish species.

Acknowledgements

Authors are indebted to Dr. C. Magugliani and Dr. E. Vela (Nuova Azzurro, Civitavecchia) for the supply of fish and to Dr. M. Tiberi for the DLEC RNA samples. This work was supported by the European Commission within the project IMAQUANIM (EC contract number FOOD-CT-2005-007103).

References

- Altmann, S.M., Mellon, M.T., Distel, D.L., Kim, C.H., 2003. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish *Danio rerio*. *J. Virol.* 77, 1992–2002.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D.J., 1990. Best local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P., 1999. Natural killer cells in antiviral defence: function and regulation by innate cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* 17, 189–220.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C., 1997. Cellular responses to interferon- γ . *Ann. Rev. Immunol.* 15, 749–795.
- Buelens, C., Bartholome, E.J., Amraoui, Z., Boutriaux, M., Salmon, I., Thielemans, K., Willems, F., Goldman, M., 2002. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood* 99, 993–998.
- Buonocore, F., Prugnoli, D., Falasca, C., Secombes, C.J., Scapigliati, G., 2003. Peculiar gene organisation and incomplete splicing of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-1 β . *Cytokine* 21, 257–264.
- Buonocore, F., Libertini, A., Prugnoli, D., Mazzini, M., Scapigliati, G., 2006a. Production and characterization of a continuous embryonic cell line from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mar. Biotechnol.* 8, 80–85.
- Buonocore, F., Randelli, E., Bird, S., Secombes, C.J., Costantini, S., Facchiano, A., Mazzini, M., Scapigliati, G., 2006b. The CD8 α from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cloning, expression and 3D modelling. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 637–646.

- Buonocore, F., Randelli, E., Bird, S., Secombes, C.J., Facchiano, A., Costantini, S., Scapigliati, G., 2007. Interleukin-10 expression by real-time PCR and homology modelling analysis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 270, 512–522.
- Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Guerra, L., Picchiatti, S., Costantini, S., Facchiano, A.M., Zou, J., Secombes, C.J., Scapigliati, G., 2008. A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterization and structural analysis. *Mol. Immunol.* 45, 3168–3177.
- Colonna, M., Krug, A., Cella, M., 2002. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 373–379.
- Coulombel, C., Vojdani, G., Doly, J., 1991. Isolation and characterization of a novel interferon- α encoding gene, IFN- α 11, within a murine IFN cluster. *Gene* 104, 187–195.
- Dalton, J.A.R., Jackson, R.M., 2004. An evaluation of automated homology modelling methods at low target-template sequence similarity. *Bioinformatics* 23, 1901–1908.
- Dong, L.W., Kong, X.N., Yan, H.X., Yu, L.X., Chen, L., Yang, W., Liu, Q., Huang, D.D., Wu, M.C., Wang, H.Y., 2008. Signal regulatory protein alpha negatively regulates both TLR3 and cytoplasmic pathway in type I interferon induction. *Mol. Immunol.* 45, 3025–3035.
- Fellous, M., Nir, U., Wallach, D., Merlin, G., Rubinstein, M., Revel, M., 1982. Interferon-dependent induction of mRNA for the histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3082–3086.
- Julienius, K., Molgaard, A., Gupta, R., Brunak, S., 2005. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15, 153–164.
- Kabsch, W., Sander, C., 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- Karpusas, M., Nolte, M., Benton, C.B., Meier, W., Lipscomb, W.N., Goelz, S., 1997. The crystal structure of human interferon beta at 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11813–11818.
- Karpusas, M., Whitty, A., Runkel, L., Hochman, P., 1998. The structure of human interferon-beta: implications for activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1203–1216.
- Klaus, W., Gsell, B., Labhardt, A.M., Wipf, B., Senn, H., 1997. The three-dimensional high resolution structure of human interferon α -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.* 274, 661–675.
- Kontsek, P., Karayianni-Vasconcelos, G., Kontsekova, E., 2003. The human interferon system: characterisation and classification after discovery of novel members. *Acta Virol.* 47, 201–215.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4, 69–77.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150–163.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK—a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283–291.
- Laskowski, R.A., Crislyakov, V.V., Thornton, J.M., 2005. PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 33, D266–D268.
- Levrault, J.-P., Boudinot, P., Colin, I., Benmansour, A., Peyrieras, N., Herbomel, P., Lutfalla, G., 2007. Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system. *J. Immunol.* 178, 4385–4394.
- Long, S., Wilson, M., Bengten, E., Bryan, L., Clem, L.W., Miller, N.W., Chinchar, V.G., 2004. Identification of a cDNA encoding channel catfish interferon. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 97–111.
- Lutfalla, G., Crollius, H.R., Stange-Thomann, N., Jaillon, O., Mogensen, K., Monneron, D., 2003. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* 4, 29.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D., Bryant, S.H., 2007. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 35, D237–D240.
- Martin, S.A.M., Zou, J., Houlihan, D.F., Secombes, C.J., 2007. Directional responses following recombinant cytokine stimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-11 macrophage cells as revealed by transcriptome profiling. *BMC Genomics* 8, 150.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10, 1–6.
- O'Sullivan, O., Suhre, K., Abergel, C., Higgins, D.G., Notredame, C., 2004. 3DCoffee: combining protein sequences and structures within multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 340, 385–395.
- Pearson, W.R., Lipman, D.J., 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2444–2448.
- Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R., 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202, 8–32.
- Quadt-Akabayov, S.R., Chill, J.H., Levy, R., Kessler, N., Anglister, J., 2006. Determination of the human type I interferon receptor binding site on human interferon- α 2

- by cross saturation and an NMR-based model of the complex. *Protein Sci.* 15, 2656–2668.
- Radhakrishnan, R., Walter, L.J., Hruza, A., Reichert, P., Trotta, P.P., Nagabhushan, T.L., Walter, M.R., 1996. Zinc mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure* 4, 1453–1463.
- Robertsen, B., Bergan, V., Rokenes, T., Larsen, R., Albuquerque, A., 2003. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression and biological activity. *J. Interferon Cytokine Res.* 23, 601–612.
- Robertsen, B., 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 172–191.
- Sali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Samuel, C.E., 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 778–809.
- Scapigliati, G., Buonocore, F., Bird, S., Zou, J., Pelegrin, P., Falasca, C., Prugnoli, D., Secombes, C.J., 2001. Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 beta. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 711–726.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.
- Senda, T., Shimazu, T., Matsuda, S., Kawano, G., Shimizu, H., Nakamura, K.T., Mitsui, Y., 1992. Three-dimensional crystal structure of recombinant murine interferon-beta. *EMBO J.* 11, 3193–3201.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeier, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D., Klucher, K.M., 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4, 63–68.
- Sippl, M.J., 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 17, 355–362.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., Schreiber, R.D., 1998. How cells respond to interferons. *Ann. Rev. Biochem.* 67, 227–264.
- Waine, G.J., Tymms, M.J., Brandt, E.R., Cheetham, B.F., Linnane, A.W., 1992. Structure-function study of the region encompassing residues 26–40 of human interferon- α 4: identification of residues important for antiviral and antiproliferative activities. *J. Interferon Res.* 12, 43–48.
- Zou, J., Carrington, A., Collet, B., Dijkstra, J.M., Yoshiura, Y., Bols, N., Secombes, C., 2005. Identification and bioactivities of IFN- γ in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *J. Immunol.* 175, 2484–2494.
- Zou, J., Tafalla, C., Truckle, J., Secombes, C.J., 2007. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *J. Immunol.* 179, 3859–3871.

Ringraziamenti

Ringraziamenti

Un grazie immenso al mio tutor, Dr. Francesco Buonocore, una persona eccezionale che mi ha sempre consigliato con grande entusiasmo in questo percorso formativo insegnandomi moltissimo.

Grazie al Prof. Giuseppe Scapigliati, per l'opportunità che mi sta offrendo.

Grazie alla Dr.ssa Elisa Randelli, una grande amica, per gli importanti consigli e l'aiuto che mi ha sempre offerto.

Grazie al Dr. Massimo Tiberi per la collaborazione scientifica per la produzione delle cellule DLEC di spigola.

Grazie alle mie care colleghe, la Dr.ssa Maria Cristina Belardinelli, la Dr.ssa Laura Guerra e la Dr.ssa Viviana Scala, per ogni momento passato insieme nel laboratorio.

Grazie al Dr. Jun Zou, al Dr. Sam Martin, al Prof. Chris J. Secombes dello Scottish Fish Immunology Research Centre (SFIRC) of Aberdeen (UK) per l'ospitalità e il grande spirito di collaborazione alla mia ricerca.

Grazie alla Dr.ssa Susan Costantini e al Dr. Angelo M. Facchiano dell' Istituto di Scienze dell'Alimentazione del CNR di Avellino per la collaborazione alla realizzazione della struttura 3D dell'IFN di spigola.

Un Grazie Speciale alla mia FAMIGLIA. A mio marito Danilo, per tutto l'amore che mi dà, per la complicità che ci lega, e per avermi regalato la gioia più grande: essere madre. Al mio piccolo Riccardo, che ancora deve nascere e che ha partecipato "attivamente" alla stesura di questa tesi.

Grazie a mio padre Geremia e a mia madre Costanza, per aver sempre creduto in me e per avermi insegnato tutto ciò che mi ha permesso di esser la persona che oggi sono.

Un grazie lo meritano anche i miei tre adorabili cani: Chadeau, Yambo e Billy, per i momenti spensierati passati in loro compagnia, necessari per ricaricare le batterie durante questi 3 faticosi anni.

Grazie...forse un grazie lo merito anch'IO...per non essermi mai arresa ed aver sempre creduto nel mio lavoro!!!

Grazie a tutti!!!